



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

Laguncularia racemosa (Combretaceae), *Avicennia germinans*
(Acanthaceae), **BACTERIAS Y HONGOS MICORRÍDICOS**
ARBUSCULARES ASOCIADOS MEDIO SIGLO DESPUÉS DE LA
CONTAMINACIÓN CON PETRÓLEO.

ISIS ALEJANDRA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2020



**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, la que suscribe Isis Alejandra Martínez Hernández, 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 de la Profesora Dra. María del Carmen Rivera Cruz, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "Languncularia racemosa (Combretaceae), Avicennia germinans (Acanthaceae), bacterias y hongos micorrízicos arbusculares asociados medio siglo después de la contaminación con petróleo." 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, la Consejera 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.

H. Cárdenas, Tabasco, a 12 de Junio de 2019.

Isis Alejandra Martínez Hernández
Nombre Completo y Firma

Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Vo. Bo. Profesora Consejera o Director(a) de Tesis

La presente tesis, titulada “*Laguncularia racemosa* (Combretaceae), *Avicennia germinans* (Acanthaceae), **BACTERIAS Y HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS MEDIO SIGLO DESPUÉS DE LA CONTAMINACIÓN CON PETRÓLEO**”. Realizado por la alumna: Isis Alejandra Martínez Hernández, 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

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

ASESORA:

DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:

DR. CARLOS FREDY ORTÍZ GARCÍA

ASESOR:

DR. GEOVANNI HERNÁNDEZ GALVEZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 12 DE JUNIO DEL 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de postgrado, con expediente de beca número 886396.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco por haberme permitido realizar la Maestría en Producción Agroalimentaria en el Trópico.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, Responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, por todo su apoyo a la cual merece todos mis respetos, y por haber compartido su conocimiento.

A la Sra. Darvelia Flores Romero y su familia por abrirme las puertas de su casa, permitirme hacer esta investigación en su propiedad con bosque de manglar, y acompañarme en la colecta de muestras de suelo, raíz de mangle blanco y negro.

Al Dr. Santos Carballar Hernández por la confianza, disposición y sugerencias durante mi estancia en el Laboratorio Suelos en la Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. A su tiempo para guiarme en la identificación taxonómica de morfoespecies de hongos micorrícicos arbusculares.

Al comité particular integrado por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Carlos Fredy Ortíz García y al Dr. Geovanni Hernández Galvez, quienes gracias a sus observaciones me ayudaron a mejorar el desarrollo de esta investigación y el escrito de esta tesis.

Al M.C. Antonio Trujillo Narcía por la selección del sitio, acompañarme, dirigir el muestreo en suelo y rizosfera de mangle blanco y negro, así mismo por la dirección de la cartografía en donde se ubican los puntos de muestreo.

A mis compañeros estudiantes del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental; Ricarda, Omar, Erika, Ángel, Celia, Lupita y Mónica.

***Laguncularia racemosa* (Combretaceae), *Avicennia germinans* (Acanthaceae),
BACTERIAS Y HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS
MEDIO SIGLO DESPUÉS DE LA CONTAMINACIÓN CON PETRÓLEO.**

Isis Alejandra Martínez Hernández M, en C.

Colegio de Postgraduados 2020

Se evaluó la distribución de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizados (HTP) en suelo y rizosfera de *Laguncularia racemosa* (Lr), *Avicennia germinans* (Ag), el efecto de los HTP en la población de bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) y hongos micorrícicos arbusculares (HMA) asociados a ambas especies vegetales después de medio siglo de la contaminación con petróleo en La Venta Tabasco México, ubicada en la Cuenca baja del Río Tonalá al oeste del Complejo Procesador de Gas La Venta. Se colectaron muestras de suelo, raíz y rizosfera en 18 puntos para cada especie de mangle (dos muestras por árbol) a través de una superficie de 8000 m², suelo (materia orgánica sáprica), raíz [terciaria (Te) y cuaternaria (Ct)] y rizosfera (raíz con suelo). La distribución espacial de los HTP definió cuatro zonas de estudios (Z) para Lr y Ag (Z0; 2104, Z1: 4763, Z2: 19659 y Z3; 48462 mg/kg). Los HTP fueron similares en rizosfera y suelo en la Z1 y Z2, pero mayor en suelo de la Z3 de Lr y Ag. El suelo en Lr de la Z2 y rizosfera de Ag en Z3 estimuló la mayor población de BSP, pero los HTP incrementaron a las BSP en suelo y rizosfera de Ag. Tres estructuras del HMA (hifas, arbusculos y esporas) fueron abundantes entre 96 a 100% asociadas a las raíces Te y Cu de Lr y Ag en las cuatro zonas. La colonización total del HMA en raíz Te y Cu fue entre 68 a 76%, siendo la mayor 76% en raíz Te (Z0 y Z3) de Lr y Ag, y raíz Cu (Z1 y Z3) de Ag. El efecto de HTP no fue significativo en el porcentaje de hifas, arbusculo, vesículas y esporas asociadas a raíz Te y Cu de Ag. El número de esporas de *Diversispora aurantium* en las tres zonas y *Acaulospora scrobiculata* en Z3 asociadas a Ag muestran resistencia a los HTP. Los resultados sugieren que Lr y Ag se desarrollan en suelo con petróleo derramado desde hace medio siglo, pero la rizosfera de Ag bioestimula a la actividad microbiana que podría mediar la atenuación natural de los HTP, por la alta población de BSP, colonización micorrícica, y dos morfoespecies que se establecen en suelo orgánico con 48462 mg/kg de petróleo intemperizado.

Palabras claves: *Acaulospora scrobiculata*, bacterias solubilizadoras de P, mangle negro, petróleo.

***Laguncularia racemosa* (Combretaceae), *Avicennia germinans* (Acanthaceae),
ASSOCIATED ARBUSCULAR MYCORRHIZAL BACTERIA AND FUNGI
HALF A CENTURY AFTER OIL CONTAMINATION.**

Isis Alejandra Martínez Hernández
Colegio de Postgraduados 2020

ABSTRACT

It was evaluated the distribution of total weathered petroleum hydrocarbons (HTP) in soil and rhizosphere of *Laguncularia racemosa* (Lr), *Avicennia Germinans* (Ag), the effect of HTP on the population of phosphate-solubilizing bacteria (BSP) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) associated with both plant species after half a century of oil contamination in La Venta Tabasco Mexico, located in the lower Tonalá River Basin west of La Venta Gas Processor Complex. . Soil, root and rhizosphere samples were collected at 18 points for each type of mangrove (two samples per tree) through an area of 8000 m², soil (organic matter, sapric), root [tertiary (Te) and quaternary (Ct)] and rhizosphere (root with soil). The spatial distribution of HTP defined four study sites (S) for Lr and Ag (S0; 2104, S1: 4763, S2: 19659 and S3; 48462 mg / kg). The HTP were similar in rhizosphere and soil in S1 and S2, but higher in S3 soil than Lr and Ag. Soil in Lr in S2 and Ag rhizosphere in S3 stimulated the higher BSP population, but HTP increased to the BSP in soil and rhizosphere of Ag. Three structures of AMF (hyphae, arbusculi and spores) were abundant between 96 to 100% associated with Te and Ct roots of Lr and Ag in the four sites. The total colonization of AMF in Te and Cu roots was between 68 to 76%, being the highest 76% in Te roots (Z0 and Z3) of Lr and Ag, and Cu roots (Z1 and Z3) of Ag.

