



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA CONTAMINACIÓN CON CROMO HEXAVALENTE
SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE AMEBAS
DE VIDA LIBRE DEL SUELO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA:

PAOLA SAMANTHA HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA



TLALNEPANTLA EDO. DE MÉXICO

NOVIEMBRE, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado en Laboratorio de Ecología Microbiana en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Fes Iztacala gracias al financiamiento de la DGAPA-UNAM-PAPIIT IN217112-2 y la FES-IZTACALA-PAPCA-UNAM 2011-2012

Índice

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	7
Hipótesis	8
Objetivos	
Objetivo general.....	9
Objetivos particulares.....	9
Material y Métodos	
Colecta de suelo.....	10
Determinación del volumen mínimo para obtener la comunidad de amebas presentes.....	10
Microcosmos.....	10
Protocolo de contaminación del suelo.....	11
Análisis fisicoquímico del suelo.....	11
Estimación de cantidad total e Identificación de amebas.....	12
Estimación de cantidad total de amebas.....	12
Identificación de amebas.....	12
Estimación de la abundancia de amebas.....	13

Establecimiento de los grupos tróficos.....	13
Análisis estadístico.....	13
Resultados	
Determinación del volumen mínimo de muestra.....	15
Riqueza.....	16
Abundancia.....	19
Riqueza y abundancia acumulada por tiempo.....	23
Similitud de riqueza y abundancia de especies.....	25
Cantidad total de amebas.....	27
Grupos tróficos.....	27
Similitud entre grupos tróficos.....	30
Análisis fisicoquímicos.....	31
Discusión	32
Conclusión	41
Literatura citada	42
Anexo	53

Resumen

La falta de control en la liberación y disposición de residuos industriales y mineros son la principal fuente de contaminación del suelo por metales pesados altamente tóxicos como el CrVI, el cual puede alterar la estructura y las redes tróficas microbianas y por consiguiente importantes procesos ecológicos generando una disminución en la productividad de los suelos. Sin embargo, la microbiota del suelo responde rápidamente a este tipo de perturbaciones y algunos microorganismos son capaces de reducir el CrVI a su forma menos tóxica: el CrIII, principalmente las bacterias. Por lo que estimular su tasa de crecimiento podría realzar la actividad reductora del CrVI disminuyendo su concentración y biodisponibilidad en el medio. Así, la depredación supone un estímulo al mantener jóvenes las poblaciones bacterianas e incrementar su actividad metabólica. De manera que las amebas al ser los mayores depredadores bacterianos del suelo, un cambio en la estructura de su comunidad podría alterar las actividades bacterianas mermando el proceso de reducción del CrVI y persistiendo como un contaminante en el suelo. Por lo que en este estudio se evaluó el efecto del CrVI sobre la estructura de la comunidad amebiana en microcosmos de suelo a las 24 hrs y los días 5, 10, 15, 20 y 25 después de la adición de 140 ppm de CrVI. La estructura de la comunidad amebiana del suelo con CrVI se modificó completamente con respecto a la comunidad del control, al haber una disminución de 8 especies y diferir significativamente la abundancia a lo largo del estudio. Las especies *Paratetramitus jugosus* y *Vahlkampfia aberdonica* fueron más abundantes en suelo con CrVI, a diferencia de *Korotnevella stella* quien disminuyó su abundancia en más el 50%. De las especies presentes solo en este suelo *Euglypha sp.* y *Filamoeba sp.* fueron las más abundantes. En cuanto a los grupos tróficos, en el suelo contaminado se perdieron amebas con preferencia trófica a bacterias-levaduras y a protozoos, predominando las bacterívoras y las omnívoras. De manera que el CrVI actuó como un factor de selección beneficiando a especies resistentes y capaces de aprovechar los recursos disponibles, como las especies bacterívoras. Por lo que se mantuvo la presión de depredación sobre las poblaciones bacterianas persistentes, afectando en menor grado las actividades bacterianas y posiblemente también la actividad reductora del CrVI dentro del suelo.

Introducción

El crecimiento mundial de la poblacional humana dirige inevitablemente a un modo de vida basado en la producción a nivel industrial y como consecuencia a un mayor impacto ambiental. En muchos casos este impacto también conlleva a la contaminación (McEldowney *et al.*, 1993).

La contaminación se define como la introducción de sustancias o energía que provoca una alteración en las características físicas, químicas y biológicas del ambiente a tal grado que suponen un riesgo a la salud humana, a los recursos y a los ecosistemas. Los tipos y fuentes de contaminación son tan diversos como sus efectos potenciales dentro del ambiente. Por lo que su importancia radica en su toxicidad, persistencia y acumulación en los organismos (McEldowney *et al.*, 1993).

Se consideran contaminantes tanto compuestos sintéticos como elementos presentes en la naturaleza, cuya concentración elevada por la actividad antropogénica llega a niveles tóxicos o capaces de perturbar los ecosistemas, como es el caso de los metales pesados (McEldowney *et al.*, 1993; Desjardin *et al.*, 2002).

Los metales pesados representan uno de los contaminantes más comunes en los suelos, lo cual se debe a la falta de innovación industrial y a la ausencia de controles adecuados para evitar su liberación durante los procesos en la industria y en la minería (Kotas y Stasicka, 1999). Así como a la inadecuada disposición o reciclado de los productos que los contienen al término de su vida útil (Castro, 2009). La contaminación del suelo por metales pesados no se limita a áreas de actividad industrial y minera, también se presenta en suelos destinados a la actividad agrícola, debido al depósito de biosólidos y al riego con aguas residuales de origen industrial (Giller *et al.*, 1997; Reyes-Solís *et al.*, 2009).

Los residuos industriales contienen diferentes tipos de metales. Entre ellos, el cromo es considerado como uno de los principales componentes debido a su amplia utilidad en la industria metalúrgica, química y peletera. (Cervantes *et al.*, 2001; Kamaludeen *et al.*, 2003; Owlad, 2009).

Estos procesos generan residuos con una gran cantidad de compuestos de cromo, los cuales son depositados en los suelos. Ejemplo de ello, son los problemas de contaminación en el municipio de Tultitlan, Edo. de México y la ciudad de León, Guanajuato donde la industria química y peletera han generado una gran cantidad de residuos de cromo (Armienta-Hernández y Rodríguez-Castillo, 1995; Gutiérrez-Ruíz *et al.*, 1997; López-Luna *et al.*, 2009;).

En el ambiente edáfico, el cromo puede existir de forma estable en dos estados de valencia: el cromo trivalente (CrIII) y el cromo hexavalente (CrVI) (Kotás y Stasicka, 1999).

El CrIII es un elemento traza esencial para el funcionamiento del metabolismo humano y mucho menos soluble en el ambiente (Volke *et al.*, 2005). Al contrario, el CrVI es altamente tóxico y su alta solubilidad en el medio le permite migrar en el ambiente y estar biológicamente disponible (Kotás y Stasicka, 1999; Cervantes *et al.*, 2001; Cheung y Gu, 2006).

La exposición al CrVI genera daños en el metabolismo celular y en la estructura y expresión del ADN (Kotás y Stasicka, 1999; Poljsak *et al.*, 2010). Ello representa no solo un problema ambiental, sino también un problema de salud, debido a que en la mayoría de los compuestos crómicos de los residuos industriales, predomina la forma hexavalente (Desjardin *et al.*, 2002).

La capacidad de migración del CrVI en el ambiente, le permite Interactuar con la microbiota del suelo, trayendo consigo cambios en las dinámicas naturales y como consecuencia efectos adversos en los procesos biológicos que allí se desempeñan (Kotás y Stasicka, 1999; Shi *et al.*, 2002; Owlad, 2009).

Los suelos con este tipo de contaminantes presentan modificaciones en sus características físicas y químico-mineralógicas, tales como el pH, potencial redox, conductividad y la proporción de arcillas y componentes orgánicos (Bulgariu *et al.*, 2007). Lo anterior genera una perturbación en los sistemas edáficos, al modificar la estructura y distribución de las comunidades microbianas, las cuales están influidas principalmente por la naturaleza mineral de los suelos (Bamforth, 1985). Por consiguiente, este tipo de contaminantes

cambia las interacciones entre algunos componentes de las redes tróficas del suelo y con ello modifica importantes procesos ecológicos que regulan estos organismos tales como el ciclo de nutrientes y el proceso de descomposición de la materia (McEldowney *et al.* 1993). Al mismo tiempo, altas concentraciones de CrVI pueden tener efectos adversos sobre la actividad, la biomasa y la estructura de las comunidades microbianas alterando las funciones y la estabilidad del sistema (Baath 1989; Fließbach, *et al.*, 1994; Madoni, *et al.*, 1995; Kandeler, *et al.*, 1996; Giller, *et al.*, 1997; Kuperman *et al.*, 1998; Wyszowska *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2002; Ekelund *et al.*, 2003; Nakatsu *et al.*, 2005; Perez de Mora *et al.*, 2006; Nguyen-Viet *et al.*, 2007; Nguyen-Viet *et al.*, 2008).

Sin embargo, los procesos microbianos muestran respuestas más rápidas a las perturbaciones que otras propiedades del suelo, debido a que sus ciclos de vida son completados en lapsos de tiempo muy cortos (Bamforth, 1985; Kuperman *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2002; Ekelund *et al.*, 2003; Bulgariu *et al.*, 2007; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007). De esta manera, dependiendo del tipo, fuerza y duración del episodio de perturbación, éste puede funcionar como un factor de selección, al eliminar especies sensibles y beneficiar a las más resistentes. Por lo que a largo plazo, la exposición al CrVI, puede proveer mecanismos de adaptación y permitir una restructuración de las comunidades microbianas debido a la disminución en la competencia interespecífica y a la capacidad de resistir las condiciones de perturbación (Desjardin *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002; Nguyen-Viet *et al.*, en 2007; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007; Sobolev y Begonia, 2008).

La resistencia de las comunidades microbianas a este tipo de contaminantes está relacionada con su habilidad para desarrollar mecanismos de reducción y detoxificación del metal o estrategias que les brinden protección contra las fluctuaciones del medio y eviten su interacción con el CrVI (Harrison *et al.*, 2007; Muneer *et al.* 2009; Poljsak *et al.*, 2010).

Existen microorganismos que pueden reducir la forma tóxica del CrVI a su forma más estable, disminuyendo su movilidad y biodisponibilidad en los suelos. Si bien algunas

levaduras y protozoos tienen la habilidad para reducir el CrVI a CrIII, las bacterias son consideradas los organismos más eficientes para realizar este proceso (Desjardin *et al.*, 2002; Cheung y Gu, 2006; Muneer *et al.* 2009). Por consiguiente, la depredación sobre las comunidades bacterianas podría realzar la actividad reductora del CrVI, al remover individuos senescentes y estimular la tasa de crecimiento de formas más jóvenes con mayor actividad metabólica (Bonkowski, 2003). Las amebas son consideradas los depredadores bacterianos más importantes del suelo debido a su abundancia y a su modo de depredación (Bamforth, 1985; Bonkowski, 2003; Smirnov, 2009). Su importancia como depredadores reside en el control que ejercen sobre de las poblaciones bacterianas, lo que a su vez incrementa el reciclaje de nutrientes y la mineralización de la materia orgánica manteniendo la productividad y estabilidad de las comunidades microbianas (Bamforth, 1985; Vargas, 1990; Foissner, 1999; Bonkowski, 2003). Además, representan la conexión entre los niveles tróficos del suelo y son capaces de sobrevivir bajo condiciones adversas mediante el desarrollo de estrategias de formación de quistes (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Foissner, 1999; Smirnov, 2009).

Las diferentes especies de amebas pueden ser afectadas directamente por su interacción con el contaminante al alterar sus funciones celulares o indirectamente, a través de la modificación de la estructura de las poblaciones que le sirven de alimento, modificando la estructura, el funcionamiento y la estabilidad de las redes tróficas del suelo (Shi *et al.*, 2002; Nguyen-Viet *et al.*, 2007). Este tipo de perturbaciones pueden reducir la diversidad amebiana y cambiar el ensamble de especies de la comunidad, provocando una disminución en la actividad y en la capacidad para producir biomasa. Incluso aunque los sistemas puedan ser capaces de funcionar con pocas especies sobrevivientes, la disminución en la riqueza de amebas podría alterar la relación depredador-presa y como consecuencia las actividades bacterianas, mermando así el proceso de reducción del CrVI y prolongando su persistencia en los suelos. Ello hace más lenta la recuperación del sistema edáfico y por tanto lo hace más vulnerable a nuevas perturbaciones (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007).

Antecedentes

Algunos estudios realizados con microcosmos demuestran que añadir al suelo altas concentraciones de metales pesados como el cobre, afecta negativamente la mineralización, la actividad y diversidad de microorganismos, siendo más susceptibles a estos componentes tóxicos durante la fase de crecimiento exponencial. Además, el número de tipos morfológicos de protozoos bajan al aumentar la concentración de cobre, por lo que algunos protozoos son más susceptibles a ciertos tóxicos que otros (Ekelund *et al.*, 2003). Esta susceptibilidad fue comprobada por Madoni *et al.*, (1996), al observar el efecto de diferentes metales pesados sobre la comunidad de protozoos de lodos activados utilizados para el tratamiento de aguas. En este estudio, el ciliado *Opercularia minima* presentó una mortalidad de 56 % en lodos con altas concentraciones de Cu (6.12 mg/L); mientras que los ciliados *Opercularia coarctata* y *Vorticella convallaria* presentaron una supervivencia superior al 95% a esa misma concentración. De esta manera, la sensibilidad en las distintas especies de protozoos varía dependiendo del metal y su concentración. Del mismo modo, Madoni *et al.*, (1996) observaron una mortalidad del 55% de la comunidad de protozoos y una pérdida de 5 especies de las 16 iniciales en presencia de cromo hexavalente a una concentración de 150 mg/L.

Estudios en suelos contaminados, expuestos por un largo periodo de tiempo a altas concentraciones de cromo y plomo, muestran un efecto de disminución sobre el crecimiento y la actividad de la biomasa microbiana dependiendo de la disponibilidad y concentración de los metales en la solución del suelo, aunque la tasa de disminución fue dos veces menor en el suelo contaminado con cromo que el suelo con plomo. Sin embargo, la respiración y biomasa microbiana no se vio afectada al agregar mayor cantidad de metal en un suelo previamente contaminado durante largo tiempo, en comparación con el suelo al que ya no se agregó más metal. Además, la adición de sustratos orgánicos incrementó la tasa de respiración en los suelos ya contaminados (Shi *et al.*, 2002).

Por otro lado Nguyen-Viet *et al.*, (2007 y 2008) demostraron que la riqueza y la densidad de especies de comunidades de amebas testadas que viven en diferentes especies de musgos se correlacionaron negativamente con la concentración de plomo.

Considerando los efectos que los metales pesados tienen sobre las comunidades de protozoos y en especial el cromo hexavalente, nos hemos hecho la pregunta:

¿Como se modificará la estructura de la comunidad amebiana del suelo al agregar cromo hexavalente?

Por lo que en éste estudio se pretende observar cómo varia la estructura de la comunidad de amebas de vida libre del suelo a causa de la contaminación con este metal en un experimento de microcosmos.

Hipótesis

De acuerdo a los efectos que provoca el CrVI sobre las propiedades y los organismos del suelo, la estructura y las interacciones tróficas de la comunidad de amebas de vida libre se verán alteradas, al disminuir la riqueza y abundancia amebiana en presencia del metal.

Objetivo general

- ❖ Evaluar el efecto de la contaminación con cromo hexavalente sobre la estructura de la comunidad de amebas de vida libre del suelo.

Objetivos particulares

- ❖ Determinar la riqueza y abundancia de amebas de vida libre en microcosmos de suelo contaminado con cromo hexavalente y en un suelo control libre de contaminante.
- ❖ Determinar la cantidad total de amebas por gramo de suelo seco en el suelo control y el suelo contaminado
- ❖ Establecer los grupos tróficos de la comunidad amebiana
- ❖ Determinar si existe relación entre los diferentes parámetros físicos y químicos con la estructura de la comunidad de amebas.

Materiales y Métodos

Colecta de suelo

Se colectó una muestra compuesta de suelo en el interior del jardín botánico de la FES Iztacala, el cual fue tamizado con un cernidor de 2mm de apertura y posteriormente homogenizado. El suelo se colocó en bolsas de plástico herméticas y se mantuvo almacenado a 4°C en condiciones de oscuridad hasta su utilización (Forster, 1995).

Determinación del volumen mínimo para obtener la comunidad de amebas presentes

Para la determinación del volumen mínimo de suelo a tomar de cada microcosmos se realizó una curva de acumulación de especies en ensayos secuenciales de 1 g de suelo hasta 10 g. Los datos fueron procesados en el programa PC-Ord versión 4 para Windows® mediante la técnica de rarefacción para obtener el 100% (teórico) de la comunidad y estimar en base al método de segundo orden de Jackknife el volumen necesario a procesar para tener al menos el 60% de la comunidad representada (McCune y Grace, 2002).

Microcosmos

Los microcosmos se elaboraron en recipientes de polietileno con capacidad de 500 g, en los cuales se agregaron 100 g de suelo seco que posteriormente se humedecieron con agua destilada estéril, manteniéndolos al 60% de su capacidad de campo y en condiciones de invernadero.

Se estableció un grupo control con suelo sin contaminar y un grupo con suelo contaminado con cromo hexavalente (CrVI). Cada grupo constó de 25 microcosmos.

El análisis se realizó 24 hrs después de la contaminación, seguido de intervalos de 5 días hasta el día 25. Cada análisis consistió de 4 repeticiones o microcosmos (Sutherland,

1996). Por cada microcosmos se tomaron 8 gramos de suelo húmedo, los cuales se establecieron previamente mediante la determinación del volumen mínimo.

Protocolo de contaminación del suelo

La contaminación se realizó con una solución de $K_2Cr_2O_7$ 0.01 M en agua destilada estéril (Madoni *et al.*, 1996). Se agregaron 13.44 ml de solución a cada microcosmos para alcanzar una concentración de 140 ppm de CrVI (INE, 1985) en 100g de suelo seco y para elevar únicamente un 20% más la humedad de suelo y realizar la primer toma de muestra al 60% de su capacidad de campo. Previo a la contaminación, los microcosmos se mantuvieron durante 20 días al 60% de su capacidad de campo y en condiciones de invernadero para el establecimiento de la comunidad amebiana.

