



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA AMBIENTAL

EFFECTO DEL COMBUSTÓLEO SOBRE LA ESTRUCTURA TRÓFICA DE LA COMUNIDAD DE

AMEBAS DE VIDA LIBRE DEL SUELO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M en C SANDRA CORTÉS PÉREZ

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR: DR. RONALD FERRERA-CERRATO
COLEGIO DE POSTGRUADOS, CAMPUS MONTECILLO, COLPOS

DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015.



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
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de agosto de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **CORTÉS PÉREZ SANDRA**, con número de cuenta **95023706**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL COMBUSTÓLEO SOBRE LA ESTRUCTURA TRÓFICA DE LA COMUNIDAD DE AMEBAS DE VIDA LIBRE DEL SUELO"**, realizada bajo la dirección del **DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA**:

Presidente: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH
Vocal: DR. VICTOR JOAQUIN JARAMILLO LUQUE
Secretario: DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
Suplente: DR. HOMERO JULIO EUDES CAMPO ALVES
Suplente: DR. MIROSLAV MACEK

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de octubre de 2015.

María del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

PRIMERAMENTE AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM.

AL CONACYT (REGISTRO NO. 175562) Y AL COMECYT POR LAS BECAS RECIBIDAS DURANTE EL DOCTORADO

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. RONALD FERRERA-CERRATO
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

ÍNDICE

SIGNIFICADO DE LAS SIGLAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
EFFECTO DEL COMBUSTÓLEO SOBRE LA ESTRUCTURA TRÓFICA DE LA COMUNIDAD DE AMEBAS DE VIDA LIBRE DEL SUELO	5
INTRODUCCIÓN.....	5
PERTURBACIÓN Y MICROORGANISMOS DEL SUELO.....	9
PERTURBACIÓN ANTROPOGÉNICA DEL SUELO.....	10
FUNCIÓN DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE DEL SUELO.....	12
LAS REDES TRÓFICAS MICROBIANAS DEL SUELO	15
FUNCIONALIDAD DE LAS ESPECIES MICROBIANAS	16
<i>Diferentes categorías de diversidad funcional microbiana del suelo.</i>	17
<i>Obtención de la energía en las amebas de vida libre</i>	19
<i>Grupos tróficos de AVL del suelo</i>	19
<i>Amebas que se alimentan de algas</i>	20
<i>Amebas bacterívoras</i>	21
<i>Amebas que se alimentan de otros protozoos, hongos y levaduras</i>	21
<i>Amebas omnívoras</i>	22
<i>Estabilidad y perturbación del suelo</i>	22
JUSTIFICACIÓN.....	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
<i>Objetivos particulares:</i>	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
<i>Descripción de los microcosmos</i>	27
<i>Perturbaciones del suelo</i>	27
<i>Identificación y estimación de amebas</i>	28
DETERMINACIÓN DE GRUPOS TRÓFICOS DE AVL	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	30
MODELOS DE LA RED TRÓFICA	31
RESULTADOS.....	32
NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) DE AVL DEL SUELO EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	32
RIQUEZA DE ESPECIES DE AMEBAS DESNUDAS DE VIDA LIBRE EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	34
<i>Especies más frecuentes durante el estudio</i>	39
<i>Familias que se registran 1 día después de la perturbación por contaminación por combustóleo y n-hexano</i>	40
RIQUEZA DE ESPECIES QUE INTEGRAN LOS GRUPOS TRÓFICOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.....	41
<i>Frecuencias de especies que integran las comunidades de AVL bacterívoras</i>	41
<i>AVL-P (que se alimentan de otros protozoos) en todos los tratamientos</i>	43

<i>Especies que integran las comunidades de AVL-A (Alguívoras)</i>	44
<i>Especies que integran las comunidades de AVL omnívoras (O), fungívoras (F) y las que se alimentan de levaduras (L)</i>	44
DIVERSIDAD TRÓFICA	45
SIMILITUD ENTRE LAS COMUNIDADES DE AVL DE LOS DIFERENTES MICROCOSMOS	45
SIMILITUD ENTRE LOS GRUPOS TRÓFICOS DE LAS COMUNIDADES DE AVL EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	46
<i>Similitud entre las comunidades de AVL-B de los diferentes tratamientos</i>	46
<i>Similitud entre las comunidades de AVL-P de los microcosmos</i>	47
<i>Similitud entre las comunidades de AVL alguívoras (A) de los diferentes microcosmos</i>	47
<i>Similitud entre las comunidades de AVL omnívoras (O) de los microcosmos</i>	48
<i>Similitud entre las comunidades de AVL fungívoras (F) y que se alimentan de levaduras (L) de los microcosmos</i>	48
DISCUSIÓN	52
EFECTO DE TRES FACTORES DE PERTURBACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURACIÓN TRÓFICA DE AVL.....	57
EFECTO DE LA PERTURBACIÓN SOBRE LAS REDES TRÓFICAS DE ADVL DEL SUELO	60
CONCLUSIÓN	62
.....	63
REFERENCIAS	68
ANEXO 1. TROPHIC STRUCTURE OF AMOEBA COMMUNITIES NEAR ROOTS OF <i>MEDICAGO SATIVA</i> AFTER CONTAMINATION WITH FUEL OIL NO. 6	79
ANEXO 2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	93
ANEXO 3 REFERENCIAS DE LOS GRUPOS TRÓFICOS	105
ANEXO 4 FOTOGRAFÍAS DE AMEBAS DESNUDAS DE VIDA LIBRE OBSERVADAS EN LOS MICROCOSMOS.	110
AMEBAS DEL SUELO PERTURBADO MECANICAMENTE	111
AMEBAS DEL SUELO CONTAMINADO CON COMBUSTÓLEO.....	119
AMEBAS DEL SUELO CONTAMINADO CON HEXANO.....	130

Índice de figuras

Figura 1. Número más probable (NMP) de las AVL de las muestras de suelo de cada microcosmos.....	33
Figura 2. Riqueza de especies de las comunidades AVL en los microcosmos con suelo desnudo y con <i>Medicago sativa</i>	34
Figura 3. Riqueza de especies de AVL por cada grupo trófico en los microcosmos..	40
Figura 4. Frecuencias de aparición de las especies de amebas de cada uno de los tratamientos.	41
Figura 5. Frecuencias de aparición de las especies de AVL por cada grupo trófico en los microcosmos.....	43

Figura 6. Análisis grupal entre las comunidades de amebas de vida libre (AVL) en los diferentes tratamientos.....	46
Figura 7. Análisis grupal entre las comunidades tróficas de las comunidades de AVL del suelo no contaminado, contaminado con combustóleo, contaminado con hexano y con <i>Medicago sativa</i>	50
Figura 8. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación.	63
Figura 9. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 30 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación..	64
Figura 10. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 30 después de someter al suelo a 3 diferentes factores de perturbación y con <i>Medicago sativa</i>	65
Figura 11. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 60 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación.	66
Figura 12. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 60 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación, con <i>Medicago sativa</i>	67

Significado de las siglas

AVL amebas de vida libre

AVL-F amebas fungívoras

AVL-A amebas alguívoras

AVL-B amebas bacterívoras

AVL-L amebas que se alimentan de levaduras

AVL-O amebas omnívoras

AVL-P amebas que se alimentan de otros protozoos

B fósforo

C carbono

CC capacidad de campo

D' índice de diversidad de Simpson

GT grupos tróficos

H' índice de diversidad de Shannon-Wiener

MO materia orgánica

N nitrógeno

ND amebas sin grupo trófico definido

NMP número más probable

PPM producción primaria microbiana

RE riqueza de especies

RTMS redes tróficas microbianas del suelo

S0 microcosmos sometidos a una perturbación mecánica después de un período de 24 horas

S30 microcosmos sometidos a una perturbación mecánica después del periodo de 30 días

S60 microcosmos con suelo desnudo con combustóleo después de 60 días

SC0 microcosmos contaminados con combustóleo después de 24 horas

SC30 microcosmos contaminados con combustóleo después de un periodo de 30 días

SC60 microcosmos contaminados con combustóleo después de 60 días

SCP30 microcosmos contaminados con combustóleo + *Medicago sativa* después de un periodo de 30 días

SCP60 microcosmos contaminados con combustóleo + *Medicago sativa*

SD suelo desnudo

SH0 microcosmos contaminados con hexano después de 24 horas

SH30 microcosmos contaminados con hexano después del periodo de 30 días

SH60 microcosmos contaminados con combustóleo después de 60 días

SHP30 microcosmos contaminados con hexano + *Medicago sativa* después de un periodo de 30 días

SHP60 microcosmos contaminados con hexano + *Medicago sativa*

SP suelo con planta

SP30 microcosmos con suelo no contaminado + *Medicago sativa*

SP60 microcosmos no contaminados + *Medicago sativa*

v grados de libertad

χ^2 chi cuadrada

RESUMEN

La estructuración de las redes tróficas está determinada por la variedad de los recursos alimenticios en cualquier sitio. Las estrategias para la obtención de nutrientes y energía para la supervivencia permite la clasificación de los organismos en grupos tróficos para entender cómo se lleva a cabo el ciclo de los nutrimentos. Las redes tróficas están reestructurándose constantemente y dependen de los cambios ambientales que están llevando a cabo, sobre todo cuando tales cambios son causados por perturbaciones fuertes. Los suelos con una perturbación física por la agricultura simplifican las redes tróficas microbianas, situación que se agrava cuando ocurren derrames de hidrocarburos. Los efectos combinados de estas perturbaciones son el empobrecimiento de nutrientes y materia orgánica asimilable, así como la pérdida de propágulos y / o disminución de las funciones de los microorganismos y sus actividades microbianas. Por ello nos preguntamos cómo cambiaría la estructura trófica de la comunidad amebas de un suelo cultivado inmediatamente después de la contaminación con combustóleo y hexano y cómo esta comunidad se reestructuraba después de 30 y 60 días de plantar *Medicago sativa* (Leguminosae), teniendo como control un suelo sin planta. Utilizamos 45 microcosmos para rastrear los efectos de las diferentes fuentes de perturbación: 1) la perturbación mecánica, 2) la contaminación con 50 000 ppm de combustóleo (Apéndice 1) y 3) la contaminación con n-hexano. Cada tipo de perturbación generó diferentes comunidades y redes tróficas de amebas del suelo. El grupo bacterívoro tuvo un aumento significativo en la riqueza de especies 24 horas después del contacto con combustóleo, sin embargo, la comunidad de amebas del suelo contaminado con hexano sufrió extinciones locales de algunas especies de varios grupos tróficos. La presencia de *M. sativa* tuvo un efecto positivo en la comunidad de las amebas y en la estructura de la red trófica de todos los tratamientos en el tiempo, donde los grupos tróficos de amebas fueron más diversos en la zona de las raíces después de 60 días. El hexano causó el mayor impacto negativo sobre la riqueza de especies y la cantidad de amebas de vida libre. La presencia de *M sativa* permitió la estructuración de una red trófica en la zona de las raíces, que hacen de esta leguminosa un buen candidato para métodos de biorremediación.

ABSTRACT

Food web structuration is determined by the variety of food sources in any place. The strategies for obtaining nutrients and energy for survival allows the classification of organisms by trophic groups in order to understand the hubs and organismal dependencies producing the nutrient cycling. Food webs are constantly reforming as environmental changes are taking place, especially when such changes are caused by strong perturbations. Soils physical perturbation by agriculture simplify the microbial food webs that is worsen when hydrocarbon spills happen. The effects of this combined perturbation are also the impoverishment of nutrients and assimilable organic matter, as well as the loss of microbial propagules and / or decrease of microorganisms' functions and their activities. We wonder how the trophic structure of amoebae community changes right after contamination of a cultivated soil with fuel oil No 6 or hexane and how this community get restructured after 30 and 60 days when *Medicago sativa* (Leguminosae) is planted as well as when soil remained unplanted. We set up 45 microcosms to trace the effects of different perturbation sources: 1) mechanical disturbance, 2) contamination with 50 000 ppm fuel oil. No. 6 (Appendix 1) and 3) contamination with n-hexane. Every type of disturbance generated different soil amoebae communities and food webs. The bacterivorous group had a significant increase in species richness 24 hours after contact with fuel oil no. 6, contrary to the hexane contaminated soil, whose several trophic groups suffered local extinctions. The presence of *M sativa* had a positive effect on amoebae community and food web structure in all treatments over time, where trophic groups of amoebae were more diverse in the root zone after 60 days. Hexane caused the greatest negative impact on the species richness and quantity of free-living amoebae and other microorganisms. The presence of *M sativa* allows the structuration of a more complex food web in the root zone, which make this legume a good candidate to plant for bioremediation purposes.

Efecto del combustóleo sobre la estructura trófica de la comunidad de amebas de vida libre del suelo

Introducción

El suelo es un sistema con una gran diversidad de microambientes, dentro de los cuales los “**hots spots**” o puntos calientes se deben a la disposición de recursos para el desarrollo de los microorganismos (Figura 1). El suelo es una matriz muy heterogénea, especialmente cuando hay raíces presentes. Este es uno de los **hots spots** más importantes del suelo conocido como rizósfera. Esta zona se localiza en la región donde el suelo se encuentra en contacto directo o bajo la influencia cercana de las vellosidades radiculares de la planta. En esta región se llevan a cabo una gran cantidad de relaciones entre la planta, el suelo y la microbiota (Sundin *et al.*, 1990; Williamson & Gleason, 2003) por medio de un intercambio de una gran diversidad de compuestos de alto y bajo peso molecular, los que llegan a sobrepasar el 40% de la biomasa de la planta en peso seco (Krome *et al.*, 2009; Lynch & Whipps, 1990; Raynaud, 2010). La estructura del suelo también depende de la actividad fisiológica de los organismos que lo habitan y que se fomenta durante la interacción entre microorganismos-planta, en especial de sus segregaciones celulares, pues estas excreciones sirven como los principales agentes cementantes que ayudan a la agregación de las partículas de suelo. El aumento en la biomasa microbiana en la zona de raíces es una indicación de que las relaciones biológicas entre los microorganismos tienden a incrementarse en este microambiente (Sundin *et al.*, 1990).

La raíz de la planta tiene la potencialidad de transformar las características del suelo que la rodea, un ejemplo de ello es la capacidad de la raíz de incrementar la cantidad de oxígeno a su rededor, lo que facilita las condiciones para que se lleve a cabo el metabolismo de los

microorganismos aerobios. Los microorganismos metabolizan los recursos que pueden captar en un espacio y en un tiempo determinado. Así, la diversidad de microorganismos está condicionada por el microambiente que los rodea y en donde se pueden desarrollar sus poblaciones. El metabolismo de los organismos mantiene el flujo constante de compuestos orgánicos y de energía en el sistema, aunque esta actividad puede ser afectada por los factores ambientales y perturbaciones que pueden modificar la estructura de las comunidades dentro del suelo.

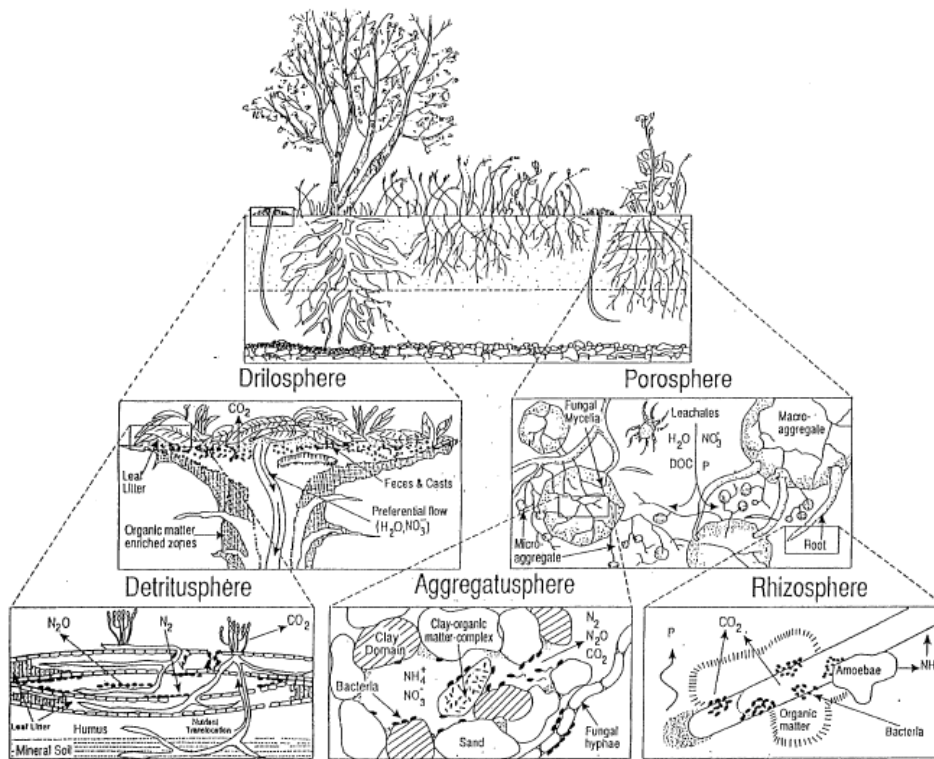


Figura 1. "Esferas" de influencia, siendo "hot spots" de actividad del suelo. "Drilosfera," parte de la tierra que es influenciada por la lombriz de tierra; porosfera, la porción que contiene películas de agua y canales entre los agregados;" Los micro y macroagregados contienen bacterias, hongos, así como micro-y macrofauna; "rizosfera, región de suelo directamente influenciada por la raíz"; detritusfera cubierta de hojarasca, fermentada y humificada, que son excelentes para los microorganismos (incluyendo micorrizas) y fauna que se alimentan de estos residuos (tomado de Coleman, 1994).

Las redes tróficas microbianas del suelo tienen una participación importante en el mecanismo de transformación y transferencia de Materia Orgánica (**MO**) entre los microorganismos y la planta. Las especies han desarrollado toda una serie de estrategias de adquisición de materia (tanto en su forma orgánica como inorgánica) y de energía a partir de los recursos que se encuentren en su hábitat. Los mecanismos iniciadores de la transmisión de energía son las interacciones simbióticas que incluyen al co-metabolismo, el sintrofismo y la depredación. (Wardle, 2002). Cada uno de estos procesos se lleva a cabo por una gran diversidad de grupos microbianos, donde se engloban especies que explotan un recurso básico común de una forma similar o **redundante**.

La planta se mantiene en contacto con la microbiota por medio de una gran diversidad de exudados que segrega su raíz. Estos exudados sirven como atrayentes y/o repelentes de una gran diversidad de microorganismos que viven en la proximidad de las raíces (Westover & Bever, 2001). Dichos compuestos posibilitan o limitan la interacción entre una gran cantidad de especies de bacterias y hongos (micorrízicos) con la planta, permitiendo a algunas especies de microorganismos colonizar el suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz (Bonkowski *et al.*, 2001). Este fenómeno afianza las relaciones mutualistas entre la planta y esta microbiota, ya que solo ciertas especies de bacterias y hongos aportan compuestos moleculares que sirven a la planta, la que a su vez contribuye con sus exudados radiculares que sirven como alimento o compuestos básicos para ciertas especies de microorganismos. Todo esto da como resultado un **“trueque biológico” de moléculas orgánicas**.

Cuando las relaciones entre las especies implicadas son benéficas, la consecuencia es un incremento de la biomasa de los microorganismos y de la planta. Este fenómeno estimula la integración de otras especies microbianas que tienen una relación directa o indirecta con la planta. Tal es el caso de especies parásitas (fitoparásitos) y depredadoras de microorganismos. Estos micro-depredadores utilizan mecanismos de quimiotaxis, en su mayoría desconocidos, pero que se reconocen como mecanismos de detección de sus

presas potenciales¹ que habitan los alrededores de la raíz (Levchenko & Iglesias, 2002; Pilon-Smits, 2005). Una gran diversidad de micro depredadores de segundo, tercer o *n* orden se dan cita en la rizósfera gracias al incremento de la biomasa de sus presas. El aumento en la complejidad de las redes tróficas por la incorporación de otras especies intensifica el consumo de una cantidad mayor de recursos, lo que reduce la pérdida de energía y acelera la velocidad del reciclaje de los nutrientes (Ingham *et al.*, 1985).

La importancia de la relación depredador-presa radica en la liberación de **N** y **P** en forma de desecho (nitratos y amonio en el caso del **N** y como fosfatos en el caso del **P**). Compuestos que se encontraban acumulados en la biomasa de sus presas y que al ser liberados rápidamente se reciclan por la misma comunidad de microorganismos que viven con la planta (Clarholm, 1985; Bonkowski *et al.*, 2001).

Los protozoos del suelo son un grupo importante de depredadores de una gran diversidad de microorganismos (Schonborn, 1992). Dentro de sus presas preferidas se encuentran las bacterias (Coleman, 1994). De forma general, se pueden distinguir varios grupos morfológicos de protozoos, tales como flagelados, ciliados, amebas y los ameboflagelados. Cada uno de estos grupos tiene una gran diversidad de estrategias para la obtención de energía.

Dentro de los protozoos microvíboros más importantes del suelo se encuentran las amebas. Estos protozoos se pueden distinguir en tres grupos morfológicos; testadas, semitestadas y desnudas. La gran velocidad de adaptación de estos eucariontes les ha permitido poblar diferentes microhabitats y explotar una gran variedad de presas (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005). La depredación ejercida por las amebas sobre sus presas es promotora del movimiento del **N** y el **P** en formas disponibles para la microfauna y la misma planta (Darbyshire, 1994). Sin embargo, cabe destacar que estos eucariontes sirven de alimento a otros organismos edáficos como ácaros y nemátodos. Este tipo de

¹ Hay que recordar que los microorganismos se comunican y se detectan por medio de la concentración de compuestos segregados o presentes en el microambiente.

interacciones convierte a estos eucariontes en una conexión entre la microflora y la mesofauna.

Perturbación y microorganismos del suelo

La alteración de la transferencia de materia y energía ha sido tema de debate en diferentes campos de la Ecología. Un área de la ecología de conservación se enfoca en el estudio de las alteraciones provocadas por las perturbaciones y su correlación con la pérdida o cambio circunstancial de la funcionalidad de las especies, lo que altera los diversos procesos que realizan los organismos dentro del reciclaje de nutrientes del ecosistema. Así, en el caso del suelo, se ha intensificado el estudio de las alteraciones de las redes tróficas microbianas. Pues, como resultado de las perturbaciones, la diversidad presenta cambios en la proporción y la riqueza de las especies (con efectos positivos y negativos en la cantidad de biomasa en cada especie). Los cambios en los grupos tróficos de las redes alimenticias parecen depender de la intensidad y tipo de perturbación que se presente en el suelo. Asimismo, tenemos que la perturbación puede ser constante y de poca intensidad, constante y muy intensa, o el evento sucede solo una vez, pero con un nivel de intensidad alto por mencionar algunos casos.

Cada combinación de tipo e intensidad de la perturbación puede repercutir en la actividad y la diversidad de los grupos funcionales. En los casos de alteraciones intensas, la complejidad de la estructura de la comunidad sufre un efecto negativo por la pérdida de la riqueza de especies aunque la actividad del sistema puede permanecer por la presencia de las especies con funciones **redundantes** (Walker, 1992; Cowling et al, 1994; Chapin & Körner 1996). Sin embargo, el efecto no es homogéneo para todas ellas, pues algunas especies pueden verse beneficiadas por la perturbación (Pickett, *et al.* 1989). Esto permite analizar a la comunidad desde un punto de vista funcional por medio de la organización de las agrupaciones de estas especies en gremios tróficos.

Considerando entonces a la comunidad como una unidad estructurada, organizada y jerarquizada que se desarrolla y funciona dentro del ecosistema en un mismo espacio y tiempo, podemos observar que las comunidades microbianas están adaptadas 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; Odum, *et al.* 1979). Muchas de estas variaciones están dictadas por los pulsos de recursos (Scholes *et al.*, 2005), los cuales son aportes energéticos que aprovechan los organismos en un tiempo y un espacio particular de acuerdo con su tiempo generacional (Konopka, 2000).

Perturbación antropogénica del Suelo

Las actividades antropogénicas pueden cambiar por completo la estructura de las unidades fundamentales que conforman a los ecosistemas y a las comunidades (Pickett, *et al.* 1989). Las alteraciones debidas al uso agrícola del suelo, o por explotación de recursos energéticos, tienen impacto negativo directo sobre nuestra sociedad. En el caso de los recursos petroleros, debido a la contaminación por hidrocarburos, ya sea durante su explotación o su transporte.

El suelo utilizado para la agricultura 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, que repercuten sobre la microfauna que lo habita. La destrucción de los horizontes y la alteración física del sustrato del suelo genera estrés en las comunidades que se desarrollan en él. El arado del suelo tiene el fin de evitar la pérdida de agua, lo que ocasiona una reestructuración por la destrucción de los macroagregados y aumentar el espacio entre ellos, afectando la continuidad en la porosfera. Las propiedades que pueden verse afectadas son la estructura, un incremento en la densidad real y un decremento en la porosidad de la matriz del suelo, por mencionar

los más importantes (Spedding *et al.*, 2004; Bowman *et al.*, 1990). La disminución de la porosidad provoca una alteración del hábitat de los microorganismos, reduciendo la posibilidad del desarrollo de varias especies. Un ejemplo es el caso de las amebas testadas, que dependen significativamente de la porosidad del suelo, debido a que la testa es una estructura rígida que limita sus actividades en el espacio entre los agregados. Sin embargo, muchas especies de microorganismos pueden sobrevivir en los pequeños espacios dentro de los agregados, como es el caso de las bacterias y los grupos de protozoos, tales como amebas pequeñas, ameboflagelados, ciliados pequeños, flagelados y nanoflagelados.

Otros efectos importantes sobre el suelo son las alteraciones en sus propiedades químicas debido principalmente a la adición de materia orgánica y/o uso frecuente de abonos, causando que las concentraciones de **C** (carbono), **N**, y **P** permanezcan más tiempo en el suelo. En conjunto todos estos factores están correlacionados con el cambio de la diversidad de la microflora y la microfauna de los suelos de cultivo (Sánchez-Moreno, 2007; Coleman, *et al.*, 2002; Buckley & Schmidt, 2001). Algunas estrategias para la recuperación del suelo se basan en dejarlo “reposar”, permitiendo con ello la formación de horizontes, ya sea por la influencia de la gravedad o por la acción de las raíces de las plantas.

El entendimiento de los procesos de perturbación del suelo, y por consecuencia de su uso, es indispensable para desarrollar alternativas de recuperación y manejo de este recurso. Para ello se ha recurrido a estudiar cómo se pueden ver afectadas las funciones que realizan los microorganismos. La determinación de estos cambios es posible si se agrupa a las especies por sus hábitos alimenticios. Lo que permite desentrañar la magnitud de los efectos que diversos tipos de perturbación pueden causar en la comunidad microbiana del suelo, desde una perspectiva de las relaciones y su impacto en el reciclaje de los principales nutrimentos. Si se desea entender con detalle cómo se llevan a cabo el reciclaje de los nutrimentos en los suelos perturbados, es imprescindible saber quiénes están participando en él y cuál es su importancia en el mantenimiento de este proceso. Sin embargo, para la mayoría de los grupos edáficos sigue siendo necesario realizar el análisis desde un punto de

vista taxonómico tradicional. Las amebas desnudas, entre otros protozoos, viven estrechamente ligadas a la matriz edáfica donde tienen mayor importancia como depredadores de microorganismos. Las amebas cuentan con una gran diversidad de presas, pero las preferencias alimenticias tienden hacia el dominio Bacteria.

Esto nos proporciona indicios de cómo están organizadas las comunidades y cómo se establece la sistematización jerarquizada y funcional que provee a los sistemas de una mayor estabilidad a través del tiempo.

[Función de las amebas de vida libre del suelo.](#)

Hay algunas estrategias biológicas que se han utilizado para incrementar la conservación y recuperación del suelo, sobre todo con la ayuda de otros organismos, tal es el caso de las plantas, que son utilizadas como sistemas vivos de bioestimulación de las comunidades de bacterias y hongos que se encuentran en la cercanía de la raíz. El proceso de intercambio de compuestos entre plantas y microbiota (principalmente bacterias) atrae a una gran cantidad de especies de microorganismos depredadores, entre los cuales destacan las amebas (Raynaud *et al.*, 2005). Aunque estos micro-depredadores no tienen una interacción directa con los exudados radiculares (Pilon-Smits, 2005), se puede intuir su importancia en el sistema con ayuda del modelo del circuito microbiano.

Se ha observado que el circuito microbiano es muy eficiente en la transferencia de energía y **MO** (Bonkowski, 2004) ya que se aprovecha **la mayor cantidad de compuestos orgánicos** de fuentes vivas o no vivas. Este fenómeno está ligado a la biomasa y número de especies de microorganismos que componen la red trófica donde la eficiencia de la transferencia de MO incrementa cuando hay una gran cantidad de especies. Esto puede potencializar la diversidad de las funciones de los microorganismos, lo que también es conocido como paradoja del circuito microbiano, ya que a diferencia de las redes tróficas de macroscópicas, donde solo se pueden sostener pocos depredadores de segundo y tercer orden, las redes

tróficas microbianas tienen la capacidad de sostener una gran cantidad de especies de hábitos depredadores.

Para entender cuál es la función de las amebas dentro del sistema edáfico es necesario agruparlas por sus tendencias alimenticias. El uso de este tipo de agrupaciones relaciona la estructura por especies de amebas con la función que cada especie puede estar llevando a cabo en el ecosistema. Algunos autores han agrupado a los protozoos provenientes de sistemas acuáticos, edáficos y perturbados en diferentes grupos tróficos (bacterívoros/detrívoros, saprotrofos, alguívoros, omnívoros y depredadores) (Coûteaux, 1976; Bahr, 1982; Hawkins & Sedell, 1981; Pratt & Cairns, 1985). Por lo tanto los cambios en la estructura de la comunidad pueden tener relación con los cambios de eficiencia en las funciones y servicios del sistema, por lo menos a la escala de la región rizosférica. Cortés-Pérez (2009) encontró una extensa variedad de especies de amebas en suelo de cultivo de maíz, donde observó una tendencia en el aumento y dominancia de especies bacterívoras. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los suelos desnudos y con cubierta vegetal, siendo este último el que tuvo la mayor cantidad de especies.

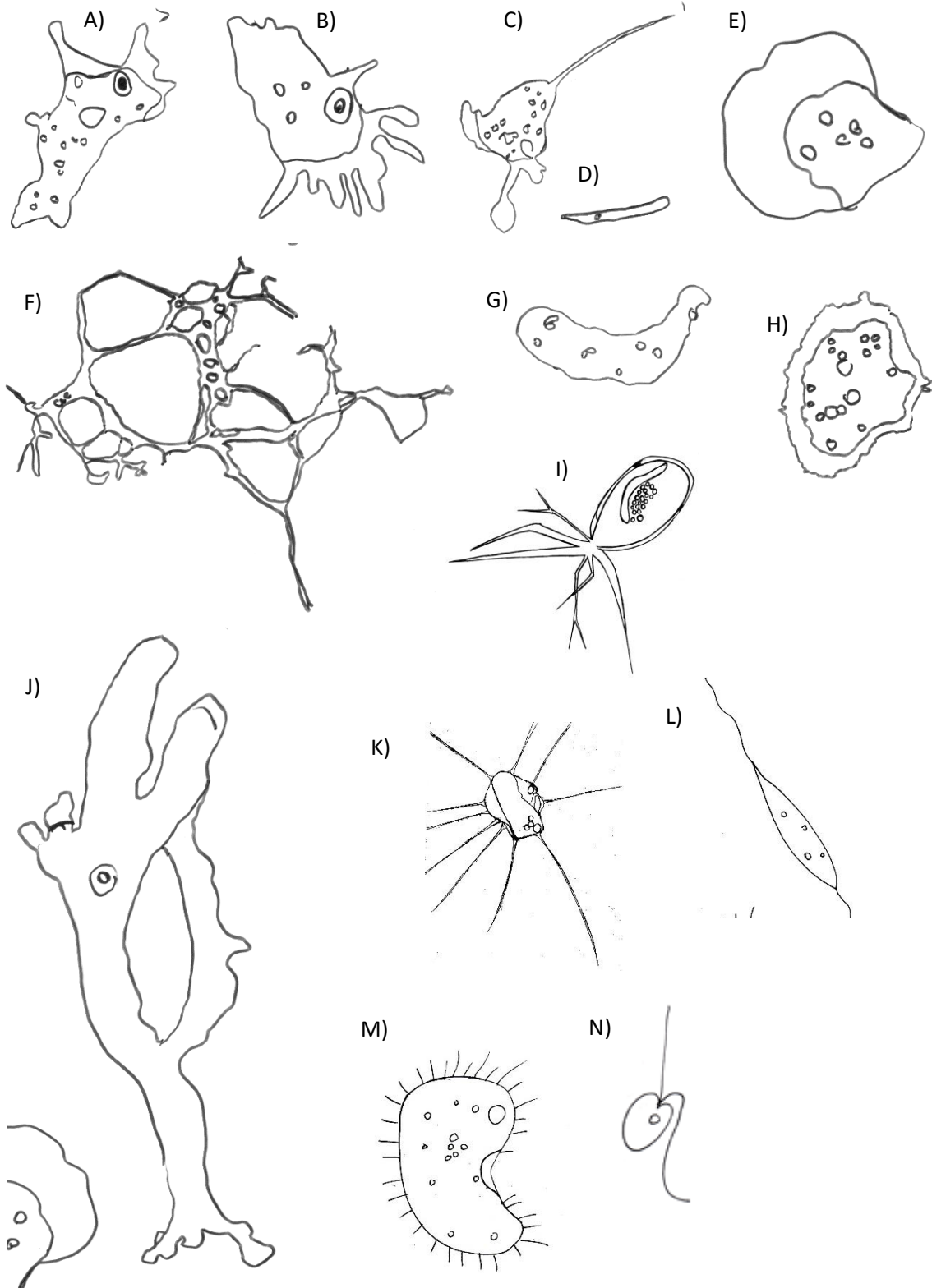


Figura 2. Tipos morfológicos de protozoos de vida libre del suelo. A) *Korotnevelia*, B) *Vexillifera*, C) Ameboflagelado (*Breviata*), D) *Hartmannella*, E) *Vannella*, F) *Biomyxa*, G) *Saccamoeba*, H) *Cochliopodium*, I) *Trinema*, J) *Trichamoeba*, K) *Nuclearia*, L) Flagelado, M) Ciliado y N) *Bodo*.

Las redes tróficas microbianas del suelo

Para entender cómo se desarrollan y/o cambian las funciones de las comunidades es necesario desarrollar modelos generales, pero muy prácticos, de “las **redes tróficas**”. Estos modelos nos permiten intuir las rutas del flujo de energía y la transformación de la materia basándose en la interacción que existe entre los consumidores y sus recursos (Minoshima *et al.*, 2007). El modelo inicial implica 3 diferentes niveles; producción primaria, consumidores y descomponedores (Coleman & Crossley, 1996; Rossberg, 2013). En este último nivel introdujeron a los microorganismos como una caja negra, donde se lleva a cabo una gran diversidad de funciones e interacciones microbianas, muchas de ellas permanecen aún desconocidas.

Los descomponedores son microorganismos heterótrofos que pueden absorber nutrientes por ósmosis (**osmotrofia**), tales como algunas bacterias, hongos y protozoos. Los detritívoros o saprófagos obtienen su energía de materia orgánica (**MO**) descompuesta. Sin embargo, falta describir en detalle las interacciones complejas que tienen lugar en las **Redes Tróficas Microbianas del Suelo (RTMS)** (Richards, 1987).

Las **RTMS** pueden sostener un número mayor de especies consumidoras en comparación con las redes macroscópicas, pues los microorganismos disipan menos energía en forma de calor, por lo que se puede sostener un mayor número de especies. Esto se conoce como la paradoja del “**Circuito microbiano**”, pues el reciclaje de materia y la transformación de energía son más eficientes entre mayor sea la diversidad de heterótrofos en la red trófica microbiana del suelo (Coleman, 1994).

El **cometabolismo** es una relación simbiótica que se expresa en el circuito microbiano. En esta simbiosis los microorganismos modifican y/o degradan compuestos muy complejos, normalmente antropogénicos, dejando los nutrimentos y estructuras carbonadas asimilables disponibles para otros microorganismos (Alexander, 1967). Con ello se produce

un mayor aprovechamiento de recursos y poca pérdida de energía (Bonkowski, 2004) en los diferentes niveles de la **RTMS**.

La **redundancia** de especies permite al ecosistema soportar perturbaciones y aminorar sus efectos sobre su funcionamiento en el reciclaje de nutrimentos y la **MO**. Ya que existe la posibilidad de que las especies afectadas por la perturbación sean remplazadas por otras con funciones similares (Johnson *et al.*, 1996).

Funcionalidad de las especies microbianas

La **biodiversidad funcional** se define como el conjunto de especies que realizan las funciones dentro del ecosistema en el proceso de flujo de energía y reciclaje de nutrientes. El flujo de energía ocurre principalmente por dos procesos: por la descomposición de la **MO** que proviene de organismos muertos y la descomposición de **MO** que llevan a cabo los consumidores heterótrofos a partir de otros organismos (Bengtsson *et al.*, 1995). Así, podemos congrega a los taxa por dietas similares y sus hábitos depredadores, por mencionar algunos ejemplos (Gardner *et al.*, 1982). Es necesario remarcar que una especie puede realizar *n* funciones. Sin embargo, solo podemos reconocer un conjunto limitado de funciones y en función de estas últimas es que agrupamos a las especies que tengan una función equivalente. Esto se conoce como **grupo funcional** y se define como un conjunto de diferentes especies que afectan de forma similar una o varias propiedades y/o procesos del ecosistema (Gardner *et al.*, 1982).

Diferentes categorías de diversidad funcional microbiana del suelo.

Los microorganismos se clasifican en dos categorías fundamentales; **autótrofos** y **heterótrofos**. En la primera categoría la fuente de carbono (**C**) es inorgánica, y en la segunda el **C** proviene de una fuente orgánica (Stanier *et al.*, 1977). Ahora se sabe que los organismos **autótrofos** son dependientes de ciertos factores de crecimiento de origen microbiológico. La energía obtenida a partir de una fuente inorgánica genera la base para otra división (además de los microorganismos **fotosintéticos**); los **quimiolitoautótrofos**. Estos microorganismos obtienen su energía a partir de las reacciones químicas de oxidación - reducción de los minerales.

La vegetación se encarga de transformar la energía lumínica en biomasa, por ello se les conoce como **productores primarios**. En las **RTMS** la producción primaria se lleva a cabo por dos vías, la fotosíntesis y por la oxidación-reducción de compuestos minerales, por lo que hay diferentes categorías nutricionales.

Como parte de los **quimioheterotrofos** tenemos a los **osmótrofos** (bacterias, hongos, flagelados y ameboflagelados). Sin embargo, muchos protozoos son de hábitos fagótrofos (ingesta de partículas). Alternativamente los organismos que requieren alimentarse de otros organismos se conocen como **biotrofos** o mejor conocidos como **heterótrofos**. En esta última categoría se pueden englobar los protozoos **depredadores**, así como algunos **parásitos** (Richards, 1987).

Las **AVL** son microorganismos **heterótrofos** que incluyen a los **microbívoros** y **carnívoros**. Los protozoos pueden ser **autótrofos**, pero la mayoría como es el caso de las **AVL** pertenecen a los **microbívoros** (Richards, 1987; Coûteaux & Darbyshire, 1998).

Las **RTMS** se componen de los siguientes **niveles generales** (Richards, 1987; Nisbet, 1984):

- **Producción Primaria Microbiana (PPM)**: En este nivel los microorganismos **autótrofos** y **quimiolitoheterótrofos** se encargan de la acumulación de la **MO** utilizando como fuente de energía la luz y/o los minerales.
- **Consumidores**. Son los microorganismos heterótrofos que obtienen su **MO** a partir de organismos vivos.

La **PPM** del subsuelo está distribuida en pequeños compartimentos o parches microscópicos. Cuando se lleva a cabo por procariontes y eucariontes unicelulares fotosintéticos ocurre en los primeros milímetros de la superficie. Aunque el suelo parezca una matriz sólida y opaca, las ondas de luz pueden penetrar una corta distancia antes de ser absorbidas por los minerales como los óxidos de hierro en una longitud de onda de 860 nm y por las arcillas en una longitud de onda de hasta 220 nm (Karnieli *et al.*, 1999). La **MO** llega a absorber longitudes de onda de 1700 a 2300 nm (Ben-Dor *et al.*, 1997). El agua absorbe longitudes de onda de 1900 a 1400 nm. Todos estos elementos reducen la amplitud de las longitudes de onda, lo que genera un gradiente cromático. Sin embargo, permiten la llegada de un espectro adecuado para que se lleve a cabo la fotosíntesis de manera inconspicua (desde nuestra percepción) ya que sucede a nivel microscópico. Las microalgas de tipo eucarionte se desarrollan en los primeros centímetros (2 cm) del suelo donde haya la suficiente humedad y luz (Lund, 1947). Los géneros más comunes pertenecen a las familias **Chlorophyceae**, **Bacillariophyceae** (diatomeas), **Myxophyceae**, **Xanthophyceae** y **Chrysophyceae**. Las cianobacterias tienen la capacidad de colonizar sistemas edáficos desérticos donde pueden iniciar la formación de las comunidades de costras biológicas, o formar biopelículas endolíticas mono-específicas (Walker & Pace, 2007).

Así, los microorganismos **fotoautótrofos**, **fotoheterótrofos**, **quimioautótrofos**, **quimioheterótrofos**, son los que se encargan de la fijación de la energía y su acumulación en **MO**. Estos microorganismos pertenecen al primer nivel en la **RTMS**. La transferencia de esta biomasa acumulada a otros niveles tróficos, se lleva a cabo por los **microbívoros** del suelo (Richards, 1987), donde las **AVL** son un grupo muy importante de microorganismos depredadores.