The effect of HTP was not significant in the percentage of hyphae, arbusculus, vesicles and spores associated with the Te and Cu roots of Ag. The number of spores of *Diversispora aurantium* in the three zones and *Acaulospora scrobiculata* in Z3 associated with Ag show resistance to HTP. The results suggest that Lr and Ag have been developed in soil with spilled oil for half a century, but the Ag rhizosphere biostimulates the microbial activity that could mediate the natural attenuation of HTP, due to its high population of BSP, mycorrhizal colonization, and two morphospores that are established in organic soil with 48462 mg / kg of weathered oil.

Key words: *Acauloespora scrobiculata*, P-solubilizing bacteria, black mangrove, oil.

DEDICATORIAS

Agradezco y dedico esta tesis principalmente a Dios por permitirme vivir una etapa en mi vida, y lograr mis metas.

A mis familiares y amigos, por brindarme todo su apoyo y consejos.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Distribución e importancia del bosque de manglar	4
2.1.1. Definición y tipos de manglar	5
2.1.2. Caracterización y taxonomía del mangle blanco.....	6
2.1.3. Caracterización y taxonomía del mangle negro	8
2.2. Los suelos del Manglar.....	10
2.2.1. Suelo Histosol.....	11
2.2.2. Suelo Gleysol.....	13
2.2.3. Suelo Solonchaks	13
2.3. Organismos en el manglar	14
2.4. La rizosfera e importancia	15
2.4.1. Actividad microbiológica en suelo y rizosfera de mangle	16
2.4.1.1. Bacterias solubilizadoras de fosfato	17
2.4.1.2. Hongos micorrícicos arbusculares.....	18
2.5. El petróleo y su interacción con bacterias y hongos.....	20
2.5.1. Definición y propiedades químicas del petróleo intemperizado.....	20
2.5.2. Características de los hidrocarburos.....	21
2.5.3 Efecto del petróleo en bacterias y hongos micorrícicos arbusculares	22
CAPÍTULO III. OBJETIVO	24
3.1 Objetivo General	24
3.2 Objetivo Específico	24
CAPÍTULO IV HIPÓTESIS	25
4.1 Hipótesis General	25
4.2 Hipótesis Específica	25
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Etapa I. Trabajo de Campo	27
5.1.1. Sitio de estudio y muestras colectadas	27
5.1.2. Propiedades químicas del suelo.....	31
5.2. Etapa II. Tipología de suelo.....	32
5.2.1. Clasificación y delimitación de zonas.....	32

5.3. Etapa III. Trabajo en laboratorio	32
5.3.1. Hidrocarburos totales del petróleo	32
5.3.2. Análisis de bacterias solubilizadoras de fosfatos	33
5.3.3. Análisis de colonización del hongo micorrícico arbuscular	36
5.3.3.1. Tensión y montaje de raíz.....	36
5.3.3.2. Extracción y conteo de esporas micorrícicas.....	38
5.3.3.3. Aislado e identificación taxonomica de especies.....	39
5.3.3.4. Identificación taxonomica de especies.....	40
5.4. Etapa VI. Análisis estadísticos	41
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1. Hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera y suelo	42
6.2 Bacterias solubilizadoras de P en rizosfera y suelo	45
6.3. Micorriza arbuscular en <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i>	47
6.4. Descripción de especies de hongos micorrícicos arbuscular en manglar.....	51
6.4.1. <i>Diversispora aurantium</i> Blaszk, Tadych y Madej.....	52
6.4.4. <i>Funneliformis geosporum</i> (T.H. Nicolson & Gerd).....	53
6.4.5. <i>Glomus claroideum</i> N.C. Schenck & G.S. Sm.....	53
6.4.6. <i>Diversispora</i> sp	54
6.4.7. <i>Acaulospora</i> sp1 y sp2	54
6.4.8. <i>Acaulospora bireticulata</i> FM Rothwell y Trappe	55
6.5. Morfoespecies en suelo y rizosfera de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> contaminado con petróleo.....	56
CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN.....	59
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de especies de hongos micorriza arbúscular.....	20
Cuadro 2. Concentración de hidrocarburos totales del petróleo por zonas según rizosfera y suelo de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i>	45
Cuadro 3. Poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato en rizosfera y suelo de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> en suelo sin petróleo y con petróleo intemperizado.....	47
Cuadro 4. Colonización del hongo micorrícico arbuscular en raíz terciaria y cuaternaria de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i>	50
Cuadro 5. Diversidad de morfoespecies en suelo de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i>	56
Cuadro 6. Morfoespecies de HMA en suelo de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> según la zona sin y con petróleo degradado.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Órganos de la planta mangle blanco (<i>Languncularia. Racemosa</i> L. a). Tallo, b) hoja, c) flor, d) fruto, e) raíz, f) rizosfera.	8
Figura 2. Órganos de la planta mangle prieto (<i>Avicennia. Germinans</i>). a) Tallo, b) hoja, c) flor, d), fruto, e) raíz y f) rizosfera.....	10
Figura 3. a) Rizosfera de mangle y b) partes que conforman una raíz nutritiva.....	16
Figura 4. Estructuras del hongo micorrícico arbuscular. a) Hifa, b) arbusculo, c) vesícula y d) espora.....	19
Figura 5. Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado	21
Figura 6. Flujograma del proceso de investigación.....	26
Figura 7. Ubicación geográfica del bosque de mangle evaluado.....	28
Figura 8. Panorámica del sitio de estudio. a) <i>L. racemosa</i> , b) <i>A. germinans</i> y c) Suelo con rasgos de petróleo intemperizado.....	29
Figura 9. Coordenadas geográficas de nueve puntos (norte y sur) para muestrear suelo y rizosfera de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> en suelo sin y contaminado con petróleo intemperizado.....	30
Figura 10. Muestreo de rizosfera de <i>L. racemosa</i> (a) y <i>A. germinans</i> (b).....	31
Figura 11. Extracción de hidrocarburos totales del petróleo. a) Equipo soxhlet para la extracción y b) lavado con cloruro de metileno al 98% de pureza.....	33
Figura 12. a) Preparación de medios de cultivos Pikovskaya y b) medio de cultivo contenido en caja Petry.....	34
Figura 13. Técnica de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar. a) Mezcla muestra y agua estéril, b) inoculación de muestra, c) homogenización de la mezcla, d) incubación y e) conteo de unidades formadoras de colonias.....	35
Figura 14. a) Selección de raíz terciaria y cuaternaria, b) raíz en cápsula, c) raíz en KOH 10% por 144 h, d) lavado con agua al corriente, e) raíz en peróxido de hidrógeno, f) raíz en HCl al 10% y g) tinción en azul tripano.....	37
Figura 15. a) Montaje de raíz, b) aplicación de lactoglicerol y c) observación al microscopio.....	37
Figura 16. Extracción y conteo de esporas. a) Peso muestra, b) agitar y reposo, c) tamizar y lavar con agua, d) gradiente de sacarosa, e) colocar tamiz al tubo, f) colocar esporas en caja Petry, g) conteo en de esporas con estereoscopio.....	37
Figura 17. Aislado de esporas del suelo. a) Separación de esporas de materia orgánica, b) esporas suspendida con una gota de reactivo PVLG+Melzer.....	40
Figura 18. Distribución espacial de hidrocarburos totales en suelo y rizosfera de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> en cuatro zonas del bosque.....	44
Figura 19. Colonización total del hongo micorrícico arbuscular en raíces terciarias y cuaternarias de <i>L. racemosa</i> y <i>A. germinans</i> en suelo sin y con petróleo degradado.....	50