Análisis fisicoquímico del suelo

Se realizó la caracterización del suelo analizando los siguientes propiedades: el porcentaje de materia orgánica se obtuvo mediante su oxidación por la reacción de dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico, método desarrollado por Walkley y Black, (1947); la textura del suelo se determinó por el método del Hidrómetro de Bouyoucos, (1962) basado en la velocidad de sedimentación de las partículas; la capacidad de intercambio catiónico se obtuvo por el método volumétrico del Versenato desarrollado por Schollenberger y Simon (1945), el cual se fundamenta en el desplazamiento y sustitución de los cationes del suelo por una sal saturante; y el pH real, se determinó con potenciómetro utilizando una solución de suelo, en una relación de 2.5 partes de agua destilada por una de suelo (Muñoz *et al.*, 2007). Éste último análisis también se realizó para cada grupo experimental al mismo intervalo de tiempo de la toma de muestras.

Identificación y estimación de la cantidad total de amebas

Para las técnicas de estimación y extracción de amebas para su identificación se utilizó extracto de suelo, el cual se preparó tomando 200 g de suelo seco en 1000 ml de agua destilada, posteriormente se calentó en baño maría a 60 °C por 2 horas y se filtró en papel Wathman #42, para ser esterilizado a 121 °C a 103 KPa de presión por 15 min (Bamforth, 1992; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007).

Identificación de amebas

Para la identificación de amebas se utilizaron cultivos en cajas petri con agar no nutritivo (13 g de agar en 1000 ml de extracto de suelo diluido 1:5). Los cultivos se realizaron homogenizando 2 g de suelo húmedo en 20 ml de extracto de suelo, el cual se dejó reposar por 45 min para la precipitación de partículas. Posteriormente el sobrenadante se vertió en la caja petri sobre las placas de agar, dejando reposar durante 2 h para la adherencia de las amebas y posteriormente retirar el exceso de líquido en condiciones de esterilidad. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 28°C hasta su revisión para la ubicación de las amebas mediante un microscopio invertido y la posterior extracción de las preparaciones. Finalmente la determinación morfológica se realizó con ayuda de un microscopio de contraste de fases a 40X y se basó en claves y literatura especializada de Page, 1976; Page, 1983; Page, 1988; Page y Siemensma 1991; Patterson, 1996; Smirnov y Goodkov, 1999; Lee *et al.*, 2000 y Smirnov y Brown, 2004; (Bamforth, 1995; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007; Cortés-Pérez, 2009).

Estimación de cantidad total de amebas

La cantidad total de amebas, se estimó mediante la técnica del Número Más Probable (NMP) haciendo una serie de 6 diluciones 1:10 con 4 repeticiones en placas de cultivo celular de 24 pozos. Se tomó 1g de suelo húmedo en 10 ml de extracto, para preparar una

dilución 1:10. Posteriormente se homogenizó en un vortex por 15 s, dejando reposar 30 min para la sedimentación de las arcillas y partículas de gran tamaño. A cada pozo se le agregaron 400 µl de agar no nutritivo, 900 µl de extracto de suelo 1:10 y finalmente 100 µl de sobrenadante de suelo resuspendido, realizando una dilución de 1:10 por pozo. Las placas de cultivo celular se incubaron durante 10-15 días a 28 °C y se revisaron en el microscopio invertido registrando presencia-ausencia de amebas (Bamforth, 1992; Bamforth, 1995; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2007; Rodríguez-Zaragoza y González, 2007; Cortés-Pérez, 2009).

Estimación de la abundancia de amebas

La abundancia de amebas se estableció de manera indirecta mediante la suma del registro de presencia-ausencia por especie cada 2 g de suelo húmedo (8 g de suelo en total) por microcosmos en los diferentes tiempos del análisis (Sutherland, 1996).

Establecimiento de los grupos tróficos

Los grupos tróficos se establecieron de acuerdo a las preferencias alimenticias de cada especie en base a la literatura.

Análisis estadístico

El volumen mínimo del suelo a utilizar se estableció en base al método de rarefacción con ayuda del programa PC-ORD[®] versión 4.1 para Windows[®]. El mismo programa se utilizó para obtener la similitud de especies entre comunidades y grupos tróficos mediante el índice de Sørensen (Bray-Curtis) (McCune y Grace, 2002).

Asimismo se realizó la prueba homogeneidad de χ^2 cuadrada para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos grupos con relación a la riqueza y la frecuencia acumulada (Yamane, 1999)

La cuenta total de amebas basada en el método del NMP se normalizó mediante conversión logarítmica y se analizó con la prueba de t de Student entre el suelo contaminado y el no contaminado (Yamane, 1999)

En cuanto al pH real se realizó un análisis de varianza factorial para determinar la existencia de diferencias significativas (Yamane, 1999).

Resultados

Determinación del volumen mínimo de muestra

La curva de acumulación de especies utilizando el estimador de segundo orden (Jackknife) mostró que 10 g de muestra de suelo representa el 65.98% de la riqueza total esperada, por lo que para obtener una riqueza mayor al 95% se necesitaría aumentar el número de submuestras(1 g) a más de 15. Con base en los datos anteriores se eligió trabajar con 8 gramos de suelo, ya que cumple con 60.73% de la representatividad de la comunidad, además de no sobrepasar en más del 11% el promedio de distancia entre las submuestras y su conjunto, lo anterior indica que un aumento en el número de submuestras elevaría en muy poco grado la representatividad de la comunidad, debido a la presencia de más del 55% de especies raras.

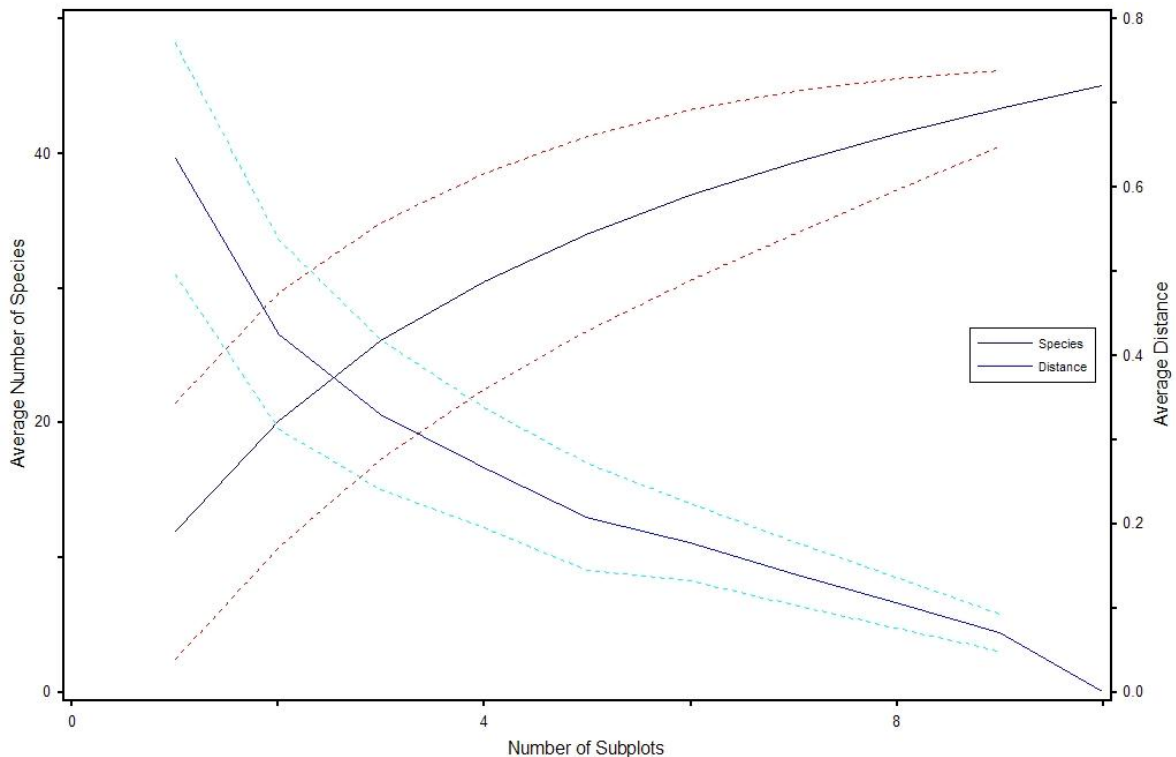


Figura 1. Curva de acumulación de especies en submuestras secuenciales de 1 g de suelo y curva del promedio de medidas de distancia de Sørensen.

Riqueza

Se identificaron un total de 82 especies de amebas de vida libre pertenecientes a 34 géneros y 18 familias. De las cuales 74 se presentaron en el suelo control y 66 en el suelo contaminado, lo que representa una disminución de solamente un 10.81 % de la riqueza de especies (Tabla 1).

Ambos suelos compartieron 58 especies. Las especies de los géneros *Naegleria*, *Guttulinopsis*, *Glaeseria*, *Oscillosignum* y *Gocevia* fueron exclusivos para el suelo control, mientras que las especies *Adelphamoeba sp.*, *Stachyamoeba sp.*, *Thecamoeba similis*, *Platyamoeba sp.*, *Flabellula sp.*, *Filamoeba sp.*, *Cochliopodium sp.* y *Euglypha sp.* se observaron solamente en el suelo contaminado (Tabla 1).

Tabla 1. Especies identificadas en ambos suelos: suelo control (S) y suelo contaminado (SCrVI); familia y grupo trófico (preferencia trófica) al que pertenecen (GT): Bacterívoro (B), Bacterívoro-Protozoos (B-P), Bacterívoro-Alguívoro (B-A), Bacterívoro-Detrítico (B-D), Bacterívoro-Levaduras (B-L), Omnívoro (O), Fungívoro (F), Protozoos (P) e Indeterminado (*).

FAMILIA	ESPECIE	S	SCrVI	GT
VAHLKAMPFIDAE	<i>Vahlkampfia enterica</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia aberdonica</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia froschi</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia russelli</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia ovis</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia avara</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia ustiana</i>	+	+	B
	<i>Vahlkampfia sp.</i>	+	+	*
	<i>Naegleria gruberi</i>	+	-	B
	<i>Willaertia sp.</i>	+	-	*
	<i>Willaertia af. magna</i>	+	+	*

	<i>Adelphamoeba galeacystis</i>	+	+	B
	<i>Adelphamoeba sp.</i>	-	+	*
	<i>Tetramitus rostratus</i>	+	+	B
	<i>Paratetramitus jugosus</i>	+	+	B
GRUBERELLIDAE	<i>Stachyamoeba sp.</i>	-	+	*
	<i>Stachyamoeba lipophora</i>	+	+	B
GUTTULINOPSIDAE	<i>Guttulinopsis nivea</i>	+	-	B
	<i>Rosculus ithacus</i>	+	+	B
HARTMANNELLIDAE	<i>Glaeseria mira</i>	+	-	B
	<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	+	+	B
	<i>Hartmannella vermiformis</i>	+	+	B
THECAMOEBIDAE	<i>Thecamoeba terricola</i>	+	+	B-P
	<i>Thecamoeba similis</i>	-	+	B-P
	<i>Dermamoeba sp.</i>	+	+	F
	<i>Paradermamoeba valamo</i>	+	+	B
VANNELLIDAE	<i>Vannella platypodia</i>	+	+	B
	<i>Vannella lata</i>	+	-	B
	<i>Vannella simplex</i>	+	-	B
	<i>Vannella miroides</i>	+	+	B
	<i>Vannella cirrifera</i>	+	-	B
	<i>Platyamoeba stenopodia</i>	+	+	B
	<i>Platyamoeba placida</i>	+	+	B
	<i>Platyamoeba sp.</i>	-	+	B
PARAMOEBIDAE	<i>Korotnevella stella</i>	+	+	B-P
	<i>Korotnevella bulla</i>	+	-	P
	<i>Mayorella oclawaha</i>	+	-	B-P
	<i>Mayorella ambulans</i>	+	-	B-P
	<i>Mayorella godesae</i>	+	-	B-P
	<i>Mayorella spatula</i>	+	+	B
	<i>Mayorella cultura</i>	+	+	B
	<i>Mayorella microeruca</i>	+	+	B-A

	<i>Mayorella bicornifrons</i>	+	-	O
	<i>Mayorella riparia</i>	+	+	B-P
	<i>Oscillosignum proboscidium</i>	+	-	*
VEXILLIFERIDAE	<i>Vexillifera bacillipedes</i>	+	+	B
FLABELLULIDAE	<i>Paraflabellula kudoii</i>	+	+	B
	<i>Paraflabellula reniformis</i>	+	+	B
	<i>Flabellula sp.</i>	-	+	B
LEPTOMYXIDAE	<i>Rhizamoeba australiensis</i>	+	+	B
	<i>Rhizamoeba polyura</i>	+	+	B
	<i>Rhizamoeba timidum</i>	+	+	*
	<i>Rhizamoeba sp.1</i>	+	+	*
	<i>Leptomyxa reticulata</i>	+	+	B-P
	<i>Leptomyxa sp.</i>	+	-	*
ACANTHAMOEBIIDAE	<i>Acanthamoeba triangularis</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba griffini</i>	+	+	O
	<i>Acanthamoeba sp.</i>	+	-	O
	<i>Acanthamoeba sp.1</i>	+	+	O
ECHINAMOEBIIDAE	<i>Echinamoeba silvestris</i>	+	+	B
	<i>Echinamoeba exundans</i>	+	+	B
	<i>Filamoeba sp.</i>	-	+	*
	<i>Filamoeba nolandi</i>	+	+	B
HYALODISCIDAE	<i>Flamella citrensis</i>	+	+	B
	<i>Flamella sp.</i>	+	+	B
COCHLIOPODIIDAE	<i>Cochliopodium actinophorum</i>	+	+	B
	<i>Cochliopodium minus</i>	+	+	B-D
	<i>Cochliopodium sp.</i>	-	+	*

	<i>Gocevia fonbrunei</i>	+	-	B-L
ARACHNULIDAE	<i>Arachnula impatiens</i>	+	+	O
	<i>Arachnula sp.</i>	+	+	*
BIOMYXIDAE	<i>Biomyxa vagans</i>	+	+	B
	<i>Biomyxa sp.</i>	+	+	*
	<i>Biomyxa sp. 1</i>	+	+	*
TRINEMATIDAE	<i>Trinema sp.</i>	+	+	*
EUGLYPHIDAE	<i>Euglypha sp.</i>	-	+	*
	<i>sp. 1</i>	+	+	*

Abundancia

En base a una frecuencia absoluta total de 96 registros, la especie más abundante en el grupo control fue *Vahlkampfia aberdonica* con 60 registros, seguida de *Vahlkampfia ustiana* con 58 y *Paratetramitus jugosus* con 56. En cuanto al grupo contaminado las especies más abundantes fueron *Paratetramitus jugosus*, *Vahlkampfia aberdonica* y *Vahlkampfia avara* con 66, 65 y 63 registros respectivamente.

De acuerdo al porcentaje de frecuencia relativa por especie, en el suelo control el mayor valor corresponde al 62.5%, mientras que para el suelo contaminado el porcentaje de frecuencia aumentó a 68.7%. Por lo que ambas comunidades se estructuraron únicamente en especies comunes y raras; comprendiendo estas últimas más del 91% de las especies registradas en el suelo control y más del 95% en el suelo contaminado. Las especies sumamente raras (1 registro) fueron 16 (21.6%) en el suelo control y 18 (27.2%) en el suelo contaminado. Ambos grupos compartieron 5 especies raras: *Thecamoeba terrícola*, *Vannella miroides*, *Mayorella cultura*, *Acanthamoeba griffini* y *Cochliopodium minus*. Asimismo, de las especies presentes exclusivamente en cada comunidad, *Naegleria gruberi*, *Guttulinopsis nivea*, *Oscillosignum proboscidium* se observaron solo una vez

dentro del suelo control, mientras que *Adelphamoeba sp.*, *Stachyamoeba sp.*, *Thecamoeba similis*, *Flabellula sp.* y *Cochliopodium sp.* obtuvieron un solo registro en el suelo contaminado(Figura 2 y 3).

A diferencia de las especies raras, las especies comunes contribuyeron únicamente con el 8.1% y 4.5% de la riqueza en el suelo control y el suelo contaminado respectivamente. El suelo control presentó 6 especies comunes: *Vahlkampfia aberdonica*, *Vahlkampfia ustiana*, *Paratetramitus jugosus*, *Vahlkampfia avara*, *Hartmannella vermiformis* y *Dactylamoeba stella*, mientras que el suelo contaminado solo presentó como especies comunes a: *Paratetramitus jugosus*, *Vahlkampfia aberdonica* y *Vahlkampfia avara* (Figura 2 y 3). Las especies *Vahlkampfia ustiana*, *Hartmannella vermiformis* y *Korotnevella stella* cuya abundancia fue de 58, 53 y 52 respectivamente en el suelo control, disminuyeron considerablemente en el suelo contaminado a 21, 42 y 4, lo que fue estadísticamente significativo ($\chi^2 P<0.05$).

