



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Efecto del petróleo sobre la comunidad de
bacterias fijadoras de nitrógeno”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

CARLOS MANUEL MARTÍNEZ REYES

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, Enero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México. Alma máter, formar parte de ella es como estar en casa.

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza, director de la presente tesis. Gracias por todas esas charlas que siempre encaminaron a la motivación de progresar académicamente y como individuo. Usted alentó esa pasión por los sistemas biológicos.

Al Mtro. Ramón Víctor Moreno Torres, por demostrar que ante cualquier situación hay que dar lo mejor que uno tiene, nunca ser conformista.

Ambos me han enseñado que siempre es posible hacer aquellas cosas que más nos hacen felices y que mejor manera que con un poco de buen humor.

Al comité de sinodales por sus oportunas y precisas observaciones:

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo.

Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar.

Dr. Daniel Jesús Muñoz Iniestra.

DEDICATORIAS.

Llegar a este punto de termino de tesis no hubiera sido posible sin el incondicional apoyo de mis padres Carlos y Laura, Siento una profunda gratitud; sin su confianza, amistad y amor no lograría nada importante. Esta tesis es para ustedes.

A las niñas Martha y Brenda, a quienes siempre he admirado por su sencillez y dedicación, es un orgullo ser su hermano. A mi papá Chico, mamá Martha y mamá Rufina, quienes siempre están al pendiente de que todos sus hijos tengamos lo mejor.

A la pandilla del laboratorio: empezando por las muchachas que hacen que dé más gusto estar metido en ese lab. Laura, Sandra, Candis y Ana. A los camaradas con quienes hemos pasado momentos gratos; Jaime, Jorge, Erick, Cruz, Daniel y Chucho. Junto con los profes, todos son un gran equipo. Creo que no hubo nadie que se salvara de auxiliarme en algo .para la realización de la tesis.

No olvido a los amigos de carrera (larga): Iván, Alí, Nathiely, Víctor y todos los batos locos. Finalmente una dedicación muy especial al eterno equipo; Ivone, Daniela, Itzel, Toño y mí más entrañable amiga Sandra.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. HIPÓTESIS	5
4. OBJETIVOS	6
4.1 Objetivo general	6
4.2 Objetivos particulares	6
5. MATERIAL Y MÉTODO	6
5.1 Colecta de suelo para el microcosmos	6
5.2 Preparación de los microcosmos	7
5.3 Obtención y caracterización de colonias	7
5.4 Análisis físico-químico del suelo	8
5.5 Análisis estadísticos	8
6. RESULTADOS	9
6.1 Riqueza y abundancia total	9
6.2 Descripción macro y microscópica de las colonias de bacterias	10
6.3 Abundancia y riqueza por tiempo	12
6.4 Estructura de la comunidad	15
6.5 Similitud de riqueza y abundancia de UTO	18
6.6 Caracterización de suelo	19
6.6.1 Materia orgánica	19
6.6.2 Nitrato	19
6.6.3 Amonio	20
6.6.4 Fósforo asimilable	21
6.6.5 pH	21
7. DISCUSIÓN	22
8. CONCLUSIÓN	29
9. REFERENCIAS	30
10. ANEXOS	36

1. RESUMEN

El petróleo es una fuente de carbono para las bacterias con un metabolismo capaz de degradar al hidrocarburo a formas más sencillas y/o menos tóxicas, inclusive tienen la capacidad de integrarlo en su biomasa, sin embargo necesitan nitrógeno para hacerlo, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de petróleo crudo sobre la cantidad de unidades formadoras de colonias y las unidades taxonómicas operativas de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo. El diseño experimental en condiciones de microcosmos consistió en cinco tratamientos: control, 4 000 ppm, 8 000ppm, 16 000 ppm, 32 000 ppm de petróleo. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias a los 2, 4 y 8 días en cada tratamiento las cuales también sirvieron para caracterizar las unidades taxonómicas operativas de acuerdo a su morfología colonial y tinción de Gram. Se determinaron 51 UTO de las cuales 12 estuvieron presentes en todos los tratamientos. El índice de Bray-Curtis mostró que el grupo control y el suelo con 4 000 ppm (ambos al día 4) compartieron el 100% de la información, además de mostrar la mayor abundancia de UFC. Mientras que la mayor riqueza de UTO se presentó en las concentraciones de 8 000 y 16 000 ppm. Sin embargo la riqueza y abundancia de todos los tratamientos disminuyó para el octavo día. Se concluyó que el petróleo tiene un efecto negativo en la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno. No obstante la presencia de este tipo de bacterias con capacidad para fijar nitrógeno es muy importante en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

2. INTRODUCCIÓN

El subsuelo y el suelo constituyen un recurso natural que desempeña funciones como medio filtrante durante la recarga de los mantos acuíferos y la protección de los mismos. Es el lugar donde ocurren los ciclos hidrológicos y biogeoquímicos a través de las redes tróficas, además de ser el espacio donde se realizan las actividades agrícolas y ganaderas por ser el soporte de la vegetación (Saval., 1995). Asimismo, conforma el hábitat de bacterias, hongos, levaduras, virus, entre otros, quienes mantienen los sistemas ecológicos, ya que le aportan componentes químicos y minerales (como resultado de la biodegradación) y complejos orgánicos como ácidos húmicos y fúlvicos, enzimas, vitaminas, hormonas y antibióticos; además albergan una rica reserva genética. (Fernández *et al.*, 2006) En la actualidad, como resultado de la explotación de recursos por el hombre, es posible encontrar una gran variedad de compuestos tóxicos en el suelo, como es el caso de los derrames de hidrocarburos en los que destaca principalmente el petróleo. La contaminación con petróleo provoca que se aglutinen las partículas del mismo y se generen estructuras más gruesas que cubren la superficie y el espacio poroso, que a su vez afecta la aireación y la humedad del suelo (Padilla *et al.* 1989). Además el efecto del petróleo tiene repercusiones directas en la comunidad, viendo reflejadas en la abundancia y riqueza de diversas maneras; y esta dependerá de la intensidad y la frecuencia con que se presente, con el tipo y naturaleza del suelo así como el tipo de hidrocarburo (Labud *et al.*, 2007)

En marzo de 2005 se publicó la Norma Oficial Mexicana, con el título de NOM-SEMARNAT/SS-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Cuyos límites se establecen en función de la fracción ligera, media y pesada (Tabla 1).

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo

(NOM-SEMARNAT/SS-2003).

Fracción de hidrocarburos	Uso del suelo predominante (mg/kg ⁻¹ base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

En general la adición de hidrocarburos al suelo aumenta el contenido de materia orgánica, perturbando el balance natural de nutrientes en el sistema, por ende una rápida disminución de otros, como el nitrógeno y el fósforo (Martínez-Prado *et al.* 2011), lo que conlleva una relación excesiva de carbono-nitrógeno de hasta 20:1 (Leahy *et al.*,1990). La consecuencia de lo anterior es la disminución de poblaciones microbianas importantes para la asimilación y reciclado de nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos (Vázquez-Luna *et al.*, 2010), provocando una pérdida en la actividad bioquímica esencial para la función del suelo, induciendo la selectividad y la disminución de la diversidad como la riqueza biológica (Rivera-Cruz *et al.* 2002). No obstante que las comunidades microbianas se acoplan y moldean al tipo de materiales que tienen disponibles (Rodríguez *et al.* 2008, Steinberger *et al.*, 2009), lo que se ve reflejado en la diversidad y abundancia de la comunidad influenciada por un contaminante donde la riqueza disminuye, pero la capacidad de proliferar y aumentar en abundancia de aquellas bacterias tolerantes es mayor. Un ejemplo claro

son los microorganismos que utilizan fracciones de petróleo como fuente de carbono, los cuales pueden degradar al contaminante a formas más sencillas y/o menos tóxicas (Padilla *et al.*, 1989). Tal como Bossert *et al.* (1984) reportaron que los suelos crónicamente contaminados con petróleo crudo son capaces de sostener abundantes poblaciones de bacterias de vida libre fijadoras de N atmosférico.

Por otro lado, gracias a la adición de nitrógeno facilitado por las bacterias diazotróficas (fijadoras de nitrógeno) es posible ajustar dicha relación (C/N). Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son microorganismos que crecen libremente en el suelo y no necesariamente tiene una relación simbiótica con plantas para la fijación. Por ello, este proceso se realiza de manera independiente a ellas (Postgate., 1998; Chapin *et al.* 2002). No obstante que gracias a los exudados de la raíz se incrementa la estimulación de la actividad microbiana (Joner *et al.*, 2003). Por su parte el nitrógeno es uno de los principales constituyentes de las proteínas, ácidos nucleicos y clorofilas (Postgate., 1998), se mueve entre las formas orgánica e inorgánica a través de procesos asociados con la oxidación y reducción de compuestos nitrogenados (nitratos, nitritos, amonio,) y de su captura por las biomásas vegetal, microbiana y animal. El regreso a la atmosfera puede darse en forma NO_2 , NO_3 o dependiendo de la cantidad de O_2 disponible (Chapin *et al.*, 2002). Con excepción de las propias cianobacterias, que son fijadores autótrofos que producen su propio carbono orgánico por fotosíntesis; el resto de los microorganismos fijadores de vida libre son heterótrofos y requieren de una fuente externa de carbono, de materia orgánica, además de condiciones adecuadas de humedad y de tensión de oxígeno para crecer (Postgate., 1998; Chapin *et al.*, 2002). Entiéndase por crecimiento microbiano el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo; lo cual no hace referencia al crecimiento de un único microorganismo (que es denominado ciclo celular), sino al demográfico de una población. Puesto que las poblaciones

de bacterias crecen de forma explosiva acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido (Madigan *et al.*, 2004), es de suma importancia conocer cuales es su desarrollo poblacional para poder potenciar sus efectos benéficos y determinar cuáles son los primeros grupos de bacterias que se establecen en un suelo que ha sufrido una perturbación por algún tipo de hidrocarburo.

La contaminación con petróleo en los suelos de cultivo altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo. Dependiendo de la concentración del contaminante será el efecto en la comunidad de bacterias, y aunque algunas tengan un metabolismo capaz de degradar a los hidrocarburos, necesitan de nitrógeno para hacerlo. Por lo que se plantea la siguiente pregunta: **¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de petróleo crudo sobre las unidades formadoras de colonias y las unidades taxonómicas operativas de bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo?**

3. HIPÓTESIS

Si las diferentes concentraciones de petróleo provocan un efecto selectivo favoreciendo a algunas UTO, entonces la diversidad disminuirá a altas concentraciones, mientras que las abundancias de las UFC se mantendrán constantes

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de petróleo crudo sobre las unidades formadoras de colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo.

4.2 Objetivos particulares

- Caracterizar morfológicamente los grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno mediante las unidades taxonómicas operativas y Tinción Gram
- Determinar la riqueza de Unidades taxonómicas operativas y la abundancia de las unidades formadoras de colonias en el suelo contaminado con diferentes concentraciones de petróleo, además de un grupo control, respecto a los días 2, 4 y 8 después de haber sido sembradas.
- Comparar la riqueza y abundancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno de los diferentes tratamientos.
- Determinar las características del suelo en base a la materia orgánica, pH, fosforo asimilable y nitrógeno mineral.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Colecta de suelo para el microcosmos.

Se realizó un muestreo en zig-zag en un campo de cultivo de Tultitlán, Estado de México; sin antecedente de contaminación por hidrocarburos. En este sitio se tomaron muestras en seis puntos separados por una distancia de un metro. Éstas muestras se tamizaron (abertura de malla de 2mm) y mezclaron para obtener una muestra compuesta.

