



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

POBLACIONES DE BACTERIAS, HONGOS Y COLÉMBOS DURANTE LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON DIÉSEL

ANA CAROLINA GUERRERO CHÁVEZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **Ana Carolina Guerrero Chávez**, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Alejandro Alarcón**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Poblaciones de bacterias hongos y colémbolos durante la fitorremediación de suelo contaminado con diésel**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Campus Montecillo, a 11 de julio de 2018

Ana Carolina Guerrero Chávez

Vo. Bo. del Dr. Alejandro Alarcón

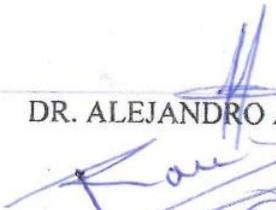
La presente tesis titulada: **Poblaciones de bacterias, hongos y colémbolos durante la fitorremediación de suelo contaminado con diésel**, realizada por la alumna: **Ana Carolina Guerrero Chávez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

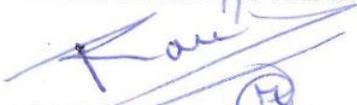
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

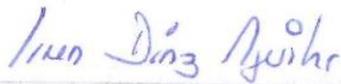
CONSEJERO


DR. ALEJANDRO ALARCÓN

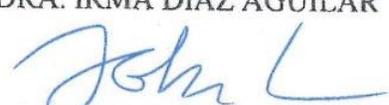
ASESOR


DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESORA


DRA. IRMA DÍAZ AGUILAR

ASESOR


DR. JOHN LARSEN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2018

POBLACIONES DE BACTERIAS, HONGOS Y COLÉMBOLOS DURANTE LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON DIÉSEL

Ana Carolina Guerrero Chávez, M en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN

La contaminación con hidrocarburos del diésel altera las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, disminuyendo su productividad. Durante la fitorremediación, las plantas liberan compuestos orgánicos que favorecen la diversidad y la actividad de microorganismos rizosféricos y de la mesofauna. Este trabajo evaluó el impacto del diésel en la abundancia de diferentes grupos funcionales bacterianos, y la abundancia de colémbolos en un sistema de fitorremediación en mesocosmos. Se establecieron seis tratamientos: 1) Control; 2) *Medicago sativa*; 3) 10,000 mg diésel kg⁻¹; 4) 20,000 mg kg⁻¹; 5) *M. sativa* con 10,000 mg kg⁻¹, y 6) *M. sativa* con 20,000 mg kg⁻¹. Los tratamientos se muestrearon a las 24 h, y a los 4, 8 y 12 meses, después de la contaminación. Los grupos funcionales bacterianos se cuantificaron en medios selectivos, y los colémbolos se extrajeron con el embudo de Berlesse-Tullgreen. El diésel a 10,000 mg kg⁻¹, estimuló la población de bacterias, y promovió la nodulación en *M. sativa*. La biomasa microbiana (bacterias, hongos y actinobacterias) medida con ácidos grasos aumentó por efecto del diésel y de la planta. La biomasa de hongos micorrízicos arbusculares incrementó a los 8 meses de la contaminación, y de manera particular en el tratamiento con mayor concentración de diésel a los 12 meses. Los colémbolos se observaron en los tratamientos contaminados después de un año, mientras que en el control se encontraron después de 4 meses. Después de 12 meses de la contaminación, la degradación de hidrocarburos del diésel fue mayor del 50 %; sin embargo, el suelo con planta y diésel a 20,000 mg kg⁻¹, tuvo menor degradación. La contaminación con diésel y el manejo de suelo, afectó la abundancia de colémbolos, denotando su posible uso como indicadores biológicos de la recuperación de suelo después de la contaminación con diésel.

Palabras clave: Bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos, lipolíticas, actinobacterias, hongos filamentosos, hongos micorrízicos arbusculares, alfalfa.

POPULATION OF BACTERIA, FUNGI AND COLLEMBOLA DURING THE PHYTOREMEDIATION OF DIESEL-CONTAMINATED SOIL

Ana Carolina Guerrero Chávez, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2018

ABSTRACT

The diesel contamination alters physical, chemical and biological properties of soil, decreasing its productivity. During phytoremediation, plants release organic compounds that promote the diversity and activity of rhizosphere microorganisms and mesofauna. This work evaluated the impact of diesel on the abundance of different bacterial functional groups, and the abundance of collembolans in mesocosms during the phytoremediation with *Medicago sativa*. Six treatments were established: 1) Control; 2) *Medicago sativa*; 3) 10,000 mg diesel kg⁻¹; 4) 20,000 mg kg⁻¹; 5) *M. sativa* with 10,000 mg kg⁻¹, and 6) *M. sativa* with 20,000 mg kg⁻¹. Treatments were sampled at 24 h, and at 4, 8 and 12 months after contamination. The bacterial functional groups were quantified in selective media, and the collembola were extracted with the Berlesse-Tullgreen funnel. Diesel at 10,000 mg kg⁻¹, stimulated the bacterial population, and promoted the nodulation in *M. sativa*. The microbial biomass (bacteria, fungi and actinobacteria) measured as fatty acids increased due to the effect of diesel and plant activity. The biomass of arbuscular mycorrhizal fungi increased after 8 months of contamination, and particularly in the treatment with the highest concentration of diesel at 12 months. Collembolans were observed in the contaminated treatments after one year, while in the control they were found after 4 months. After 12 months of contamination, the degradation of diesel hydrocarbons was greater than 50%; however, the soil with plant and diesel at 20,000 mg kg⁻¹ had the lowest degradation. Diesel contamination and soil management affected the abundance of collembolan by which these organisms have potential use as biological indicators of soil recovery after diesel contamination.

Key words: Nitrogen fixing bacteria, phosphate solubilizers, lipolytics, actinobacteria, filamentous fungi, arbuscular mycorrhizal fungi, Alfalfa.

DEDICATORIA

Al Dr. Alejandro Alarcón, por sus observaciones a lo largo de estos dos años, por su amistad y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento, además de un par de risas y bullying recreativo.

Agradezco a los miembros de mi Comité de Tesis: al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por dejarme ser su consentida y por compartir conmigo pláticas valiosas y recordarme que la ciencia no es lo único, hay que saber un poco de todo. A la Dra. Irma Díaz Aguilar, por enseñarme el maravilloso mundo de la mesofauna, y con su pasión por estos organismos logró que también me enamorara de ellos. Al Dr. John Larsen, por abrirme las puertas de su laboratorio y compartir su conocimiento.

A mi familia Guerrero y Chávez, por estar siempre dándome apoyo y echándome porras.

A Gabo, mi persona favorita, por estar siempre ahí para mí, aunque sea a la distancia nunca me faltó tu apoyo, tu humor y confianza. Gracias Gabote!

Y a mis padres porque me siguen apoyando incondicionalmente y se involucran activamente en mis proyectos sin pedir nada a cambio. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la culminación de este trabajo.

Al Colegio de Postgraduados Campus-Montecillo por permitir que forme parte de un excelente ambiente académico y por proporcionarme las herramientas necesarias para mi formación.

A todos los amigos y compañeros del área de microbiología, por compartir conmigo las risas, conocimiento y experiencias, los cumpleaños y demás festejos.

A los profesores del área de microbiología, que sin ser parte de la tesis, siempre me apoyaron de manera incondicional, no sólo en lo académico si no en lo humano; al Dr. Almaraz, al Dr. Jesús y a la maestra Mary, muchas gracias por todo.

A las personas que de alguna manera fueron parte de este proyecto; Margarito y Don Genaro, el Dr. Cobos, Fani Saucedo, el Dr. Otero, el Dr. Jorge, la Dra. Remedios, Don Manuel y Chayito, que me apoyaron en todo, aún en lo que no les correspondía.

Y al profe Chava, que como buen padre académico, me siguió guiando cuando lo necesité.

Muchas gracias profe!

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Contaminación por hidrocarburos	4
2.2 Situación de la contaminación por hidrocarburos del petróleo en México.....	4
2.3 Técnicas de remediación.....	6
2.4 Biorremediación.....	6
2.5 Fitorremediación.....	8
2.6 Rizósfera	8
2.7 <i>Medicago sativa</i>	11
2.8 Bacterias, hongos y colémbolos en suelos con hidrocarburos	14
2.9 Técnicas para el análisis de las comunidades microbianas en suelos con hidrocarburos	16
2.10 Perfiles de ácidos grasos microbianos	17
2.11 Discusión general de literatura y justificación de la investigación.....	22
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos Particulares	24
3.3 Hipótesis general.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Colecta de muestras de suelo	25
4.2 Diseño experimental	26
4.3 Protocolo para la contaminación del suelo	27
4.4 Análisis físicos y químicos del suelo.....	28
4.5 Grupos funcionales microbianos.....	29
4.6 Análisis de ácidos grasos totales de la comunidad de microorganismos del suelo	30

4.7 Extracción e identificación de colémbolos	31
4.8 Análisis de hidrocarburos totales del diésel.....	32
4.9 Análisis estadístico	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Propiedades químicas de los suelos	34
5.2 Grupos funcionales microbianos.....	34
5.3 Ácidos grasos totales	40
5.4 Abundancia de colémbolos edáficos.....	44
5.5 Degradación de hidrocarburos del diésel.....	45
6. DISCUSIÓN.....	48
6.1 Grupos funcionales microbianos.....	48
6.2 Ácidos grasos totales	50
6.3 Abundancia de colémbolos edáficos.....	51
6.4 Degradación de hidrocarburos del diésel.....	55
7. CONCLUSIONES.....	57
8. LITERATURA CITADA	58
9. ANEXOS.....	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios del impacto de los hidrocarburos en la diversidad microbiana del suelo con diferentes técnicas de remediación.....	18
Cuadro 2. Ácidos grasos, sus abreviaciones y posibles indicadores.	20
Cuadro 3. Abundancia de colémbolos pertenecientes a los órdenes encontrados en el muestreo previo a la colecta del suelo para el experimento.	26
Cuadro 4. Número de nódulos encontrados después de doce meses de la contaminación tomando 10 plantas por tratamiento por cada mesocosmos con planta.....	36
Cuadro 5. Análisis químicos del suelo en los cuatro muestreos en todos los tratamientos. Carbono orgánico (CO) y materia orgánica (MO) se muestran en porcentaje. El fósforo se expresó en mg/kg-1; la capacidad de intercambio catiónico (CIC); potasio (K) y calcio (Ca) se expresaron en $\text{cmol}^{(+)} \text{kg}^{-1}$	37
Cuadro 6. Abundancia de colémbolos encontrados en los cuatro muestreos (meses) en los diferentes tratamientos.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de sitios contaminados con hidrocarburos a nivel mundial	5
Figura 2. Contaminantes involucrados en emergencias ambientales reportadas en México en el periodo de 2008 – 2015	5
Figura 3. Anatomía general de la raíz y las zonas que comprenden la rizósfera.	10
Figura 4. Descripción de la planta de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>). a) Caracteres morfológicos (hojas, tallo, flores y sistema radical) b) Desarrollo de nódulos activos de <i>Sinorhizobium meliloti</i> en la raíz.....	13
Figura 5. Sitio de estudio. a) Zona de muestreo en la localidad San Pablo Ixayoc, Texcoco, Estado de México; b) Parcela de cultivo de maíz donde se tomaron las muestras; c) Puntos de muestreo (primeros 5 cm del suelo) dentro de la parcela de cultivo.....	25
Figura 6. Establecimiento de los mesocosmos. a y b) Aplicación de la contaminación del suelo con 10,000 y 20,000 mg de diésel kg ⁻¹ , y c) colocación de bolsas de malla dentro de los mesocosmos para el muestreo de los colémbolos.....	29
Figura 7. Extracción, identificación y montaje de colémbolos edáficos. a) Vista de un embudo tipo Berlese-Tullgren. b) Identificación de morfotipos: Entomobryomorpha (izquierda) y Poduromorpha (derecha). c) Vista de los colémbolos montados en laminillas permanentes para su identificación taxonómica.	32
Figura 8. Relación entre bacterias solubilizadoras de fosfatos y concentración de fósforo (izquierda), y bacterias fijadoras de nitrógeno y porcentaje de nitrógeno en el suelo (derecha) a lo largo de los cuatro muestreos (24 h, 4, 8 y 12 meses) en los seis tratamientos (C, D10, D20 CP, PD10 y PD20).	37
Figura 9. Bacterias de rápido crecimiento (izquierda), y lipolíticas (derecha) a lo largo de los cuatro muestreos (24 h, 4, 8 y 12 meses) en los seis tratamientos (C, D10, D20, CP, PD10 y PD20).....	39
Figura 10. Concentración de ácidos grasos de bacterias Gram negativas (izquierda), y Gram positivas (derecha) en los seis tratamientos en tres muestreos (4, 8 y 12 meses).	41

Figura 11. Concentración de ácidos grasos de bacterias totales (izquierda), y hongos totales (derecha) en los diferentes tratamientos en tres muestreos (4, 8 y 12 meses).	42
Figura 12. Concentración de ácidos grasos de actinobacterias (izquierda), y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (derecha) en los diferentes tratamientos en tres muestreos.	43
Figura 13. Porcentaje de degradación de hidrocarburos del diésel después de 12 meses en todos los tratamientos.	46
Figura 14. Abundancia de hidrocarburos del diésel a) 10,000 mg kg ⁻¹ y b) 20,000 mg kg ⁻¹ , después de 24 h de contaminación en los tratamientos sin planta.....	47
Figura 15. Abundancia de hidrocarburos del diésel a los 12 meses después de la contaminación en los seis tratamientos	47



1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos del petróleo son contaminantes que se acumulan en el ambiente debido a actividades humanas, y representan un serio problema debido a que son tóxicos, mutagénicos y/o cancerígenos (Covino *et al.*, 2016; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016), además de que son una amenaza adicional para la comunicación de las plantas con su microbioma (Dubey *et al.*, 2016). Por lo anterior, el desarrollo eficiente de tecnologías de remediación es uno de los principales objetivos de los ingenieros, ecólogos y biotecnólogos ambientalistas (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016).

Aunque existen técnicas de remediación físicas, químicas y biológicas, las técnicas de biorremediación, como la fitorremediación, son una alternativa económica y ambientalmente amigable para la descontaminación del suelo y se basan en la capacidad de las plantas para liberar compuestos orgánicos (como ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, azúcares o fenoles) al suelo a través de la raíz (Bais, *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2005; Alisi *et al.*, 2009), lo que mejora la estructura del suelo e incrementa la densidad, la diversidad y la actividad de los microorganismos, o bien, se pueden inducir sistemas de enzimas y genes derivados de las poblaciones de hongos y bacterias (Covino *et al.* 2016; Pacwa-Płociniczak *et al.* 2016; Wei *et al.* 2014), los cuales aceleran la biorremediación del suelo al ser capaces de transformar o degradar los hidrocarburos. Algunas de estas bacterias son promotoras del crecimiento de plantas (PGPB, por sus siglas en inglés) y pueden incrementar la biomasa vegetal por diferentes mecanismos como la producción de fitohormonas y sideróforos, la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Gerhardt *et al.* 2009; Glick 2003; Kukla *et al.*, 2014).



Entre las plantas más utilizadas en la fitorremediación están las gramíneas y las leguminosas, ya que tienen un alto porcentaje de tolerancia a la contaminación con hidrocarburos y metales pesados; poseen una alta degradación de contaminantes; y además, las leguminosas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico a través de nódulos y no compiten por este recurso con los microorganismos (Minai-Tehrani, 2008; Minoui *et al.*, 2015).

Algunos estudios han demostrado que la combinación de hongos y bacterias puede incrementar la eliminación de compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Chen *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2014; He *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2014). Es probable que, después del consumo de los nutrientes disponibles, los hongos obtengan una ventaja competitiva sobre las bacterias debido a su capacidad de usar mayor número de fuentes de carbono recalcitrantes (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014).

Los invertebrados del suelo como los colémbolos, son un grupo clave en los sistemas contaminados con hidrocarburos del diésel en el suelo, debido a que están expuestos directamente a los contaminantes y son esenciales para la salud y funcionamiento del sistema edáfico por su papel en el reciclaje de nutrientes. Los impactos de los hidrocarburos en las comunidades de invertebrados se pueden modificar debido a cambios de diferentes propiedades ambientales disminuyendo la riqueza y abundancia de éstos (Wasley *et al.*, 2016).

Los microorganismos como hongos y bacterias participan activamente en la degradación de los hidrocarburos del petróleo, y junto con la mesofauna del suelo, como ácaros y colémbolos, son componentes principales en las redes tróficas. Éstos, además de participar en el reciclaje de la materia, promueven el crecimiento de hongos y bacterias y los mantiene fisiológicamente activos ya que son parte de su fuente de alimentación (Mulder, 2006; Pausch *et al.*, 2016). Los estudios sobre el funcionamiento de las redes tróficas en



sistemas contaminados con hidrocarburos del petróleo, como el diésel, son escasos, por lo que es esencial tener un conocimiento integrado y holístico de la biología de la rizósfera para el mantenimiento y el manejo de los sistemas terrestres bajo condiciones adversas. Además, este conocimiento puede ser usado para manipular los sistemas rizosféricos con fines de biorremediación, aumentar de la biomasa vegetal, producir biocombustibles, secuestrar carbono en el suelo, e inducir una producción agrícola sostenible (Dubey *et al.*, 2016) en áreas que fueron dañadas por derrames de hidrocarburos.

El conocimiento de la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo desde el punto de vista de la comunidad de microorganismos edáficos, no ha considerado la importancia de diferentes niveles de las redes tróficas en el suelo. Lo anterior, es fundamental para entender el potencial que tienen los microorganismos autóctonos para tolerar y eventualmente biodegradar contaminantes, ya que la recuperación de un sistema contaminado con hidrocarburos depende además del tipo y concentración de los contaminantes, de la diversidad funcional microbiana, de las especies involucradas y su relación en los diferentes niveles tróficos.



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Contaminación por hidrocarburos

Los hidrocarburos del petróleo que entran al sistema pueden ser degradados o retenidos de manera natural por diferentes procesos físico-químicos y biológicos como la volatilización, foto-oxidación, adsorción a la materia orgánica, lixiviación, absorción de las plantas o degradación microbiana (Kuppusamy *et al.*, 2017; Okere y Semple, 2012). La tasa en la que estos procesos ocurren y la proporción de hidrocarburos del petróleo que son degradados o retenidos en el suelo dependen de diferentes factores como el tipo de suelo y de sus propiedades (porcentaje de materia orgánica, arcillas y contenido mineral; temperatura, humedad, potencial redox, disponibilidad de los nutrientes, presencia y actividad de microorganismos capaces de degradarlos), y de las propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos como su masa molecular, biodisponibilidad y toxicidad (Barnier *et al.*, 2014; He *et al.*, 2014). La mayoría de los sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo de los que se tienen datos a nivel mundial (Figura 1) son primordialmente las zonas industriales abandonadas que presentan como principales contaminantes una mezcla de hidrocarburos de alto y bajo peso molecular junto con metales pesados que se encuentran en áreas de alta demanda comercial (periféricas a zonas urbanas, recreativas o habitacionales) (Thavamani *et al.*, 2012).

2.2 Situación de la contaminación por hidrocarburos del petróleo en México

En México la contaminación del suelo por petróleo y sus derivados ocurre durante las actividades de extracción, transporte, tomas clandestinas, y mal manejo de las diferentes sustancias. La SEMARNAT (2016) reportó 4078 sitios contaminados por emergencias ambientales entre 2008 y 2015; siendo los estados de Veracruz (con 391 emergencias



ambientales) y Guanajuato (con 237) los más contaminados. Los principales contaminantes involucrados en estas emergencias ambientales fueron los hidrocarburos (1,175 emergencias), gasolina (1,057 emergencias) y diésel (554 emergencias) (Figura 2).