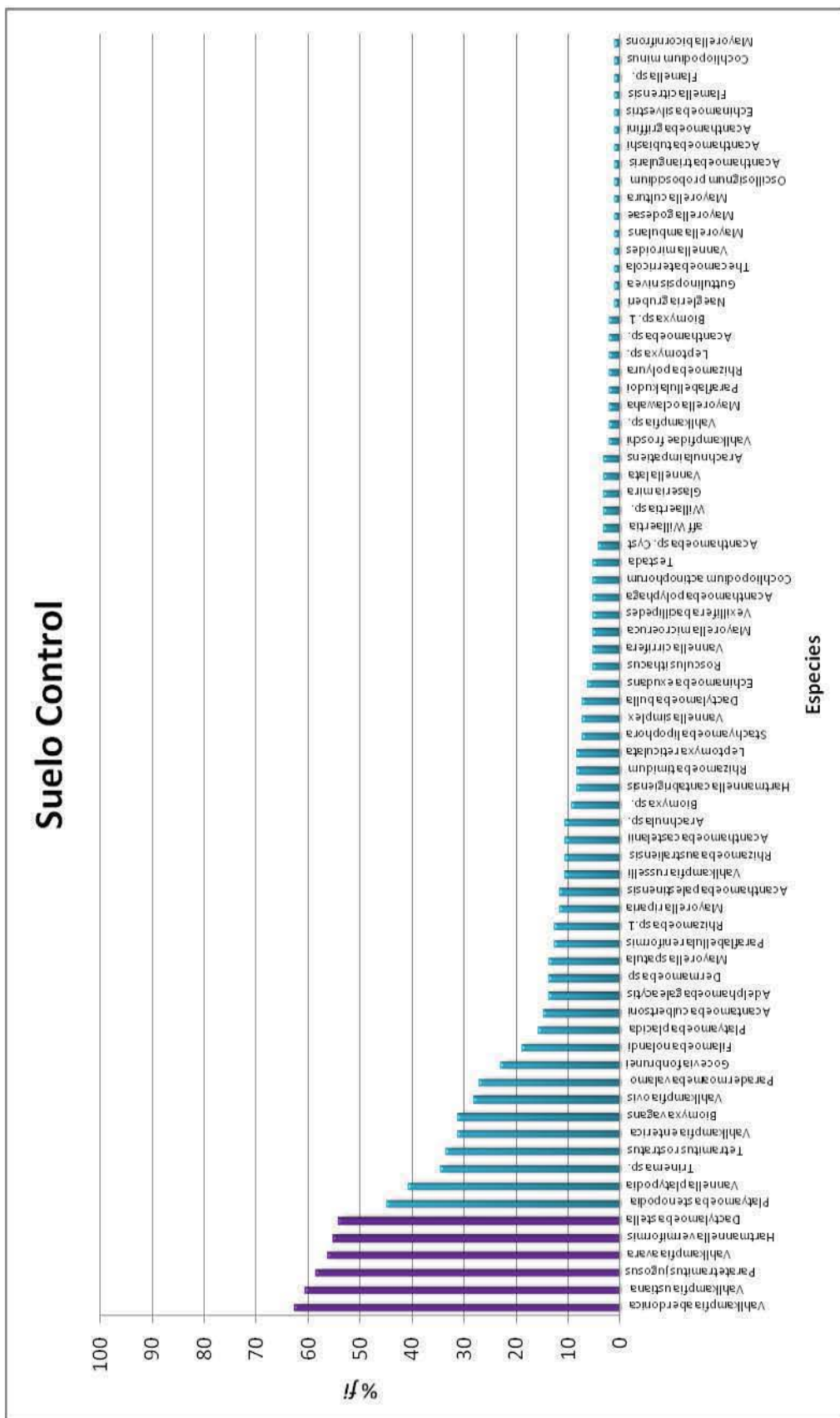


Figura 2. Porcentaje de la frecuencia relativa por especie dentro del suelo control. Especies comunes (morado) y especies raras (azul).

Suelo Contaminado con CrVI

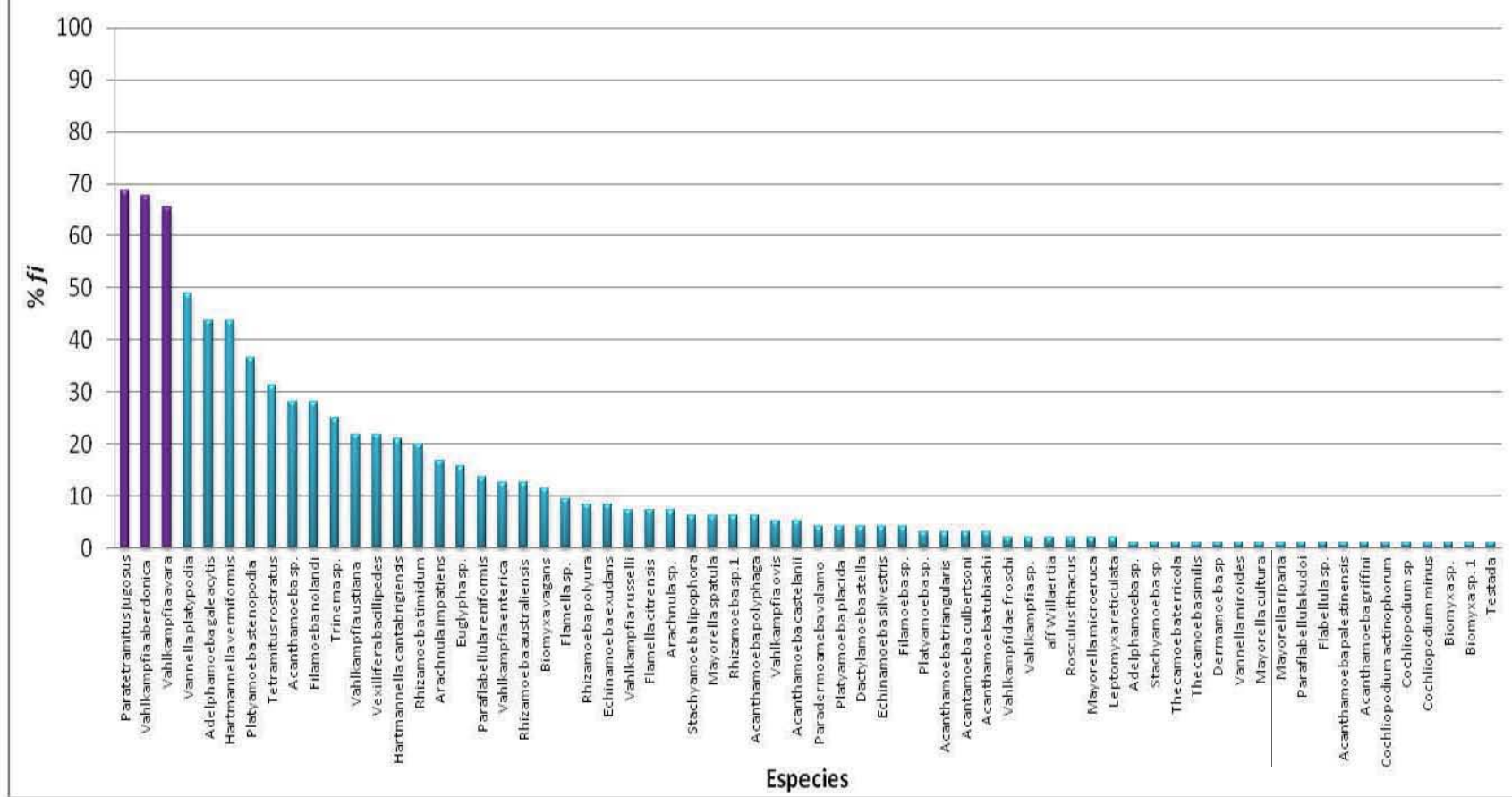


Figura 3. Porcentaje de frecuencia relativa por especie dentro de suelo contaminado. Especies comunes (morado) y especies raras (azul).

Riqueza y abundancia acumulada por tiempo

La riqueza y la abundancia acumulada a lo largo del experimento se comportaron de manera similar para ambos grupos. Sin embargo, en el suelo control la mayor riqueza se alcanzó el día 15 con 49 especies, mientras que la mayor abundancia respecto a todas las especies se alcanzó hasta el día 20 con 180 registros. El suelo contaminado obtuvo sus mayores valores el día 10 con 44 especies y una abundancia de 185 superando en ambos parámetros al control, al igual que en el día 5, cuando se registró mayor riqueza y abundancia de amebas (Figura 4 y 5).

De acuerdo al análisis de ji-cuadrada no existen diferencias significativas con relación a la riqueza de especies entre los diferentes días de muestreo, pero la abundancia acumulada sí difiere significativamente a lo largo del experimento ($P < 0.05$).

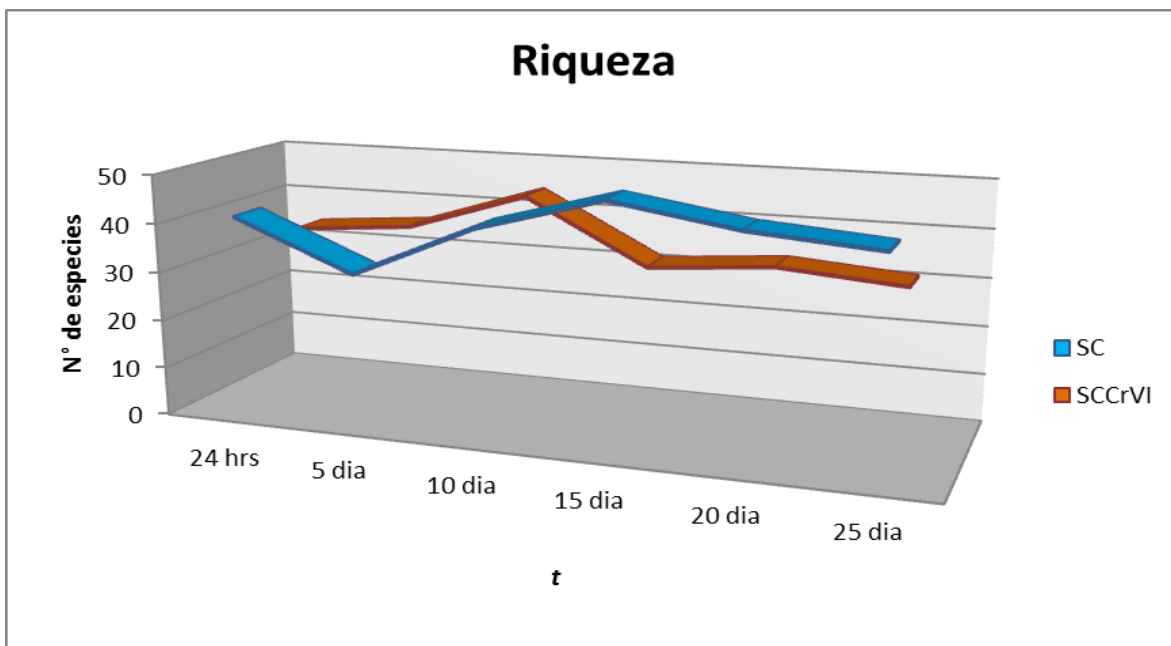


Figura 4. Especies encontradas en cada uno de los días de muestreo (t), dentro del suelo control (S) y el suelo contaminado (SCrVI).

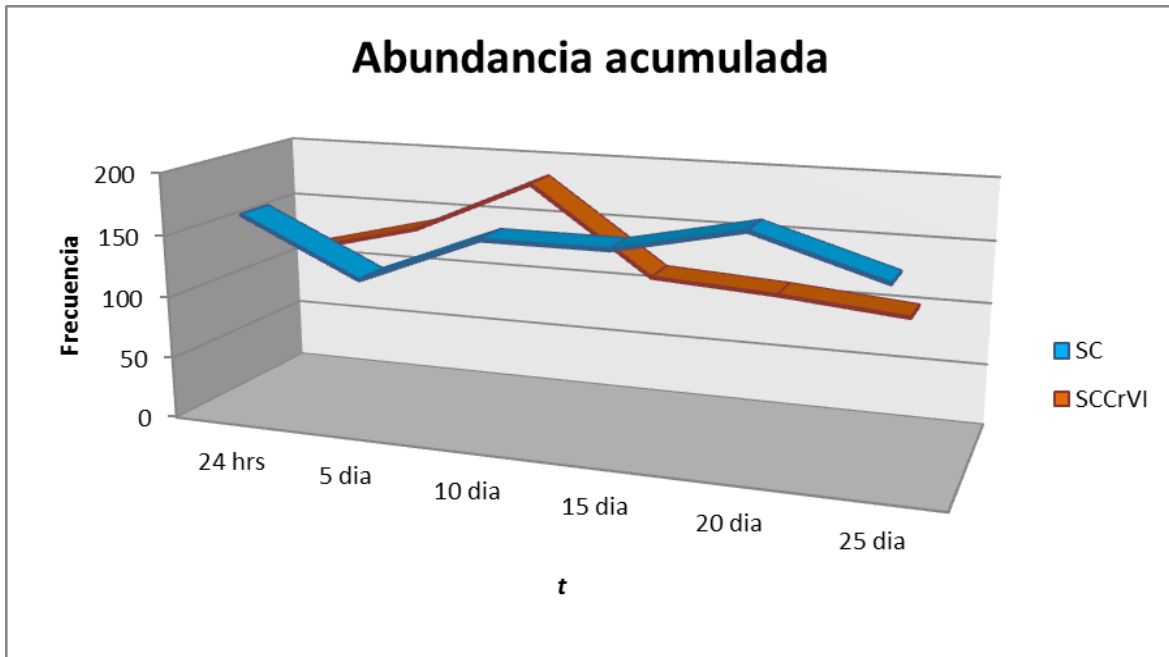


Figura 5. Abundancia acumulada de todas las especies de amebas en cada día de muestreo (t), dentro del suelo control (S) y el suelo contaminado (SCrVI).

En ambos suelos se presentaron 10 especies durante todo el experimento, de las cuales 4 representan a las más abundantes. Sin embargo, las especies *Biomyxa vagans* y *Filamoeba nolandi* aunque se consideraron especies raras aparecieron en patrones muy particulares a lo largo del tiempo y en cada uno de los suelos. En el suelo control, *Biomyxa vagans* tuvo un solo registro (6.25%) en los primeros dos muestreos (24 hrs y día 5) y aumentó su abundancia 50%, 62.5% y 37.5% los siguientes días. Mientras que en el suelo contaminado su mayor registro ($f=3$) fue en el día 5. En el caso de *Filamoeba nolandi*, ésta tuvo de 1 a 8 registros, alcanzando su mayoría el día 20 y disminuyendo a 2 registros para el día 25 en el suelo control. A diferencia del control, dentro del suelo contaminado la especie tuvo su mayor abundancia ($f=7$) a las 24 hrs y la menor el día 20 con solo 2 observaciones.

Las especies *Acanthamoeba sp.*, *Arachnulla impatiens*, *Trinema sp.* y *Euglypha sp.* aumentaron su abundancia el día 10 en el suelo contaminado, en comparación con los demás días de muestreo y con el suelo control.

En el caso de la especie *Acanthamoeba culbertsoni*, ésta presentó diferencias significativas respecto a su abundancia durante todos los días de muestreo entre los 2 grupos ($\chi^2 P < 0.05$). Dentro del suelo control *Acanthamoeba culbertsoni* tuvo su máximo valor con 8 registros a las 24 hrs; el día 5 y 10 no se registró, sino hasta el día 15 (f=3), continuando la observación de *Acanthamoeba culbertsoni* el día 20 y 25 (f=1 y f=2). En el suelo contaminado solo se registró en las primeras 24 hrs (f=1) y el día 10 (f=2).

Similitud de riqueza y abundancia de especies

De acuerdo al análisis de similitud de Sørensen (Bray-Curtis) por presencia-ausencia, la riqueza de especies en el suelo contaminado y en el suelo control difirió en su mayoría, con excepción del análisis a las 24 hrs del suelo con CrVI y el día 25 del suelo control, los cuales compartieron una similitud del 95%. En del suelo control se formaron dos grupos: el día 5 y 10 compartieron el 100% de información y las 24 horas y el día 20 tuvieron una semejanza de 81%. En cuanto al suelo contaminado la mayor similitud correspondió al 87%, a las 24 hrs y el día 25 (Figura 6).

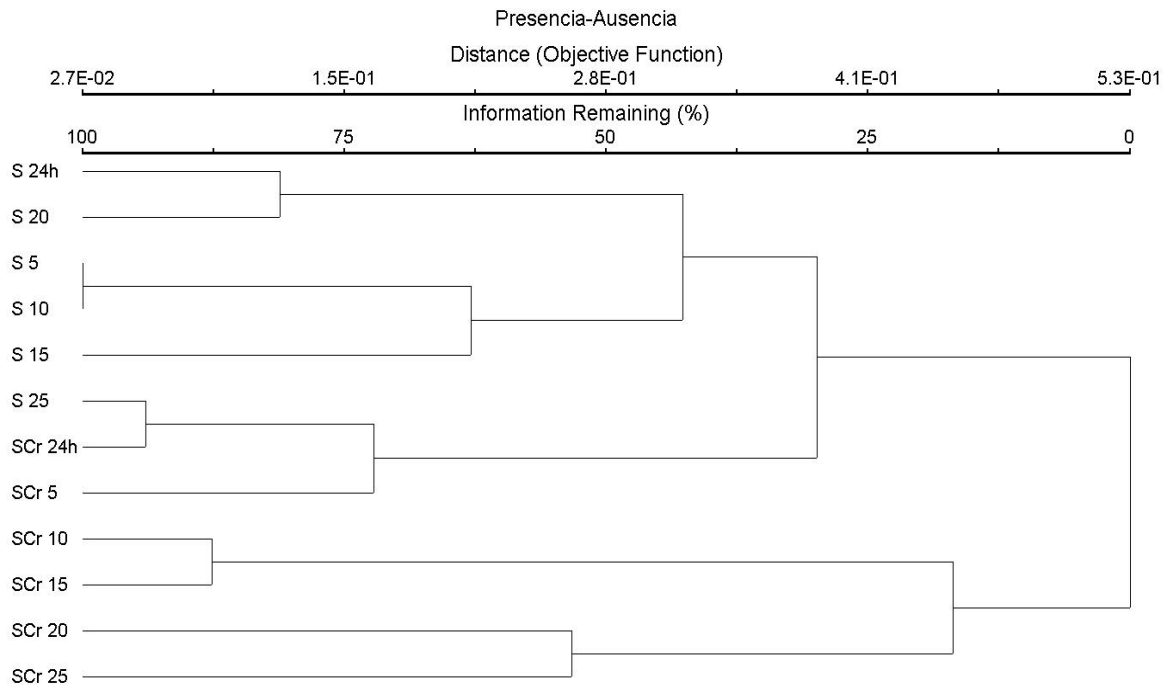


Figura 6. Dendrograma de similitud relativa de la riqueza entre el suelo control (S) y el suelo contaminado (SCr) a los diferentes tiempos de muestreo: a las 24h y los días (5, 10, 15, 20 y 25) (Sørensen (Bray-Curtis)).

En cuanto a la abundancia de especies el análisis de similitud separó a los 2 suelos, debido a que no compartieron información entre ellos. Asimismo, se formaron 4 grupos con más del 75% de similitud. El suelo control integró 2 grupos, uno de ellos con una similitud de 85% entre los días 15 y 25, y otro con 78% entre el día 5 y 10. El suelo contaminado constituyó dos grupos muy parecidos, uno de ellos compartió el 100% de información entre el día 15 y 20, en tanto que a las primeras 24 hrs y al día 5 tuvieron una semejanza de 93% (Figura 7).