5.2 Preparación de los microcosmos.

Cada microcosmos consistió de 120 g de suelo seco contenidos en recipientes de polietileno con capacidad de 250 g. La contaminación con petróleo del suelo en los contenedores se realizó con concentraciones de 4000, 8000, 16000 y 32 000 ppm, además de un grupo control libre de contaminante. El petróleo se agregó gradualmente y se homogenizó mecánicamente. Después se humedeció con agua destilada estéril hasta llegar al 50% de capacidad de retención de agua. Se establecieron 5 tipos de microcosmos: uno libre de contaminante y cuatro con las diferentes concentraciones. Posteriormente a la contaminación, los microcosmos se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones de laboratorio. Se llevaron a cabo 4 repeticiones de cada microcosmos, dando un total de 20 microcosmos por día.

5.3 Obtención y caracterización de colonias.

Una vez preparados los microcosmos se establecieron tres tiempos para la obtención de colonias: 2 días, 4 días y 8 días después de haber agregado el petróleo. El muestreo para la obtención de dichas colonias se obtuvo de microcosmos diferentes para cada día.

Se tomó un gramo de suelo por cada microcosmos y se prepararon diluciones de la siguiente manera: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 y 1/1000 000. Se realizaron siembras en cajas de Petri, sobre medio de cultivo Rennie (1981) agregando 0.1 ml de la tercera a la sexta dilución. Posteriormente se determinó el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}) a las 96 horas después de haber realizado dicha siembra. Para el aislamiento y purificación de las cepas se hicieron siembras continuas por estría hasta obtener la presencia de un solo tipo de colonia.

Las unidades taxonómicas operativas fueron caracterizadas por morfología colonial en base a la forma, el tipo de elevación y el borde, además de

tinción de Gram así como las formas básicas (cocos, bacilos y bacterias filamentosas)

5.4 Análisis físico-químico del suelo

Se hizo la caracterización del suelo (al ser únicamente una caracterización del suelo, las muestras fueron tomadas de los tratamientos de un único tiempo) en base a las siguientes propiedades: pH real, el cual se determinó con un potenciómetro usando una solución de 10 g de suelo en 25 ml de agua destilada (Bates 1954. Willart et al 1958). El fósforo asimilable se determinó con la combinación de ácido clorhídrico y el fluoruro de amonio con el objetivo de extraer las formas de fósforo solubles (Bray-kurtz, 1945). El porcentaje de materia orgánica se obtuvo mediante su oxidación provocada por el calor de la reacción de dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico (Walkley-Black, 1947). La extracción de nitrógeno mineral se determinó con una sal de potasio de fuerza iónica alta para remover NH_4 , NO_2 y NO_3 del suelo

5.5 Análisis estadísticos.

Para analizar la similitud de tratamientos y entre tratamientos se utilizó el índice de similitud de Sørensen.

La similitud de la riqueza de unidades taxonómicas operativas y su frecuencia entre los tratamientos se determinó mediante la prueba de Ji-cuadrada.

Para determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos respecto al tiempo se utilizó Análisis de Varianza ($\alpha < 0.05$) y finalmente se utilizó la prueba post hoc de Tukey para conocer cual o cuales medias eran diferentes

6. RESULTADOS

6.1 Riqueza y abundancia total

Se determinaron en total 51 unidades taxonómicas operativas basadas en las características morfológicas de cada una de las colonias, así como en base al tipo de pared de las bacterias (cuadro 1). Los tratamientos con mayor riqueza (31 UTO) fueron los suelos con 8 000 ppm y 16 000 ppm de petróleo, mientras que el suelo con 32 000 presentó el menor número de UTO (27). Todos los tratamientos tuvieron 12 UTO en común, aunque en cada tratamiento dominó una cepa diferente. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas $\alpha = 0.05$ de la riqueza de UTO entre tratamientos a lo largo del experimento, (figura 1).

Por otro lado, el suelo Control presentó el mayor número de Unidades formadoras de colonias totales (100 millones por ml) seguido del suelo con 4 000 ppm de petróleo (35 millones/ml), mientras que el suelo con 8 000 ppm presentó el menor número de UFC (7 millones /ml), (figura 2). Ninguno de los tratamientos fue significativamente diferente ($P \leq 0.01$).

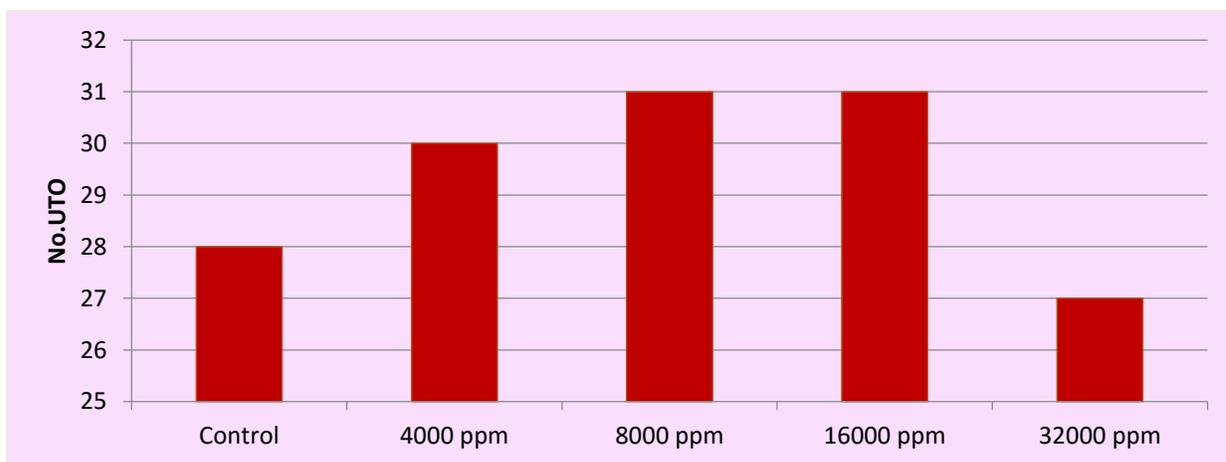


Figura 1. Número de unidades taxonómicas operativas de cada tratamiento a lo largo del experimento.

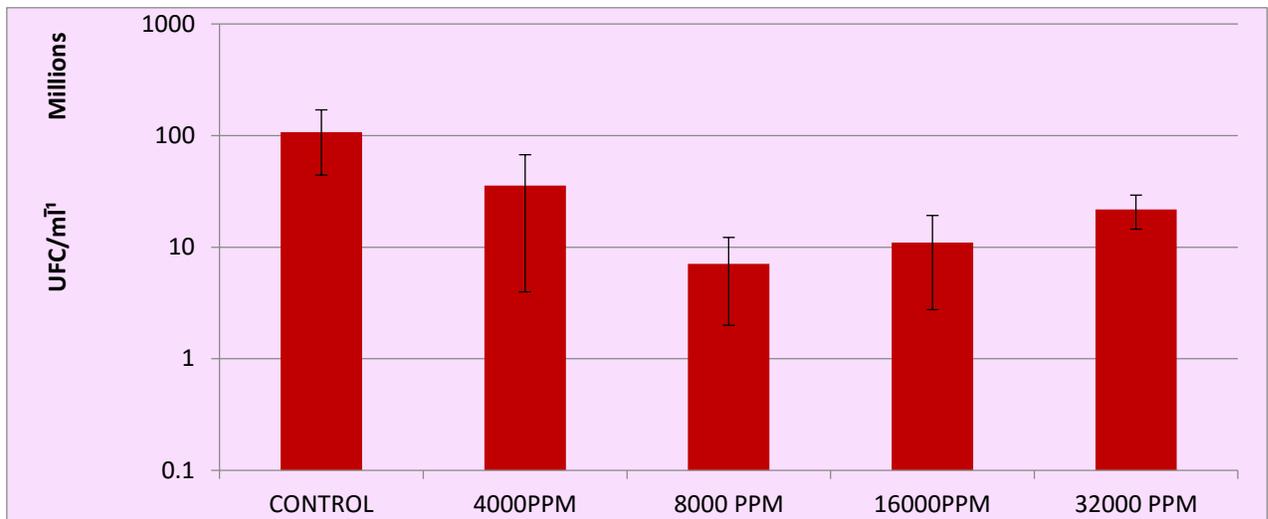


Figura 2. Número de unidades formadoras de colonias de cada tratamiento, n=4.

6.2 Descripción macro y microscópica de las colonias de bacterias

Se presentaron todas las formas básicas de las colonias bacterianas, desde las formas redondas (cocos agrupados y cocos aislados), formas bacilares, hasta las filamentosas. A las colonias se les realizó la tinción de Gram, con la que se diferenciaron tres grupos: bacterias filamentosas Gram indefinidas, bacterias Gram - y bacterias Gram + (figuras 3 a 5)

La abundancia de las bacterias de estos grupos no mostraron diferencias significativas en general ($p \leq 0.05$), sobre todo entre los tratamientos dentro del mismo periodo de tiempo. Solamente en el grupo control al día 2 y 8 las bacterias filamentosas y Gram - presentaron diferencias significativas, también las bacterias Gram - en el grupo de 8 000 ppm en el mismo periodo de tiempo (Tukey, $p \leq 0.05$) (figura 3 y 5).

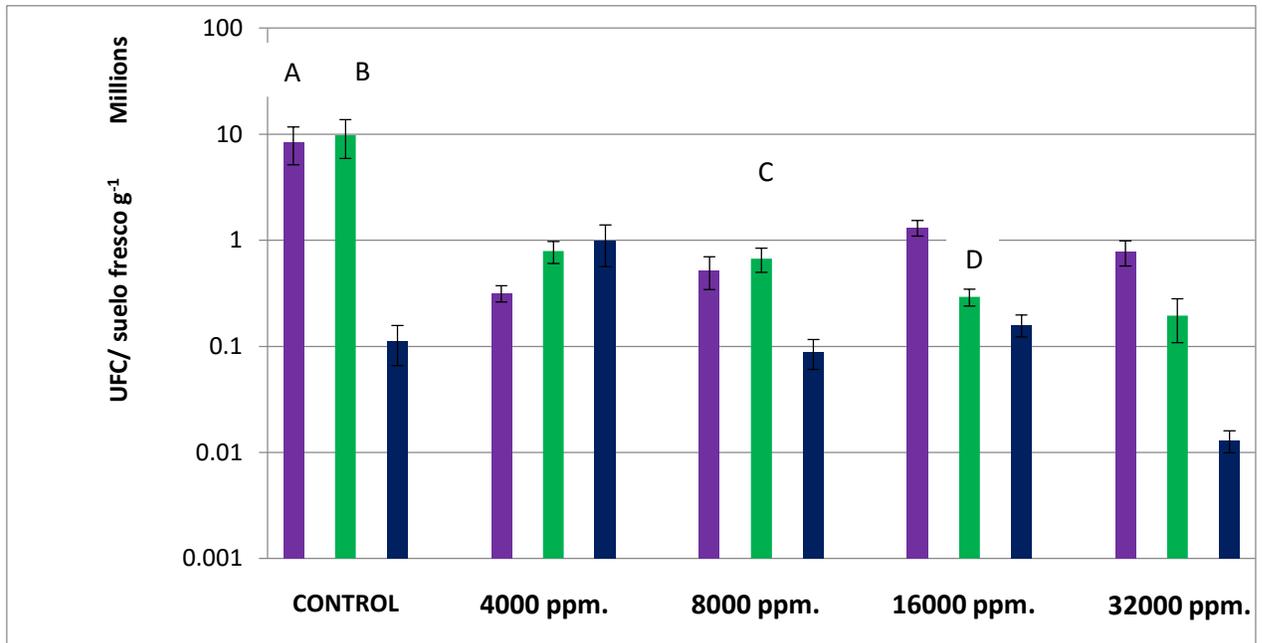


Figura 3. DIA 2: Unidades formadoras de colonias en 1 gramo de suelo fresco, n=4. Se toma en cuenta las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-6} Columnas de color Verde indican bacterias Gram-, las Azules bacterias Gram + y las morados bacterias Filamentosas. Columnas con letra indican bacterias con diferencia significativa en un tiempo posterior ($P \leq 0.01$)