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de manglares ubicados en costas tropicales de los continentes, son sumideros efectivos de nutrientes esenciales para mantener altas tasa de crecimiento de plantas y microorganismos aeróbicos facultativos y anaeróbicos, estos sistemas exportan carbono orgánico refractario en partículas pero importan nutrientes disueltos (Holmer, 2003). En zonas petroleras el suelo y la rizosfera de manglar es un reservorio de hidrocarburos del petróleo degradados que se han derramado *in situ* o importados por arrastre de la marea proveniente de pantanos, ríos y mar (López-Jiménez *et al.*, 2019). Esta contaminación se ha convertido en un serio problema global para la microflora asociada a *Laguncularia racemosa* (Lr) y *Avicennia germinans* (Ag) (Zhang *et al.*, 2004; Gundlach, 2018).

Los hidrocarburos totales del petróleo degradados (HTP) son una mezcla de hidrocarburos saturados (pristano, fitano y farnesano), fracción pesada con base aromática C60 a C66 y asfaltenos (Atlas *et al.*, 1981). Los HTP persisten por mucho tiempo en suelo y sedimento y son; recalcitrantes, tóxicos, mutagénicos y en algunos casos cancerígenos (Little *et al.*, 2018). Los HTP pueden afectar negativamente a las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo (Trujillo-Narcía *et al.*, 2014) y, en consecuencia son amenaza en los ecosistemas costeros. Sin embargo Berg and Smalla (2009); López-Jiménez *et al.*, (2019) reportan que la rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* ha logrado sostenerse en suelos anegados, contaminados con HTP, altos contenidos de material orgánico natural y nutriente.

La rizosfera integrada por raíz con suelo para intercambiar nutrientes con la planta y microorganismos (Marschner, 2012) es muy particular para *L. racemosa* y *A. germinans*. La rizosfera está integrada por raíz alimenticia que se deriva de la raíz cable o primaria que crece horizontal, enterrada en el suelo por las cuales se nutre la planta. La raíz alimenticia (secundaria, terciaria y cuaternaria) crece horizontal y vertical hacia la profundidad del suelo bajo condiciones anaeróbicas (Purnobasuky, 2013; Dueñas and Nieto, 2010).

La rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* en Histosol está rodeada de material orgánico (fábrico, hémico y sáprico) que conforman el suelo no rizosférico. La rizosfera y el suelo no rizosférico orgánico forman microbiomas con intensa actividad microbiana que suministran nutrimentos a los organismos asociados con el ecosistema (Kathiresan *et al.*, 2011;

Saravanakumar *et al.*, 2016). Los dos microbiomas disponen de altos contenidos de carbono derivados de exudado radical y degradación de material orgánico de origen natural y antropogénico en donde sucede la mitigación del potencial tóxico de los HTP. Estos espacios son colonizados por bacterias diazotróficas y hongos que solubilizan nutriente como el fosfato y utilizan a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía en su metabolismo celular (Maier and Gentry, 2015).

Las bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP) representan del 10 al 40% de la población microbiana del suelo (Fernández y Rodríguez, 2005) y están asociadas a la raíz de *L. racemosa* y *A. germinans*, e involucradas en el reciclaje del carbono bajo condiciones anóxicas y tóxicas derivadas de los HTP (Das *et al.*, 2012; López-Jiménez *et al.*, 2019). Las BSP solubilizan a través de la enzima fosfatasa al fosfato orgánico e inorgánico (Paredes y Espinosa, 2010). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) al igual que las BSP establecen asociación benéfica con más del 80% de las familias de plantas de la tierra (Camarena-Gutiérrez, 2012), son hongos del phylum *Glomeromycota*, clase *Glomeromycetes*, órdenes [*Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales*, *Archaeosporales*] (Redecker *et al.*, 2013; Schüßler, 2015). Las crecientes evidencias indican que las especies de árboles pueden alterar; la diversidad de comunidades fúngicas del HMA y la tasa de reproducción o supervivencia de distintos taxones fúngicos. Esta alteración es debido a que la planta cambia la asignación de carbono a las raíces o regulan las condiciones del suelo (Lovelock *et al.*, 2013; Jian *et al.*, 2016). La sobrevivencia del HMA generalmente se ha evaluado bajo condiciones aeróbicas, pero en los últimos 25 años, su colonización se ha localizado en ecosistemas de humedales, asociados a 15 especies de mangle (Miller and Sharitz, 2000; Wang *et al.*, 2010).

Los HMA son esenciales para la descomposición de materia orgánica y conservación de la nutrición, al asociarse a la raíz del mangle contribuyen en la absorción de nutriente especialmente del fósforo que favorecen el crecimiento de la planta bajo condiciones ambientales adversas (Nardini *et al.*, 2011). Los HMA y las BSP han sido reportados asociado a plantas que habitan sitios contaminados con HTP (Alejandro-Córdova *et al.*, 2017; López-Jiménez *et al.*, 2019), pero la toxicidad del petróleo en HMA se ha manifestado negativamente en la germinación de esporas, disminución del porcentaje de estructuras fúngicas que colonizan a la raíz y la diversidad de especies (Kirk *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Nardini *et al.*, 2011; Nwoko, 2014; Alejandro-Córdova *et al.*, 2017), sin embargo las

BSP han mostrado resistencia al establecerse e incrementar su población en la rizosfera de *L. racemosa* con petróleo intemperizado (López-Jiménez *et al.*, 2019).