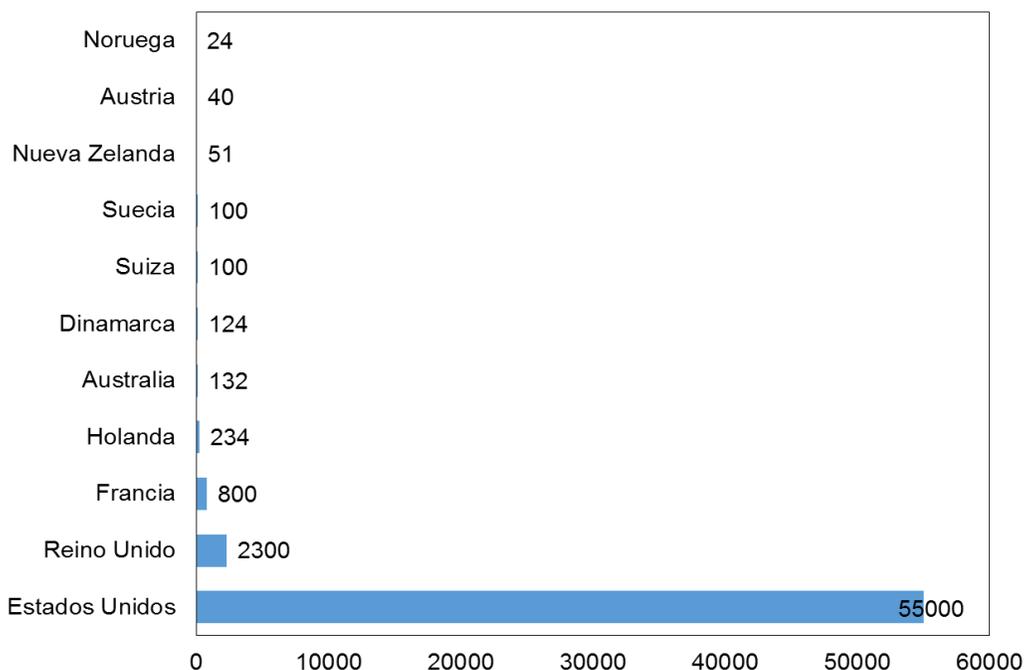


Figura 1. Número de sitios contaminados con hidrocarburos a nivel mundial (Kuppusamy *et al.*, 2017).

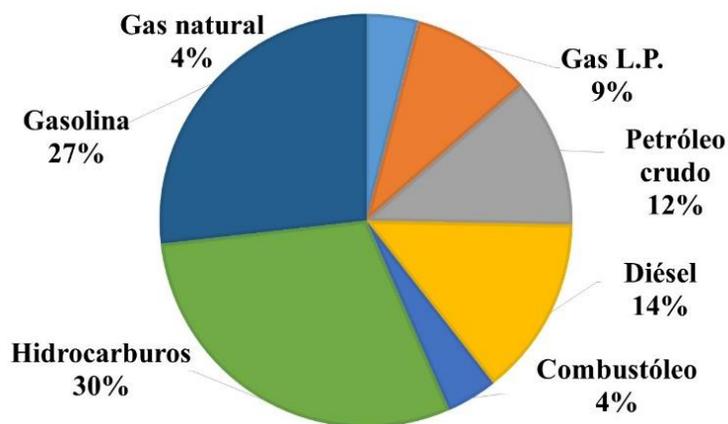


Figura 2. Contaminantes involucrados en emergencias ambientales reportadas en México en el periodo de 2008 – 2015 (SEMARNAT, 2016).



2.3 Técnicas de remediación

Existen diversas técnicas de remediación del suelo, tanto *in situ* como *ex situ*, entre ellas hay físicas, químicas y biológicas. Las dos primeras son más rápidas pero más costosas y muchas veces son incluso, destructivas al ambiente, mientras que la remediación biológica es más segura y económica. Dentro de las tecnologías de remediación físicas y químicas están la remediación electrocinética, el lavado de suelos, extracción por solvente, inundación de suelos, extracción de vapores, solidificación y estabilización, tratamientos con reacciones de oxidación-reducción, separación física, desorción térmica, incineración, vitrificación y pirolisis (Volke-Sepúlveda y Velasco, 2002).

2.4 Biorremediación

La biorremediación es el uso de microorganismos para descomponer los hidrocarburos (Wennerstrom, 1995; Chapelle, 1999; Iosob *et al.*, 2016). La actividad microbiana en el proceso de la biorremediación está restringida por un número de factores como bajos nutrientes, bajo nivel de donadores de electrones y baja biodisponibilidad de los contaminantes (Ron y Rosenberg, 2014), por lo que el éxito de esta técnica depende de que los hidrocarburos se encuentren biodisponibles, además de que los microorganismos tengan las condiciones adecuadas para reproducirse (nutrientes, temperatura, pH, y sus nichos fundamentales) (Martin *et al.*, 2014; Vidali, 2001). Estas limitaciones pueden ser superadas introduciendo nutrientes, donadores/aceptores de electrones y surfactantes, a los sitios contaminados, para mejorar el potencial de biodegradación de los microorganismos autóctonos (Masakorala *et al.*, 2013).



Dentro de la biorremediación se han desarrollado diferentes técnicas para acelerar el proceso de remediación de los suelos, mejorando al mismo tiempo su estructura, productividad y diversidad microbiana.

- Bioestimulación: circulación de soluciones acuosas que contengan nutrientes para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y mejorar la biodegradación de contaminantes orgánicos (Taylor y Jones, 2001). El nitrógeno y el fósforo son los nutrientes limitantes comúnmente utilizados durante la bioestimulación (Chang *et al.*, 2010; Steliga *et al.*, 2012).
- Bioaumentación: consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad de degradar el contaminante, para promover su biodegradación o biotransformación (Castiglione *et al.*, 2016).
- Biolabranza: la superficie del suelo contaminado es tratado en el mismo sitio por medio del arado. El suelo se mezcla con nutrientes y suelo sin contaminar y se remueve periódicamente para favorecer su aireación, controlando el pH y la temperatura (Wang *et al.*, 2016).
- Composteo: el material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol), para mejorar el balance de nutrientes y mejorar la aireación y generación de calor. Los sistemas de composteo incluyen tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Velasco y Volke-Sepúlveda, 2003).



- Fitorremediación: utiliza las plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar o destruir contaminantes en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la rizodegradación, fitoextracción, fitodegradación y fitoestabilización (Alkorta *et al.*, 2004).

2.5 Fitorremediación

La fitorremediación, representa una alternativa ambientalmente amigable para la descontaminación de hidrocarburos y algunos metales pesados, y se basan en la capacidad de las plantas de acelerar la biorremediación ya que las raíces penetran en las capas profundas del suelo, permitiendo que la concentración de oxígeno aumente en la rizósfera (Alisi *et al.*, 2009) y libera compuestos orgánicos al suelo, lo que incrementa la densidad, diversidad y actividad de los microorganismos o puede inducir enzimas derivadas de las poblaciones bacterianas existentes (Kirk *et al.*, 2005; Covino *et al.*, 2016; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016), además de estabilizar, extraer o degradar los contaminantes (Wenzel, 2009; Masakorala *et al.*, 2013). Algunas de estas bacterias son promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés) y pueden incrementar la biomasa de las plantas por diferentes mecanismos como producción de fitohormonas, sideróforos, fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos (Gerhardt *et al.*, 2009; Glick, 2003; Kukla *et al.*, 2014).

2.6 Rizósfera

Los suelos albergan una enorme diversidad de organismos que forman múltiples redes tróficas que son fundamentales para el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas (Mulder, 2006). En 1904, el agrónomo alemán y fisiólogo de plantas Lorenz Hiltner usó por primera



vez el término *rizósfera* para describir la interfase planta-raíz. Hiltner describió a la rizósfera como el área alrededor de la raíz de la planta que es habitada por una comunidad específica de microorganismos, influenciada por los compuestos liberados por la raíz (Hiltner, 1904). La definición de rizósfera se ha modificado para incluir tres zonas definidas por su proximidad e influencia desde la raíz (Figura 3). La *endorizósfera*, que incluye el córtex y la endodermis de la raíz; el *rizoplano*, que es la zona media directamente adyacente a la raíz, incluyendo su epidermis y el mucílago; y la *ectorizósfera*, la zona más externa y se extiende hacia el suelo “desnudo”.

Debido a la complejidad y diversidad de los sistemas radicales, la rizósfera no es una región de tamaño o forma definida, sino que consiste en un gradiente de propiedades químicas, físicas y biológicas, que cambia a lo largo de la raíz (McNear Jr, 2013). Por otra parte, la micro y la mesofauna son componentes principales en las redes tróficas que se llevan a cabo en el suelo, y son factores determinantes para el reciclaje de la materia orgánica y para el flujo de energía en los sistemas terrestres. Independientemente de su importancia, las relaciones tróficas en el suelo han sido poco estudiadas (Pausch *et al.*, 2016). Sólo unos cuantos invertebrados tienen una función importante en la génesis de los suelos, y el papel de ácaros y colémbolos, junto con los enquitreidos y los nemátodos, es importante para el metabolismo del suelo (Macfadyen, 1963; Van der Drift, 1965).

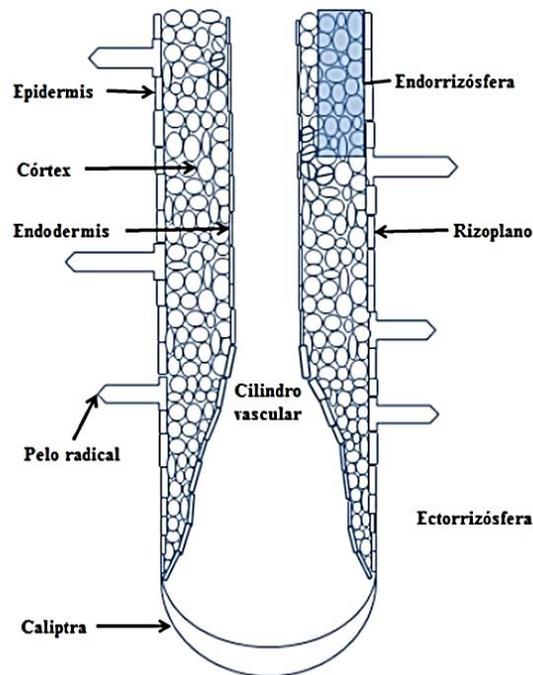


Figura 3. Anatomía general de la raíz y las zonas que comprenden la rizósfera (Modificado de Ferrera Cerrato, 1995).

Los colémbolos están entre los grupos de animales más abundantes y diversos, y cumplen diferentes funciones en el suelo; por un lado, contribuyen a conformar la parte física del suelo creando canales y aumentando la aireación del suelo, y aportan a las propiedades bioquímicas promoviendo la descomposición de la materia orgánica, y aumentando la actividad e interacciones con hongos y bacterias (Lavelle *et al.*, 2016). La parte física la llevan a cabo con la descomposición mineral y la reducción de hojarasca, formación de humus, y aumento del horizonte húmico a través de excrementos (Ambroz y Nosek, 1967). Además del reciclaje de materia orgánica, su importancia radica en los efectos secundarios a través de la estimulación de la actividad microbiana, distribución de esporas, inhibición de micostasis y bacteriostasis, y la estimulación del crecimiento microbiano como consecuencia del “forrajeo” de colonias viejas. Así, el consumo y la dispersión de estos microorganismos, junto con su propia microbiota intestinal, aumenta la descomposición de sustancias poco digeribles, formando sustancias húmicas (Butcher *et al.*, 1971).



Los colémbolos son parte importante de la rizósfera, ya que inducen cambios en la arquitectura de la raíz. Endlweber y Scheu (2006) demostraron que *Cirsium arvense* y *Epilobium adnatum* en presencia del colémbolo *Protaphorura fimata*, mostraron raíces más largas y delgadas, y con mayor número de raicillas secundarias (Endlweber y Scheu, 2007). El rango de descomposición de materia orgánica por colémbolos se relaciona a la diferencia cualitativa de su microbiota intestinal (Butcher *et al.*, 1971). Estos organismos tienen diferencias morfológicas que los separan dependiendo de su estilo de vida y fuentes de alimentos (Christiansen, 1964; Rusek, 1998). Por ejemplo, en las capas superiores del suelo los colémbolos (órdenes Entomobryomorpha o Symphypleona) se alimentan de la hojarasca, micro-algas, líquenes y musgos, mientras que los colémbolos que habitan en los estratos inferiores (órdenes Poduromorpha y algunos Entomobryomorpha) dependen del detritus, los compuestos orgánicos liberados por las plantas y del micelio de hongos (Ponge, 2000; Potapov *et al.*, 2016).

2.7 *Medicago sativa*

Entre las plantas más utilizadas para la fitorremediación de hidrocarburos están las gramíneas y las leguminosas, ya que se ha reportado que tienen un alto porcentaje de degradación de estos contaminantes debido a la capacidad de estimular el crecimiento de microorganismos del suelo, como los degradadores de hidrocarburos, y a la liberación de enzimas implicadas en la biodegradación de contaminantes en la zona de raíz (Glick, 2003; Agnello *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Marchand *et al.*, 2016; McIntosh *et al.*, 2017; Mukhopadhyay *et al.*, 2017; Panchenko *et al.*, 2017); además, las leguminosas son



capaces de fijar nitrógeno atmosférico a través de sus nódulos, y no compiten por este recurso con los microorganismos (Minai-Tehrani, 2008; Minoui *et al.*, 2015).

La familia de las leguminosas (Fabaceae) se divide en tres subfamilias: Mimosoideas, Cesalpinoideas y Papilionoideas. A esta última subfamilia pertenece el género *Medicago* en la que se encuentra la alfalfa, la cual tiene importancia agrícola y forrajera. *Medicago sativa* es una planta perenne de raíz gruesa y tallo leñoso; sus foliolos son ovalados u oblongos, dentados en el ápice; tiene estípulas semi-lanceoladas, largamente acuminadas y dentadas en la base. Sus flores son grandes (8-10 mm), en racimos oblongos multifloros sobre un pedúnculo no aristado, con corola violácea o azul; sus semillas son de 1.5 por 2.5 mm, ovals (Figura 4a). Las raíces de la alfalfa son abundantes y profundas; consta de una raíz principal, robusta y pivotante y numerosas raíces secundarias (Del Pozo, 1983). La raíz principal es muy marcada y puede llegar hasta la capa freática o roca madre a grandes profundidades (2 a 5 m). Esto le da a la planta la capacidad para extraer agua de las capas más profundas del suelo (Bolton, 1962; Villax, 1963).

La alfalfa es capaz de asimilar nitrógeno atmosférico gracias a la simbiosis con ciertas bacterias llamadas rizobias, que se desarrollan en las células de la raíz formando nódulos. Estas rizobias son bacilos Gram negativos que en la última etapa de la simbiosis se transforman en bacteroides vacuolados capaces de fijar nitrógeno atmosférico. La especie de rizobia capaz de hacer simbiosis con la especie *Medicago sativa* es *Sinorhizobium meliloti*. Los nódulos activos contienen un pigmento rojo de naturaleza proteica, cuyas bandas de absorción son similares a la hemoglobina de la sangre (Figura 4b), y que recibe el nombre de leghemoglobina. Cuando un nódulo deja de ser activo, esta leghemoglobina pierde su color rojo, y es fácil de detectar a simple vista. También existe evidencia de que las leguminosas son capaces de usar fuentes de fósforo que no están disponibles para otras plantas al modificar



el pH, haciendo soluble este elemento (Hall *et al.*, 2011) y por la producción de fosfatasa que libera a través del sistema radical (Venterink, 2011). Estas características hacen que la alfalfa no tenga que competir con los microorganismos del suelo por recursos que pueden ser limitantes en suelos contaminados con hidrocarburos.

Aunque el mayor efecto de la alfalfa en sitios con hidrocarburos se atribuye al incremento en la actividad microbiana y a la fijación simbiótica de nitrógeno, los exudados radicales de *M. sativa* tienen una alta actividad peroxidasa, que aumenta en estos sitios ya que produce hasta ocho diferentes tipos de peroxidasa, mientras que en el suelo libre de contaminantes sólo se encontraron cinco diferentes, lo que explica su gran efectividad en la fitorremediación de sitios con hidrocarburos (Dubrovskaya *et al.*, 2017; Muratova *et al.*, 2015).



Figura 4. Descripción de la planta de alfalfa (*Medicago sativa*). a) Caracteres morfológicos (hojas, tallo, flores y sistema radical) (Ilustración: Norman Criddle, en Clark y Malte, 1913). b) Desarrollo de nódulos activos de *Sinorhizobium meliloti* en la raíz de alfalfa (Guerrero-Chávez, 2017).



2.8 Bacterias, hongos y colémbolos en suelos con hidrocarburos

La comunidad microbiana sufre cambios después de un derrame de hidrocarburos debido al incremento en la abundancia de los microorganismos autóctonos capaces de tolerar y degradar estos compuestos (Hamamura *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008; Mikkonen *et al.*, 2011;). Entre las cepas más comunes de hongos, aisladas de sitios con historial de contaminación, están las pertenecientes al grupo Ascomycota y Sordariomycetes (géneros *Aspergillus*, *Amorphoteca*, *Fusarium*, *Graphium*, *Neosartoria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Sporobolomyces*, *Talaromyces*, y levaduras de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, y *Yarrowia*); y en las cepas bacterianas, sobresalen las pertenecientes a los grupos de Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, y Gammaproteobacteria (Covino *et al.*, 2015; Bourceret *et al.*, 2016; Marchand *et al.*, 2016; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016; Varjani, 2017). Al introducir plantas en los suelos contaminados, la diversidad de las bacterias aumenta, destacando los miembros de los órdenes Actinomycetales, Rhizobiales, y Xanthomonadales (Bourceret *et al.*, 2016).

Algunos estudios han demostrado que la combinación de hongos y bacterias pueden incrementar la eliminación de compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Fan *et al.*, 2014; He *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Marchand *et al.*, 2016). Es probable que, después del consumo de los nutrientes disponibles, los hongos obtengan una ventaja competitiva sobre las bacterias debido a su capacidad de usar mayor número de fuentes de carbono recalcitrantes (Langarica-Fuentes *et al.*, 2014).

Melekhina *et al.* (2015) estudiaron la dinámica de poblaciones de microorganismos de diferentes grupos funcionales (degradadoras de hidrocarburos, amonificadoras y nitrificadoras), y la densidad poblacional de la microfauna y mesofauna durante siete años en un suelo contaminado con hidrocarburos (2500-4500 mg kg⁻¹). Desde 1996 hasta el 2002,



este suelo fue sujeto a diferentes técnicas de biorremediación incluyendo remoción del petróleo superficial, rotación de cultivos, y drenaje. Por una parte, la población de bacterias degradadoras de hidrocarburos y nitrificadoras aumentó durante los tres primeros años y luego empezó a disminuir, mientras que las bacterias amonificadoras aumentaron solo durante el primer año y posteriormente, disminuyeron. En este mismo estudio, las larvas de dípteros y los ácaros (Mesostigmata) predominaron en las primeras etapas en los suelos contaminados y fueron reemplazados por colémbolos en las últimas etapas.

Los invertebrados del suelo, como los colémbolos (Hexapoda: Collembola), son un grupo clave en estos sistemas debido a que están expuestos directamente a los contaminantes del suelo, y debido a que se alimentan de hongos, mantienen estas poblaciones fisiológicamente activas, por lo que el proceso de degradación de hidrocarburos es más rápido (Wasley *et al.*, 2016). Además, se conoce bien su taxonomía y ecología, y tienen bajo potencial de dispersión, alta capacidad reproductiva y en algunas familias, tolerancia a vivir en condiciones adversas (Coulson *et al.*, 2000).