Obtención de la energía en las amebas de vida libre

La clasificación primaria de la forma de como obtienen energía las **AVL** se determina por la presencia autógena, no autógena, o ausencia de cloroplastos. Sin embargo, la mayoría de las **AVL** conocidas son **heterótrofas**. Su alimento puede ser variado; algas eucariontes, algas procariontes, bacterias, protozoos, hongos, levaduras y otros eucariontes multicelulares, inclusive **MO** disuelta en el ambiente. La forma cómo capturan su alimento es por medio de la **fagocitosis** y la **pinocitosis** (Nisbet, 1984).

Grupos tróficos de AVL del suelo

Las **AVL** se pueden agrupar por sus tendencias alimenticias en: **bacterívoras**, **detritívoras**, **alguívoras**, **fungívoras**, **omnívoras**, **depredadoras de otros protozoos** (Coûteaux, 1976; Bahr, 1982, Hawkins & Sedell, 1981; Pratt & Cairns, 1985; Coûteaux & Darbyshire, 1998). Para poder agrupar a las **AVL** por sus hábitos alimenticios, se debe considerar que las amebas complementan su alimentación *in situ* con otros elementos, incluidas otro tipo de presas, pero sin perder la preferencia por un grupo de presas en particular.

Las especies de **AVL** solo pueden ser aisladas cuando se les suministra el grupo de organismos que son su sustrato alimenticio principal. El aislamiento de muchas especies de amebas es poco exitoso porque se desconocen sus preferencias alimenticias, aunque hay

algunas especies, como *Leptomyxa reticulata* y *Balamuthia mandrillaris*, que pueden mantenerse por algunos días en cultivo con bacterias como única fuente de alimento, pero no incrementan el número de trofozoitos y se enquistan después de unos días (Pussard & Pons, 1976; Cabello et al, 2014). Se ha observado que algunas especies de amebas, tienen cloroplastos, pero a diferencia de las algas, estos protozoos pueden incorporar otros elementos en su dieta, como **MO** disuelta y otros microorganismos (Laybourn-Parry *et al.*, 2000).

Amebas que se alimentan de algas

Las amebas del género *Nuclearia* son conocidas por ser voraces consumidoras de algas de tipo eucarionte (Cann, 1986). Las amebas que se alimentan de cianobacterias (Huang & Wu, 1982) se les considera un grupo trófico diferente del **alguívoro** por la naturaleza de sus presas. Las microalgas forman parte del dominio Eucaria, mientras que las cianobacterias pertenecen al dominio Bacteria. Aunque los dos tipos de microorganismos poseen una pared celular, la composición química de ésta es muy diferente. Las estrategias de digestión para cada tipo de presa son diferentes, por la dificultad en la degradación de los peptidoglicanos que le dan una mayor resistencia, estabilidad y protección a las cianobacterias (Whitton & Potts, 2002). Otro factor que influye en la selección de estas presas por sus depredadores es la toxicidad, ya que las cianobacterias producen sustancias que utilizan para contrarrestar la depredación (que son producto del metabolismo secundario del nitrógeno que fijan), aunque algunas especies de **AVL** tienen la capacidad de neutralizar estos compuestos (Laybourn-Parry *et al.*, 1987). Con respecto al valor nutricional, las cianobacterias son una importante fuente de nitrógeno pues tienen la capacidad de fijarlo del ambiente a su biomasa (Whitton & Potts, 2002).

Amebas bacterívoras

Las bacterias son la fuente principal de alimento para una gran cantidad de especies de **AVL** (Clarholm, 1985). Sin embargo el dominio bacteria consta de varios reinos y tiene una gran diversidad de especies. Parte de la conducta de las amebas es la selectividad que tienen sobre las especies de presas. Por ello, es lógico concluir que las amebas tengan preferencias por cierto tipo de alimento (Griffiths *et al.*, 1994; Rønn *et al.*, 2002). Parte de este comportamiento se debe a que muchas especies de bacterias generan compuestos tóxicos para evadir a sus depredadores. Por ejemplo, la bacteria ***Serratia marcescens*** produce una exotoxina para ahuyentar a las amebas (Singh, 1942). Las bacterias del género ***Pseudomonas*** producen exotoxinas amebicidas, incluso las biopelículas de estas bacterias contienen compuestos repelentes para evitar la depredación (Abd *et al.*, 2008). El ramoneo preferencial de las amebas afecta la estructuración de las comunidades bacterianas, provocando un decremento en el número de algunas especies de β -proteobacterias, lo que permite el incremento de ***Actinobacteria***, ***Nitrospira***, ***Verrucomicrobia*** y ***Planctomycetes***. También se encontraron otros grupos de β -proteobacterias (con la capacidad de oxidar amonio) y γ -proteobacterias que no mostraron cambios en su abundancia (Rosenberg *et al.*, 2009). La modificación en la estructura de la comunidad bacteriana provoca que la comunidad de bacterívoros también cambie como consecuencia del tipo y disponibilidad de las presas.

Amebas que se alimentan de otros protozoos, hongos y levaduras

Arachnulla impatientis es una ameba que presenta preferencia por los hongos. Sin embargo, también puede alimentarse de bacterias, levaduras, cianofíceas y flagelados (Pussard & Pons, 1976). ***Trichamoeba mycophaga***, es una ameba que se alimenta solo de hongos, y posee enzimas que pueden degradar la pared de estos organismos (Chakraborty

& Old, 1986). Otros casos son las especies del género *Leptomyxa*, con la capacidad de alimentarse de otros eucariontes unicelulares y pluricelulares. Incluso, para el aislamiento de esta ameba se requieren cepas celulares eucariontes (*Balamuthia*, solo se puede cultivar en medio con células de riñón de mono). O como el caso de *Gephyramoebae* que se alimenta de pequeños protozoos (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005).

Amebas omnívoras

Las especies de **AVL** omnívoras son aquellas que tienen la capacidad de crecer con una gran variedad de presas. Este es el caso de las especies del género *Acanthamoeba*. La diversidad de presas de este género se encuentran en los dominios **Bacteria** y **Eucaria** (unicelulares y pluricelulares), tales como; bacterias (Pickup *et al.*, 2007), cianobacterias (Wright *et al.*, 1981), microalgas eucariontes, hongos (Old *et al.*, 1985) (esporas), levaduras (Nero, 1964), organismos pluricelulares (humanos) entre otros. Incluso algunas especies de este género pueden mantenerse solo con **MO** disuelta en el medio (Neff *et al.*, 1958).

Estabilidad y perturbación del suelo

El establecimiento de las plantas genera cambios en la estructura física, química y biológica del suelo que está en contacto íntimo con sus raíces, y también tiene efectos directos e indirectos sobre toda la estructura trófica edáfica que se encuentre dentro de esta zona de influencia (efecto rizosférico) (Raynaud, 2010). Así, entre más biomasa y especies de presas existan en la zona de raíces, la diversidad de sus depredadores aumentará en el sistema (Raynaud *et al.*, 2005). La red trófica del suelo toma forma por el ramoneo que ejercen los depredadores sobre la microbiota de diversos niveles tróficos.

Por tal motivo se ha comenzado a estudiar cómo la contaminación por hidrocarburos modifica la composición de las comunidades microbianas, así como de protozoos (Anderson *et al.*, 2001) y cómo la adición de nutrientes esenciales (**N** y **P**) o bioestimulación acelera la degradación o incorporación de los hidrocarburos en la biomasa de la microbiota de las zonas de raíces. El principal objetivo de la **fitorremediación** es utilizar diversas especies de plantas para hacer más eficiente la degradación de los hidrocarburos mediante la estimulación de las comunidades de bacterias y hongos hidrocarbonoclastas mediante las relaciones simbióticas que ocurren en la zona de raíces (Siciliano *et al.*, 2003). Sin embargo, se desconocen las interacciones que se llevan a cabo entre las plantas y los microorganismos en los suelos contaminados (Singh *et al.*, 2004; Pilon-Smits, 2005). Pero existen algunos indicios de que la velocidad de mineralización de los hidrocarburos incrementa como consecuencia de la depredación a la que se ven sujetas las especies hidrocarbonoclastas (Mattison *et al.*, 2005; Holubar *et al.*, 2000). Este fenómeno se relaciona con el circuito microbiano, ya que entre más especies estén interrelacionadas, la resultante será un aumento en las interacciones entre los niveles de la red y una mayor eficiencia de transformación de materia y energía (Bonkowsky, 2004). Así, la relación entre los grupos tróficos y sus presas, aumenta la velocidad de mineralización o integración de la **MO** y de los hidrocarburos en la biomasa.

Las **AVL** son protozoos que explotan una amplia gama de recursos de diferentes niveles de la **RTMS**. Los protozoos vinculan diferentes niveles tróficos, mediante la depredación y ramoneo de diversas especies de presas del edafón (Coleman, 1994). Se ha observado que las **AVL** tienen desarrollado el sentido de detección y elección de su presas (Singh, 1975). Su plasticidad ecológica les permite explotar recursos variados, así como sobrevivir a perturbaciones intensas que ocurran en su ambiente. Es necesario entender cuál es la resistencia de estos depredadores a las perturbaciones para poder modelar la transformación de la energía que proviene de **MO** recalcitrante, como es el caso de los hidrocarburos.

A su vez, las amebas sirven de alimento para otros organismos de mayor tamaño como los nemátodos o los microartrópodos. Por tal motivo, las amebas funcionan como una conexión

entre varios niveles de la red trófica (la microflora y la mesofauna) permitiendo el flujo de energía y el reciclaje de nutrientes en el ecosistema.

Estas interacciones entre la planta y los microorganismos a través de las raíces en un suelo contaminado conducen a las siguientes preguntas, **¿Cómo se reestructuran las redes tróficas de AVL después de tres tipos de perturbación (un pulso de contaminación por combustóleo, hexano y la revoltura del suelo)?** así como **¿Cuál es el efecto de *Medicago sativa* sobre la reestructuración de estas redes tróficas del suelo después de la perturbación causada por cada uno de los factores mencionados?**

Justificación

Las diferentes perturbaciones generadas por las actividades antropogénicas tienen efectos sobre las propiedades físicas, químicas, biológicas del suelo y la productividad. El edafón, como parte de las propiedades biológicas, tiene un papel fundamental sobre los procesos que implican el reciclaje de los nutrimentos que son fundamentales para la productividad del suelo. Sin embargo, en las últimas décadas se ha recurrido a la fitorremediación como base para la recuperación de los suelos perturbados por contaminación o por un exceso en el uso para la agricultura. La fitorremediación se basa en la bioestimulación de los microorganismos por medio de los exudados de las raíces de la planta, con el objetivo de incrementar la producción de biomasa y el restablecimiento de los ciclos de los nutrimentos. Ahora sabemos que las perturbaciones tienen efectos sobre las comunidades y las funciones de los procariontes, sin embargo el conocimiento es fragmentario, ya que se desconocen los efectos de estas perturbaciones sobre otros grupos del edafón. Las amebas son los depredadores de microorganismos más abundantes y diversos del suelo, su capacidad de enquistarse en circunstancias poco propicias para su desarrollo las hace un excelente modelo para comprender la reestructuración de la comunidad después de perturbaciones intensas. Para someter a prueba esta idea se implementó un estudio con microcosmos que fueron sometidos a 3 perturbaciones intensas (revoltura del suelo,

contaminación por combustóleo y contaminación por hexano), para ver el efecto sobre la comunidad de amebas de vida libre (**AVL**). Después de cada perturbación se sembró *Medicago sativa* para observar los efectos que esta pudiera tener sobre la comunidad trófica de las **AVL** después de la perturbación en 3 diferentes períodos de tiempo. Con esto, podemos observar si la presencia de la leguminosa afecta positivamente la recuperación de la estructura de los grupos tróficos (**GT**) que estructuran a la comunidad de **AVL** después de una perturbación intensa. La determinación de **GT** sirve para entender los cambios que se generan en la estructura de la comunidad de **AVL** en las etapas tempranas después de una perturbación intensa, con la meta de mejorar las estrategias de biorremediación y recuperación del suelo.

Hipótesis

1.- Si la perturbación ocasionada por diversas causas (perturbación mecánica, por contaminación de hexano y de combustóleo) tienen un efecto negativo diferencial sobre las especies que estructuran la comunidad de **AVL**, entonces el número de individuos y la riqueza de especies disminuirán después de las diferentes perturbaciones, haciendo que las proporciones y el número de Grupos Tróficos de la comunidad **AVL** sean muy bajos inmediatamente después de las perturbaciones a las que se someterá el suelo. Posteriormente si se carece de otro evento perturbador, entonces la comunidad de **AVL**, se reestructurara a través del tiempo.

2.- Si la presencia de las plantas afecta positivamente a los microorganismos del suelo, entonces la reestructuración de la comunidad y la recuperación del número total de individuos de **AVL** en el suelo rizosférico de *Medicago sativa* tomará un período menor de tiempo en comparación con el suelo desnudo que también fue perturbado. En este contexto, se espera que en todos los suelos sometidos a las perturbaciones mencionadas,

los grupos de amebas bacterívoras y omnívoras se vean favorecidos dentro de la proporción total de la riqueza de especies de la comunidad de **AVL**.

Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue **determinar los efectos de las perturbaciones generadas por un pulso de contaminación con n-hexano, con combustóleo y por revoltura del suelo sobre la estructura trófica de las AVL, así como determinar el efecto de la presencia de *Medicago sativa* sobre la estructura trófica de AVL, después de estas perturbaciones.**

Objetivos particulares:

1. Comparación del **NMP** de **AVL** entre el suelo desnudo y el suelo rizosférico de ***Medicago sativa*** de los períodos de **1, 30 y 60** días después de los 3 factores de perturbación.
2. Determinar la **frecuencia de especies** y la **similitud** de la estructura entre las diferentes comunidades de **AVL** determinadas en el suelo desnudo y el suelo con la planta de los períodos **1, 30 y 60** días después de las perturbaciones.
3. Comparar el **índice de diversidad trófica** de **AVL** del suelo desnudo y rizosférico después de las perturbaciones durante los 3 períodos de tiempo (**1, 30 y 60 días**).
4. Realizar y comparar los **modelos de las redes tróficas** después de la exposición a hexano, combustóleo y la perturbación mecánica, del suelo con ***M. sativa*** y suelo desnudo.

Materiales y métodos

Descripción de los microcosmos

El estudio se realizó con 45 de microcosmos cilíndricos con una capacidad de 1 K. A cada contenedor se le colocaron 300 g de una mezcla compuesta de suelo (peso seco) proveniente de una parcela sin cultivar (el suelo presentó una textura franco arenoso (60 % de arena, 30 % de limos y 30 % de arcillas). El suelo se humedeció con agua destilada estéril hasta llegar al 60% de su capacidad de campo (**CC**). Los microcosmos se mantuvieron a una humedad constante con agua destilada estéril y bajo condiciones de invernadero, durante 30 días. Después del período señalado, los 45 microcosmos fueron divididos en 3 lotes, cada uno con 15 microcosmos para cada tratamiento o factor de perturbación (mecánica, por contaminación con combustóleo y hexano).

Perturbaciones del suelo

Los microcosmos fueron sujetos a 3 diferentes factores de perturbación: **1) Perturbación mecánica**, donde el suelo fue sometido a una revoltura con ayuda de una pala pequeña. **2) Perturbación producida por un pulso intenso de contaminación** de 50 000 ppm de **combustóleo**, donde se utilizaron 110 ml de hexano para disminuir la viscosidad de los 15 g de combustóleo utilizados para obtener la concentración mencionada (5 g de combustóleo para contaminar cada 100 g de suelo). Se procedió a contaminar el suelo con la mezcla de combustóleo y hexano que se vertió en un recipiente de vidrio. Posteriormente se agregó el suelo de 20g en 20g mezclando vigorosamente para asegurar la homogeneidad de la muestra y se humedeció con agua destilada estéril hasta llegar al 60% **CC**. **3) Perturbación por contaminación con hexano**; se procedió a contaminar el suelo con 110 ml de hexano que se vertió en un recipiente de vidrio. Posteriormente se agregó el suelo de 20g en 20g mezclando vigorosamente, el suelo se humedeció con agua destilada estéril hasta llegar al 60% **CC** (para más detalle ir al cuadro 1). El mismo protocolo de contaminación del suelo fue utilizado para el tratamiento con hexano (110 ml).

Después de la perturbación, de cada lote de microcosmos se utilizaron 6 para sembrar 20 semillas de *M. sativa*. Para el grupo control se utilizaron 15 microcosmos con suelo sin contaminar (9 microcosmos con suelo desnudo; **SD** y 6 con *M. sativa*; **SP**). En cada muestreo se utilizaron 3 microcosmos, de los cuales se obtuvieron muestras de 5 g por cada uno que se procesaron gramo por gramo. El primer muestreo se realizó 24 h después de cada perturbación. Los siguientes muestreos se realizaron después del día 30 y 60, en el suelo desnudo y en presencia de *Medicago sativa*. Los microcosmos se mantuvieron bajo condiciones de invernadero hasta el momento en que se tomaron las muestras (ver cuadro 1).

Identificación y estimación de amebas

Para identificar las especies de **AVL** se utilizó el método de la “**placa-agar**”, donde el principio básico es obtener a las amebas por su densidad ya que la agitación y el exceso de agua hacen que los trofozoitos se despeguen de los agregados de suelo y adquieran su forma flotante. De esta forma los trofozoitos pueden ser vertidos sobre una placa de agar, donde finalmente los trofozoitos puedan sujetarse a la superficie que proporciona el agar después de un período de sedimentación, para su posterior observación². Para cada litro de extracto de suelo diluido en agua destilada (1:5) se agregaron 13 g de agar no nutritivo (para las cajas Petri).

² **Respuesta de las amebas ante cambios de su hábitat físico.**

Las amebas han desarrollado 2 estrategias para la evasión de cambios físicos en su hábitat 1) una de ellas es cuando la célula asume la forma flotante, donde la ameba se despegar del sustrato y asume una forma estrellada, debido a que la célula presenta protrusiones de citoplasma de diversas formas y tamaños. La segunda estrategia es cuando la ameba adopta temporalmente una forma monopoidal (forma de movimiento que la célula asume para incrementar su desplazamiento (Bovee, 1960). Estas estrategias ofrecen la posibilidad de que el trofozoito evite los daños físicos. Estas estrategias pueden tener utilidad para la dispersión de trofozoitos a grandes distancias en un gran volumen de suelo. La forma estrellada común cuando la ameba parece detectar corrientes de agua, donde las protrusiones funcionan como mayor área de contacto con el agua en movimiento, lo que acelera aún más su desplazamiento.

Cuadro 1. Tratamientos a los que se sometieron los microcosmos.

Período Tratamientos	0	30	60
S Suelo desnudo al 60 % CC durante 30 días	S0: 3 microcosmos sometidos a una perturbación mecánica	S30: 3 microcosmos 30 días después de la perturbación	S60: 3 microcosmos 60 días después de la perturbación
SP Suelo con planta (<i>Medicago sativa</i>)		SP30: 3 microcosmos 30 días después de cultivar la planta	SP60: 3 microcosmos 60 días después de cultivar la planta
SC Suelo contaminado con combustóleo (50 000 ppm)	SC0: 3 microcosmos contaminados después de 24 h	SC30: 3 microcosmos 30 días después de la contaminación c/combustóleo	SC60: 3 microcosmos 60 días después de la contaminación c/ combustóleo
SCP Suelo contaminado con combustóleo + planta (<i>Medicago sativa</i>)		SCP30: 3 microcosmos contaminados c/ combustóleo, 30 días después de cultivar la planta	SCP60: 3 microcosmos contaminados c/ combustóleo, 60 días después de cultivar la planta
SH Suelo contaminado con hexano (110 ml)	SH0: 3 microcosmos contaminados después de 24 h	SH30: 3 microcosmos 30 días después de la contaminación c/hexano	SH60: 3 microcosmos 60 días después de la contaminación c/hexano
SHP Suelo contaminado con hexano + planta (<i>Medicago sativa</i>)		SHP30: 3 microcosmos contaminados c/hexano, después de 30 días después de cultivar la planta	SHP60: 3 microcosmos contaminados c/hexano, después de 60 días después de cultivar la planta
Se utilizaron 110 ml de hexano para disminuir la viscosidad de 15 g de combustóleo			
El muestreo se realizó en 3 microcosmos por cada control y tratamiento			
De cada microcosmo se procesaron 5 gr de suelo			
(15 gr en total por cada tratamiento)			

Para obtener los trofozoitos de **AVL** el proceso fue el siguiente: se homogeneizó 1 g de suelo en 10 ml de extracto de suelo diluido en agua destilada (1:10) estéril y se dejó reposar por 30 min con el fin de que se precipitaran las partículas de mayor tamaño y peso. Posteriormente el sobrenadante se vertió sobre las placas de agar, dejando reposar con una leve inclinación durante 2 h, después se retiró el exceso de líquido de las cajas con una pipeta Pasteur estéril. Inmediatamente, se realizaron preparaciones con el objetivo de observar a las amebas activas. Posteriormente, las placas restantes se mantuvieron a 28 °C por tres días y se revisaron periódicamente durante 20 días. La determinación morfológica se hizo con un microscopio de contraste de fases y con ayuda de claves morfológicas especializadas (Page, 1976; Page, 1988; Page y Siemensma 1991 y de Patterson, 1996).

Determinación de grupos tróficos de AVL

El gremio trófico de cada especie de ameba fue determinado por medio de una revisión bibliográfica sobre los hábitos alimenticios y formas de cultivo reportadas para estas especies, donde se registró el tipo de alimento requerido para su crecimiento (cada una de las referencias se encuentran en las tablas donde se determinó la frecuencia de las especies de **AVL**). Algunos hábitos alimentarios se determinaron por la observación de la presencia de las presas dentro de sus vacuolas alimenticias.

Análisis estadístico.

El conteo de las amebas se realizó con la técnica del **NMP** y el cálculo se realizó con la fórmula de Thomas
$$NMP = \frac{\text{Numero de tubos positivos}}{\sqrt{(\text{Cantidad de ml de la muestra de tubos negativos}) \times (\text{Cantidad de ml de todos los tubos})}}$$
.

Los cálculos de rarefacción para determinar el volumen mínimo de suelo se realizaron con la ayuda del programa **PC-ORD, Versión 6.0** para Windows©. Las comunidades de amebas fueron analizadas de la siguiente forma; abundancia absoluta con la técnica del **NMP**; frecuencia de especies; número de taxa para determinar la similitud de especies entre comunidades y grupos tróficos con el **índice de Sørensen**. Para determinar diferencias

significativas en el índice de diversidad trófica, se utilizó la prueba de χ^2 . Para determinar si existen diferencias significativas entre las frecuencias de las especies en las diferentes comunidades se utilizó la prueba de χ^2 , esta misma prueba se utilizó para saber si existían diferencias significativas entre el **NMP** de cada uno de los tratamientos. Las especies se agruparon por sus preferencias tróficas para medir la similitud de especies de los grupos tróficos entre los diferentes muestreos con ayuda de un análisis grupal, la distancia fue estimada por el método Bray-Curtis y la unión de los grupos por medio del Centroid. Las estimaciones del índice de similitud de Sørensen se llevaron a cabo mediante el programa **PC-ORD, Versión 6.0** para Windows®.

Modelos de la red trófica

Los modelos de las redes tróficas fueron basados en el modelo de red trófica de Duffy *et al.*, 2007. El gremio trófico fue determinado por medio de revisión bibliográfica de hábitos alimenticios y sus formas de cultivo reportadas para las especies de amebas, donde se registró el tipo de alimento requerido para su crecimiento (las referencias se encuentran en las tablas de especies de **AVL**). Algunos hábitos alimenticios se determinaron por la presencia de las presas dentro de sus vacuolas digestivas.

Resultados

Número más probable (NMP) de AVL del suelo en los diferentes tratamientos

El suelo no contaminado obtuvo el mayor número de individuos de **AVL** durante todo el estudio. Se observó una significativa reducción en la cantidad de **AVL** un día después de someter a esta comunidad a los diferentes factores de perturbación. Después de que se contaminó el suelo con combustóleo, se observó un decremento significativo en la cantidad de amebas. Sin embargo, el decremento en el número de individuos fue aún mayor después de contaminar con hexano. El suelo contaminado, por su parte, mostró una disminución de la mitad de amebas/g peso seco después de 30 días. Por otra parte, el suelo rizosférico de *M. sativa* triplicó el número de amebas en todos los tratamientos. Sin embargo la cantidad de individuos del suelo rizosférico de los microcosmos con hexano **SHP30** y **SHP60** mostraron un aumento significativo de individuos en comparación con el suelo desnudo **SH0**; $\chi^2 \nu = 1, P = 0.05$; **Figura 1**).

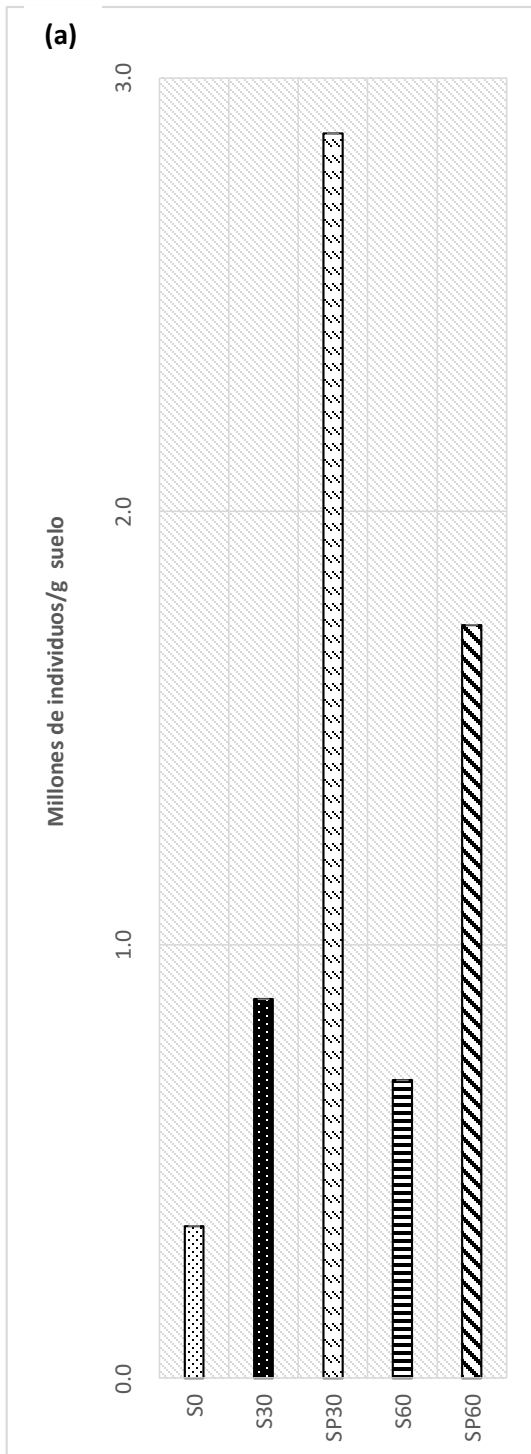
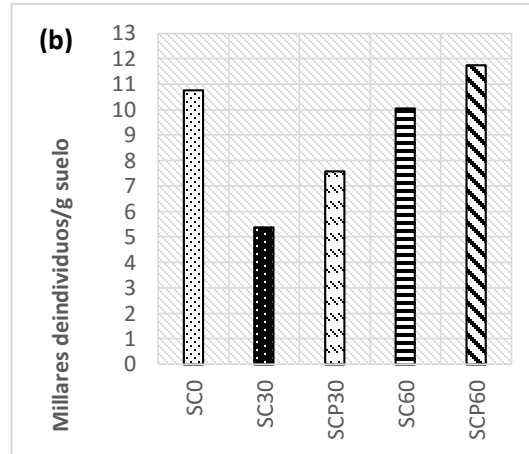
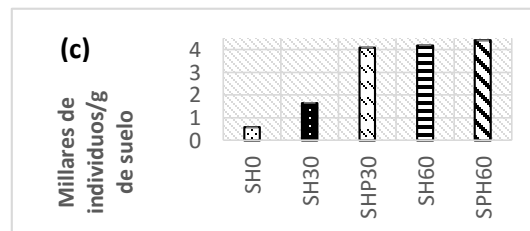


Figura 1(a). Número más probable (NMP) de las AVL de las muestras de suelo de cada microcosmos. **S0**, suelo desnudo 24 h después de la perturbación mecánica (3.5×10^5 amebas /g de suelo); **S30**, suelo desnudo 30 días después de la perturbación mecánica bajo condiciones de invernadero (8.7×10^5 de amebas /g de suelo); **S60**, suelo desnudo 60 días después de la perturbación (6.9×10^5 de amebas /g de suelo); **SP30** suelo contaminado con *Medicago sativa* después de 30 días (2.9×10^6 de amebas /g de suelo); **SP60** suelo con la planta después de 60 días (1.7×10^6 de amebas /g de suelo).



(b). NMP de las amebas de las muestras de suelo de los diferentes microcosmos. **Claves de los microcosmos:** **SC0**, suelo desnudo 24 h después de la contaminación con combustóleo (1.1×10^4 amebas /g de suelo); **SC30**, suelo desnudo 30 días después de la contaminación (5.3×10^3 amebas /g de suelo); **SC60**, suelo desnudo 60 días después de la contaminación (1.0×10^4 amebas /g de suelo); **SCP30** suelo rizosférico 30 días después de la contaminación y con *Medicago sativa* (7.6×10^3 amebas /g de suelo) días ; **SCP60** suelo contaminado y con planta después de 60 días (1.2×10^4 amebas/g de suelo).



(c). NMP de las amebas de las muestras de suelo de los diferentes microcosmos. **Claves de los microcosmos:** **SH0**, suelo desnudo 24 h después de la exposición al n-hexano (5.7×10^2 amebas /g de suelo); **SH30**, suelo desnudo 30 días después de la contaminación (1.7×10^3 amebas /g de suelo); **SH60**, suelo desnudo 60 días después de la contaminación (4.2×10^3 amebas /g de suelo); **SHP30** suelo rizosférico 30 días después de haberse expuesto al hexano y de mantener a *Medicago sativa* (4.1×10^3 amebas /g de suelo) días ; **SHP60** suelo contaminado y con la planta después de 60 días (4.4×10^3 amebas/g de suelo).

Riqueza de especies de amebas desnudas de vida libre en los diferentes tratamientos

Se identificaron en total **141 especies** de **AVL**. En el suelo no contaminado registramos **100 especies** durante los 60 días del experimento. En el suelo contaminado con combustóleo también se encontraron **100 especies** de **AVL**. En el suelo contaminado con hexano solo se registraron **63 especies** de **AVL** (**Figura 2**).

La riqueza de especies (**RE**) fue significativamente alta en el **SC0**, con respecto a los suelos **SH0** y **S0**. ($\chi^2 v = 1$, $P = 0.05$). Después de 30 días la **RE** en el suelo **SH30** fue significativamente menor que los demás microcosmos, los cuales tuvieron una riqueza de especies similar. Más aún, la comunidad de **AVL** del suelo con *M. sativa* (**SHP30**) registró la menor cantidad de especies en comparación con los otros microcosmos. Las comunidades de los suelos de la zona de raíces a los **60 días** (**SCP60** y **SP60**) mostraron una reducción de **RE**, mientras que la riqueza de especies del suelo **SHP60** mostró una cantidad significativamente menor en comparación con los otros tratamientos ($\chi^2 v = 1$, $P = 0.05$; **Anexo 2**; **Figura 2**). La riqueza de especies de las comunidades de **AVL** entre los tratamientos **S0** vs **SC0**, **SC0** vs **SH0**, **S30** vs **SH30**, **SCP30** vs **SHP30**, fueron significativamente diferentes ($\chi^2 v = 1$, $P = 0.05$; **Anexo 2**; **Figura 3**).

Figura 2. Riqueza de especies de las comunidades AVL en los microcosmos con suelo desnudo y con Medicago sativa. . **S0**, suelo desnudo 24 h después de la perturbación mecánica; **S30**, suelo desnudo 30 días después de la perturbación mecánica; **S60**, suelo desnudo 60 días después de la perturbación; **SP30** suelo con *M. sativa* 30 días después de la revoltura del suelo; **SP60** suelo con la planta 60 días después de la perturbación. **SC0**, suelo contaminado con combustóleo después de un período de 24 h; **SC30**, suelo contaminado con combustóleo después de 30 días; **SC60**, suelo contaminado con combustóleo después de 60 días; **SCP30** suelo contaminado con combustóleo después de 30 días con *M. sativa*; **SCP60** suelo contaminado después de 60 días con la planta (para mayor detalle ver anexo 1). **SH0** suelo contaminado con hexano después de 24 h; **SH30**, suelo 30 días después de haber sido expuesto al hexano; **SH60**, suelo 60 días después de haber sido expuesto al hexano; **SHP30** suelo 30 días después de haber sido expuesto al hexano con *M. sativa*; **SHP60** suelo 60 días después de haber sido expuesto al hexano y con *M. sativa*.

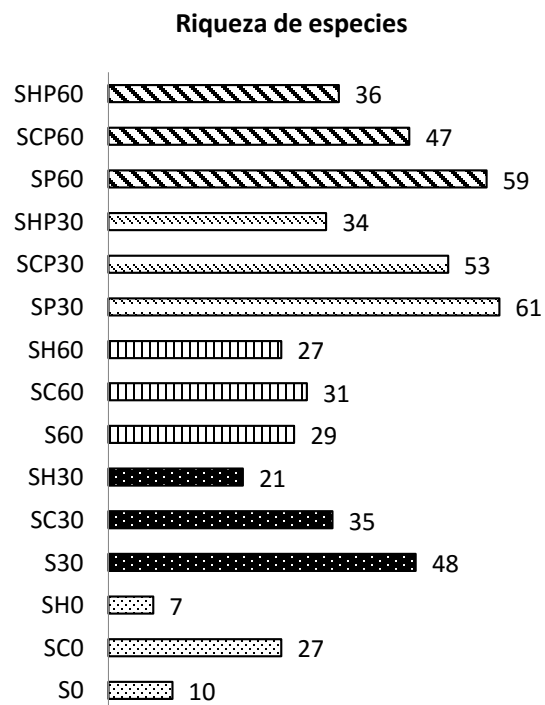


Tabla 1. Especies de AVL presentes en los diferentes microcosmos. **S0**, suelo desnudo después de la perturbación mecánica; **S30**, suelo desnudo de 30 días después de la perturbación; **S60**, suelo desnudo 60 días después de la perturbación mecánica; **SP30** suelo con **Medicago sativa** 30 días después de la perturbación; **SP60** suelo con la planta 60 días después de la perturbación. Grupo trófico de la especie de ameba; **B**: bacterívoras, **O**: omnívoras, **A**: alguívoras, **P**: amebas que se alimentan de otros protozoos, **L**: amebas que se alimentan de levaduras, **F**: Fungívoras, **ND**: amebas sin un grupo trófico determinado. Referencias en anexo 3.

Especies	GT	S0	S30	S60	SP30	SP60	S0	S30	S60	SP30	SP60	S0	S30	S60	SP30	SP60	Referencia
<i>Adelphamoeba galeacystis</i>	B	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	Page, 1976
<i>Adelphamoeba sp</i>	B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	observada en este estudio
<i>Amoeba diminutiva</i>	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Acanthamoeba griffini</i>	B	0	0	0	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	Page & Siemensma,1991
<i>A. mauritaniensis</i>	B	0	0	0	1	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Marciano-Cabral & Cabral, 2003; http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx
<i>A. tubiashi</i>	B	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Daggett et al., 1982
<i>Cochliopodium actinophorum</i>	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	Culture collection of algae and protozoa, ATCC
<i>Comandonia operculata</i>	B	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	2	http://www.ccap.ac.uk
<i>Echinamoeba exundans</i>	B	0	0	0	2	0	5	0	1	0	4	0	0	0	1	3	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Page, 1975
<i>E. silvestris</i>	B	1	0	0	4	0	1	1	2	1	0	0	1	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Page, 1975
<i>Filamoeba nolandi</i>	B	0	0	0	5	2	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Page(a), 1967
<i>Flabellula citata</i>	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1971; *Page, 1968
<i>Gocevia fonbrunei</i>	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	ATCC, Page, 1988
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	B	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Hartmannella vermiformis</i>	B	0	0	2	4	5	0	0	0	2	2	1	0	2	2	2	Dillon & Parry, 2009; Pickup et al, 2007; Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Page, 1967; Ray, 1951
<i>Mastigamoeba constants</i>	Os-B	0	0	0	0	0	0	5	4	6	3	0	2	2	1	2	Adl, 2003; *Finlay & Esteban, 1998;*Novarino et al, 1997
<i>M. invertans</i>	Os-B	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	Adl, 2003; *Finlay & Esteban, 1998;*Novarino et al, 1997
<i>M. psammobia</i>	Os-B	0	0	3	0	11	0	1	2	5	4	0	0	0	0	0	Adl, 2003; *Finlay & Esteban, 1998;*Novarino et al, 1997
<i>M. punctachora</i>	Os-B	0	0	0	0	0	0	0	4	3	12	0	0	0	1	0	Lloyd et al, 2004; Adl, 2003; *Finlay & Esteban, 1998;*Novarino et al, 1997
<i>M. simplex</i>	Os-B	0	0	1	1	1	0	6	4	5	7	0	1	0	1	0	Walker et al, 2001; Adl, 2003; *Finlay & Esteban, 1998; *Novarino et al, 1997
<i>Mayorella cultura</i>	B	0	3	1	6	3	1	1	0	3	4	0	4	0	4	3	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Page, 1976; Pratt and Cairns, 1985; Bovee,1961
<i>M. gadesae</i>	B	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	Page, 1976
<i>M. limacis</i>	B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Page, 1976; Pratt and Cairns, 1985

Especies	GT	S 0	S 3 0	S 6 0	S P 3 0	SP 60	S C 0	S C 3 0	S C 6 0	S C P 3 0	SC P6 0	S H 0	S H 3 0	S H 6 0	S H P 3 0	S H P 6 0	Referencia
<i>M. microeruca</i>	B	0	1	1	1	2	0	0	1	1	4	0	0	0	1	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>M. spatula</i>	B	0	5	1	8	10	0	3	3	7	11	0	1	1	5	7	Page, 1976; Pratt and Cairns, 1985
<i>Naegleria gruberi</i>	B	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	Pratt and Cairns, 1985; Chang,1958
<i>Oscillosignum dakotaensis</i>	B	0	0	2	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	*Present study
<i>O. proboscidium</i>	B	0	0	1	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	*Present study
<i>Parafabellula kudoii</i>	B	0	3	0	1	0	2	2	2	0	0	0	1	1	1	4	Page & Siemensma,1991
<i>P. reniformis</i>	B	0	0	0	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Peglar <i>et al.</i> , 2004; Bovee & Sawyer, 1979
<i>Paramoeba pemaquidensis</i>	B	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1983; Bovee y Sawyer, 1979
<i>Platyamoeba stenopodia</i>	B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005, *Zubkov &Sleigh, 1999
<i>Rhizamoeba polyura</i>	B	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Bovee & Sawyer, 1979
<i>Saccamoeba limax</i>	B	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>S. stagnicola</i>	A-B	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Stachyamoeba lipophora</i>	B	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	Page, 1975
<i>Tetramitus ovis</i>	B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	Danso &Alexander, 1975
<i>T. rostratus</i>	B	0	1	0	0	3	0	0	1	1	2	0	0	1	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	B	0	1	1	5	6	7	1	0	6	1	3	1	6	3	4	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. avara</i>	B	0	0	2	3	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976, Page, 1967
<i>V. enterica</i>	B	2	0	0	3	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. erythaenus</i>	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. froschi</i>	B	0	3	0	0	2	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. inornata</i>	B	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976; Page, 1967
<i>V. jugosa</i>	B	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976; Page, 1967
<i>V. magna</i>	B	1	3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. ovis</i>	B	2	3	2	2	3	5	1	1	5	5	0	0	3	9	5	Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. russelli</i>	B	0	3	1	0	0	1	1	1	4	0	0	0	0	0	0	Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>V. ustiana</i>	B	0	0	0	2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	Pratt and Cairns, 1985; Page, 1976
<i>Vannella anglica</i>	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1983; Bovee y Sawyer, 1979
<i>V. caledonica</i>	B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	*Zubkov &Sleigh, 1999
<i>V. cirrifera</i>	B	0	0	1	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2003; *Zubkov &Sleigh, 1999