Dada la importancia de los microorganismos en el microbiomas rizosférico de las plantas que sostienen el equilibrio del ecosistema costero, y su coexistencia en el bosque de manglar asociado a la infraestructura petrolera, residuos de perforación y tiradero de petróleo desde hace medio siglo en el sureste de México, se plantea conocer la interacción de las bacterias solubilizadoras de P, la colonización de los hongos micorrícico arbuscular y morfospecies asociadas a *L. racemosa* y *A. germinans* después de cincuenta años de derrames de petróleo crudo en el suelo y rizosfera.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Distribución e importancia del bosque de manglar

Las especies que habitan el bosque de manglar son halofíticas con 8 familias de mangles verdaderos y 12 géneros: Avicenniaceae (*Avicennia*), Chenopodiaceae (*Suaeda*), Combretaceae (*Laguncularia*, *Lumnitzera*), Meliaceae (*Conocarpus*, *Xylocarpus*), Myrsinaceae (*Aegiceras*), Plumbaginaceae (*Aegialitis*), Rhizophoraceae (*Rhizophora*, *Bruguiera*), Sonneratiaceae (*Sonneratia*), e incluyen un total de 11 especies en América y 36 en el Indo Pacífico y África. En México existen cuatro especies; el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), el mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), el mangle negro (*Avicennia germinans*) y el mangle botoncillo (*Conocarpus erectus* y *Conocarpus erectus* var. *sericeus*) (FAO, 2007).

La superficie mundial del bosque de manglar se encuentra entre 12 y 20 millones de ha, y México para el año 2015 contaba con una superficie de 775 555 ha en ambos litorales (Atlántico y Pacífico), que representan aproximadamente el 5% de la cobertura total mundial. El estado de Tabasco cuenta con una superficie de 45 410 ha (CONABIO, 2017).

El bosque de manglar para el ecosistema costero es importante debido a los siguientes aspectos; (1) protege a la costa de alta exposición a radiaciones solares UV, (b) efecto y furia de ciclones, inundaciones, aumento del nivel del mar, acción de las olas y erosión costera, (c) la raíz del mangle cuenta con un sustrato firme y así contribuye a una estabilidad duradera de la costa, (d) proporciona una fuente de alimento y viveros para muchos peces y mariscos, y muy a menudo fomentan y atraen a otros tipos de vida silvestre, (e) ofrece protección a flora y fauna asociada a ecosistemas colindantes, (f) alberga microorganismos que tienen utilidad biotecnológicas al producir diversas enzimas, antibióticos, proteínas terapéuticas y vacunas de importancia industrial (Kathiresan, 2012; Thatoi *et al.*, 2013), (g) son almacenadores, transformadores y exportadores de materia orgánica, con lo que contribuyen a los ciclos biogeoquímicos de diversos elementos (Mitsch y Gosselink, 2000; Herrera *et al.*, 2016) y (h) retiene contaminantes derivados de los derrames del petróleo en el mar, ríos y vertido de metales pesados (Olguín *et al.*, 2007).

2.1.1. Definición y tipos de manglar

Existen diversas definiciones del ecosistema manglar; (1) es un área biótica o bioma formado por árboles muy tolerantes a las existentes en las zonas inter mareal cercana a la desembocadura de cursos de agua dulce en latitudes tropicales y subtropicales (Amador, 2019), (2) es un sistema complejo que resulta de varias interacciones intrincadas entre factores abióticos (suelo, agua, mareas y clima) y bióticos (actividades de plantas, vertebrados e invertebrados), que pueden alterarse en distancias cortas (Hossain y Nuruddin, 2016). (3) es un sistema altamente productivo, se compara con buena tierra agrícola por su alto nivel de fertilidad, donde la presencia de las plantas tienen un impacto significativo en el entorno físico y químico, y son sumideros altamente efectivos de nutrientes esenciales para mantener altas tasa de crecimiento de las plantas y de los organismos que lo habitan (Holmer, 2003; Kathiresan, 2012).

La clasificación del bosque de manglar según su ubicación en las costas es; ribereño, de borde e islotes y de cuenca.

Bosque ribereño. Se desarrolla a lo largo de las márgenes de los ríos. La especie dominante cerca del agua es el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), tiene raíces en forma de zancos y su fruto es más pesado que el de otras especies. Costa adentro se ubica el mangle rojo y hacia el interior se encuentran el mangle prieto (*Avicennia germinans*) y el patabán o blanco (*Laguncularia racemosa*) (Amador, 2019).

Bosque de borde e islotes. Estos se desarrollan a lo largo de las costas y sobre islotes. Están formados exclusivamente por mangle rojo, pero en las partes más internas y estancadas el mangle prieto y blanco sustituye al mangle rojo. En general en los islotes las alturas de los árboles son menores (7m) en relación con los bosques de borde (10 m) (Amador, 2019).

Bosque de cuenca, es donde establecen en las partes más interiores de la costa continentales, por detrás de ribera y de bordes. Se desarrollan en zonas donde la renovación del agua es mucho más lenta y hay falta de oxígeno. Aquí predomina el mangle prieto (zona con mayor salinidad), provisto de neumatóforos que le permiten tomar el oxígeno del aire atmosférico y en menor medida el blanco (zonas con mayor aporte de agua dulce), también con neumatóforos, pero menos desarrollados (Amador, 2019; SEMARNAT, 2019).

2.1.2. Caracterización y taxonomía del mangle blanco

El mangle blanco pertenece a la familia Combretaceae y clasificado como *Languncularia racemosa* (L.) C.F. Gaertn es un arbusto o árbol generalmente pequeño de hasta 20 metros de alto por 60 cm de diámetro. Su tronco es recto con ramas ascendentes, copa redondeada y densa. Las ramas jóvenes son ligeramente aplanadas de color pardo moreno. Su madera no es durable, es medianamente pesada y difícil de trabajar por su tendencia a deformarse y rajarse. Su corteza externa es gris oscura a rojiza y se parte en pequeñas placas (Figura 1a). La corteza interna es de color rosa a rojo oscuro, cambia a pardo rojizo y exuda un líquido rojizo. La parte interna del tronco (albura) es de color pardo amarillento o crema rojizo. Las hojas del mangle blanco son opuestas, elípticas y redondeadas tanto en la base como en el ápice, llegan a medir desde 4 a 10 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho; la parte superior de la hoja (haz) es verde oscuro brillante y la parte inferior (envés) es verde amarillento. El pecíolo mide de 4 a 15 mm y posee un par de glándulas cerca de la base de la lámina. La hoja tiene numerosas glándulas hundidas en el envés de la lámina que pueden verse fácilmente a contra luz (Figura 1b) (CONABIO-CONANP, 2009).