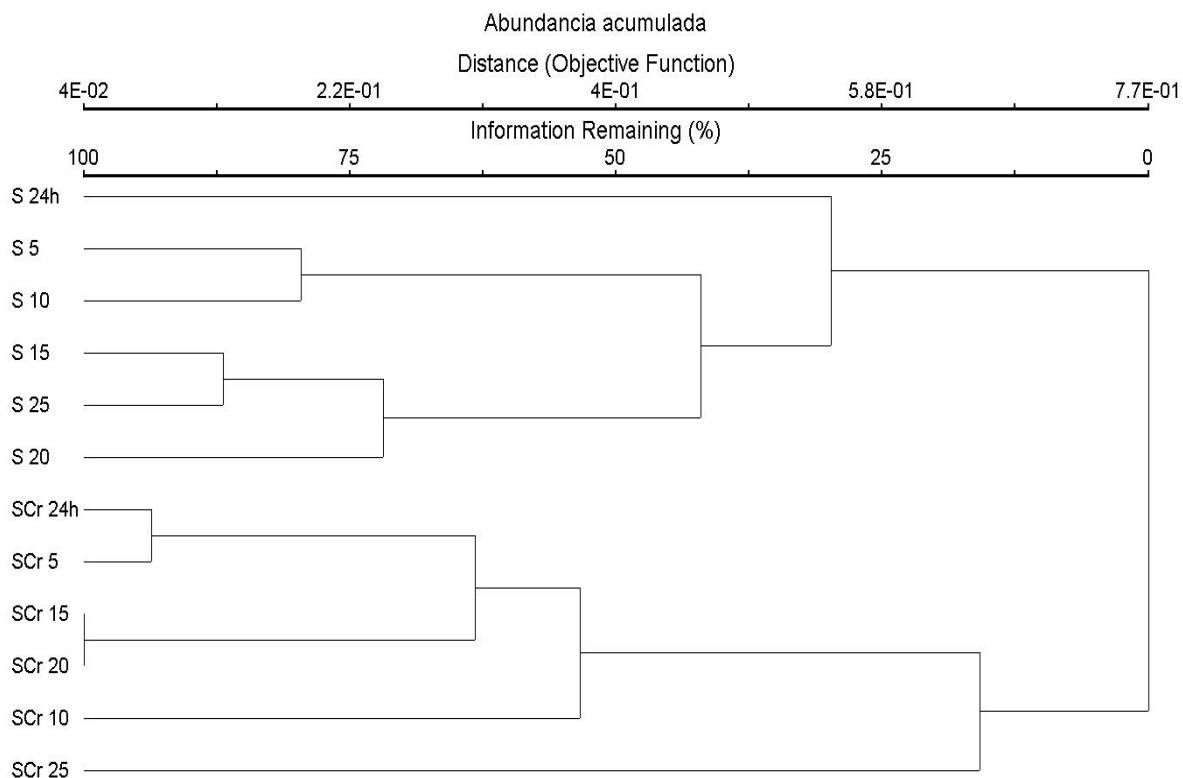


Figura 7. Dendrograma de similitud relativa de la abundancia por especie entre el suelo control (S) y el suelo contaminado (SCr) a los diferentes tiempos de muestreo: a las 24h y los días (5, 10, 15, 20 y 25) (Sørensen (Bray-Curtis)).

Cantidad total de amebas

En el suelo control la cantidad total de amebas fue de 5848 individuos por gramo de suelo en peso fresco y en el suelo contaminado de 4445 organismos por gramo de suelo en peso fresco (Datos transformados logarítmicamente). De acuerdo a la prueba *t* de Student, no hubo diferencias significativas en relación al número total de amebas ($P < 0.05$).

Grupos tróficos

Las especies se concentraron en 8 grupos tróficos propuestos: Bacterívoro, Bacterívoro-Protozoos, Bacterívoro-Alguívoro, Bacterívoro-Detritívoro, Bacterívoro-Levaduras, Omnívoro, Fungívoro y amebas con preferencia trófica a protozoos. El 65.1% de las especies se ubicaron el grupo Bacterívoro, el 17.5% dentro del Omnívoro, 9.5% en el Bacterívoro-Protozoos y los demás grupos constituyen el 1.6% de especies cada uno (Figura 8).

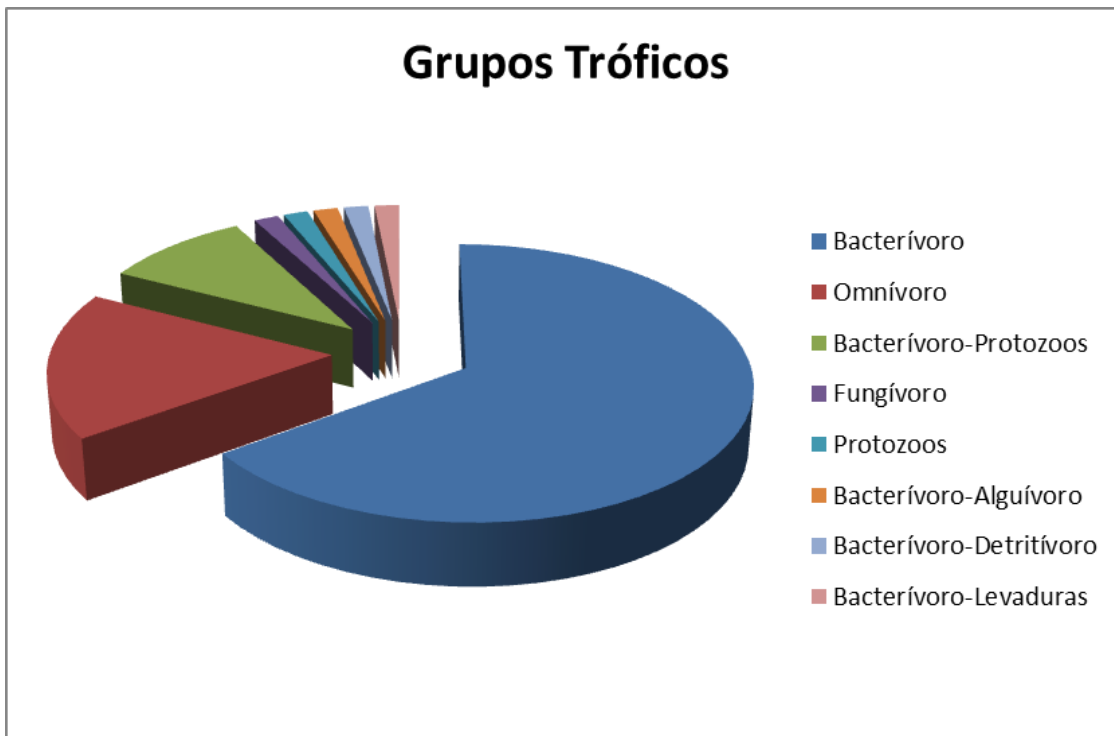


Figura 8. Proporción de los grupos tróficos presentes respecto a las preferencias alimenticias de las especies encontradas.

Los dos suelos compartieron especies ubicadas en 6 grupos tróficos, sin embargo en el suelo control se encontró una especie con preferencia trófica a protozoos y otra con preferencia a bacterias y levaduras.

En ambos suelos el grupo Bacterívoro represento más del 60% de las frecuencias acumuladas a lo largo del experimento en ambos suelos. El siguiente grupo más frecuente en el control fue el Bacterívoro-Protozoos, seguido de las especies omnívoras (Figura 9). Al contrario, en el suelo contaminado estos grupos se invirtieron, siendo más frecuente los omnívoros que los bacterívoros-protozoos. Además, en el día 15 únicamente se observaron especies bacterívoras y omnívoras (Figura 10).

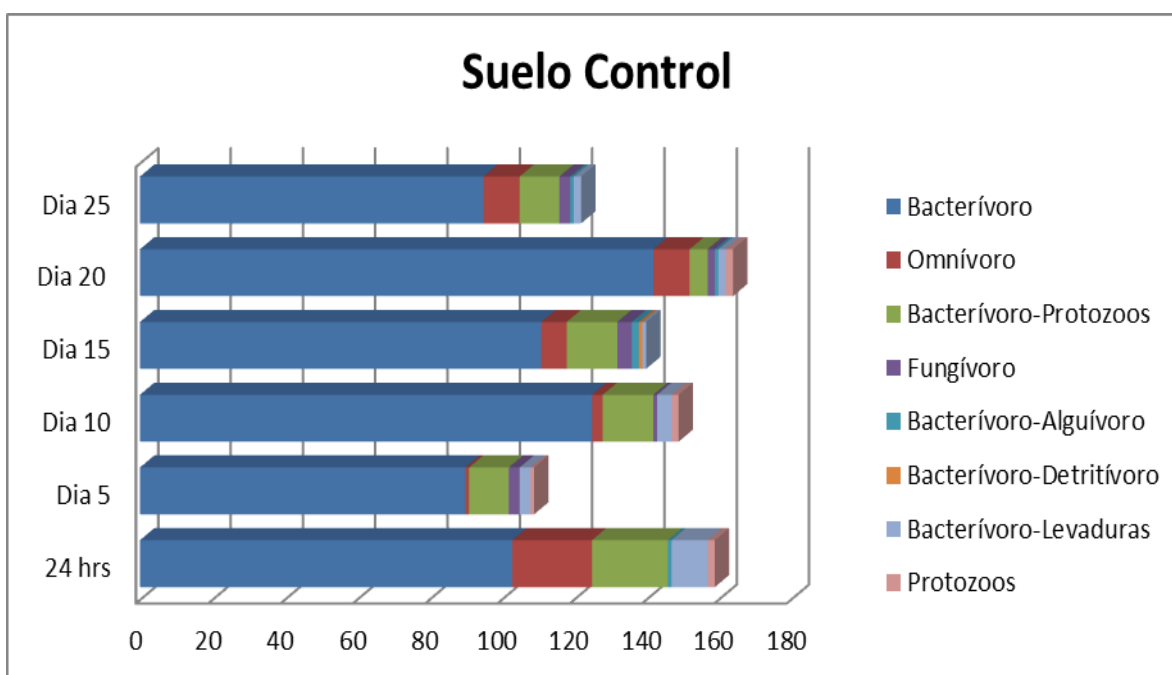


Figura 9. Abundancia acumulada de las especies pertenecientes a cada grupo trófico dentro del suelo control.

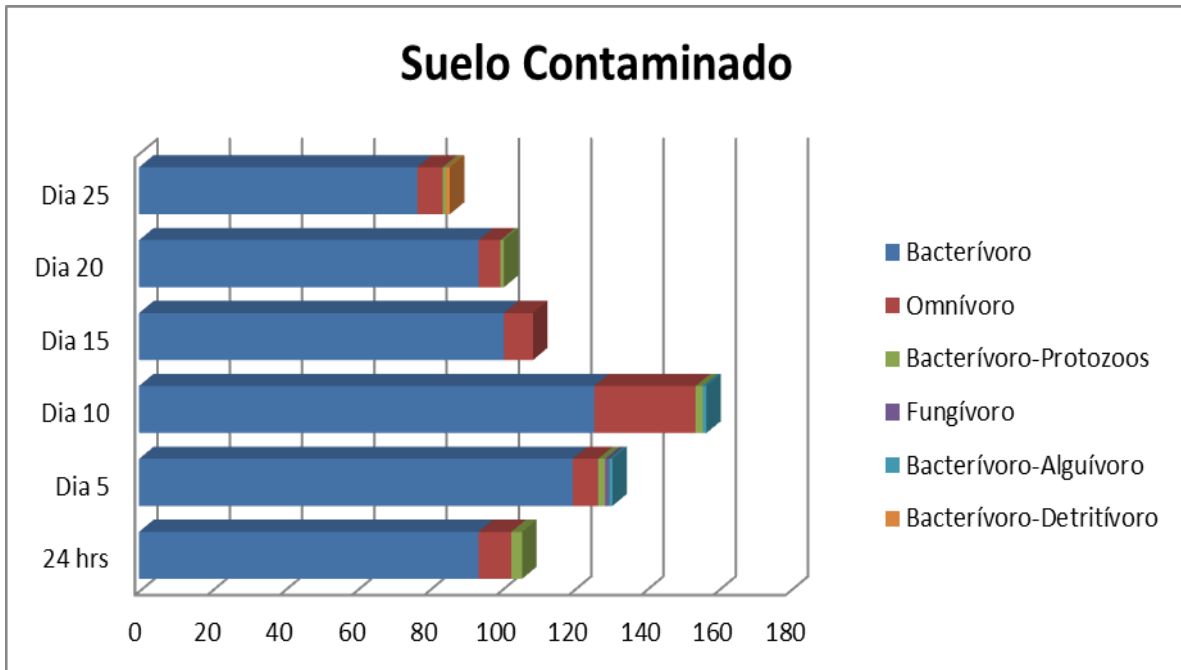


Figura 10. Abundancia acumulada de las especies pertenecientes a cada grupo trófico dentro del suelo contaminado.

Similitud entre grupos tróficos

El análisis de similitud de acuerdo a los grupos tróficos Bacterívoro, Omnívoro y Bacterívoro-Protozoos formó 5 grupos con más del 80% de semejanza. De estos grupos, 2 corresponden al suelo control, donde los días 5 y 25 compartieron el 95% de información y los días 10 y 15 compartieron el 92%. El suelo contaminado formó dos grupos: el análisis a las 24 hrs y al día 20 tuvieron 100% de similitud. Asimismo el día 15 compartió 98% de semejanza con el grupo anterior. Del mismo modo el grupo formado por el día 10 y 15 del suelo control tuvo un parecido del 87% con el día 5 del suelo contaminado (Figura 11).

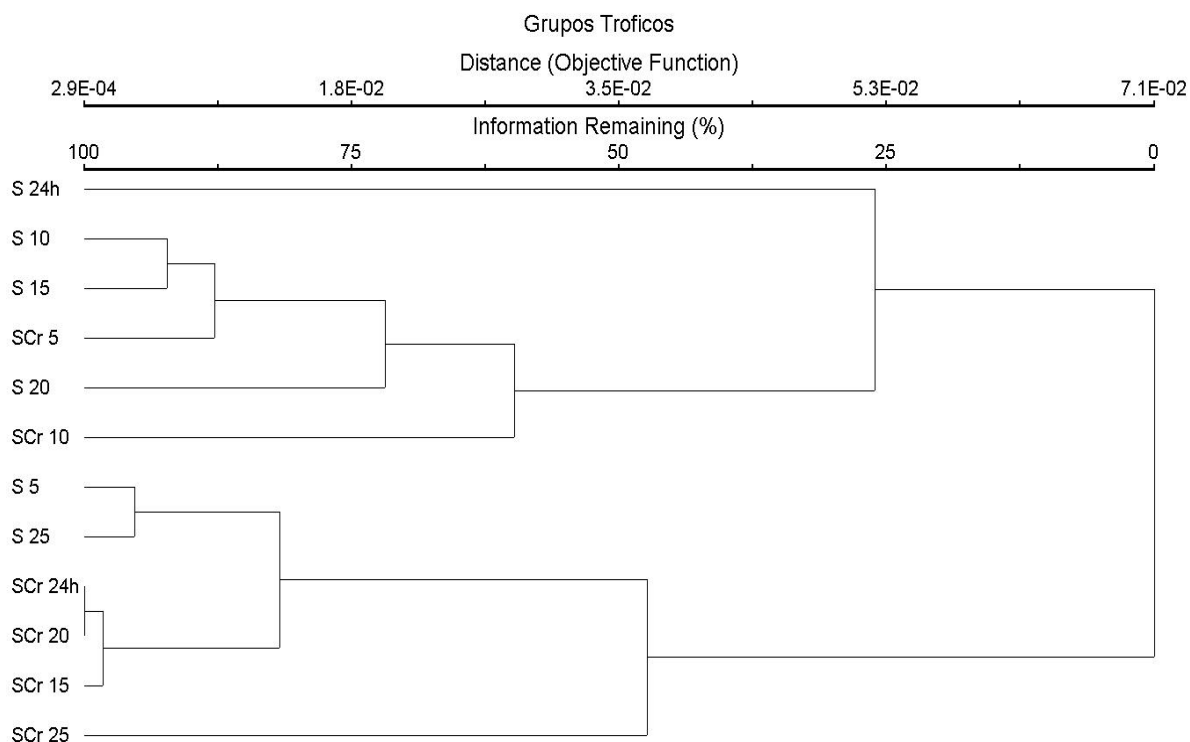


Figura 11. Dendrograma de similitud relativa de frecuencias acumuladas de las especies pertenecientes a los grupos tróficos: Bacterívoro, Omnívoro y Bacterívoro-Protozoos, entre el suelo control (S) y el suelo contaminado (SCr) a los diferentes tiempos de muestreo: a las 24 h y los días (5, 10, 15, 20 y 25) (Sørensen (Bray-Curtis)).

Análisis fisicoquímicos

De acuerdo al análisis del suelo, éste posee una textura migajón arcillo-arenoso (limos 34%, arcillas 22% y arenas 44%), un pH de 7.3, 5.04% de materia orgánica y un porcentaje de 33.44 cmol/Kg de capacidad de intercambio catiónico.

Respecto al pH, éste se mantuvo durante el experimento en un rango de 7.3 a 7.9 en el suelo control. El valor más bajo correspondió a las 24 hrs y el más alto al día 25. En el suelo contaminado el pH aumentó significativamente durante todo el experimento; el pH

más bajo fue de 7.7 durante el día 10 y el valor más alto 8.3 se registro el día 15 (ANOVA $\alpha 0.05$) (Figura 12).