Especies	GT	S 0	S 3 0	S 6 0	S P 3 0	SP 60	S C 0	S C 3 0	S C 6 0	S C 3 0	SC P6 0	S H 0	S H 3 0	S H 6 0	S H 3 0	S H 6 0	Referencia
<i>V. mira</i>	B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1983; Bovee y Sawyer, 1979
<i>V. platypodia</i>	B	0	0	0	3	2	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2003, Barbea & Buhler, 2001; *Zubkov & Sleigh, 1999
<i>V. simplex</i>	B	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	CCAP, Page 1976, Page, 1988
<i>Vexillifera bacillipedes</i>	B	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Page, 1969
<i>V. minutissima</i>	B	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Bovee & Swayer, 1979
<i>V. variabilis</i>	B	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>V. telma</i>	B	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Willaertia magna</i>	B	0	0	1	0	5	0	0	2	3	7	0	0	0	0	0	Jonckheere <i>et al.</i> , 1984
<i>Breviata anathema</i>	B	0	0	2	0	0	0	4	0	1	0	0	3	3	2	4	Walker <i>et al.</i> 2006
<i>Cercomona simplex</i>	B	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	Myl'nikov & Karpov, 2004
<i>Phreatamoeba balamuthi</i>	B	0	0	0	0	2	0	2	0	1	3	0	0	0	0	0	Chavez <i>et al.</i> 1986
<i>Biomyxa vagans</i>	P-A	0	1	1	3	3	0	3	1	1	1	0	0	1	0	3	Cash et al, 1919; Anderson & Hoeffler, 1979
<i>Dactylamoeba bulla</i>	P-A	0	4	1	1	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	*Jeroen <i>et al.</i> 2010
<i>D. stella</i>	P-A	0	2	2	1	8	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	*Jeroen <i>et al.</i> 2010
<i>Flamella citrensis</i>	P	0	0	0	2	0	2	1	1	0	0	0	2	0	0	1	Bovee, 1956; Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Gephyramoeba delicatula</i>	P	0	1	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	Pussard & Pons, 1976
<i>Leptomyxa reticulata</i>	P	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Old & Darbyshire, 1978
<i>Mayorella ambulans</i>	P, B	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1976
<i>M. bicornifrons</i>	P, B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1976
<i>M. clavella</i>	P, B	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1976
<i>M. riparia</i>	P, B	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1976; Page, 1988
<i>Polychaos timidum</i>	P-A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Rhizamoeba australiensis</i>	P	0	2	0	4	5	3	2	1	0	0	0	2	0	0	2	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>R. fiabellata</i>	P	1	0	0	0	3	4	1	2	5	5	0	0	0	0	0	Old & Darbyshire, 1978
<i>Trichamoeba sp</i>	P-B	0	1	0	0	0	4	0	0	0	5	4	0	0	1	2	Present study
<i>Deuteramoeba algonquinensis</i>	A-P	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	http://amoeba.ifmo.ru/species/amoebidae/dmyc.htm
<i>Dinamoeba mirabilis</i>	A	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	*Page, 1976
<i>Hyalodiscus rubicundus</i>	A	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Röpstorf <i>et al.</i> , 1994
<i>Nuclearia deliculata</i>	A	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	Cann, 1986; West, 1903; Page y Siemensma, 1991
<i>N. radians</i>	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	Page y Siemensma, 1991
<i>N. simplex</i>	A	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	West, 1903; Page y Siemensma, 1991
<i>Paragocevia placopus</i>	A,P, B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Page, 1988
<i>Vampyrellidium perforans</i>	A	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	Surek & Melkonian, 1980; Page y Siemensma, 1991
<i>V. vagans</i>	A	1	2	0	1	3	1	2	1	3	0	0	0	0	0	0	Entz, 1916; Page y Siemensma, 1991

Especies	GT	S 0	S 3 0	S 6 0	S P 3 0	SP 60	S C 0	S C 3 0	S C 6 0	S C 3 0	SC P6 0	S H 0	S H 3 0	S H 6 0	S H 3 0	S H 6 0	Referencia
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	O	0	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Wrights <i>et al.</i> 1981; Nero & Hedrick, 1964
<i>A. lenticulata</i>	O	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>A. palestinensis</i>	O	2	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>A. polyphaga</i>	O	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	1	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>A. rhyodes</i>	O	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>A. triangularis</i>	O	0	1	0	2	3	5	4	1	1	3	0	1	0	2	1	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Arachnula impatiens</i>	F-B	0	0	1	3	5	0	0	3	4	7	0	0	0	0	2	Old & Darbyshire, 1978; *Chakraborty & Old, 1982
<i>Dermamoeba granifera</i>	F	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Pussard et al, 1979
<i>Dermamoeba minor</i>	F	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005; Pussard <i>et al.</i> , 1979
<i>Deuteramoeba mycophaga</i>	F	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	Page, 1988; Chakraborty & Old, 1986
<i>Cochliopodium actinophorum</i>	Y	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>C. bilimbosum</i>	Y	0	3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>C. minus</i>	Y	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	Rodríguez-Zaragoza et al, 2005
<i>Biomyxa merdaria</i>	ND	0	2	2	5	4	0	1	1	1	4	0	1	0	1	0	
<i>Gocevia binucleata</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<i>Paradermamoeba valamo</i>	ND	0	1	0	1	3	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
<i>Pessonella marginata</i>	ND	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Polychaos calcynucleolus</i>	ND	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Trichamoeba cloaca</i>	ND	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>Adelphamoeba sp</i>	ND	2	2	0	0	5	0	0	1	0	7	0	0	1	0	1	
<i>Arachnula sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
<i>Biomyxa sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4	0	1	0	0	0	
<i>Dactylamoeba sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	
<i>Flamella sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	
<i>Glaeseria sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	
<i>Hartmannella sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
<i>Hydramoeba sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>Hyperamoeba? sp</i>	ND	0	0	0	0	1	0	5	4	2	5	1	0	0	0	0	
<i>Leptomyxa sp Q</i>	ND	0	0	0	0	2	7	2	1	8	5	2	1	0	0	0	
<i>Leptomyxa sp1</i>	ND	0	1	1	0	1	3	0	1	3	1	0	0	1	0	0	
<i>Mastigamoeba sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	
<i>Mastigella sp.</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	
<i>Mayorella sp.</i>	ND	0	0	0	4	2	0	0	0	0	5	0	0	0	2	0	
<i>Nuclearia sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
<i>Rhizamoeba sp1</i>	ND	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	2	1	0	2	
<i>Rhizamoeba sp Q</i>	ND	0	0	0	0	1	6	2	3	9	10	0	0	0	0	0	

Especies	GT	S 0	S 3 0	S 6 0	S P 3 0	SP 60	S C 0	S C 3 0	S C 6 0	S C 3 0	SC P6 0	S H 0	S H 3 0	S H 6 0	S H 3 0	S H 6 0	Referencia
<i>Rosculus sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
<i>Saccamoeba sp</i>	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
<i>Stachyamoeba sp</i>	ND	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	
<i>Vampyrella sp</i>	ND	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	4	
<i>Vahlkampfia spA</i>	ND	0	0	0	0	0	4	0	0	3	9	1	0	2	0	3	
<i>Vexillifera sp</i>	ND	0	0	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	1	0	
<i>Acrasidae</i>	ND	0	0	0	1	3	0	0	0	0	5	0	0	1	0	0	
<i>Amoebidae</i>	ND	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
<i>Dsp3</i>	ND	0	1	0	3	1	1	4	0	5	3	0	0	0	0	0	
<i>Sp2 transp</i>	ND	0	1	0	2	3	0	4	0	3	3	0	0	0	0	0	
<i>Arcella sp1A</i>	ND	0	2	1	0	2	0	0	0	1	0	0	1	2	0	0	
<i>Arcella sp2 C</i>	ND	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Trinema? sp1</i>	ND	0	2	0	0	2	1	0	0	0	2	0	0	2	0	1	
<i>Trinema? sp2gris</i>	ND	0	0	0	0	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	

Especies más frecuentes durante el estudio

Las especies más abundantes de amebas pertenecen al grupo bacterívoro. De estas, las especies que destacaron fueron: *Mayorella spatulla* (familia **Paramoebidae**), *Mastigamoeba psammobia* (ameboflagelado) (familia **Mastigamoebidae**), ambas de hábitos bacterívoros y *Dactylamoeba stella* (familia **Paramoebidae**, que se alimenta de otros protozoos). Estas especies no producen quistes de resistencia y fueron las más frecuentes en **el suelo no contaminado** y en presencia de *Medicago sativa*. Mientras que en el suelo contaminado y con alfalfa las especies con mayor frecuencia de aparición **60 días** después de la contaminación por combustóleo fueron *Amoeba carolinensis* (familia **Amoebidae**), *Mastigamoeba punctachora* (ameboflagelado) (familia **Mastigamoebidae**; bacterívora), *Mayorella spatulla* (familia **Paramoebidae**; bacterívora), *Vahlkampfia sp* y *Willaertia magna* (familia **Vahlkampfiidae**; ambas bacterívoras). En el caso del suelo con hexano las especies más frecuentes fueron *Mayorella spatulla* (familia **Paramoebidae**), *Vahlkampfia aberdonica* y *V. ovis* (familia **Vahlkampfiidae**).

Familias que se registran 1 día después de la perturbación por contaminación por combustóleo y n-hexano

En el suelo con combustóleo **SC0** se presentaron las siguientes familias; **Vahlkampfiidae** (6 spp), **Acantamoebidae** (5 spp), **Leptomyxidae** (4 spp), **Paramoebidae** (3 spp), **Flabellulidae** (3 spp), **Vexilliferidae** (3 spp), **Echinamoebidae** (2 spp), **Cerchomonidae** 1 (spp), **Hyalodiscidae** (1 spp), **Trinematidae** (1 spp), y 6 especies que no se pudieron asignar a una familia (**ver anexo 1**).

Después de la contaminación con hexano, en el suelo desnudo **SH0** se presentaron especies pertenecientes a las siguientes familias; **Vahlkampfiidae** (2 especies), **Leptomixyidae** (3 especies), **Hartmannellidae** (1 especie) y **Amoebidae** (1 especie).

Las especies que se compartieron entre las comunidades **SC0** (**ver anexo 1**) y **SH0** fueron **Vahlkampfia aberdonica**, **Leptomyxa sp Q**, **Rhizamoeba sp 1** y **Vahlkampfia spA**.

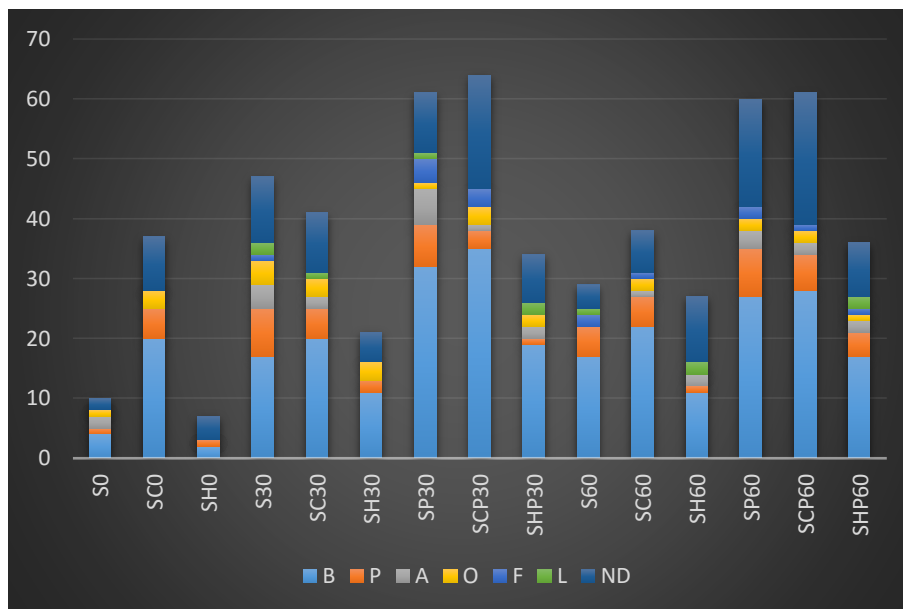


Figura 3. Riqueza de especies de AVL por cada grupo trófico en los microcosmos. **S** (suelo perturbado mecánicamente); **SC**: suelo con combustóleo; **SH**: suelo con hexano; **P**: microcosmos con **Medicago sativa**. **Períodos de tiempo**: **0**; 24 h después de la perturbación mecánica y por la contaminación con combustóleo y hexano. **30**; 30 días después de las perturbaciones. **60**; 60 días después de las perturbaciones.

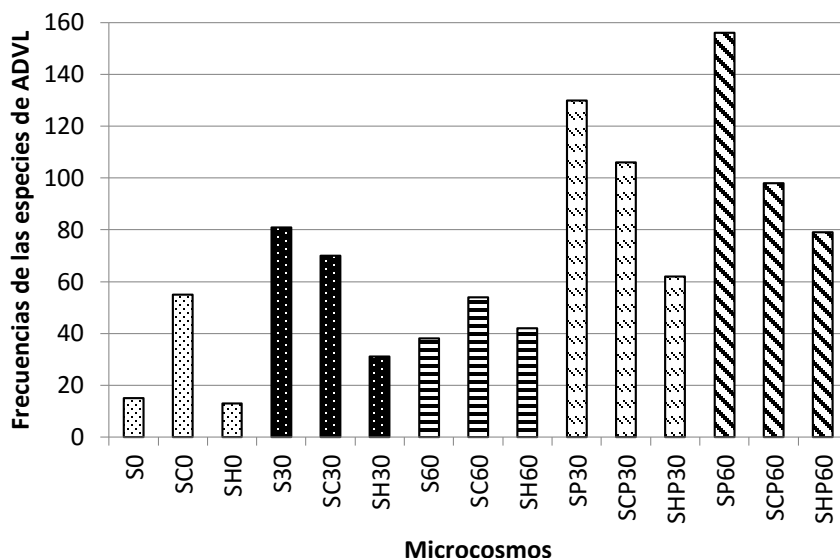


Figura 4. Frecuencias de aparición de las especies de amebas de cada uno de los tratamientos. *S*, suelo desnudo; *SP*, suelo con *M. sativa*; *H*, contaminación con hexano; *C*, contaminación con combustóleo. **Periodos de tiempo**; **0**, 24 h después de la perturbación; **30 y 60**; días después de la perturbación.

Riqueza de especies que integran los grupos tróficos en los diferentes tratamientos

La riqueza de especies entre las comunidades de organismos bacterívoros provenientes de los tratamientos **S0 vs SC0**, **SC0 vs SH0**, fueron significativamente diferentes entre sí ($\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$; Anexo 2; Figura 3).

Frecuencias de especies que integran las comunidades de AVL bacterívoras

Las especies de **AVL-B** fueron las más frecuentes en todos los tratamientos. Su frecuencia fue mayor 1 día después de la contaminación por combustóleo en comparación con el suelo desnudo contaminado con hexano y el control (**S0 vs SC0** y **SH0 vs SC0**). Mientras que en el suelo **SH0** se registró la menor frecuencia de especies de **AVL-B** (**SH0 vs S0** y **SH0 vs SC0**; $\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$; Figura 5). A los 30 días solo el suelo con hexano mostro una frecuencia

significativamente menor a la de los otros tratamientos ($\chi^2 \nu = 1, P = 0.05$; **Figura 5; anexo 2**).

La frecuencia y la **RE** de las comunidades de **AVL-B** a los **30 días** con ***M. sativa*** fueron muy similares. Mientras que el suelo con hexano **SHP30** registró un valor significativamente menor que los otros tratamientos del mismo período ($\chi^2 \nu = 1, P = 0.05$, Anexo 2; **Figura 5**).

En el último período del estudio (60 días) disminuyeron las frecuencias de las especies **AVL-B** en comparación con el período anterior. Donde el menor registro de frecuencias de estas amebas se presentó en el suelo con hexano sin planta (**SH60**). Lo mismo sucedió en el tratamiento con ***M. sativa*** (**SHP60**). Al comparar los suelos **SCP60** y **SP60** observamos que este último tuvo la mayor frecuencia de bacterívoras de todos los tratamientos ($\chi^2 \nu = 1, P = 0.05$; **Figura 5**).

Los suelos con ***M. sativa***, tienen un valor superior significativo en las frecuencia de estas especies en comparación con los valores que se presentaron en los suelos desnudos del mismo período (**SC30 vs SCP30** y **SC60 vs SCP60**, Anexo 1) ($\chi^2 \nu = 1, P = 0.05$; **Figura 5**).



Figura 5. Frecuencias de aparición de las especies de AVL por cada grupo trófico en los microcosmos. **S** (suelo perturbado mecánicamente); **SC**: suelo con combustóleo; **SH**: suelo con hexano; **P**: microcosmos con **Medicago sativa** (c) y (e). **Periodos de tiempo**: **0**; 24 h después de la perturbación mecánica y por la contaminación con combustóleo y hexano (a). **30**; 30 días después de las perturbaciones (b). **60**; 60 días después de las perturbaciones (d).

AVL-P (que se alimentan de otros protozoos) en todos los tratamientos

El suelo **SH0** mostró una mayor frecuencia de amebas **P**, no obstante este incremento no fue significativo. No existen diferencias significativas entre las frecuencias de las **AVL-P** de los suelos desnudos **SC0** y **S0** ($\chi^2 v = 1$, $P = 0.05$; Figura 5; Anexo 2).

En el suelo desnudo **S30** se obtuvo la mayor cantidad de **AVL-P**, mientras que en los microcosmos con suelo desnudo **SH30** observamos la menor cantidad de frecuencias de estas especies de amebas (**Figura 5**, Anexo 2). En el suelo con planta **SHP30** se encontró la menor frecuencia de amebas **P**, en comparación con los otros tratamientos con **M. sativa** (**SCP30** y **SP30**) donde la aparición de estas especies fue mayor ($\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$; **Figura 5**, Anexo 2).

La comunidad de **AVL-P** del suelo **SH60** mostró la menor frecuencia de este grupo trófico en contraste con las comunidades provenientes de los otros suelos desnudos del mismo período (60 días). En los tratamientos con **M. sativa**; **SCP60** y **SHP60** se observaron frecuencias significativamente menores de las especies **P** en comparación con el grupo control **SP60** ($\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$; **Figura 5**; Anexo 2).

Especies que integran las comunidades de AVL-A (Alguívoras)

Las especies de **AVL-A** solo fueron observadas en el suelo desnudo **S0**. Después de **30 días** registramos un incremento en sus frecuencias solo en los microcosmos **S30**, **SC30** y **SP30**. El suelo con planta **SP30** fue el tratamiento donde se registró la mayor frecuencia de las especies de este grupo trófico ($\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$). No hubo diferencias significativas entre las frecuencias de las especies **AVL-A** que se presentaron **60 días** después en los tratamientos **SH60**, **SP60** y **SPH60** (**Figura 5**; anexo 2).

Especies que integran las comunidades de AVL omnívoras (O), fungívoras (F) y las que se alimentan de levaduras (L)

La mayor frecuencia de las especies de **AVL-O** fue registrada en el suelo **S30** ($\chi^2 \nu = 1$, $P = 0.05$; **Figura 5**; ver anexo 2).

Las especies de **AVL-F** se presentaron con mayor frecuencia en el suelo con ***M. sativa* SP30** en contraste con los otros tratamientos (**Figura 5**). Mientras que la frecuencia de las **AVL-L** fue mayor en el suelo **S30** en comparación con los otros tratamientos (**Figura 5**).

Diversidad Trófica

Con respecto a la diversidad trófica, no se encontraron diferencias significativas en el índice de diversidad de Shannon-Wiener (**H'**) ni en el índice de diversidad de Simpson (**S**) de las diferentes comunidades de **AVL** encontradas en los suelos de los microcosmos utilizados para el experimento (**Tabla 2**).

Similitud entre las comunidades de AVL de los diferentes microcosmos

El análisis de similitud entre las comunidades mostró la formación de **dos grupos**, cuyo **parecido** oscila entre el **60 y 70%**. En el primer grupo se formó con la mayoría de los tratamientos expuestos al hexano y el suelo desnudo no contaminado (**S0**). Las comunidades de los microcosmos **SHP30** y **SHP60** mostraron una similitud del **93 %**, mientras que las comunidades **SH60** y **SH30** se les unen compartiendo el **80 %** y el **55 %** de la información respectivamente (**Figura 6**, conjunto en tono verde). El segundo grupo se formó con las comunidades de **AVL** de los microcosmos contaminados con combustóleo con y sin planta y las comunidades del suelo control con ***M. sativa***, siendo los tratamientos con la planta los más parecidos (**Figura 6**; conjunto en color rosa). Un día después de la perturbación las comunidades del **S0**, **S60**, **SH0** y el **SC0** no comparten la suficiente información para agruparse con ninguna otra comunidad (**Figura 6**, flechas rojas).

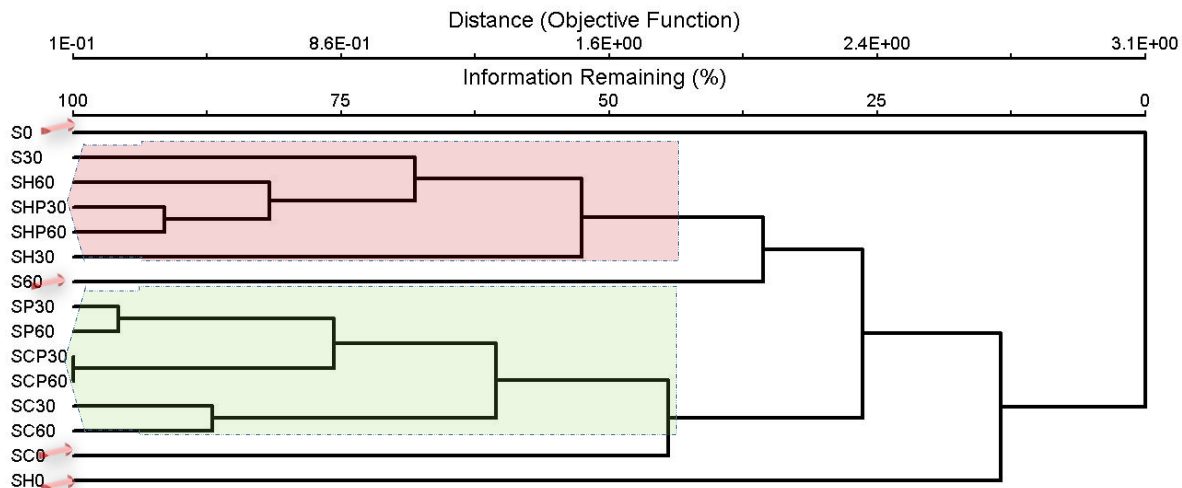


Figura 6. Análisis grupal entre las comunidades de amebas de vida libre (AVL) en los diferentes tratamientos. **S**: suelo, **SP**: suelo con **M. sativa**, **SC**: suelo con combustóleo, **SCP**: suelo con combustóleo y planta, **SH**: suelo con hexano, **SHP**: suelo con hexano y planta. **30** y **60** simbolizan los días transcurridos después de las diferentes tipos de factores de perturbación.

Similitud entre los grupos tróficos de las comunidades de AVL en los diferentes tratamientos

Similitud entre las comunidades de AVL-B de los diferentes tratamientos

Las comunidades de **AVL-B** de todos los tratamientos comparten el **50 %** de las especies. Dentro de este conjunto se observaron **3 subgrupos**; el primero lo conformaron las comunidades **AVL-B** provenientes de la zona de raíces de **M. sativa** del suelo **no contaminado** y el suelo **con combustóleo** de ambos períodos, con un **75 %** de similitud. El segundo subgrupo se formó con las comunidades de **AVL-B** del suelo expuesto al hexano, tanto del suelo desnudo como el suelo con **M. sativa** de los períodos de 30 y 60 días. Como parte de este subconjunto observamos a la comunidad de **AVL-B** del suelo **S60** compartiendo solo el 62 % de las especies con estas comunidades. En el tercer subconjunto se aglutinaron a las comunidades de **AVL-B** de los suelos desnudos **SC30** y **SC60** con el **89 %** de similitud (**Figura 7**; conjunto en tono verde). Las comunidades bacterívoras de los suelo

recién perturbados **SH0** y **S0** comparten muy poca información con las otras comunidades y se les observó separadas de estas (**Figura 7**; flechas rojas).

Similitud entre las comunidades de AVL-P de los microcosmos

El grupo de las **AVL-P** se dividió en tres grupos. El **primer grupo** aglutina una serie de 3 subgrupos, el primero se formó con 3 comunidades, **S30**, y **SP60** (**80 %** de similitud) donde la comunidad del suelo **S60** menos información con las comunidades mencionadas (**67 %** de similitud); el **segundo subconjunto** fue compuesto por las comunidades de los suelos **SP30**, **SC30**, **SHP60**, **SH30** y **SC60**, con un parecido del **80 %**. El **tercer subgrupo** contiene las comunidades **P** de los suelos contaminados con combustóleo **SC0**, **SCP60** y **SCP60** con el **84 % de similitud** (**Figura 7**; conjunto en tono rosa).

El **segundo grupo** de **AVL-P** se formó con las comunidades de **SH0** y **SHP30**, con un parecido del **75 %** (**Figura 7**; conjunto en tono café). El **tercero** y **cuarto** grupo fueron conformados por las comunidades **P** de los microcosmos **S0** y **SH60** respectivamente, estas comunidades no comparten información con los otros ensamblajes (**Figura 7**; señaladas con flechas negras).

Similitud entre las comunidades de AVL alguívoras (A) de los diferentes microcosmos

Con respecto al grupo trófico alguívoro observamos 2 agrupaciones; el **primer grupo** contiene a las comunidades **S0**, **SCP30**, **SC30**, **SP60**, **SCP60** y **SC60**, con una similitud del **74 %**. El **segundo grupo** incluyó 2 subgrupos unidos por un **56 %** de similitud. Las comunidades **A** de los suelos **S30**, **SHP30** y **SP30** que conformaron el primer subgrupo con una similitud del **74%**, el segundo subgrupo se formó con las comunidades de **AVL-A** que habitaron los microcosmos **SH60** y **SHP60**, con una similitud entre las comunidades del **87 %** de las especies (**Figura 7**; conjunto en tono amarillo).

Similitud entre las comunidades de AVL omnívoras (O) de los microcosmos

Las comunidades de amebas omnívoras compartieron el **57 %** de las especies. Dentro de este grupo se observaron **3 subagrupaciones**; las comunidades de **AVL-O** de los suelos **S0, S30, SCP30** y **SH30**, formaron **el primer subgrupo** con una similitud del **80 %**. El segundo subgrupo se formó con las comunidades de los suelos rizosféricos **SP30, SHP30, SP60, SCP60, SC0** y **SC30** con un parecido del **85 %**. El tercer subgrupo se formó con las comunidades omnívoras de los tratamientos **SC60** y **SHP60** se aglomeraron con una similitud del **98 % (Figura 7; conjunto en tono azul)**.

Similitud entre las comunidades de AVL fungívoras (F) y que se alimentan de levaduras (L) de los microcosmos

Las comunidades de las amebas **AVL-F** formaron 2 agrupaciones, cada una con una similitud mayor a la del **90 %**. El primer grupo se formó con las comunidades de fungívoros de los microcosmos **S30** y **S60**, con una similitud del **92 %**. La segunda agrupación se conformó de las comunidades de **AVL-F** de los microcosmos **SP30, SCP30, SP60, SCP60, SC60** y **SHP60 (Figura 7; conjunto en tono morado)**.

Las comunidades de **AVL-L** de los diferentes tratamientos se aglomeraron en **2 grupos**; el **primer grupo** se formó con las comunidades de los tratamientos **S30, S60, y SC30** con el **95 %** de similitud entre las especies. El **segundo grupo** se conformó de las comunidades provenientes de los suelos **SP30, SH60, SHP60** y **SHP30** con un parecido del **88 % (Figura 7; conjunto en tono crema)**.

Tabla 2. Diversidad trófica de AVL por gramo de suelo) con y sin Medicago sativa. **S0**, suelo desnudo después de 30 días de la perturbación mecánica; **S30**, suelo desnudo 30 días después de la perturbación; **S60**, suelo desnudo después de 60 días de la perturbación; **SP30** suelo de la zona de raíces de Medicago sativa después de 30 días; **SP60** suelo de la zona de raíces 60 días después de la perturbación.

	H'	D'
S0	1.83	0.66
S30	2.61	0.71
S60	1.79	0.49
SP30	2.44	0.57
SP60	2.43	0.54
SC0	2.3	0.46
SC30	2.6	0.47
SC60	2.1	0.41
SCP30	2.1	0.38
SCP60	1.9	0.32
SH0	1.89	0.44
SH30	2.3	0.48
SH60	1.54	0.49
SHP30	2.12	0.45
SHP60	2.27	0.57

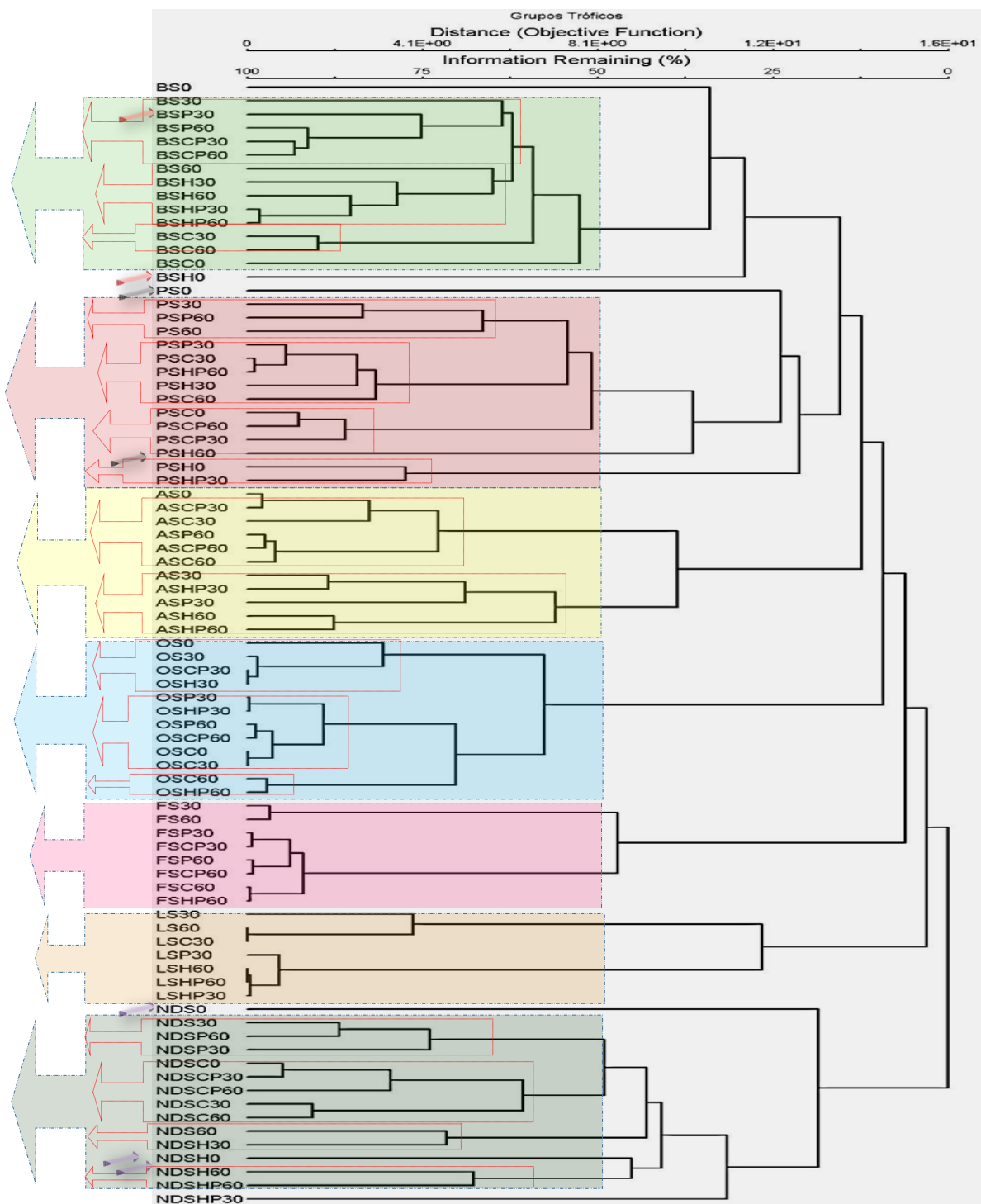


Figura 7. Análisis grupal entre las comunidades tróficas de las AVL del suelo no contaminado, contaminado con combustóleo, contaminado con hexano y con *Medicago sativa*. **S**: suelo desnudo, **SP**: suelo con planta, **SC**: suelo con combustóleo, **SCP**: suelo con combustóleo y planta, **SH**: suelo con hexano, **SHP**: suelo con hexano y planta. **30** y **60** simbolizan los días transcurridos después de las diferentes perturbaciones. **Grupos tróficos**: **B**: amebas bacterívoras; **P**: amebas que se alimentan de otros protozoos; **A**: amebas algúvoras; **O**:

omnívoras; **F**: amebas fungívoras; **L**: amebas que se alimentan de levaduras y **ND**: amebas sin un grupo trófico determinado.

Discusión

En el ambiente existen muchos factores que pueden provocar diferentes niveles de perturbación. En este caso pudimos observar claramente que el daño ocasionado a una comunidad depende del tipo de factor y de la intensidad del mismo. La dinámica de las comunidades de **AVL** fue diferencial entre tratamientos, pero en todos los casos hubo efectos negativos sobre el número de individuos y la riqueza de especies después de la perturbación (**Figuras 1 y 2**). Todos los niveles tróficos de las comunidades se ven sometidas a cambios en la frecuencia y en la composición de especies.

Un día después de la perturbación mecánica, la comunidad de **AVL** mostró la menor cantidad de especies e individuos de amebas de todos los tratamientos. Lo cual puede deberse a los cambios en la estructura del suelo producidos por la manipulación mecánica, ya que disminuyen la actividad biológica y ralentizan los procesos microbianos a un nivel de micro y macroescala (Haban, 1986; Elliott & Coleman, 1988; Bowman *et al.*, 1990; Franzluebbers *et al.*, 1994; McGarty *et al.*, 1995). Sin embargo, la presencia de *M. sativa* permitió que las AVL llegaran a su número máximo a los 30 días (**Figura 1**). **Sesenta días después** de la perturbación mecánica las comunidades encontradas en el suelo desnudo y el suelo rizosférico tuvieron una disminución en el número total de amebas, siendo más significativo en el suelo desnudo debido a la ausencia de los recursos aportados por la raíz. Estos cambios son consecuencia de la perturbación física que tiene efecto sobre el espacio disponible a un nivel de microescala. Ya que la destrucción de la estructura del suelo reduce los espacios donde se desarrollan las **AVL**.

Como muestra el dendrograma de la figura 6, la comunidad de AVL del suelo desnudo es más heterogénea que aquellas comunidades desarrolladas bajo la influencia de la raíz de la alfalfa, pues los ensamblajes de especies del suelo desnudo presentan una mayor proporción de especies diferentes. Cabe destacar, que la comunidad de **AVL** de un día posterior a la perturbación mecánica es la que comparte menos información con el resto de las comunidades encontradas. La contaminación con combustóleo y hexano también

disminuyen drásticamente. En todos los casos la comunidad de amebas se recuperó rápidamente, pero a los 30 días eran comunidades diferentes. Esto nos da fuertes indicios que la naturaleza de la perturbación condiciona la estructura por especies de la comunidad. En el caso del suelo rizosférico de todos los tratamientos, la tendencia parece seguir una dinámica sucesional confluyente, donde la estructura de especies de las comunidades es más parecida entre ellas.

Las amebas pueden ser agrupadas por su tamaño, volumen y adaptabilidad a los pequeños espacios dentro de la matriz del suelo. Este es el caso de muchas especies de amebas testadas, ya que su distribución está restringida a espacios definidos por el tamaño y rigidez de la testa. Las amebas testadas de gran tamaño se desarrollan mejor en los primeros horizontes del suelo, donde la hojarasca y los subsiguientes horizontes les proporcionan los recursos y condiciones necesarias, porque en la porosfera existe mayor abundancia de canales de gran tamaño (Bobrov *et al*, 1999). Registramos 3 especies de amebas testadas (2 spp del género ***Arcella*** y 1 sp de ***Trinema***) y 5 especies de amebas de testa transparente y flexible (***Cochliopodium*** 2 spp y 1 sp de cada uno de los géneros ***Gocevia***, ***Paragocevia*** y ***Hyalidiscus***). Su tamaño varía entre 10 y 50 micras (Page, 1976), exceptuando a ***Gocevia*** (110 micras; Page, 1976), lo que puede indicar que el suelo presenta una gran cantidad de espacios disponibles entre agregados. Estas especies testadas también se presentaron en el suelo con ***M. sativa*** y se alimentan de levaduras; lo que indica que estas especies dependen indirectamente de la alfalfa pues están más ligadas a la presencia de sus presas. Otras especies presentes fueron las amebas pequeñas (aproximadamente 20 micras) y de forma monopodal, aunque algunas especies forman pseudópodos (especies de ***Paramoebidae***), su forma básica de locomoción rápida es por medio de un lobopodo que se asemeja a la forma de un gusano (familias ***Vahlkampfidae*** y ***Hartmannellidae***). Las especies de estos grupos fueron muy abundantes en los dos suelos (suelo con y sin planta). Otras de las especies que se identificaron pertenecen a las familias ***Paramoebidae*** y ***Leptomyxidae***, las cuales se caracterizan por un movimiento celular que les permite aumentar su velocidad gracias a la forma monopodal o en una forma más ameboide para disminuir su velocidad y poder alimentarse y formar otros pseudópodos (observación

personal). Este tipo de movimiento rápido y fino podría ayudar al rastreo y ubicación de sus presas (Roberts *et al.*, 2011) o a la detección de otros microorganismos depredadores potencialmente peligrosos para las amebas dentro de su microambiente.

Cada una de las especies de **AVL** desnudas se caracterizan por su forma peculiar de movimiento y la capacidad de formar pseudópodos de diversos grosores y formas, que van desde 1 a 20 micras dependiendo del tamaño de la ameba. La mayoría de las especies encontradas en el suelo desnudo de los 60 días son de un tamaño que oscila entre las 20 y las 80 micras (**Anexo 4**). Por el contrario, en el suelo de la zona de raíces se presentaron especies de mayor tamaño pertenecientes al género *Mayorella* (de 60 a 150 micras; Page, 1988). Los compuestos que segrega la planta modifican las propiedades del suelo, ayudando a que este adquiera una estructura más desarrollada, donde la agregatosfera y la porosfera se hacen más estables porque los exudados de las raíces promueven la cementación de los agregados, lo que modifica la densidad aparente del mismo e incrementa los espacios entre agregados. Esto favorece el desarrollo de especies de gran tamaño, como es el caso del género *Leptomyxa*, una ameba reticulada o en forma de red de aproximadamente 600 micras (tamaño promedio en las identificaciones morfológicas) encontrada en la zona de raíces. Esta especie de ameba es capaz de formar pseudópodos de diversos grosores, que llegan a ser de hasta 1 micra de diámetro. Esto le trae ventajas para alimentarse en los espacios que sirven como refugios de sus presas (protozoos de pequeño tamaño y algunas bacterias).

La perturbación de la revoltura del suelo fue intensa pero de poca duración y muy baja frecuencia, por lo que en la ausencia de otras perturbaciones, favoreció la recuperación de la riqueza de especies de amebas, pero solo durante los primeros 30 días. Durante este período la riqueza especies de **AVL** incrementó cuatro veces en comparación con la comunidad de **AVL** encontrada un día después de la perturbación. En contraste, el suelo con *M. sativa* albergó la mayor cantidad de especies, así como la mayor cantidad de biomasa. Esto nos dice que la raíz de la alfalfa proporciona una mayor cantidad y variedad de recursos para las poblaciones de microorganismos de la zona de raíces haciendo evidente una mayor complejidad de las comunidades. Esto significa que existe una mayor

cantidad de pulsos de recursos que la misma planta puede mantener (Booth *et al.*, 2001) que permiten recuperar a las comunidades de los microorganismos (Garrett *et al.*, 2001) pues la riqueza de especies se mantuvo estable en los tratamientos con ***M. sativa*** de los 30 a los 60 días.

El fenómeno de reducción de individuos se observó en todos los tratamientos a los 60 días. Esto puede dar indicios de que los nutrientes comienzan a escasear, ya que en el tratamiento donde la planta está presente también se registró una reducción de aproximadamente el 50% en el número de amebas en comparación con el número de individuos del período anterior. Lo que también puede deberse a la competencia por espacio.

En el suelo expuesto al hexano, la cantidad de amebas paso de millones a solo unos cuantos miles de individuos por gramo de suelo. Este solvente redujo significativamente la riqueza y la frecuencia de especies de amebas en su forma trófica, ya que 24 horas después solo se pudo registrar la presencia de algunos trofozoitos y una gran cantidad de quistes. No obstante, la cantidad de **AVL** se duplicó a los 30 días después de contaminar con hexano y a los 60 días se volvió a duplicar el número de amebas. ***M. sativa*** influyo positivamente la recolonización de las amebas, ya que el suelo de la zona de raíces mostró el doble de individuos después de 30 días en comparación con el suelo desnudo del mismo período.

La contaminación por hexano tuvo un efecto selectivo que provocó cambios en el desarrollo de la comunidad de **AVL**. Este hidrocarburo de bajo peso molecular es muy propenso a la volatilización, pero en contacto directo con moléculas hidrófobas se genera un efecto disolvente de los lípidos de la membrana plasmática de los microorganismos (Sikkema *et al.*, 1995). Aunque esto depende de la concentración efectiva del contaminante a la que están expuestos los organismos (Maier, 2000). La comunidad de **AVL** determinada un día después de la perturbación con hexano comparte muy pocas especies con las otras comunidades (Figura 7). Por ello, las especies que encontramos en los períodos subsiguientes se pueden clasificar como tolerantes a este solvente tóxico. Las especies resistentes en su forma trófica al hexano fueron ***Hartmannella vermiformis***, ***Vahlkampfia***

aberdonica, **Trichamoeba sp**, **Hyperamoeba sp**, mientras que **Leptomyxa**, **Rhizamoeba**, **Vahlkampfia** fueron géneros abundantes en forma de quiste. Estas especies se desarrollaron en los períodos sucesivos del experimento, aunque con una baja frecuencia de aparición (tabla 1). Lo cual explica la poca similitud entre las comunidades de 1, 30 y 60 días.