Los colémbolos reaccionan de manera relativamente rápida a los cambios en la estructura y propiedades químicas y físicas del suelo (Ardestani y Van Gestel, 2014; Rieff *et al.*, 2016; Rusin y Gospodarek, 2016). Los efectos negativos de los derrames de hidrocarburos en los invertebrados del suelo se han confirmado en algunas investigaciones (Blakely *et al.*, 2002; Uribe-Hernández *et al.*, 2010; Rusin y Gospodarek, 2016). Al respecto, Uribe-Hernández *et al.* (2010) evaluaron el efecto de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo y de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos, en suelos contaminados en el área de Minatitlán, Veracruz, sobre la abundancia de colémbolos. Las familias más abundantes de colémbolos encontradas en los suelos contaminados fueron Isotomidae y Entomobryidae, y las especies que pudieran ser tolerantes a altas



concentraciones de estos compuestos fueron *Americabrya* sp., *Lepidocyrtus* sp., *Pseudosinella* sp., *Seira* sp., *Willowsia* sp., *Ballistura* sp., *Ballistura excavata*, *Cryptopygus thermophilus*, *Isotoma* sp., *Isotomurus* sp., *Paronella* sp., *Sminthurides* sp., *Acherontides. juxtlahuacaensis.*, *Xenylla welchi*, *X. welchi*, *Cyphoderus* sp., *Deuterosminthurus* sp., y *Brachystomella* sp., mientras que las familias Hypogastruridae, Neanuridae, Onychiuridae, Tomoceridae, Katiannidae, Bourletiellidae y Dicrytomidae se encontraron esporádicamente en suelos contaminados y sólo después de un proceso de biorremediación, y las especies *Trogolaphysa* sp., *Sminthurus* sp., *Folsomides* sp. y *F. parvulus*, estas últimas de la familia Isotomidae, son muy sensibles al proceso de contaminación, ya que sólo se encontraron en los suelos sin hidrocarburos. Por otra parte, Rusin y Gospodarek (2016) observaron que en un suelo con diésel (6000 mg kg⁻¹), las familias de colémbolos más abundantes fueron Isotomidae y Entomobryidae, las cuales comenzaron a recuperarse después de 15 meses de la contaminación y a los 25 meses, las poblaciones fueron iguales a las del suelo control.

2.9 Técnicas para el análisis de las comunidades microbianas en suelos con hidrocarburos

Para conocer la diversidad microbiana del suelo existen diversas metodologías que nos ayudan a estimar la estructura de las comunidades microbianas del suelo. Los dos análisis más comunes son los perfiles de ácidos grasos complementados con técnicas de biología molecular (Bastida *et al.*, 2016; Hou *et al.*, 2015), con los que es posible analizar cambios en la abundancia y la riqueza de comunidades microbianas después de un proceso de contaminación por hidrocarburos en el suelo (Cuadro 1).



2.10 Perfiles de ácidos grasos microbianos

La determinación de los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos del suelo se ha convertido en uno de los métodos más comúnmente utilizados para estudiar la biomasa y la estructura de las comunidades microbianas. Un ácido graso, el componente básico de la mayoría de los lípidos, es una cadena de hidrocarburos con un grupo metilo (CH_3) en un extremo de la molécula (llamado omega, ω) y un grupo carboxilo (COOH) en el otro extremo (IUPAC-IUB, 1967). Los ácidos grasos son componentes esenciales de las membranas celulares de todas las células vivas, éstos no se encuentran en productos de almacenamiento celular (como las inclusiones citoplasmáticas) ni en células muertas (Cunningham *et al.*, 1996; Zelles, 1999). Para mantener la integridad de la membrana celular, los microorganismos forman cadenas de ácidos grasos de diferente longitud (entre 14 y 20 carbonos) y composición (Frostegård *et al.*, 1993); éstos se consideran biomarcadores de origen bacteriano y fúngico (Wilson y Jones, 1993).

Los ácidos grasos más utilizados y los microorganismos de donde fueron aislados se muestran en el Cuadro 2. Por ejemplo, las bacterias Gram negativas contienen un grupo hidroxilo (OH), en la posición β en la parte lipídica de la pared celular. Esta característica es única para ese grupo bacteriano y se utiliza para estimar su biomasa total en muestras de suelo (Parker *et al.*, 1982).

Para poder identificar especies microbianas por medio de ácidos grasos, se necesitan cultivos puros. En cultivos mixtos o muestras ambientales esta técnica indica la abundancia de los diferentes grupos microbianos y ayudan a detectar cambios rápidos en la estructura de la comunidad microbiana.



Cuadro 1. Estudios del impacto de los hidrocarburos en la diversidad microbiana del suelo con diferentes técnicas de remediación.

Técnica de remediación	Análisis de la comunidad	Concentración y tipo de hidrocarburos	Microorganismos encontrados	Autores
Ninguna	Biblioteca de clonas de gen 16S rRNA	157 067.9 mg HC kg ⁻¹ de suelo. HC alifáticos (75%) y aromáticos (25%)	<i>Proteobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, Ignavibacteriae, Spirochaetes, Chlamydiae, Candidatus Saccharibacteria</i> y <i>Parcubacteria</i> .	Salam <i>et al.</i> 2017
Abono	Ácidos grasos y metaproteómica	0.004 mg de petróleo crudo por kg ⁻¹ de suelo	<i>Rhizobiales, Sphingomonadales</i> y <i>Caulobacterales</i>	Bastida <i>et al.</i> 2016
Surfactantes	Ácidos grasos y secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA	138 mg de HC kg ⁻¹ de suelo	<i>Sphingomonas, Bacillus, Pseudomonas, y Flavobacterium</i>	Wang <i>et al.</i> 2016
Surfactantes y nutrientes	Cuantificación de la expresión del gen <i>alkB</i> .	7.4 g de petróleo crudo kg ⁻¹ de suelo	<i>Ochrobactrum intermedium, Microbacterium oryzae, Pseudomonas sp.</i> Y <i>Alcaligenes faecalis</i> ,	Tahseen <i>et al.</i> 2016
Ninguno	Ácidos grasos y DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)	171-2 137 HC mg kg ⁻¹ de suelo	<i>Pseudomonas Sphingomonas</i> y <i>Arthrobacter</i> ,	Markowicz <i>et al.</i> 2016
Fitorremediación	Perfiles de ácidos grasos	300 mg de petróleo kg ⁻¹ de suelo	Bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos, actinomicetos	He <i>et al.</i> , 2014
Fitorremediación	16S rRNA	4000 mg de petróleo kg ⁻¹ de suelo	<i>Klebsiella sp</i> <i>Pseudomonas sp</i>	Hou <i>et al.</i> , 2015
Fitorremediación	HPLC y perfiles de ácidos grasos	1000mg de fenantreno kg ⁻¹ de suelo	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	Sun <i>et al.</i> , 2015
Fitorremediación	16S rRNA a e ITS	1870 mg de petróleo kg ⁻¹ de suelo	<i>Funneliformis mosseae</i> y <i>Rhizophagus intraradices</i>	Bourceret <i>et al.</i> , 2016



Se ha observado que en sitios contaminados con petróleo crudo o con diésel en diferentes concentraciones (5 hasta 2000 mg kg⁻¹) hay predominancia de la biomasa de bacterias Gram negativas, y la biomasa de las células eucariontes disminuye después de 40 días (Macnaughton *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2007). Por otra parte, Erdoğan *et al.* (2013) determinaron que la concentración de ácidos grasos de las bacterias Gram positivas fue mayor en suelo contaminado con hidrocarburos que en el suelo sin contaminar, aunque disminuyeron con el tiempo. De manera similar, los ácidos grasos de las bacterias Gram negativas tuvieron una concentración alta al inicio de la incubación (1-30 días) mientras que al final se comenzó a reducir, y al día 120 no se encontraron.

En otro estudio, Pacwa-Płociniczak *et al.* (2016) aislaron 42 cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos de un suelo contaminado, e identificaron 41 cepas basándose en el perfil de ácidos grasos de células completas usando el método MIDI-MIS Microbial Identification System (Sherlock TSBA6 library; MIDI Inc., Newark, DE, USA). Entre las bacterias estudiadas, 31 cepas pertenecieron a la especie *Rhodococcus erythropolis*, y las otras a los géneros *Rahnella* (4 cepas), *Serratia* (3 cepas), y *Proteus* (1 cepas). Las cepas aisladas fueron evaluadas por su habilidad de producir surfactantes y promover el crecimiento vegetal, y sólo dos de ellas (*R. erythropolis* CD126 y *R. erythropolis* CD111) tuvieron ambas propiedades, por lo que se consideraron como bacterias prometedoras en la fitorremediación asistida por microorganismos.



Cuadro 2. Ácidos grasos, sus abreviaciones y posibles indicadores (Zelles, 1999).

Abreviación	Tipo de ácido graso	Organismo al que pertenece o del que se aisló
PLFA	Ácidos grasos fosfolípidos	Biomasa microbiana
EL-SATFA	Ácidos grasos saturados ligados a éster	Procariontes, eucariontes
Cadena recta	Ácidos grasos de cadena recta	Eucariontes
Cadena recta >20C	Cadenas rectas saturadas de más de 20C átomos de carbono	Eucariontes, musgos, plantas superiores
Saturados Ciclopropano	20:0, 21:0, 26:0, etc Ácidos grasos con un anillo ciclopropano β -hidróxido ácidos grasos	No identificado Gram negativas: <i>Rhodospirillum</i> , <i>Cromatium/Legionella</i> ; Gram positivas: <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i>
Iso/anteiso	La posición de la ramificación de metilo es iso o anteiso	Gram positivas, Gram negativas: <i>Cytophaga</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Flavbacterium</i>
Cadena ramificada	Ácidos grasos con cadenas ramificadas	Gram positivas: actinomicetos
10ME	Rama metilada en el átomo 10C	Actinomicetos, reductores de sulfatos
EL-MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados ligados a éster	No identificado
ω 7	Tipo de ácido vírica (vía anaeróbica desaturasa)	Aerobios Gram negativos, anaerobios estrictos
ω 9	Tipo oleico	Gram positivas



ω8	No identificado	Bacteria metano-oxidativas
Ácido graso de 16C EL-PUFA	No identificado Ácidos grasos poliinsaturados ligados a éster	Metanotrofos tipo I Eucariontes, cianobacterias
EL-HYFA	Ácidos grasos hidroxilo enlazados con éster	No identificado
Alfa	Sustitución de hidroxilo en la posición 2 más cercana al extremo carboxilo	<i>Pseudomonas</i> , Gram negativas, actinomicetos, hongos, <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Candida</i> spp.
Beta	Sustitución de hidroxilo en la posición 3 más cercana al extremo carboxilo	<i>Mycobacterium</i> , Bacteroides/ <i>Flavobacterium</i> , Gram negativas excepto <i>Eikenella</i> , <i>Arthrobacter</i> , hongos
Omega	Sustitución de hidroxilo en la posición 3 más cercana al final alifático	Hongos
NEL-UNSFA	Ácidos grasos no sustituidos sin éster	<i>Clostridium</i> ; eucariontes
NEL-HYFA	Ácidos grasos sustituidos con hidroxilo sin enlace éster	Bacterioides/ <i>Flavobacterium</i>
Ácido micólico	Beta-OH alfa-ramificado	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>
LP-HYFA	Ácidos grasos hidroxilo sustituidos localizados en el exterior de la membrana (lipopolisacáridos)	No identificado
Dicarboxílico	Ácidos grasos dicarboxílicos	Plantas (cutina, suberina)



2.11 Discusión general de literatura y justificación de la investigación

Los organismos del suelo, como hongos, bacterias y colémbolos, son útiles para hacer el seguimiento del cambio que ocurre en el suelo después de un derrame de hidrocarburos, ya que sus poblaciones son sensibles a los cambios físicos y químicos, y responden de manera rápida tanto a la contaminación inicial como a la recuperación del sistema. Al analizar los cambios en la diversidad funcional de bacterias y en la comunidad de colémbolos, se puede evaluar de manera biológica, el estado de contaminación del suelo. Los microorganismos son importantes en el funcionamiento del suelo al ayudar al reciclaje de la materia orgánica y de nutrientes. La biorremediación de los hidrocarburos del petróleo se atribuye principalmente a la presencia de diferentes grupos bacterianos que poseen genes capaces de degradar o transformar compuestos aromáticos y alifáticos, junto con otras propiedades fisiológicas importantes como producción de surfactantes, formación de biopelículas, fijación de nitrógeno atmosférico, o solubilización de fosfatos. A su vez, las plantas ayudan a que este proceso sea más rápido al proveer hábitat para los microorganismos, y mejorar la porosidad y la estructura del suelo.

Ante un evento de contaminación del suelo, es importante conocer la biodegradación de los hidrocarburos del diésel desde el punto de vista de la comunidad de microorganismos edáficos, considerando diferentes niveles de las redes tróficas, para entender el potencial que tienen los microorganismos autóctonos para tolerar y eventualmente biodegradar contaminantes, ya que la recuperación de un sistema contaminado con hidrocarburos depende de la diversidad funcional microbiana, y su relación en los diferentes niveles tróficos. Los estudios sobre el funcionamiento de las redes tróficas en suelos contaminados con hidrocarburos son escasos, por lo que esta investigación planteó la siguiente pregunta; ¿Cómo



cambia la población de bacterias, hongos y colémbolos durante la fitorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos del diésel?



3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de los hidrocarburos del diésel en la población de grupos funcionales de bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fosfatos, lipolíticas, de rápido crecimiento, y de hongos edáficos, así como en la abundancia de colémbolos edáficos en un sistema de fitorremediación en mesocosmos.

3.2 Objetivos Particulares

- Conocer la variación de los grupos funcionales de bacterias (fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y lipolíticas) y hongos, en diferentes tratamientos de contaminación del suelo por hidrocarburos del diésel.
- Evaluar el impacto de los hidrocarburos del diésel en la comunidad de bacterias y hongos de la rizósfera mediante el análisis de ácidos grasos.
- Identificar la abundancia de colémbolos edáficos tolerantes a los hidrocarburos del diésel, durante el proceso de fitorremediación.

3.3 Hipótesis general

Los hidrocarburos del diésel modificarán la población de grupos bacterianos funcionales, así como la abundancia de hongos y colémbolos edáficos en un sistema de fitorremediación en mesocosmos.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de muestras de suelo

El suelo para este estudio se colectó de la localidad de San Pablo Ixayoc, Texcoco, Estado de México, de una parcela de cultivo de maíz criollo, la cual no tiene historial de contaminantes. Se localiza a 2989 msnm, en las coordenadas 19° 26' 48'' N 98°46' 17.6'' W. El suelo es un andosol derivado de ceniza volcánica (IUSS Working Group WRB, 2015), con textura franca (43.4% de arena, 33.7% de limo, y 22.9% de arcilla), pH de 5.3, 1.1% de carbono; 27.3 mg N inorgánico kg⁻¹ y 12.7 mg de P disponible kg⁻¹. Se tomaron muestras de diferentes puntos de la parcela con un muestreo dirigido en los primeros 5 cm de suelo (Figura 5). El suelo se secó a la sombra a temperatura ambiente, se tamizó con malla de 1 cm de apertura, y se homogenizó para obtener una muestra compuesta (Margesin, 2005).



Figura 5. Sitio de estudio. a) Zona de muestreo en la localidad San Pablo Ixayoc, Texcoco, Estado de México; b) Parcela de cultivo de maíz donde se tomaron las muestras; c) Puntos de muestreo (primeros 5 cm del suelo) dentro de la parcela de cultivo.



Previo a la colecta del suelo, se realizó un estudio prospectivo para determinar la abundancia de colémbolos en la zona agrícola de muestreo (Cuadro 3), y tener una referencia de las morfoespecies que habitan en ese suelo y, después, poder compararlas con las que toleran los tratamientos aplicados en este estudio. Cinco muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 0-10 cm, cercanas a la zona radical del maíz. El orden dominante fue Poduromorpha, seguido de Entomobryomorpha, mientras que el orden Symphypleona fue muy escaso y colémbolos del orden Neelipleona no se observaron. De acuerdo a la abundancia en los diferentes puntos de muestreo, se realizó un muestreo dirigido para la colecta de suelo que se utilizó en el estudio.

Cuadro 3. Abundancia de colémbolos pertenecientes a los órdenes encontrados en el muestreo previo a la colecta del suelo que se utilizó en el experimento.

Muestra	Poduromorpha	Entomobryomorpha	Symphypleona
1	684	44	0
2	188	37	0
3	91	36	1
4	120	4	1
5	26	21	4

4.2 Diseño experimental

Para estudiar el efecto de los hidrocarburos del diésel en la población de grupos funcionales de bacterias, hongos y colémbolos edáficos en un sistema de fitorremediación, se utilizaron mesocosmos bajo condiciones experimentales controladas en invernadero. La especie vegetal utilizada fue la alfalfa (*Medicago sativa*), debido a que es una planta muy eficiente en la fitorremediación de los suelos contaminados. En el experimento se establecieron seis tratamientos con tres repeticiones en un arreglo de acuerdo a un diseño experimental completamente al azar, teniéndose un total de 18 unidades experimentales. Los



tratamientos fueron: 1) Suelo control (C), 2) Suelo con planta, *Medicago sativa* (CP), 3) Suelo contaminado con diésel a 10,000 mg kg⁻¹ (D10), 4) Suelo contaminado con 20,000 mg kg⁻¹ (D20), 5) Suelo con planta, *M. sativa*, contaminado con 10,000 mg kg⁻¹ (PD10), y 6) Suelo con planta, *M. sativa*, contaminado con 20,000 mg kg⁻¹ (PD20).

4.3 Protocolo para la contaminación del suelo

Para el establecimiento de los mesocosmos se utilizaron bandejas rectangulares de plástico de 30X30X20 cm. Para el suelo control (C) y los tratamientos con planta y diésel se utilizaron ocho kilos de suelo. Para los tratamientos con el suelo contaminado con 10,000 ó 20,000 mg de diésel kg⁻¹ (D10 y D20), se agregaron 80 mL y 160 mL de diésel, respectivamente (Figura 6a y 6b). El suelo se mezcló para que la contaminación con el hidrocarburo fuera lo más homogénea posible. En los tratamientos con planta (CP, PD10 y PD20), se siguió el mismo protocolo que en los tratamientos sin planta (C, D10 y D20) y después de homogenizar el suelo se agregaron las semillas de *M. sativa*. Una vez que estuvieron montados todos los mesocosmos, se agregó agua destilada poco a poco, hasta llegar al 60% de la capacidad de campo (CC) para que el suelo se hidratara y las semillas comenzaran a germinar (Esin *et al.*, 2013).

En cada mesocosmos se colocaron 8 bolsas de 10 cm de altura por 5 cm de diámetro, hechas con malla de plástico con abertura de 3 mm (Figura 6c), para extraer a los colémbolos sin perturbar el ambiente edáfico en el que se pudieran habitar después de la aplicación de los tratamientos. La pérdida de humedad se compensó tres veces a la semana añadiendo agua destilada. Los mesocosmos se mantuvieron en condiciones de invernadero durante los 12 meses del experimento (Temperaturas 9 °C mínima y 40 °C máxima).



Una vez establecido el experimento, se tomaron muestras de cada mesocosmos a las 24 h, y a los 4, 8 y 12 meses después de la aplicación de los tratamientos para los análisis de las variables en estudio. A partir de estas muestras, se usaron 500 g para los análisis físicos y químicos del suelo, 10 g para el análisis de grupos funcionales microbianos, 5 g para el análisis de ácidos grasos, y 400 g para la obtención de colémbolos. En el último muestreo se utilizaron 10 g de todos los tratamientos para la extracción de hidrocarburos totales del diésel.