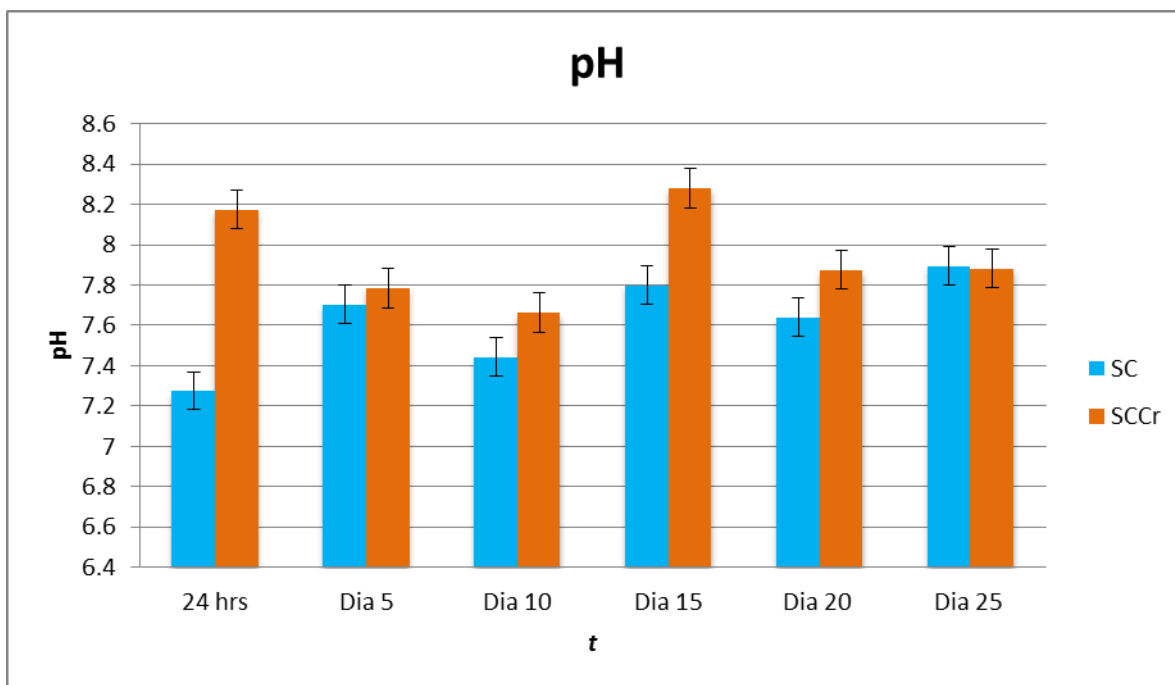


Figura 12. Cambio en los niveles de pH en el suelo control (S) y el suelo contaminado (SCrVI), durante el experimento (t).

Discusión

La contaminación del suelo con metales pesados provoca una disminución en la riqueza y abundancia de especies en distintas comunidades de protozoos, en relación con la dosis metálica y el tiempo de exposición (Babich *et al.*, 1982; Boon *et al.*, 1988; Madoni *et al.*, 1995; Haq *et al.*, 2000; Cervantes *et al.*, 2001; Nguyen-Viet *et al.*, 2007; Nguyen-Viet *et al.*, 2008). En cuanto al efecto del cromo hexavalente sobre la comunidad de protozoos Madoni *et al.*, (1995) encontró que la disminución en la riqueza y abundancia de especies está relacionada directamente con la concentración de CrVI. Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas ni en la riqueza de especies y ni en cantidad total de amebas a lo largo del experimento. Lo cual significa que la mayoría de las especies amebianas poseen mecanismos de tolerancia o resistencia a los cambios producidos en el suelo por la adición del cromo, así como al mismo metal.

No obstante, el CrVI funcionó como un factor selectivo en la comunidad, al eliminar ciertas especies y favorecer a otras (Baath *et al.*, 1998). De esta manera, el crecimiento de algunas poblaciones tolerantes al metal pudo ser beneficiado al excluir otras especies sensibles, las cuales representaban una competencia por los recursos, razón por la que se mantuvo la cantidad total de amebas (Nguyen-Viet *et al.*, 2007). Cabe mencionar que en el conteo para obtener el número total de individuos, se registró tanto a los trofozoítos como a los quistes. Por lo que no se hizo una distinción entre los organismos activos y latentes en los suelos. Aunque el contaminante pudiese haber actuado como un factor de estímulo para entrar en estado quiescente, no se discriminó a las formas enquistadas, debido a que los métodos para separar estas dos formas amebianas pueden amplificar el efecto real del metal. Estos métodos consisten, ya sea en elevar la temperatura o en adicionar compuestos químicos que eliminen instantáneamente a los trofozoítos (Singh, 1945). Sin embargo, ambos métodos pueden también eliminar quistes o estimular a algunas amebas para desenquistarse y exagerar el papel de los organismos cultivables. A pesar del sesgo propio del método de estimación utilizado en este trabajo, el mismo método se empleó para ambos suelos, proporcionando un error similar y permitiéndonos

comparar ambas comunidades (Singh, 1946; Bamforth, 1995; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2004).

Asimismo, el CrVI como factor de selección resultó en la presencia tanto de especies sensibles como tolerantes, con la capacidad de crecer bajo estas condiciones de perturbación (Sudo y Aiba, 1973; Haq *et al.*, 1997; Haq *et al.*, 2000), o especies que posiblemente transformen el metal o posean mecanismos de detoxificación (Haq *et al.*, 1998; Haq *et al.*, 2000; Ledin, 2000; Cheung y Gu, 2006). Esto concuerda con una gran cantidad de estudios que demuestran que los sistemas edáficos contienen un amplio espectro de tipos microbianos, algunos sumamente sensibles y otros resistentes a diferentes tipos de contaminantes (Shi *et al.*, 2002). Por lo que posiblemente en este estudio la riqueza y la cantidad total de la comunidad de amebas se mantuvo al ser remplazadas las especies sensibles al Cr por aquellas con mayor espectro de tolerancia y adaptabilidad a estas condiciones, ya que este espectro de tolerancia y resistencia a distintos metales, así como al CrVI, parece variar entre las diferentes especies de protozoos con respecto a la concentración y tiempo de exposición de acuerdo a lo observado por Sudo y Aiba, (1973), Haq *et al.*, (1997) y Haq *et al.*, (2000).

La resistencia a este tipo de factores adversos dentro de los protozoos se atribuye principalmente a la capacidad de algunas especies de entrar en estado de latencia mediante la formación de quistes (Sleigh, 1973; Cowling, 1994; Hausmann y Hülsmann, 1996; Smirnov, 2009). Este proceso de diferenciación es inducido principalmente por estrés ambiental y alimenticio (Singh, 1975; Cowling, 1994; Martín-González *et al.*, 2005) protegiendo a los organismos de excesivas fluctuaciones de humedad, temperatura, pH y suministro de alimento. En este caso, es posible que los quistes hayan funcionado como refugio ante el metal, evitando un efecto tóxico a algunas especies: como *Adelphamoeba sp.* y *Stachyamoeba sp.* cuyos quistes de doble pared pudieron impedir el paso del metal en solución, al contrario de *Naegleria gruberi*, que a pesar de también formar quistes de doble pared, su característica porosa, los hace permeables al medio, facilitando la acción tóxica del cromo (Page, 1988; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2004; Jonckheere y Brown, 2005). A diferencia de estos organismos, las especies del género *Glaeseria* poseen quistes

sencillos cubiertos por una sola matriz gelatinosa y su proceso de enquistamiento tarda hasta 6 días, por lo que el metal pudo afectar directamente al trofozoito antes de que la ameba pudiera entrar en estado de quiescencia (Page, 1969; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2004). Probablemente, *Osilocignum sp.* fue afectada de la misma manera, ya que no se conoce la formación de quistes por parte de las especies de este género. (Page, 1988; Smirnov, 2009). Con respecto a *Guttulinopsis nivea*, su crecimiento pudo ser impedido por el aumento de pH que sufrió el suelo al agregar la solución de $K_2Cr_2O_7$, ya que esta especie crece en condiciones ligeramente ácidas (Raper *et al.*, 1977).

Mientras tanto, la especie *Gocevia fonbrunei* quien posee una cutícula y capacidad de formar quistes, no toleró la presencia del metal, a diferencia de las especies del género *Cochliopodium* que permanecieron en el suelo contaminado, a pesar de compartir muchas características con *Gocevia*.

Por otro lado, no se conoce la capacidad de formar quistes por parte de las especies del género *Thecamoeba*, *Flabellula* y *Platyamoeba*, pero algunas de ellas asumen un estado celular latente en forma de disco esclerotizado como estrategia de resistencia (Page, 1976; Cowling, 1994; Hausmann y Hülsmann, 1996; Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 2004). Aunque esta estrategia aumenta la relación superficie-volumen celular incrementando el contacto con el cromo, la esclerotización de la célula pudo haber protegido al organismo, o su resistencia podría deberse a otros mecanismos metabólicos de detoxificación. Como en el caso de las especies del género *Filamoeba* y *Euglypha*, cuyos mecanismos de resistencia parecen ir más allá de la formación de quistes, pues algunas especies de estos géneros se han detectado en ambientes contaminados con altas concentraciones de metales (Amaral *et al.*, 2002; Nguyen-Viet *et al.*, 2007).

Existen diferentes mecanismos microbianos en respuesta a la toxicidad de metales, tales como la acumulación, la reducción y la expulsión de metales. La acumulación se considera el principal mecanismo utilizado por los protozoos. Este proceso se ha observado en: *Amoeba proteus*, *Tetrahymena termopila*, *Uronema nigricans* y distintas especies de Colpodidos (Al-Atia, 1980; Schlenk y Moore, 1994, Martín-González *et al.*, 2005; Díaz *et al.*,

2006). Sin embargo, el solo proceso de acumulación podría causar la muerte celular en largos períodos de tiempo. Por lo que la transformación intracelular o extracelular de las formas metálicas solubles a sus formas más estables, parece ser un importante mecanismo de resistencia en protozoos expuestos a CrVI, como en el caso de los ciliados, *Vorticella microstoma*, *Euplotes mutabilis*, *Stylonychia mytilus*, *Tachysoma pellionella* y *Parmecium bursaria* quienes redujeron en más del 50% la concentración del metal en el medio (Shakoori *et al.*, 2004; Mortuza, *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2007; Rehman *et al.*, 2008; Poljsak *et al.*, 2010). Asimismo, la reducción intracelular de CrVI involucra otros procesos de protección, inhibiendo así, la toxicidad de los radicales libres generados durante los procesos oxido-reducción en el interior de la célula (Schlenk y Moore, 1994; Shakoori *et al.*, 2004; Martín-González *et al.*, 2005; Poljsak *et al.*, 2010).

También es posible que la concentración del CrVI adicionada, no represente la dosis tóxica para las amebas (Martín-González *et al.*, 2005), o que no haya estado totalmente biodisponible en el suelo. Dado que la acción de los metales sobre los microorganismos depende de esta biodisponibilidad, los efectos adversos a lo largo del experimento pudieron haber disminuido al ser removido el cromo en solución, ya sea por una rápida absorción por parte de las arcillas del suelo debido a su alta capacidad de intercambio catiónico, y a su posterior precipitación por el pH neutro del suelo (Bartlett, 1991; Bonn *et al.*, 1998; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Giller *et al.*, 2009), o por la formación de complejos con los abundantes compuestos orgánicos del suelo y como resultado la posible reducción de CrVI a CrIII (Song *et al.*, 2006). Este proceso de reducción requiere un consumo de protones, razón por la que el pH del suelo aumentó durante el estudio (Figura 12), lo que en consecuencia facilitó aun más la precipitación del metal (Kotas y Stasicka, 2000; Shi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010; Poljsak *et al.*, 2010). Además, los organismos que perecieron inmediatamente a la adición del CrVI, pudieron también proteger a los organismos vivos al absorber la forma tóxica del cromo, disminuyendo su concentración en el medio y con ello limitando su biodisponibilidad (Harrison *et al.*, 2007). Asimismo, la cantidad de arcillas y materia orgánica presente en el suelo permitió la formación de agregados que funcionaron como microhabitats para las amebas impidiendo

su interacción con el CrVI (Bamforth 1988, Ekelund y Ronn 1994; Kandeler *et al.*, 1996; Nkatsu *et al.*, 2005)

La variación de tolerancia de las diferentes especies de amebas al CrVI y a los cambios producidos en el sistema edáfico a causa del contaminante, modificaron la estructura de la comunidad de amebas en la riqueza y abundancia de especies. A pesar de que las comunidades en ambos suelos se distribuyeron únicamente en especies comunes y raras, en el suelo contaminado la riqueza de especies comunes disminuyó en un 50%, pero su abundancia aumentó en comparación con el suelo control. Este aumento en la abundancia de *Vahlkampfia aberdonica*, *Vahlkampfia avara* y *Paratetramitus jugosus*, puede atribuirse a su rápida formación de quistes. Sin embargo, al comparar a *Vahlkampfia ustiana*, *Hartmanella vermiformis* y *Korotnevella stella*, quienes pasaron de ser especies comunes en el suelo control a ser especies raras en el suelo contaminado (Figuras 2 y 3), nos indica que esta variación no depende solamente de un mecanismo de resistencia propio de la comunidad amebiana, sino de la composición y disponibilidad de su alimento (Bhattacharya *et al.*, 1987; Nguyen-Viet *et al.*, 2007).

Por lo tanto el contaminante también tuvo un impacto en las comunidades fúngicas, bacterianas y de levaduras, la cuales representan la principal fuente de alimento para las amebas (Ekelund *et al.*, 2003). Razón por lo que las comunidades amebianas fueron completamente diferentes en la composición y abundancia de especies en los distintos días de muestreo de acuerdo al análisis de similitud (Figuras 6 y 7).

De esta manera, la disminución en la riqueza y abundancia de especies de amebas las primeras 24 hrs del experimento, muestra la acción directa del CrVI sobre la comunidad, donde las poblaciones sumamente sensibles fueron eliminadas o decrecieron en número, permaneciendo especies resistentes como *Filamoeba nolandii*, o aquellas con capacidad de enquistarse rápidamente como las especies del genero *Acanthamoeba* (Bamforth, 1988). Posterior a las 24 hrs y hasta el día 10, ambos parámetros aumentaron gradualmente debido al rápido crecimiento poblacional de las especies que resistieron la perturbación inicial como los individuos de la familia Vahlkampfiidae, y al de especies oportunistas como

Acanthamoeba sp. quienes aprovecharon rápidamente los recursos disponibles al reducirse de forma temporal la presión competitiva con las especies que se perdieron durante las primeras 24 hrs (Figuras 4 y 5) (Sleigh, 1973; Ekelund *et al.*, 2003). Consecutivamente una disminución en la riqueza y abundancia de amebas, así como poca diferencia en las proporciones del grupo bacterívoro y omnívoro de los días 20 y 25 con respecto al control, indican una disminución en los recursos alimenticios y un posible restablecimiento de la competencia (Figuras 9 y 10).

Las comunidades microbianas que sirven de alimento para las amebas, están sujetas a la disponibilidad de nutrientes, los cuales dependen a su vez del pH del medio. En conjunto, la oscilación del pH del suelo causada por la adición del CrVI y la toxicidad del mismo, también cambiaron la estructura de estas comunidades limitando su actividad como productores primarios e impactando en la estructura trófica de la comunidad amebiana. Lo cual se ve reflejado en el aumento de las proporciones de amebas bacterívoras y omnívoras en los días 5 y 10, así como en la pérdida de los grupos con preferencia trófica a protozoos y a bacterias-levaduras y a la disminución de amebas fungívoras, bacterívoras-alguívoras y bacterívoras-detritívoras (Figuras 9 y 10) (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Frostergard *et al.*, 1995; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006). De manera que la comunidad de amebas del suelo con CrVI se estructuró diferente al suelo control con respecto a la abundancia de los grupos tróficos: Bacterívoro, Omnívoro y Bacterívoro-Protozoos (Figura 11).

El aumento en la proporción de amebas bacterívoras en el suelo con CrVI (Figuras 9 y 10), fue causado por una mayor disponibilidad de presas bacterianas. Esta disponibilidad se debe a que las poblaciones bacterianas del suelo son afectadas en menor grado por la contaminación con metales que otros grupos microbianos, gracias al intercambio genético que les permite adquirir características para sobrevivir y adaptarse a estas condiciones. Además, el modo de vida de algunas bacterias dentro de las cavidades del suelo y principalmente dentro de biopelículas, les brinda cierta protección contra la depredación y contra fluctuaciones ambientales como a cambios producidos en el pH del suelo, así como a diferentes flujos de metales, debido a la matriz extracelular de polímeros de la

biopelícula producida por las mismas bacterias, la cual retiene y bloquea el paso de algunos iones metálicos, impidiendo su contacto con las células y en consecuencia inmovilizándolos para su posterior precipitación. Además, la distribución en el interior de la biopelícula de diferentes tipos bacterianos capaces de adaptar su fisiología a este tipo de estrés, brinda protección a otras bacterias que pudieran ser sensibles al metal (Ledin, 2000; Almas *et al.*, 2005; Harrison *et al.*, 2007).

Estas estrategias no las excluyen por completo de la toxicidad del CrVI y de la presión de los depredadores. Las bacterias gram-negativas son más abundantes en suelos contaminados con metales que las bacterias gram-positivas (Baath, 1989; Giller *et al.*, 1997; Ekelund *et al.*, 2003;), lo cual puede estar relacionado a su tolerancia o capacidad de reducir el metal o a la ausencia de depredadores por la contaminación (Holtze *et al.*, 2003).

Este cambio en las comunidades bacterianas pudo ser la causa de la disminución en las abundancias de la especie bacterívora *Biomyxa vagans*, ya que la abundancia de bacterias gram-negativas, no significa alimento disponible para todas las especies de amebas bacterívoras. Existe selectividad alimenticia, no solo entre diferentes tipos bacterianos sino también entre cepas del mismo tipo (Singh, 1975; Bonkowski, 2003). Esta preferencia se debe a diferencias en la morfología y fisiología tanto de las colonias bacterianas como de las células individuales. A pesar de esta selectividad alimenticia, la pérdida de pocas especies de amebas bacterívoras indica que las bacterias sobrevivientes pudieron satisfacer la demanda alimenticia de estas amebas. Además, de que parece existir una preferencia alimenticia por bacterias gram-negativas en los protozoos según Pussard *et al.*, (1994).

Respecto al incremento en la abundancia de especies omnívoras como *Acanthamoeba sp.* y *Arachnulla impatiens* durante los días 5, 10 y 15, se puede atribuir a su capacidad de utilizar diferentes fuentes de alimento y de responder rápidamente en sistemas perturbados, regulando así el impacto entre los niveles tróficos. Al contrario los organismos especialistas se alimentan de un limitado número de especies, por lo que

tienen que depredar intensamente sobre unas pocas presas, exacerbando el impacto de la perturbación inicial en la comunidad. Asimismo, un especialista tiene que esperar un incremento en su fuente de alimento, ya que al depredar sobre poblaciones poco abundantes puede agotar el recurso y como consecuencia eliminar al depredador. Esta situación pudo ser la causa de la disminución en la abundancia de la ameba fungívora *Dermamoeba sp.* y de algunas especies bacterívoras-protozoos. Así como la eliminación de amebas con preferencias tróficas a protozoos y bacterias-levaduras (Fagan, 1997).