Sus flores (Figura 1c) son de color blanco verdoso, simétricas, pentameras; receptáculo glabro, subovoides, 3-3.5 mm de largo; bractéolas 2, obovada, adnatas en la parte superior, sub-opuestos, peludas, 1.8-2 × 1.5-1.8 mm; prolongación del receptáculo urceolar, 0.5-0.7 mm; lóbulos del cáliz 5, margen triangular, sedoso, ciliado, 1 × 1 mm; disco nectarífero pibicular, lateralmente discreto; pétalos 5, suborbicular, glabro, internamente ligeramente velludo, marginalmente ciliado, caducifolio, 1-1.2 × 1-1.2 mm; estambres 10, incluidos, 1-1.5 mm, filetes filiformes, anteras obovadas o subovoides, 0.4 × 0.5 mm; ovario cilíndrico, estilete cilíndrico, incluido, 0.6-1.3 mm, estigma filiforme, región terminal capitulada. Frutos (Figura 1d) sebobodados, estriados, sedosos, 10-15 × 4-9 mm, lóbulos del cáliz persistentes; pedicelo de fruta discreto, glabro (Linsingen *et al.*, 2009).

El sistema radical de mangle blanco contiene cuatro tipos de raíces; raíz de cable, neumatóforos, nutritivas o alimenticias y raíces de anclaje. Las raíces del cable corren horizontal y radialmente a varios metros del árbol. Los neumatóforos crecen verticalmente hacia arriba (altura 10-15 cm, dato obtenido directamente por el autor) y exponen sus puntas en el aire. Las raíces de anclaje crecen verticalmente hacia abajo aproximadamente 1 m de profundidad. Las raíces de alimentación o nutritivas se originaron a partir de neumatóforos justo debajo del suelo y crecen horizontalmente. Los neumatóforos (Figura 1e) están cubiertos por una epidermis impermeable. Durante la marea baja, las lenticelas en la superficie de los neumatóforos permiten el intercambio de gases entre la atmósfera y la

estructura interna de la raíz. Por lo tanto, los neumatóforos tienen una función importante como mecanismo de ventilación altamente especializado, permitiendo que la planta sobreviva en suelos anaeróbicos (Purnobasuki, 2013).

Las raíces (Figura 1f) de las plantas de manglar son típicamente poseídas de una corteza parénquima (Justin y Armstrong, 1987; Nandy y Ghose, 2001). El parénquima se considera una adaptación importante a los suelos inundados porque proporciona un mecanismo para la aireación de las raíces en el medio ambiente caracterizado por bajas concentraciones de oxígeno (Pezeshki, 2001; Vartapetian *et al.*, 2003) y actúa como una vía para que el oxígeno suministre raíces respirantes (Curran, 1985).

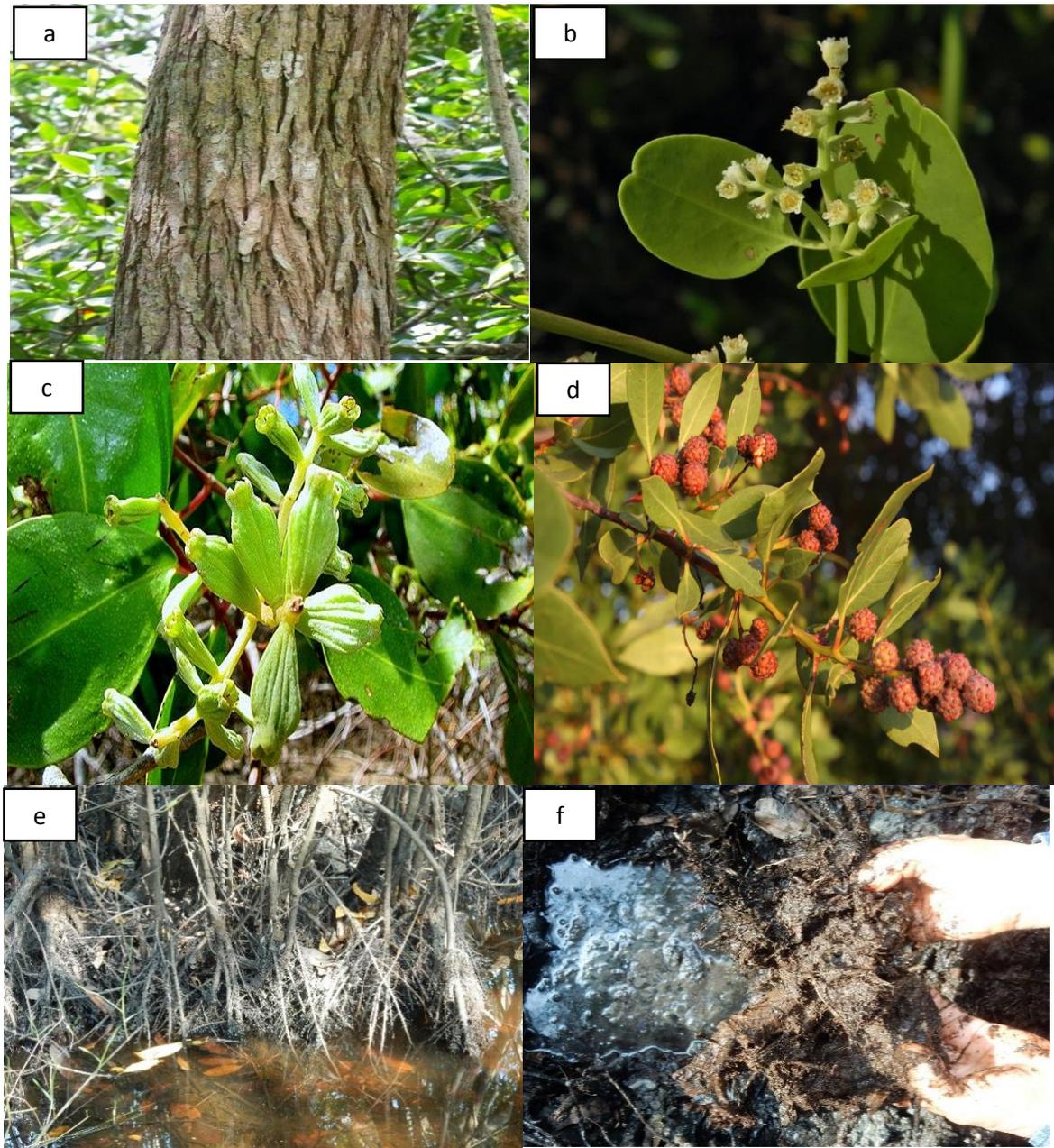


Figura 1. Órganos de la planta de mangle blanco (*Laguncularia racemosa* L.). a) Tallo, b) hoja, c) flor, d) fruto, e) raíz, f) rizosfera (fotografías e y f cortesía Rivera-Cruz, 2019).

2.1.3. Caracterización y taxonomía del mangle negro

El mangle negro *Avicennia germinans* (L) L. es un arbusto o árbol perenne de porte pequeño que pertenece a la familia Acanthaceae. En promedio, el mangle negro mide de 2 a 8 metros de altura. El tallo de este árbol es grueso, de 20 a 60 cm de ancho, con corteza de color

marrón oscuro, la cual tiene escamas irregulares, aplanadas y ásperas (Figura 2a) (Daniel, 2016).