Poco se sabe acerca de la tolerancia de las **AVL** a solventes, pero se han reportado algunas especies de amebas tolerantes a fungicidas y a bromuro de metilo en suelos agrícolas (Ekelund, 1999; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2004; Ekelund *et al.*, 2009). Algunos géneros de amebas encontradas durante el presente estudio tienen un glucocalix que es una cubierta protectora de la célula (como en el caso de algunas especies de la familia **Hartmannellidae**). Los glicostilos y las microescamas son otras estructuras protectoras que se han encontrado en muchas especies de **Dactylamoeba**, **Paramoeba** y **Cochliopodium**. Los glicostilos son estructuras complejas, flexibles y radialmente simétricas que se distribuyen a lo largo de la membrana plasmática. **Mayorella**, **Dermamoeba**, **Gocevia** y **Paragocevia** presentan, además una cutícula gruesa (Page, 1988). Las especies de estos géneros forman pequeñas células redondeadas como formas de resistencia en lugar de quistes. Los glicostilos y las cutículas pueden proteger a las amebas de los efectos tóxicos causados por los solventes, lo que explicaría la presencia de estos géneros en el suelo después de la exposición al hexano. También es posible que tengan mecanismos convergentes con los desarrollados por algunas bacterias tolerantes (Isken & Bont, 1998; Ramos *et al.*, 2002), las cuales realizan cambios en la composición de su membrana, haciéndola menos hidrofóbica (Heipieper *et al.*, 2007).

La especie multinucleada **L. reticulata**, tiene la capacidad de realizar la plastronomía, lo que le permite enquistarse cuando el plasmodio queda por lo menos con un núcleo. Esta es una de las amebas con un plasmodio multinucleado de 100 a más de 600 μm (Singh, 1948). El enquistamiento en estas amebas es lento en condiciones de cultivo (Singh, 1948), mostraron un rápido enquistamiento después de la exposición al hexano y se les localizó en su forma trófica 30 días después. Otra de las ventajas es que el quiste no aísla por completo a la ameba del ambiente, ya que su semipermeabilidad les permite recibir señales que

proviene del alimento disponible en su hábitat. De esta manera las amebas se reactivan y adquieren su forma trófica cuando detectan las condiciones mínimas para su sobrevivencia.

Las especies de gran tamaño tardan períodos largos de tiempo en aparecer como parte de las comunidades microbianas. Lo que se debe a los hábitos alimentarios de estas especies, ya que muchos de los protozoos necesitan de un tipo variado de alimento para desarrollarse. Este es el caso de *L. reticulata* y *Rhizamoeba* que podrían ser utilizadas como indicadores de la recuperación de las redes tróficas del suelo, pues por su gran tamaño (entre 150-400 μm) requieren mayor cantidad de presas de talla media a grande para multiplicarse en comparación con las amebas pequeñas. Las necesidades de las especies de *Leptomyxa* sp y *Rhizamoeba* sp aumentan con el incremento de tamaño, pues requieren presas de mayor tamaño, como otros protozoos o inclusive organismos microscópicos multicelulares, como rotíferos y nemátodos (Mast & Root, 1916). Su presencia refleja que en el suelo existe una gran cantidad de recursos que permiten sostener las poblaciones de especies de amebas de gran tamaño.

Efecto de tres factores de perturbación sobre la estructuración trófica de AVL

Las diferentes perturbaciones promovieron el desarrollo de 3 comunidades diferentes de **AVL**. El cambio físico abrupto, como lo es la revoltura del suelo, generó una respuesta negativa muy similar a la ocurrida en la comunidad que fue expuesta al hexano. Sin embargo, el mayor registro de especies se obtuvo en el suelo contaminado con combustóleo. El hexano causó la mayor devastación en la comunidad de **AVL**. El suelo expuesto al hexano tuvo un efecto similar a una fumigación, afectando de manera sustancial la estructura por especies de la comunidad de este suelo.

Después de la perturbación con el combustóleo se detectaron algunas familias comunes de **AVL**: **Vahlkampfiidae**, **Acantamoebidae**, **Leptomyxidae**, **Paramoebidae**, **Flabellulidae**,

Vexilliferidae, Echinamoebidae, Cerchomonidae, Hyalodiscidae, Trinematidae y 6 especies cuya familia no se logró establecer, sin embargo 3 de estas especies pertenecen a la clase **Heterolobosea** y las restantes se determinaron como pertenecientes a la clase **Lobosea**.

Las amebas del genero **Vahlkampfia (Vahlkampfiidae)** son muy comunes en los suelos y se han encontrado desde suelos de zonas semidesérticas hasta en costras microbianas. Además, estas amebas tienen una gran plasticidad que les permite explotar una gran diversidad de microambientes.

Las especies de la familia **Acanthamoebidae**, se conocen por su alto potencial patógeno oportunista (Ahmed, 2009). Su capacidad patogénica se debe a la resistencia de sus quistes a diversos factores ambientales, incluyendo al cloro (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005). Estas especies omnívoras tienen la ventaja de consumir desde una gran variedad de compuestos nutritivos en solución hasta presas que van desde bacterias, hongos, levaduras, hasta eucariontes unicelulares y pluricelulares (Daggett *et al.*, 1982; Ahmed, 2009; Nero, 1964; Neff, 1958; Wrights, 1981).

Las amebas de la familia **Paramoebidae** pertenecen a los grupos tróficos bacterívoras, alguívoras y algunas especies conforman el grupo de las que se alimentan de otros protozoos (Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005; Page, 1976; Pratt & Cairns, 1985; Bovee, 1961; Jeroen *et al.*, 2010). Esta fue una de las familias con más representantes en los grupos tróficos y que fueron muy frecuentes en todos los tratamientos. **Mayorella spatulla**, por ejemplo, fue la especie bacterívora más frecuente en los microcosmos (Laybourn *et al.*, 1987; Bovee, 1960).

En el suelo con combustóleo se registró la presencia de algunas especies de amebas testadas de las familias **Trematidae** y **Arcellidae**. Estas especies se presentaron en todos los microcosmos teniendo una mayor presencia en los tratamientos con la planta. Algunas especies de amebas testadas son de hábitos depredadores, y generalmente buscan presas de gran tamaño (Gilbert *et al.*, 2003; Yeates & Foissner; 1995).

Las especies que aparecen un día después de la contaminación con combustóleo, pertenecen a las **estrategas “a”** (Bamforth, 2014) que son especies de hábitos depredadores y un ciclo de vida corto que promueven la liberación y el reciclaje rápido del **N** en su forma orgánica (Bamfoth, 1995), lo que haría posible la reintroducción de los compuestos hidrocarbonados en la biomasa (Holubar *et al.*, 2000). El efecto indirecto de la depredación podría acelerar este proceso.

Las especies de **AVL** tolerantes a los hidrocarburos son claves en el reciclaje de compuestos hidrocarbonados ya que la mayoría de estas especies son depredadoras de bacterias. Cabe señalar que los procariontes son los principales degradadores de productos de origen petroquímico y que al ser depredados por los protozoos (Mattison *et al.*, 2005), se mantienen en reproducción por lo que necesitan obtener más C mediante el consumo de los hidrocarburos.

La estimulación del incremento poblacional de amebas bacterívoras 24 h después de la adición del combustóleo puede deberse al efecto en cascada relacionado con el crecimiento poblacional de bacterias hidrocarbonoclastas que se desarrollaron después de la adición de combustóleo. En ambientes marinos contaminados con petróleo se ha observado un crecimiento explosivo de las poblaciones hidrocarbonoclastas horas después del evento de contaminación. Por ello, estas bacterias pudieron contribuir al incremento de las especies de **AVL** tolerantes al combustóleo en todos los tratamientos. Cabe resaltar que el suelo rizosférico con combustóleo fue el que pudo albergar la mayor cantidad de estas especies, como se ha observado en otros estudios (Siciliano *et al.*, 2003), incluyendo las que se alimentan de otros protozoos (**P**).

Las comunidades de amebas que se **alimentan de otros protozoos** formaron tres agrupaciones. La similitud entre estas comunidades puede ser resultado de algunos factores indirectos relacionados con la exposición a los hidrocarburos. La riqueza de especies con este hábito alimenticio es relativamente menor en comparación con el grupo de los **bacterívoros**, y sus poblaciones deben encontrarse distribuidas en función de la presencia de sus presas preferidas.

La comunidad de las **AVL omnívoras** del género *Acanthamoeba* se vieron favorecidas solo en el suelo desnudo contaminado con combustóleo. Sin embargo, existen subagrupaciones de este grupo trófico que se relacionan con la presencia de *M. sativa*, pues en el suelo de la zona de raíces contaminado con combustóleo y no contaminado mostraron una similitud significativa, mientras que el suelo con combustóleo después de 30 días presentó el menor número de omnívoras.

El efecto de la raíz de la planta fue más evidente en algunos grupos tróficos, como fue el caso de las amebas de hábitos bacterívoros y las que se alimentaron de otros protozoos. La estructuración trófica que se presenta después de los tres factores de perturbación es mucho más compleja en el suelo rizosférico que aquella que se presentó en los suelos desnudos. El “efecto en cascada” nos da indicios del incremento de la complejidad ya que la planta introduce una serie de compuestos que bioestimulan a toda la microbiota, comenzando por el grupo bacterívoro, lo que nos indica que la comunidad de bacterias incrementa, tanto en biomasa como en su **RE** proporcionando una mayor cantidad y variedad de recursos alimenticios para sus depredadores. Este incremento de biomasa microbiana es un fuerte incentivo para toda clase de depredadores que no son bacterívoros, sobre todo en aquellos que se alimentan de otros protozoos. Existen otro tipo de grupos tróficos que se benefician de forma indirecta por la alfalfa, tales como las alguívoras, las que se alimentan de levaduras y el grupo de amebas de las que no se tiene conocimiento de sus hábitos alimenticios (**ND**). Este último grupo presentó una tendencia a agruparse dependiendo del tipo de perturbación de la que fue objeto (**Figura 7**).

Efecto de la perturbación sobre las redes tróficas de ADVL del suelo

Los diferentes factores de perturbación afectaron negativamente y de forma diferencial la dinámica de las redes tróficas que se encontraron en los microcosmos. La red trófica más afectada se encontró en el suelo expuesto al hexano. Durante las primeras veinticuatro horas encontramos la red trófica más simple, ya que sólo se observó al grupo bacterívoro y

al que se alimenta de otros protozoos (**Figura 8**). Posteriormente esta red trófica cambio drásticamente en la identidad e inclusión de las especies que conforman cada grupo trófico. Después de 30 días la red trófica encontrada en el suelo expuesto al hexano comenzó a incluir más especies, entre ellas al grupo de las amebas omnívoras (**Figura 9**). El suelo rizosférico con hexano mostró una mayor cantidad de grupos tróficos en ese mismo periodo, al incorporarse el grupo de amebas algúvoras y las que se alimentan de levaduras, además de una recuperación mayor de las especies bacterívoras (**Figura 10**). En el segundo período la red trófica del suelo con hexano mostró casi la misma cantidad de grupos a excepción de las omnívoras (**Figura 11**), mientras que en el suelo rizosférico con hexano se integró el grupo de las amebas fungívoras (**Figura 12**).

Aunque el **GT** de las amebas bacterívoras estuvo presente en todos los microcosmos, la cantidad e identidad de las especies es completamente diferente en el tiempo y en el espacio.

Después de 30 días las redes tróficas de los tratamientos con *M. sativa* del suelo contaminado con combustóleo y el suelo control se mantuvieron constantes en la composición de los grupos tróficos, con la diferencia de que en el suelo control encontramos al grupo fungívoro (**Figura 10**). La alfalfa permitió el desarrollo de otras especies aumentando la biomasa de los diferentes grupos tróficos. La planta funciona como soporte de las comunidades de protozoos, pues 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, la planta proporciona sombra sobre el suelo atemperando la radiación; en el subsuelo, la raíz provee de diferentes exudados a los microorganismos que habitan en la rizósfera, los que a su vez sirven de presas potenciales para las **AVL** (Lynch *et al.*, 2002; Zwart, *et al.*, 1994). El grupo bacterívoro pudo mantener la función de liberación de compuestos orgánicos que se encuentran en la biomasa de las bacterias.

El grupo omnívoro se presentó desde las primeras etapas de recuperación de las **RTMS** de todos los microcosmos, sin embargo su **riqueza de especies** es pobre en comparación con

otros grupos. La supervivencia de las **ADVL** omnívoras sugiere la capacidad de aprovechar la amplitud de su nicho. Este es el caso de las especies omnívoras (género *Acanthamoeba*), las que son consideradas como **estrategas "r"**, debido a que exhiben crecimiento poblacional rápido (Bamforth *et al.*, 2005) y retienen muy poco tiempo los nutrientes. Lo cual posibilita que el suelo contaminado con combustóleo exporte nutrimentos biodisponibles. Al desaparecer ciertos grupos de depredadores de otros protozoos, se reduce la competencia por las presas potenciales, lo que permite la supervivencia del grupo omnívoro.

Conclusión

Las perturbaciones de gran intensidad y corta duración pueden tener efectos diversos sobre las redes tróficas de amebas del suelo. Las especies no poseen la misma resistencia ante los cambios drásticos. La abundancia de cada especie se ve afectada a niveles diferentes y en casos extremos lleva hasta la extinción de la población. La reducción de la diversidad de especies es un efecto negativo que ocurre al mismo tiempo que la reducción del funcionamiento del sistema. En caso de que no existan más especies que puedan llevar a cabo dicha función, el sistema puede llegar al colapso. Sin embargo, las interacciones rizosféricas posibilitan el mantenimiento de las funciones del sistema aún con una gran reducción de la riqueza de especies. Por lo tanto, la estabilidad en el funcionamiento del sistema depende de las especies (Hunt & Wall, 2012) con funciones redundantes y de la variación en las condiciones ambientales.

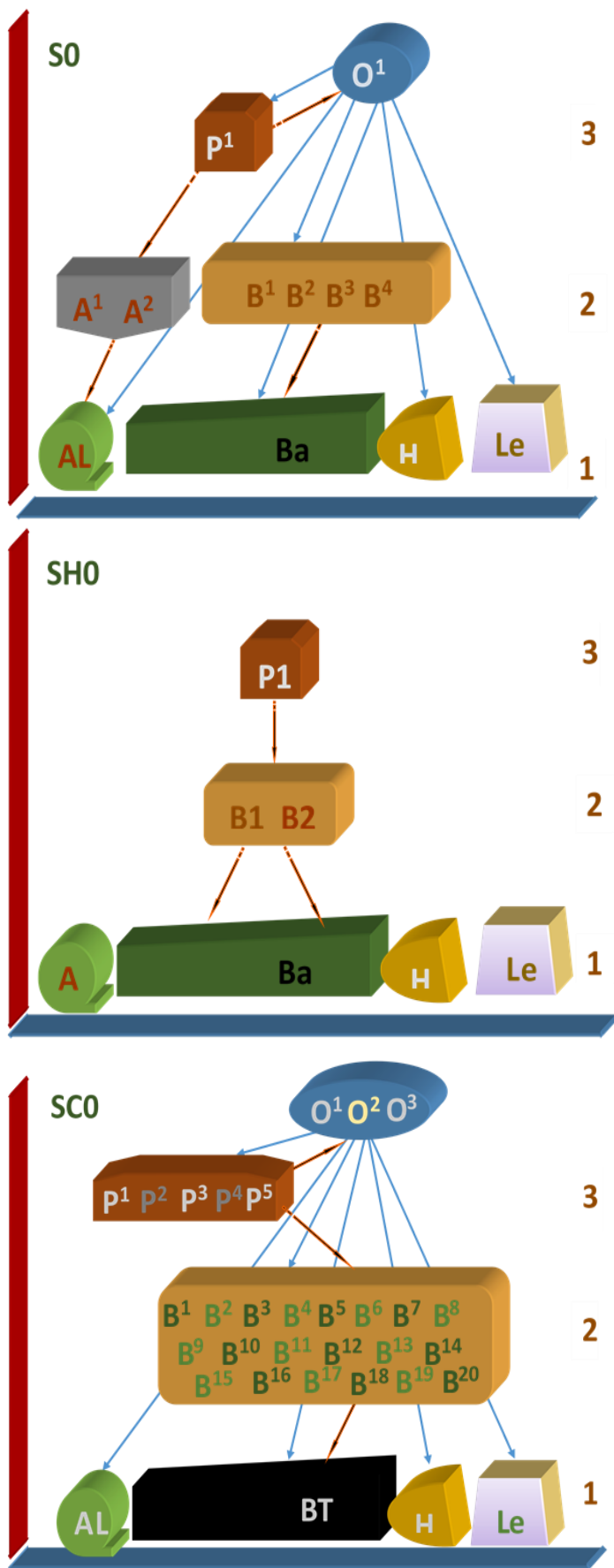
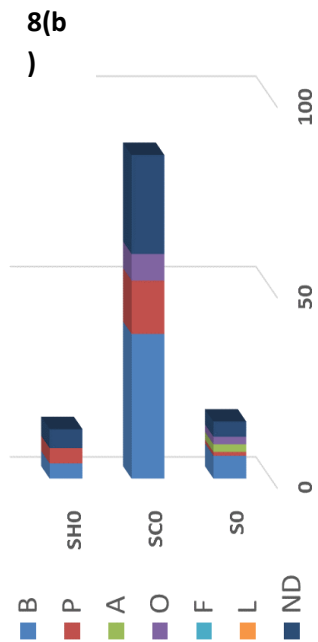


Figura 8. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación. **S**, suelo con perturbación mecánica. **C**, suelo contaminado con combustóleo. **H**, suelo contaminado con hexano. **O**, cero que simboliza un período de 24 h después de la perturbación. En la parte posterior de la figura se encuentran los principales tipos de presas; **A**, algas; **Ba**, bacterias, **BT**, bacterias tolerantes al combustóleo; **H**, hongos; **Le**, levaduras (nivel 1). Grupos tróficos de ADVL; **A**, alguívoras; **B**, bacterívoras; **F**, fungívoras; **L**, amebas que se alimentan de levaduras (nivel 2). **P**, amebas que se alimentan de otros protozoos (nivel 3). **O**, omnívoras (sin nivel trófico).

Figura 8(b). Frecuencias de las especies que estructuran los grupos tróficos de ADVL.



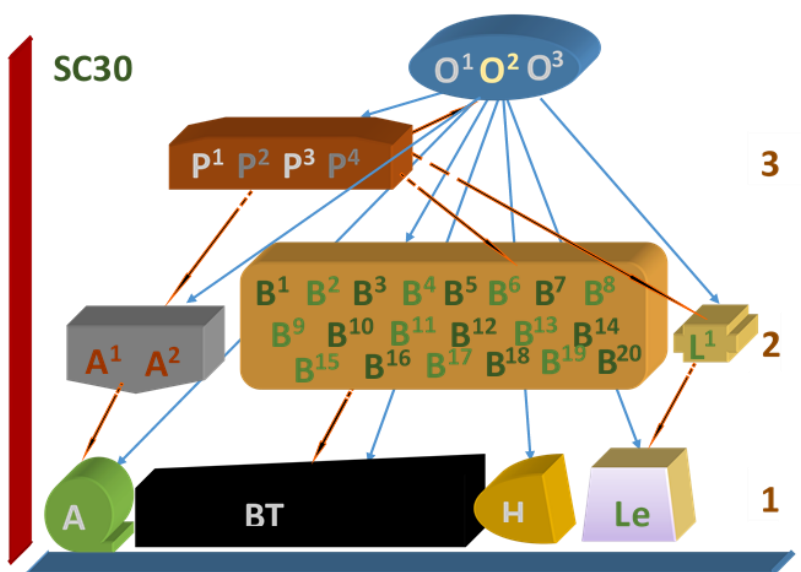
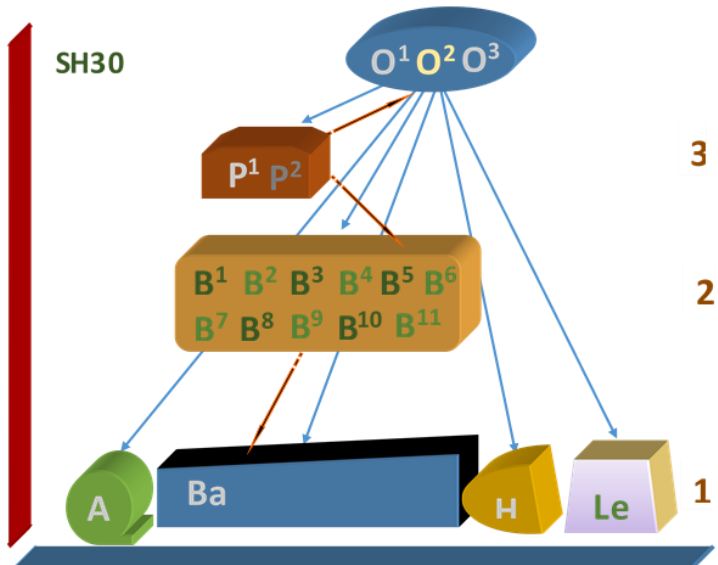
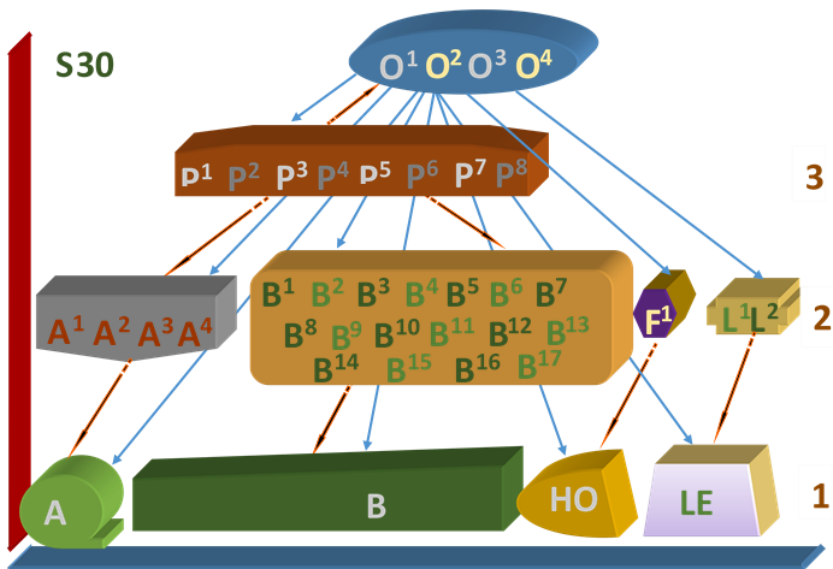
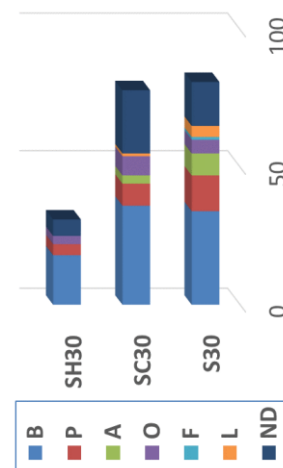


Figura 9. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 30 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación. **S**, suelo con perturbación mecánica. **C**, suelo contaminado con combustóleo. **H**, suelo contaminado con hexano. 30, 30 días después de la perturbación. En la parte posterior de la figura se encuentran los principales tipos de presas; **A**, algas; **Ba**, bacterias, **BT**, bacterias tolerantes al combustóleo; **H**, hongos; **Le**, levaduras (nivel 1). Grupos tróficos de ADVL; **A**, alguívoras; **B**, bacterívoras; **F**, fungívoras; **L**, amebas que se alimentan de levaduras (nivel 2). **P**, amebas que se alimentan de otros protozoos (nivel 3). **O**, omnívoras (sin nivel trófico).

Figura 9(b). Frecuencias de las especies que estructuran los grupos tróficos de ADVL.

9(b)



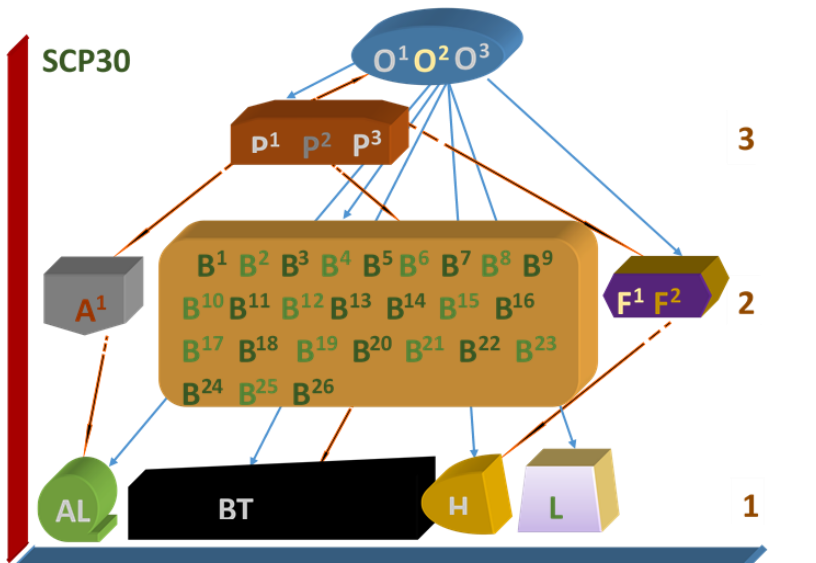
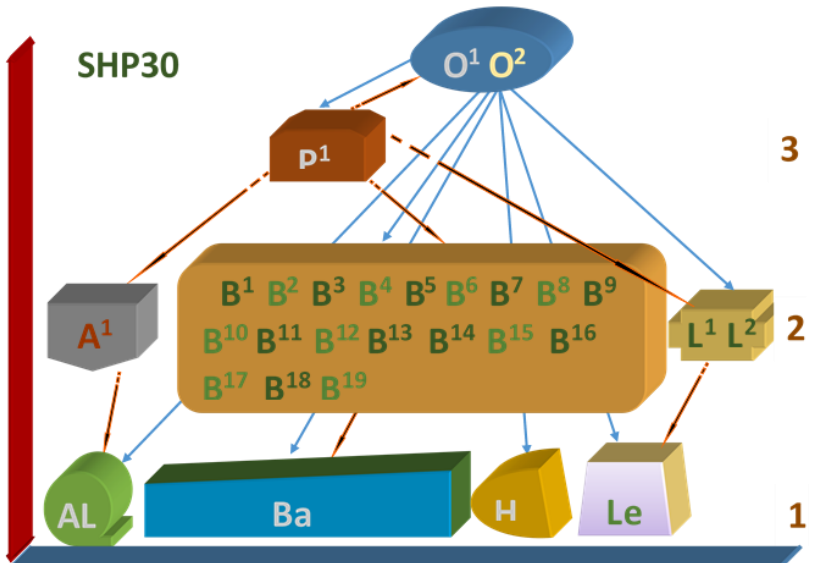
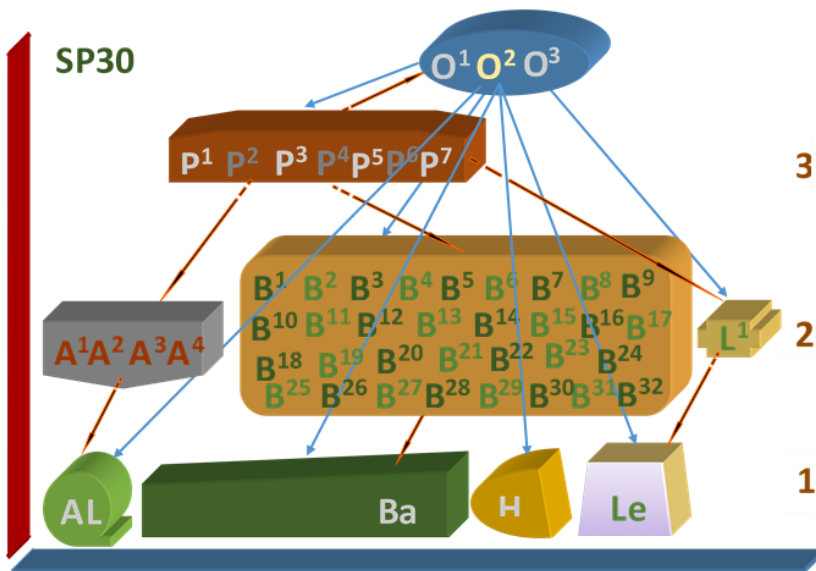
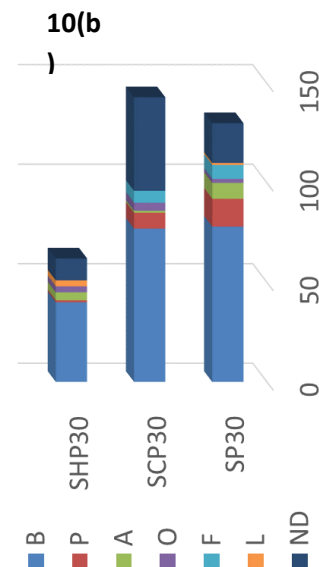


Figura 10. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 30 después de someter al suelo a 3 diferentes factores de perturbación y con *Medicago sativa*. **S**, suelo con perturbación mecánica. **C**, suelo contaminado con combustóleo. **H**, suelo contaminado con hexano. **P**, *Medicago sativa*. **30**, 30 días después de la perturbación. En la parte posterior de la figura se encuentran los principales tipos de presas; **A**, algas; **Ba**, bacterias, **BT**, bacterias tolerantes al combustóleo; **H**, hongos; **Le**, levaduras (nivel 1). Grupos tróficos de ADVL; **A**, alguívoras; **B**, bacterívoras; **F**, fungívoras; **L**, amebas que se alimentan de levaduras (nivel 2). **P**, amebas que se alimentan de otros protozoos (nivel 3). **O**, omnívoras (sin nivel trófico).

Figura 10(b). Frecuencias de las especies que estructuran los grupos tróficos de ADVL.



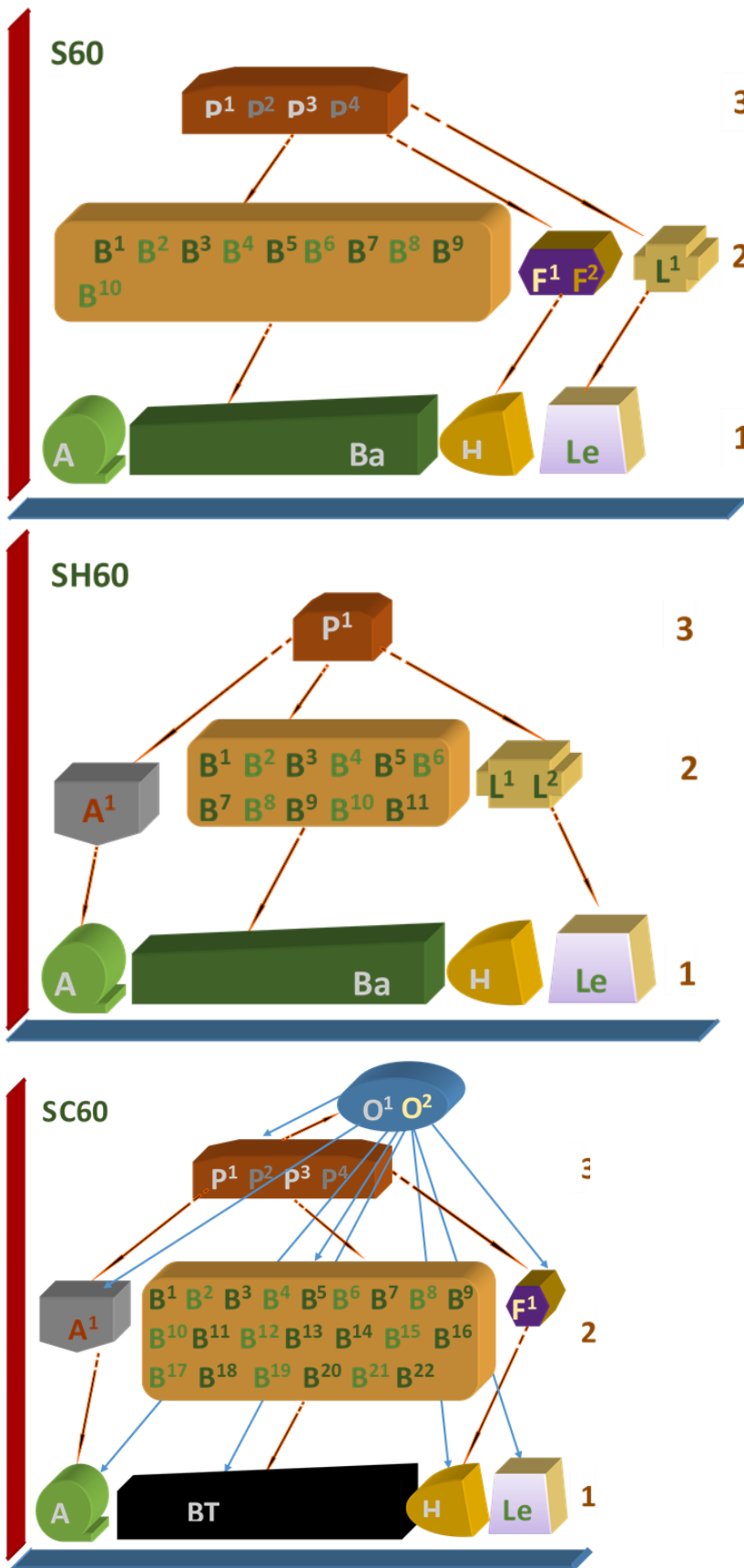
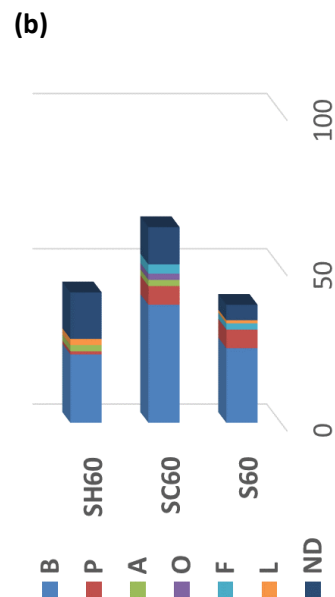


Figura 11. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 60 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación. *S*, suelo con perturbación mecánica. *C*, suelo contaminado con combustóleo. *H*, suelo contaminado con hexano. 60, 60 días después de la perturbación. En la parte posterior de la figura se encuentran los principales tipos de presas; *A*, algas; *Ba*, bacterias, *BT*, bacterias tolerantes al combustóleo; *H*, hongos; *Le*, levaduras (nivel 1). Grupos tróficos de ADVL; *A*, alguívoras; *B*, bacterívoras; *F*, fungívoras; *L*, amebas que se alimentan de levaduras (nivel 2). *P*, amebas que se alimentan de otros protozoos (nivel 3). *O*, omnívoras (sin nivel trófico).

Figura 11(b). Frecuencias de las especies que estructuran los grupos tróficos de ADVL.



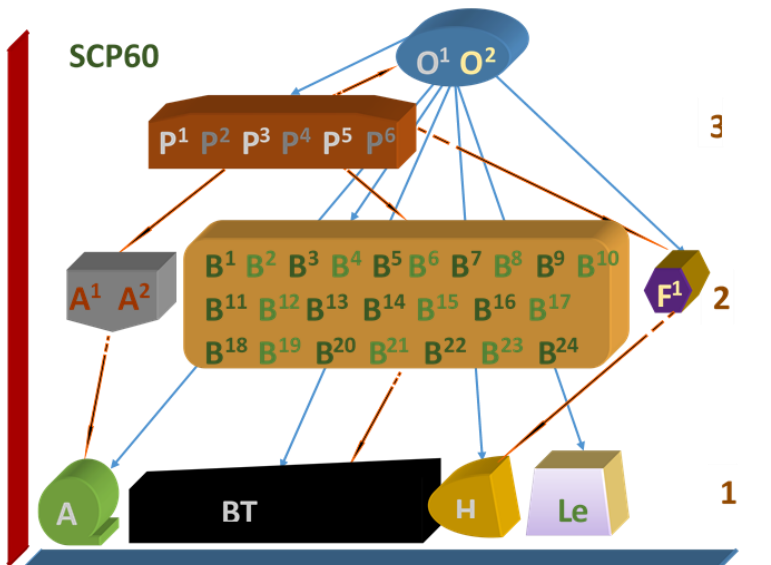
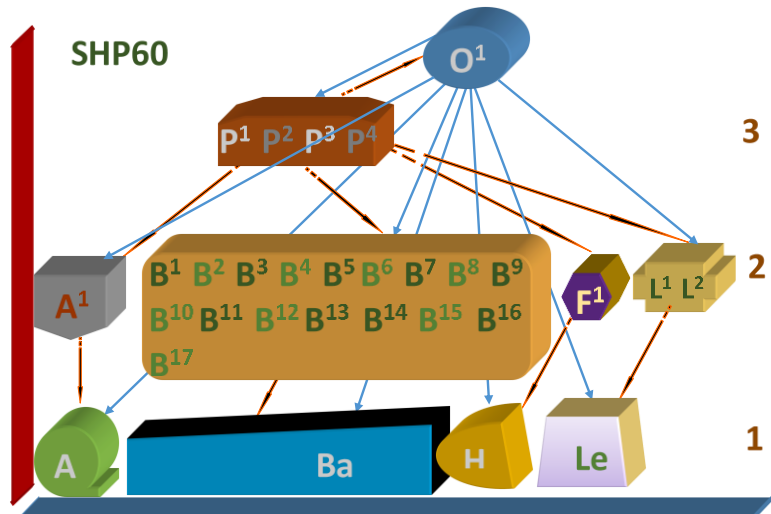
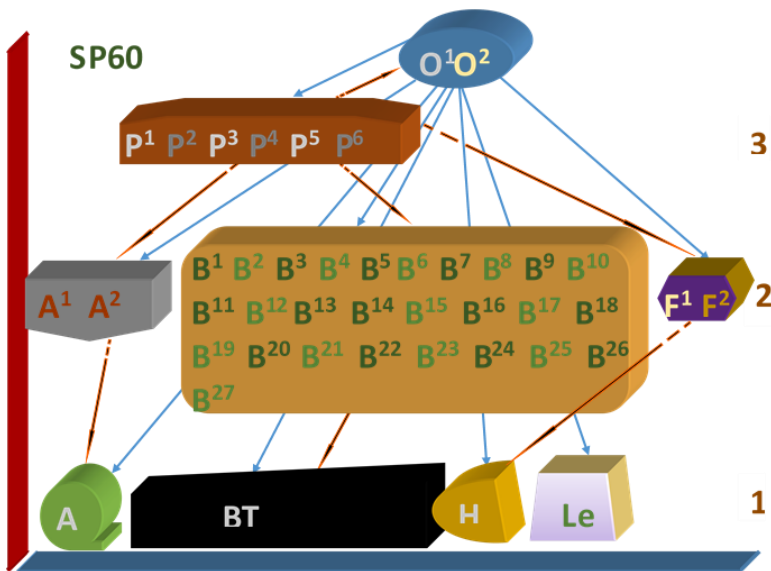
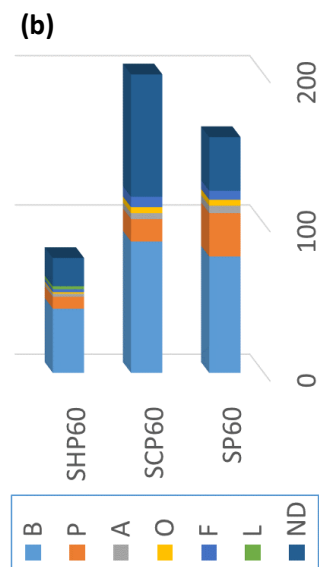


Figura 12. Redes tróficas de amebas de vida libre (AVL) de las comunidades 60 días después de someter al suelo de cultivo a 3 diferentes factores de perturbación, con *Medicago sativa*. **S**, suelo con perturbación mecánica. **C**, suelo contaminado con combustóleo. **H**, suelo contaminado con hexano. **P**, *Medicago sativa*. **60**, 60 días después de la perturbación. En la parte posterior de la figura se encuentran los principales tipos de presas; **A**, algas; **Ba**, bacterias, **BT**, bacterias tolerantes al combustóleo; **H**, hongos; **Le**, levaduras (nivel 1). Grupos tróficos de ADVL; **A**, alguivoros; **B**, bacterivoros; **F**, fungivoros; **L**, amebas que se alimentan de levaduras (nivel 2). **P**, amebas que se alimentan de otros protozoos (nivel 3). **O**, omnivoros (sin nivel trófico).

Figura 12(b). Frecuencias de las especies que estructuran los grupos tróficos de ADVL.



Referencias

1. Abd H, Wretlind B, Saeed A, Idsund E, Hultenby K & Sandström G (2008) *Pseudomonas aeruginosa* Utilises Its Type III Secretion System to Kill the Free-Living Amoeba *Acanthamoeba castellanii* *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55: 235–243.
2. Ahmed Khan N (2009) *Acanthamoeba* Biology and Pathogenesis. Castier Academic Press UK. USA 290 pp.
3. Alexander, 1967. Agriculture and the Quality of Our Environment (N.C. Brady, Ed.) pp 331-342. Am. Soc. Adv. Washington D.C.
4. Anderson OR, Gorrel T, Kruzanzky R & Levandowsky M (2001) Naked amoeba and bacteria in an oil-impacted salt marsh community. *Microbiology Ecology* 42: 474-481.
5. Bahr LM (1982) Functional taxonomy: an immodest proposal. *Ecology Modelling* 15:211-233.
6. Bamforth SS (1995) Interpreting soil ciliate biodiversity. *Plant Soil* 170: 159–164.
7. Bamforth SS (2014) Composition of Soil Testate Amoebae Communities: Their Structure and Modifications in the Temperate Rain Forests of New Zealand and Tasmania. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.
8. Bamforth SS, Wal HD & Virginia RA (2005) Distribution and diversity of soil protozoa in the McMurdo dry valleys of Antarctica. *Polar Biology* 28: 756-762.
9. Ben-Dor E, Inbar Y, Chen Y (1997) The reflectance spectra of organic matter in the visible near-infrared and short wave infrared region (400–2500 nm) during a controlled decomposition process. *Remote Sensing of Environmental* 61:1-15.
10. Bengtsson J, Seta-EläÈ, H, Zheng DW (1995) Food webs and nutrient cycling in soils: interactions and positive feedbacks. In: Polis, G., Winemiller, K. (Eds.), *Food Webs: Patterns and Processes*. Chapman and Hall, London, pp. 30-38.