De esta manera los omnívoros tienen una ventaja sobre los especialistas, por lo que amebas testadas pueden adoptar este comportamiento al variar sus dietas dependiendo de la disponibilidad de alimento (Cowling, 1994; Ekelund y Ronn, 1994; Smith *et al.*, 2008). Esta variación permitió a las especies *Trinema sp.* y *Euglypha sp.* aumentar su abundancia durante estos días, además de que como estrategias *r* no son competidores eficientes, por lo que incrementaron su número en ausencia de otros competidores (Luckinbill, 1979; Bamforth, 1988; Smith *et al.*, 2008). Aunque la Omnivoría se suele considerar como un desestabilizador de las comunidades, al cambiar la dinámica en las relaciones tróficas del suelo, en sistemas perturbados su alta redundancia funcional dentro de las redes tróficas actúa como un amortiguador de estas interacciones, al sustituir la función que desempeñan las especies extintas localmente (Sleigh, 1973; Cortés-Pérez, 2009). El aumento de su abundancia implica un mantenimiento de las interacciones tróficas, a pesar de la pérdida de biomasa y especies en suelos perturbados con este tipo de contaminantes, compensando así la pérdida de funciones (Giller *et al.*, 1997; Girvan *et al.*, 2005).

Conclusión

El CrVI provocó un aumento en el pH del suelo y modificó la estructura de la comunidad de amebas al disminuir la riqueza y la abundancia de especies, y con ello simplificó las relaciones tróficas al perderse los grupos funcionales con preferencia alimenticia a protozoos y a bacterias-levaduras.

Por otro lado, la presencia de CrVI en el suelo permitió el establecimiento de determinadas especies como *Filamoeba sp.* y *Euglypha sp* quienes mantuvieron la cantidad de amebas dentro del sistema al remplazar a las especies que fueron eliminadas. Además el CrVI benefició a las amebas bacterívoras, indicando que se están alimentando de bacterias tolerantes y posiblemente reductoras del CrVI.

Literatura citada

Al-Atia G. R. 1980. Toxicity of cadmium to *Amoeba proteus*: a biochemical approach. *Journal of Protozoology* 27(1): 128-132.

Almas A. R., Mulder J. y Bakken L. R. 2005. Trace metal exposure of soil bacteria depends on their position in the soil matrix. *Environmental Science and Technology* 39(16): 5927-5932.

Amaral Z. L. A., Gómez F., Zettler E., Keenan B. G., Amils R. y Sogin M. L. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's river of fire. *Nature* 417: 137.

Armienta-Hernández M. A. y Rodríguez-Castillo R. 1995. Environmental exposure to chromium compounds in the valley of Leon, Mexico. *Environmental Health Perspective* 103 (1): 47-51.

Baath E. 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air and Soil Pollution* 47: 335-379.

Bagchi D., Stohs S. J., Downs B. W., Bagchi M. y Preuss H. G. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180: 5-22.

Bamforth S. S. 1985. Symposium on Protozoan Ecology: The role of protozoa in litters and soils. *Journal of Protozoology* 32(3): 404-409.

Bamforth S. S. 1988. Interactions between protozoa and other organism. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24: 229-234.

Bamforth S.S. 1992. Sampling and enumerating soil protozoa. En: Lee J. J. Soldo A. T. (Eds.). *Protocols by the Society of Protozoologists*. Society of Protozoology. Allen Press, Inc. USA.

Bamforth S. S. 1995. Isolation and counting of protozoa. pp. 174-180. En: Alef k., Nannipieri P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. Great Britain. 576 pág.

Bartlett R. J. 1991. Chromium cycling in soils and water: links, gaps and methods. *Environmental Health Perspectives* 92: 17-24.

Bhattacharya A., Ghosh M. y Choudhury A. 1987. Seasonal abundance of *Acanthamoeba rhysoides* (Singh, 1952) (Protozoa: Gymnamoebia) in a mangrove litter-soil ecosystem of Gangetic-Estuary, India. *Journal of Protozoology* 34(4): 403-405.

Bonkowski M. 2003. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162: 617-631.

Boon G. T., Bouwman L. A., Bloem J. y Römkens P. F. A. M. 1998. Effects of a copper-tolerant grass (*Agrostis capillaris*) on the ecosystem of a copper-contaminated arable soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(10): 1964-1971.

Bulgariu L., Bulgariu D., Robu B. y Macoveanu M. 2007. The impact of urbane soils pollution with heavy metals (Cd, Pb) case study: industrial zone, Iasi city. *Annals of West University of Timisoara* 16(1): 65-82.

Castro Díaz J. 2009. A 30 años del cierre de Cromatos de México 60 mil toneladas de residuos aún nos envenenan. La jornada ecológica. Consultado en: <http://www.jornada.unam.mx/2009/02/02/eco-c.html>

Cervantes C. Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J. C. y Moremo-Sanchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 335-347.

Cheung K. H. y Gu J. 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59(1): 5-15.

Chen C.-P., Lin T.-H., Juang K.-W. y Lee D.-Y. 2010. Assessing the phytotoxicity of Cr(III) and Cr(VI) in Cr(VI)-spiked soils by using XANES and resin extraction methods. *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*. Brisbane, Australia. pp 9-12.

Cortés-Pérez S. 2009. Cambio en la comunidad de amebas desnudas en suelo contaminado por combustóleo en el municipio de Jalacingo, Veracruz. Tesis Maestría. FES Iztacala, UNAM. 74 pág.

Cowling A. J. 1994. Protozoan distribution and adaptation pp. 5-42. En: Darbyshire J. F. (Ed.). *Soil Protozoa*. CAB INTERNATIONAL. UK 209 pág.

De Jonckheere J. F. y Brown S. 2005. Description of a new species with a remarkable cyst structure in the genus *Naegleria*: *Naegleria angularis* sp. n. *Acta Protozoologica* 44: 64-65.

Desjardin V., Bayard R., Huck N., Manceau A. y Gourdon R. 2002. Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. *Waste Management* 22: 195-200.

Díaz S. Martín-González A. y Gutiérrez J. C. 2006. Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. *Environmental International* 32: 711-717.

Ekelund F. y Rønn R. 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15: 321-353.

Ekelund F., Olsson S. y Johansen A. 2003. Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soil spiked with a range of copper concentrations. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1507-1516.

Fagan W. F. 1997. Omnivory as stabilizing feature of natural communities. *American Naturalist* 150(5): 554-567.

Fließbach A., Martens R. y Reber H. H. 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry* 26(9): 1201-1205.

Foissner W. 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 95-112. }

Foster J. C. 1995. Soil sampling and storage. pp 49-51. En: Alef k., Nannipieri P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. Great Britain. 576 pág.

Frostegard A., Tunlid A. y Baath E. 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry* 28(1): 55-63.

Giller K. E., Witter E. y McGrath S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30(10-11): 1389-1414.

Giller E. K., Witter E. y McGrath S. P. 2009. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 2031-2037.

Girvan M. S., Campbell C. D., Killham K., Prosser J. I. y Glover L. A. 2005. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environmental Microbiology* 7(3): 301-313.

Gutiérrez-Ruíz M. E., Castillo-Blum S. E. y Rosales A. E. 1997. Chromate contamination north of México City proposal for a solution. pp 115-128. En: Gutiérrez A. V. J., Sánchez M. S., Nava M. A. D., López M. G., Barrios H. S. L., Hoffmann A. y Marbán H. J. A. (Eds.). *Memoria, Seminario internacional sobre restauración de sitios contaminados en el marco del programa de cooperación técnica México-Japón*. INE, SEMARNAT 257 pág.

Haq R. U. Oazi J. I. y Shakoori A. R. 1998. Growth and survival of protozoa isolated from a tannery effluent. *Folia Microbiology* 43(1): 109-112.

Haq R. U., Rehman A. y Shakoori A. R. 2000. Effect of dichromate on population and growth of various protozoa isolated from industrial effluents. *Folia Microbiology* 45(3): 275-278.

Harrison J. J., Ceri H. y Turner R. J. 2007. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 5: 928-938.

Hausmann K. y Hülsmann N. 1996. Protozoology. 2nd edition. Thieme Medical Publishers, Inc. New York, USA. pp 199-205, 231-234, 272-288.

Holtze M. S., Ekelund F., Rasmussen L. D., Jacobsen C. S. y Johnsen K. 2003. Prey-predator dynamics in communities of culturable soil bacteria and protozoa: differential effects of mercury. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 1175-1181.

INE. 1985. Estudio de monitoreo y evaluación del cementerio industrial de Cromatos de México S. A. en Tultitlán Estado de México. INE. 137 pág.

Kamaludeen S. P. B., Megharaj M., Juhasz A. L., Sethunathan N. y Naidu R. 2003. Chromium–microorganism interactions in soils: remediation implications. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 178: 93-164.

Kandeler E., Kampichler C. y Horak O. 1996. Influence of heavy metal on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23: 299-306.

Kotás J. y Stasicka Z. 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution* 107: 263-283.

Kuperman R. G., Williams G.P. y Parmelee. 1998. Spatial variability in the soil foodwebs in a contaminated grassland ecosystem. *Applied soil ecology* 9: 509-514.

Lara E., Berney C., Ekelund F., Harms H. y Chatzinotas A. 2007. Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 139-148.

Ledin M. 2000. Accumulation of metals by microorganisms processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51: 1-31.

Lee J. J., Leedale G. F. y Bradbury P. 2000. *An illustrated guide to the protozoa. Organisms traditionally referred to as protozoa, or newly discovered groups*. 2nd edition. Allen Press Inc. Lawrence KS, USA. Vol. 2: (690-1432).

López-Luna J., González-Chávez M. C., Esparza-García F. J. y Rodríguez-Vázquez R. 2009. Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials* 163: 829–834.

Luckinbill L. S. 1979. Selection and the r/K continuum in experimental populations of protozoa. *The American Naturalist* 113(3): 427-437.

McCune B. y Grace J. B. 2002. *Analysis of Ecological Communities*. MjM Software Design. Oregon, USA. 300 pág.

Madoni P., Davoli D., Gorbi G. y Vescovi L. 1996. Toxic effect of heavy metal on the activated sludge protozoan community. *Water Research* 30(1): 135-141.

Martín-González A., Broniquel S., Díaz S., Ortega R. y Gutiérrez J. C. 2005. Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biology International* 29: 119-126.

Martín-González A., Díaz S., Borniquel S., Gallego A. y Gutiérrez J. C. 2006. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiology* 157: 108-118.

McEldowney M. S., Hardman D. J. y Waite S. 1993. *Pollution: Ecology and Biotreatment*. Longman Scientific & Technical. New York, USA 344 pág.

Mortuza M. G., Takahashi T., Ueki T., Kosaka T., Michibata H. y Hosoya H. 2005. Toxicity and bioaccumulation of hexavalent chromium in green *Paramecium*, *Paramecium bursaria*. *Journal of Health Science* 51(6): 676-682.

Muneer B., Rehman A., Shakoori F. R. y Shakoori A. R. 2009. Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 597-600.

Muñoz I. D. J., Mendoza C. A., López G. F., Soler A. A. y Hernández M. M. M. 2007. Edafología: manual de métodos de análisis de suelo. FES Iztacala, UNAM 82 pág.

Nakatsu C. H., Carmosini N., Baldwin B. Beasley F., Kourtev P. y Konopka A. 2005. Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 7679-7689.

Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E. A. D., Cortet J., Badot P. M. y Gilbert D. 2007. Relationship between testate amoeba (Protist) communities and atmospheric heavy

metals accumulated in *Barbula indica* (Bryophyta) in Vietnam. *Microbial Ecology* 53: 53-65.

Nguyen-Viet H., Bernard N., Mitchell E. A. D., Badot P.-M. y Gilbert D. 2008. Effect of lead pollution on testate amoebae communities living in *Sphagnum fallax*: an experimental study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69: 130-138.

Owlad M., Kheireddine A., Wan D. W. A. y Baroutian S. 2009. Removal of hexavalent chromium-contaminated water and wastewater: a review. *Water, Air and Soil Pollution* 200: 59-77.

Page F. C. 1969. *Platyamoeba stenopodia* n.g., n. sp., a freshwater amoeba. *Journal of Protozoology* 16(3): 437-441.

Page F. C. 1976. An illustrated key to freshwater and soil amoebae, with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association 34. Ambleside, Cumbria 155 pág.

Page F. C. 1983. Marine Gymnamoebae. Institute of Terrestrial Ecology NERC. Cambridge, England 54 pág.

Page F. C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoeba with instructions for culture. CCAP freshwater Biological Association. Ambleside, Cumbria 122 pág.

Page F. C. y Siemensma F. J. 1991. Nackte Rhizopoda und Heliozoa, Protozoenfauna Band 2. Gustav Fischer Verlag . Stuttgart. New York . Tübingen, Alemania 297 pág.

Patterson D. J. 1996. Free-living freshwater protozoa, a colour guide. Manson Publishing Ltd. London, England 223 pág.

Pérez-de-Mora A., Burgos P., Madejón E., Cabrera F., Jaeckel P. y Schloter M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals:

effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 327-341.

Poljsak B., Pócsi I., Raspor P. y Pesti M. 2010. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. *Journal of Basic Microbiology* 50: 21-36.

Pussard M., Alabouvette C. y Levrat P. 1994. Protozoan interactions with the soil microflora and possibilities for biocontrol of plant pathogens. En: Darbyshire J. F. (Ed). *Soil Protozoa*. CAB INTERNATIONAL. UK 209 pág.

Raper K. B., Worley A. C. y Kessler D. 1977. Observations on *Guttulinopsis vulgaris* and *Guttulinopsis nivea*. *Mycologia* 69(5): 1016-1030.

Rehman A., Shakoori F. R. y Shakoori A. R. 2006. Uptake of heavy metals by ciliate, *Tachysoma pellionella*, isolated from industrial effluents and its potential use in bioremediation of toxic wastewater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77:469-476.

Rehman A., Shakoori F. R. y Shakoori A. R. 2007. Multiple metal resistance and uptake by a ciliate, *Stylonychia mytilus*, isolated from industrial effluents and its possible use in wastewater treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79: 410-414.

Rehman A. Shakooti F. R. y Shakoori A. R. 2008. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresource Technology* 99: 3890-3895.

Reyes-Solís I. E., Solís C., Isaac-Olive K., García N. E. y Andrade E. 2009. Fractionation analysis of trace metals in humic substances of soils irrigated with wastewater in Central Mexico by particle induced X-ray emission. *Microchemical Journal* 91: 129–132.

Rodríguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* 20(3): 225-241.

Rodríguez-Zaragoza S., Dorantes I., Velasco-Velasco J. y Ferrera-Cerrato R. 2004. Impacto de la fumigación con bromuro de metilo en tipos morfológicos de amebas desnudas de un suelo agrícola. *TERRA Latinoamericana* 22(2): 197-205.

Rodríguez-Zaragoza S., Mayzlish E. y Steinberger Y. 2005. Seasonal changes in free-living amoeba species in the root canopy of *Zygophyllum dumosum* in the Neveg Desert, Israel. *Microbial Ecology* 49: 134-141.

Rodríguez-Zaragoza S. y González L. E. 2007. Response of the amoebae community to soil conditions transiting on badlands formation. pp 203-230. En: Willis I. C. 2007. Progress in Environmental Research. Nova Science Publishers. USA 309 pág.

Schlenk D. y Moore C. T. 1994. Effect of pH and time on the acute toxicity of copper sulfate to the ciliate protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 800-804.

Shakoori A. R., Rehman A. y Riaz-ul-Haq. 2004. Multiple metal resistance in the ciliate protozoan, *Vorticella microstoma*, isolated from industrial effluents and its potential in bioremediation of toxic wastes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72: 1046-1051.

Shi W., Bischoff M., Turco R. y Konopka A. 2002. Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 21: 169-177.

Singh B. N. 1946. A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. *Annals of Applied Biology* 33(1): 112-119.

Singh B. N. 1975. Pathogenic and non-pathogenic amoebae. The Macmillan Press. London, UK. pp 4-17.

Sleigh M. 1973. The biology of protozoa. Edward Arnold Editor. London, UK. 315 pág.

Smirnov A. V. y Goodkov A. V. 1999. An Illustrated list of basic morphotypes of Gymnamoebia (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology* 1: 20-29.

Smirnov A. V. y Brown S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology* 3(3): 148-190.

Smirnov A. 2009. Amoebas, Lobose. Encyclopedia of Microbiology. 3r Edition. pp 558-577.

Smith G. H., Bobrov A. y Lara E. 2008. Diversity and biogeography of testate amoebae. *Biodiversity and Conservation* 17(2): 329-343.

Sobolev D. y Begonia T. M. F. 2008. Effects of heavy metals contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 5(5): 450-456.

Song J., Townsend T., Solo-Gabriele H. y Jang Y. 2006. Hexavalent chromium reduction in soils contaminated with chromated copper arsenate preservative. *Soil & Sediment Contamination* 15: 387-399.

Sudo R. y Aiba S. 1973. Effect of copper and hexavalent chromium on the specific growth rate of ciliata isolated from activated-sludge. *Water Research* 7: 1301-1307.

Sutherland W. J. 1996. Ecological census techniques, a handbook. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 336 pág.