4.4 Análisis físicos y químicos del suelo

Para el análisis de los resultados se consideraron las siguientes variables del suelo: contenido de carbono orgánico (CO) (método de Walkley y Black), materia orgánica (MO), contenido de arena (A), limo (L) y arcilla (R), nitrógeno (N) (micro-Kjeldahl) expresados en porcentajes. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) (acetato de amonio), el contenido de sodio (Na), potasio (K) y calcio (Ca) se expresaron en $\text{cmol}^{(+)} \text{kg}^{-1}$. El contenido de fósforo aprovechable en mg kg^{-1} (Bray y Kurtz no. 1), y la densidad aparente del suelo (Da) en g cm^{-3} (Cuadro 4) (Reeuwijk, 1999). Las muestras de suelo se analizaron en el Laboratorio de Génesis de Suelos, Postgrado de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.



Figura 6. Establecimiento de los mesocosmos. a y b) Aplicación de contaminación del suelo con 10 000 y 20 000 mg de diésel kg⁻¹; y c) colocación de bolsas de malla dentro de los mesocosmos para el muestreo de los colémbolos.

4.5 Grupos funcionales microbianos

Para la obtención de los grupos funcionales de hongos y bacterias a las 24 h y a los 4, 8 y 12 meses, se usaron diferentes medios selectivos. Para bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico se usó el medio Rennie (Rennie 1981); para bacterias solubilizadoras de fosfatos el medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948); y para los microorganismos lipolíticos se utilizó el medio con Tween 20 (Sierra, 1957). Además, se utilizó Agar Nutritivo (Merck®) para la estimación de la comunidad total de bacterias de rápido crecimiento.

En cada muestreo se pesaron 10 g de suelo y se homogenizaron en 90 mL de agua destilada, en agitación durante 15 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde 10⁻² hasta 10⁻⁵ (Miles *et al.*, 1938). De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 mL que se distribuyó sobre la placa de agar correspondiente para cada grupo microbiano, por



triplicado. Las cajas de Petri se incubaron a 28°C durante siete días, y se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC x g⁻¹ ss) (Miles *et al.*, 1938).

4.6 Análisis de ácidos grasos totales de la comunidad de microorganismos del suelo

De cada tratamiento se tomaron 5 g de suelo, los cuales se liofilizaron (FREEZON 6 Labconco) para evitar que las células vivas perdieran su estructura celular. Las muestras liofilizadas se molieron en un mortero, y se pesaron 0.25 g por muestra ya que con un gramo de suelo, la columna del cromatógrafo se sobrecargó de ácidos grasos (Datos no presentados). Inmediatamente, se realizó la extracción de ácidos grasos de acuerdo al protocolo del manual MIDI (2002) y se le agregó a cada muestra 100 µl de estándar interno 19:0. La extracción de ácidos grasos totales requiere de 4 pasos. 1) Saponificación, aquí se realiza la lisis de células y los ácidos grasos son separados de lípidos celulares y convertidos en sales de sodio (NaOH y metanol a 96°C por 30 min); 2) Metilación, las sales sódicas de los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos para incrementar la volatilidad de los ácidos (HCl y metanol a 80°C por 10 minutos); 3) Extracción, los ésteres metílicos se transfieren de la fase acuosa ácida a la fase orgánica con la técnica de extracción líquido-líquido (hexano:éter metil terbutílico a 7 rpm por 10 min y 2000 rpm por 20 min); y 4) Lavado básico, se eliminan los ácidos grasos libres y agentes residuales (solución básica de NaOH a 7 rpm por 5 min y 2000 rpm por 3 min).

Las muestras se analizaron con la librería TSBA6 en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890B GC System, usando gas helio como acarreador y usando el software Sherlock Versión 6.0 (MIDI Inc., Delaware, USA). Para bacterias Gram positivas se usaron



los siguientes biomarcadores: 027: 14:0 iso, 037: 15:0 iso, 048: 16:0 iso, 061: 17:0 iso, 062: 17:0 anteiso. Los biomarcadores de bacterias Gram negativas que se usaron fueron: 009: 10:0 2OH, 010: 10:0 3OH, 023: 12:0 2OH, 026: 12:0 3OH, 043: 14:0 2OH, 072: 16:0 2OH, 075: 16:0 3OH, 089: 19:0 cyclo w8c, 092: 18:0 2OH; para hongos: 105: 5-18:2w6,9; para actinobacterias: 093: 19:0 10-methyl, 073: 17:0 10-methyl, 084: 18:0 10-methyl; y para hongos micorrízicos arbusculares: 052: 16:1 w5c. Ver Ratledge y Wilkinson (1988) para la especificidad de biomarcadores FAME.

4.7 Extracción e identificación de colémbolos

Los colémbolos edáficos se extrajeron del suelo contenido en las mallas de los mesocosmos (Figura 6c), con la técnica de los embudos tipo Berlese-Tullgren (Palacios-Vargas y Mejía-Recamier, 2007). En cada muestreo a las 24 h y 4, 8 y 12 meses se tomaron dos bolsas de malla de cada mesocosmos, cada una con 200 g de suelo; el suelo se colocó dentro de los embudos de Berlese-Tullgren, en donde permanecieron durante 5 días (Figura 7a). Los colémbolos se colectaron en frascos de plástico con 20 mL de alcohol al 96 % para su conservación y almacenamiento. Se realizó un muestreo extra a los 18 meses debido a que se observó, principalmente en los tratamientos con planta, la presencia de otros morfotipos de colémbolos conforme iba transcurriendo la fitorremediación. Los colémbolos se separaron en morfotipos de los órdenes Poduromorpha y Entomobryomorpha bajo un microscopio estereoscópico Zeiss Stemi DV4 (Figura 7b).

Para la identificación taxonómica de los colémbolos, los especímenes fueron previamente aclarados manteniéndolos en ácido láctico durante 15 min a 45°C en un AccuBlock™ Mini-Compact Dry Bath para facilitar su identificación taxonómica.



Posteriormente, se hicieron preparaciones permanentes con medio de montaje Hoyer (Palacios-Vargas y Mejía-Recamier, 2007), y se secaron en una estufa a 45°C durante 5 días. Con un microscopio de contraste de fases (Zeiss), los morfotipos se identificaron a nivel de género o especie, utilizando las claves de Christiansen y Bellinger (1998), Bellinger *et al.* (1996-2017) y diferentes claves taxonómicas de las familias Isotomidae (Potapow, 2001), Tullbergiinae (Dunger y Schlitt, 2011), y de la subfamilia Capbryinae y tribu Entomobryini (Jordana, 2012). Por último, se contaron sus abundancias en cada muestra de cada tratamiento.

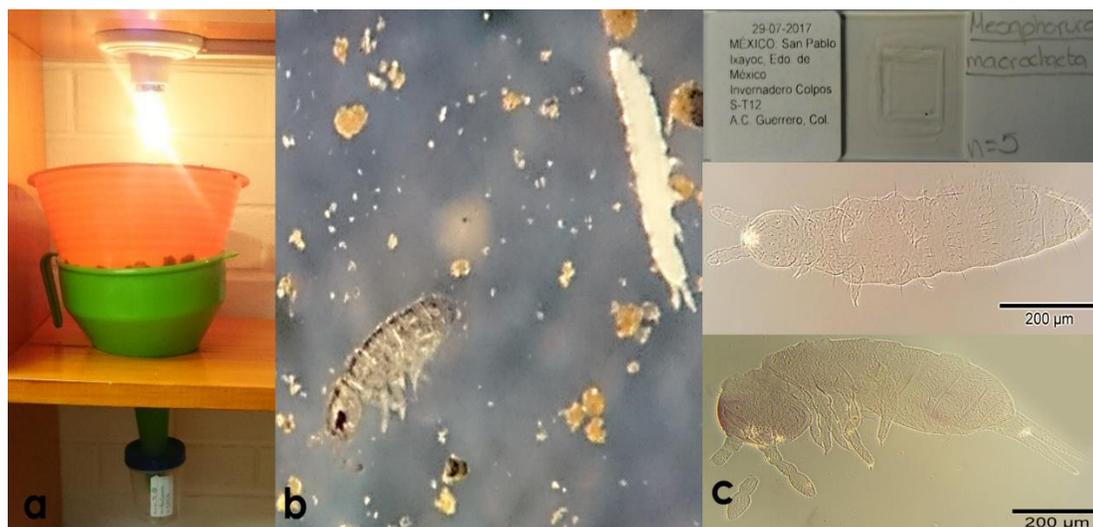


Figura 7. Extracción, montaje e identificación de la comunidad de colémbolos edáficos. a) Vista de un embudo tipo Berlese-Tullgren, b) Identificación de morfotipos: Entomobryomorpha (izquierda) y Poduromorpha (derecha), c) Vista de los colémbolos montados en laminillas permanentes para su identificación taxonómica.

4.8 Análisis de hidrocarburos totales del diésel

La extracción de hidrocarburos de cada una de las muestras de suelo se realizó por duplicado. Se pesaron 2 g de suelo de cada muestra, y se adicionaron 4 mL de hexano grado HPLC (Sigma-Aldrich), se mantuvo en agitación durante 30 min a 210 rpm, y



posteriormente, se separó la fase orgánica. Esto se repitió tres veces; y el extracto hexánico se dejó secar dentro de una campana de extracción a temperatura ambiente (30 °C), durante 12 h. El análisis de los hidrocarburos totales del diésel de los diferentes tratamientos se realizó por el método modificado EPA SW-846 Method 8270B (Louchouart *et al.*, 2000; USEPA, 1986) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS (Agilent Technologies, model 6890N, NetWork GC system) (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). El análisis de hidrocarburo se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA). Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz.

4.9 Análisis estadístico

Los datos de las propiedades físicas y químicas del suelo, así como de las unidades formadoras de colonias y de los hidrocarburos se normalizaron realizando una transformación logarítmica, para que los datos siguieran una distribución normal y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha= 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 6.2.9200 para Windows.

A los resultados de ácidos grasos se les aplicó un análisis GLM ya que no tuvieron distribución normal, y la prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha= 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS mencionado.



5. RESULTADOS

5.1 Propiedades químicas de los suelos

El porcentaje de materia orgánica (MO) incrementó conforme aumentó la concentración de diésel agregado al suelo y tuvo diferencias significativas entre los tratamientos cuatro meses después de la contaminación de acuerdo a la concentración de hidrocarburos, siendo D20 y PD20 los tratamientos con mayor porcentaje de MO en este muestreo. Después de un año de contaminación ya no hubo diferencias entre los tratamientos (Cuadro 4).

La relación C/N después de 4 meses de la contaminación presentó diferencias en PD10 con C y CP, siendo mayor en los tratamientos con planta que sin ésta. Aunque a los 8 meses disminuyó la relación en todos los tratamientos, las diferencias significativas entre tratamientos aumentaron, sin embargo, después de un año de la contaminación sólo existió diferencia entre los tratamientos D10 y D20. Desde el segundo muestreo (mes 4) la relación C/N en los tratamientos control (C y CP) y D10 ya fueron de un suelo equilibrado. En los siguientes muestreos, esta condición se apreció en todos los tratamientos.

5.2 Grupos funcionales microbianos

La abundancia de bacterias solubilizadoras de fosfatos y la concentración de fósforo tuvieron un comportamiento similar en el suelo control (C y CP), y en el suelo con mayor contaminación de diésel (D20 y PD20). Cuando la concentración de fósforo disminuyó a los 4 meses, la abundancia de bacterias aumentó y cuando la concentración de fósforo aumentó en los siguientes muestreos, la abundancia de bacterias disminuyó tanto en el suelo con planta como en el suelo sin planta (Figura 8a y c). Sin embargo, la concentración de fósforo fue más alta en el suelo sin planta con mayor contaminación (Figura 8b).



Por otro lado, en el suelo con una concentración media de diésel hubo un aumento en la abundancia de bacterias en el segundo muestreo (4 meses) en D10, mientras que este aumento en la abundancia en el tratamiento con planta (PD10) sucedió hasta el tercer muestreo (8 meses) (Figura 8b).

La abundancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno y el porcentaje de nitrógeno en el suelo tuvieron un comportamiento similar en los suelos contaminados con planta y sin ésta (Figura 8d-e). En el segundo muestreo (mes 4) el porcentaje de nitrógeno y la abundancia de bacterias aumentaron; este aumento en las UFC bacterianas fue mayor en los tratamientos sin planta (D10 y D20). En los siguientes muestreos, el porcentaje de nitrógeno fue homogéneo y sólo presentó diferencia en el tercer muestreo (mes 8) en los tratamientos con 10,000 mg diésel kg^{-1} (Cuadro 5), mientras que la abundancia de bacterias disminuyó (Figura 7 e-f). Los tratamientos sin contaminante (Figura 8d) tuvieron un comportamiento más estable; al aumentar el porcentaje de nitrógeno, la abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno disminuyó (Figura 8d).

Los primeros nódulos del tipo indeterminado, se encontraron después de 8 meses, en una sola planta del tratamiento PD10 (datos no presentados). A los 12 meses se encontraron nódulos en todos los tratamientos; aunque el número de nódulos disminuyó al aumentar la concentración de diésel. Sin embargo, sólo se observó diferencia significativa entre las plantas establecidas en el control con respecto a las plantas creciendo en la concentración de 20,000 mg diésel kg^{-1} (Cuadro 4).

Las bacterias de rápido crecimiento mostraron la misma tendencia entre las diferentes concentraciones de diésel (Figura 9a-c). A los 4 meses hubo un incremento en la abundancia de estas bacterias, siendo mayor en los tratamientos contaminados sin planta (D10 y D20), pero en los siguientes muestreos esta abundancia disminuyó. En el suelo C la abundancia fue



mayor que en el suelo CP a los 4 meses; sin embargo, para los siguientes muestreos esta tendencia se invirtió y hubo mayor abundancia en los tratamientos con planta (Figura 9a).

La tendencia en la abundancia de las bacterias lipolíticas fue diferente a los demás grupos funcionales bacterianos evaluados, ya que se modificó de acuerdo a la concentración de diésel. Los tratamientos C y CP no presentaron diferencias en ninguno de los muestreos, aunque el tratamiento CP mostró mayor abundancia a los 12 meses, sin embargo no fue significativa (Figura 9d). El tratamiento D10 tuvo una tendencia similar al C, contrario a PD10, que la abundancia aumentó en cada muestreo y en el último muestreo registró la mayor abundancia de este grupo funcional bacteriano (Figura 9e).

El suelo con mayor contaminación sin planta (D20) tuvo menor abundancia de bacterias lipolíticas en el primer muestreo (24 h), y durante los demás muestreos se observó la misma tendencia que en los otros tratamientos sin planta (C y D10). El tratamiento con planta (PD20) aumentó la abundancia de bacterias lipolíticas en los 3 muestreos pero después de un año disminuyó, aunque la abundancia fue mayor que en el tratamiento sin planta (Figura 9f).

Cuadro 4. Número de nódulos encontrados después de doce meses de la contaminación tomando 10 plantas por tratamiento por cada mesocosmos con planta.

Tratamientos con <i>Medicago sativa</i>	Número de nódulos
Control	52±10.3 a
PD10	27±9.02 ab
PD20	16±4 b

Simbología: PD10: *M. sativa* con diésel 10,000 mg kg⁻¹; PD20: *M. sativa* con 20,000 mg kg⁻¹.

Letras diferentes son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). Promedio \pm error estándar, n=10

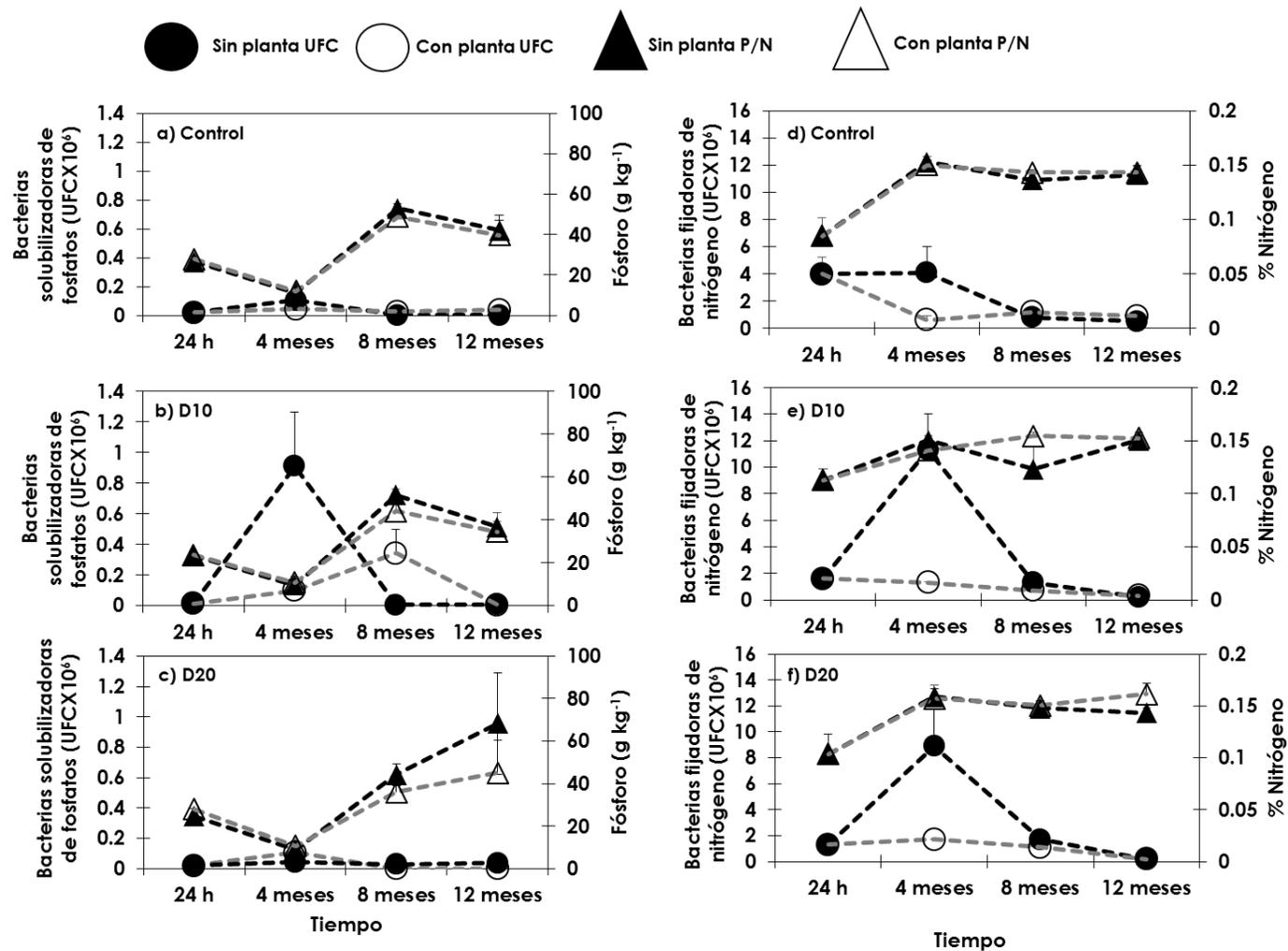


Figura 8. Relación entre bacterias solubilizadoras de fosfatos y concentración de fósforo (izquierda), y bacterias fijadoras de nitrógeno y porcentaje de nitrógeno en el suelo (derecha) a lo largo de los cuatro muestreos (24 h, 4, 8 y 12 meses) en los seis tratamientos (C, D10, D20 CP, PD10 y PD20). (LSD, $\alpha=0.05$ n=3).



Cuadro 5. Análisis químicos del suelo en los cuatro muestreos en todos los tratamientos. Carbono orgánico (CO) y materia orgánica (MO) se muestran en porcentaje. El fósforo se expresó en mg/kg-1; la capacidad de intercambio catiónico (CIC); potasio (K) y calcio (Ca) se expresaron en cmol⁽⁺⁾ kg⁻¹.