11. Bobrov A, Charman DJ & Warner BG (1999) Ecology of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) on peatlands in Western Russia with special attention to niche separation in closely related taxa. *Protist* 150, 125-36.
12. Bonkowski M (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162: (3) 617-631.
13. Bonkowski M, Jentschke G. & Scheu S (2001) Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway Spruce seedlings (*Picea abies* Karst.), mycorrhiza (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) and naked amoebae (protozoa). *Applied Soil Ecology* 18: 193–204.
14. Booth RK, Bonkowski M, Jentschke G & Scheu S (2001) Contrasting effects of microbial partners in the rhizosphere: interactions between Norway Spruce seedlings (*Picea abies* Karst.), mycorrhiza (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) and naked amoebae (protozoa). *Applied Soil Ecology* 18: 193–204.
15. Bovee EC (1960) Studies Concerning the Effects of Nutrition on Morphology of Amebas. 1. *Mayorella cultura* Bovee, on Abundant and Starvation Quantities. *American Midland Naturalist* 63: 2, 257-269.
16. Bovee EC (1961) A small ameba of freshwater lakes and ponds, *Mayorella cultura* n. sp. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1:54–62.
17. Bowman RA, Reeder JD, Lober RW (1990) Changes in soil properties in a central plains rangeland soil after 3, 20, and 60 years of cultivation. *Soil Science*. 150, 851-857.
18. Buckley DH & Schmidt TM (2001) The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial Ecology* 42:11-21.
19. Cabello-Vílchez AM, Reyes-Batlle M, Montalbán-Sandoval E, Martín-Navarro MC, López-Arencibia A, Elias-Letts R, Guerra H, Gotuzzo E, Martínez-Carretero E, Piñero JE, Maciver SK, Valladares B & Lorenzo-Morales J (2014) The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. *Parasitology Research*. 113: (7) 2509-2513.
20. Cann JP (1986) The Feeding Behavior and Structure of *Nuclearia delicatula* (Filosea: Aconchulinida). *Journal of Protozoology*. 3:392-396.

21. Chakraborty S & Old KM (1986) Ultrastructure and description of a fungus-feeding amoeba, *Trichamoeba mycophaga* n.sp. (Amoebidea, Amoebae), from Australia Journal of Protozoology. 33:564-569.
22. Chapin FS & Körner C (1996) Arctic and Alpine biodiversity: it's a patterns, causes and ecosystem consequences. Functional Roles of Biodiversity: A Global Perspective (Ed. Por HA Mooney et al) 7-32, Chichester:SCOPE-Wiley.
23. Clarholm M (1985) Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. Soil Biology and Biochemistry. 17: 181–187.
24. Coleman DC & Crossley DA (1996) Fundamentals of Soil Ecology. Academic Press. 205 pp.
25. Coleman DC, Fu S, Hendrix P, Crossley D Jr (2002) Soil food webs in agroecosystems: impacts of herbivory and tillage management. European Journal of Soil Biology 38: (1); 21-28.
26. Coleman DC (1994) The microbial loop concept as used in terrestrial soil ecology studies. Microbial Ecology. Earth and Environmental Science. 2(28):245-250.
27. Coleman DC, Hendrix PF, Beare MH, Cheng W, Crossley DA Jr (1993) Microbial and faunal dynamics as they affect soil organic matter dynamics in subtropical Agroecosystems. In: Paoletti MG, Foissner W, Coleman DC (eds) Soil biota and nutrient cycling farming systems. Lewis Publishing Company, Chelsea, Michigan, pp. 1-14.
28. Coleman DC (1994) The microbial loop concept as used in terrestrial soil ecology studies. Microbial Ecology. Earth and Environmental Science. 2(28):245-250.
29. Cortés-Pérez S (2009) Cambio de la comunidad de amebas desnudas en suelo contaminado por combustóleo en el Municipio Jalacingo, Veracruz. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis. 74p.
30. Coûteaux MM & Darbyshire JF (1998) Functional diversity amongst soil protozoa. Applied Soil Ecology. 10: 229-337.
31. Coûteaux MM (1976) en Coûteaux MM & Darbyshire JF (1998) Functional diversity amongst soil protozoa. Applied Soil Ecology. 10: 229-337.

31. Cowling RM, Mustart PJ, Laurie H & Richards MB (1994) Species diversity: functional diversity and functional redundancy in fynbos communities. *South African Journal of Science*. 90: 333-337.
32. Daggett PM, Sawyer TK, Nerad TA (1982) Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. *Microb Ecol* 8(4):371–386.
33. Darbyshire JF (1994) *Soil protozoa*. Cab International. London 209 pp.
34. Duffy E, Cardinale BJ, France KE, McIntyre PB, Thébault E & Loreau M (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology letters* 10: 522-538.
35. Ekelund F, Saj S, Vestergård M, Bertaux J & Mikola J (2009) The “soil microbial loop” is not always needed to explain protozoan stimulation of plants. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2336–2342.
36. Ekelund, F. 1999. The impact fungicide fenpropimorph (Corbel[®]) on bacterivorous and fungivorous protozoa soil. *Journal of Applied Ecology*. 36: 233-243.
37. Elliott, E.T., Coleman, D.C., 1988. Let the soil work for us. *Ecological Bulletins* 39: 23-32.
38. Franzluebbers AJ, Hons FM, Zuberer DA (1994) Tillage and crop effects on seasonal dynamics of soil CO₂ evolution, water content, temperature, and bulk density. *Applied Soil Ecology*. 2: 95-109.
39. Gardner RH, Cale WG & O'Neill RV (1982) Robust analysis of aggregation error. *Ecology*. 63: 771-779.
40. Garrett CJ, Crossley DA Jr, Coleman DC, Hendrix PF, Kisselle KW & Potter RL (2001) Impact of the rhizosphere on soil microarthropods in agroecosystems on the Georgia piedmont. *Applied Soil Ecology* 16: 141–148.
41. Gilbert D, Mitchell EA, Amblard C, Bourdier G & André-Jean F (2003) Population Dynamics and Food Preferences of the Testate Amoeba *Nebela tinctoria* major-bohemica-collaris Complex (Protozoa) in a *Sphagnum* Peatland. *Acta Protozoologica* 42: 99 – 104.
42. Griffiths BS (1994) Soil nutrient flow. En: Darbyshire, J. F. (Ed.), *Soil Protozoa*. CAB International, Wallingford, pp. 65-91.

43. Hawkins CP & Sendell JR (1981) Longitudinal and seasonal changes in functional organization of macroinvertebrate communities in four Oregon streams. *Ecology*. 62: 387-397.
44. Heipieper H J, Neumann G, Cornelissen S & Meinhardt F (2007) Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems, *Applied Microbiology Biotechnology*. 74 961-973.
45. Holubar MP, 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.
46. Huang TC & Wu HY (1982) Predation of amoebae on the filamentous blue-green algae. *Bot Bull Academia Sinica* 23: 63-70.
47. Hunt HW & Wall DH (2002) Modelling the effects of loss of soil biodiversity on ecosystem function. *Global Change Biology* 8: 33-50.
48. Ingham RE, Trofymow JA, Ingham ER & Coleman DC (1985) Interactions of bacteria, fungi, and their nematode grazers: Effects on nutrient cycling and plant growth. *Ecological Monographs* 55: 119-140.
49. Isken S & de Bont JAM, (1998) Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*. 2 229-238.
50. Jeroen Van Wichelen J, van Gremberghe J, Vanormelingen P, Debeer AE, Leporcq B, Menzel D, Codd GA, Descy JP & Vyverman W (2010) Strong effects of amoebae grazing on the biomass and genetic structure of a *Microcystis* bloom (Cyanobacteria). *Environmental Microbiology* 10: 2797–2813
51. Johnson KH, Vogt KA, Clark HJ, Schmitz OJ & Vogt DJ (1996) Biodiversity and the productivity and stability of ecosystems. *TEE*, 11:372-377.
52. Karnieli A, Kidron GJ, Glaesser C & Ben-Dor E (1999) Spectral Characteristics of Cyanobacteria Soil Crust in Semiarid Environments. *Remote Sensing of Environment* 69 (1): 67-75.
53. Konopka A (2000) Theoretical analysis of the starvation response under substrate pulses. *Microbial Ecology*. 38:321–329.

54. Krome K, Rosenberg K, Bonkowski M & Scheu S (2009) Grazing of protozoa on rhizosphere bacteria alters growth and reproduction of *Arabidopsis thaliana*. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1866-1873.
55. Laybourn-Parry J, Jones K & Holdich JP (1987) Grazing by *Mayorella* sp. (Protozoa: Sarcodina) on cyanobacteria. *Functional Ecology*. 1: 99-104.
56. Laybourn-Parry J, Roberts EC & Bell EM (2000) Mixotrophy as a survival strategy in Antarctic lakes. In: Davidson W, Howard-Williams C & Broady P (eds.) *Antarctic Ecosystems: Models for Wider Ecological Understanding*, The Caxton Press, Christchurch, New Zealand, pp. 33-40.
57. Levchenko A & Iglesias PA† (2002) Models of Eukaryotic Gradient Sensing: Application to Chemotaxis of Amoebae and Neutrophils. *Biophysical Journal*. 82: 50–63.
58. Lorenzo-Morales J, Ortega-Riva A, Martínez E, Foronda P & Valladares B (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*, 95, 273–277.
59. Lund J. W. G. 1947. New Phytologist Observations on Soil Algae II. Notes on Groups Other than Diatoms. *New Phytologist*. 35-60.
60. Lynch JM, Brimecombe MJ & de Leij F (2002) Rhizosphere. *Encyclopedia of life sciences & Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group* 1-8.
61. Lynch JM, Whipps JM. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129: 1–10.
62. Maier RM (2000) Microorganisms and organic pollutants In: *Environmental Microbiology* (Eds. Maier R.M., Pepper L.I., Gerba P.C.) 16: 363-400. Elsevier, California, USA.
63. Mast SO & Root FM (1916) Observations on Ameba feeding on rotifers, nematodes and ciliates, and their bearing on the surface-tension theory. *Journal of Experimental Zoology*. 21: 33–49.
64. Mattison RG, 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.

65. Minoshima H, Jackson LE, Cavagnaro TR, Sánchez-Moreno S, Ferris H. Temple SR, Goyal S & Mitchell JP (2007) Soil Food Webs and Carbon Dynamics in Response to Conservation Tillage in California. *Soil Science Society of America Journal*. 71:952–963.
66. Neff RJ, Neff RH & Taylor RE (1958) The nutrition and metabolism of a soil amoeba, *Acanthamoeba* sp. *Physiological Zoology*. 31: 73-91.
67. Nero LC, Tarver MG, Hedrick LR (1964) Growth of *Acanthamoeba castellanii* with the yeast *Torulopsis farinosa*. *Journal Bacteriology* 87:220–225.
68. Nisbet B (1984) Nutrition and feeding strategies in protozoa. British library Cataloguing in Publication Data. Gran Bretaña. 274 pp.
69. Odum EP (1985) Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*. 35, 7: 419-422.
70. Odum EP, Finn JT, Franz EH (1979) Perturbation theory and the subsidy-stress gradient. *BioScience*. 29, 6: 349-352.
71. Old KM, Chakraborty S & Gibbs R (1985) Fine structure of a new mycophagous amoeba and its feeding on *Cochliobolus sativus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 17: 645-655.
72. Ollivier B & Magot M (2005) Petroleum microbiology. ASM Press, USA.
73. Page FC & Siemensma FJ (1991) Nackte rhizopoda and Heliozoa. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart.
74. Page FC (1976) An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Freshwater biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. 155 p.
75. Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae with instructions for culture. Freshwater biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. U.K. 122 pp.
76. Patterson DJ (1996) Free-living freshwater protozoa. Ed. John Wiley & Sons. Inglaterra 223 pp.
77. Pickett STA, Kolasa J, Armesto JJ & Collins LS (1989) The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchical levels. *Oikos*. 54:129-136.
78. Pickup ZL, Pickup R & Parry JD (2007) A comparison of the growth and starvation responses of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* in the

- presence of suspended and attached *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiology Ecology. 59: 556–563.
79. Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. Annu Rev Plant Biol 56: 15-39.
 80. Pratt RJ & Cairns JJr (1985) Functional groups in the protozoa: roles in differing ecosystems. Journal Protozoology 32: (3) 415-423.
 81. Pussard, M & Pons R (1976) Etude des genres *Leptomyxa* et *Gephyramoeba* (Protozoa, Sarcodina). 1. *Leptomyxa reticulata* Goodey, 1915. Protistologica. 12:151 168.
 82. Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P & Ramos-González MI (2002) Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria, Annual Review of Microbiology. 56: 743-768.
 83. Raynaud X (2010) Soil properties are key determinants for the development of exudates gradients in a rhizosphere simulation model. Soil Biology & Biochemistry 42:210-219.
 84. Raynaud X, Lata JC & Leadley PW (2005) Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant–microbial interactions. Plant and Soil. 287 (1): 95-116.
 85. Richards BN (1987) The microbiology of terrestrial ecosystems. Longman Group UK Limited.
 86. Roberts EC, Legrand C, Steinke M & Wootton EC (2011) Mechanisms underlying chemical interactions between predatory planktonic protists and their prey. Journal of Plankton Research. 1-9.
 87. Rodríguez-Zaragoza S (1994) Ecology of free-living amoebae. Critical Reviews in Microbiology .20: (3) 225-41.
 88. 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.
 89. Rodríguez-Zaragoza S, Dorante I, Velasco-Velasco J, Ferrera-Cerrato R (2004) Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amebas desnudas de un suelo agrícola. Terra Latinoamericana. 197-205.

90. Rønne R, McCaig AE, Griffiths BS & Prosser JI. (2002). Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied Environmental Microbiology*. 68: 6094–6105.
91. Rosenberg K, Bertaux J, Krome K, Hartmann A, Scheu S & Bonkowski M (2009) Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *The ISME Journal*. 3, 675–684.
92. Rossberg AG (2013) *Food webs and biodiversity*. WileyBlackwell. UK. 376 pp
93. Sánchez-Moreno S. Ferris H (2007) Suppressive service of the soil food web. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 119: 75–87.
94. Scholes L, Warren PH & Beckerman AP (2005) The combined effects of energy and disturbance on species richness in protist microcosms. *Ecology Letters*. 8:730-738.
95. Schonborn W (1992) (b) The role of protozoan communities in freshwater and soil ecosystems. *Acta Protozoologica*. 31: 11-18.
96. Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW (2003) Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied Environmental Microbiology* 69:483–489.
97. Sikkema J, de Bont J A M & Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews*. 59: 201-222.
98. Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature*, 163: 688.
99. Singh BK, Millard P, Whiteley AS, & Murrell JC (2004) Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. *Trends Microbiology*. 12: 386–393.
100. Singh BN (1942) Selection of bacterial food by soil flagellates and amoebae. *Annual Applied Biology* 29:18-22
101. Singh BN (1948). Studies on giant amoeboid organisms. 1. The distribution of *Leptomyxa reticulata* Goodey in soils of Great Britain and the effect of bacterial food on growth and cyst formation. *Journal Microbiology*. 2, 8.
102. Singh BN (1975) Pathogenic and non-pathogenic amoebae. The Macmillan Press LTD. UK.

103. Spedding TA, Hamel C, Mehuys GR & Madramootoo CA (2004) Soil microbial dynamics in maize-growing soil under different tillage and residue management systems. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: (3) 499-512.
104. Stainer RY, Adelberg EA & Ingraham JL (1977) *General Microbiology*. Macmillan, London.
105. Sundin P, Valeur A, Olsson S, Odham G (1990) Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 73:13–22.
106. Trewavas A (2006) “A brief history of systems biology”, *The Plant Cell*.18: 2420–2430.
107. Walker BH (1992) Biodiversity and ecological redundancy. *Conservation Biology*. 6: 18-23.
108. Walker JJ & Pace NR (2007) Endolithic microbial ecosystems. *Annual Reviews Microbiology*. 61: 331-47.
109. Wardle DA (2002) *Communities and Ecosystems. Linking aboveground and belowground Components*. Princeton University Press, 392 p.
110. Westover KM & Bever JD (2001) Mechanisms of Plant Species Coexistence: Roles of Rhizosphere Bacteria and Root Fungal Pathogens. *Ecology*. 82: (12) 3285-3294.
111. Whitton BA & Potts M (2002) *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publisher. NY, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 466 pp.
112. Williamson VM & Gleason CA (2003) Plant–nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:327-333.
113. Wright S J L, Redhead K & Maudsley H (1981) *Acanthamoeba castellanii*, a Predator of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*. 125: 293-300.
114. Yeates GW & Foissner W (1995) Testate amoebae as predators of nematodes. *Biology and Fertility of Soils*. 20(1):1-7.
115. Zwart KB, Kuikman PJ & van Veen JA (1994) Rhizosphere protozoa: their significance in nutrient dynamics. In: Darbyshire JF, ed. *Soil protozoa*. Wallingford, UK: CAB International, 93–122.

116. Upadhyay JM (1968) Growth and Bacteriolytic Activity of a Soil Amoeba, *Hartmannella glebae*. Journal of Bacteriology. 95:(3) 771–774.

ANEXO 1. Trophic Structure of Amoeba Communities Near Roots of *Medicago sativa* After Contamination with Fuel Oil No. 6

Trophic Structure of Amoeba Communities Near Roots of *Medicago sativa* After Contamination with Fuel Oil No. 6

Sandra Cortés-Pérez & Salvador Rodríguez-Zaragoza & Ma. Remedios Mendoza-López

Received: 13 February 2013 / Accepted: 30 September 2013 / Published online: 26 October 2013
Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Root exudation increases microbial activity, selecting bacterial and fungal communities that metabolize organic matter such as hydrocarbons. However, a strong contamination pulse of hydrocarbons around plant roots may reorganize the soil's microbial trophic structure toward amoebae feeding on bacteria. We conducted a microcosm experiment to elucidate the effect of *Medicago sativa* on the trophic structure of naked amoebae after a strong pulse of pollution (50,000 ppm of fuel oil no. 6, which is a mixture of long chains ranging from C10 to C28). Plants were seeded 24 h after contamination and species of amoebae in the microcosms were identified at 1, 30, and 60 days after pollution. Several species from three trophic groups of naked amoeba were still alive 24 h after the hydrocarbon pulse. Non-planted microcosms harbored three trophic groups after 60 days, while planted ones nourished four groups. The bacterivore group was the most diverse in all microcosms, followed by protist-eaters and omnivores. The quantity of amoebae was significantly higher (3.4×10^3 organisms/g soil) in the planted pots than in the non-planted ones (1.3×10^3 organisms/g soil after 30 days of pollution ($P \leq 0.01$)). The shortest hydrocarbon chains (C10–C14) disappeared or diminished in all microcosms, and the longest ones increased in the planted ones. *M. sativa* thus exerted a positive effect on species richness, quantity, and the composition of amoebae trophic groups in contaminated soil. This indirect effect on bacterial predators is

another key factor underlying hydrocarbon assimilation by living organisms during phytoremediation.

Introduction

Microbial food webs in soil are species assemblages bearing a high degree of complexity [1] that is enhanced by mineral substrates and intimate plant–microbe relationships [2, 3]. The root zone is a hot spot where trophic relationships are augmented through the biostimulation of bacteria and fungi by root exudates. These exudates may select the species composition of bacteria and fungi communities that colonize the environment around the root [3, 4]. In a cascade effect, this colonization attracts microbial predators including protozoa, nematodes, and microarthropods. Microbial predators, like soil amoebae, are preyed upon by nematodes and mites, serving as a hub that connects the microflora to the soil's mesofauna, which in turn connects the flux of energy from bacteria to higher levels in the ecosystem [1, 5].

Naked amoebae play a very important role as predators because they can move between soil particles in very narrow spaces that cannot be traversed by larger swimmers, such as ciliates and flagellates. In this way, amoebae may profit from the abundant bacterial resources inside small pores and aggregates [6]. However, each bacterium has its own strategies for challenging potential predators, from extra-thick cell walls (Actinobacteria) to the production of unpalatable pigments and toxins (Cyanobacteria) that may paralyze or even kill their predators [7]. On the other hand, predators implement their own strategies to overcome their prey's defenses, allowing them to feed on their preferred food source. Species of soil amoebae can be categorized by the kind of food they preferentially ingest to fulfill their life cycles. Although their feeding behaviors may be wider than the observed set of behaviors,

S. Cortés-Pérez (*) · S. Rodríguez-Zaragoza
Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, Fes-Iztacala UNAM,
Av. De los Barrios #1 Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla
Edo., México C.P. 54090, Mexico
e-mail: p5_azul@rocketmail.com

M. R. Mendoza-López
Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA),
Universidad Veracruzana, Av. Luis Castelazo Ayala S/N Col.
Industrial Ánimas, Xalapa, Veracruz C.P. 91190, Mexico

this analysis allows a gross estimation of amoeba participation in organic matter cycling.

Previously, amoebae were thought to be bacterivores only. However, this grouping is too wide for today's standards, as the prokaryotes are divided into two domains of life encompassing several kingdoms; there are other eukaryotic microbial groups that amoebae may adapt to feed on. Feeding preferences are now determined by food sources, leading to categorization as bacterivores (B), fungivores (F), algivores (A), protozoan-eaters (P), yeast-eaters (Y), cyanobacteria-eaters (C), omnivores (O), osmotrophs (OS), and species whose feeding preferences are not determined (ND). Amoebae may temporally feed on microorganisms that are not their preferred food when it is not available, but the amoebae cannot reproduce and eventually become encysted [8, 9].

On the other hand, several predator species may exploit the same kind of resources, which is known as functional grouping. This redundancy strengthens the interspecies competition between predators and, at the same time, favors the continuity of the system's functioning in the face of many perturbations [10]. We used this idea to evaluate the effect of a strong, perturbing pulse of hydrocarbons (mimicking a fuel spill) on the functioning of the microbial food web in the root zone of the legume *Medicago sativa*.

Legume plants are used to enhance soil remediation through biostimulation of hydrocarbon-degrading bacteria and fungi. However, the key biochemical and ecological steps during this process are still unknown. Even less is known about the plant-microbe interactions that occur shortly after the pulse of contamination reaches the soil [11]. Bacteria and fungi (mainly yeasts) are the main groups of microorganisms that are able to mineralize hydrocarbons [12]; their efficiency of mineralizing organic molecules increases when microbial predators are present in the soil [13– 17]. This phenomenon is explained by the microbial loop paradox, in which the increasing number of species and interactions in the food web increases its efficiency of energy use during organic matter transformation [17], because the wastes produced by one species are used as substrates by another species. Thus, the predator-prey relationship increases the mineralization rate of organic matter if a reduced nitrogen source is present.

M. sativa, a hydrocarbon-resistant plant, has been used in the phytoremediation of oil-contaminated soils because nitrogen-fixation takes place in its root environment. This plant-bacteria interaction may supply the reduced nitrogen needed to metabolize the recalcitrant organic molecules through soil microbial activity. It has been observed that *M. sativa* exerts a positive effect on bacterial populations feeding on oil-derived molecules [18– 21]. We therefore wished to evaluate the response of the trophic structure of naked amoebae around roots of *M. sativa* after an intense pulse of pollution with a mixture of heavy hydrocarbons (fuel oil no. 6). We aimed to determine

the changes in structure and composition of these trophic groups through a microcosm study.

Methods

Fifteen microcosms were established by pouring 300 g (dry weight) of sandy soil (60 % sand, 30 % lime, 10 % silt) into 1, 500-ml plastic containers. Approximately 30–40 ml of sterilized distilled water was added to each container to reach 60 % of the soil's water-holding capacity. The 15 microcosms were maintained for 30 days under greenhouse conditions.

Soil Pollution Protocol

All microcosms received a pulse of hydrocarbon contamination following exposure to greenhouse conditions for 30 days. The viscosity of fuel oil no. 6 was diminished by dilution in hexane (15 g of fuel oil no. 6 in 110 ml of hexane, final dilution 1:7). Then, we contaminated a composite soil sample with this mixture by adding and mixing fractions of 20 g of soil each time until completing 300 g for each container with a final concentration of 50,000 ppm. This final hydrocarbon concentration was chosen to simulate soil conditions from an actual fuel oil spill in the field. Hexane was allowed to volatilize by keeping soil containers open for 24 h. Then, about 30–40 ml of sterilized distilled water was added to each container to reach 60 % of soil water holding capacity (WHC).

Three contaminated microcosms (soil contaminated at time zero [SC0]) were processed for observation of amoeba communities right after the contamination pulse, six contaminated microcosms were kept without plants (SC), and six microcosms were seeded with 20 seeds of *M. sativa* (SCP). Microcosms were weighed to monitor water loss; enough water was added every 3–4 days to keep them at 60 % water-holding capacity under greenhouse conditions. Three microcosms from the SC and SCP groups (SC30 and SCP30, respectively) were processed for amoeba determination at day 30, and the remaining microcosms were processed at day 60 (SC60 and SCP60, respectively).

Determination of the Quantity and Species Richness of Naked Amoebae

Identification of naked amoebae was accomplished after cultivation in soil extract agar. Soil extract was prepared by mixing 200 g of soil in 1,000 ml distilled water, heating the mixture at 60 °C in a water bath for 2 h, filtering it through Whatman #41 paper, autoclaving it for 15 min, and storing it at 4 °C until use. Soil extract agar was prepared by adding 15 g non-nutritive agar in 1,000 ml of 1:5 soil extract, autoclaving for 15 min, and filling each plate with 15 ml soil extract agar [22].

Species–area curve was used to standardize the sample size for comparison of the amoeba communities between microcosms. We processed ten samples of 1 g of soil to obtain measurements of the species frequency in our soil samples (data not shown). We then applied the species–area curve algorithm (PC-Ord© ver. 6 for Windows©), and set a sample size of 5 g for each microcosm.

Five grams of soil was processed from each microcosm. Soil was homogenized in 10 ml of a diluted soil extract solution (1:10) via five pulses of 2-min vortexing. The tubes were left untouched for 30 min to allow the sand to precipitate, and the supernatant was seeded on the soil extract plates. These plates were left untouched for another 90 min; excess water was removed to avoid the growth of ciliates and flagellates.

Cultures were viewed daily for 21 days under an inverted microscope to detect amoebae. Amoebae were observed at high magnification (400× to 1,000×) using phase contrast microscopy for morphological identification. Videos of their movement were saved for later diagnosis corroboration. Identification was achieved following the keys of Page [23, 24], Page and Siemensma [25], Patterson [26], Walker et al. [27], Smirnov and Brown [28] and details found in <http://amoeba.ifmo.ru/>.

Amoebae were counted via the most probable number (MPN) method, which we modified after Singh's method by homogenizing 1 g of soil in a 1:10 soil extract diluted in sterilized distilled water. Then, decimal dilutions of soil extract were set up in 24-well culture plates, and the plates were wrapped and left at room temperature for 15 days. After this time, the presence or absence of amoebae was registered in each well, and the MPN was calculated with the Thomas formula [22]. Once the species identification was accomplished amoebae trophic groups were determined according to their feeding habits reported in bibliography (for more detail about this reference, see Table 1). We grouped the naked amoebae into several categories: bacterivores (B), fungivores (F), algal-eaters (A), protozoa-eaters (P), omnivores (O), yeast-eaters (Y), cyanobacterial-eaters (C), osmotrophic (OS) and non-determinate (ND) (Table 1).

Statistical Analysis

Amoeba communities were analyzed according to the number of taxa, amoeba abundance (MPN), Shannon's trophic diversity index (H' ; $H' = -\sum p_i \ln p_i$) [29], where p_i is the proportion of the i th genera inside a trophic group of the amoeba community), and Simpson's diversity index (D ; $D = 1/\lambda = 1/\sum (n_i/N)^2$) [30], where n_i is the number of genera in trophic group (or family) i , and N is the known total number of all species in the community). The component n_i/N is equal to P_i in Shannon's index. The similitude index

was calculated by Sørensen analysis using PC-Ord© ver. 6 for Windows©. The total number of amoebae, species richness, and species frequencies were analyzed with the Chi-square test [31].

Hydrocarbon Extraction from Soil Samples

Hydrocarbon extraction was achieved by duplicate from soil samples that were frozen at the days of sampling, such as day 0 and 60. After thermally equilibrated at room temperature, 2 ml of hexane (HPLC degree) was added to 1 g soil sample, kept in continuous agitation for 30 min to separate the organic phase. This procedure was repeated three times; the hexane extract was dried with anhydrous NaSO_4 and filtered. This fraction was evaporated under reduce pressure prior to inject into a gas chromatography. We used a gas chromatograph apparatus Agilent Technologies™, model 6890 N (Net Work GC system) equipped with a column DB-5, 5 % phenyl-methyl polysiloxane (Agilent Technologies), 60 m long, 0.25 mm internal diameter and 0.25 μm film thickness.

The starting temperature was 50 °C, which was maintained for 5 min, and then the temperature was raised to 280 °C using a heating rate of 20 °C/min and kept on for 20 min. Helium gas was used as carrier at flow of 1 ml/min, injector temperature was 250 °C, split injection with a 15:1 split ratio. The peak identification was performed by mass spectrometry using the mass spectrometer Agilent Technologies™ model 5975 inert XL.

Mass spectra for each compound were obtained by electron impact ionization at 70 eV. The identification of mass spectra was obtained by comparison with a standard database (05 HP Chemstation-NIST Mass Spectral search program, version 2.0d). Additionally we corroborate by comparing with a second standard (Saturated Alkanes, C7-C3, no. catalog, 49451-U Sigma-Aldrich) under the same conditions, which we used as external standard to quantify hydrocarbons.

Results

The numbers of amoebae in the contaminated soil varied from $4.3 \times 10^3/\text{g}$ soil at day 30 to $8.0 \times 10^3/\text{g}$ soil (dry weight) at day 60; the numbers in the contaminated soil with plants rose from $6.0 \times 10^3/\text{g}$ soil at day 30 to $9.4 \times 10^3/\text{g}$ soil at day 60 (Fig. 1). The differences between non-planted soil and planted soil after 30 days (SC30 vs. SCP30) and after 60 days (SC60 vs. SCP60) were statistically significant ($P < 0.01$). However, the SC30 sample had a significant decrease in amoeba number after 30 days ($P < 0.01$). We observed more individual amoebae in polluted soil with plants than in polluted soil without plants (Fig. 1).

In total, we identified 88 species in the microcosms. These species were grouped into 41 genera and 26 families (Table 1).

Table 1 Total frequencies of soil free-living amoebae species and trophic groups (TG) in planted and non-planted contaminated microcosms

	TG	SC0	SC30	SC60	SCP30	SCP60	Reference
Vahlkampfia aberdonica	B	5	1		5	1	[23, 49, 51]
V. avara	B		1		1		[23, 49, 51, 52]
V. enterica	B				1	1	[23, 49, 51]
V. erythraeus	B				1		[23, 49, 51]
V. froschi	B	1	1		1	2	[23, 49, 51]
V. inornata	B	1			1		[23, 49, 51, 52]
V. jugosa	B	3	1				[23, 51, 52]
V. magna	B				1		[23, 51]
V. ovis	B	5	2	1	5	3	[23, 51]
V. russelli	B	1	1	1	2		[23, 51]
V. ustiana	B	1	1	1	1	1	[23, 51]
Naegleria gruberi	B	2		1			[51, 53]
Tetramitus ovis	B			1			[54]
T. rostratus	B			1	1	2	[49]
Saccamoeba stagnicola	B, A		1				[49]
S. limax	B			1	1		[49]
Willaertia magna	B			2	2	5	[55]
Adelphamoeba galeacystis	B					1	[23]
Adelphamoeba sp	B			1		3	Present study
Stachyamoeba lipophora	B			1	1	1	[56]
Hartmannella vermiformis	B				1	2	[49, 52, 57–59]
Acanthamoeba griffini	B	1			1	1	[25]
A. mauritaniensis	B	3	1				[60, http://www.atcc.org/]
A. tubiashi	B	1				1	[61]
Filamoeba nolandi	B				1		[49, 52]
Echinamoeba exundans	B	3		1			[25, 49, 56]
E. silvestris	B	1	1	2			[25, 49, 56]
Mastigamoeba constants	B, OS		5	4	5	2	[33]
M. invertans	B, OS			1	1	1	[33]
M. psammobia	B, OS		1	2	4	3	[33]
M. punctachora	B, OS			4	2	5	[62]
M. simplex	B, OS		6	4	4	2	[33]
Paraflabellula kudoii	B	2	2	2			[25]
P. reniformis	B	1					[63, 64]
Mayorella cultura	B		1		2	4	[23, 49, 51, 65]
M. limacis	B	1				1	[23, 51]
M. microeruca	B			1	1	3	[49]
M. spatula	B		3	3	6	6	[23, 51]
Oscillosignum dakotaensis	B				2		Present study
O. proboscidium	B				1		Present study
Vexillifera sp	B	1	1		1		Present study
V. bacillipedes	B					1	[25, 66]
V. minutissima	B		1				[64]
Platyamoeba stenopodia	B					1	[49, 67]
Vannella caledonica	B					1	[67]
V. cirrifera	B					2	[49, 67]
V. platypodia	B		1		1		[49, 67, 68]
Breviata anathema	B		3		1		[69]
Cercomona simplex	B				2		[70]

Table 1 (continued)

	TG	SC0	SC30	SC60	SCP30	SCP60	Reference
Phreatamoeba balamuthi	B		2		1	2	[71]
Flamella citrensis	P	2	1	1			[72]
Gephyramoeba delicatula	P, B	1	1		2		[25, 73]
Rhizamoeba australiensis	P	3	1	1			[49]
R. flabellata	P, B	2	1	2	5	4	[25]
Leptomxya reticulata	P, B			1		1	[25, 73, 74]
Dactylamoeba bulla	P, B, A			1			[25, 75]
D. stella	P, B, A					2	[25, 75]
Biomyxa vagans	P, A		2	1	1		[25, 76, 77]
Acanthamoeba castellanii	O	1	2				[49, 78, 79]
A. lenticulata	O			1			[49]
A. triangularis	O	4	3	1	1	1	[49, 60, 80]
A. palestinensis	O	1	1		1		[49]
A. polyphaga	O				2		[49, 60]
A. rhyodes	O					1	[60, 80]
Arachnulla impatiens	O			3	4	3	[81, 82]
Deuteroamoeba mycophaga	F				1		[24, 83]
Dermamoeba minor	F				1		[49, 84]
Vampyrella vagans	A					1	[85]
Dinamoeba mirabilis	A		2				[23]
Cochliopodium bilimbosum	Y		1				[49]
Paradermamoeba valamo	ND				2		
Trichamoeba cloaca	ND		1		1		
Arcella sp1	ND				1		
Acrasidae	ND					1	
Dactylamoeba sp.	ND		2			1	
Glaeseria sp.	ND				1	5	
Hyperamoeba sp.	ND		5	4	2	2	
Mastigella sp.	ND				2	2	
Mayorella sp.	ND					2	
Rhizamoeba sp1	ND	6	2	3	7	2	
Rhizamoeba sp2	ND	1			1		
Rosculus sp.	ND					1	
Trinema sp1	ND	1				1	
Trinema sp2	ND				1	2	
Vahlkampfia sp.	ND				3	4	
Dsp3	ND		4		4	2	
Sp2 transp	ND		4		2	2	

SC0, contaminated soil at day 0; SC30 and SC60, soil after 30 and 60 days of contamination, respectively; SCP30 and SCP60, planted microcosms after 30 and 60 days of contamination, respectively. Trophic groups: B bacterivores, O omnivores, A algivores, P protozoa-eaters, Y yeast-eaters, F fungivores, C cyanobacteria-eaters, ND not determined

At 24 h after pollution (SC0), we found 27 species that belonged to 11 genera and nine families. The non-planted soil after 30 days (SC30) harbored 35 species from 21 genera and 14 families, with six species remaining *incertae sedis*. At day 60 (SC60), the richness decreased to 31 species belonging to 19 genera and 11 families, and one species with *incertae sedis* status (Fig. 2). In contrast, the planted soil after 30 days

(SCP30) displayed 53 species belonging to 27 genera and 17 families, with five species *incertae sedis*. Species richness decreased ($P \leq 0.1$) to 47 at day 60 (SCP60). These species belonged to 25 genera and 14 families, with four species *incertae sedis* (Fig. 2). We detected a significant increase in species richness in planted microcosms compared to non-planted ones at both the 30th and 60th days ($P \leq 0.1$; Fig. 2).

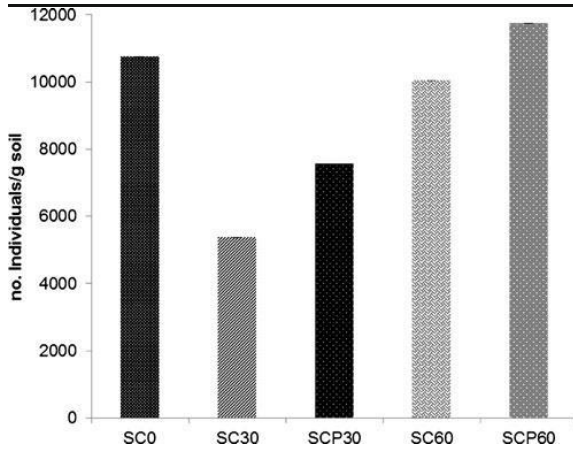


Fig. 1 MPN of amoebae in soil samples from each microcosm. SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination pulse

Mastigamoebidae, *Vahlkampfiidae*, and *Paramoebidae* were the only families presented in all planted and non-planted microcosms throughout the study period.

M. sativa were detected the presence of 12 species that were not observed in the non-planted microcosms 30 days after contamination. However, these species were not observed in the planted microcosms at day 60; rather, we observed 12 different species that were unique to the planted microcosms at the 60th day (Table 1).

Sørensen analysis revealed three groups of amoeba communities (less than 50 % similitude); planted soils at 30 and 60 days shared 100 % likeliness, while non-planted soils (SC60) shared 70 % likeliness (Fig. 3).

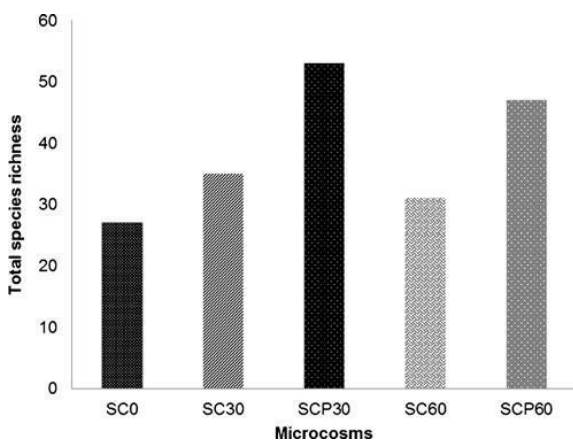


Fig. 2 Species richness of communities of amoebae in planted and non-planted microcosms. SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination

Amoeba communities from SC0 and SC30 were not pooled with any other community, and were very different from each other. We identified six trophic groups (Table 1) throughout this study. Bacterivores (B) were present in all microcosms and had the highest species richness, followed by the protist-eaters (P). There were only three trophic groups (B, P, and O) present immediately after contamination that exhibited the same dynamics regarding overall species richness; there was a larger variety of trophic groups at day 30 than at day 60 (Fig. 4) in both planted and non-planted soils, and bacterivores had the highest proportions in planted and non-planted microcosms (Fig. 4).

Trophic diversity (H' and D) was similar in all microcosms (Table 2). Only the omnivore group was composed of several species from the genera *Acanthamoeba* and *Arachnulla*, while group B was the most diverse, with up to 50 species from 21 genera (Table 1). The bacterivores species appeared most frequently in the amoeba communities at day 30 (represented mostly by *Mastigamoeba* and *Hyperamoeba*, followed by protist-eating species from the genera *Biomyxa*, *Gephyramoeba*, and *Rhizamoeba*, and one omnivore species of *Acanthamoeba* (Table 2). The number of individuals ($P < 0.025$) and the frequency of bacterivores species ($P < 0.1$) were significantly differed between planted and non-planted microcosms (Fig. 1). However, the identities of the species changed along the time course of the study. Twenty-four hours after the contamination pulse, the dominant species belonged to the genera *Rhizamoeba* and *Vahlkampfi*. In contrast, the most common species in the non-planted soil after 60 days belonged to the genus *Mastigamoeba*, while the genera *Rhizamoeba*, *Mayorella*, and *Willertia* encompassed the most common species in the soil planted with *M. sativa* (Table 1). The clustering pattern obtained for trophic groups was different from the one obtained when analyzing the general species richness (Fig. 5). Bacterivores amoebae from planted microcosms practically did not change; they resembled each other 90 % from the 30th day to the 60th day (Fig. 5). The non-planted microcosms resembled each other 80 % during the same period. Protozoa-eating amoebae were essentially the same in the non-planted microcosms from the 30th day to the 60th day (94 % likeliness) and the planted microcosms showed a similar pattern (85 % similitude). Fungivores and yeast-eaters occurred only in planted soil and non-planted microcosms, respectively, after 30 days. Algae-eaters were present in non-planted microcosms at day 30 and in planted ones at day 60; however, the species assemblages changed (Fig. 5). Trophic diversity indices (H' and D) exhibited non-significant statistical differences between control microcosms and treatments. In general, non-planted polluted soils had lower trophic diversity indices than the planted

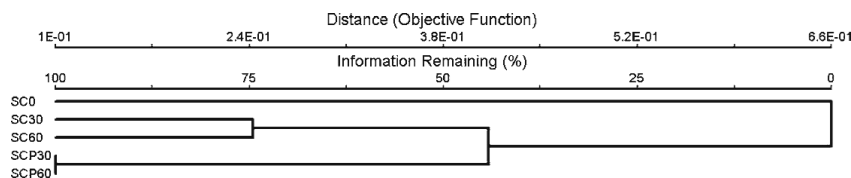


Fig. 3 Cluster analysis of free-living amoebae community in contaminated soil. Distance was estimated by Bray–Curtis and the group linkage was set up by centroid method. SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination

ones, except for the non-planted polluted soil at 30 days. The non-planted polluted soil at day 60 displayed the lowest trophic diversity of all of the microcosms (Table 2).