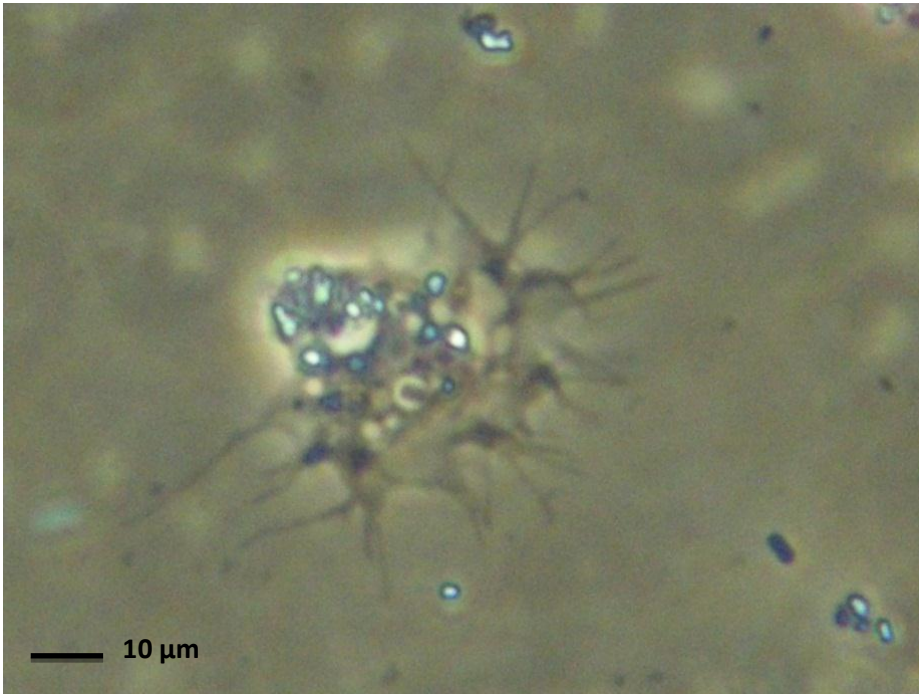
Vargas R. 1990. Avances en microbiología de suelos: los protozoarios y su importancia en la mineralización del nitrógeno. *Agronomía Costarricense* 14(1): 121-134.

Volke S. T., Velasco T. J. A. y de la Rosa P. D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. INE-SEMARNAT 141 pág.

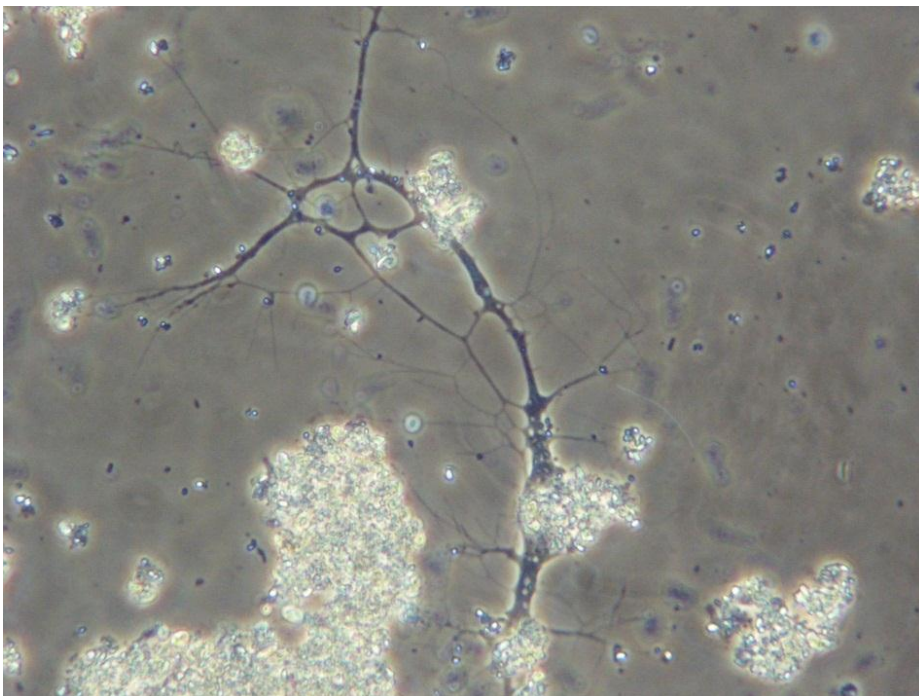
Wyszkowska J., Kucharski J., Jastrzębska E. y Hłasko A. 2001. The biological properties of soil as influenced by chromium contamination. *Polish Journal of Environmental Studies* 10(1): 37-42.

Yamane T. 1999. Estadística. 3ra edición. Oxford University Press-Harla México S. A. de C. V. Distrito Federal, México. 771 pág.

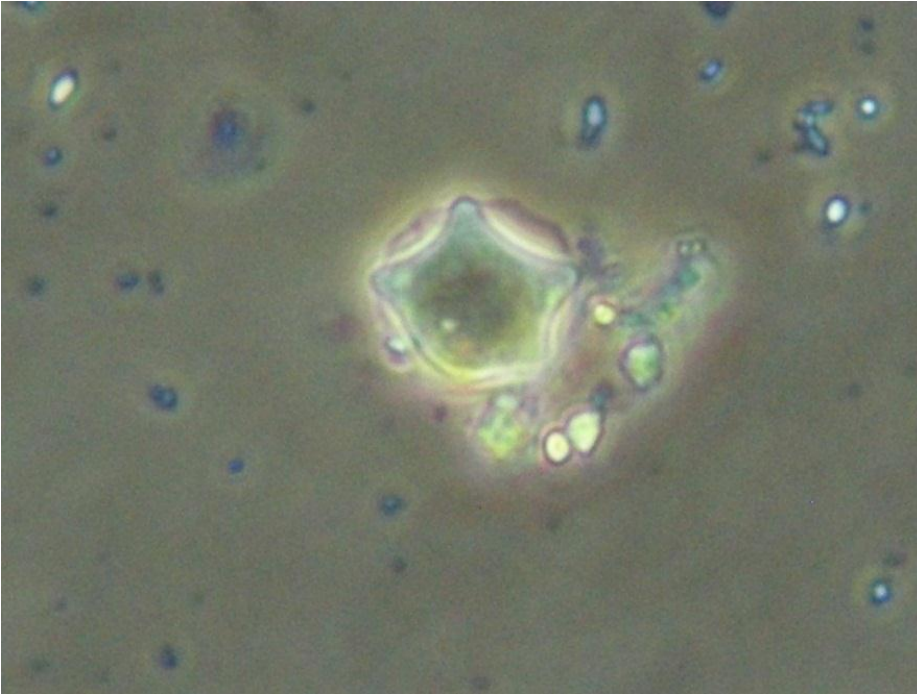
Anexo



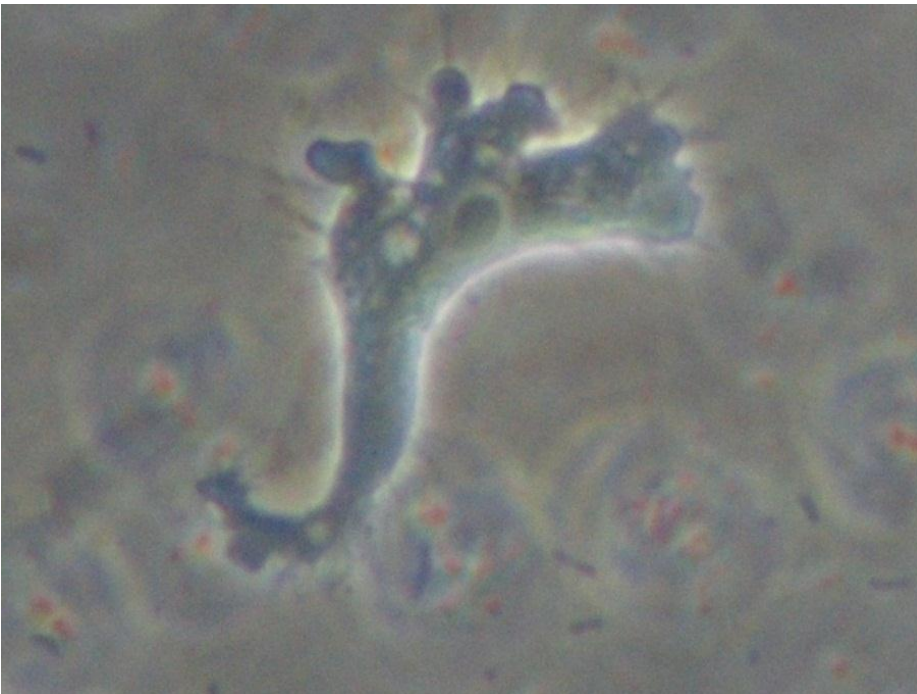
Filamoeba nolandi



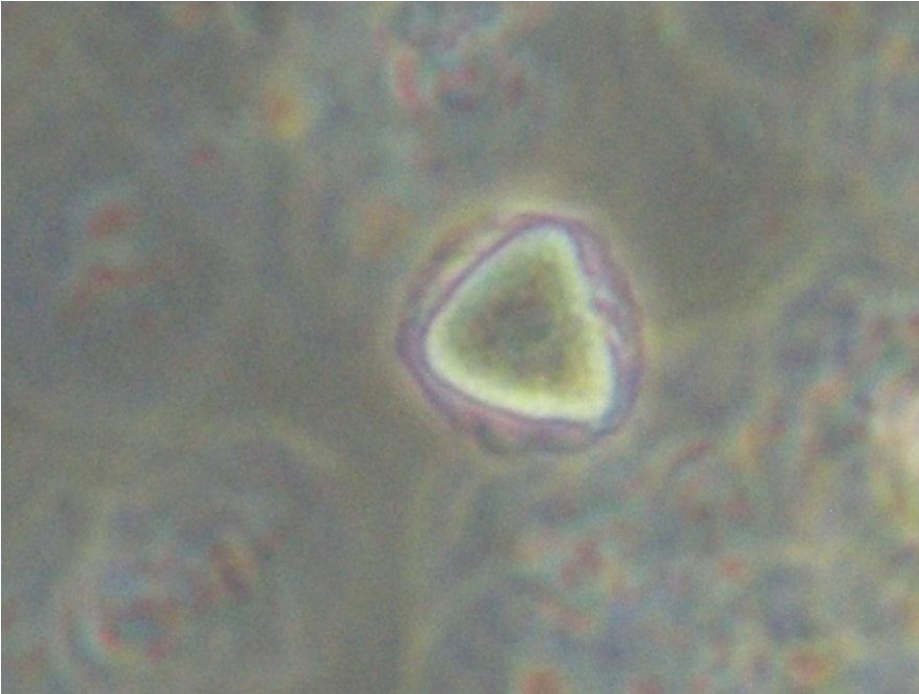
Biomyxa vagans



Acanthamoeba tubiashi



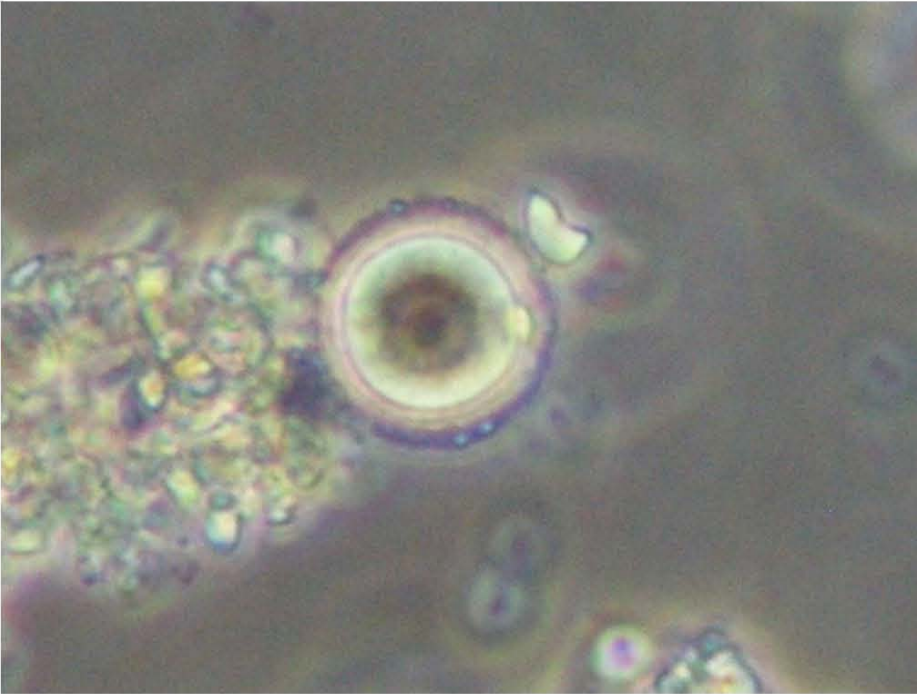
Rhizamoeba polyura



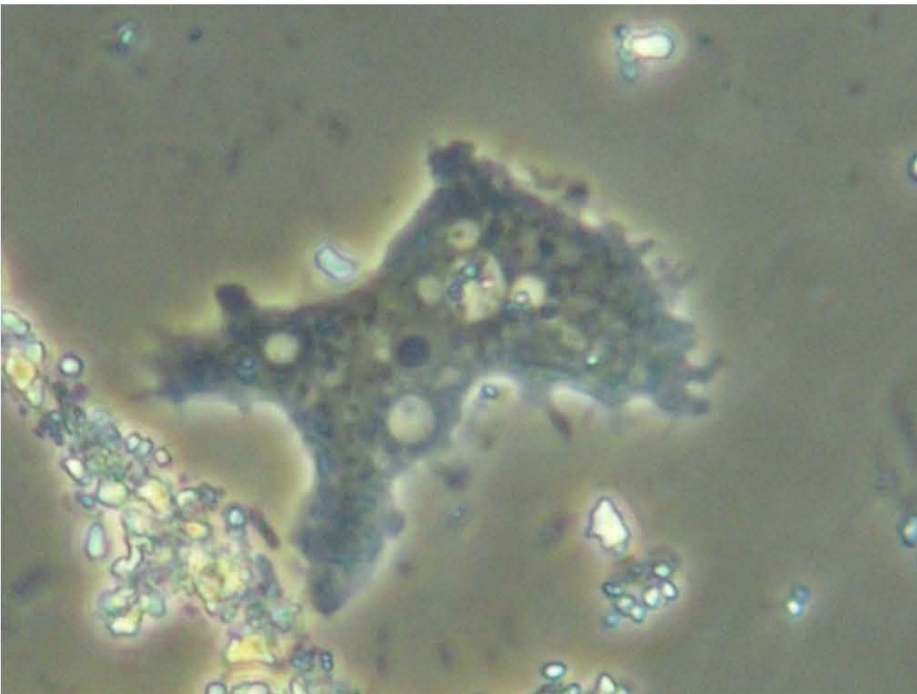
Acanthamoeba triangularis



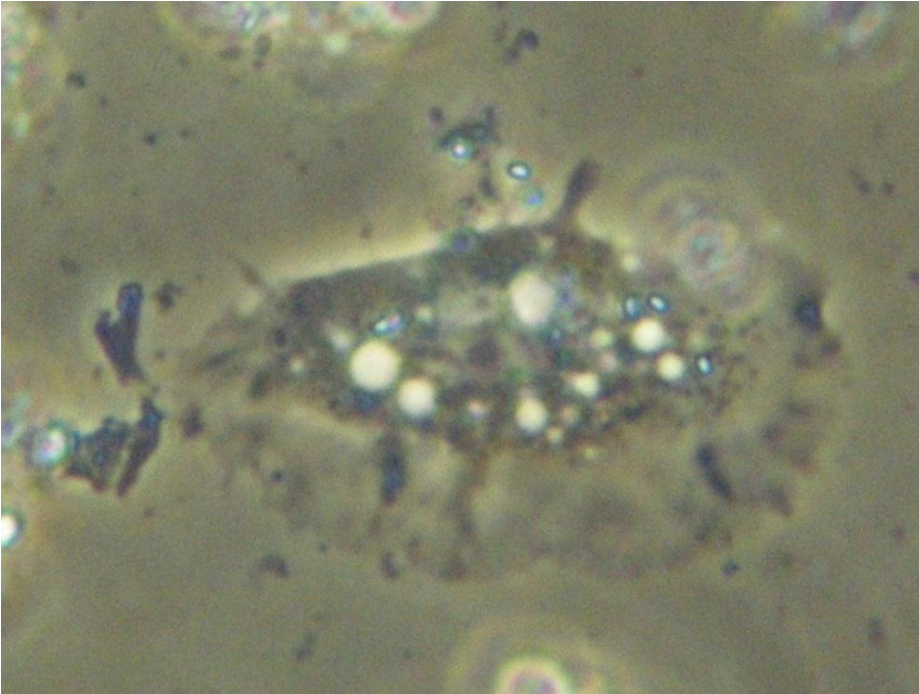
Euglypha sp.