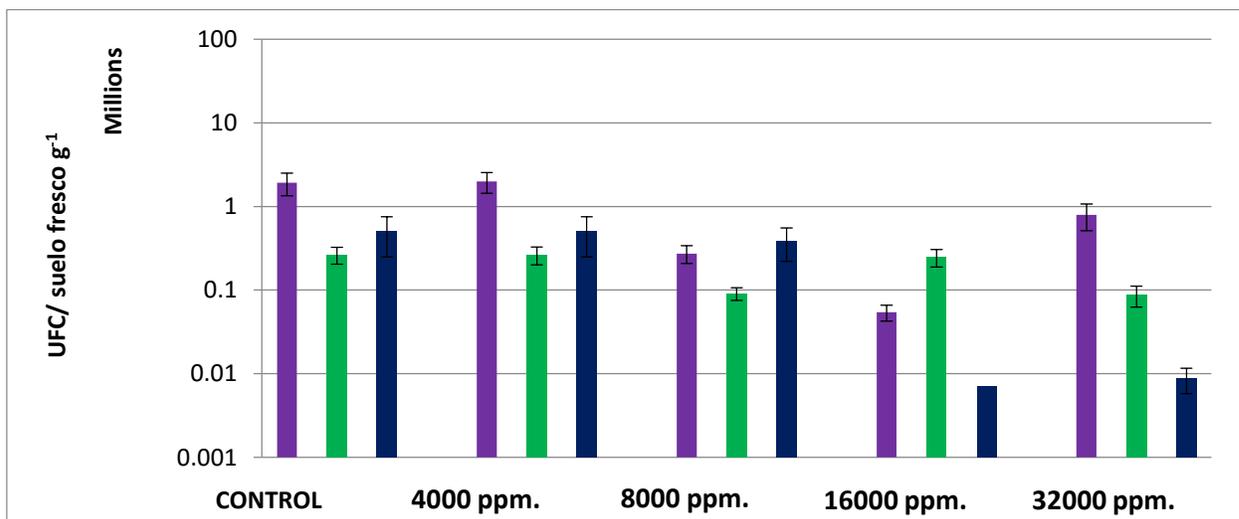


Figura 4. DIA 4: Unidades formadoras de colonias en 1 gramo de suelo fresco, n=4. Se toma en cuenta las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-6} Columnas de color Verde indican

bacterias Gram -, las Azules bacterias Gram + y las morados bacterias Filamentosas. Ninguna bacteria tuvo diferencia significativa

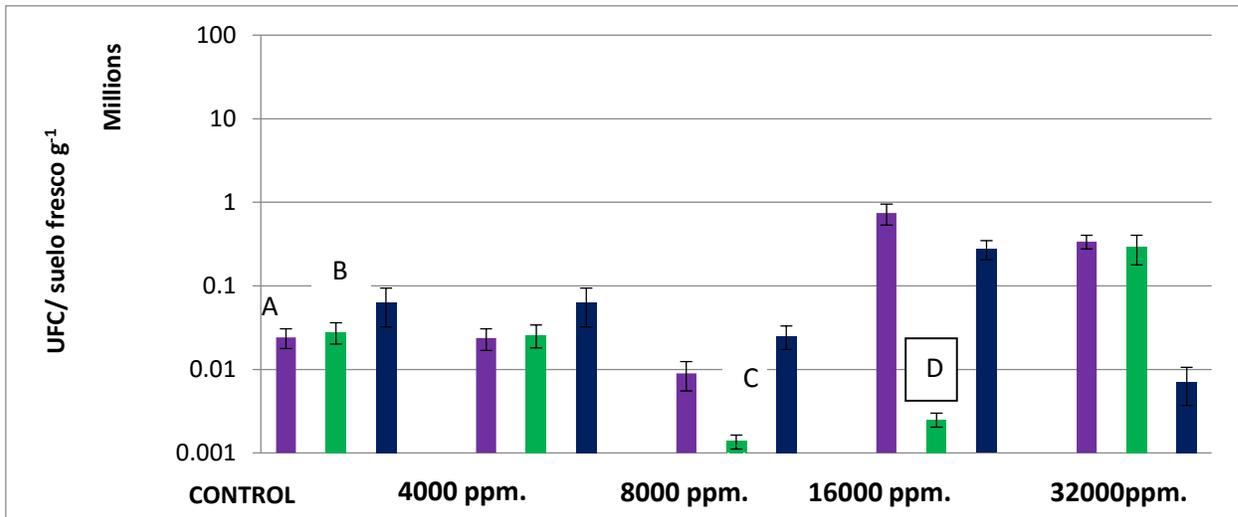


Figura 5. DIA 8: Unidades formadoras de colonias en 1 gramo de suelo fresco, n=4. Se toma en cuenta las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-6} . Columnas de color Verde indican bacterias Gram -, las Azules bacterias Gram + y las morados bacterias Filamentosas. Columnas con letra indican bacterias con diferencia significativa ($P \leq 0.01$)

6.3 Abundancia y riqueza por tiempo

Las abundancias totales disminuyeron gradualmente del 2° al 8° día, excepto en los tratamientos de 4 000 y 16 000 ppm. En la primera concentración se observó un incremento de las abundancias en el 4° día y un descenso pronunciado en el 8°; mientras que en la segunda mostró un descenso pronunciado al 4° día y un incremento al 8° día.

Cabe resaltar que el grupo control en el día 2 mostró la mayor cantidad de UFC, estando por encima de todos los suelos con contaminante. (Figura 2)

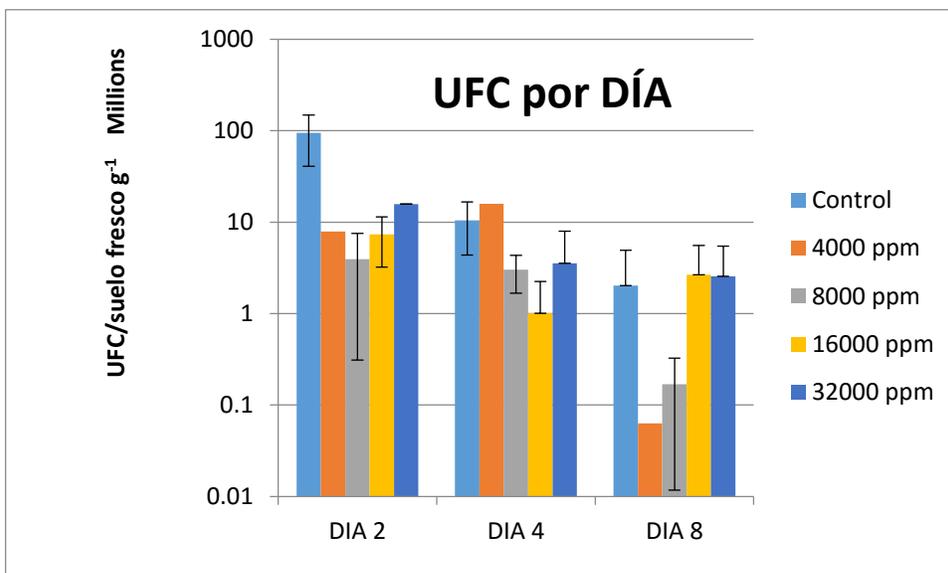


Figura 6. Cambio en la Cantidad total de UFC en cada tratamiento con respecto al tiempo, n=4.

El tratamiento con 16 000 ppm de petróleo al 2º día tuvo la mayor cantidad de UTO (21) seguido de un descenso pronunciado para el 4º y 8º día, mientras que el suelo con 32 000 ppm en el mismo día presentó la menor cantidad (11) seguido de un aumento en los días posteriores. A diferencia de lo anterior en el tratamiento con 4000 ppm se observó disminución en el número de UTO al incrementar el tiempo. El grupo control y el tratamiento con 8 000 ppm de petróleo presentaron fluctuaciones en el número de UTO durante los tres tiempos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con relación a la riqueza de especies entre los tratamientos respecto a cada día (chi- cuadrada, $\alpha=0.5$) (Figura 6).

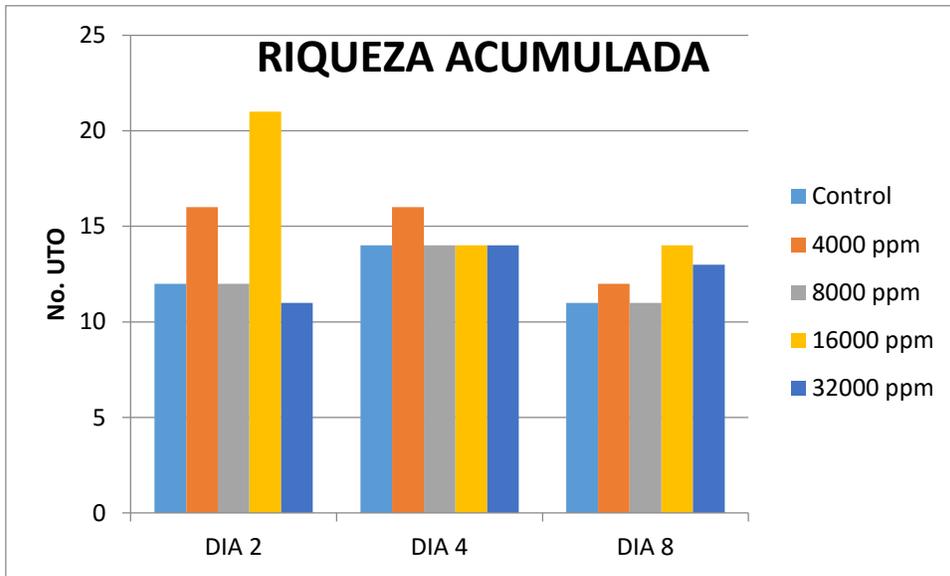
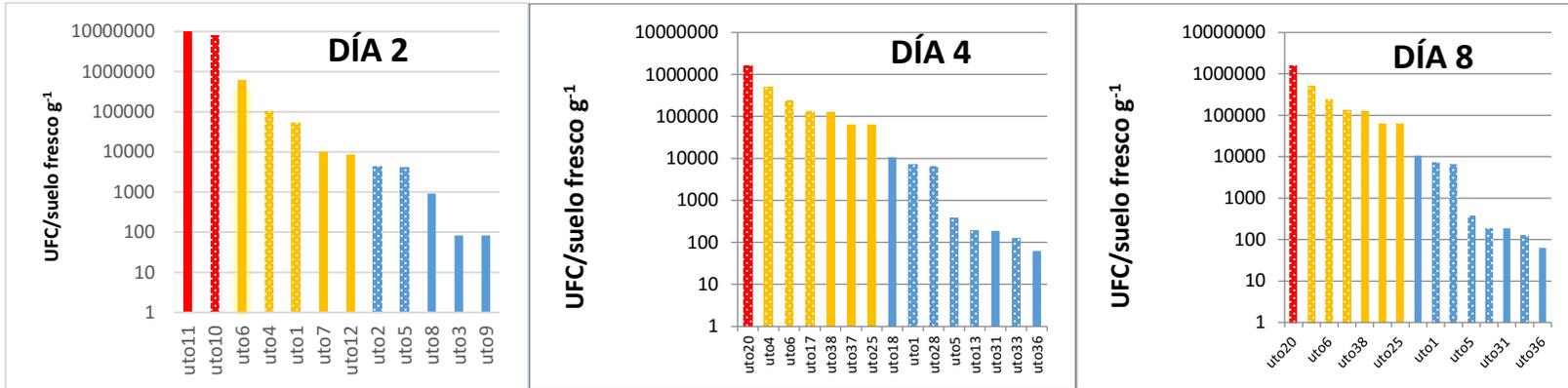
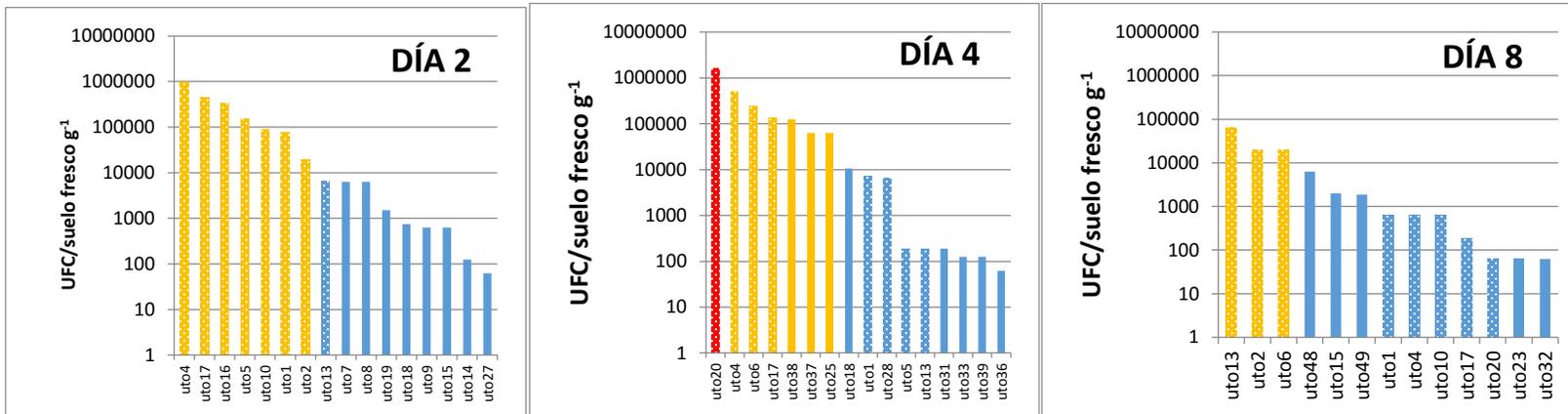