The HPLC analysis of the fuel oil no. 6 identified the following ten compounds: decane (C10), dodecane (C12), tetradecane (C14), hexadecane (C16), octadecane (C18), eicosane (C20), docosane (C22), tetracosane (C24), hexacosane (C26) and octacosane (C28). The compounds present in all three microcosms (SC0, SC60 and SCP60) are graphically summarized in Fig. 6. These results showed a significant decreasing concentrations in decane, dodecane, hexadecane, eicosane, docosane, tetracosane and octacosane after 60 days in the bare soil ($P = 0.05$). Decane and dodecane were not present in planted soil after 60 days; while the concentration of other hydrocarbon compounds were not statistically significant after 60 days in microcosms with *M. sativa* ($P = 0.05$; Fig. 6).

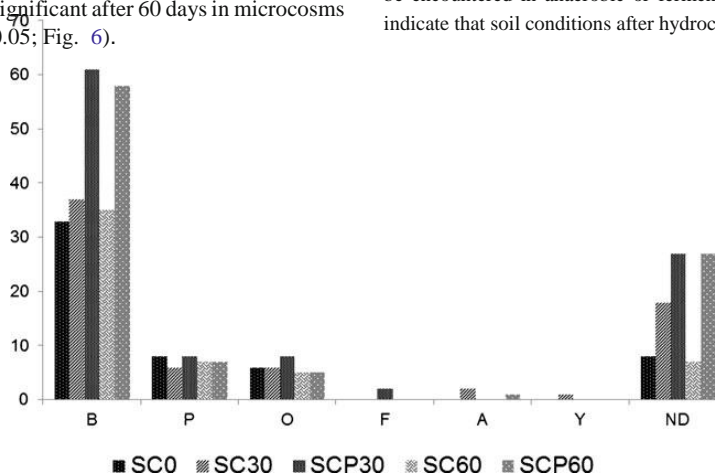


Fig. 4 Species richness of trophic groups of amoebae in planted and non-planted microcosms. SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination, SR species richness. Trophic groups: B bacterivores, O omnivores, A algivores, P protozoa-eaters, Y yeast-eaters, F fungivores, C cyanobacteria-eaters, ND not determined

Discussion

Reductions in species richness and the abundance of surviving species are the first consequences of a strong pulse of pollution [32]. However, the amoeba communities in our investigation showed a decrease in the MPN after 30 days (Fig. 1), and a recovery of species richness (Fig. 2) and trophic groups thereafter (Fig. 4).

The trophozoites present 24 h after pollution (SC0) included several species of bacterivores amoebae: *Naegleria gruberi*, *Vahlkampfia jugosa*, *Paraflabelula kudoi*, and *Echinamoeba exudans*. *Rhizamoeba australiensis* and *Flamella citensis* were the only protozoan-eating species that occurred in this soil. These species were also detected in non-planted soil after 60 days, with the sole exception of *V. jugosa*, which was not observed again. The fact that these species may also be encountered in anaerobic or fermentative habitats [33] may indicate that soil conditions after hydrocarbon

Table 2 Trophic diversity of amoebae per gram of soil (dry weight) from planted and non-planted microcosms contaminated with 50,000 ppm fuel oil no. 6

	SC0	SC30	SC60	SCP30	SCP60
H'	2.3	2.6	2.1	2.1	1.9
D	1.9	1.9	1.7	1.6	1.5

SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination pulse, H' Shan-non index, D Simpson index

contamination induce the dominance of fermentative bacteria, allowing the presence of these bacterivores amoebae.

The abundance of soil amoebae was significantly higher in the planted microcosms than in the non-planted ones, and there were significant differences in the numbers of soil amoebae in contaminated non-planted microcosms and contaminated planted microcosms (Fig. 1). These observations indicate that ecosystems may respond to strong pollution pulses by increasing the number of individuals that are not sensitive to the contaminants, plus the species that may be favored by the pollutant and tend to keep the quantity of organisms consistent with the available resources. Several species of amoebae may be negatively affected by hydrocarbons, while

others may be favored, allowing them to increase their populations and to replace dead individuals, especially for the sensitive species. Although encystation enables most species of amoebae to overcome direct exposure to hydrocarbons [34], mainly individuals that encyst rapidly overcome these adverse conditions [35, 36].

M. sativa produced an increase in the number of amoeba species in the contaminated soil, since there were 24 species after 60 days (12 new species every 30 days) compared with non-planted soil (Table 1). Plants indirectly stimulate the population increase of several amoeba species [37, 38] that were considered "rare" because their numbers were low in our non-planted microcosms. For example, the bacterivorous amoeba *Rhizamoeba flabellata* was present throughout the study in both kinds of microcosms, although it was common in the leguminous root zone and remained rare in bare soil. This genus was later observed as trophozoites that increased their frequency during the study, especially in the planted microcosms; a similar increment was reported by Zarda et al. (1998).

Root exudes may indirectly influence amoebae as they stimulate bacterial and fungal production, which in turn can be consumed by these protozoa. At the hydrocarbon concentration used in this investigation, only bacteria seemed to be stimulated in the contaminated microcosms; the bacterivorous amoebae were more numerous and more diverse. This

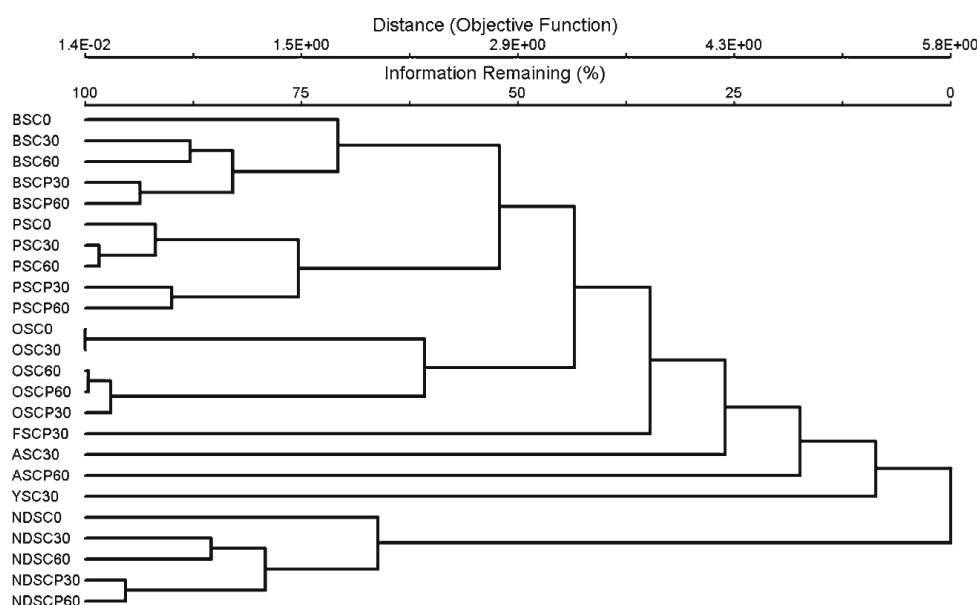
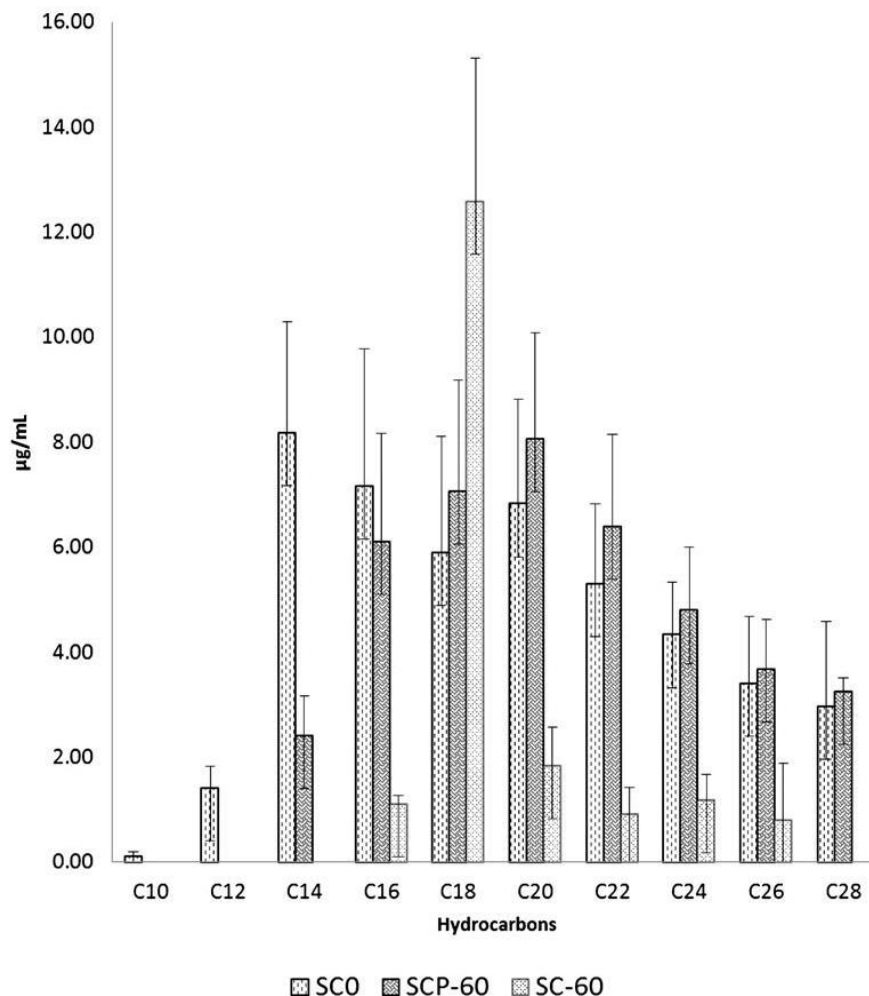


Fig. 5 Cluster analysis of the trophic groups in the amoebae communities from contaminated microcosms. Distance was estimated by Bray–Curtis, and the group linkage was set up by centroid method. SC0 non-planted microcosm 24 h after contamination pulse, SC30 non-planted microcosm 30 days after contamination pulse, SC60 non-planted microcosm 60 days after contamination pulse, SCP30 microcosms planted with *Medicago sativa* 30 days after contamination pulse, SCP60 planted microcosms 60 days after contamination. Trophic groups: B bacterivores, O omnivores, A algivores, P protozoa-eaters, Y yeast-eaters, F fungivores, C cyanobacteria-eaters, ND not determined

Fig. 6 Hydrocarbon concentrations from microcosms after 24 h and 60 days. Three microcosms from each treatment were analyzed individually and averaged. Standard deviation lines are shown at the top of the bars



phenomenon exerts a cascade effect on the trophic web because protozoans can quickly detect small changes in the population densities of their prey [39].

Although amoebae are an important group of bacterivores in soil, not all of them exclusively consume bacteria. The smallest amoeba species complement their nutrition by osmotrophy, taking in dissolved organic molecules from the soil solution. Many amoebae complement their nutrition by predation on a wide variety of prey from the soil environment. For example, *Dactylamoeba stella*, *D. bulla*, *Biomyxa vagans*, and *Saccamoeba stagnicola* can be grown in the laboratory while feeding on bacteria, algae, and small proto-zoa suspended in a medium rich in soluble nutrients. The increase in the numbers of bacterivores species in soil produces an increase in the number of protist-eaters, which allow the persistence of the omnivorous ones. Such an increase in the numbers of bacterivores and yeast-feeding species may indicate a more diverse availability of microorganisms,

representing more chances for fuel oil no. 6 to be degraded by bacteria and yeasts [34, 40].

The bacterivores most frequently found in all treatments were species from the genera *Mastigamoeba* and *Vahlkampfia*. *Mastigamoeba* species have the capacity to feed on both bacteria and dissolved organic matter. These amoebae and *Rosculus* sp. (which eat bacteria) are active in temporarily anaerobic soils rich in dissolved organic matter. These proto-zoa are osmotrophic, and some species can grow axenically or when supplemented with bacteria [33]. This feeding behavior allows them to efficiently exploit varied resources, including the N and P already fixed in their prey's biomass [41], which in turn has a positive feedback on plant nutrition [42].

Omnivorous amoebae were only represented by the genera *Acanthamoeba* and *Arachnula*; however, the species composition of this group varied during the study (Table 1). *Acanthamoeba* may be dominant in human-impacted environments where competition with other protozoa is strongly

diminished, such as in bathtubs and swimming pools [43]. Cysts of these amoebae are very resistant to disinfectants commonly used in water-cooling towers and other water reservoirs for human use [44]. *Acanthamoeba* is also very abundant and even dominant in organically polluted waters and soils [45]. Many species of this genus are r-selected or S-selected [46], meaning that they may leave the cyst stage right after the pulse of resources reaches the soil.

Other species of amoebae were evident later in the community succession, such as *Mayorella spatula* (Table 1). This amoeba was observed after 30 days and was the most common in planted-soil microcosms. Most environments have a small number of abundant species fluctuating in response to biotic and abiotic changes, and a larger number of rare species that may or may not be registered depending on the sampling methodology. This kind of species distribution was more evident in the planted soil.

Several amoeba species like *Gephyramoeba* sp., *Filamoeba nolandii*, and *Acanthamoeba castellani* [47] seem to be adapted to hydrocarbon pollution, as they may withstand exposure to hydrocarbons and feed on bacteria and yeasts that are able to degrade long organic chains. The apparent lack of *Acanthamoeba* species in polluted soil was not expected (Table 1), since these species are considered to be very resistant to strong stress in soils. It is relevant to note that this exclusion of *Acanthamoeba* was more evident in the planted microcosms, where plant exudates enhance specific species of bacteria and fungi. Omnivorous amoebae are essentially non-specialist, and consequently are less efficient at resource appropriation than the specialist genera such as *Nuclearia* [48] and *Vampyrellidium*, which are very effective predators of algae. This scenario could explain why *Acanthamoeba* did not survive in the polluted habitat in this investigation, since their food requirements [49] were probably deficient in the contaminated soil. *Acanthamoeba* was rarely detected in our microcosms; only 9/18 morphological species were observed, and there were more species immediately after the pulse of contamination than at the 60th day (Table 1). These observations may provide evidence that omnivorous amoebae can take advantage of the missing competing species, but can be outcompeted after the amoeba community recovers from the initial disturbance. On the other hand, the richness of protozoa-eating species remained almost constant during the study, as the species thriving around the root zone did not change from the 30th to the 60th day (Table 1). Fuel oil no. 6 thus exerted little or no effect on this trophic grouping as long as the plant was present.

Trophic diversity indices did not display statistically significant differences between microcosms. However, the polluted soil at day 30 (SC30) had the highest trophic diversity index, as calculated by both Shannon's (H') and Simpson's (D) formulas (Table 2). This finding allows us to infer that modification of the amoeba community structure takes time

after the pulse of contamination. Changes in the amoeba community may require more than 30 days, or this period of time may be critical, as the species richness increased from 35 to 53 during this time in the planted microcosms and the quantity of amoebae dropped from 10,000 to nearly 8,000 individuals/g in the planted one (while it drops from 10,000 to 4,000 in the non-planted microcosms; Fig. 1). *M. sativa* exerted a positive effect on the structure of the amoeba community, allowing permanence of the rare species and diminishing the importance of the common and dominant ones, as reflected by a decrease in the Simpson index.

Recovery of the amoeba community after the pulse of contamination depends on the various strategies and resistance mechanisms of each species in the face of the incoming pollutant. However, the effect of each kind of hydrocarbon depends on its concentration in the mixture, where the low molecular weight ones are much more toxic for amoeba than the higher ones [50]. Such contaminants may be inferred as one of the forces shaping the amoeba community. This may explain the arising of different communities in the non-planted soil after 60 days and those of the planted soil during the same period.

Thus, several species of amoebae may temporarily resist the new conditions (more than 30 days), but ultimately they may be eliminated and replaced by truly tolerant species. Although the trophic groups recovered from pollution after 30 days in both non-planted and planted microcosms (Fig. 4), they declined in non-planted microcosms at day 60, but remained constant in the planted microcosms.

Taken together, we interpret our results as the successive recovery of the community following exposure to hydrocarbons, and we propose that important changes in amoeba community assemblage occur during the first 30 days after pollution. Community changes are expected to occur more slowly thereafter, as the heavier hydrocarbons take longer to be degraded by yeasts and bacteria. All of these plant–microbe–soil interactions are very important for understanding the metabolic processes of microbial hydrocarbon degradation; understanding these processes will enable the development of management strategies for improving the efficiency of bioremediation technologies.

Acknowledgments Subnargem grant 2009–10 BM-ex. Sandra Cortés Perez acknowledges the support of Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, CONACyT for their support in obtaining her doctoral degree and Dr. Ronald Ferrera-Cerrato.

References

1. Coleman DC (1994) The microbial loop concept as used in terrestrial soil ecology studies. *Microb Ecol* 247:245–250. doi:

- 2.
3. Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (2001) The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil–plant interface. Marcel Dekker, New York
4. Lambers H, Mougel C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant–microbe–soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321:83–115. doi: 10.1007/s11104-009-0042-x
5. Chanway CP, Turkington R, Holl FB (1991) Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere micro-organisms. In: Begon M, Fitter AH, Macfadyen A (eds) Advances in ecological research. Academic Press, San Diego, pp 121–169
6. Duffy E, Cardinale BJ, France KE, McIntyre PB, Thébault E, Loreau M (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecol Lett* 10:522–538. doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01037.x
7. Cowling AJ (1994) Protozoan distribution and adaptation. In: Darbyshire JF (ed) Soil protozoa. Cab International, London, pp 5–42
8. Leão PN, Engene N, Antunes A, Gerwick WH, Vasconcelos V (2012) The chemical ecology of cyanobacteria. *Nat Prod Rep* 29: 372–391. doi: 10.1039/C2NP00075J
9. Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ (1993) *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* 40(4):504–514. doi: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04943.x
10. Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC, Yagi S, Kohlmeier CK, Glaser C, Vugia D, Bakardjiev A, Azimi P, Maddux-Gonzalez M, Martinez AJ, Visvesvara GS (2003) Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol* 41(7):3175–3180. doi: 10.1128/JCM.41.7.3175-3180.2003
11. Rosenfeld JS (2002) Functional redundancy in ecology and conservation. *Oikos* 98:156–162. doi: 10.1034/j.1600-0706.2002.980116.x
12. Pilon SE (2005) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56:15–39. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214
13. Ollivier B, Magot M (2005) Petroleum microbiology. ASM Press, USA
14. Clarholm M (1985) Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. *Soil Biol Biochem* 17: 181–187. doi: 10.1016/0038-0717(85)90113-0
15. Clarholm M (1989) Effects of plant–bacterial–amoebal interactions on plant uptake of nitrogen under field conditions. *Biol Fertil Soils* 8(4):373–378. doi: 10.1007/BF00263171
16. Ingham RE, Trofymow JA, Ames RN, Hunt HW, Morley CR, Moore JC, Coleman DC (1986) Trophic interactions and nitrogen cycling in a semi-arid grassland. I. Seasonal dynamics of the natural populations, their interactions and effects on nitrogen cycling. *J Appl Ecol* 23:597–614. doi: 10.2307/2404039
17. Ingham RE, Trofymow JA, Ames RN, Hunt HW, Morley CR, Moore JC, Coleman DC (1986) Trophic interactions and nitrogen cycling in a semi-arid grassland: II. System response to removal of different groups of soil microbes or fauna. *J Appl Ecol* 23:615–630. doi: 10.2307/2404040
18. Bonkowski M (2004) Protist and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytol* 162:617–631. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x
19. Gudín C (1970) Syrratt WJ (1975) Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination. *Environ Pollut* 8(2): 107–112. doi: 10.1016/0013-9327(75)90020-8
20. Nichols TD, Wolf DC, Rogers HB, Beyrouy CA, Reynolds CM (1997) Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Pollut* 95:165–178. doi: 10.1007/BF02406163
21. Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW (2003) Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl Environ Microbiol* 69:483–489. doi: 10.1128/AEM.69.1.483-489.2003
22. Muratova A, Hübnert T, Narula N, Wand H, Turkovskaya O, Kusch P, Jahn R, Merbach W (2003) Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiol Res* 158:151–161. doi: 10.1078/0944-5013-00187
22. Singh BN (1975) Pathogenic and non-pathogenic amoebae. Macmillan, UK
23. Page FC (1976) An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Freshwater biological Association, Ambleside
24. Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater biological Association, Ambleside
25. Page FC, Siemmensma FJ (1991) Nackte rhizopoda and heliozoa. Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart
26. Patterson DJ (1996) Free-living freshwater protozoa. John Wiley & Sons, England
27. Walker G, Simpson AGB, Edgcomb V, Sogin ML, Patterson DJ (2001) Ultrastructural identities of *Mastigamoeba punctachora*, *Mastigamoeba simplex* and *Mastigella commutans* and assessment of hypotheses of relatedness of the pelobionts (Protista). *Eur J Protistol* 37(1):25–49. doi: 10.1078/0932-4739-00780
28. Smirnov AV, Brown S (2004) Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology* 3(3):148–190
29. Shannon CE, Weaver W (1949) The mathematical theory of communication. University Illinois Press, Urbana
30. Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* 163:688. doi: 10.1038/163688a0
31. Greenwood PE (1996) A guide to chi-squared testing. John Wiley & Sons, New York
32. Joynt J, Bischoff M, Turco R, Konopka A, Nakatsu CH (2006) Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microb Ecol* 12:209–219. doi: 10.1007/s00248-005-0205-0
33. Adl SM (2003) The ecology of soil decomposition. CABI Publishing, USA
34. Zarda B, Mattison G, Hess A, Hahn D, Hoehener P, Zeyer J (1998) Analysis of bacterial and protozoan communities in an aquifer contaminated with monoaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol* 27:141–152. doi: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00532.x
35. Darbyshire JF (1994) Soil protozoa. CAB International, London
36. Rodriguez-Zaragoza S (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 3:225–241. doi: 10.3109/10408419409114556
37. Sørensen J (1997) The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds) Modern soil microbiology. Marcel Dekker, New York, pp 21–45
38. Brimecombe MJ, De Lelj FA, Lynch JM (2001) The effect of root exudates on rhizosphere. Microbial populations. In: Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P (eds) The rhizosphere. Biochemistry and organic substances at the soil–plant interface. Marcel Dekker, New York, pp 95–140
39. Kota S, Borden RC, Barlaz MA (1999) Influence of protozoan grazing on contaminant biodegradation. *FEMS Microbiol Ecol* 29: 179–189. doi: 10.1016/S0168-6496(99)00010-0
40. De Hoog GS, Zeng JS, HARRAK MJ, Sutton DA (2006) *Exophiala xenobiotica* sp. an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Anton Leeuw* 90:257–268. doi: 10.1007/s10482-006-9080-z
41. Sinclair JL, Kampbell DH, Cook ML, Wilson JT (1993) Protozoa in subsurface sediments from sites contaminated with aviation gasoline or jet fuel. *Appl Environ Microbiol* 59:467–472
42. Raynaud X (2010) Soil properties are key determinants for the development of exudates gradients in a rhizosphere simulation model. *Soil Biol Biochem* 42:210–219. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.10.19
43. De Jonckheere JF, van de Voorde H (1976) Differences in destruction of cysts of pathogenic and on pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 31:294–297, PMID: PMC169762
44. De Jonckheere JF (1991) Ecology of *Acanthamoeba*. *RID* 5:385–

84. Pussard M, Alabouvette C, Pons R (1979) Etude préliminaire d'une amibe mycophage *Thecamoeba granifera* s. sp. Minor (Thecamoebidae, Amoebida). *Protistologica* 16:443–451

85. West GS (1903) Observations on freshwater rhizopods, with some remarks on their classification. *J Linn Soc Lond Zool* 29:108–117. doi: [10.1111/j.1096-3642.1903.tb00429.x](https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1903.tb00429.x)

ANEXO 2 Análisis estadísticos

Tablas con los valores de χ^2 de la comparación entre las frecuencias de las especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de los microcosmos con suelo desnudo en 3 diferentes períodos. Un grado de libertad $P = 0.05$, $\chi^2_{tab} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. B; bacterívoras; P amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. FT, Frecuencia total.

	S0	SC0	χ^2	S0	SH0	χ^2	SC0	SH0	χ^2
B	6	33	18.69	6	4	0.40	33	4	22.73
P	1	8	5.44	1	4	1.80	8	4	1.33
O	2	6	2.00	2	0	2.00	6	0	6.00
F	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
A	2	0	2.00	2	0	2.00	0	0	0.00
L	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
ND	4	8	1.33	4	5	0.11	8	5	0.69
FT	15	55	22.86	15	13	0.14	55	13	25.94

	S30	SC30	χ^2	S30	SH30	χ^2	SC30	SH30	χ^2
B	34	37	0.13	34	18	4.92	37	18	6.56
P	13	6	2.58	13	4	4.76	6	4	0.40
O	5	6	0.09	5	3	0.50	6	3	1.00
F	1	0	0.00	1	0	0.00	0	0	0.00
A	8	2	3.60	8	0	8.00	2	0	2.00
L	4	1	0.00	4	0	0.00	1	0	0.00
ND	16	18	0.12	16	6	4.55	18	6	6.00
FT	81	70	0.80	81	31	22.32	70	31	15.06

	S60	SC60	χ^2	S60	SH60	χ^2	SC60	SH60	χ^2
B	24	35	2.05	24	22	0.09	35	22	2.96
P	6	7	0.08	6	1	3.57	7	1	4.50
O	0	5	5.00	0	0	0.00	5	0	5.00
F	2	0	0.00	2	0	0.00	0	0	0.00
A	0	0	0.00	0	2	2.00	0	2	2.00
L	1	0	0.00	1	2	0.00	0	2	0.00
ND	5	7	0.33	5	15	5.00	7	15	2.91
FT	38	54	2.78	38	42	0.20	54	42	1.50

Tablas con los valores de χ^2 de la comparación entre las frecuencias de las especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de los microcosmos con *M. sativa*. Un grado de libertad $P = 0.05$, $\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano; P, *Medicago sativa*. B; bacterívoras; P, amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L, protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. FT, Frecuencia total.

	SP30	SCP30	χ^2	SP30	SHP30	χ^2	SCP30	SHP30	χ^2
B	78	61	2.08	78	40	12.24	61	40	4.37
P	14	8	1.64	14	1	11.27	8	1	5.44
O	2	8	3.60	2	3	0.20	8	3	2.27
F	7	2	0.00	7	0	0.00	2	0	0.00
A	8	0	8.00	8	4	1.33	0	4	4.00
L	1		0.00	1	3	0.00		3	0.00
ND	20	27	1.04	20	11	2.61	27	11	6.74
FT	130	106	2.44	130	62	24.08	106	62	11.52

	SP60	SCP60	χ^2	SP60	SHP60	χ^2	SCP60	SHP60	χ^2
B	78	58	2.94	78	43	10.12	58	43	2.23
P	29	7	13.44	29	8	11.92	7	8	0.07
O	4	5	0.11	4	3	0.14	5	3	0.50
F	6	0	0.00	6	2	0.00	0	2	0.00
A	5	1	2.67	5	2	1.29	1	2	0.33
L	0	0	0.00	0	2	0.00		2	0.00
ND	34	27	0.80	34	19	4.25	27	19	1.39
FT	156	98	13.24	156	79	25.23	98	79	2.04

Tablas con los de χ^2 de la comparación entre la riqueza de especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de los microcosmos con suelo desnudo. Un grado de libertad $P = 0.05$, $\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. B; bacterívoras; P amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L, protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. RT, Riqueza de especies total.

	S0	SC0	χ^2	S0	SH0	χ^2	SC0	SH0	χ^2
B	4	20	10.67	4	2	0.67	20	4	10.67
P	1	5	2.67	1	1	0.00	5	4	0.11
O	2	0	2.00	2	0	2.00	0	0	0.00
F	1	3	0.00	1	0	0.00	3	0	0.00
A	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
L	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
ND	2	9	4.45	2	4	0.67	9	5	1.14
RT	10	37	15.51	10	7	0.53	37	13	11.52

	S30	SC30	χ^2	S30	SH30	χ^2	SC30	SH30	χ^2
B	17	20	0.24	17	11	1.29	20	11	2.61
P	8	5	0.69	8	2	3.60	5	2	1.29
O	4	2	0.67	4	0	4.00	2	0	2.00
F	4	3	0.00	4	3	0.00	3	3	0.00
A	1	0	1.00	1	0	1.00	0	0	0.00
L	2	1	0.00	2	0	0.00	1	0	0.00
ND	11	10	0.05	11	5	2.25	10	5	1.67
RT	47	41	0.41	47	21	9.94	41	21	6.45

	S60	SC60	χ^2	S60	SH60	χ^2	SC60	SH60	χ^2
B	17	22	0.64	17	11	1.29	22	11	3.67
P	5	5	0.00	5	1	2.67	5	1	2.67
O	0	1	1.00	0	2	2.00	1	2	0.33
F	0	2	0.00	0	0	0.00	2	0	0.00
A	2	1	0.33	2	0	2.00	1	0	1.00
L	1	0	0.00	1	2	0.00	0	2	0.00
ND	4	7	0.82	4	11	3.27	7	11	0.89
RT	29	38	1.21	29	27	0.07	38	27	1.86

Tablas con los valores de χ^2 de la comparación entre la riqueza de especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de todos los microcosmos con *M. sativa*. Un grado de libertad $P = 0.05$, $\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano; P, *M. sativa*. B; bacterívoras; P amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L, protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. RT, Riqueza de especies total.

	SP30	SCP30	χ^2	SP30	SHP30	χ^2	SCP30	SHP30	χ^2
B	32	35	0.13	32	19	3.31	35	19	4.74
P	7	3	1.60	7	1	4.50	3	1	1.00
O	6	1	3.57	6	2	2.00	1	2	0.33
F	1	3	0.00	1	2	0.00	3	2	0.00
A	4	3	0.14	4	0	4.00	3	0	3.00
L	1	0	0.00	1	2	0.00	0	2	0.00
ND	10	19	2.79	10	8	0.22	19	8	4.48
RT	61	64	0.07	61	34	7.67	64	34	9.18

	SP60	SCP60	χ^2	SP60	SHP60	χ^2	SCP60	SHP60	χ^2
B	27	28	0.02	27	17	2.27	28	17	2.69
P	8	6	0.29	8	4	1.33	6	4	0.40
O	3	2	0.20	3	2	0.20	2	2	0.00
F	2	2	0.00	2	1	0.00	2	1	0.00
A	2	1	0.33	2	1	0.33	1	1	0.00
L	0	0	0.00	0	2	0.00	0	2	0.00
ND	18	22	0.40	18	9	3.00	22	9	5.45
RT	60	61	0.01	60	36	6.00	61	36	6.44

Tablas con los valores de χ^2 de la comparación entre la frecuencia de especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de los microcosmos de los tres períodos de tiempo. Un grado de libertad $P = 0.05$ ($\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano, P, *M. sativa*. B; bacterívoras; P amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L, protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. FT, frecuencia total.

	S0	S30	χ^2	S0	S60	χ^2	S0	SP30	χ^2	S0	SP60	χ^2
B	6	34	19.60	6	24	10.80	6	78	61.71	6	78	61.71
P	1	13	10.29	1	6	3.57	1	14	11.27	1	29	26.13
O	2	5	1.29	2	0	2.00	2	2	0.00	2	4	0.67
F	0	1	0.00	0	2	0.00	0	7	0.00	0	6	0.00
A	2	8	3.60	2	0	2.00	2	8	3.60	2	5	1.29
L	0	4	0.00	0	1	0.00	0	1	0.00	0	0	0.00
ND	4	16	7.20	4	5	0.11	4	20	10.67	4	34	23.68
FT	15	81	45.38	15	38	9.98	15	130	91.21	15	156	116.26

	SC0	SC30	χ^2	SC0	SC60	χ^2	SC0	SCP30	χ^2	SC0	SCP60	χ^2
B	33	37	0.23	33	35	0.06	33	61	8.34	33	58	6.87
P	8	6	0.29	8	7	0.07	8	8	0.00	8	7	0.07
O	6	6	0.00	6	5	0.09	6	8	0.29	6	5	0.09
F	0	0	0.00	0	0	0.00	0	2	0.00	0	0	0.00
A	0	2	2.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	1	1.00
L	0	1	1.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
ND	8	18	3.85	8	7	0.07	8	27	10.31	8	27	10.31
FT	55	70	1.80	55	54	0.01	55	106	16.16	55	98	12.08

	SH0	SH30	χ^2	SH0	SH60	χ^2	SH0	SHP30	χ^2	SH0	SHP60	χ^2
B	4	18	8.91	4	22	12.46	4	40	29.45	4	43	32.36
P	4	4	0.00	4	1	1.80	4	1	1.80	4	8	1.33
O	0	3	3.00	0	0	0.00	0	3	3.00	0	3	3.00
F	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	2	2.00
A	0	0	0.00	0	2	2.00	0	4	4.00	0	2	2.00
L	0	0	0.00	0	2	2.00	0	3	3.00	0	2	2.00
ND	5	6	0.09	5	15	5.00	5	11	2.25	5	19	8.17
FT	13	31	7.36	13	42	15.29	13	62	32.01	13	79	47.35

Tablas con los valores de χ^2 de la comparación entre la riqueza de especies de los diferentes grupos tróficos de las comunidades de los microcosmos de los tres períodos de tiempo. Un grado de libertad $P = 0.05$ ($\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano, P, *M. sativa*. B; bacterívoras; P amebas que se alimentan de otros protozoos; O, omnívoros; F, fungívoros; A, alguívoros; L, protozoos que se alimentan de levaduras; ND, amebas sin grupo trófico definido. Período de tiempo; 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación. RT, Riqueza de especies total.

	S0	S30	χ^2	S0	S60	χ^2	S0	SP30	χ^2	S0	SP60	χ^2
B	4	17	8.05	4	17	8.05	4	32	21.78	4	27	17.06
P	1	8	5.44	1	5	2.67	1	7	4.50	1	8	5.44
O	2	4	0.67	2	0	2.00	2	6	2.00	2	3	0.20
F	1	4	1.80	1	0	1.00	1	1	0.00	1	2	0.33
A	0	1	1.00	0	2	2.00	0	4	4.00	0	2	2.00
L	0	2	2.00	0	1	1.00	0	1	1.00	0	0	0.00
ND	2	11	6.23	2	4	0.67	2	10	5.33	2	18	12.80
RT	10	47	24.02	10	29	9.26	10	61	36.63	10	60	35.71

	SC0	SC30	χ^2	SC0	SC60	χ^2	SC0	SCP30	χ^2	SC0	SCP60	χ^2
B	20	20	0.00	20	22	0.10	20	35	4.09	20	28	1.33
P	5	5	0.00	5	5	0.00	5	3	0.50	5	6	0.09
O	0	2	2.00	0	1	1.00	0	1	1.00	0	2	2.00
F	3	3	0.00	3	2	0.20	3	3	0.00	3	2	0.20
A	0	0	0.00	0	1	1.00	0	3	3.00	0	1	1.00
L	0	1	1.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00
ND	9	10	0.05	9	7	0.25	9	19	3.57	9	22	5.45
RT	37	41	0.21	37	38	0.01	37	64	7.22	37	61	5.88

	SH0	SH30	χ^2	SH0	SH60	χ^2	SH0	SHP30	χ^2	SH0	SHP60	χ^2
B	2	11	6.23	2	11	6.23	2	19	13.76	2	17	11.84
P	1	2	0.33	1	1	0.00	1	1	0.00	1	4	1.80
O	0	0	0.00	0	2	2.00	0	2	2.00	0	2	2.00
F	0	3	3.00	0	0	0.00	0	2	2.00	0	1	1.00
A	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	1	1.00
L	0	0	0.00	0	2	2.00	0	2	2.00	0	2	2.00
ND	4	5	0.11	4	11	3.27	4	8	1.33	4	9	1.92
RT	7	21	7.00	7	27	11.76	7	34	17.78	7	36	19.56

Tablas de χ^2 resultantes de la comparación del índice de diversidad trófica de Shannon (H') entre las diferentes comunidades del suelo desnudo durante los 3 diferentes períodos de tiempo, así como la comparación entre los índices de diversidad trófica de Simpson (D') calculado para cada comunidad de los mismos microcosmos. Un grado de libertad P = 0.05, χ^2 tab = 3.8941). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación.

	S0	SC0	χ^2		S30	SC30	χ^2		S60	SC60	χ^2
H'	1.83	2.3	0.05	H'	2.61	2.6	0.00	H'	1.79	2.1	0.02
D'	0.66	0.46	0.04	D'	0.71	0.47	0.05	D'	0.49	0.41	0.01

	S0	SH0	χ^2		S30	SH30	χ^2		S60	SH60	χ^2
H'	1.83	1.89	0.00	H'	2.61	2.3	0.02	H'	1.79	1.54	0.02
D'	0.66	0.44	0.04	D'	0.71	0.48	0.04	D'	0.49	0.49	0.00

	SC0	SH0	χ^2		SC30	SH30	χ^2		SC60	SH60	χ^2
H'	2.3	1.89	0.04	H'	2.6	2.3	0.02	H'	2.1	1.54	0.09
D'	0.46	0.44	0.00	D'	0.47	0.48	0.00	D'	0.41	0.49	0.01

Tablas con los valores χ^2 resultantes de la comparación entre el índice de diversidad trófica de Shannon (H') de las comunidades del suelo con *M. sativa* de 3 diferentes períodos de tiempo, esto mismo se realizó para comparar el índice de diversidad trófica de Simpson (D'). Un grado de libertad P = 0.05, χ^2 tab = 3.8941). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación.

	SP30	SCP30	χ^2		SP60	SCP60	χ^2
H'	2.44	2.1	0.03	H'	2.43	1.9	0.06
D'	0.57	1.6	0.49	D'	0.54	0.32	0.06

	SP30	SHP30	χ^2		SP60	SHP60	χ^2
H'	2.44	2.12	0.02	H'	2.43	2.27	0.01
D'	0.57	0.45	0.01	D'	0.54	0.57	0.00

	SCP30	SHP30	χ^2		SHP60	SCP60	χ^2
H'	2.1	2.12	0.00	H'	2.27	1.9	0.03
D'	1.6	0.45	0.65	D'	0.57	0.32	0.07

Tablas de χ^2 de la comparación entre el índice de diversidad trófica de Shannon (H') de las comunidades del suelo desnudo y con *M. sativa* de 3 diferentes períodos de tiempo, así como el índice de diversidad trófica de Simpson (D'). Un grado de libertad P = 0.05, χ^2 tab = 3.8941). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación.

	S0	S30	χ^2		SC0	SC30	χ^2		SH0	SH30	χ^2
H'	1.83	2.61	0.14	H'	2.3	2.6	0.018	H'	1.89	2.3	0.040
D'	0.66	0.71	0.00	D'	0.46	0.47	0.000	D'	0.44	0.48	0.002
	S0	S60	χ^2		SC0	SC60	χ^2		SH0	SH60	χ^2
H'	1.83	1.79	0.00	H'	2.3	2.1	0.009	H'	1.89	1.54	0.036
D'	0.66	0.49	0.03	D'	0.46	0.41	0.003	D'	0.44	0.49	0.003
	S0	SP30	χ^2		SC0	SCP30	χ^2		SH0	SHP30	χ^2
H'	1.83	2.44	0.09	H'	2.3	2.1	0.009	H'	1.89	2.12	0.013
D'	0.66	0.57	0.01	D'	0.46	0.38	0.007	D'	0.44	0.45	0.000
	S0	SP60	χ^2		SC0	SCP60	χ^2		SH0	SHP60	χ^2
H'	1.83	2.43	0.08	H'	2.3	1.9	0.038	H'	1.89	2.27	0.035
D'	0.66	0.54	0.01	D'	0.46	0.32	0.027	D'	0.44	0.57	0.017

Tablas de χ^2 de la comparación entre el número de amebas (NMP) de las comunidades del suelo desnudo y con *M. sativa* durante los 3 diferentes períodos de tiempo, así como el índice de diversidad trófica de Simpson (D'). Un grado de libertad P = 0.05, $\chi^2_{\text{tab}} = 3.8941$. Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación.

S0	SH0	χ^2
351049.31	567.98	349349.04
S0	SC0	
351049.31	10754.37	320064.86
SH0	SC0	
567.98	10754.37	9164.40
S30	SH30	
874506.19	1648.19	869574.02
S30	SC30	
874506.19	5374.06	858515.30
SH30	SC30	
1648.19	5374.06	1976.88
S60	SH60	
687569.74	4178.95	675133.87
S60	SC60	
687569.74	10040.39	658026.59
SC60	SH60	
10040.39	4178.95	2416.18
SP30	SHP30	
2872882.02	4088.83	2860638.78
SP30	SCP30	
2872882.02	7565.96	2850263.65
SHP30	SCP30	
4088.83	7565.96	1037.38
SP60	SHP60	
1737832.45	4410.54	1724645.48
SP60	SCP60	
1737832.45	11748.95	1702901.18
SHP60	SCP60	
4410.54	11748.95	3332.55

Tablas de χ^2 de la comparación entre el número de amebas (NMP) de las comunidades del suelo desnudo y con *M. sativa*. La comparación se realizó entre los microcosmos del mismo tratamiento pero a diferente tiempo. Lo mismo se realizó con el índice de diversidad trófica de Simpson (D'). Un grado de libertad P = 0.05, χ^2 tab = 3.8941). Abreviaturas; S, suelo; C, contaminación por combustóleo; H, contaminación con hexano. 0, 24 h después de la perturbación; 30, treinta días después de la perturbación; 60, sesenta días después de la perturbación.