Muestreo	Tratamientos	%MO	%CO	%N	Relación C/N	P(mg kg ⁻¹)	CIC	K	Ca
24 h	C	3.73±0.44b	2.16±0.25b	0.09±0.01a	27.9±6.6a	26.63±1.4a	8.5±3.4a	0.55±0.05a	6.28±0.7a
	D10	4.51±0.19b	2.61±0.11ab	0.11±0.01a	23.6±2.9a	23.4±0.5b	15.6±4.2a	0.66±0.01a	6.93±0.9a
	D20	5.62±0.35a	3.26±0.2a	0.1±0.01a	33.4±5.6a	24.6±0.3ab	12.3±4.1a	0.61±0.01a	8.05±0.4a
4 meses	C	3.44±0.14c	1.98±0.08b	0.15±0.002a	12.97±0.7b	11.1±0.07a	28±2 a	0.58±0.008 a	20.7±0.1 a
	D10	4.34±0.14b	2.50±0.08ab	0.15±0.004a	16.67±1ab	9.58±2a	25.1±1.8 a	0.56±0.02 a	1.87±0.2 a
	D20	5.36±0.08a	3.08±0.04ab	0.16±0.01a	19.58±1.5ab	9.15±1.6a	25.1±1.5 a	0.55±0.003 a	1.66±0.1 a
	CP	3.46±0.04c	1.99±0.02b	0.15±0.008a	13.33±0.6b	11.97±0.8a	24.5±2.8 a	0.45±0.01 b	1.72±0.02 b
	PD10	4.46±0.05b	3.56±1.02a	0.14±0.004a	24.96±6.4a	10.74±2.8a	23.2±0.5 a	0.48±0.02 b	1.34±0.4 b
	PD20	5.59±0.2a	3.21±0.11ab	0.16±0.009a	20.67±1.8ab	10.81±2.3a	23.8±1.9 a	0.58±0.02 a	1.71±0.3 a
8 meses	C	3.01±0.12c	1.73±0.06d	0.14±0.002ab	12.71±0.3bc	53.08±2.3a	18.3±4 a	0.44±0.07 c	5.35±0.6 c
	D10	3.68±0.2b	2.11±0.11c	0.12±0.02b	18.08±2.7a	51.64±2.5a	22.5±2.4 a	0.76±0.09 a	5.77±0.3 a
	D20	4.12±0.13a	2.37±0.07a	0.15±0.004ab	16.04±0.9ab	44.28±5ab	25.5±0.8 a	0.65±0.03 ab	4.36±0.1 ab
	CP	2.88±0.05c	1.66±0.02d	0.14±0.002ab	11.57±0.3c	48.89±6.1a	24.2±0.8 a	0.49±0.05 bc	5.61±0.3 bc
	PD10	3.15±0.04c	1.81±0.02d	0.15±0.003a	11.70±0.4c	44.08±3.9ab	23.3±1.7 a	0.55±0.04 bc	4.34±0.4 bc
	PD20	4.43±0.2a	2.55±0.11b	0.15±0.004ab	17.02±1.2a	36.10±3b	25.5±4.4 a	0.64±0.03 ab	3.74±0.1 ab
12 meses	C	3.81±0.9a	2.19±0.5a	0.14±0.007a	15.21±2.7ab	42.22±7.2a	16.5±3.7 a	0.72±0.1 a	4.81±0.6 a
	D10	3.15±0.04a	1.81±0.02a	0.15±0.004a	12.05±0.4b	36.72±6.7a	22.5±0.5 a	0.67±0.02 ab	6.19±0.4 ab
	D20	4.08±0.09a	2.34±0.05a	0.14±0.004a	16.37±0.4a	68.41±23.8a	21.2±0.3 a	0.65±0.1 ab	6.88±0.4 ab
	CP	3.81±0.12a	1.89±0.06a	0.14±0.006a	13.25±1ab	39.82±3.6a	24±4.3 a	0.35±0.02 c	5.04±0.3 c
	PD10	3.15±0.08a	2.14±0.04a	0.15±0.005a	14.09±0.5ab	34.38±5a	19.5±1.3 a	0.53±0.02 bc	5.18±0.2 bc
	PD20	4.08±0.25a	2.47±0.14a	0.16±0.01a	15.44±1.3ab	45.11±15.4a	19.3±1.6 a	0.57±0.003 ab	7.05±2.2 ab

Simbología: C) Control; D10) Suelo con 10 000 mg kg⁻¹ de diésel; D20) Suelo con 20 000 mg kg⁻¹ de diésel; CP) Control con *M. sativa*; PD10) Suelo con 10,000 mg kg⁻¹ y *M. sativa*; PD20) Suelo con 20,000 mg kg⁻¹ y *M. sativa*. Letras diferentes en un mismo muestreo para cada variable, son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). Promedio \pm error estándar, n=3.

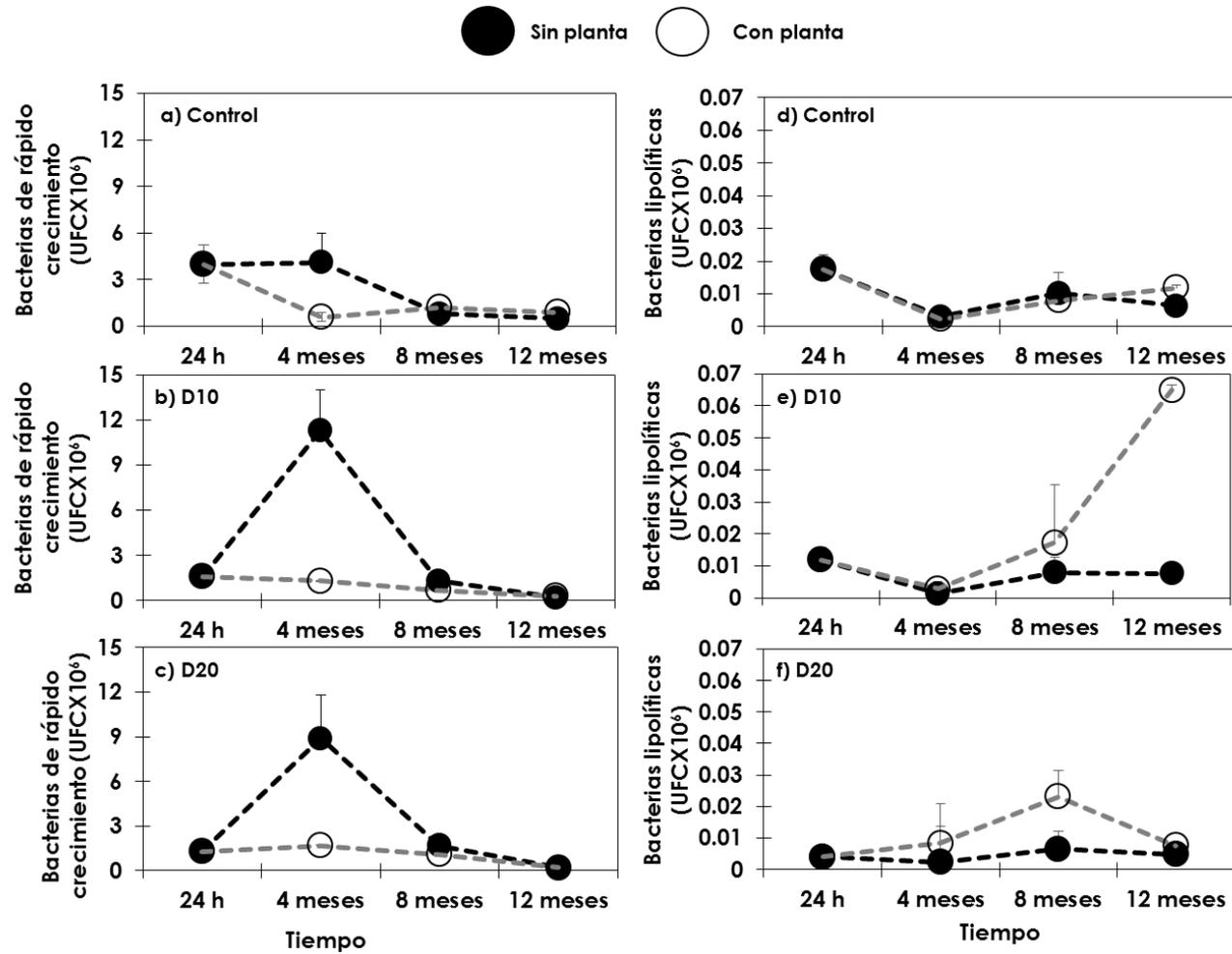


Figura 9. Bacterias de rápido crecimiento (izquierda), y lipolíticas (derecha) a lo largo de los cuatro muestreos (24 h, 4, 8 y 12 meses) en los seis tratamientos (C, D10, D20, CP, PD10 y PD20) (LSD, $\alpha=0.05$ n=3).



5.3 Ácidos grasos totales

Al comparar las concentraciones (nmol) de ácidos grasos de los diferentes microorganismos, se observó que tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas tuvieron el mismo comportamiento (Figura 10a-c), aunque se observó mayor abundancia de ácidos grasos de bacterias Gram positivas (Figura 10d-f). Independientemente de la presencia de *Medicago*, los suelos con mayor concentración de hidrocarburos mostraron mayor abundancia de ácidos grasos de bacterias y hongos totales, con respecto a los tratamientos sin diésel (Figura 11). En los tratamientos sin diésel (C y CP) no se observaron diferencias en la abundancia de ácidos grasos de ambos grupos microbianos (Figura 11).

La concentración de ácidos grasos de actinobacterias (Figura 12a-c) fue menor que la de bacterias totales (Figura 11a-c), y la concentración de ácidos grasos tuvo la tendencia de aumentar conforme incrementó la concentración de diésel, particularmente en la concentración de 20,000 mg kg⁻¹ (Figura 12a-c). Con este grupo microbiano la planta no tuvo un efecto rizosférico significativo en ninguno de los tratamientos ya que no se encontraron diferencias estadísticas.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) tuvieron la menor abundancia de ácidos grasos de los diferentes grupos microbianos evaluados. Estos hongos mostraron alta sensibilidad al diésel ya que a los 4 meses de la contaminación, la abundancia de ácidos grasos fue baja o no se detectó (Figura 11d). Después de 8 y 12 meses, se observó un aumento significativo en la abundancia de los ácidos grasos, particularmente en los tratamientos con planta con la concentración más alta de diésel (Figura 11e-f)

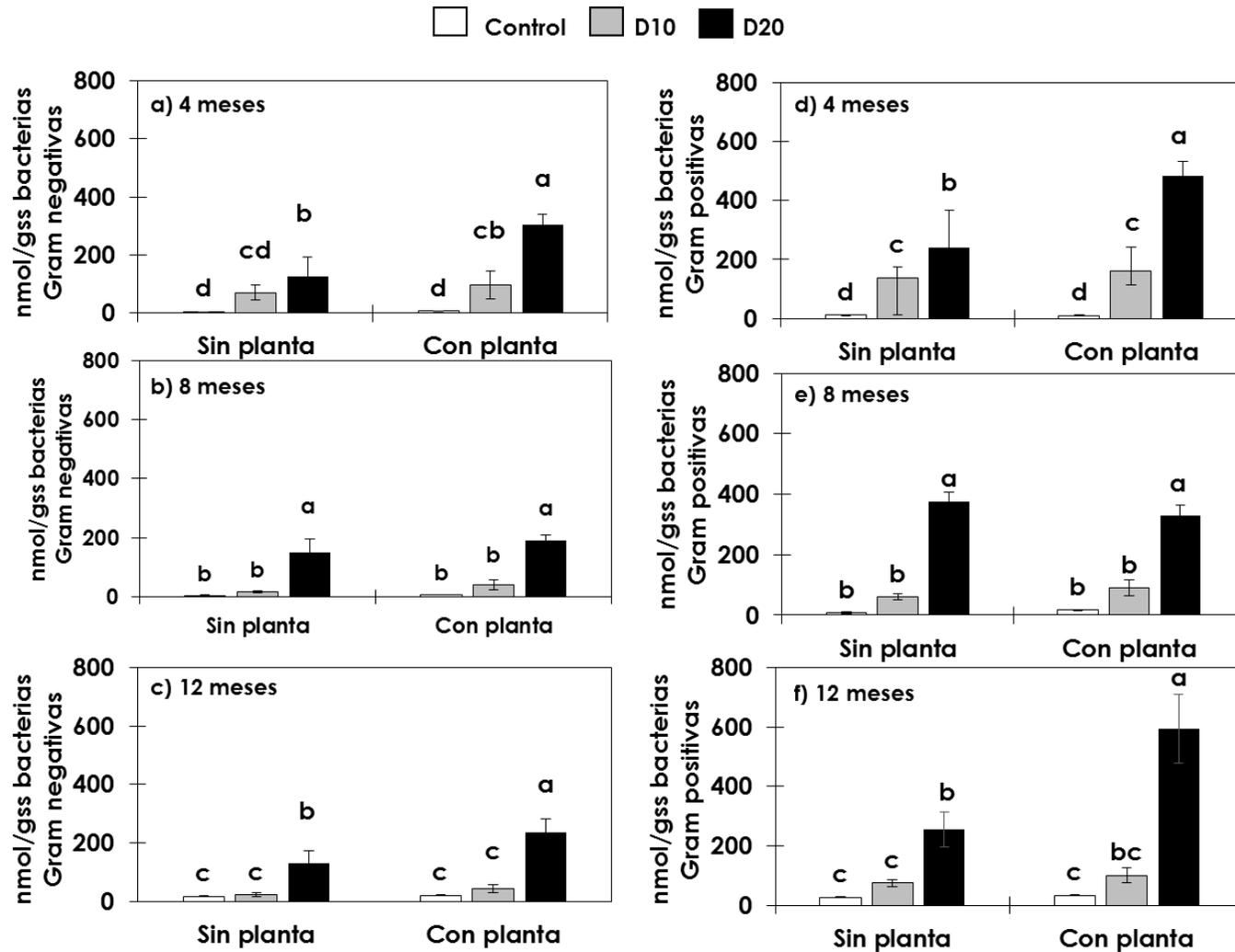


Figura 10. Concentración de ácidos grasos de bacterias Gram negativas (izquierda), y Gram positivas (derecha) en los seis tratamientos en tres muestreos 4, 8 y 12 meses). Letras diferentes indican diferencias significativas en cada muestreo ($n=3$, $LSD \alpha=0.05$).

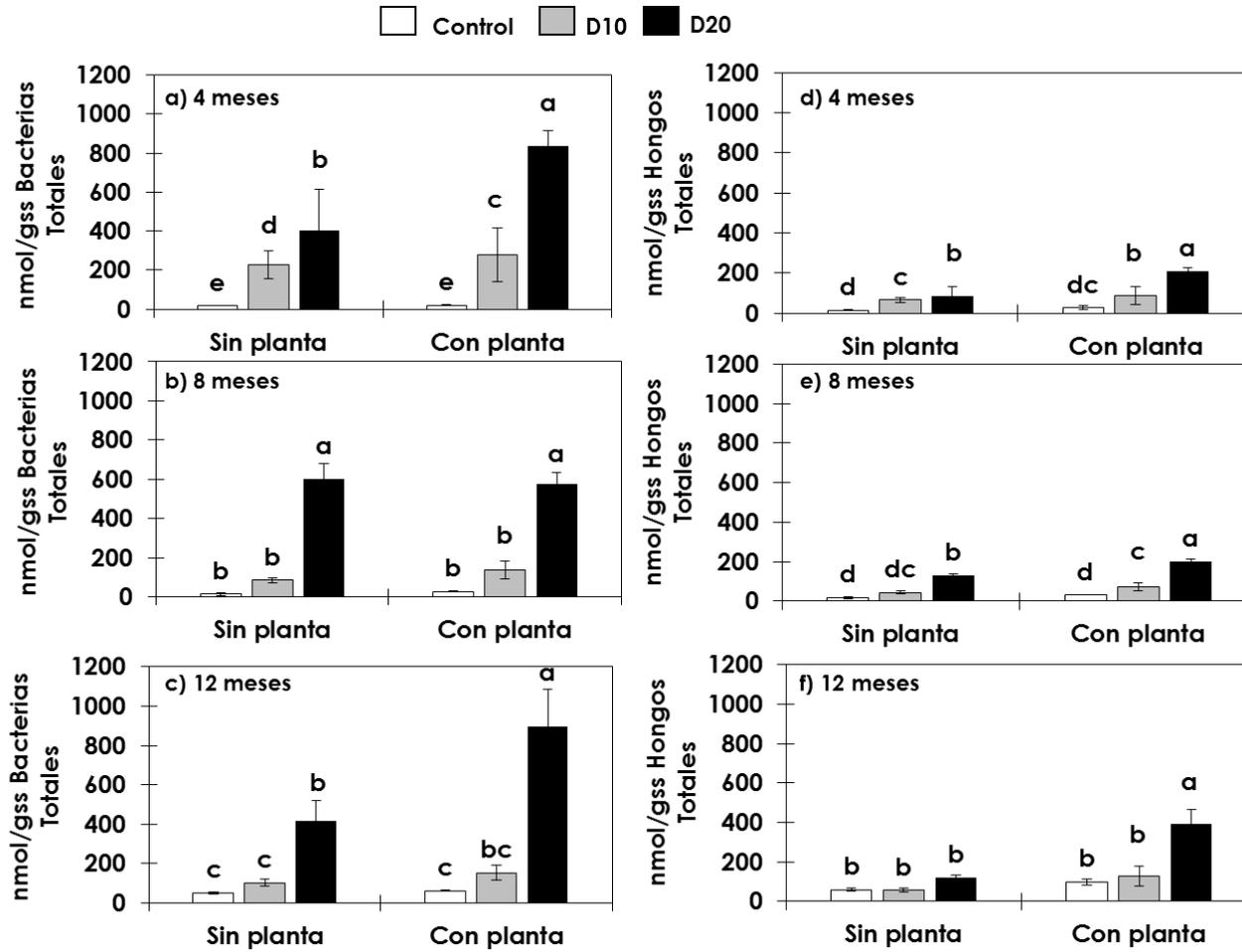


Figura 11. Concentración de ácidos grasos de bacterias totales (izquierda), y hongos totales (derecha) en los diferentes tratamientos en tres muestreos (4, 8 y 12 meses). Letras diferentes indican diferencias significativas en cada muestreo ($n=3$, $LSD \alpha=0.05$).