Las hojas del mangle negro tienen forma elíptica y se disponen de manera opuesta; son gruesas con consistencia coriácea y presentan glándulas en extremo apical. Cada hoja mide de 3 a 15 cm de longitud por 1 a 4 cm de ancho y cuelga de un pecíolo grueso de 1.3 cm de largo (Figura 2b). Las flores se organizan en inflorescencias axilares, las cuales miden de 2 a 6 cm de largo. A su vez, las flores son sésiles con anchura de 1 a 2 cm. Los pétalos desarrollan un tubo de 0.3 a 0.4 cm de largo y tienen color verdoso, crema o blanco. Los cuatro estambres miden de 0.4 a 0.5 cm de largo, mientras que el estilo mide de 0.1 a 0.3 cm de longitud. (Figura 2c), los frutos miden de 2 a 3 cm de diámetro, son planos, verde oscuro y con una pericarpio aterciopelado (Figura 2d) (Daniel, 2016).

El sistema radical del mangle negro, está integrado al igual que el mangle blanco cuatro tipos de raíces; raíz de cable, neumatóforos, raíces de alimentación y raíces de anclaje: Las raíces del cable son las de mayor grosor y corren horizontal y radialmente a varios metros del árbol. Los neumatóforos de entre 20 a 60 cm de altura (dato obtenido directamente por el autor), crecen verticalmente hacia arriba y exponen sus puntas en el aire. Las raíces de anclaje crecen verticalmente hacia abajo aproximadamente cm de profundidad. Las raíces de alimentación o nutritivas se originaron a partir de neumatóforos justo debajo del suelo y crecen horizontalmente (Purnobasuki, 2013).

La raíz del mangle negro se caracteriza por contener raíz respiratoria o de rodilla (neumatóforos) pero más grandes que el mangle blanco y más pequeñas que el mangle rojo. Los neumatóforos son las raíces superficiales que suministran oxígeno a la planta (Figura 2e). Las raíces de mangle negro permanecen bajo condiciones anaeróbicas creando condiciones de reducción, pero los neumatóforos suministran oxígeno creando una rizosferas que puede presentar condiciones de reducción y oxidación según la época del año (Figura 2f). Los neumatóforos son cubiertos con lenticelas que permiten la entrada de aire (Thibodeau and Nickerson, 1986).

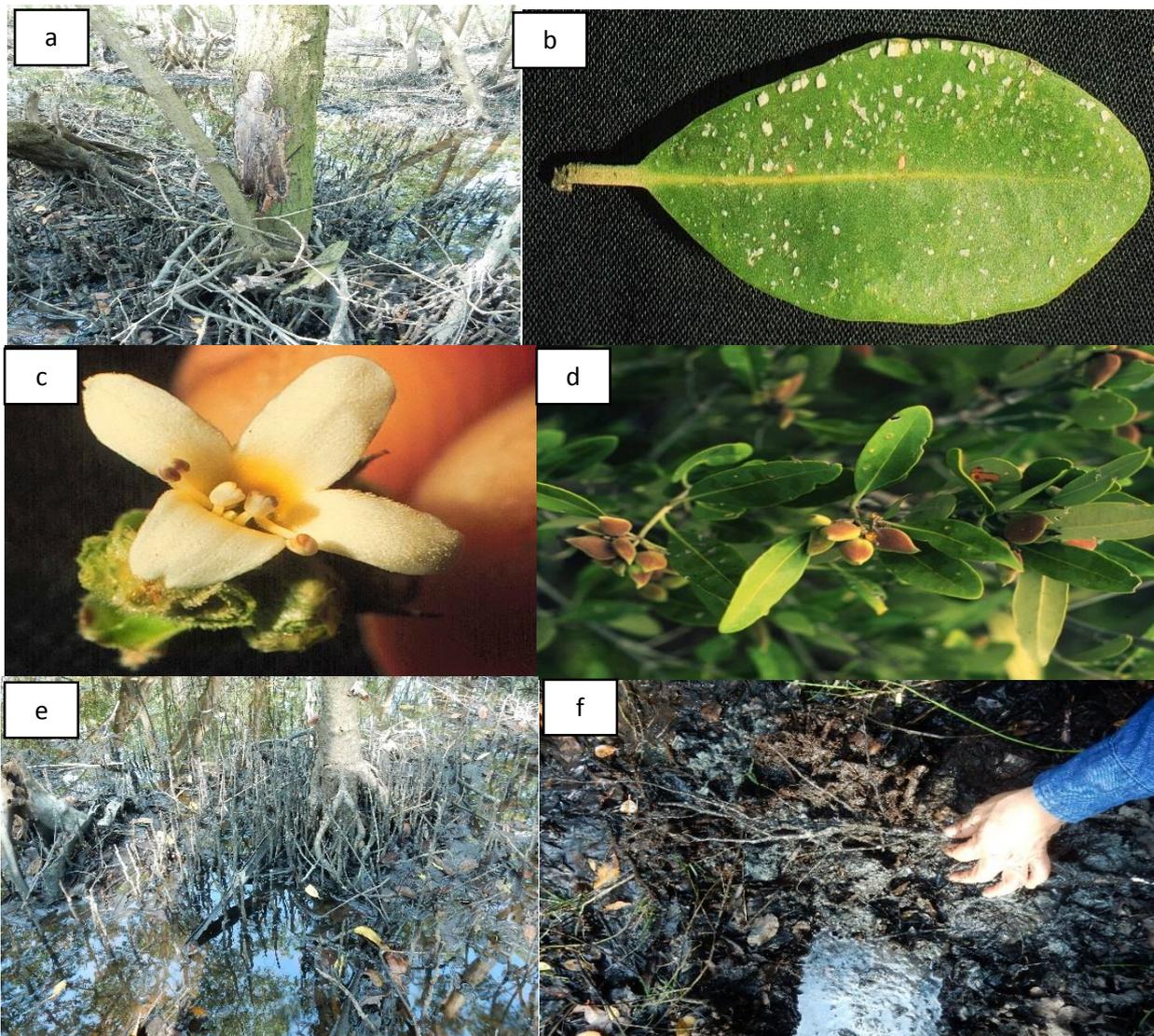


Figura 2. Órganos de la planta de mangle prieto (*Avicennia germinans* L.). a) Tallo, b) hoja, c) flor, d) fruto, e) raíz, f) rizosfera (Fotografías e y f cortesía Rivera-Cruz, 2019).