S0	S30	χ^2
351049.31	874506.19	223577.88
S30	SP30	
874506.19	2872882.02	1065677.14
S60	SP60	
687569.74	1737832.45	454791.28
SH0	SH30	χ^2
567.98	1648.19	526.52
SH30	SHP30	
1648.19	4088.83	1038.29
SH60	SHP60	
4178.95	4410.54	6.24
SC0	SC30	χ^2
10754.37	5374.06	1794.83
SC30	SCP30	
5374.06	7565.96	371.28
SC60	SCP60	
10040.39	11748.95	133.97

Anexo 3 Referencias de los grupos tróficos

1. Adl SM (2003) The ecology of soil decomposition. CABI Publishing, USA
2. Anderson OR, Hoeffler WK (1979) Fine structure of a marine proteomyxid and cytochemical changes during encystment. *J Ultrastruct Res* 66:276–287.
3. Barbeau J, Buhler T (2001) Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res Microbiol* 152:753–760.
4. Bovee EC (1961) A small amoeba of freshwater lakes and ponds, *Mayorella cultura* n. sp. *Trans Am Microsc Soc* 1:54–62.
5. Bovee EC (1956) Some observations on the morphology and activities of a new amoeba from citrus wastes, *Flamella citrensis* n.sp. *J Eukaryot Microbiol* 3:151–155.
6. Bovee EC & Sawyer TK (1979) Marine flora and fauna of the northeastern United States: Protozoa, Sarcodina, Amoebae. [Washington]: Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service: for sale by the Supt of Docs US Govt Print Off.
7. Cann JP (1986) The feeding behavior and structure of *Nuclearia delicatula* (Filosea: Acanthamoebidae). *J Protozool* 3:392–396.
8. Cash J, Wailes HG (1919) The British freshwater Rhizopoda and Helizoa. The Ray Society. Vol 4. No. 103. Johnson Reprint Corporation, New York.
9. Chakraborty S, Old KM (1986) Ultrastructure and description of a fungus-feeding amoeba, *Trichamoeba mycophaga* n.sp. (Amoebidea, Amoebae), from Australia. *J Eukaryot Microbiol* 33: 564–569.
10. Chavez LA, Balamuth W, Gong T (1986) A light and electron microscopical study of a new, polymorphic free-living amoeba, *Phreatamoeba balamuthi* n. g., n. sp. *J Protozool* 3:397–404.
11. Daggett PM, Sawyer TK, Nerad TA (1982) Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. *Microb Ecol* 8(4):371–386.
12. Danso SKA, Alexander M (1975) Regulation of predation by prey density: the protozoan–*Rhizobium* relationship. *Appl Microbiol* 4: 515–521.
13. Dillon A, Parry JD (2009) Amoebic grazing of freshwater *Synechococcus* strains rich in phycoerythrin. *FEMS Microbiol Ecol* 69:106–112.

14. De Jonckheere JF, Dive DG, Pussard M, Vickerman K (1984) *Willaertia magna* gen. nov., sp. nov. (Vahlkampfiidae). A thermophilic amoeba found in different habitats. *Protistologica* 20:5–13
15. Finlay B. J., Esteban G. (1998) Planktonic ciliate species diversity as an integral component of ecosystem function in a freshwater pond. *Protist* 149: 155–165.
16. Jeroen Van Wichelen J, van Gremberghe J, Vanormelingen P, Debeer AE, Leporcq B, Menzel D, Codd GA, Descy JP, Vyverman W (2010) Strong effects of amoebae grazing on the biomass and genetic structure of a *Microcystis* bloom (Cyanobacteria). *Environ Microbiol* 10: 2797–2813
17. Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16(2):273–307.
18. Myl'nikov AP, Karpov SA (2004) Review of diversity and taxonomy of cercomonads. *Protistology* 3(4):201–217.
19. Nero LC, Tarver MG, Hedrick LR (1964) Growth of *Acanthamoeba castellanii* with the yeast *Torulopsis famata*. *J Bacteriol* 87:220–225.
20. Novarino G, Warren A, Butler H, Lambourne G, Boxshall A, Bateman J, Kinner NE, Harvey RW, Mosse RA, Teltsch B (1997) Protistan communities in aquifers: a review. *FEMS Microbiol Rev* 20:261–75.
21. Old KM, Darbyshire JF (1978) Soil fungi as food for giant amoebae. *Soil Biol Biochem* 2:93–100.
22. Page FC, Siemensma FJ (1991) *Nackte rhizopoda and heliozoa*. Gustab-Fisher Verlag, Stuttgart, New York: 3-170.
23. Page FC (1988) *A new key to freshwater and soil gymnamoebae*. Freshwater biological Association, Ambleside.
24. Page FC (1983) *Marine Gymnamoebae*. Lavenham Press Ltd., Lavenham.
25. Page FC (1975) A new family of amoebae with fine pseudopodia. *Zool J Linnean Soc* 56:73–89.
26. Page FC (1976) *An illustrated key to freshwater and soil amoebae*. Freshwater biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. 155 p.
27. Page FC (1971) Two Marine Species of *Flabellula* (Amoebida, Mayorellidae). *The Journal of Protozoology*, 18: 37–44.

28. Page FC (1967) Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. J Eukaryot Microbiol 14:499–521.
29. Page FC (1968) Generic Criteria for *Flabellula*, *Rugipes* and *Hyalodiscus*, With Descriptions of Species. The Journal of Protozoology, 15: 9–26.
30. Peglar MT, Amaral ZLA, Anderson OR, Nerad TA, Gillevet PM, Mullen TE, Frasca JRS, Silberman JD, O'Kelly CJ, Sogin ML (2003) Two new small subunit ribosomal RNA gene lineages within the subclass Gymnamoebia. J Eukaryot Microbiol 50:224–232.
31. Pickup ZL, Pickup R, Parry JD (2007) A comparison of the growth and starvation responses of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* in the presence of suspended and attached *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiol Ecol 59:556–563.
32. Pussard M, Pons R (1976) Etude des genres *Leptomyxa* et *Gephyramoeba* (Protozoa, Sarcodina): 1. *Leptomyxa reticulata* Goodey, 1915. Protistologica 12:151–168
33. Pratt RJ, Cairns J Jr (1985) Functional groups in the protozoa: roles in differing ecosystems. J Protozool 3:415–423.
34. Ray DL (1951) Agglutination of bacteria: a feeding method in the soil amoeba *Hartmannella* sp. J Exp Zool 118:443–465.
35. Rodriguez Zaragoza S, Mayzlish E, Steinberger Y (2005) Seasonal changes in free-living amoeba species in the root canopy of *Zygophyllum dumosum* in the Negev Desert, Israel. Microb Ecol 49:134–141.
36. Röpstorf P, Hülsmann N, & Hausmann K (1994), Comparative Fine Structural Investigations of Interphase and Mitotic Nuclei of Vampyrellid Filose Amoebae. Journal of Eukaryotic Microbiology, 41: 18–30.
37. Surek B & Melkonian M (1980) The filose amoeba *Vampyrellidium perforans* nov. sp. (*Vampyrellidae*, *Aconchulinida*): axenic culture, feeding behavior and host range specificity. Arch. Protistenkd. 123: 166-191.
38. Walker G, Simpson AGB, Edgcomb V, Sogin ML, Patterson DJ (2001) Ultrastructural identities of *Mastigamoeba punctachora*, *Mastigamoeba simplex* and *Mastigella commutans* and assessment of hypotheses of relatedness of the pelobionts (Protista). Eur J Protistol 37(1):25–49.
39. West GS (1903) Observations on freshwater rhizopods, with some remarks on their classification. J Linn Soc Lond Zool 29:108–117.
40. Wrights JL, Redhead K, Maudsley H (1981) *Acanthamoeba castellanii*, a predator of Cyanobacteria. J Gen Microbiol 125:293–300.

41. Zubkov MV, Sleigh MA (1999) Growth of amoebae and flagellates on bacteria deposited on filters. *Microb Ecol* 37:107–115.

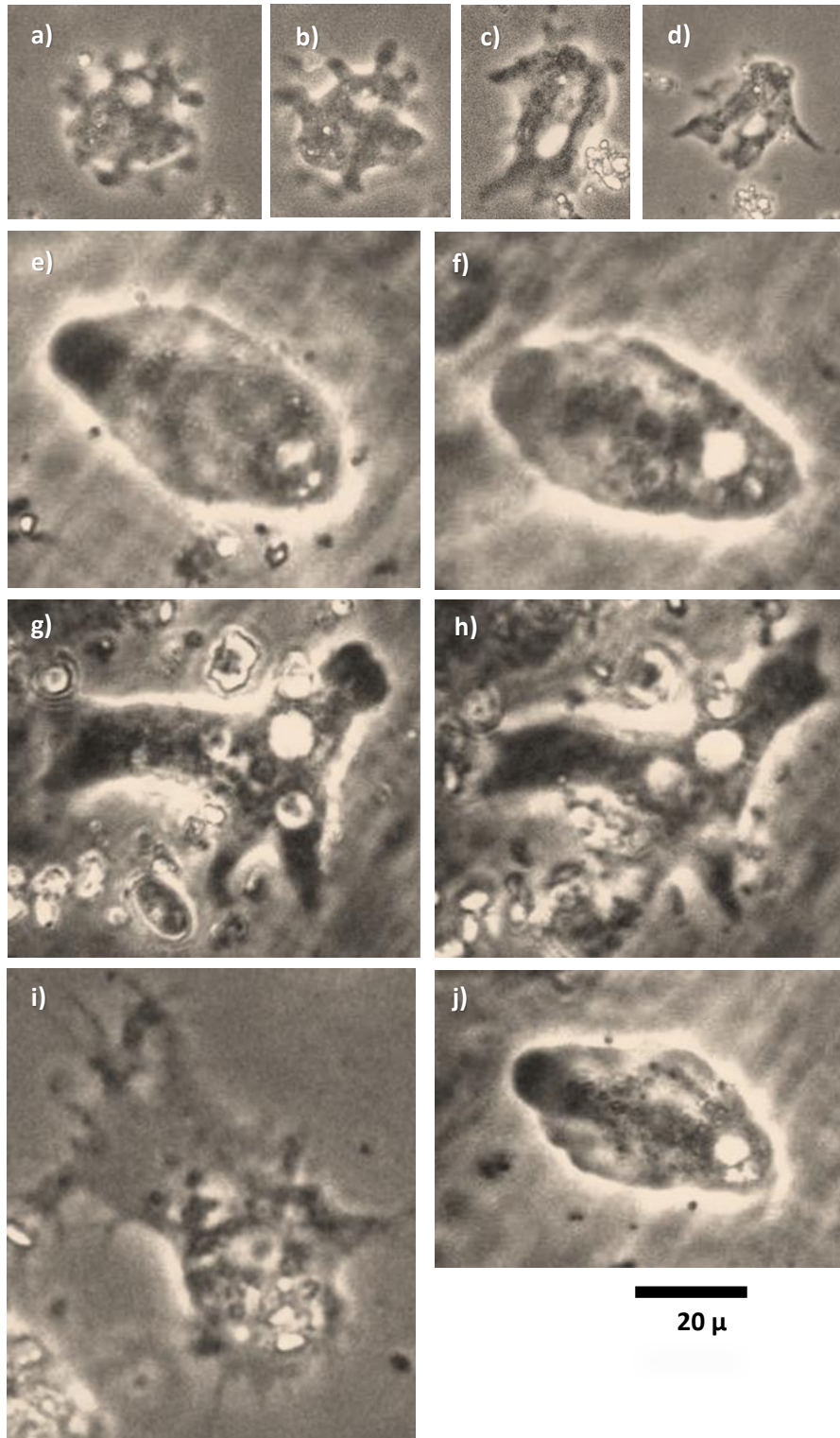
42. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/tabid/112/Default.aspx>

43. <http://amoeba.ifmo.ru/species/amoebidae/dmyc.htm>

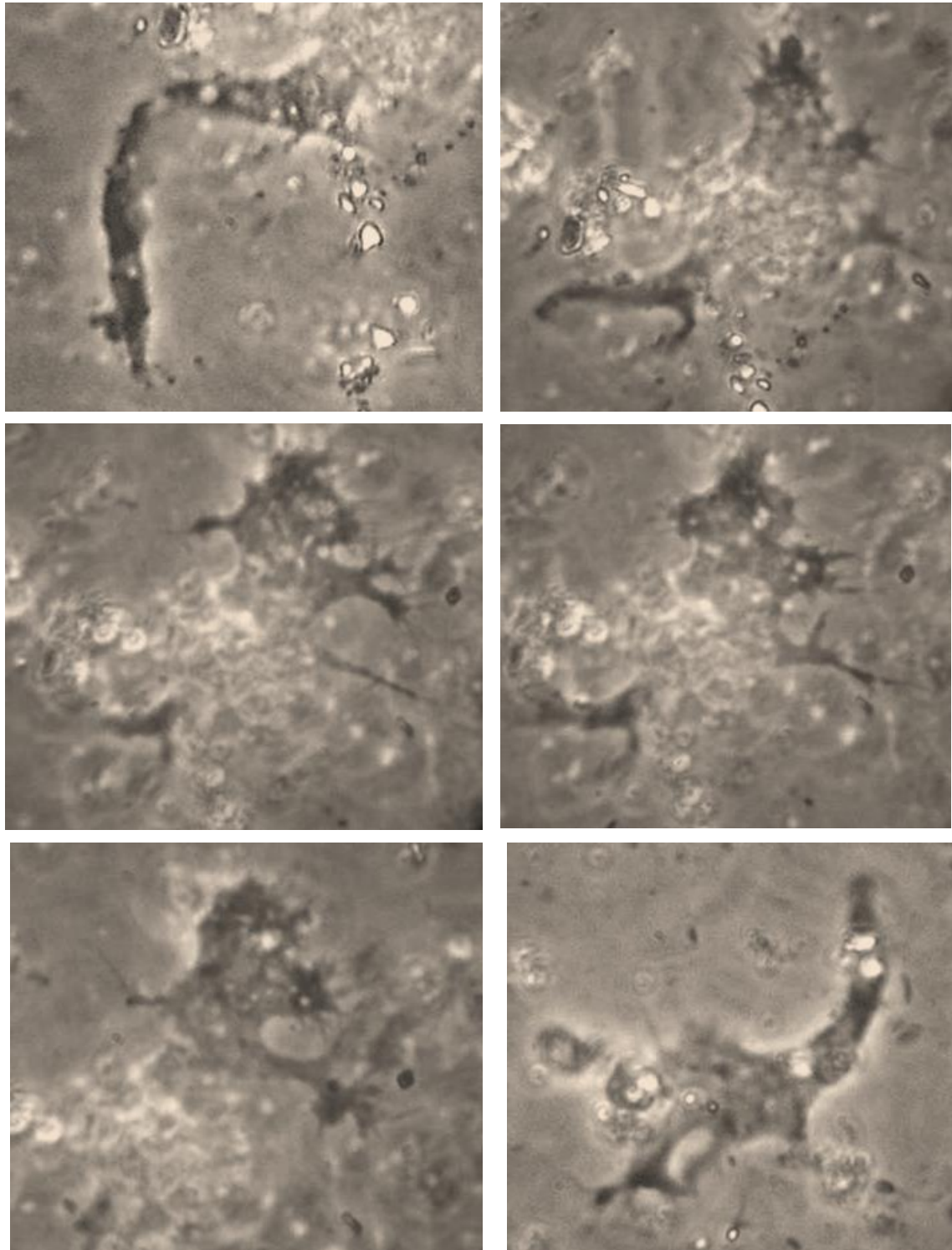
44. <http://www.ccap.ac.uk>

ANEXO 4 FOTOGRAFÍAS DE AMEBAS DESNUDAS DE VIDA LIBRE OBSERVADAS
EN LOS MICROCOSMOS

AMEBAS DEL SUELO PERTURBADO MECANICAMENTE

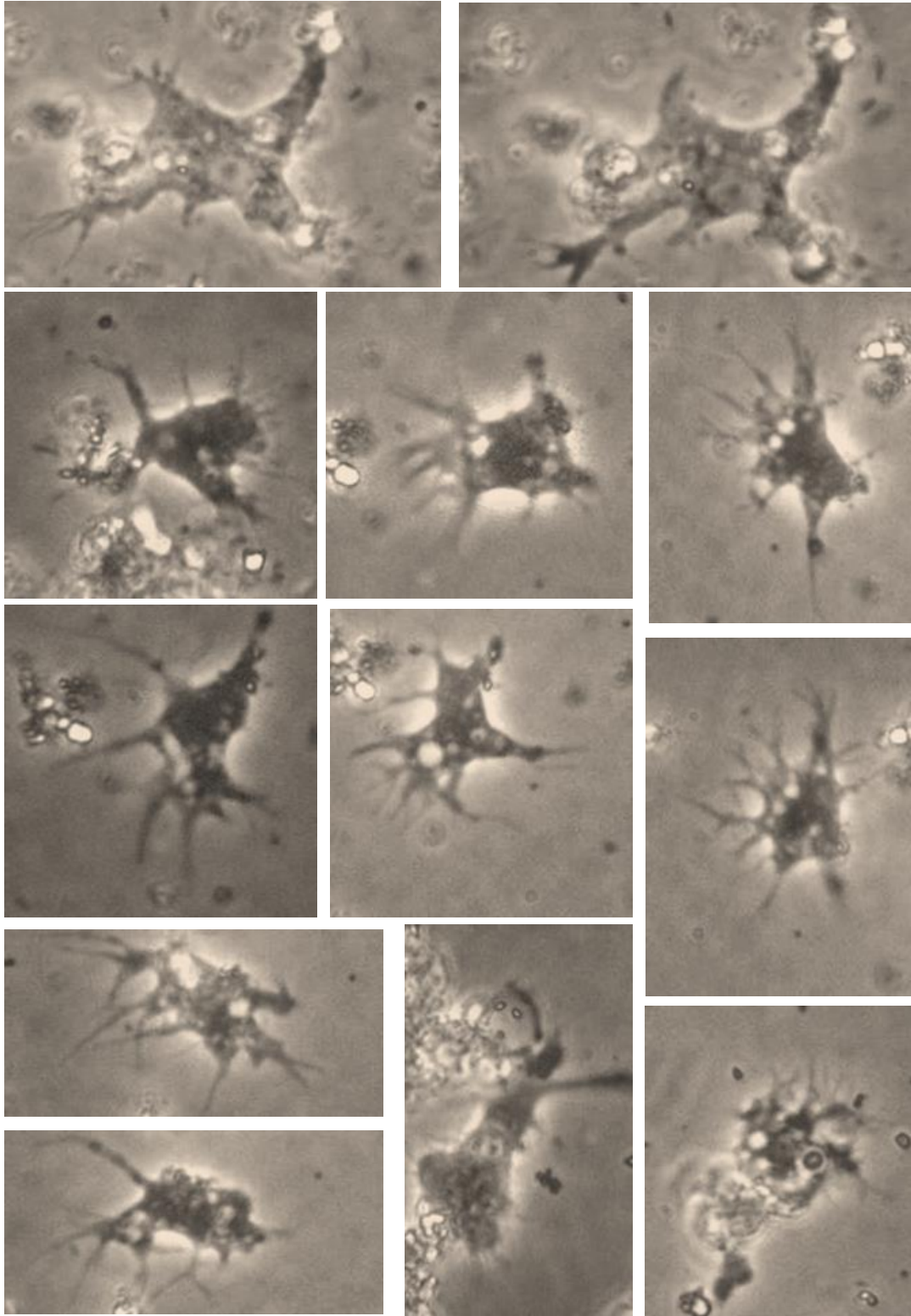


Trofozoitos encontrados 60 días después de la perturbación mecánica (microcosmos S60); a-d) *Dactylamoeba bulla* (*Korotnevella bulla*); e-f) *Dermamoeba granifera*; g-h) *Mayorella godasae*; i) *Biomyxa merdaria*; j) *Dermamoeba minor*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



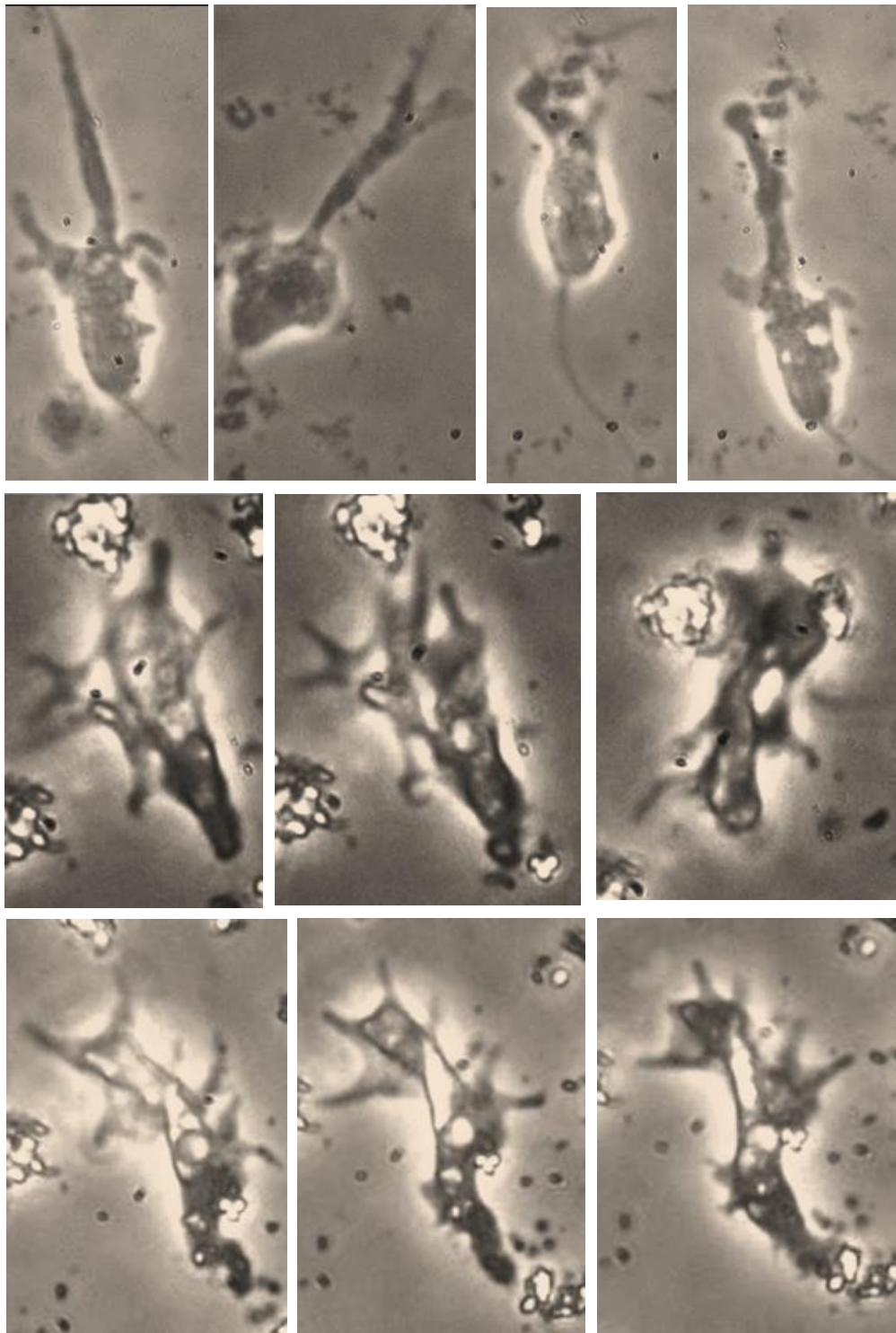
100 μ

Trofozito observado a 10X de *Biomyxa vagans*, encontrado en el suelo 60 días después de la perturbación mecánica en los microcosmos S60. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



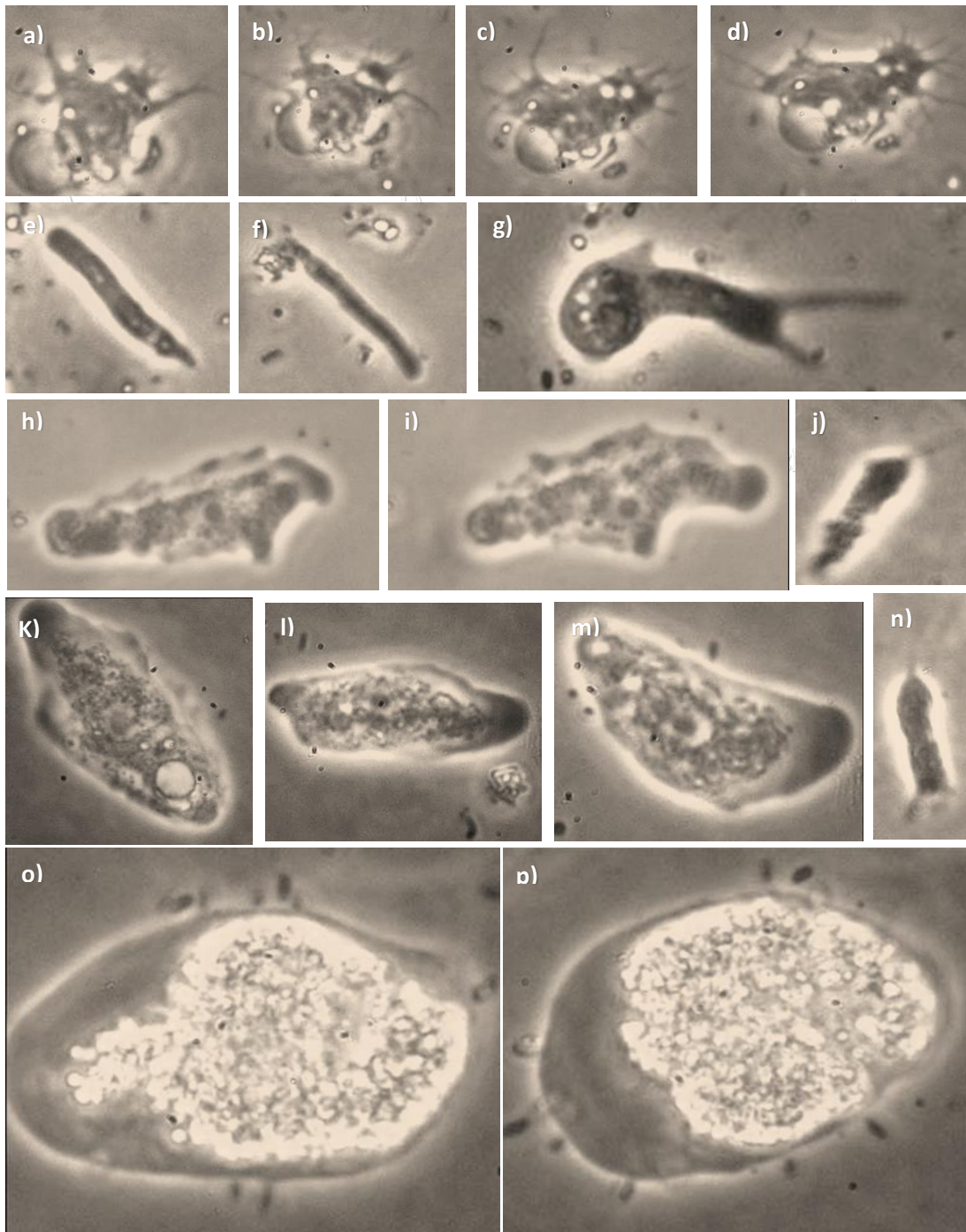
100 μ

Trofozoitos de *Biomyxa vagans* encontrados en el suelo S60 (60 días después de la perturbación mecánica). (Microscopia de contraste de fases, 10X)



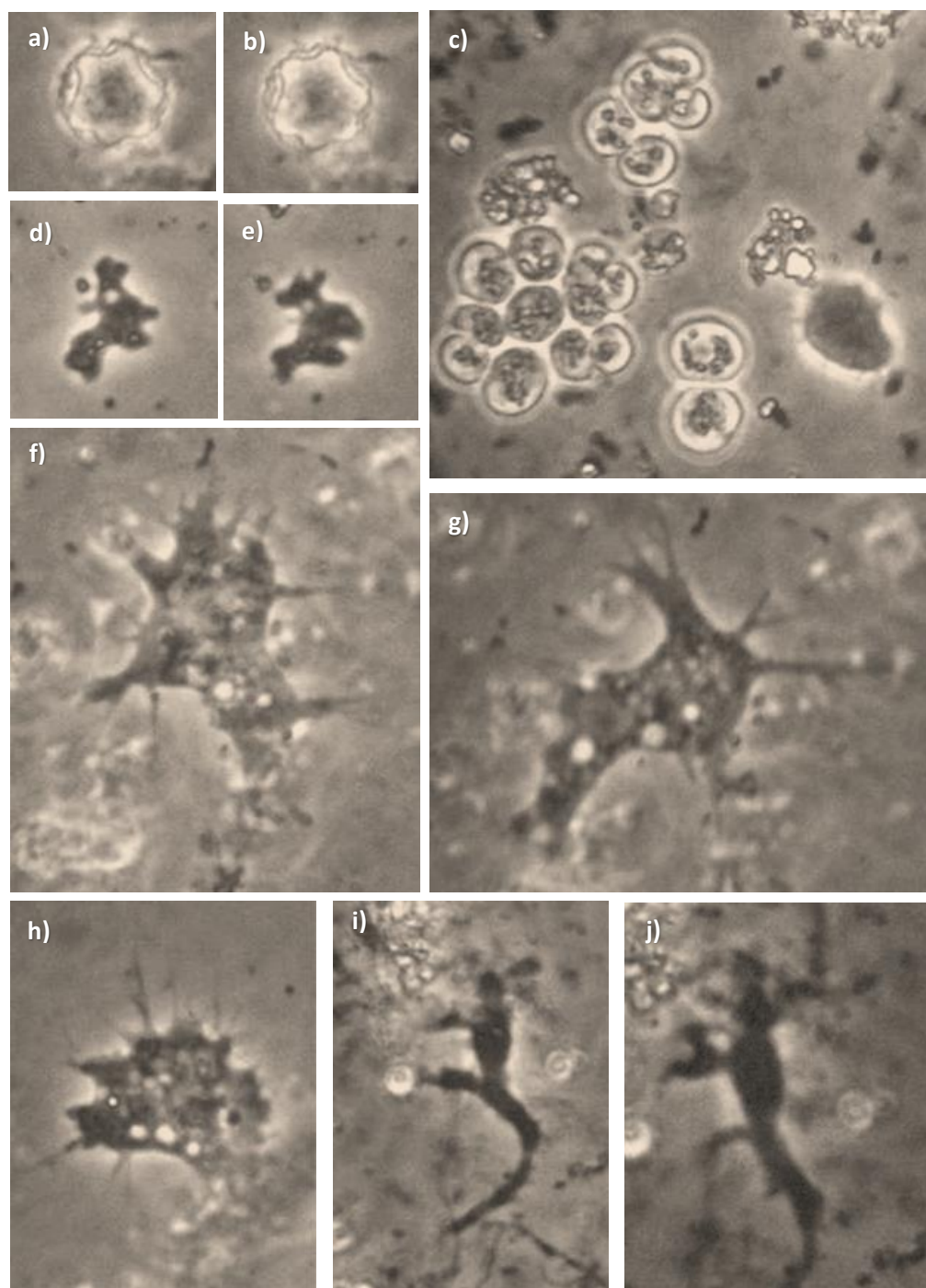
20 μ

Trofozoitos de protozoos encontrados en el suelo 60 días después de la perturbación mecánica (microcosmos S30); a-d) *Breviata anathema*; e-j) *Korotnevella stella*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



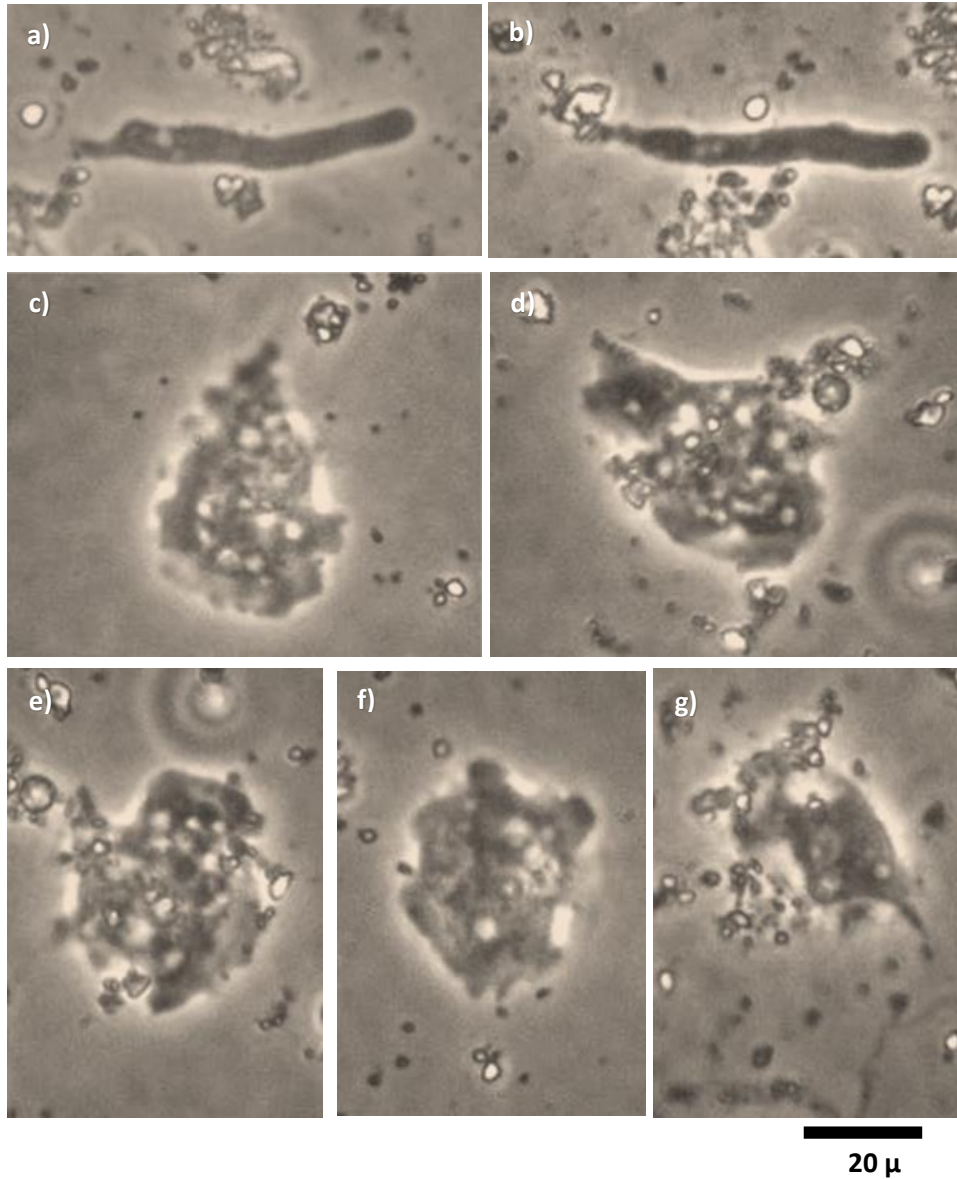
20 μ

Amebas encontradas en el suelo con *Medicago sativa* 30 días después de la perturbación mecánica (microcosmos SP30); a-d) *Vampyrella* sp.; e-f) *Hartmanella vermiformis*; g) *Oscillosignum proboscidium*; h-i) *Paradermamoeba* sp.; j y n) *Hyperamoeba* sp.; k) *Dermamoeba minor*; l-m) *Paradermamoeba valamo*; o-p) *Paragocevia* sp. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



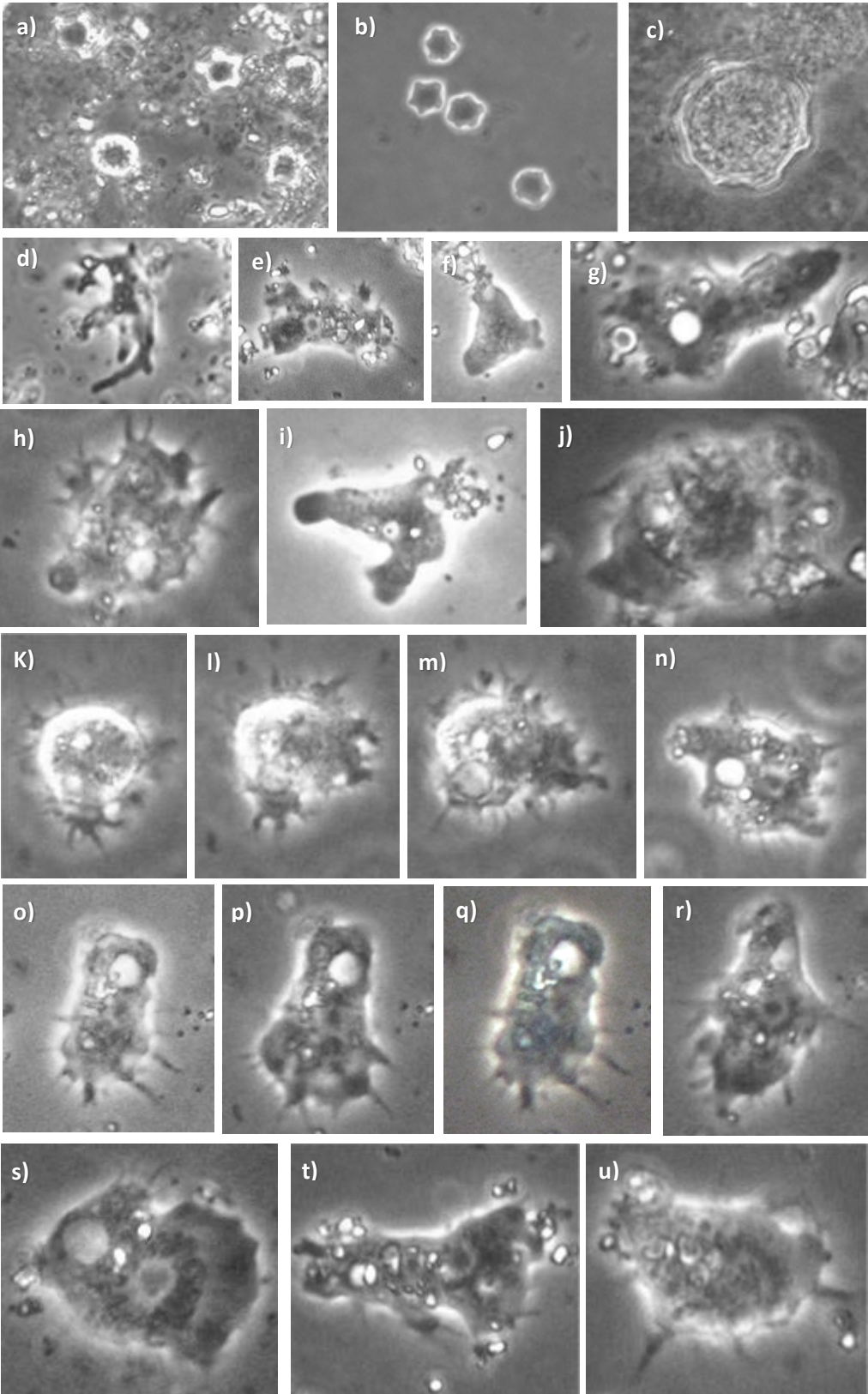
20 μ

Amebas encontradas en el suelo perturbado mecánicamente 30 días después de sembrar con *Medicago sativa*; a-b) quistes de *Acanthamoeba mauritanensis*; **c)** *Vampyrellidium* sp y a su lado quistes de *Cochliopodium* sp. **d-e)** *Amoeba diminutiva*; **f-h)** *Biomyxa merdaria*; **i-j)** *Gephyramoeba delicatula*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)