Figura 7. Riqueza total de UTO de cada tratamiento en un tiempo determinado

6.4 Estructura de la comunidad CONTROL

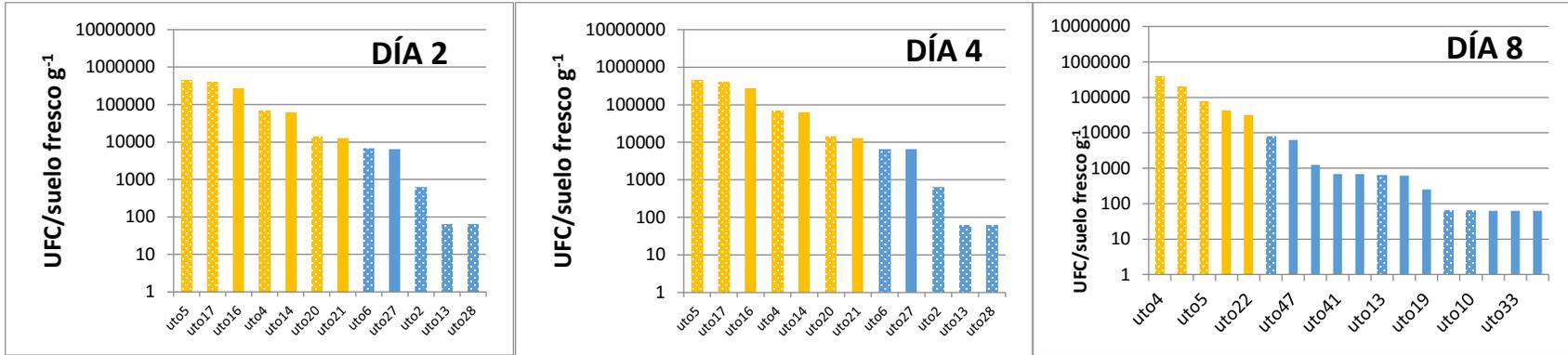


4 000 ppm

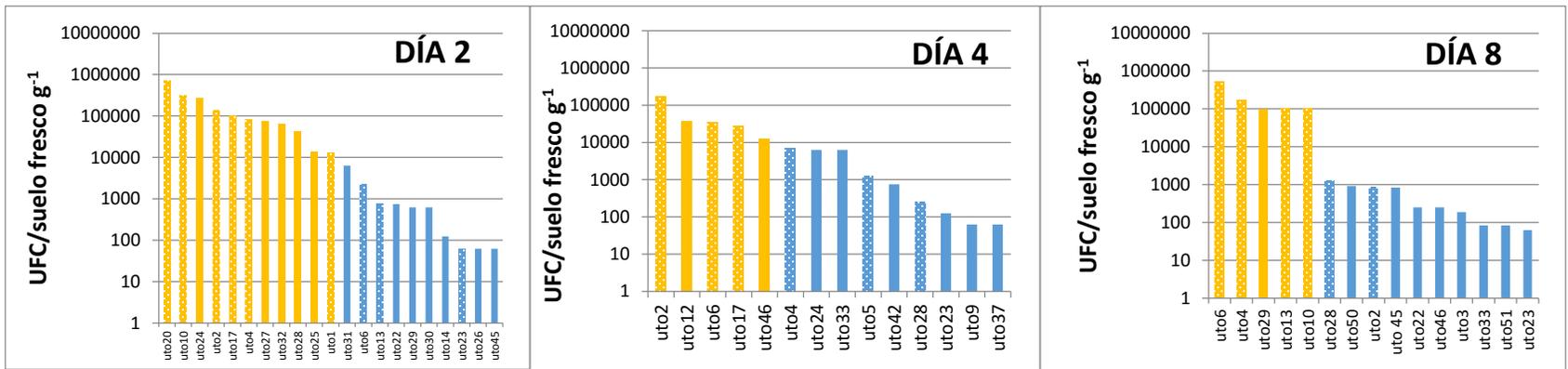


Continúa figura

8 000 ppm



16 000 ppm



Continúa figura

32 000 ppm

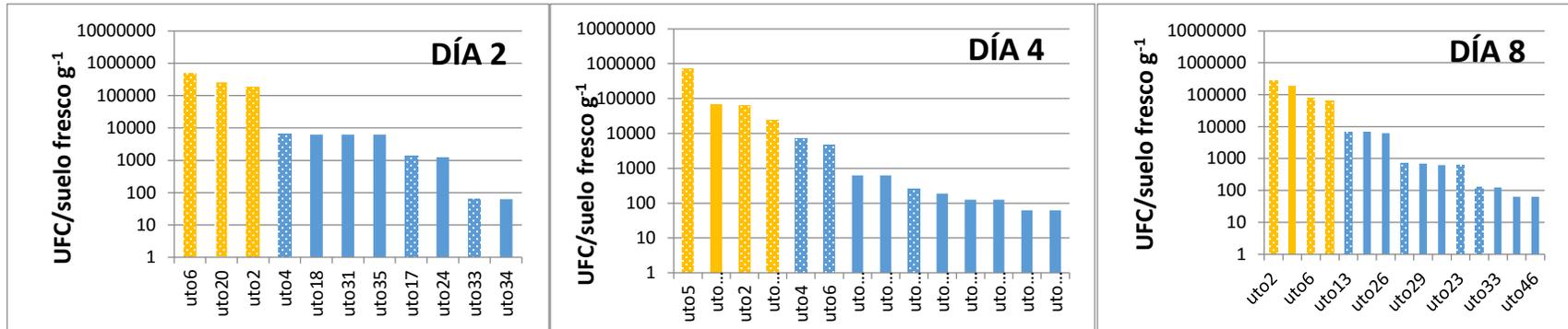


Figura 8. Frecuencia de las unidades taxonómicas operativas por grupo. Las barras rojas indican UTOs dominantes, las barras amarillas indican UTOs comunes y las barras azules UTOs raras. Barras con trama señalan a las 12 UTOs que aparecieron en todos los grupos en al menos uno de los tres periodos de tiempo.

El grupo control en el día 2 y 4, y el tratamiento de 4000 ppm al día 4, fueron los únicos en mostrar UTO dominantes; en todos los demás grupos la comunidad se estructuró en UTO comunes y raras. Hubo 12 UTO en común en todos los tratamientos incluido el grupo control, las cuales aun cuando difieran en su categoría (dominantes comunes y raras) siempre estuvieron dentro de las más abundantes dentro su grupo.

6.5 Similitud de riqueza y abundancia de UTO.

El análisis de similitud de Sørensen, mostró la formación de 4 grupos dentro del margen de 51% de similitud, donde se destaca que el suelo control y el suelo con 4 000 ppm (ambos grupos al día 4) comparten 100% de información y a su vez ambos comparten alrededor del 80% de la misma con el suelo de 16 000 ppm al día 2. Por otro lado, el tratamiento con 16 000 ppm en el día 8 y el tratamiento con 32 000 ppm en el día 2 se asemejan en un 93%. Estos últimos tratamientos (16 000 32 000 ppm) se asemejan en un 87 % pero esta vez al día 4 y 8 respectivamente.

Los tratamientos con 4 000 ppm y 8 000 ppm ambos al día 2 comparten el 94% de similitud, mientras que en un 98% lo hacen el grupo control y el tratamiento de 4000 ppm ambos al día 8.

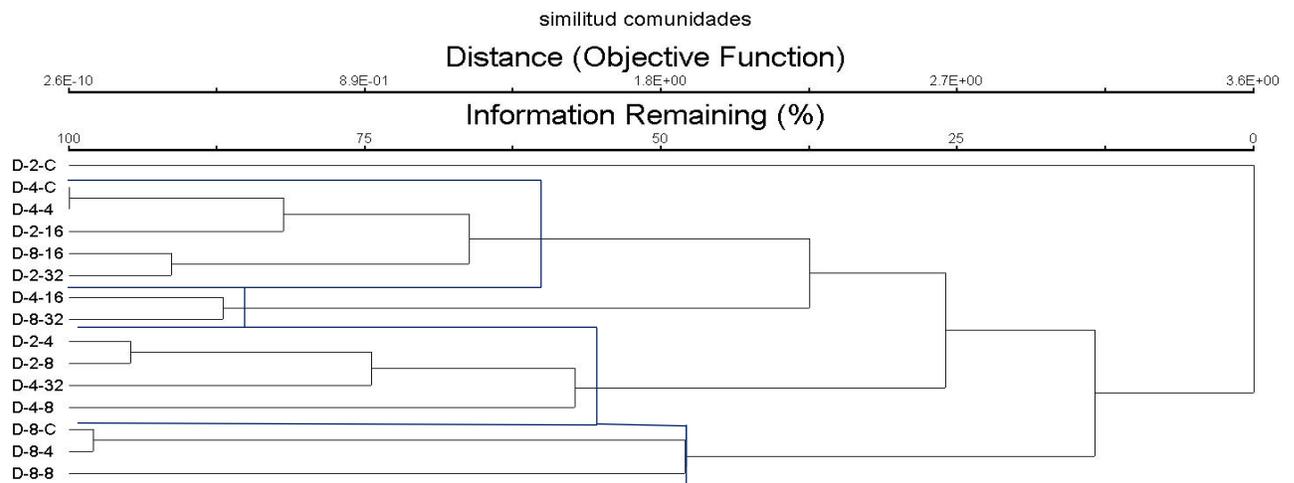


Figura 9. Dendrograma de la riqueza de UTOs entre los diferentes tratamientos. Se abrevia como D, tiempo en días (días 2,4 y 8), seguido del número al que corresponde cada tratamiento (4000, 8000, 16000 y 32000 ppm

6.6 Caracterización de suelo.

6.6.1 Materia orgánica.

Los porcentajes de MO en todos los tratamientos, incluido el grupo control, se situaron en la categoría de rico. El contenido de materia orgánica incrementó directamente proporcional al aumentar la cantidad de petróleo en los tratamientos; siendo el grupo control el que tuvo el menor porcentaje de materia orgánica.