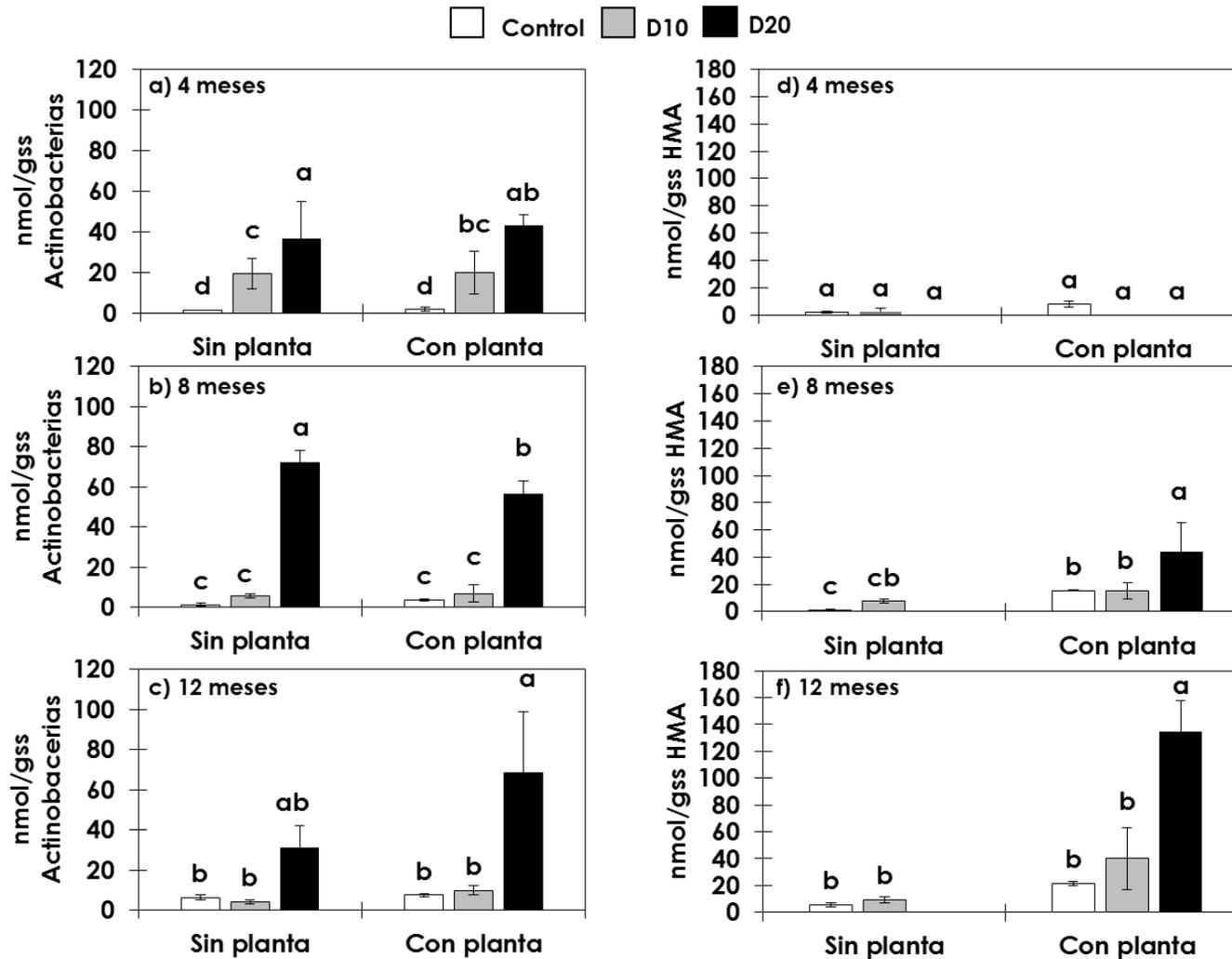


Figura 12. Concentración de ácidos grasos de actinobacterias (izquierda), y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) (derecha) en los diferentes tratamientos en tres muestreos. Letras diferentes indican diferencias significativas en cada muestreo (n=3, LSD $\alpha=0.05$)



5.4 Abundancia de colémbolos edáficos

Un total de 1307 colémbolos fueron colectados, encontrándose un total de 3 especies comprendidas dentro de 4 géneros y 5 familias. En los tratamientos con planta en el suelo control, en los muestreos de 4, 8 y 12 meses, en donde se encontró la mayor abundancia de colémbolos del orden Poduromorpha; mientras que en el suelo contaminado con 20,000 mg kg⁻¹ se detectaron solo dos individuos hasta los 12 meses (Cuadro 6). Sin embargo, la mayor abundancia de colémbolos poduromorfos (1191 individuos) se contabilizó en el tratamiento con planta a los 4 meses. Los colémbolos del orden Entomobryomorpha no se observaron en ninguno de los tratamientos sin planta, sólo hasta el muestreo a los 18 meses se encontró la mayor cantidad de individuos en los tratamientos con 10,000 y 20,000 mg kg⁻¹, con 8 y 30 individuos, respectivamente. En los muestreos previos a los 18 meses solo se observaron 4 individuos a los 4 meses, y 2 individuos a los 12 meses, de colémbolos del orden Entomobryomorpha.

Los individuos encontrados del orden Poduromorpha, correspondieron principalmente a la especie *Mesaphorura macrochaeta* (Rusek, 1976) (Anexo), y en muy baja abundancia se encontraron dos morfoespecies que solo se identificaron a nivel de género. En relación a los colémbolos del orden Entomobryomorpha detectados al mes 4 en el tratamiento control con planta (CP), correspondieron a dos diferentes géneros *Proisotoma* e *Isotomurus* (Anexo) y en el caso del tratamiento control a los 12 meses, solo se encontró un individuo de la familia Hypogastruridae y en el tratamiento PD20 se detectó un individuo del género *Proisotoma*. En el muestreo del mes 18, los colémbolos identificados en el tratamiento PD20 (Cuadro 6) correspondieron al género *Entomobrya*, con dos morfotipos diferentes (Anexo). A través de este estudio se detectó una abundancia baja de colémbolos en los diferentes tratamientos evaluados, en general, en los tratamientos sin planta con o sin diésel es donde no se observó



presencia de colémbolos, en comparación con los tratamientos con planta, *M. sativa*, donde se observó mayor presencia de colémbolos, principalmente en el control con planta sin diésel.

Cuadro 6. Abundancia de colémbolos pertenecientes a los dos órdenes, identificados en los cuatro muestreos (meses) en los diferentes tratamientos en presencia o ausencia de planta, *Medicago sativa*.

Orden de Colémbolos	Diésel (mg kg ⁻¹)	Sin planta				Con planta			
		4	8	12	18	4	8	12	18
Poduromorpha	Control	1	0	6	0	1191	28	34	0
	D10	0	0	0	0	0	0	0	0
	D20	0	0	0	0	0	0	2	0
Entomobryomorpha	Control	0	0	1	0	4	0	0	0
	D10	0	0	0	0	0	0	0	8
	D20	0	0	0	0	0	0	2	30

Simbología: D10: diésel 10,000 mg kg⁻¹; D20: diésel 20,000 mg kg⁻¹.

5.5 Degradación de hidrocarburos del diésel

Después de 12 meses, los tratamientos D10, D20 y PD10 mostraron, en promedio, 90% de degradación de hidrocarburos, mientras que el tratamiento PD20, mostró 60% de degradación (Figura 13). En la Figura 14, se observan los cromatogramas obtenidos a las 24 h después de la contaminación con ambas concentraciones de diésel, detectándose hidrocarburos saturados con cadenas de entre 12 y 20 carbonos (Figura 14). En la Figura 15 se muestran los cromatogramas de todos los tratamientos después de 12 meses, observándose que en los tratamientos contaminados con 20,000 mg kg⁻¹ sin planta y con planta mostraron hidrocarburos remanentes (con cadenas entre 19 y 22 carbonos, y cadenas entre 15 y 18 carbonos, respectivamente) (Figura 15e y f), mientras que en los tratamientos con 10,000 mg kg no se detectaron hidrocarburos remanentes (Figura 15c y d). No se detectaron hidrocarburos en las muestras de los tratamientos control con o sin planta (Figura 15a y b).

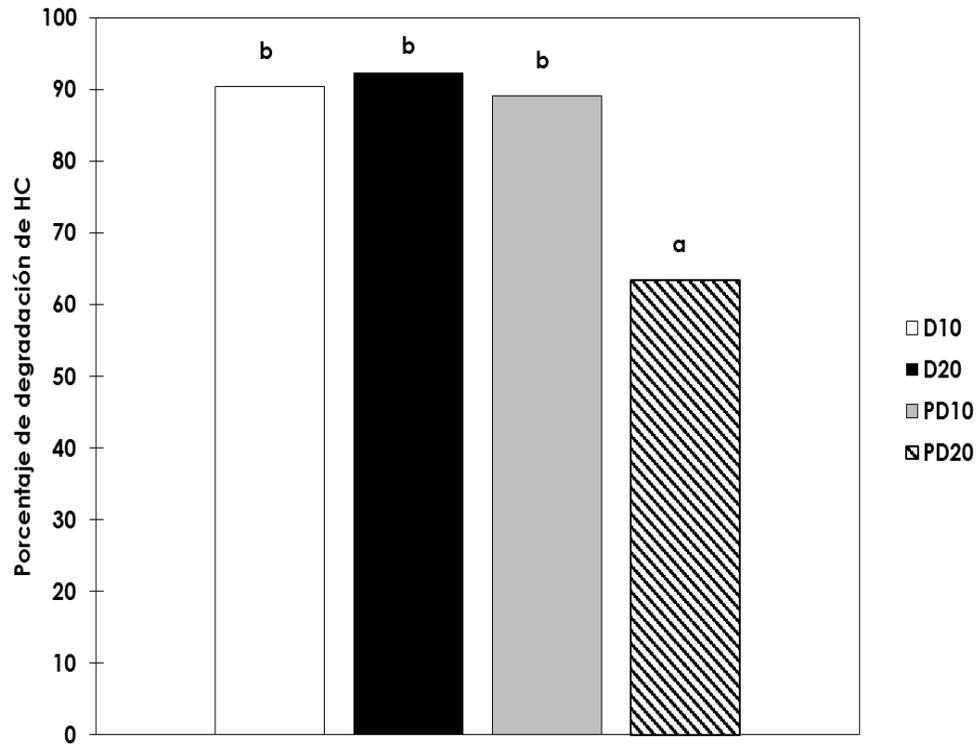


Figura 13. Porcentaje de degradación de hidrocarburos del diésel después de 12 meses en todos los tratamientos. Letras diferentes en cada muestreo indican diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$ n=6).

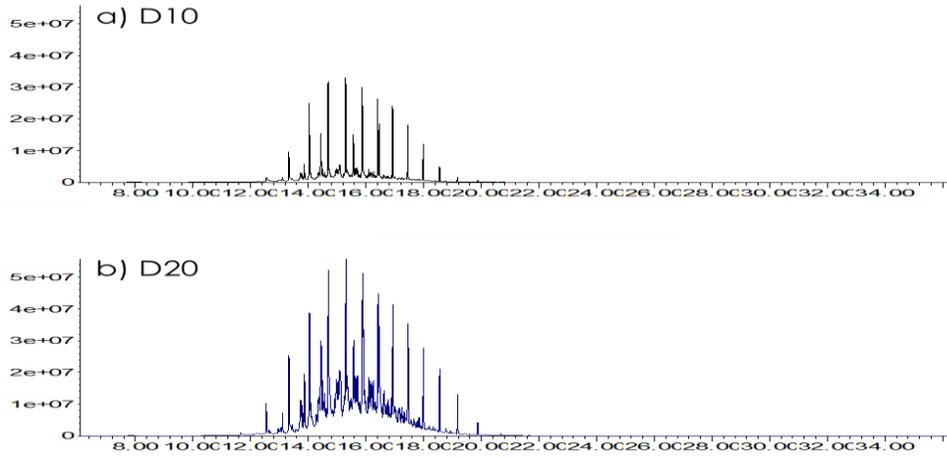


Figura 14. Abundancia de hidrocarburos del diésel a) 10,000 mg kg⁻¹ y b) 20,000 mg kg⁻¹, después de 24 h de contaminación en los tratamientos sin planta.

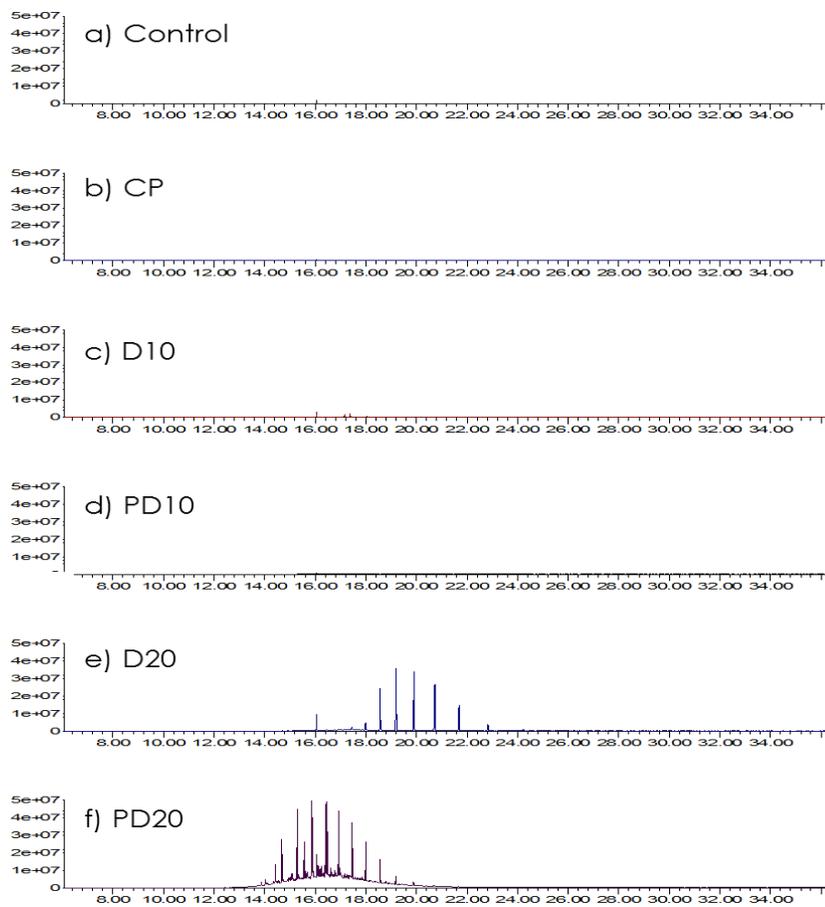


Figura 15. Abundancia de hidrocarburos del diésel a los 12 meses después de la contaminación en los seis tratamientos.



6. DISCUSIÓN

6.1 Grupos funcionales microbianos

Después de 12 meses, el tratamiento PD20 tuvo mayor porcentaje de nitrógeno en comparación con el tratamiento D20. Lo anterior se relaciona con aquellas respuestas reportadas por Mukhopadhyay *et al.* (2017) quienes encontraron que el contenido de N fue más alto en un suelo contaminado cultivado con cuatro especies de leguminosas (*Albizia lebbbeck*, *Cassia siamea*, *Delonix regia*, y *Dalbergia sissoo*) en comparación con un suelo sin vegetación y con lo reportado por Piehler *et al.* (1999), que atribuyeron el incremento de nitrógeno a la fijación de este elemento por bacterias de vida libre, a la disponibilidad del diésel, al aumento de la biomasa bacteriana y al incremento de la actividad metabólica.

Contrario al nitrógeno, la concentración de fósforo fue menor en los tratamientos con planta (CP, PD10 y PD20). Las leguminosas son capaces de producir fosfatasas en el suelo (Houlton *et al.*, 2008), además de estimular a las poblaciones bacterianas solubilizadoras de fosfatos. Las UFC de bacterias solubilizadoras de fosfatos fueron más altas en los tratamientos con planta después de 8 meses, excepto en el suelo con mayor concentración de diésel, en el que se presentó mayor abundancia de UFC desde los 4 meses.

Los grupos bacterianos lipolíticos y solubilizadores de fosfatos fueron más altos en los suelos con una contaminación media en ausencia de la planta D10; mientras que en los tratamientos con planta, el grupo bacteriano lipolítico fue más abundante con la concentración más alta de diésel. Morales-Guzmán *et al.* (2017) encontraron las poblaciones más altas de bacterias lipolíticas y solubilizadoras de fosfatos en suelos con mayores concentraciones de hidrocarburos de petróleo intemperizado (50,000 y 150,000 mg kg⁻¹); no obstante, estas poblaciones bacterianas fueron mayores a las encontradas en el presente



trabajo. Mujibur-Rahman *et al.* (2002) encontraron que las bacterias lipolíticas son más abundantes en los sitios con mayor concentración de diésel, lo cual puede ser debido a la riqueza de fuentes de lípidos disponibles en sitios con diésel. Maletic *et al.* (2009) evaluaron las poblaciones de diferentes grupos bacterianos (organotróficos, oligotróficos facultativos, lipolíticos y bacterias oxidantes de aceite) en un suelo con altas concentraciones de hidrocarburos, tratado con biopilas, encontrando que durante el experimento la abundancia de UFC de todos los grupos bacterianos fue mayor que al inicio, y después de 500 días, todos los grupos bacterianos redujeron su abundancia. Rončević *et al.* (2005) observaron que en un suelo contaminado con hidrocarburos, la abundancia de bacterias incrementaba significativamente cuando la concentración de hidrocarburos aumentaba, y cuando los hidrocarburos disminuyeron, también lo hizo la abundancia bacteriana.

Dentro de los grupos funcionales bacterianos evaluados, las bacterias de rápido crecimiento fue el grupo más abundante. Los tratamientos con diésel sin planta (D10 y D20) mostraron el mayor número de UFC (12×10^6 y 9×10^6 , respectivamente), pero en los siguientes muestreos, las UFC disminuyeron. Algunos estudios han reportado que ante bajas concentraciones de diésel (2.98 mg g^{-1}) se han encontrado menos UFC de bacterias de rápido crecimiento (2.1×10^8) (Mujibur-Rahman *et al.*, 2002), mientras que en suelos con mayor contaminación ($41,400 \text{ mg kg}^{-1}$ de hidrocarburos totales y 3.57 mg kg^{-1} de hidrocarburos aromáticos policíclicos), se registraron conteos altos (10^8 – 10^9 UFC g^{-1}) de bacterias de rápido crecimiento (Maletic *et al.*, 2009).



6.2 Ácidos grasos totales

La concentración de ácidos grasos de hongos y bacterias incrementó conforme aumentó la concentración de diésel en el suelo, y las bacterias fueron más abundantes que los hongos. Esta diferencia en la abundancia microbiana es común en los suelos contaminados con hidrocarburos (Bourceret *et al.*, 2016), y el aumento en la abundancia de microorganismos con altas concentraciones de hidrocarburos se ha reportado previamente (Blakely *et al.*, 2002; Margesin *et al.*, 2007). Lo anterior se puede atribuir probablemente, al alto contenido de carbono derivado por la contaminación con diésel (Bourceret *et al.*, 2016).

La concentración de ácidos grasos de todos los grupos microbianos encontrados en los tratamientos con 20,000 mg kg⁻¹ (D20 y PD20) fue significativamente mayor que en los tratamientos con 10,000 mg kg⁻¹ (D10 y PD10), y en los tratamientos control (C y CP), principalmente de bacterias Gram positivas. Las bacterias Gram positivas tiene importancia en los sistemas contaminados con hidrocarburos (Cébron *et al.*, 2008; Kawasaki *et al.*, 2016); además, en los suelos sujetos a algún tipo de biorremediación (bioaumentación, bioestimulación, fitorremediación), presentan bacterias Gram negativas en mayor abundancia (Esin *et al.*, 2013). La respuesta de protección de las bacterias Gram positivas ante la presencia de hidrocarburos se refleja en el aumento de su abundancia, mientras que la respuesta de la comunidad de bacterias Gram negativas se relaciona con la modificación de su membrana y no en el aumento de su biomasa (Bastida *et al.*, 2016). Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen un desempeño principal en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo, al ser más tolerantes y mostrar mayor diversidad (Ding *et al.*, 2009; Bastida *et al.*, 2016; Thomas y Cébron, 2016; Iffis *et al.*, 2017).

La concentración de ácidos grasos tanto de hongos filamentosos como de bacterias fue significativamente mayor en el tratamiento con 20,000 mg kg⁻¹ con planta (PD20). Bastida



et al. (2016) observaron que el contenido de ácidos grasos de hongos fue mayor en el suelo con petróleo después de 50 días, comparado con un suelo sin contaminante, y al agregar una planta, la biomasa de bacterias como de hongos filamentosos aumentó (Joner *et al.*, 2001).

La concentración de ácidos grasos de actinobacterias, al igual que los otros grupos microbianos, aumentó conforme aumentó la concentración de diésel. El aumento en las poblaciones de actinobacterias en los sitios con mayor concentración de diésel ya se ha reportado antes (Mujibur-Rahman *et al.*, 2002).

Los ácidos grasos de los HMA aumentaron por efecto de la concentración de diésel, la presencia de *M. sativa* y del tiempo. Franco-Ramírez *et al.* (2007) encontraron que los HMA están presentes en la rizósfera de las plantas en suelos crónicamente contaminados con petróleo, y que éstos pueden tener importancia en la adaptación y crecimiento de sus hospederos; aun cuando la germinación de esporas de HMA y la longitud de las hifas es afectada por la presencia de diferentes hidrocarburos. Lo anterior puede explicar la baja concentración de ácidos grasos de estos microorganismos, incluso a los 4 meses; sin embargo, a los 12 meses, la concentración de ácidos grasos aumentó por efecto de la disminución de los hidrocarburos del diésel en el suelo (< 40%).