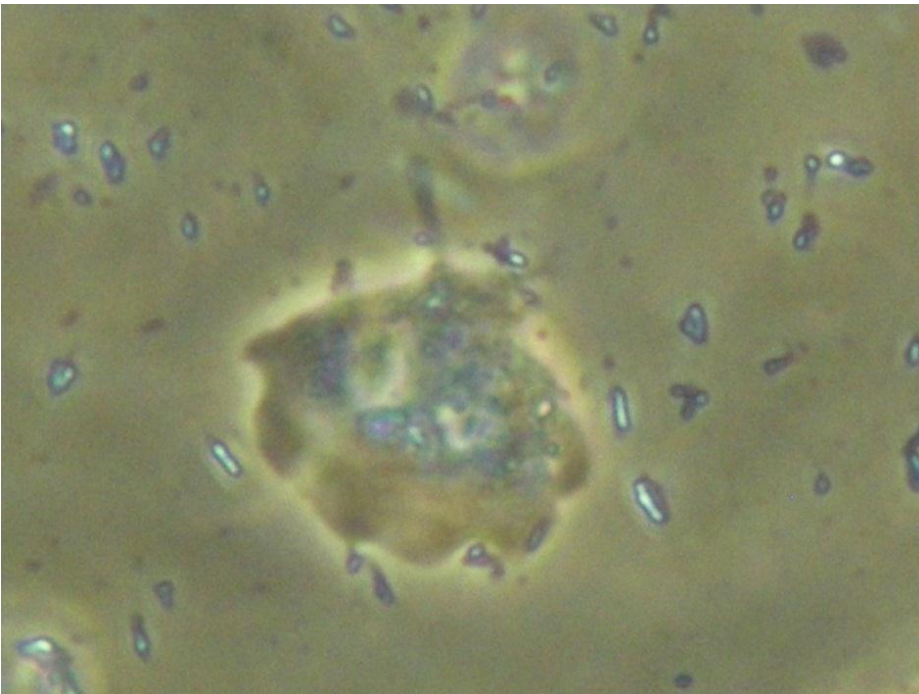
Vahlkampfia ovis



Rhizamoeba timidum



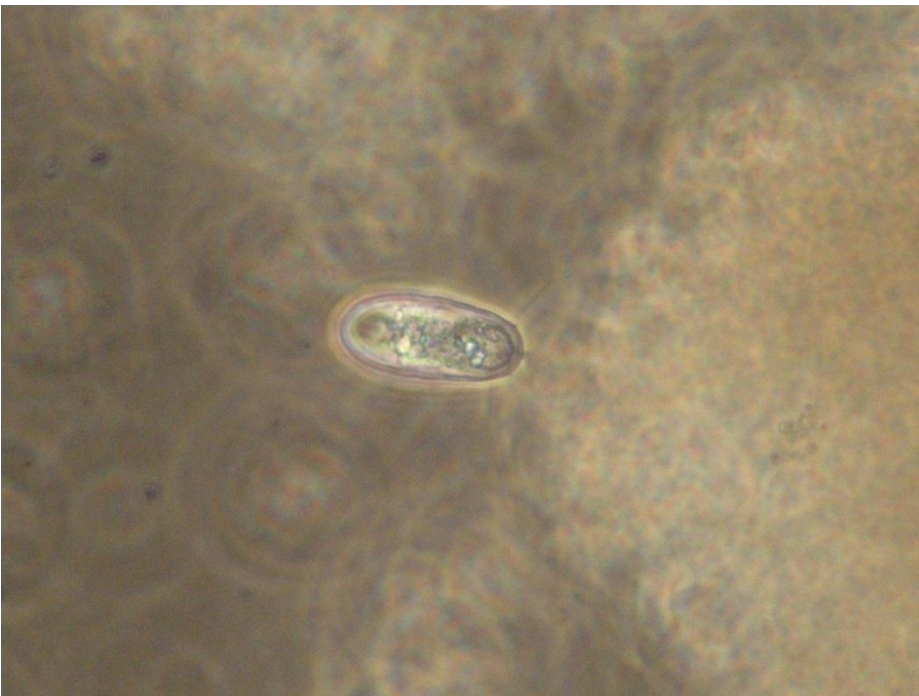
Paraflabellula reniformis



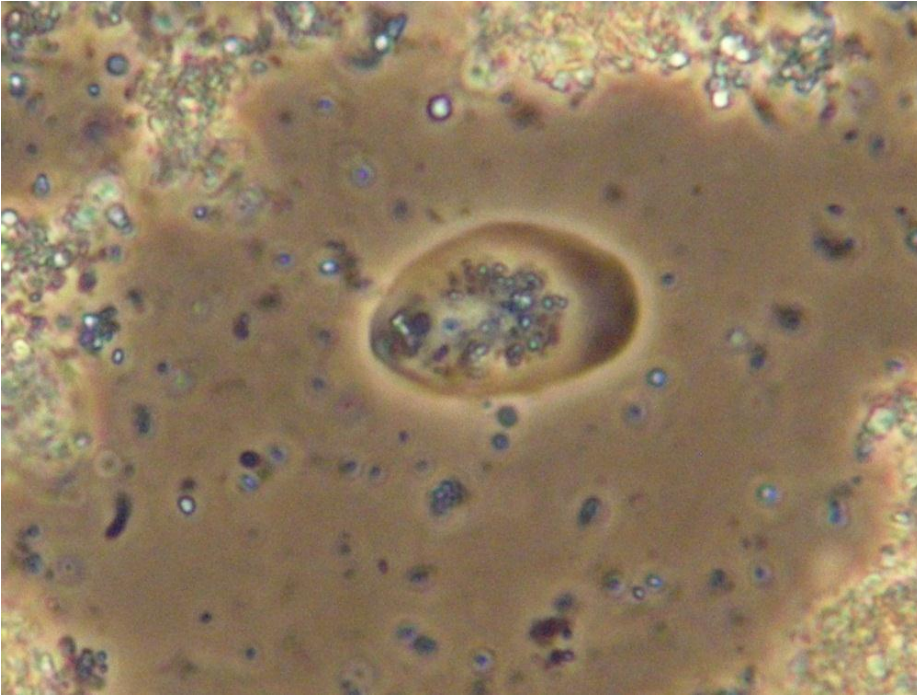
Flabellula sp.



Hartmanella vermiformis



Trinema sp.



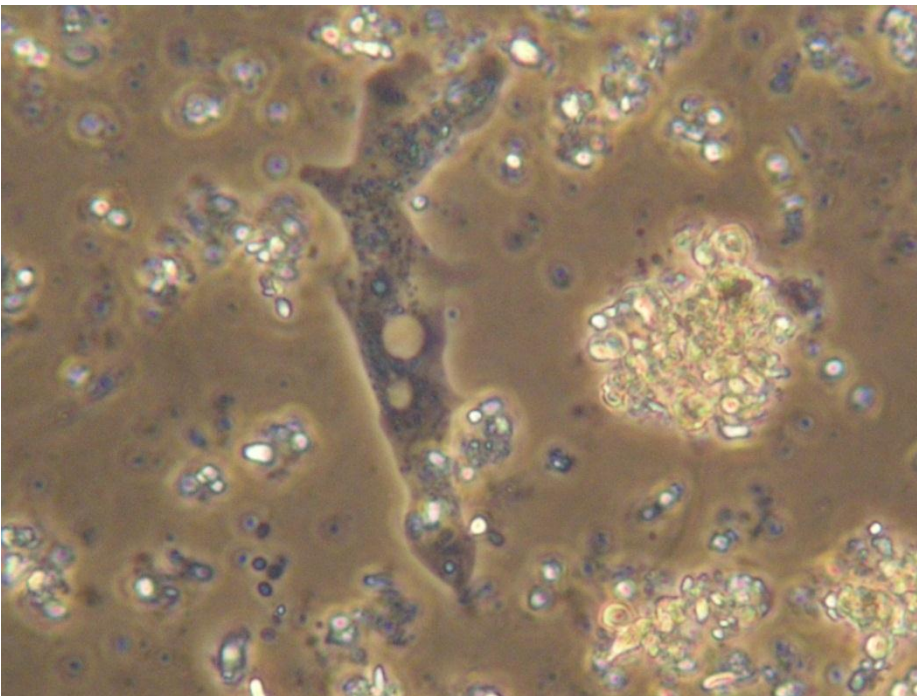
Dermamoeba sp.



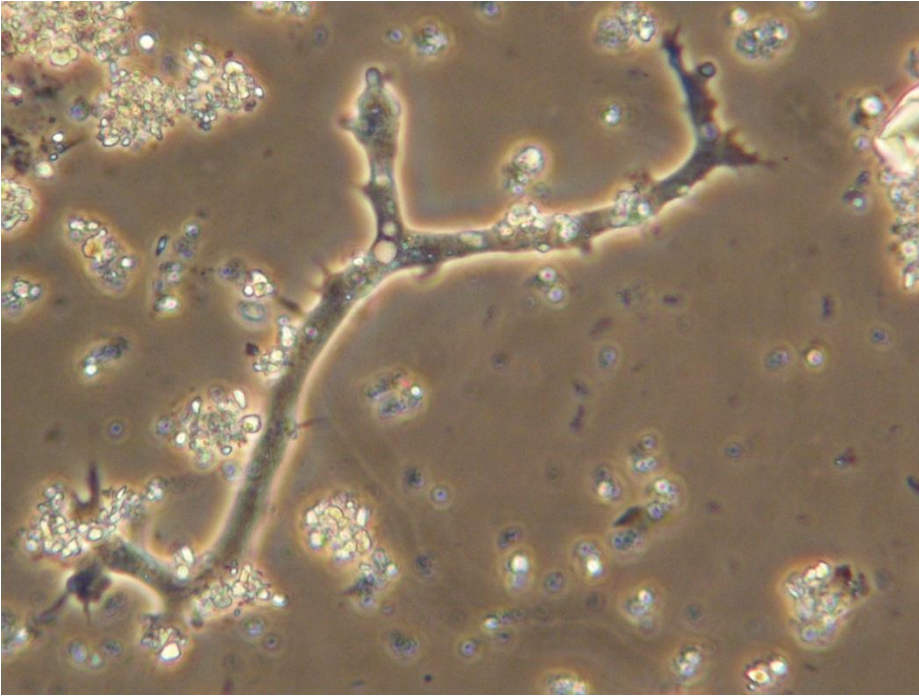
Paradermamoeba valamo



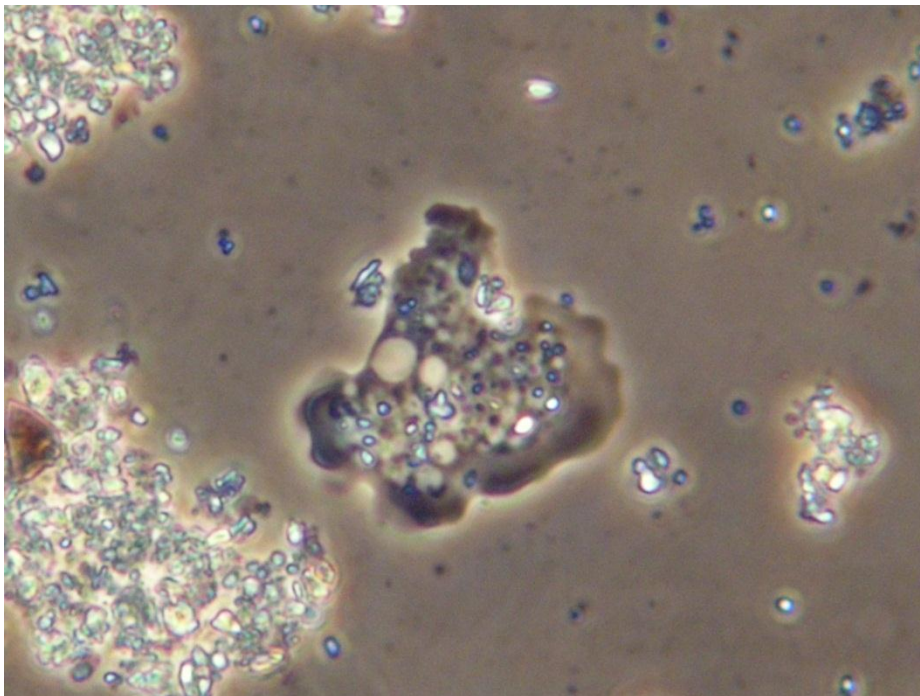
Platyamoeba stenopodia



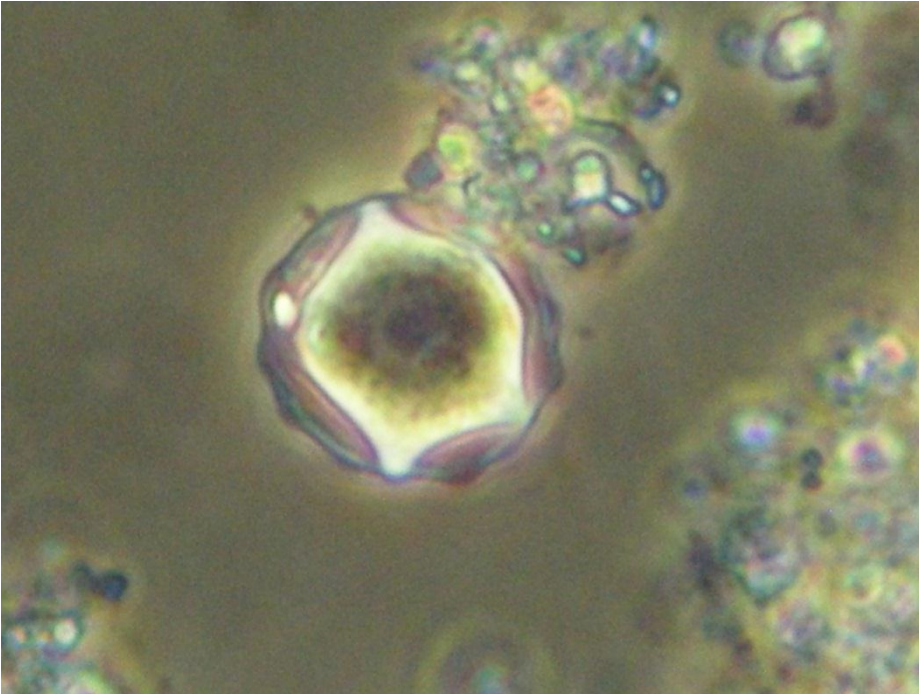
Korotnevella stella



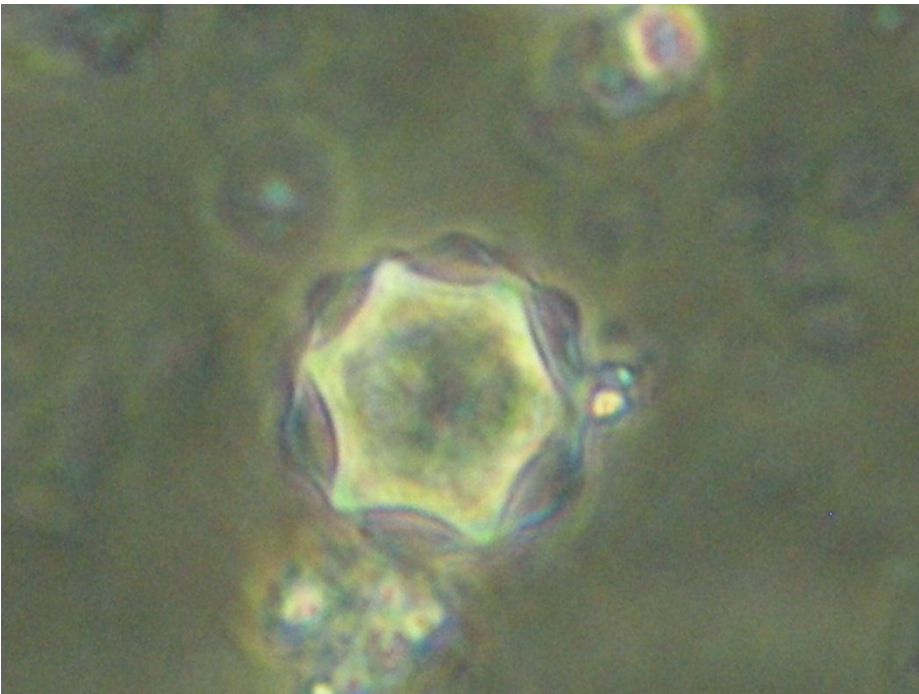
Leptomyxa reticulata



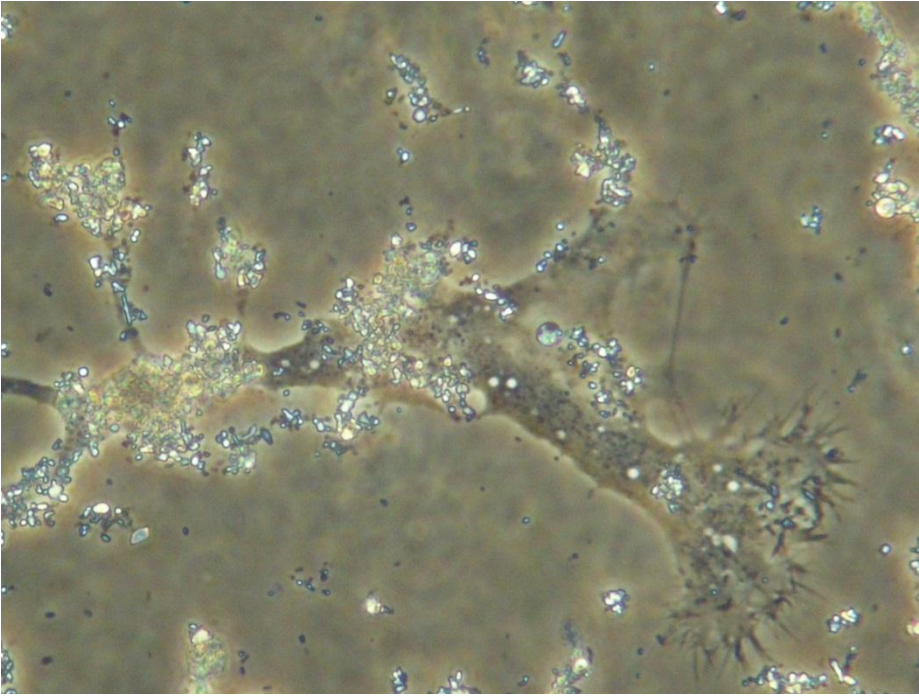
Gocevia fonbrunei



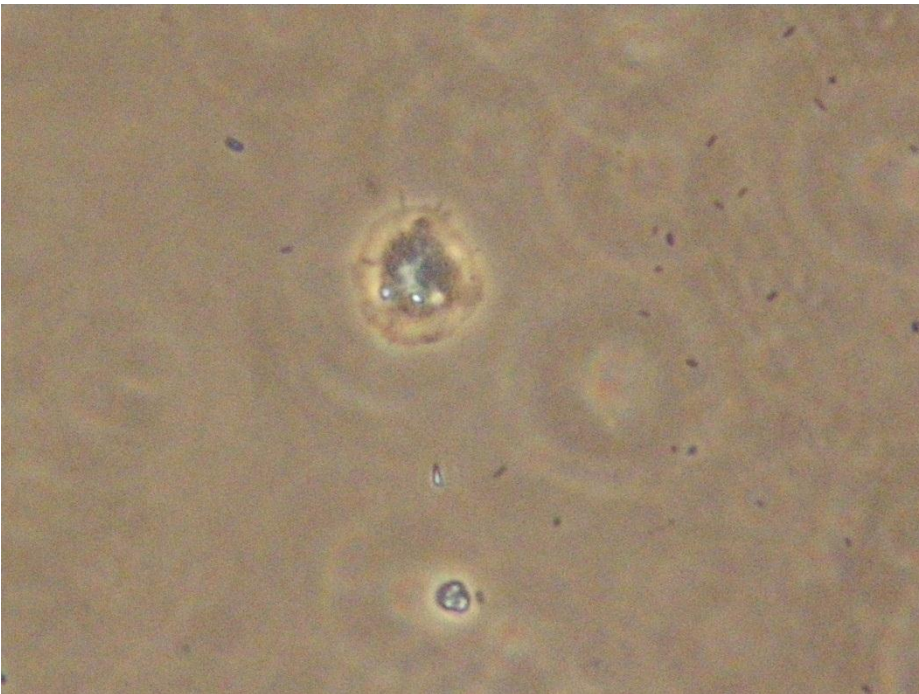
Acanthamoeba castellanii



Acanthamoeba astronyxis



Arachnulla impatiens



Cochliopodium actinophorum