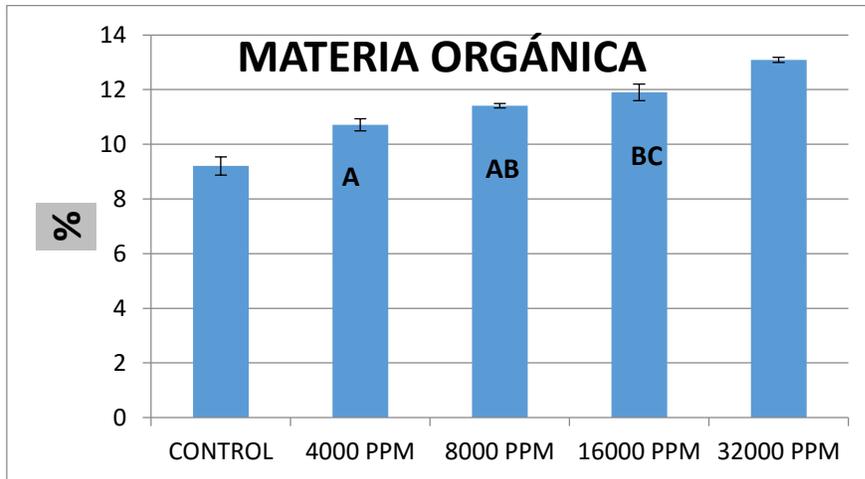


Figura 10. Porcentaje de materia orgánica. Columnas que comparte una letra NO presentan diferencias significativas, n=4

6.6.2 Nitrato

La concentración de nitratos fue catalogada como muy alta. Los tratamientos con 8 000 ppm y 16 000 ppm tuvieron los valores más altos, sin embargo no hubo diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (ANOVA $\alpha=0.05$, $p>0.01$)

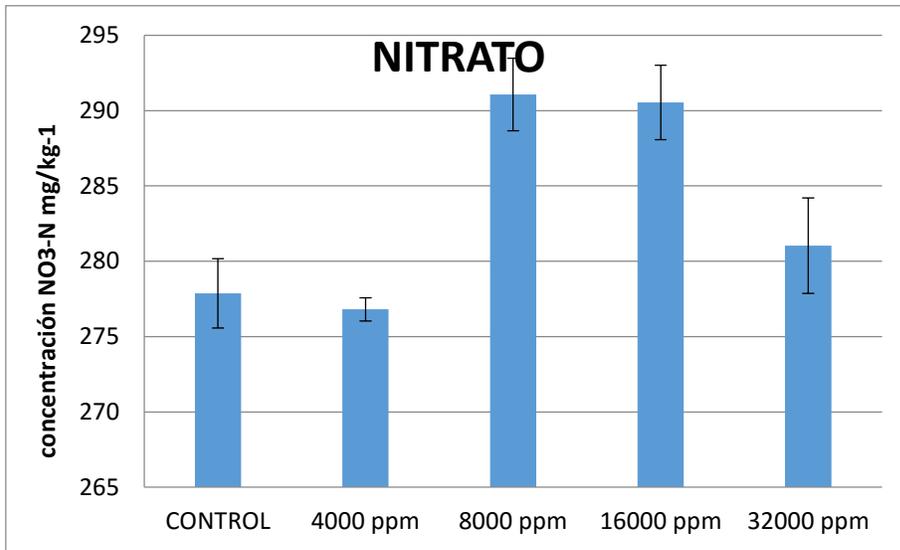


Figura 11. Concentración de Nitrato mg/kg⁻¹. N=4

6.6.3 Amonio

La concentración de amonio fue catalogada como muy baja. El grupo control seguido del tratamiento con 16 000 ppm tuvieron los niveles más altos de NH₄. Ningún tratamiento presentó diferencias significativas (ANOVA $\alpha=0.05$, $p>0.01$).

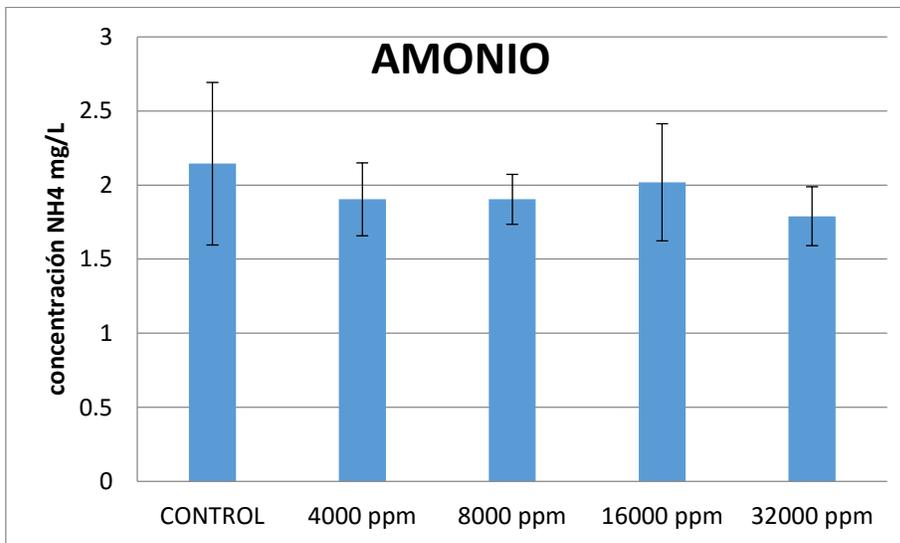


Figura 12. Concentración de Amonio mg/L⁻¹. N=4

6.6.4 Fósforo asimilable

Los niveles de fósforo en el grupo control solo estuvieron por debajo del tratamiento con 4 000 ppm de petróleo, ambos tratamientos tuvieron niveles medios de fósforo. A partir de estos tratamientos los niveles decayeron directamente proporcional al incrementar la cantidad de petróleo, por lo que los tratamientos con 8 000 ppm, 16 000 ppm y 32 000 ppm presentaron niveles pobres de ortofosfatos.

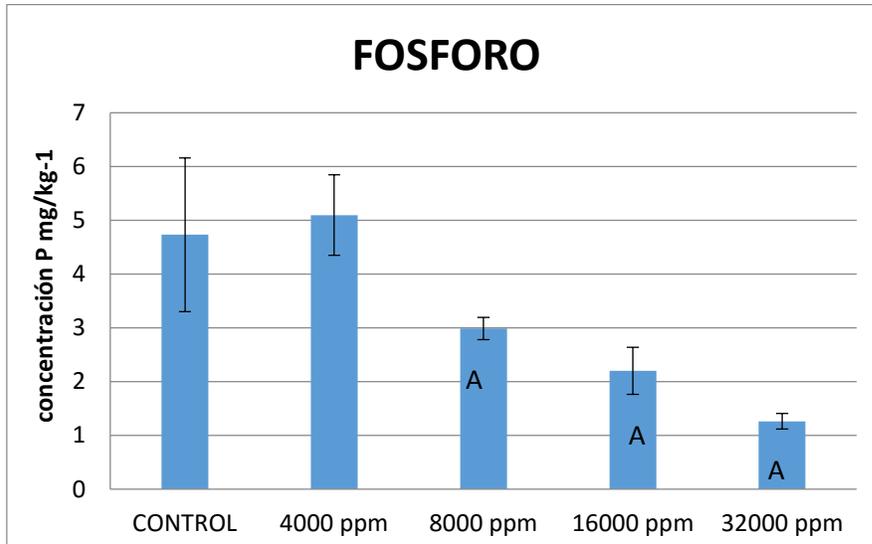


Figura 13. Fosforo asimilable. Columnas que comparten una letra NO presentan diferencias significativas, n=4.

6.6.5 pH.

EL pH se mantuvo en un rango de 6.8 a 7.1 entre los tratamientos, por lo que se encuentra en la categoría de neutro. El valor más bajo corresponde al tratamiento con 8 000 ppm y el más alto al de 32 000 ppm. No hubo diferencia significativa en ninguno de los tratamientos (ANOVA $\alpha=0.05$, $p>0.01$)

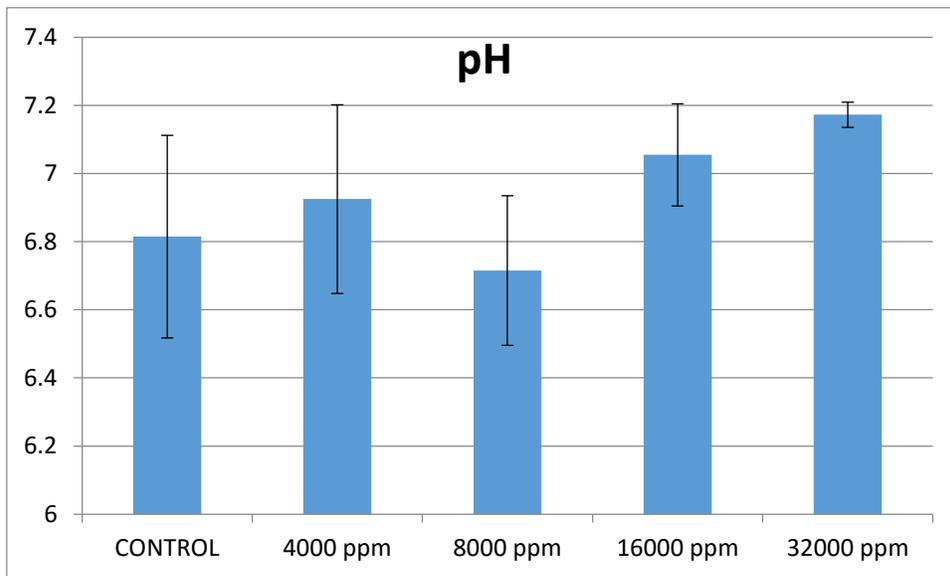


Figura 14. Niveles de pH, n=4.

7. DISCUSIÓN

La presencia de hidrocarburos induce la selectividad y la disminución de la diversidad (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). Por ello en el presente estudio, se determinó la respuesta de la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno ante el efecto de diferentes concentraciones de petróleo. La respuesta de la riqueza de las UTO tiende a formar una campana; ya que hubo una mayor riqueza en las concentraciones intermedias de petróleo, pero presentaron las abundancias más bajas (figura 1 y 2). Esto es debido a que en las concentraciones de 8 000 y 16 000 ppm (intermedias) posiblemente existe una mayor variedad de recursos disponibles pero también son escasos, contrario a la concentración de 32 000 ppm donde la cantidad de petróleo es abundante como recurso pero a su vez limita la variedad y disponibilidad de otros recursos; por lo que en este grupo, el primer impacto del petróleo fue ocasionar una baja diversidad y un ligero aumento en días posteriores. Por otro lado, cabe señalar que el grupo control es un suelo libre de planta. Debido a esto la falta de exudados

vegetales provoca una baja diversidad, ya que la gama de moléculas proporcionadas por las raíces atrae una mayor variedad de tipos bacterianos aún en los suelos contaminados con hidrocarburos (Walton *et al.* 1994); por ello, en el grupo control se observó la abundancia más alta pero con una de la riqueza más baja estando solo por encima del tratamiento con 32 000 ppm. Debido a esto no se encontraron diferencias significativas en el número total de UTO de cada tratamiento, como tampoco entre los tres tiempos (ji- cuadrada, $\alpha=0.5$). Por otro lado el efecto del petróleo fue menor en el grupo con la concentración de 4000 ppm, ya que se puede observar una confluencia entre una riqueza alta y abundancia alta, siendo el segundo tratamiento con mayor número de UFC y el segundo con mayor riqueza de UTO, esto se debe a que hubo mayor número de bacterias sobrevivientes a la dosis más baja de petróleo las cuales tenían una mayor capacidad para reproducirse.