2.2. Los suelos en el manglar

Los suelos de costa tropical en donde se ubica el mangle blanco y negro generalmente permanecen en el agua por más de seis meses al año, y se les ha clasificado según la FAO (2014) en Histosol, Gleysol y Solonchaks. En general estos suelos contienen una capa orgánica superficial con textura franco arcilloso y franco arenoso. Al respecto Sukardjo

(1994); Ukpong (1991); Sah *et al.* (1989) reportan en manglares de la Costa de la India suelos franco limosos que contienen menos del 35, 40 y 45% de partículas de arena, limo y arcilla Moreno y Calderón (2011) mencionan la textura franco arcilloso arenoso con 53 y 17% de partículas de arcilla y arena en suelo con manglar de la costa de Colombia.

Según diversos investigadores las propiedades químicas del suelo en diferentes manglares del trópico húmedo en el mundo se caracteriza de la siguiente manera; el pH puede ser ácido y neutro que oscilaba entre 2.87 y 6.40 (Rambok *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2007; Moreno y Calderón, 2011), y alcalino entre 7.4 y 8.22

(Hossain *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2012). El potencial redox (Eh) se encuentra valores inferior a 100 mV, lo que significa que los suelos son anaeróbicos. En algunos bosques los valores de salinidad se obtienen más de 30% (Sukardjo, 1994; Moreno y Calderón, 2011). Sin embargo el valor de salinidad en suelo de la India es de 14.99 % (Das *et al.*, 2012). La capacidad de intercambio catiónico difiere entre los suelos del bosque de manglar en el mundo que van desde 10.63-34.75 mts 100 g⁻¹. Los valores de CEC por encima de 20 mts 100 g⁻¹, lo que indica la presencia de gran cantidad de materia orgánica y sugiere que los suelos representan un sumidero potencialmente grande para los cationes (Sah *et al.*, 1989).

2.2.1. Suelo Histosol

Los Histosoles son suelos que han experimentado poco desarrollo de perfil debido al entorno anaeróbico en el que se forman. El principal proceso de formación del suelo evidente en el suelo Histosol es la acumulación de materia orgánica madre parcialmente descompuesta sin permafrost. El Histosol está compuesto por una o más capas gruesas de materia orgánica del suelo. Generalmente, tiene material orgánicos del suelo en más de la mitad de los 80 cm superior del suelo o en dos tercios del suelo que cubre la roca superficial (Brady and Weil, 2008).

Los depósitos orgánicos se acumulan en pantanos, habitados por plantas malezas de estanque juncias, juncos, musgos, arbustos e incluso algunos árboles (manglar). Generaciones tras generaciones, los residuos de estas plantas se hunden en el agua, lo que inhibe su oxidación al reducir la disponibilidad de oxígeno y, en consecuencia actúa como un conservante parcial (Brady y Weil, 2008).

La materia orgánica en un Histosol se ha clasificado según su descomposición, y puede ser fibríca, hémica y sáprica. El material fibríco es un tejidos vegetales en los materiales orgánicos de suelo (excluyendo a las raíces vivas) que son lo suficientemente grandes para ser retenidas sobre un tamiz de malla-100 (apertura de 0.15 mm de diámetro) cuando son cribados. Muestran evidencias de la estructura celular de las plantas de las cuales se derivan, y son de 2 cm o menos en su dimensión más pequeña, o están lo suficientemente descompuestas para ser molidas o desmenuzadas con los dedos (Anónimo, 2020).

Los materiales hémicos de suelo (Gr. hemi, medio, implica una descomposición intermedia), son intermedios en su grado de descomposición entre los materiales fibrícos menos descompuestos y los materiales sápricos más descompuestos. Sus rasgos morfológicos dan valores intermedios para el contenido de fibras, densidad aparente y contenido de agua. Los materiales hémicos de suelo están parcialmente alterados, tanto física como bioquímicamente (Anónimo, 2020).

Los materiales sápricos de suelo (Gr. sapos, podrido), son los de mayor grado de descomposición de las tres clases de materiales orgánicos de suelo. Tienen la cantidad más pequeña de fibras vegetales, la densidad aparente más alta y el menor contenido de agua a saturación en base a peso seco. Los materiales sápricos de suelos comúnmente son grises muy oscuros a negros. Son relativamente estables, es decir, cambian muy poco física y químicamente con el tiempo en comparación con otros materiales orgánicos de suelo (Anónimo, 2020).

La materia orgánica sáprica está constituida principalmente por la fracción no extraíble (88 % de C orgánico). La materia orgánica disuelta es baja (1.30%), formada principalmente por material lábil no descompuesto. Los ácidos fúlvicos y húmicos (HA) son compuestos derivados de la humificación de la materia orgánica y ricos en grupos que contienen O₂, probablemente debido a las condiciones de oxidación periódicas. Los ácidos húmicos (concentración, 5.38%), fraccionados adicionalmente por diálisis en tres fracciones sobre una base de peso molecular, están constituidas principalmente por la fracción más pesada (mayor de 50 kDa; concentración, 5.36%) (Martin *et al.*, 2006).

2.2.2. Suelo Gleysols

La palabra Gleysols deriva de la palabra rusa *gley*= masa de suelo fangoso; connotativa de un exceso de agua (FitzPatrick, 1987) y se caracteriza principalmente por estar expuesto a períodos prolongados de saturación intermitente o continua con agua, causando condiciones reductoras durante su génesis. Los procesos de óxido reducción en el suelo se observan en colores amarillo, anaranjados y grises con manchas redoximórficas. La saturación de agua conduce al agotamiento del oxígeno en el suelo y provoca la transformación de metales como el hierro, aluminio y manganeso. Cuando hay oxígeno presente, el hierro se oxida y tiene un color rojizo, mientras que cuando el oxígeno se agota (debido a la saturación de agua) el hierro se reduce y adquiere un tono azul grisáceo y esto domina el color del horizonte. Los criterios diagnósticos para suelos gleysol en presencia de características de gley bien desarrolladas dentro de los 50 cm de la superficie del suelo (Krzic, 2004; Brady y Weil 2008).

2.2.3. Suelo Solonchaks

Solonchak es de origen ruso: *sol*= sal y *chak*, tierra salobre, y hay cuatro subdivisiones. Solonchaks órticos, nólicos, takiricos, y gléyicos. Estos suelos se desarrollan en ambientes áridos o semiáridos en sitios planos, o en depresiones en donde durante la estación seca el nivel freático por lo general, está a menos de 3 m de la superficie (FitzPatrick, 1987).