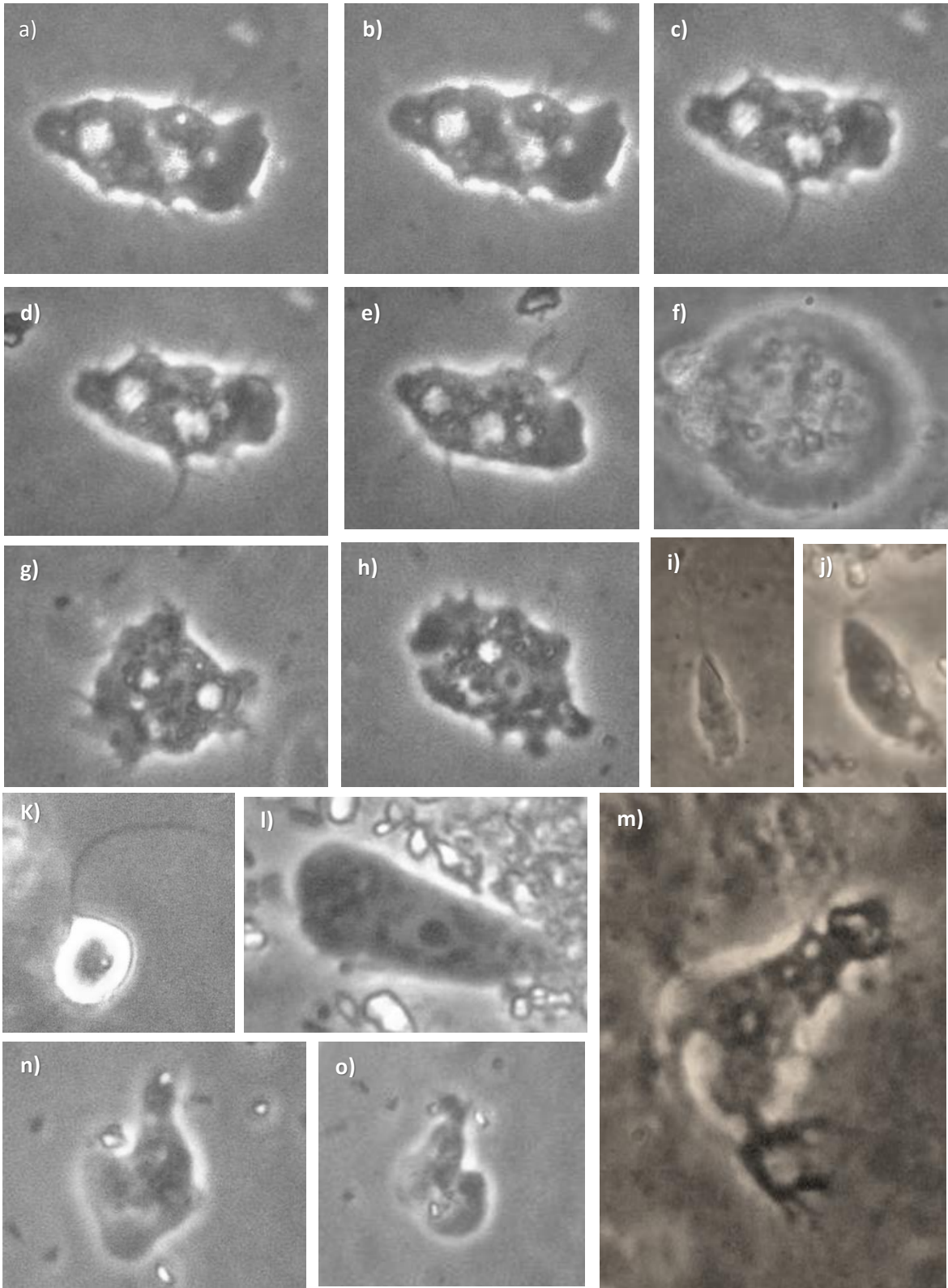


Amebas encontradas en el suelo perturbado mecánicamente 30 días después de sembrar con *Medicago sativa*; a-b) *Hartmannella cantabrigiensis*; c-f) *Personella marginata*; g) *Mayorella godasae*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)

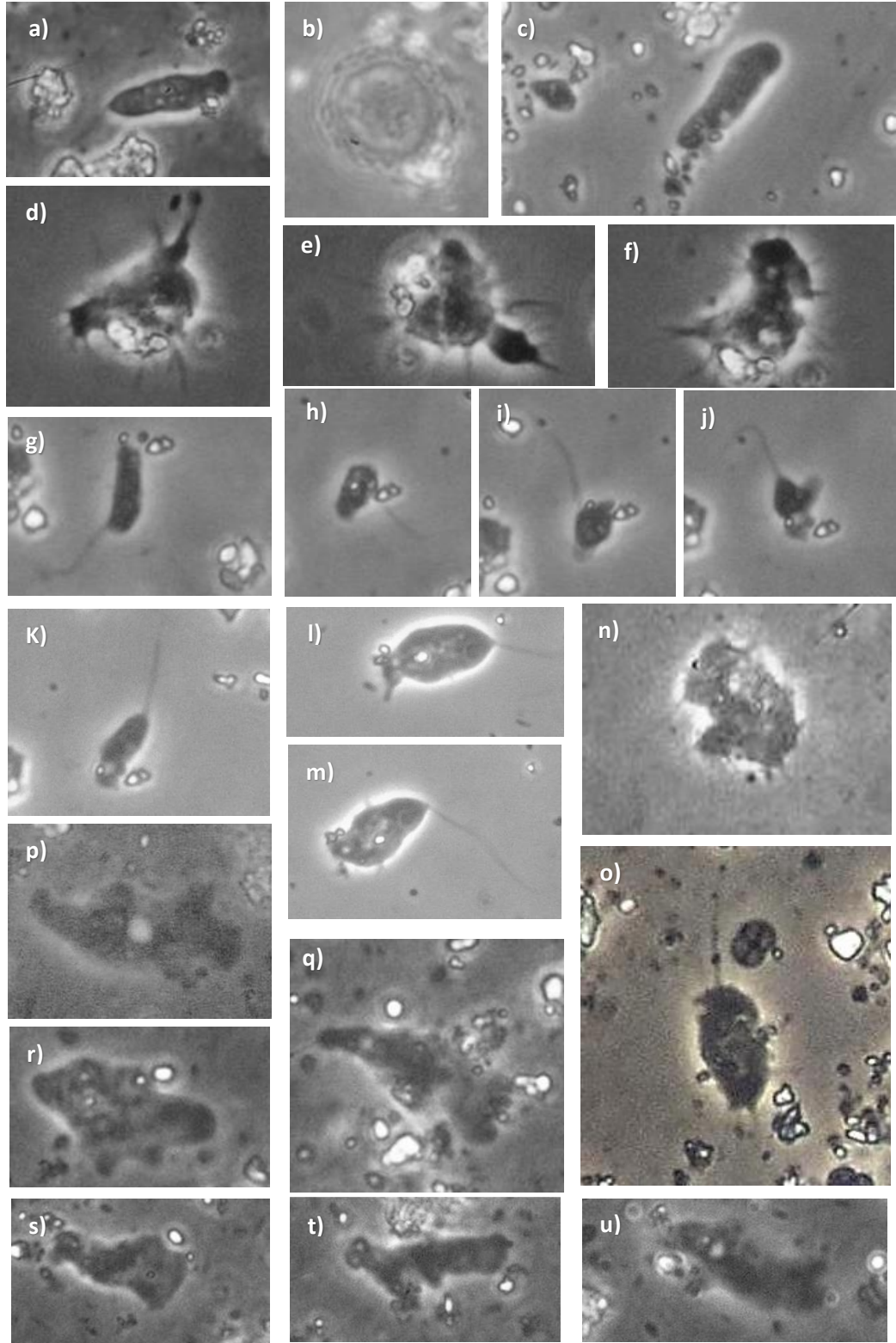
AMEBAS DEL SUELO CONTAMINADO CON COMBUSTÓLEO



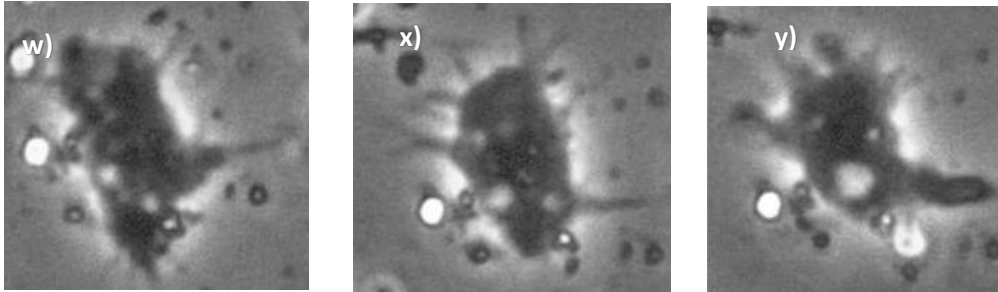
Amebas encontradas en el suelo 24 h después de contaminar con combustóleo: a y b) Quistes de *Acanthamoeba*, **c)** Quiste de *Leptomyxa*, **d)** *Korotnevella* sp (*Dactylamoeba bulla*), **e)** *Echinamoeba exudans*, **f)** *Vahlkampfia* sp, **g y j)** *Rhizamoeba australiensis*, **h e i)** *Rhizamoeba* sp1, **K, l,m y n)** *Rhizamoeba* sp2, **o, p, q y r)** *Flamella citrensis*, **s, t y s)** *Paraflabellula kudoii*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



Amebas encontradas en el suelo desnudo 30 días después de la contaminación con combustóleo.
a, b, c, d y e) *Dinamoeba* (?) sp., **f)** *Cochliopodium bilimbosum*, **g y h)** *Paraflabellula kudoj*, **i y j)**
Mastigamoeba sp., **k)** *Mastigamoeba simplex*, **l)** *Pelomyxa carolinensis*, **m)** *Rhizamoeba* sp3, **n y o)**
Vahlkampfia avara. (Microscopia de contraste de fases, 40X)

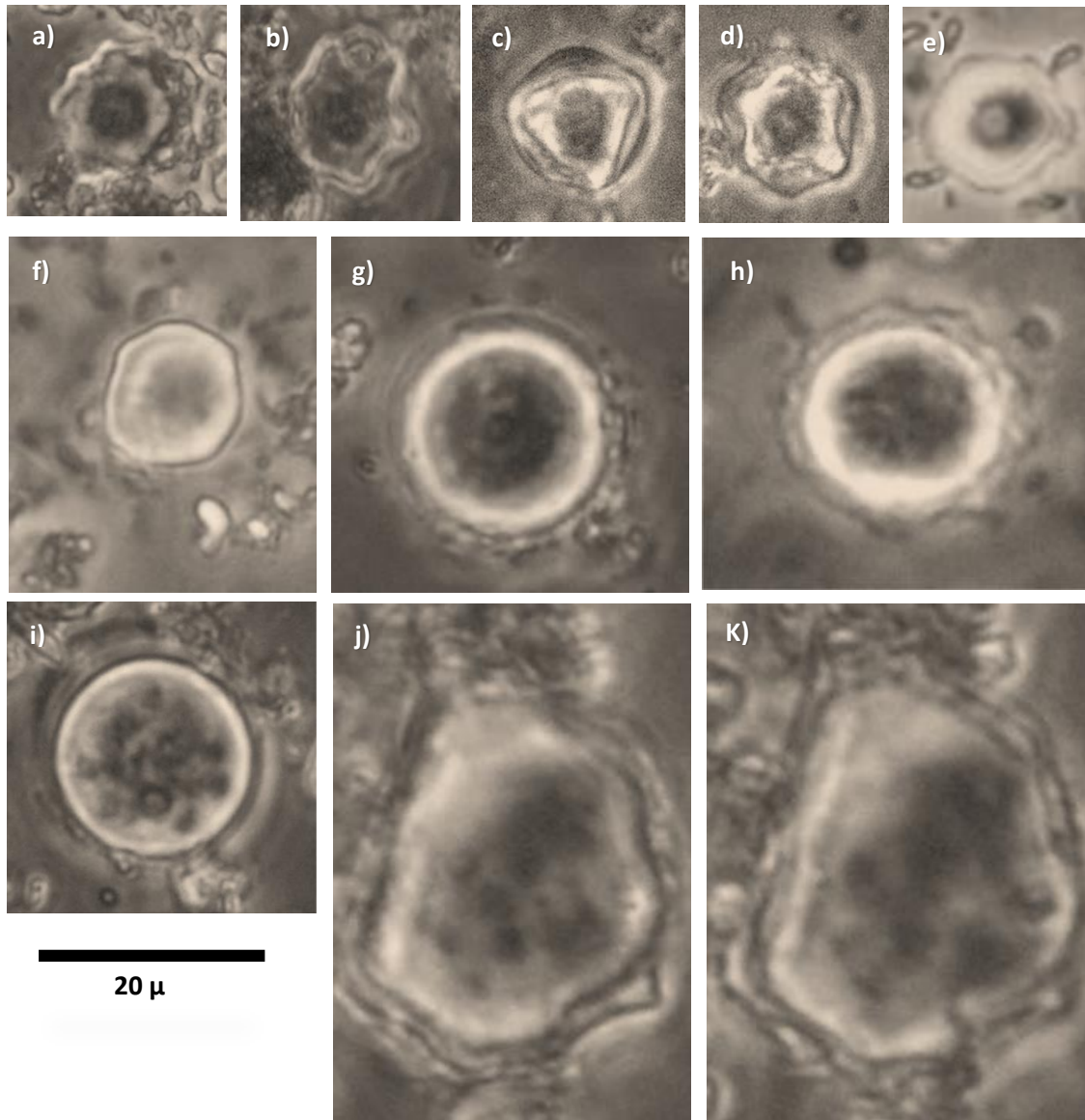


20 μ

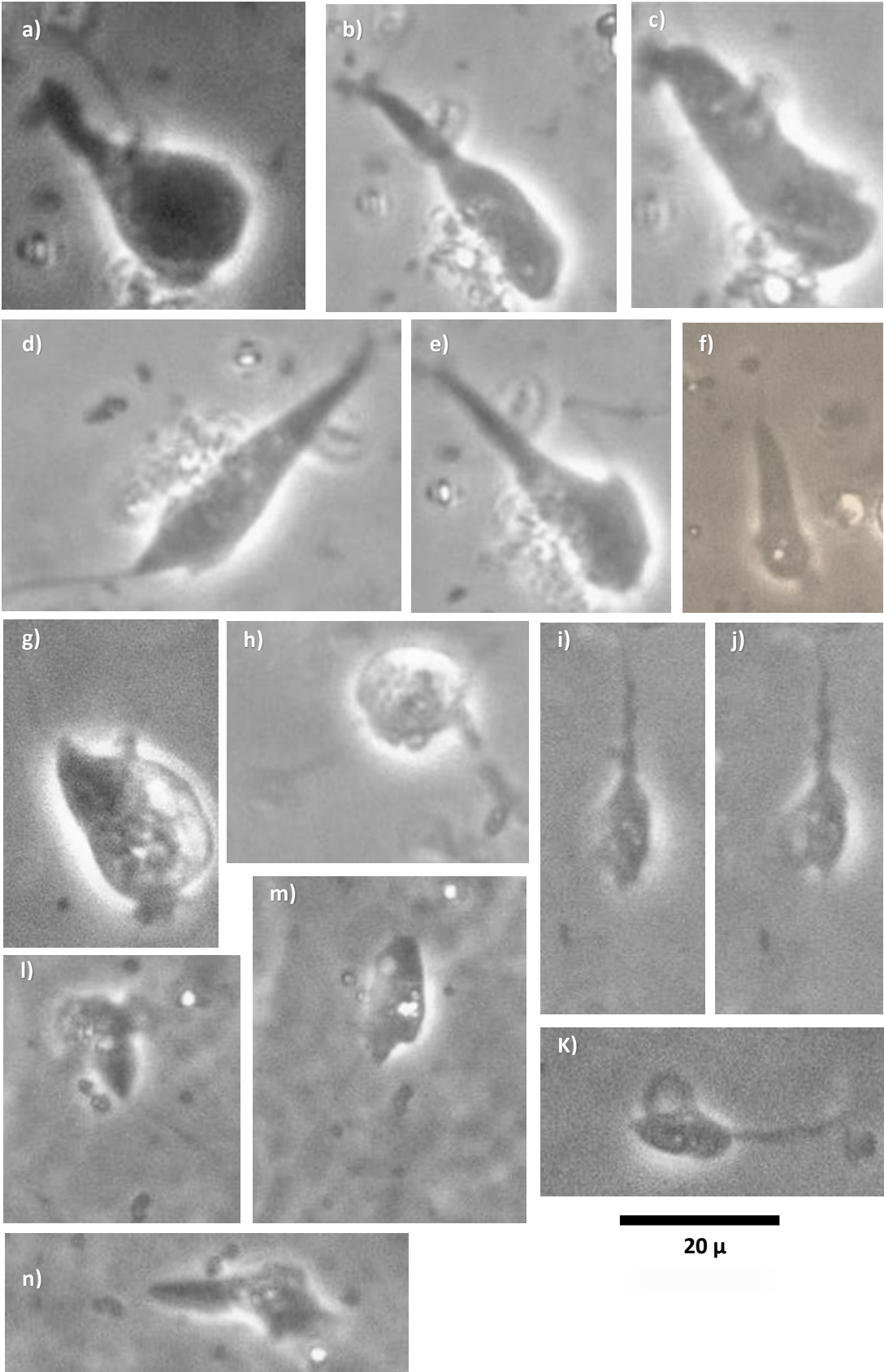


20 μ

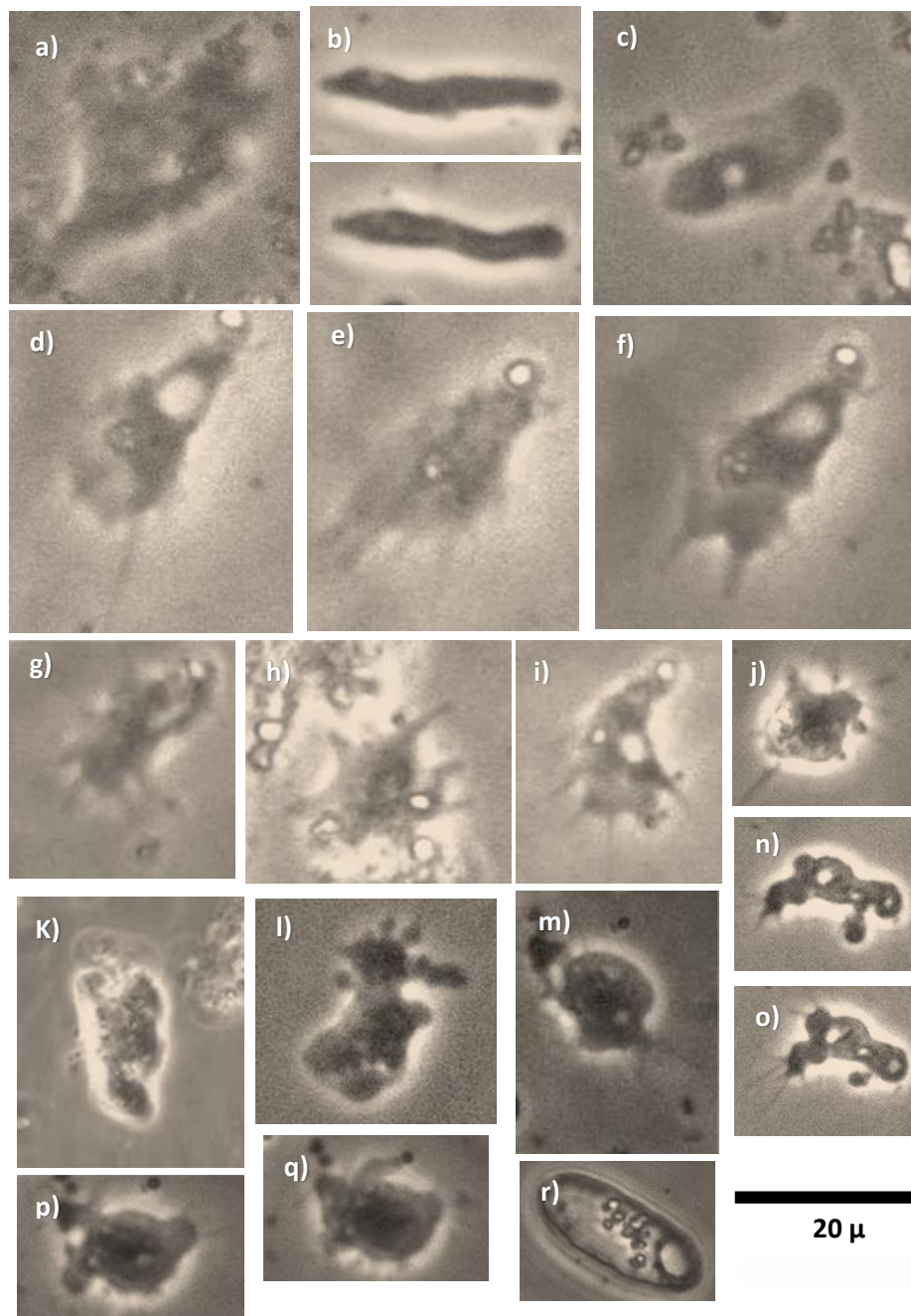
ebas encontradas en el suelo de la zona de raíces 30 después de la contaminación por combustóleo: a) *Hyperamoeba* sp, b) Quiste de *Pelomyxa*, c) *Vahlkampfia aberdonica*, d, e y f) *Arachnula impatiens*, g, h, i y k) *Mastigamoeba constans*, l y m) *Mastigamoeba punctachora*, n y o) *Mastigamoeba invertans*, p, q y r) *Mayorella cultura*; s, t y u) *Mayorella spatula*, w, x e y) *Vexillifera* sp. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



Quistes encontrados en el suelo SCP60 (suelo contaminado 60 días después de cultivar *M. sativa*; **a y b**) *Acanthamoeba rhisodes*; **c**) *Acanthamoeba triangularis*; **d**) *Acanthamoeba griffini*; **e**) *Acanthamoeba tubiashi*; **f**) **g**) *Rhizamoeba* sp.; **h**) *Stachynamoeba lipophora*; **i**) *Willartia magna*; **j** y **k**) Quistes de *Rhizamoeba flabellata*. (Microscopía de contraste de fases, 40X)

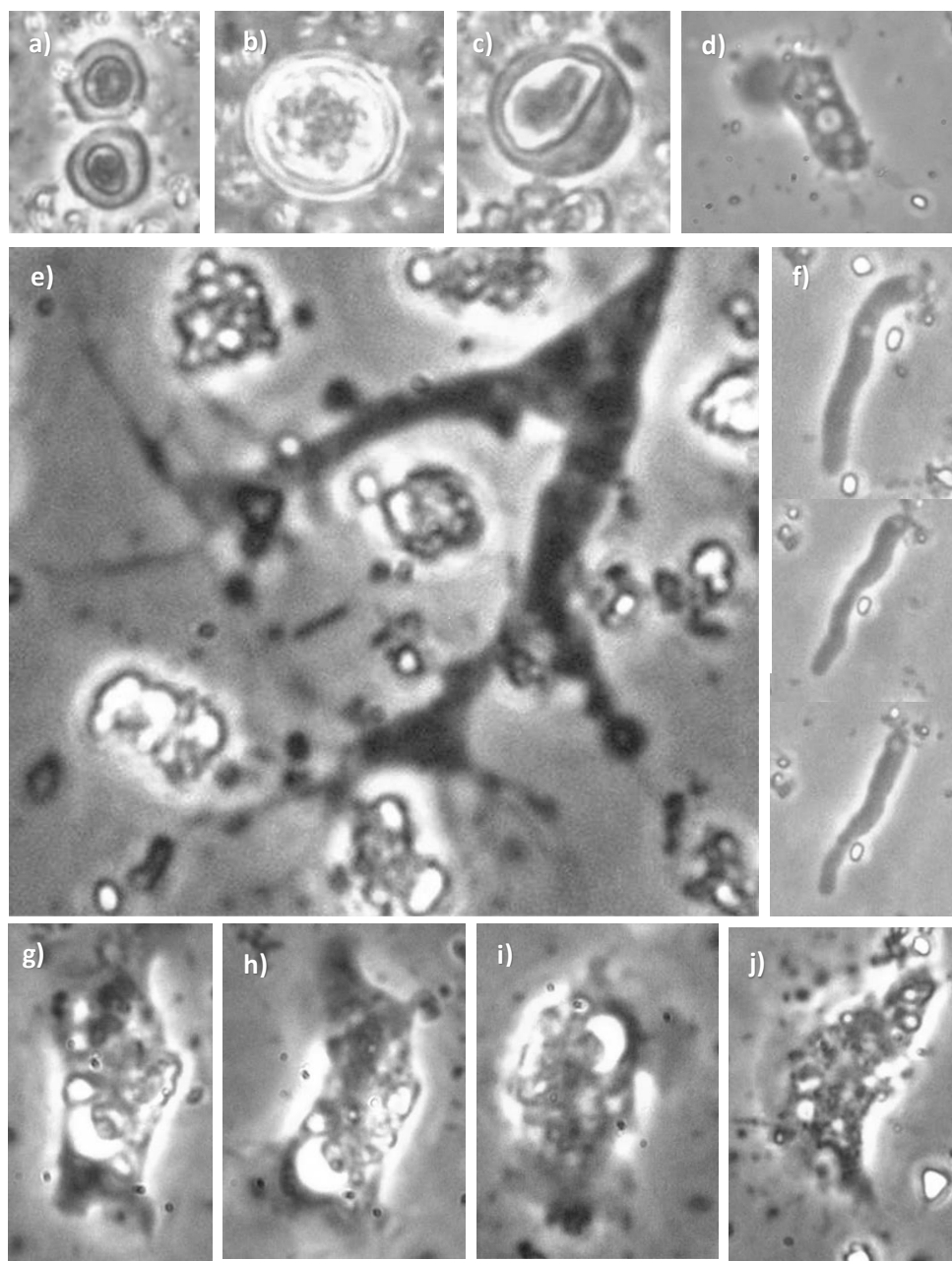


Amebas encontradas en el suelo SCP60 (suelo contaminado 60 días después de cultivar *M. sativa*); a – e) *Mastigella* sp.; f) *Hyperamoeba* sp.; g y h) *Mastigamoeba simplex*; i, j y k) *Mastigamoeba psammobia*; l, m y n) *Mastigamoeba punctachora*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



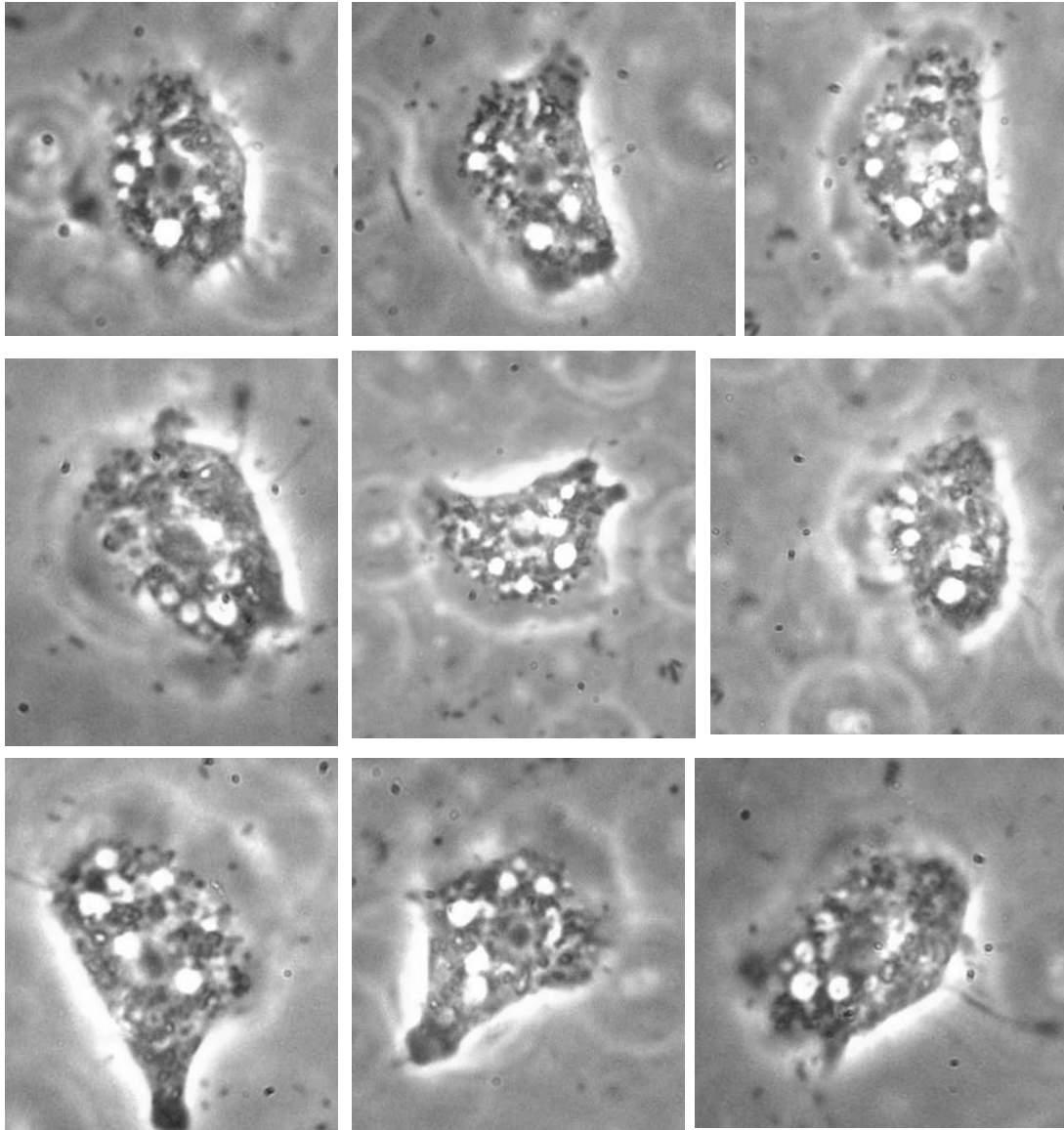
Amebas encontradas en el suelo SCP60 (suelo contaminado 60 días después de cultivar *M. sativa*); a) Amebade la familia Acrasidae; **b)** *Hartmanella vermiformis*; **c)** *Mayorella cultura*; **d-i)** *Vexillifera bacillipides*; **j)** *Nuclearia leuckarti*; **k)** *Willaertia magna*; **l)** *Adelphamoeba* sp.; **m-o)** *Aracnula* sp.; **p-q)** *Vampyrellidium* sp.; **r)** *Trinema* sp. (Microscopia de contraste de fases, 40X)

AMEBAS DEL SUELO CONTAMINADO CON HEXANO



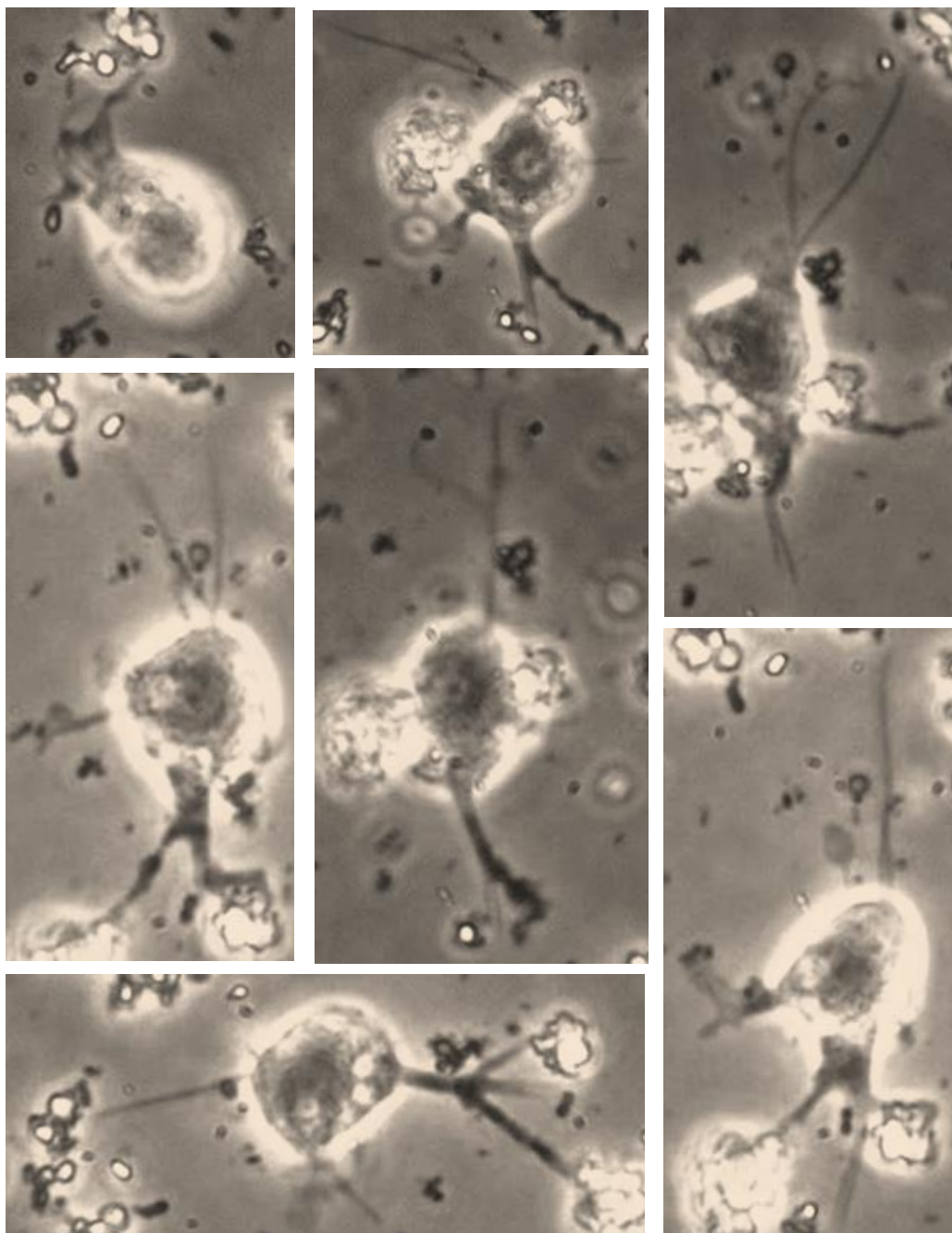
20 μ

Trofozoitos y quistes de amebas encontrados en el suelo 24 h después del contacto con hexano.
a) quistes de *Hartmanella vermiformis*; **b)** quiste de *Vahlkampfia aberdonica*; **c)** quiste de *Adelphamoeba* sp.; **d)** *Vampyrella* sp.; **e)** *Biomyxa vagans*; **f)** *Hartmanella vermiformis*; **g-j)** *Paraflabellula reiniformis*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



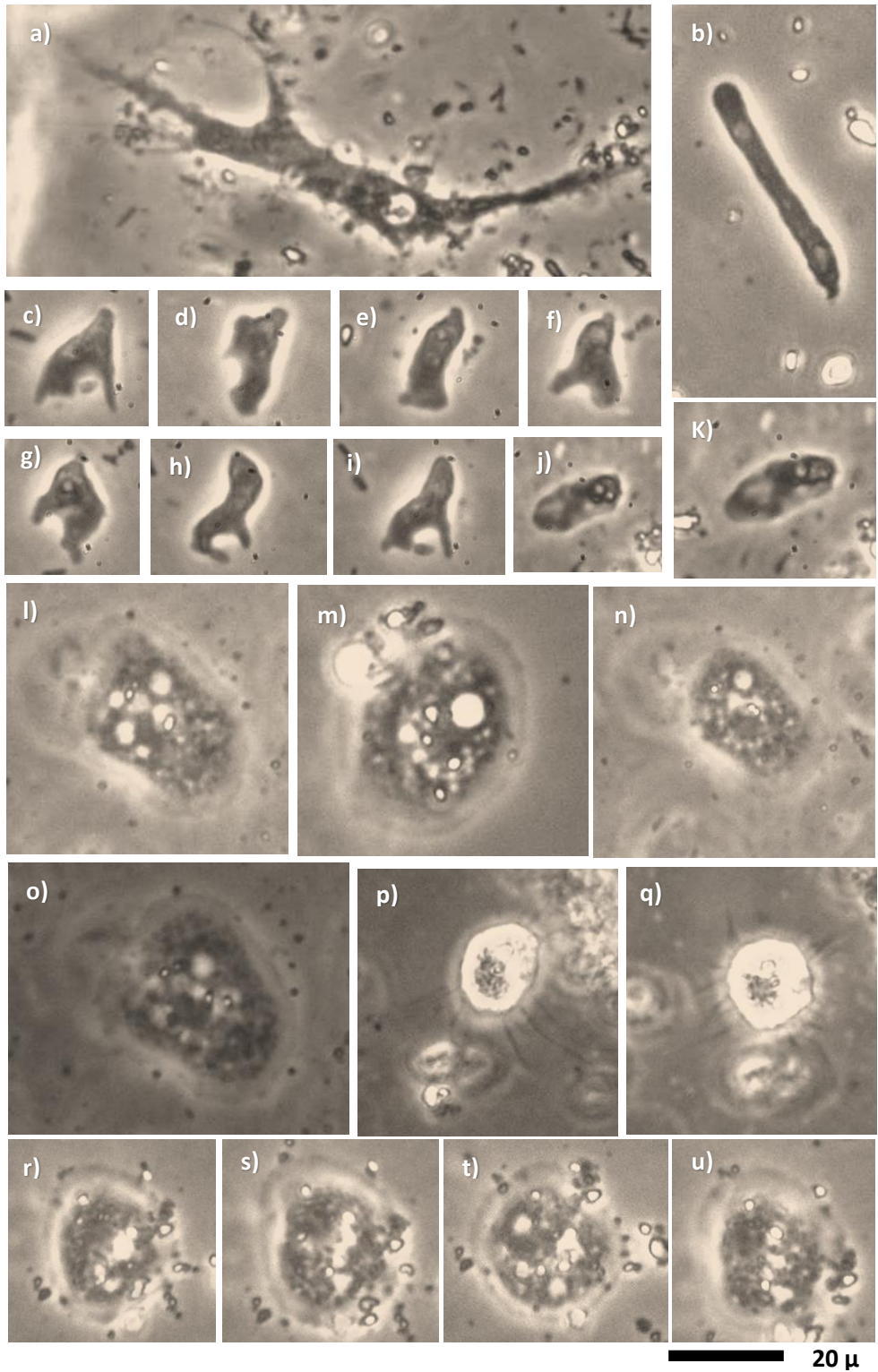
20 μ

Trofozitos de *Paraflabellula kudoi* encontrados en el suelo 24 h después de la exposición al hexano. (Microscopia de contraste de fases, 40X)

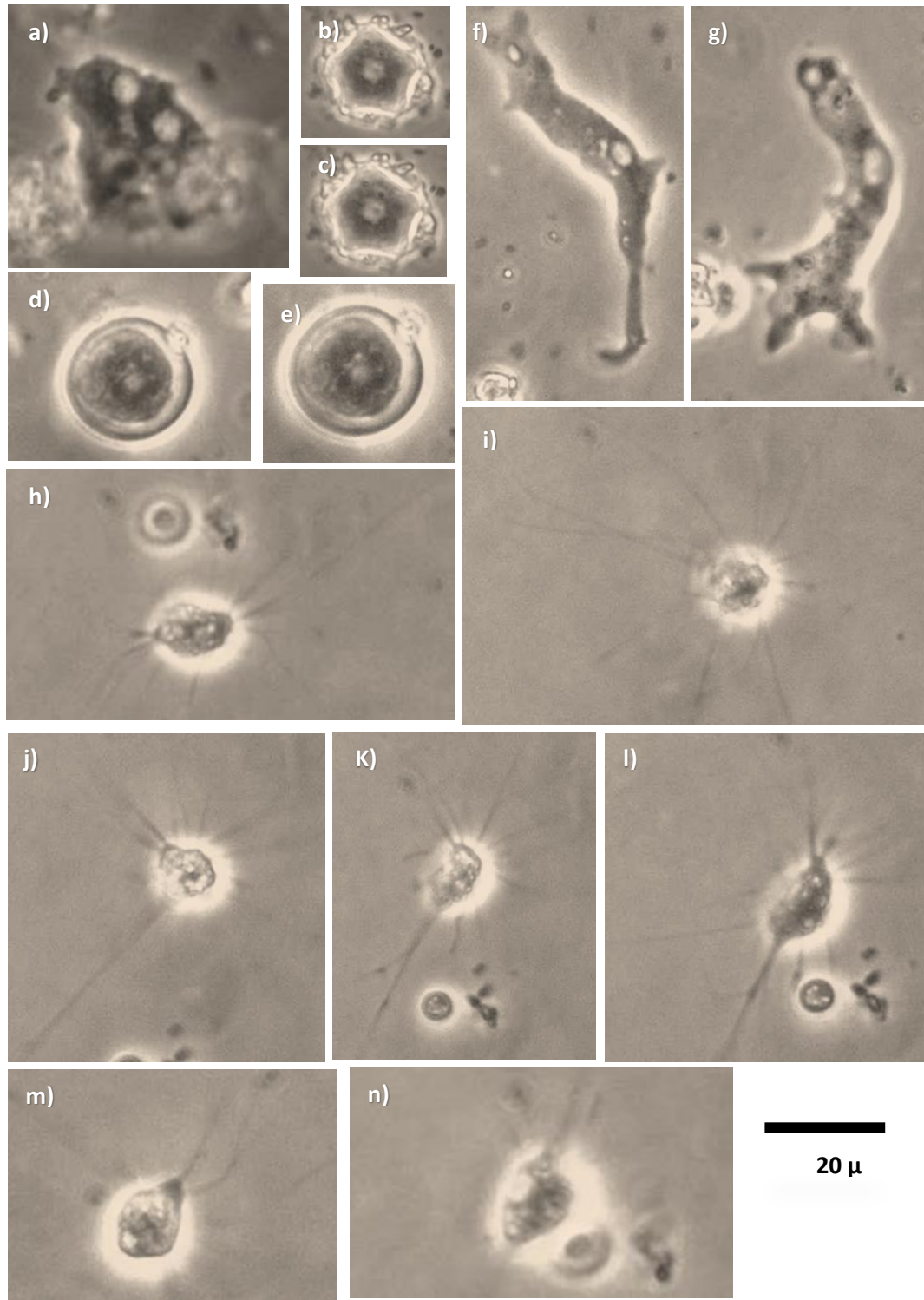


20 μ

Breviata anathema trofozoitos encontrados 24 h después del contacto con el hexano (microcosmos SH0). (Microscopia de contraste de fases, 40X)



Trofozoitos de Amebas localizados en el suelo de los microcosmos SHP30: a) *Biomyxa merdaria*; b) *Hartmanella vermiformis*; c-i) *Mayorella cultura*; j-k) *Mayorella spatula*; l-o) *Cochliopodium actinophorum*; p-q) *Nuclearia simplex*; r-u) *Cochliopodium minus*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)



Quistes y trofozoitos encontrados en el suelo 60 días después del contacto con el hexano de los microcosmos SHP60: a) *Comandonia operculata*; b-c) quistes de *Acanthamoeba griffini*; d-e) quistes de *Vahlkampfia ovis*; f-g) *Oscillosignum proboscidium*; h-n) *Vampyrelidium perforans*. (Microscopia de contraste de fases, 40X)