Sin embargo, en la mayoría de los grupos hubo un descenso gradual en el número de UFC, excepto los tratamientos de 4 000 y 16 000 ppm quienes presentaron fluctuaciones a través de los tres tiempos, no obstante que para el octavo día al igual que los demás grupos también se registró su menor abundancia, lo que indica que el petróleo aún en concentraciones diferentes tiene efecto negativo sobre la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno, contrariamente a lo que Vázquez-Luna (2011) observó en un suelo después de 9 días de ser contaminado con diferentes concentraciones de petróleo (siendo la más alta de 40 000 ppm), que las abundancias de bacterias fijadoras de nitrógeno tuvieron un incremento exponencial significativo ($P \leq 0.01$), dos o tres veces más abundante que el grupo control, no obstante que al igual que este experimento la diversidad también fue menor en la concentración más alta de petróleo.

A pesar de que los cambios en la comunidad de bacterias inducidos por las concentraciones de petróleo y el tiempo, no fueron los suficientes como para generar una diferencia estadísticamente significativa en la abundancia y la

riqueza, por lo que se deduce que la comunidad observada bajo estas condiciones de periodos cortos de tiempo, aumento progresivo de la cantidad de petróleo y ser un suelo con fines agrícolas, el proceso de recuperación de la comunidad bacteriana se está llevando a cabo.

Así mismo, las altas abundancias pero con baja riqueza en el grupo control y en los tratamientos con la mayor concentración de petróleo coinciden con otros trabajos que mencionan que las comunidades microbianas tienden a responder a los hidrocarburos, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son eliminados (Frois-Duarte *et al.*, 2001). En cuanto a los muestreos realizados en los tres tiempos, las abundancias de todos los tratamientos disminuyeron al finalizar el experimento. Este mismo fenómeno lo reportó Hernández *et al.* (2003) quien observó que la cantidad de UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre de un suelo, igualmente a diferentes concentraciones de petróleo, disminuyó considerablemente en el último día de muestreo.

Por otro parte, las fracciones de petróleo se alojan como gotas en los poros del suelo además de que pueden ser adsorbidas por la materia orgánica y la arcilla (Fine *et al.*, 1997) sobre todo los aromáticos polinucleares (Mueller *et al.*, 1996), por ello, lógicamente los niveles del porcentaje de materia orgánica tendieron a incrementar conforme aumenta la concentración de petróleo. Además, el petróleo al estar compuesto de aproximadamente 85 % de carbono, cuando es puesto en contacto con el suelo puede causar la inmovilización de nutrientes esenciales, especialmente nitrógeno y fósforo (Issoufi *et al.*, 2006), lo que por un lado explica la disminución de la concentración de fósforo al aumentar los niveles de petróleo, no obstante que el tratamiento con 4 000 ppm presentó ligeramente mayor concentración de fósforo que el grupo control y por otro lado las concentraciones de amonio y nitrato (que son las fracciones minerales predominantes de nitrógeno) fueron mayores en el

grupo control y el grupo con 8000 ppm respectivamente, pero al contrastar los niveles de nitratos con la abundancia (figura 2 y 6) es posible observar que los niveles más bajos de nitratos se presentaron en aquellos grupos donde hubo mayor abundancia de bacterias y viceversa lo que indica que sí existe una menor concentración de nitrato es debido a que hay un mayor número de microorganismos que están aprovechando dicho recurso. La concentración de nitrato en el suelo sin contaminar coincide con lo reportado en otro suelo de cultivo del Estado de México (Rivera-Espinoza *et al.*, 2003). Por su parte el nitrato al igual que el amonio es la forma de nitrógeno mejor asimilado por las plantas y por los microorganismos. (Rivera-Espinoza *et al.* 2003), por lo que las concentraciones de amonio en general fueron catalogadas como muy bajas. Finalmente, los niveles de pH fueron catalogados como neutros, lo necesario para un suelo de cultivo como lo es grupo control, además de que se observó que el pH fue mayor a concentraciones altas de petróleo; lo que difiere con lo propuesto por Li *et al.* (1997) y Riser-Roberts (1998) quienes mencionan que el petróleo disminuye el pH.

Como se ha venido mencionando, los resultados del presente estudio indican que la diversidad se vio afectada negativamente en la concentración más alta puesto que registró el menor número de UTO, solo un taxón por debajo del grupo control. Mientras que la mayor abundancia se registró en estos mismos grupos (control y 32 000 ppm) al igual que el grupo con la concentración más baja (4 000 ppm). Lo anterior refleja la existencia de UTOs sensibles y tolerantes a la intensidad y tiempo de exposición al petróleo, ejemplo de ello son las 12 UTOs que comparten los cinco grupos, las cuales en algunos casos se mantuvieron con la mayor abundancia de acuerdo al tipo de concentración y tiempo, además de aquellas cepas que solo fueron registradas en el grupo control o en concentración de petróleo específica. Esto concuerda con estudios que demuestran que los sistemas edáficos contiene un amplio espectro de tipos microbianos, algunos sumamente sensibles y otros resistentes a

diferentes tipos de contaminantes (Shiet *et al.*, 2002). Así mismo, el petróleo al entrar en contacto con el suelo, provoca en los microorganismos una reducción en su actividad (como una reacción inicial) debido a la menor disponibilidad de aire y por consiguiente la destrucción de bacterias, dejando así las cepas microbianas resistentes y adaptables a proliferar (ODU, 1981). Razón por la cual, las 12 UTO que aparecen en los cinco grupos, se consideran cepas especializadas, tolerantes y degradadoras de petróleo, con capacidad de multiplicarse en suelos con concentraciones altas de petróleo (Atlas *et al.*, 1991) y al estar posiblemente utilizando el petróleo como fuente de carbono y energía han desarrollado un alto potencial genético como para ser utilizadas en la degradación de hidrocarburos (Vázquez-Luna., 2011).

En la frecuencia, se reconoció una clara prevalencia de UTO comunes y raras, no obstante que dentro de sistemas desequilibrados existe una dominancia de ciertas especies que perciben de manera positiva los efectos causados por un factor de perturbación. Dichos efectos se hacen evidentes por el impacto directo hacia las especies dominantes (McGill *et al.*, 2007), como lo demostraron las UTO 11, 10 y 20 (únicas dominantes) en donde la primera registró la mayor abundancia en todo el experimento, sin embargo únicamente fue observada en el grupo control al día 2, por lo que es considerada como una UTO sumamente sensible a la perturbación y a la falta de nutrientes. Por su parte la UTO 10 no mostró un patrón de aparición continuo, ya que después de ser registrada como dominante en el grupo control al día 2, pasa a ser una UTO común en los tratamientos con 4 000 ppm y 16 000 ppm, mientras que en el cuarto día solo se tiene un registro de ella pero como UTO rara y para el octavo día vuelve a ser común pero esta vez en los tratamientos con 16 000 y 32 000 ppm. De igual manera la UTO 20 no mostró un patrón continuo de frecuencia, ya que en el primer muestreo fue registrada como UTO común en los tratamientos con 8 000, 16 000 y 32 000 ppm es decir en los grupos con las concentraciones más elevadas, siendo una de las de mayor abundancia

dentro de estos grupo. Pero para el cuarto día de exposición se registró como UTO dominante en el grupo control y en el tratamiento con la concentración más baja, no teniéndose registro en las concentraciones subsecuentes. Y finalmente en el octavo día dentro de los mismos grupos (control y 4 000 ppm) pasa de ser dominante a rara no habiendo registro de ella en las siguientes concentraciones. Si bien estas dos últimas UTO (10 y 20) estuvieron presentes a lo largo de todo el experimento, cada una se vio favorecida dependiendo el nivel de intensidad del agente perturbador y el tiempo de exposición. Otra cuestión a resaltar es la proporción de UTO dominantes, comunes y raras; donde en el día 2, a partir del grupo control hasta el tratamiento con 16 000 ppm el número de UTO raras fue igual o menor a la cantidad de UTO dominantes (sea el caso donde se haya registrado) junto con las comunes, mientras que en el tratamiento con 32 000 ppm las UTO raras se vieron favorecidas en número. A excepción de este grupo quien mantuvo la prevalencia de las UTO raras en los tres tiempos, en los demás grupos incluyendo el control se observó que la proporción de UTO raras respecto a las comunes fue incrementando gradualmente a través del tiempo. Este tipo de distribución donde se ven favorecidas las especies raras, algunas comunes y en menor número las dominantes se dan en comunidades pertenecientes a ecosistemas estables (Preston, 1981; McGill *et al.*, 2007), por lo que es probable que el sistema haya adquirido una nueva forma de equilibrio y considerando que el efecto del petróleo fue medido en periodos cortos de tiempo puede dar indicio de la rápida adaptación de los microorganismos.

Se caracterizó un total de 51 UTOS cuya identidad está basada en su morfología colonial y tinción de Gram, con lo cual se pudieron diferenciar en bacterias filamentosas Gram indefinidas, bacterias Gram + y bacterias Gram -. Las bacterias filamentosas se caracterizan por su amplia gama de hábitats, ser activos en la descomposición de materiales orgánicos del suelo, incluyendo la lignina y otros polímeros recalcitrantes (McCarthy,

1987), además de poseer la habilidad de la degradación de hidrocarburos y utilizar el petróleo crudo como fuente de carbono y energía (Essien, 2000). Por ello se puede explicar que en este estudio las bacterias filamentosas Gram variable fueran en su mayoría las más abundantes en los tratamientos con las concentraciones más altas. Al analizar el grupo control se observa que las bacterias filamentosas junto con las bacterias Gram - al día dos son similares en número de UTOs, además de que registraron la mayor abundancia en los cinco grupos y en los tres tiempos, mientras que las bacterias Gram + muestran un crecimiento retrasado ya que inician como las menos abundantes pero para el día 4 aumentan en número, sin embargo al igual que los otros dos tipos de bacterias en el día 8 desciende su abundancia. Esto se debió a que al tratarse del grupo control, carece de petróleo; además de ser suelo desnudo, hay pocos recursos disponibles para estar metabolizando, lo que conlleva una disminución en la abundancia de la comunidad.

En el caso particular de la baja abundancia de bacterias Gram positivas respecto a las Gram negativas expuestas a las concentraciones más altas, puede deberse a la complejidad de la pared celular de las bacterias Gram negativas que podría obstaculizar la penetración de ciertas sustancias y su entrada al citoplasma, tal es el caso de las porinas que se encuentran en la pared celular de este tipo de bacterias que ayudan en la absorción de ciertas sustancias por la célula o la extrusión de otras que pueden ser perjudiciales (Singleton., 1997). Como lo demostró Ezeet *al.*, 2013 que en un suelo contaminado a diferentes concentraciones de petróleo hubo una preponderancia de las bacterias Gram negativas sobre las Gram positivas, acrecentándose la diferencia al aumentar la concentración de petróleo.