6.3 Abundancia de colémbolos edáficos

En comparación con la abundancia de colémbolos a nivel de orden y suborden encontrados en el suelo de la parcela de maíz, al aplicar los tratamientos de estudio, las abundancias disminuyeron considerablemente, observándose mayor efecto en los tratamientos sin planta. Después del montaje de los mesocosmos y en los primeros muestreos (24 h y 4 meses), la abundancia de colémbolos fue alta en los tratamientos con planta. En



subsiguientes muestreos (8 y 12 meses) la abundancia de poduromorfos disminuyó considerablemente. Lo anterior es un indicio que la presencia de plantas es un factor que favorece la presencia de organismos del suelo como son los colémbolos del género *Mesaphorura* que habitan en ambientes euedáficos, es decir en la zona de las raíces (Potapov *et al.*, 2016), y que se caracterizan por ser de tamaño pequeño, incoloros, sin ocelos y sin fúrcula (Christiansen, 1964). En los tratamientos con diésel solo se pudieron encontrar dos individuos en el tratamiento PD10; después de 12 meses de la fitorremediación. Estos resultados pueden ser debidos a la sensibilidad que tienen los colémbolos poduromorfa a la contaminación con hidrocarburos (Blakely *et al.*, 2002; Cébron, 2011). Contrariamente a los poduromorfos, los colémbolos entomobriomorfos comenzaron a aumentar sus abundancias en los tratamientos con mayor concentración de diésel en presencia de planta, *M. sativa* (PD20). Gillet y Ponge (2005) observaron que la contaminación del suelo con hidrocarburos afecta la riqueza pero no la abundancia de colémbolos, ya que en un suelo con hidrocarburos poliaromáticos ($5.95 \mu\text{g g}^{-1}$) encontraron 9 especies de colémbolos, comparado con un suelo sin contaminantes, donde encontraron 27 especies; sin embargo, la abundancia entre ambos tratamientos fue similar. Contrariamente a lo observado por Gillet y Ponge (2005), en los tratamientos con diésel, con planta o sin planta (D10, D20, PD10, PD20), se observó escasas, sin embargo, como fue transcurriendo el tiempo de remediación la riqueza de entomobriomorfos fue incrementándose; encontrándose especies de los géneros *Isotoma*. Cébron *et al.* (2011) atribuyeron el incremento de organismos epi- y hemiedáficos, como *Isotoma*, al aumento en la hojarasca del suelo debido a presencia de vegetación en un suelo contaminado, más que a la disminución del hidrocarburo en la matriz edáfica. En los tratamientos con diésel y planta, *M. sativa*, es posible que conforme fue desarrollándose la planta, esto originó que se observara presencia de colémbolos entomobriomorfos que habitan



en nichos cerca de la superficie del suelo (Potapov *et al.*, 2016), donde se empezaba a acumular residuos del follaje de la alfalfa.

Los colémbolos son sensibles no sólo a la contaminación por hidrocarburos (Rusin y Gospodarek, 2016), sino también a la perturbación mecánica a la que se somete el suelo (Marschner *et al.*, 2001; Melekhina *et al.*, 2015). Gillet y Ponge (2004) encontraron que la estructura del suelo afecta más la diversidad de colémbolos que la presencia de contaminantes como metales pesados, y Blakely *et al* (2002) observaron que el cambio en la estructura del suelo generado por la presencia de hidrocarburos del petróleo (11,500–37,500 mg kg⁻¹) afectó en mayor proporción la estructura de las comunidades de mesofauna en comparación con la toxicidad de los hidrocarburos. En sistemas contaminados, las familias con mayor abundancia fueron Isotomidae, Entomobryidae y Onychiuridae (Uwabe *et al.*, 2014; Rusin y Gospodarek 2016); estas familias además de ser tolerantes al cambio en la estructura del suelo, contribuyen también a la degradación de lignina. En este estudio se encontraron escasos individuos que pertenecían a las dos primeras familias mencionadas, lo cual podría indicar que el manejo del suelo (cernido) antes de la aplicación de los tratamientos, fue un factor que afectó la abundancia de las especies de estas familias.

La especie de colémbolos más abundante encontrada en la presente investigación fue *Mesaphorura macrochaeta*. En los tratamientos con 20,000 mg kg⁻¹ en presencia de planta, *M. sativa* (PD20) se encontraron dos organismos de la especie, y en el tratamiento con 10,000 mg kg⁻¹ (PD10) no se encontraron individuos de esta especie. El género *Mesaphorura* (principalmente las especies *M. macrochaeta*, *M. yossi*, y *M. floriae*) es un buen indicador de la toxicidad del suelo contaminado con metales pesados (Niklasson *et al.*, 2000) y con hidrocarburos (Boitaud *et al.*, 2006). En este estudio se observaron al inicio del experimento (4 meses) una abundancia muy alta de *M. macrochaeta*, sin embargo, al aplicar los



tratamientos con diésel y planta (PD10 y PD20), la presencia de esta especie prácticamente no se observó. Estos resultados coincidieron con Boitaud *et al.* (2006) quienes indican que *M. macrochaeta* es muy sensible a la contaminación con diésel.

Similarmente, se encontraron dos individuos del género *Proisotoma* después de 4 meses en el tratamiento CP. Sin embargo, al aplicar los tratamientos con diésel no se observaron en los suelos con este contaminante, lo cual indica que también son muy sensibles a la contaminación con hidrocarburos del diésel. De acuerdo con Princz *et al.* (2012) la abundancia de este género disminuye significativamente en presencia hidrocarburos.

A los 18 meses de tratamiento de biorremediación en los suelos con planta, (*M. sativa*, PD20) se encontraron colémbolos del género *Entomobrya* los cuales se caracterizan por habitar en ambientes epiedáficos; que habitan en la capa superior de la hojarasca (Potapov *et al.*, 2016). Estos colémbolos son de tamaño mediano o grande, con una coloración pronunciada y en la mayoría de los casos tienen 8 ocelos y largas fúrculas (Christiansen, 1964). García-Segura *et al.* (2017) mencionan que el petróleo puede ser una fuente de alimento para algunos organismos del suelo después de la oxigenación, observando una sucesión de la mesofauna del suelo después de un proceso de contaminación, que le da forma a las redes tróficas, dependiendo de la concentración y composición de los hidrocarburos encontrados. En este estudio pudo observarse que conforme pasaba el tiempo de remediación del suelo con diésel, aparecían especies de diferentes géneros, aunque en muy baja abundancia, que se caracterizaban por habitar diferentes profundidades del suelo. De acuerdo con García-Segura *et al.* (2017) estas especies podrían ocupar diferentes posiciones tróficas, debido a sus formas de vida a través de diferentes profundidades del suelo, las cuales están íntimamente relacionados con sus preferencias alimenticias.



6.4 Degradación de hidrocarburos del diésel

Algunos exudados de la raíz tienen un efecto represor en la mineralización de los hidrocarburos (Tahseen *et al.*, 2016). Phillips *et al.* (2012) determinaron que los exudados de raíz de *Elymus angustus* y *M. sativa* reprimieron la mineralización de hidrocarburos durante los primeros 10 días, en comparación con los tratamientos sin planta. Sin embargo, Phillips *et al.* (2006; 2008) observaron que con el tiempo, esta represión de la degradación de hidrocarburos disminuye, y las plantas tienen un efecto selectivo en la estructura de la comunidad rizosférica y en la densidad poblacional, lo que aumenta el número de microorganismos capaces de mineralizar los hidrocarburos.

Wei *et al.* (2017) encontraron que *M. sativa* reduce más del 95 % de hidrocarburos después de 50 días. Umeh *et al.* (2018) y McIntosh *et al.* (2017) observaron que la degradación de hidrocarburos fue menor en los suelos con mayor abundancia de plantas, asociándolo con la capacidad de las plantas para invertir más energía en aminorar los efectos negativos de la competencia vegetal, en lugar de ayudar al establecimiento y promoción de las poblaciones microbianas. No obstante, las diferencias en el porcentaje de degradación dependen del tipo, la distribución y la disponibilidad de los hidrocarburos (Biache *et al.*, 2017).

En esta investigación, a los 12 meses, no se encontraron remanentes de diésel en los tratamientos con 10,000 mg kg⁻¹ (D10 y PD10), mientras que en el tratamiento con 20,000 mg kg⁻¹ sin planta (D20), se encontraron hidrocarburos con cadenas de 19-22 C, y en el tratamiento con esta misma concentración de diésel pero con planta (PD20), se encontraron cadenas de 15-18 C. Riskuwa-Shehu *et al.* (2017) en un sistema de fitorremediación de petróleo crudo en presencia de *M. sativa*, después de 90 días, indicaron que la mayor concentración de hidrocarburos correspondió a cadenas de 11-20 C y de 21-30 C. Gouda *et*



al. (2016) reportaron la pérdida de hidrocarburos con cadenas de 12 a 20 C, y degradación del 97 al 99% de hidrocarburos de petróleo, después de 90 días de fitorremediación con alfalfa. Wu *et al.* (2017) probaron un sistema de bioaumentación con bioestimulación, y aunque la degradación de hidrocarburos ($61,000 \text{ mg kg}^{-1}$) no fue significativamente mayor que en el suelo sin tratamiento, si hubo mayor diversidad y mejor estructura de la comunidad microbiana. Cabe señalar que en los tratamientos C y CP, no se encontraron hidrocarburos en ninguno de los muestreos.



7. CONCLUSIONES

A los 4 meses, el diésel a $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ en ausencia de *M. sativa* (D10), estimuló la comunidad de bacterias solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno y de rápido crecimiento con respecto al control y a los tratamientos con planta. En tanto que el diésel a $20,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (D20) únicamente estimuló la población de bacterias fijadoras de nitrógeno y aquellas de rápido crecimiento.

El diésel aumentó la concentración de ácidos grasos de todos los grupos de microorganismos evaluados. Sólo se encontraron diferencias significativas del efecto rizosférico de la concentración de ácidos grasos de hongos filamentosos y bacterias en los tratamientos con diésel a $20,000 \text{ mg kg}^{-1}$, a los 4 y 12 meses, mientras que los hongos micorrízicos arbusculares tuvieron mayor concentración de ácidos grasos en el último muestreo (12 meses) en el tratamiento con $20,000 \text{ mg kg}^{-1}$ con *M. sativa*.

Los colémbolos fueron un grupo muy afectado por los hidrocarburos del diésel, ya que sus abundancias no se recuperaron después de 12 meses de fitorremediación, aún con presencia de la planta *M. sativa*. Especies de ambos órdenes de colémbolos encontrados (Poduromorpha y Entomobryomorpha), pueden servir como bioindicadores en suelos contaminados con diésel.



8. LITERATURA CITADA

- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj M., Naidu R. 2016. The biodiversity changes in the microbial population of soils contaminated with crude oil. *Current Microbiology*, 72: 663–70.
- Agnello, A.C., Bagard, M., Van Hullebusch, E.D., Esposito, G., Huguenot, D. 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 563-564: 693-703.
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., Sprocati, A.R. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *The Science of the Total Environment*, 409: 3024–3032.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C. 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3(1): 71-90.
- Ambroz, V.Z., Nosek, J. 1967. Mikrobielle Aktivitat und Apterygotenbesatz in initialen Boden der Niederen Tatra. *Pedobiologia*, 7: 1-10.
- Arderstani, M.M., Van Gestel, C.A.M. 2014. The effect of pH and calcium on copper availability to the springtail *Folsomia candida* in simplified soil solutions. *Pedobiología*, 57: 53-55.
- Bais, H.P., Park, S.W., Weir, T.L., Callaway, R.M., Vivanco, J.M. 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant*



- Science*, 9(1): 26-32.
- Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., Louis Morel, J.L. 2014. Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment. *Science of the Total Environment*, 470–471(1): 639–45.
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, E.L., Richnow, H.H., Hernández, T., Von Bergen, M., García, C. 2016. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *Journal of Proteomics*, 135: 162–69.
- Bastida, F., Torres, I.F., Moreno, J.L., Baldrian, P., Ondoño, S., Ruiz-Navarro, A., Hernández, T. 2016. The active microbial diversity drives ecosystem multifunctionality and is physiologically related to carbon availability in mediterranean semi-arid soils. *Molecular Ecology*, 25(18): 4660–73.
- Bellinger, P.F., Christiansen, K.A., Janssens, F.J. 1996-2008. Checklist of the Collembola of the World.
- Biache, C., Ouali, S., Cébron, A., Lorgeoux, C., Colombano, S., Faure, P. 2017. Bioremediation of PAH-contaminated soils: consequences on formation and degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *Journal of Hazardous Materials*, 329: 1–10.
- Blakely, J.K., Neher, D.A., Spongberg, A.L. 2002. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied Soil Ecology*, 21(1): 71-88.
- Boitaud, L., Salmon, S., Bourlette, C., Ponge, J.F. 2006. Avoidance of low doses of naphthalene by collembola. *Environmental Pollution*, 139: 451–54.
- Bolton, J.L. 1962. Alfalfa: botany, cultivation and utilization. Interscience Publishers, INC.



New York.

- Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Poupin, P., Bauda, P., Beguiristain, T., Leyval, C. 2016. The bacterial and fungal diversity of an aged pah-and heavy metal-contaminated soil is affected by plant cover and edaphic parameters. *Microbial Ecology*, 71 (3): 711–24.
- Butcher, J.W., Snider, R., Snider, R.J. 1971. Bioecology of edaphic collembola and acarina. *Annual Review of Entomology*, 16: 249-288.
- Cai, B., Ma, J., Yan, G., Dai, X., Li, M., Guo, S. 2016. Comparison of phytoremediation, bioaugmentation and naturalattenuation for remediating saline soil contaminated by heavy crudeoil. *Biochemical Engineering Journal*, 112: 170-177.
- Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Becarelle, S., Siracusa, G., Lorenzi, R., Di Gregorio, S. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(8): 7930-7941.
- Cébron, A.,Norini, M.P.,Beguiristain, T., Leyval, C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 73: 148–159.
- Cébron, A., Cortet, J., Criquet, S., Biaz, A., Calvert, V., Caupert, C., Pernin, C., Leyval, C. 2011. Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in Microbiology*, 162: 896–907.
- Chang, W., Dyen, M.,Spagnuolo, L., Simon, P., Whyte, L., Ghoshal, S. 2010. Biodegradation



- of semi-and non-volatile petroleum hydrocarbon sinaged, contaminated soils from a sub-Arctic site: Laboratory pilot-scale experiments at site temperatures. *Chemosphere*, 80: 319–326.
- Chapelle, F.H. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: the perspectives of history and hydrology. *Ground Water*, 37 (1): 122–32.
- Chen, F., Tan, M., Ma, J., Zhang, S., Li, G., Qu, J. 2016. Efficient remediation of PAH-metal co-contaminated soil using microbial-plant combination: a greenhouse study. *Journal of Hazardous Materials*, 302: 250–61.
- Christiansen, K. 1964. Bionomics of collembola. *Annual Review of Entomology*, 9: 147-178.
- Christiansen, K.A., Bellinger, P. 1998. The Collembola of North America North of the Rio Grande, segunda edición. Grinnell College, Grinnell, Iowa, USA, pp: 1520.
- Clark, G.H., Malte, M.O. 1913. Fodder and pasture plants. Edited by Martin (Ministro de Agricultura) Burrell. Ottawa: Departamento de Agricultura, pp: 114-119.
- Coulson, S., Birkemoe, T. 2000. Long-term cold tolerance in arctic invertebrates: recovery after 4 years at below -20 degree C. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 2055-2058.
- Covino, S., D'annibale, A., Stazi, S.R., Cajthaml, T., Čvančarová, M., Stella, T., Petruccioli, M. 2015. Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. *Science of the Total Environment*, 505: 545–54.
- Covino, S., Fabianová, T., Křesinová, Z., Čvančarová, M., Burianová, E., Filipová, A., Voříšková, J., Baldrian, P., Cajthaml, T. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and microbial community shifts during co-composting of creosote-treated wood. *Journal of Hazardous Materials*, 301: 17–26.
- Cunnungham, S.D., Anderson T.A., Schwab A.P., Hsu F.C. 1996. Phytoremediation of soils



- contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55–114.
- Del Pozo Ibañez, M., Ibañez Gamborino, M. 1983. La alfalfa, su cultivo y aprovechamiento. Madrid (España). Mundi Prensa. 3ra Edición.
- Ding, N., Guo, H., Hayat, T., Wu, Y., Xu, J. 2009. Microbial community structure changes during aroclor 1242 degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 305–14.
- Dubey, R.K., Tripathi, V., Dubey, P.K., Singh, H.B., Abhilash, P.C. 2016. Exploring rhizospheric interactions for agricultural sustainability: the need of integrative research on multi-trophic interactions. *Journal of Cleaner Production*, 115: 362–65.
- Dubrovskaya, E., Pozdnyakova, N., Golubev, S., Muratova, A. 2017. Peroxidases from root exudates of *Medicago sativa* and *Sorghum bicolor*: catalytic properties and involvement in PAH degradation. *Chemosphere*, 169: 224–32.
- Dunger, W., Schlitt, B. 2011. Synopses on palaeartic collembola. Tullbergiidae. Volumen 6/1. Editor: Dunger, W. Museum of Natural History Görlitz.
- Endlweber, K., Scheu, S. 2006. Effects of collembola on root properties of two competing ruderal plant species. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2025-2031.
- Endlweber, K., Scheu, S. 2007. Interactions between micorrhizal fungi and collembola: effects on root structure of competing plant species. *Biology and Fertility of Soils*, 43: 741-749.
- Erdoğan, E.E., Şahin, F., Namlı, A. 2013. Phospholipid fatty acids analysis-fatty acid methyl ester (PLFA-FAME) changes during bioremediation of crude oil contamination soil. *African Journal of Biotechnology*, 12(44): 6294–6301.
- Fan, M.Y., Xie, R.J., Qin, G. 2014. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with yeast. *Environmental*



Technology, 35(4): 391–99.

Ferrera-Cerrato, R. 1995. Efecto de la rizósfera. En: Ferrera-Cerrato R, Pérez-Moreno J, editores. *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. México: Colegio de Postgraduados. p 39-53.

Franco-Ramírez A., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Pérez-Moreno, J., Alarcón, A. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 378-383.

Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E. 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11): 3605-3617.

García-Segura, D., Castillo-Murrieta, I.M., Martínez-Rabelo, F., Gomez-Anaya, A., Rodríguez-Campos, J., Hernández-Castellano, B., Contreras-Ramos, s.m., Barois, I. 2017. Macrofauna and mesofauna from soil contaminated by oil extraction. *Geoderma*, En prensa. DOI: 10.1016/J.GEODERMA.2017.06.013.

Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Science*, 176: 20–30.

Gillet, S., Ponge, J.F. 2004. Are acid-tolerant collembola able to colonise metal-polluted soil? *Applied Soil Ecology*, 26: 219–31.

Gillet, S., Ponge, J.F. 2005. Species assemblages and diets of collembola in the organic matter accumulated over an old tar deposit. *European Journal of Soil Biology*, 41: 39–44.