En el análisis de similitud (figura 4) se observa la formación de cuatro grupos, en los cuales las comunidades se empalman en parejas con una similitud mayor al 75%, esto se debe a que dichas parejas son de tratamientos con las concentraciones de petróleo más próximas y en un lapso de tiempo contiguo o igual, lo que hace que no existan grandes

cambios entre comunidades. Ejemplo de ello es el grupo control y el tratamiento con 4 000 ppm ambos al día 8 quienes comparten más de 95 % de información. Sin embargo También las parejas se agrupan con otras con más del doble de petróleo, como es el caso del grupo control y la concentración de 4000 ppm quienes comparten 100% de similitud (forman una pareja) y a su vez tienen cerca del 65% de similitud con los tratamientos con 16 000 ppm y 32 000 ppm (forman una pareja). Lo anterior se debe a que el grupo control y el grupo con 32 000 ppm registraron el menor número de UTOs y también ambos presentaron la mayor abundancia a lo largo del experimento.

8. CONCLUSIÓN

El petróleo tiene un efecto deletéreo en la comunidad de bacterias fijadoras de nitrógeno que se percibe a concentraciones de 8 000 y 16 000 ppm. Sin embargo la abundancia y riqueza de UTOs en todos los tratamientos disminuyó después de ocho días, aún en el grupo control. Por otro lado, los suelos con y sin petróleo presentaron bacterias en común, las cuales juegan un rol importante en la restructuración de la comunidad ya que se presume tienen la capacidad de aportar nitrógeno disponible al suelo.

9. REFERENCIAS

- ❖ Atlas M. R., Horowitz, A., Krichevly M., Bej, K. A. (1991). Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiological Ecology*. 22: 249-256.
- ❖ Baker K.H., D.S. Herson. (1994). *Bioremediation*. McGraw-Hill, New York.
- ❖ Bossert I. y R. Bartha (1984). The fate of petroleum in soil ecosystem. p. 435-473. In *Petroleum Microbiology*, ed. by Atlas, Macmillan, New York, U.S.A.
- ❖ Chapin III S.F., P.A. Matson H.A. Mooney. (2002). *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer- Verlag, New York. 436 pp.
- ❖ Eze C. N., Ogbonna J. C., Anyanwu C. U. and Eze E. A. 2013. Determination of the relative abundance and distribution of bacteria and fungi in Bonny light crude oil-contaminated sandy loam soil. *Academic Journals, Scientific Research and Essays*, 8(9): 375-381.
- ❖ Fernandez C., Linares L. *Manual De Técnicas De Análisis De Suelos Aplicadas a La Remediación De Sitios Contaminados*. México: Instituto Mexicano Del Petróleo, 2006.
- ❖ Fine, P., E.R. Graber y B. Yaron. (1997). Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. *SoilTech*. 10: 133-153.

- ❖ Freedman B. (1989). *Environmental Ecology: The Impacts of Pollution and other Stresses on Ecosystem Structure and Function*. Academic Press, Inc. San Diego, California. USA.
- ❖ Frois-Duarte G., Soares-Rosado A., Seldin L., de Araujo W y van Elsas J. D. (2001). Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1052- 1062
- ❖ Issoufi I., R. L. Rhykerd and K. D. Smiciklas. (2006). Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *Journal of Agronomy and Crop Science* 192: 310-317.
- ❖ Joner E., Leyval C. (2003). Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza, *Environmental Science and Technology* 37:2371-2375.
- ❖ Labud V., García C., Hernández T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a Sandy and clay soil, *Chemosphere* 66: 1863-1871.
- ❖ Leahy J.G., Colwell R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological reviews* 54: 305-315.
- ❖ Li X., Feng Y. y Sawatsky N. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils: plant growth. *Plant Soil* 192: 219-226.
- ❖ “Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación”. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Diario Oficial de la Federación el 3 de mayo de 2013.
- ❖ Madigan M., Martinko J., Jack P., Brock D., Rodríguez F., Sánchez, P. (2004). *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, - 1011 pages.
- ❖ Martínez P.A., Pérez-López M.E., Pinto-Espinoza J., Gurrola-Nevárez B.E., Osorio-Rodríguez A.L. (2011). *Biorremediación de suelo*

contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes *Revista. Int. Contam. Ambie*, 27(3), 241-252.

- ❖ McCarthy A. J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 46:145-163.
- ❖ McGill B. J., Etienne R.S., Gray, J.S., Alonso D., Anderson M.J., Benecha H.K., Dornelas M., Enquist B., Gree J.L., He F., Hulbert A.H., Magurran A.E., Marquet P.A., Maurer B.A., Ostling A., Soykan C.U., Ugland K.I., y White E.P. (2007). Species abundance distributions: moving beyond single prediction theories to integration within an ecological framework. *Ecology Letters*. 10:995-1015.
- ❖ Mueller J.G., C.E. Cerniglia y P.H. Pritchard. (1996). Biodegradation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. pp. 125-194. In: Crawford, R.L. y D.L. Crawford (eds.). *Bioremediation principles and applications*. Biotechnology Research Series 6. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- ❖ Muñoz-Iniestra D.J., Mendoza C.A., López G.F., Soler A.A., Hernández M.M. (2012). *Edafología, Manual de métodos de análisis del suelo*, UNAM FES iztacala pp.41-45.
- ❖ Odu CTI. (1981). Degradation and weathering of crude oil under tropical condition. In: *Proceeding of an International Seminar on the Petroleum Industry and the Nigerian Environment*. November 1981, Petroleum Training Institute, Warri, Nigeria
- ❖ Padilla R.M. (1989). *Determinación de los Niveles de Hidrocarburos en Sedimentos Recientes del Río Calzadas en la Región del Bajo Río Coatzacoalcos, Veracruz. México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 48p.
- ❖ Postgate J. (1998). *Nitrigenfixation*. 3era. ed. Cambridge University Press. Great Britain.

- ❖ Preston F.W. (1981). Pseudo-Lognormal Distribution. *Ecology* 62:2, 355-364.
- ❖ Riser-Roberts E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, Physical and Chemical Processes. Lewis Publishers. Boca Raton, FL.
- ❖ Rivera-Cruz M. del C, R. Ferrera-Cerrato, V. Volke H., R. Rodríguez V., y L. Fernández L. (2002). Población microbiana en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36: 149-160
- ❖ Rivera-Espinoza Y., Dendooven L. (2003). Dynamics of carbón, nitrogen an hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended whit biosolids and maize , *Chemosphere* 54:379-386.
- ❖ Rennie R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylenereducing(dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J Microbiol.* 27: 8-14
- ❖ Rodríguez Zaragoza, S., González-Ruiz T., González-Lozano E., Lozada-Rojas, A., EinavMayslish-Gati and Steinberger Y. (2008). Vertical Distribution of a soil microbial community as affected by plant ecophysiological adaptation in a desert ecosystem. *EuropeanJournal of SoilScience*, 44: 373 - 380
- ❖ Saval B.S. (1995). *Acciones para le Remediación de Suelos en México*. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.

- ❖ Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopka A. (2002). Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 21:169-177
- ❖ Singleton P. (1997). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, John Wiley and Sons, New York (4th ed.). pp. 19-20.
- ❖ Steinberger Y., Shamir, I., Pen-Muratov, S., and Rodríguez-Zaragoza, S. (2009). Seasonal effect of three desert halophytes on soil microbial functional diversity. *Microbial Ecology*
- ❖ Vázquez-Luna M., Montiel, F. A., Vázquez, L.D., H, Tenorio., M, F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13 (3): 511-523
- ❖ Vázquez D., M. Castelán-Estrada., M.C., Rivera-Cruz., A.I. Ortiz-Ceballos., R.F. Izquierdo. (2010). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26(3): 183-191.
- ❖ Walton B.T., A.M. Hoylman., M.M. Perez., T.A. Anderson., T.R. Johnson., E.A. Guthrie., R.F. Christman. (1994). Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. In: T.A. Anderson y J.R. Coast (eds.). *Bioremediation through rhizosphere technology*. American Chemical Society. Washington, DC. 82-92pp.
- ❖ Walton B.T., Hoylman A.M., Perez M.M., Anderson T.A., Johons T.R., Guthrie E.A., Christman R.F., (1994). Rhizosphere microbial

communities as a plant defense against toxic substances in soils, Biorremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington DC pp 82-92

- ❖ White R.E. (1997). Principles and practice of soil science, The Soil as a Natural Resource. USA: Blackwell Science

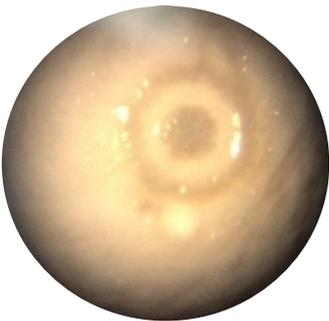
10. ANEXOS



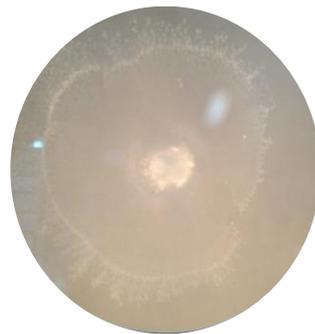
UTO24



UTO1



UTO4



UTO21



UTO13

Morfologías microscópicas.

No. UTO	FORMA	ELEVACIÓN	BORDE	COLOR	GRAM +	GRAM -	FORMA
5	Filamentosa	Elevada	Filamentoso	Blanco calcáreo		X	Filamentos
6	Circular	Elevada	Entero	Blanco homogéneo		X	Filamentos
15	Circular	Convexa	Entero	Blanco homogéneo		X	Filamentos
18	Rizoide	Pulvinada	Filamentoso	Blanco calcáreo	X		
19	Filamentosa	Convexa	Filamentoso	Blanco		X	
20	Circular	Pulvinada	Crenado	Gris, incrustada.		X	Filamentos
22	Circular	Elevada	Crenado	Amarillo intenso	X		
25	Circular	Plana	Lobulado	Traslucido		X	Filamentos
29	Puntiforme	Pulvinada	Entero	Blanco calcáreo	X		
30	Circular	Elevada	Entero	Blanco calcáreo	X		Filamentos
32	Rizoide	Elevada	Filamentoso	Traslucido	X		
37	Filamentosa	Elevada	Filamentoso	Blanco calcáreo	X		Filamentos
39	Circular	Plana	Lobulado	Traslucido		X	
42	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Traslucido, mucoso	X		
45	Circular	Convexa	Lobulado	borde café	X		Filamentos
46	Circular	Convexa	entero	Blanco calcáreo	X		
49	Circular	Plana	Entero	Traslucido	X		Filamentos
23	Circular	Plana	Entero	Traslucido			filamentos
10	Ameboide	elevada	ondulado	Gris			Bacilo
1	Filamentosa	Elevada	Filamentoso	Blanco calcáreo	X		Filamentos
14	Ameboide	Plana	Lobulada	Traslucido		X	
48	Circular	Plana	Entero	traslucido		x	
24	Circular	Plana	Enrollado	traslucido		x	Filamentos
2	circular	Plana	Entero	Transparente		X	Cocos
9	Filamentosa	Plana	Filamentosa	Traslucido, colonia grande		X	Bacilo
11	circular	Elevada	Entero	Gris Homogéneo		X	Bacilo
17	Ameboide	Plana	Lobulado	traslucido, gris		X	Bacilo
26	circular	Elevada	Entero	Gris, con tipo membrana		X	Cocos
31	circular	Plana	Entero	Traslucido		X	Cocos
36	circular	Convexa	Entero	Borde verde, centro translucido		X	Cocos
38	circular	Plana	Entero	Traslucido		X	Cocos

33	circular	Plana	Ondulado	Traslucido		X	Cocos
16	circular	Elevada	Entero	Gris		X	bacilo
28	circular	Convexa	Entero	Rosa, cremosa		X	Bacilo
12	circular	Elevada	Entero	Amarillo opaco		X	Bacilo
47	circular	Plana	Entero	Traslucido con franjas en borde		X	Cocos
41	circular	Plana	Entero	traslucido, borde incompleto		X	Cocos
3	Circular	Plana	Entero	Blanco	X		Bacilo
4	Circular	Convexa	Entero	traslucido, mucosa	X		Cocos
7	Circular	Plana	Entero	traslucido, centro opaco	X		Cocos
13	Circular	Convexa	Entero	Durazno	X		Bacilo
21	Circular	Plana	Enrollado	traslucido, mucosa	X		Bacilo
27	Filamentosa	Plana	Filamentoso	Traslucido	X		Cocos
34	Puntiforme	Plana	borde indefinido	Traslucido	X		Cocos
35	Puntiforme	Plana	Ondulado	traslucido, centro opaco	X		Cocos
40	Filamentosa	Plana	Entero	Gris, mucosa	X		Bacilo
43	Circular	Pulvinada	Ondulado	Blanco, translucido	X		Bacilo
44	Circular	Convexa	Entero	Traslucido	X		Cocos
50	Circular	Convexa	Entero	centro opaco, borde translucido	X		Cocos
51	Circular	Convexa	Ondulado	Borde mucoso, centro opaco	X		Cocos

Cuadro 1. Descripción y clasificación de las colonias de bacterias totales cultivadas en medio Rennie (1981).

MEDIO DE CULTIVO CARBON COMBINADO (RENNIE, 1981)	
Solución A	g
K ₂ HPO ₄	0.8 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl ₂	0.1 g
NaFeEDTA	0.028 g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.025 g
Extracto de levadura	0.025 g
Manitol	5 g

Sacarosa	5 g
Lactato de Sodio (60% v/v)	0.5 ml
Agua destilada	900 ml
Solucion B	
MgSO ₄ +7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.06 g
Agua destilada	100 ml
pH	7
Agar	15 g

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

Materiales.

- Muestra de suelo seco y cernido a través de un tamiz de malla de No 10.
- Frasco de 50 ml
- Agitador
- Agua destilada y buffers

Método.

- Pesar 10 g de suelo.
- Colocarlo en el frasco de 50 ml.
- Agregar 25 ml de agua destilada.
- Agitar 30 minutos y dejar reposar 30 minutos.
- Ajustar el potenciómetro con la solución Buffer.
- Tomar de lectura de pH con el potenciómetro.

CATEGORÍA	VALOR
Extremadamente ácido	Menor 4.5
Muy fuertemente ácido	4.6-5.1
Fuertemente ácido	5.2-5.6
Moderadamente ácido	5.7-6.1
Ligeramente ácido	6.2-6.6
Nuetro	6.7-7.4
Ligeramente alcalino	7.5-7.9
Moderadamente alcalino	8.8-8.4

Fuertemente alcalino	8.5-8.9
Muy fuertemente alcalino	Mayor 9.1

CUANTIFICACIÓN DE MATERIA ORGANICA (Muñoz-Iniestra *et al* , 2012)

Materiales.

- Muestra de suelo seco y cernido a través de un tamiz de malla No.10
- Solucion de dicromato de potasio 1N. Pesar exactamente 49.04 g de dicromato de potasio ($K_2CR_2O_7$), disolver en agua destilada y aforar a 1L.
- Solución de sulfato ferroso 0.5 N. Pesar 139 g de sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$) y disolver en 500 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- Solución indicadora de difenilamina. Pesar 0.5g de difenilamina y disolver en 200 ml de agua destilada y 100 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).

Método.

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

Interpretación del método.

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

Donde: 5= ml de dicromato de potasio agregados.

N= normalidad del sulfato ferroso

F.C.= Factor de corrección

0.69= Constante.

El factor de corrección se obtiene de la siguiente manera:

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

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

FÒSFERO ASIMILABLE (Bray-Kurtz, 1945)

Materiales

- Muestra de suelo seco y cernido a través de un tamiz con número de malla 10
- Balanza semianalítica.
- Papel filtro.
- Embudo de plástico.
- Vasos de precipitados de 100 ml.
- Vasos de precipitados de 150.
- Pipetas de 10ml.
- Pipetas de 5 ml.
- Espectrofotómetro.
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Gradilla.
- Papel abosorbente.
- Piceta con agua bidestilada.

Nota: para llevar acabo esta determinación deberá usarse material de vidrio Pyrex o gena neutros y guardar el agua y los reactivos en frascos neutros o de Nalgene. Deberá utilizarse agua libre de fósforo, ya sea bidestilada o desmineralizada. Es recomendable

vaciar el agua del garrafón a envases de Nalgene neutros. Previamente a la realización de esta técnica, todo el material que se utilice para preparar los reactivos y para realizar los análisis deberá dejarse por lo menos 5 minutos en mezcla crómica y después enjuagar todo con agua bidestilada.

- MEZCLA CRÓMICA: pesar 100 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y disolver en un litro de agua de destilada. Calentar hasta la completa disolución del reactivo. Dejar enfriar la solución y agregar gota a gota 100 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- SOLUCIÓN MADRE DE FLUORURO DE AMONIO 1 N: pesar 37 g de fluoruro de amonio (NH_4F), disolver en agua destilada y aforar a 1 L. Guardar en un recipiente de polipropileno.
- ÁCIDO CLORHÍDRICO 0.5N: diluir 20.2 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta completar un volumen de 500 ml de agua destilada.
- SOLUCIÓN EXTRACTORA: Agregar 460 ml de agua destilada a 15 ml de solución madre de fluoruro de amonio y 25 ml de solución de ácido clorhídrico 0.5 N. Esto nos da una solución 0.03 N de fluoruro de amonio y 0.025 N de ácido clorhídrico. La solución final debe de ser almacenada en un recipiente de polipropileno perfectamente tapado y de esta forma se conserva hasta un año.
- SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO 10 N: Disolver 404 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl) hasta completar un volumen de 500 ml con agua destilada.
- SOLUCIÓN DE MOLIBDATO DE AMONIO-ÁCIDO CLORHÍDRICO: Pesar 15 g de molibdato de amonio tetrahidratado ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) y disolver en 350 ml de agua destilada. Añadir lentamente y con agitación constante 300 ml de ácido clorhídrico 10N. Enfriar a temperatura ambiente y aforar a 1 L con agua destilada. Mezclar bien y guardar en frascos ámbar de tapón esmerilado. Esta solución debe ser preparada cada dos meses.
- SOLUCIÓN MADRE DE CLORURO ESTAÑOSO: Pesar 5 g de cloruro estañoso dihidratado ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) y disolver 12.5 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl). Calentar a baño maría hasta que se disuelva bien. Guardar en frascos ámbar con tapón esmerilado en el refrigerador y de esta manera se conserva 6 semanas máximo.

- SOLUCIÓN DE CLORURO ESTAÑOSO DILUIDA: agregar 33 ml de agua destilada a 0.1 ml de solución madre cloruro estañoso, esta solución debe ser preparada cada cuatro horas.
- SOLUCIÓN TIPO FOSFATO (100mg/ml): pesar 0.4389 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) Disolver en agua destilada y aforar a 1 L. Un ml de esta solución contiene 100 ppm fósforo
- Agua destilada o desmineralizada.

Procedimiento:

Pesar 1g de suelo y colocarlo en un embudo con papel filtro.

Agregar 7 ml de solución extractora y agitar 1 minuto. Si queda turbio volver a filtrar de nuevo hasta que quede transparente.

Tomar 1 ml del filtrado, agregar 6 ml de agua destilada y 2 ml de la solución de molibdato de amonio y mezclar bien.

Calentar el espectrofotómetro durante 15 minutos y calibrarlo con el blanco al 100 % de transmitancia a una longitud de onda de 640 nm. Cada vez que se lea una muestra el aparato se debe calibrar.

Agregar 1 ml de la solución de cloruro estañoso diluida y nuevamente mezclar.

Pasados 10 minutos leer la absorbancia en el espectrofotómetro. Todas las lecturas deberán terminarse antes de 20 minutos.

Cada vez que se lea un lote de muestras realizar un blanco de la siguiente manera: medir 2 ml de la solución extractora y colocarlos en la cubeta del espectrofotómetro, agregar 5 ml de agua destilada y 2 ml de solución de molibdato de amonio, mezclar bien y agregar 1 ml de la solución de cloruro estañoso, finalmente mezclar otra vez.

Para construir la curva patrón hacer las diluciones correspondientes de la solución tipo fosfato llevando el volumen a 100 ml, considerar las siguientes proporciones:

CONCENTRACIÓN (ppm)	ml DE SOLUCIÓN TIPO FOSFATOS
10	10
9	9
8	8
7	7
6	6
5	5
4	4

3	3
2	2
1	1

Construir la curva patrón como sigue: colocar 1 ml de cada una de las diluciones (ppm) de la solución tipo de fosfato en los tubos del espectrofotómetro. Agregar 1 ml de la solución extractora. Agregar 5 ml de agua destilada y 2 ml solución de molibdato de amonio.

Agregar 1 ml de la solución de cloruro estañoso diluido, mezclar bien.

Finalmente hacer las lecturas y terminarlas antes de 20 minutos.

Criterios.

CATEGORÍA	VALOR (ppm)
Pobre	<4.0
Medio	4.0-6.9
Rico	7.0-12.5
Extremadamente rico	>12.5

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

Materiales.

- HIDRÓXIDO DE SODIO 4M. Disolver 160 g de NaOH en 600 ml de agua destilada; aforar y agitar bien.
- ÁCIDO SALICÍLICO 5% . Disolver 5 g de ácido salicílico en 95 ml de ácido sulfúrico concentrado. (95-97%).
- SOLUCIÓN STOCK 1000 mg Na₃-N₁ . Disolver 1.8 g de nitrato de potasio en 650 ml de agua destilada y aforar a 1000 ml.
- SOLUCIÓN DE TRABAJO. Pipetear 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de la solución stock en frascos de 100 µl y aforar para tener un volumen de 0, 2, 6, 8 y 10 mg NO₃-N₁.

Métodos.

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

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

Interpretación del método.

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

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

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

Notas.

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

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

Materiales.

- SOLUCIÓN DE COLOR. Disolver 34 g de salicilato de sodio, 25 g de citrato de sodio y 25 g de tartrato de sodio en 750 ml de agua destilada. Añadir 0.12 g de nitroprusiato de sodio, disolver y aforar a 1000 ml.
- SOLUCIÓN ALCALINA DE HIPOCLORITO. Disolver 30 g de hidróxido de sodio en 750 ml de agua destilada. Añadir 10 ml de hipoclorito de sodio y aforar a 1000 ml.
- CALIBRACIÓN. Disolver 4.719 g de sulfato de amonio seco en 400 ml de agua destilada y después aforar a 1000 ml (solución stock).

Pipetear 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 +/- 0.0001 ml de la solución stock en frascos de 100 ml para dar los patrones de traajo de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg NH₄-N¹⁻. Aforar a 100 ml (solución estándar).

Métodos.

Transferir una alícuota de 0.1 ml de la muestra o la solución estándar a un tubo de ensayo. Añadir 5 ml de la solución de color, mezclar bien y dejar reposar por 15 minutos. Agregar 5 ml de la solución alcalina de hipoclorito y mezclar bien . el color se desarrolla en 1 hora y permanece estable durante algunas horas. Leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm.

Trazar una curva de calibración de las lecturas de la absorbancia contra la concentración estándar y determinar las concentraciones de las muestras y el blanco. Calcular la

concentración de las muestras corregidas (C) con la diferencia de la concentración de la muestra menos el blanco.

Interpretación del método.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{C * 0.1}{\text{peso de la muestra}}$$

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

Notas.

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