Gimenes-Rieff, G., Natal-da-Luz, T., Sousa, J.P., Osório-Wallau, M., Hahn, L., Saccol de,



- S. 2016. Collembolans and mites communities as a tool for assessing soil quality: effect of eucalyptus plantations on soil mesofuna biodiversity. *Current Science India*, 110: 713-719.
- Glick, B.R. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*, 21: 383–93.
- Gouda, H.A., El-Gendy, A.S., Abd El-Razek, T.M., El-Kassas, H.I. 2016. Evaluation of phytoremediation and bioremediation for sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *International Journal of Environmental Science and Development*, 7(7): 490-493.
- Gospodarek, J., Kołoczek, H., Petryszak, P. 2012. Dynamics of Opiliones and Acarina occurrence in soil contaminated with oil derivatives during bioremediation process. *Ecological Chemistry and Engineering*, 6(1): 143-149.
- Hall, J., Soole, K., Bentham, R. 2011. Hydrocarbon phytoremediation in the family *Fabacea* - A review. *International Journal of Phytoremediation*, 13(4): 317–32.
- Hamamura, N., Olson, S.H., Ward, D.M., Inskeep, W.P. 2006. Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 6316–6324.
- He, Y.M., Duan, X.G., Liu, Y.S. 2014. Enhanced bioremediation of oily sludge using co-culture of specific bacterial and yeast strains. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 89(11): 1785–92.
- Hernández-Ortega H.A., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Zavaleta-Mancera, H.A., López-Delgado, H.A., Mendoza-López, M.R. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*, 95: S319-



S324.

- Hiltner, L. (1904). Ueber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundungung und brache. *Arb. Deut. Landw. Gesell*, 98: 59-78.
- Hou, J., Liu, W., Wang, B., Wang, Q., Luo, Y., Franks, A.E. 2015. "PGPR enhanced phytoremediation of petroleum contaminated soil and rhizosphere microbial community response. *Chemosphere*, 138: 592–98.
- Houlton, B.Z., Wang, Y.P., Vitousek, P.M., Field, C.B. 2008. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature*, 454: 327–30.
- Iffis, B., St-Arnaud, M., Hijri, M. 2017. Petroleum contamination and plant identity influence soil and root microbial communities while AMF spores retrieved from the same plants possess markedly different communities. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1381.
- Iosob, G.A., Prisecaru, M., Stoica, I., Calin, M., Cristea, T.O. 2016. Biological remediation of soil polluted with oil products: an overview of available technologies. *Universitatea "Vasile Alecsandri" din Bacău*, 25(2): 89-101.
- IUPAC-IUB Commission on biochemical nomenclature. 1967. The nomenclature of lipids. *European Journal of Biochemistry*, 2:127-131.
- IUSS Working Group WRB. 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para a nomenclatra de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. FAO, Roma. ISBN 978-92-5-308369-5. pp: 218.
- Joner, E.J., Johansen, A., Loibner, A.P., Dela Cruz, M.A., Szolar, O.H.J., Portal, J.M., Leyval, C. 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental*



Science and Technology, 35: 2773–77.

Jordana, R. 2012. Capbryinae and entomobryini. synopses on palaeartic Collembola. Senckenberg Museum of Natural History Görlitz, 7(1).

Kawasaki, A., Warren, C.R., Kertesz, M.A. 2016. Specific influence of white clover on the rhizosphere microbial community in response to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination. *Plant Soil*, 401: 365-379.

Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, 133: 455-465.

Kukla, M., Plociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. 2014. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere*, 117: 40–46.

Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Bok Lee, Y., Naidu, R., Megharaj, M. 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168: 944-968.

Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G.D., Newell, V.A., Goberna, M. 2014. Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2): 296–308.

Lavelle, P., Spin, A., Blouin, M., Brown, G., Decaëns, H., Grimaldi, M., Jiménez, J.J., McKey, D., Mthieu, J., Velasquez, E., Zangerlé, A. 2016. Ecosystem engineers in a self-organized soil: a review of concepts and future research questions. *Soil Science*, 181: 91-109.

Louchouart, P., Bonner, J.S., Tissot, P., McDonald, T.J., Fuller, C., Page, C. 2000.



- Quantitative determination of oil films/slicks from water surfaces using a modified solidphase extraction (SPE) sampling method. En: Proceedings of the 23rd Arctic Marine Oil Spill Program Meeting, Vancouver, Canada. vol. 1., pp: 59-68.
- Macfadyen, A. 1963. The contribution of the microfauna to total soil metabolism. En: J. Doeksen y J. Van der Drift (Editores), *Soil Organisms*. North-Holland, Amsterdam, pp. 3-17.
- Macleod, C.J.A., Semple, K.T. 2002. The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism. *Environmental Pollution*, 119(3): 357–364.
- Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., White, D.C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology*, 65(8): 3566–3574.
- Maletic, S., Dalmacija, B., Roncevic, S., Agbaba, J., Petrovic, O. 2009. Degradation kinetics of an aged hydrocarbon-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 202(1-4): 149-159.
- Marchand, L., Sabaris, C.Q., Desjardins, D., Oustrière, N., Pesme, E., Butin, D., Wicart, G., Mench, M. 2016. Plant responses to a phytomanaged urban technosol contaminated by trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 3120–35.
- Margesin, R. 2005. Determination of enzyme activities in contaminated soil. *Manual of Soil Analysis: Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*, 5:309–320.
- Margesin, R., Hämmerle, M., Tscherko, D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53 (2): 259–69.



- Markowicz, A, Cycoń, M., Piotrowska-Seget. 2016. Microbial community structure and diversity in long-term hydrocarbon and heavy metal contaminated soils. *International Journal of Environmental Research*, 10(2): 321–32.
- Marschner, P., Yang, C..H., Lieberei, R., Crowley, D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1437–45.
- Martin, B.C., Suman, J.G., Price, C.A., Ryan, M.H., Tibbett, M. 2014. The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 472: 642–53.
- Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H., Chen, H. 2013. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Psuedomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263: 493–500.
- McIntosh, P., Schuthess, C.P., Kuzovkina, Y.A., Guillard, K. 2017. Bioremediation and phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) under various conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 19(8): 755–764.
- McNear Jr, D.H. 2013. The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4(3): 1.
- Melekhina, E.N., Markarova, M.Y., Shichemelinina, T.N., Anchugova, E.M., Kanev, V.A. 2015. Secondary successions of biota in oil-polluted peat soil upon different biological remediation methods. *Eurasian Soil Science*, 48(6): 643–53.
- MIDI MIS operating manual version 4.5. MIDI, Inc. Newark, Delaware. 2002.
- Mikkonen, A., Lappi, K., Wallenius, K., Lindström, K., Suominen, L., Hartikainen, K.,



- Raateland, A., Niemi, R.M., Ulrich, A., Tebbe, C.C. 2011. Ecological inference on bacterial succession using curve-based community fingerprint data analysis, demonstrated with rhizoremediation experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(3): 604–616.
- Miles, A.A., Misra, S.S., Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of Hygiene*, 38: 732–49.
- Minai-Tehrani, D. 2008. Effect of heavy crude oil-contaminated soil on germination and growth of *Poa trivialis* (rough meadow-grass). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 4(1): 83–92.
- Minoui, S., Minai-Tehrani, D., Shahriari, M.H. 2015. Phytoremediation of crude oil-contaminated soil by *Medicago sativa* (Alfalfa) and the effect of oil on its growth. *Phytoremediation for Green Energy*, 123–129.
- Morales-Guzmán, G., Ferrera-Cerrato, R., Rivera-Cruz, M.C., Torres-Bstillos, L.G., Arteaga-Garibay, R.I., Mendoza-López, M.R., Esquivel-Cote, R., Alarcón, A. 2017. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Applied Soil Ecology*, 121: 127–34.
- Mujibur-Rahman, K.S., Rahman, T., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, I.M. 2002. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Journal of Basic Microbiology*, 42(4): 284-291.
- Mukhopadhyay, S., George, J., Masto, R.E. 2017. Changes in polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and soil biological parameters in a revegetated coal mine spoil. *Land Degradation and Development*, 28(3): 1047–1055.
- Mulder, C. 2006. Driving forces from soil invertebrates to ecosystem functioning: the allometric perspective. *Naturwissenschaften*, 93: 467–79.



- Muratova, A., Dubrovskaya, E., Golubev, S., Grinev, V., Chernyshova, M., Turkovskaya, O. 2015. The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 188: 1–8.
- Niklasson, M., Petersen, H., Parker, E.D. 2000. Environmental stress and reproductive mode in *Mesaphorura macrochaeta* (Tullbergiinae, Collembola). *Pedobiologia*, 44: 476–88.
- Okere, U.V., Semple, K.T. 2012. Biodegradation of PAHs in ‘pristine’ soils from different climatic regions. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, S1: 006.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Zarska, M., Chorazewski, M., Dzida, M., Piotrowska-Seget, Z. 2016. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management*, 168: 175–84.
- Palacios-Vargas, J.G., Mejía-Recamier, B.E. 2007. Técnicas de colecta, montaje y preservación de microartrópodos edáficos. Editado por José G Palacios Vargas y Blanca E Mejía Recamier. 1° edición. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Panchenko, L., Muratova, A., Dubrovskaya, E., Golubev, S., Turkovskaya, O. 2018. Dynamics of natural revegetation of hydrocarbon-contaminated soil and remediation potential of indigenous plant species in the steppe zone of the southern volga uplands. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(4): 3260–3274.
- Panchenko, L., Muratova, A., Turkovskaya, O. 2017. Comparison of the phytoremediation potentials of *Medicago falcata* L. and *Medicago sativa* L. in aged oil-sludge-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3): 3117–30.
- Parker, J.H., Smith, G.A., Fredrickson, H.L., Vestal, J.R., White, D.C. 1982. Sensitive assay, based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid a, for Gram-negative



- bacteria in sediments. *Applied and environmental microbiology*, 44(5): 1170–77.
- Pausch, J., Kramer, S., Scharroba, A., Scheunemann, N., Butenschoen, O., Kandeler, E., Marhan, S. 2016. Small but active-pool size does not matter for carbon incorporation in below-ground food webs. *Functional Ecology*, 30(3): 479–89.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6): 927–55.
- Phillips, L.A., Germida, J.J., Farrell, R.E., Greer, C.W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(12): 3054–64.
- Phillips, L.A., Greer, C.W., Farrell, R.E., Germida, J.J. 2012. Plant root exudates impact the hydrocarbon degradation potential of a weathered-hydrocarbon contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 52: 56–64.
- Phillips, L.A., Greer, C.W., Germida, J.J. 2006. Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9): 2823–33.
- Piehler, M.F., Swistak, J.G., Pinckney, J.L., Paerl, H.W. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *Microbial Ecology*, 38(1): 69-78.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 17: 362–70.
- Ponge, J.F. 2000. Vertical distribution of Collembola (Hexapoda) and their food resources in organic horizons of beech forests. *Bioogy and. Fertiity of. Soils*, 32: 508-522.



- Potapov, A.A. 2001. Synopses on Palaeaectic Collembola. Isotomidae. Volumen 3. Editor: Dunger, W. Moscow State Pedagogical University.
- Potapov, A.A., Semenina, E.E., Korotkevich, A.Y., Kuznetsova, N.A., Tiunov, A.V. 2016. Connecting taxonomy and ecology: trophic niches of collembolans as related to taxonomic identity and life forms. *Soil Biology and Biochemistry*, 10: 20-31.
- Princz, J.I., Moody, M., Fraser, C., Van der Vliet, L., Lemieux, H., Scroggins, R., Siciliano, S.D. 2012. Evaluation of a new battery of toxicity tests for boreal forest soils: assessment of the impact of hydrocarbons and salts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(4): 766-777.
- Qiao, J., Zhang, C., Luo, S., Chen, W. 2014. Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 8(2): 293–304.
- Rajtor, M., Piotrowska-Seget, Z. 2016. Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere*, 162: 105–16.
- Ratledge y Wilkinson. 1988. C. Ratledge, S.G. Wilkinson Microbial Lipids Volumen 1 Academic Press, Inglaterra. pp: 963.
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 8–14.
- Reeuwijk, L.P. 1999. Procedimientos para análisis de suelos, versión 1999. Traducción de: Ma. del Carmen Gutiérrez Catorena, Carlos Arturo Tavares Espinosa, Carlos Alberto Ortiz Solorio. Primera edición en Español, 1999. Especialidad de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp: 145. ISBN 968-839-264-2.
- Riskuwa-Shehu, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S. 2017. Evaluation of the use of



- legumes for biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(10): 2205-2214.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 191–194.
- Ronald, M.A., Cerniglia, C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35(1–3): 317–27.
- Rončević, S., Dalmacija, B., Ivančev-Tumbas, I., Tričković J., Petrović, O., Klašnja, M., Agbaba, J. 2005. Kinetics of degradation of hydrocarbons in the contaminated soil layer. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49(1): 27-36.
- Rusin, M., Gospodarek, J. 2016. The occurrence of springtails (Collembola) and spiders (Araneae) as an effectiveness indicator of bioremediation of soil contaminated by petroleum-derived substances. *International Journal of Environmental Research*, 10(3): 449–458.
- Rusek, J. 1998. Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. *Biodiversity and Conservation*, 7: 1207-1219.
- Salam, L.B., Ilori, M.O., Amund, O.O., Mien, Y.L., Nojiri, H. 2017. Characterization of bacterial community structure in a hydrocarbon-contaminated tropical african soil. *Environmental Technology*, 39(7): 939-951.
- Semarnat. 2016. Informe de la situación del medio ambiente en México. compendio de estadísticas ambientales. indicadores clave, de desempeño ambiental y de crecimiento verde. Edición 2015. Semarnat. México. pp: 467-468.
- Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23: 15–22.



- Steliga, T., Jakubowicz, P., Kapusta, P. 2012. Changes in toxicity during in situ bioremediation of weathered drill wastes contaminated with petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 125: 1–10.
- Sun, R., Thater, B., Shi, P., Wei, X., Jiao, S., Belcher, R.W., Crowley, D.E., Wei, G. 2015. The effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) with root mucilage on phenanthrene (PHE) dissipation and microbial community composition using phospholipid fatty acid (PLFA) analysis and artificial neural network (ANN) modeling. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 100: 29–37.
- Tahseen, R., Afzal, M., Iqbal, S., Shabir, G., Khan, Q.M., Khalid, Z.M., Banat, I.M. 2016. Rhamnolipids and nutrients boost remediation of crude oil contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 115: 192–98.
- Taylor, L.T., Jones, D.M. 2001. Bioremediation of coal tar PAH in soils using biodiesel. *Chemosphere*, 44(5): 1131-1136.
- Thavamani, P., Megharaj, M., Naidu, R. 2012. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium. *Biodegradation*, 23(6): 823–35.
- Thomas, F., Cébron, A. 2016. Short-term rhizosphere effect on available carbon sources, phenanthrene degradation, and active microbiome in an aged-contaminated industrial soil. *Frontiers in Microbiology*, 7: 92.
- Umeh, A.C., Vázquez-Cuevas, G.M., Semple, K.T. 2018. Mineralisation of ¹⁴C-phenanthrene in PAH-diesel contaminated soil: impact of *Sorghum bicolor* and *Medicago sativa* mono- or mixed culture. *Applied Soil Ecology*, 125: 46–55.
- Uribe-Hernández, R., Juárez-Méndez, C.H., Montes de Oca, M.A., Palacios-Vargas, J.G.,



- Cutz-Pool, L., Mejía-Recarmier, B.E. 2010. Colémbolos (Hexapoda) como bioindicadores de la calidad de suelos contaminados con hidrocarburos en el sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81: 153-162.
- USEPA. 1986. Organic analytes. Document SW-846. En: Test Methods for Evaluating Solid Wastes, Tercera edición. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, pp: 1-16
- Uwabe, M.A., Rotimi, J., Agwu, E.J. 2014. The pollution of a terrestrial ecosystem from hydrocarbon exploitation and its outcome on Collembola (Arthropoda: Insecta). *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 16(3): 1–11.
- Van der Drift, J. 1965. The effects of animal activity in the litter layer. En: Experimental Pedology Butterworths. Editores: E.G. Hallsworthy D.V. Crawford, Londres, pp: 227-235.
- Varjani, S.J. 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223: 277–86.
- Velasco, J.A., Volke-Sepúlveda, T.L. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 66: 41-53.
- Venterink, H.O. 2011. Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. *Plant Soil*, 347:137–146.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7): 1163–1172.
- Villax, E.J. 1963. La culture des plantes fourragères dans la région méditerranéenne Occidental *Les Cahiers de Investigación Agronómica N ° 17*. Instituto Nacional de Investigación Agronómica, Rabat.
- Volke-Sepúlveda, T., Velasco, J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos



- contaminados. Primera impresión. México: Instituto Nacional de Ecología (INESEMARNAT).
- Wang, L., Li, F., Zhan, Y., Zhu, L. 2016. Shifts in microbial community structure during in situ surfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14): 1445-1461.
- Wasley, J., Mooney, T.J., Kingy, C.K. 2016. Soil invertebrate community change over fuel-contaminated sites on a subantarctic island: an ecological field-based line of evidence for site risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 12(2): 306-314.
- Wei, J., Liu, X., Wang, Q., Wang, C., Chen, X., Li, H. 2014. Effect of rhizodeposition on pyrene bioaccessibility and microbial structure in pyrene and pyrene lead polluted soil. *Chemosphere*, 97: 92–97.
- Wei, R., Ni, J., Li, X., Chen, W., Yang, Y. 2017. Dissipation and phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly spiked and long-term field-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9): 7994-8003.
- Wennerstrom, D.E., Cerniglia, C.E. 1995. Protein expression in Mycobacteria that metabolize polycyclic aromatic hydrocarbons. En: *Bioremediation of Hazardous Wastes: Research, Development, and Field Evaluations*. pp: 115
- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, 321(1–2): 385–408.
- Wilson, S.C., Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81(3): 229–49.
- Wu, M., Ye, X., Chen, K., Li, W., Yuan, J., Jiang, X. 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-



contaminated soil. *Environmental Pollution*, 223: 657–64.

www.collembola.org

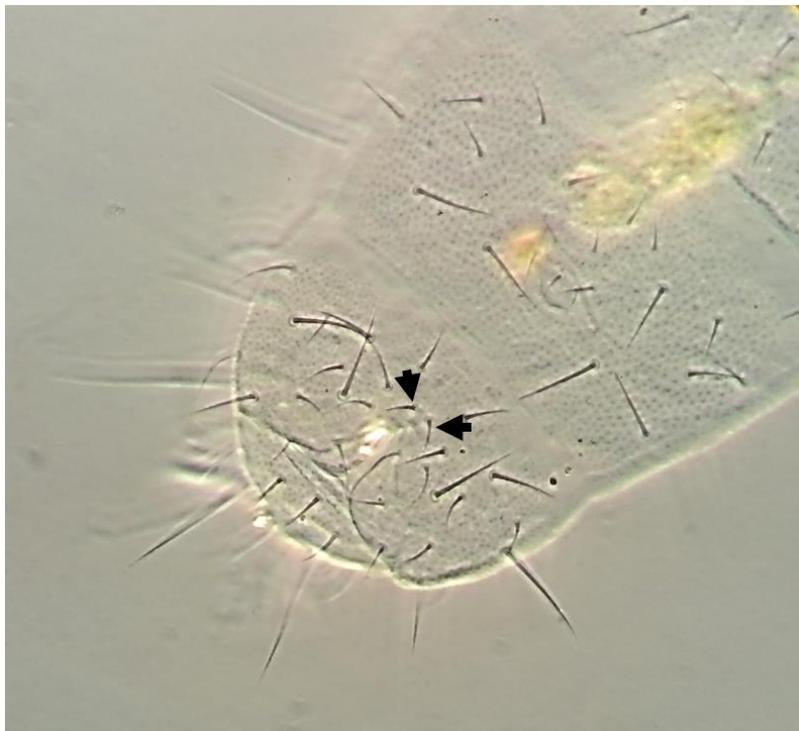
Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29: 111–29.



9. ANEXOS



Mesaphorura macrochaeta



Mesaphorura macrochaeta. Sedas 1'2' presentes en el lóbulo anal, características de la especie.



Proisotoma spp.



Isotomurus spp.



Entomobrya sp. 1. Vista a) Ventral; b) Lateral; c) Dorsal.



Entomobrya sp. 1 aclarado con ácido láctico.



Entomobrya sp. 2. Vista a) Dorsal; b) Ventral.



Entomobrya sp. 2 aclarado con ácido láctico.