La redistribución de carbonatos y yeso resulta ser un mecanismo importante para la diferenciación de horizontes en los suelos de las zonas de secas. Las sales solubles pueden acumularse a cierta profundidad o en áreas con un nivel freático cercano a la superficie del terreno (Ibáñez y Manríquez, 2013). Se trata de suelos cuya característica común es la elevada concentración de sales solubles a escasa profundidad (horizonte sálico). Estas sales suelen estar presentes en el material parental y la escasa precipitación, siempre superada por la evapotranspiración, no puede más que redistribuir las sales sin eliminarlas del perfil edáfico. Las sales provocan en las plantas un efecto osmótico y un efecto de toxicidad iónica específica que alteran la absorción hídrica, el balance nutricional y el energético. Habitualmente la sal más frecuente es la halita (sal común, NaCl) por lo que el ion dominante en la solución del suelo es el cloruro (Solonchak háplico, clorídico). La existencia de estos suelos de complejo manejo agrícola, supone la génesis de paisajes peculiares con nula o escasa vegetación pero muy especial (halófitos), especialmente cuando la concentración de sales es muy elevada (Solonchaks hipersálicos) (WRB, 2015)

2.3. Organismos en el manglar

La estructura funcional de los manglares se basa a componentes bióticos; productores, consumidores y descomponedores. Entre los productores predominan plantas hidrófitas como; las Acanthaceae (*Acanthus abractatus* Vahl, *Acanthus ilicifolius* L y *Acanthus volubilis* Wall), *Arecaceae* *Palmae* (*Nypa fructicans* (Thunb) Wurmb), *Avicenniaceae* (*Verbenaceae*) (*Avicennia alba* Blume, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Var. *Rumphiana*, *Avicennia officinalis* L, *Avicennia rumphiana* Hall. F. (formely *A. lanata*), *Bombacaceae* (*Camptostemon philippinensis* (Vidal) Becc), *Cobretaceae* (*Lumnitzera littorea* (Jack) Voigt), *Lumnitzera racemosa* Willd), *Euphorbiaceae* (*Excoecaria agallocha* L), *Lythraceae* (*Pemphis acidula* J.R. Forst. And G. Fort.), *Meliaceae* (*Xylocarpus granatum* Koen, *Xylocarpus moluccensis* (Lam.-9 M. Roem.)), *Myrsinaceae* (*Aegiceras corniculatum* (L.) Blanco, *Aegiceras floridum* Roem. And Schult), *Myrtaceae* (*Osbornia octodonta* F. Muell), *Plumbaginaceae* (*Aegialitis annulata*) *Pteridaceae* (*Acrostichum aureum* L., *Acrostichum speciosum* Willdenow), *Rhizophoraceae* (*Bruguiera cylindrica* L. (Blume), *Bruguiera gymnorizha* (L.) Lam., *Bruguiera parviflora* Wight and Arn. Ex Griff., *Bruguiera sexángula* (Lour.) Poir., *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou, *Ceriops tagal* (Perr.) C. B. Rob., *Kandelia cande* (L.) Druce, *Rhizophora apiculata* Blume, *Rhizophora lamarckii* Montr., *Rhizophora mucronata* Lam., *Rhizophora stylosa* Griff), *Rubiaceae* (*Scyphiphora hydrophyllacea* Gaertn), *Sonneratiaceae* (*Sonneratia alba* J. Smith. *Sonneratia caseolaris* (L.) Enl., *Sonneratia ovata* Backer) y *Sterculiaceae* (*Heritiera littoralis* Dryand. Ex W. Ait) (Calicdan *et al.*, 2015).

Los macro consumidores de este grupo son los peses y crustáceos (Baltz y Yáñez-Arancibia, 2013; Cowan *et al.*, 2013). Estos organismos como el cangrejo azul (*callinectes sapidus*) desempeñan un papel importante en la estructura y flujo de energía de estos bosques a través de la dinámica del detritus de origen foliar. Los cangrejos pueden remover por consumo entre 9% y 79% del detritus producido por hojarasca (Twilley, 1988; Twilley *et al.*, 1996). La acumulación de hojarasca sobre el piso del manglar puede ser un importante factor para la inmovilización de nutrientes durante la descomposición.

Descomponedores. Integra varios grupos de microorganismos como las bacterias diazotróficas y hongos benéficos. Entre las bacterias fijadoras de N que se han aislado de la rizosfera de varias especies de manglar se encuentran los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Phyllobacterium*, *Arthrobacter* sp, *Corynebacterium* sp, *Oceanomonas* sp (Cevallos *et al.*, 1996; Holguin *et al.*, 1992; Flores-

Mireles *et al.*, 2007). Entre los géneros de bacterias solubilizadoras de fosfatos aislados de la rizosfera de mangle prieto (*Avicennia germinans* L.) y blanco [*Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.]. se han encontrado a *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Vibrio proteolyticus*, *Xanthobacter agilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae*, *Enterobacter asburiae*, *Kluyvera cryocrescens*, *Pseudomonas stutzeri*, y *Chryseomonas luteola* (Vázquez *et al.*, 2000), así mismo a *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas* sp, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes* sp, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp, *Azotobacter* sp y *Micrococcus* sp (Wanderley *et al.* (2012).

Los hongos filamentosos asociados a *Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa*, and *Rhizophora mangle* reportados por Wanderley *et al.* (2012) son; *Guignardia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, *Sphaerosporium*, *Chloridium virescens* var. *virescens*, *Microsphaeropsis arundinis*, *Penicillium pinophilum*, *Periconia cambrensis*, *Phoma herbarum*, *P. diachenii*, *P. obscurans*, *Sordaria prolifica* y *Torula elisii*.

2.4. La rizosfera e importancia

La rizosfera es la raíz de la planta más el suelo que le rodea, fue utilizado por primera vez el termino por Hiltner (1904), y confirmada la definición por diferentes investigadores, al respecto Pintor *et al.*, (2001); Fageria y Stone (2006) la define como la zona del suelo adyacente a las raíces de las plantas que es física, química y biológicamente diferente del suelo a granel o no rizosférico (Figura 3a), y en ella se depositan los exudados de la raíz que pueden estimular, inhibir o no tener efecto sobre las actividades de los microorganismos del suelo. Para ser más precisos, las raíces circundantes de la capa de suelo se llama ectorizosfera, mientras que la capa de la raíz colonizada o potencialmente colonizada por microorganismo es la endorizosfera (Figura 3b).

La densidad de microorganismos es considerablemente más grande en la rizosfera que el suelo a distancia. El incremento en el número de microorganismos de esta relación es expresado como la proporción R/S, R es el número por gramo en suelo rizosférico y S es el suelo a distancia (Marschner, 2012).

Las raíces de las plantas influyen en las propiedades físicas (temperatura, disponibilidad de agua y estructura), químicas (pH, potencial redox, concentración de nutrientes, exudados de raíces, desintoxicación de Al y alelopatía) y propiedad biológica (asociación microbiana) en

la rizosfera. Sus efectos incluyen cambios en la solubilidad de los nutrientes, el transporte y la absorción de nutrientes minerales (Fageria y Stone, 2006).

En la rizosfera se depositan materiales exudados por la raíz y microorganismos, se dividen en tres grupos, el primero son los solubles en agua tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, enzimas, hormonas y vitaminas, en segundo los insolubles en agua materiales como paredes de celdas, residuos de raíz, mucilagos y células muertas, polímeros y en tercer los dióxido de carbono derivado de la respiración de la raíz (Maschner, 2012; Lynch y de Leij, 2012).

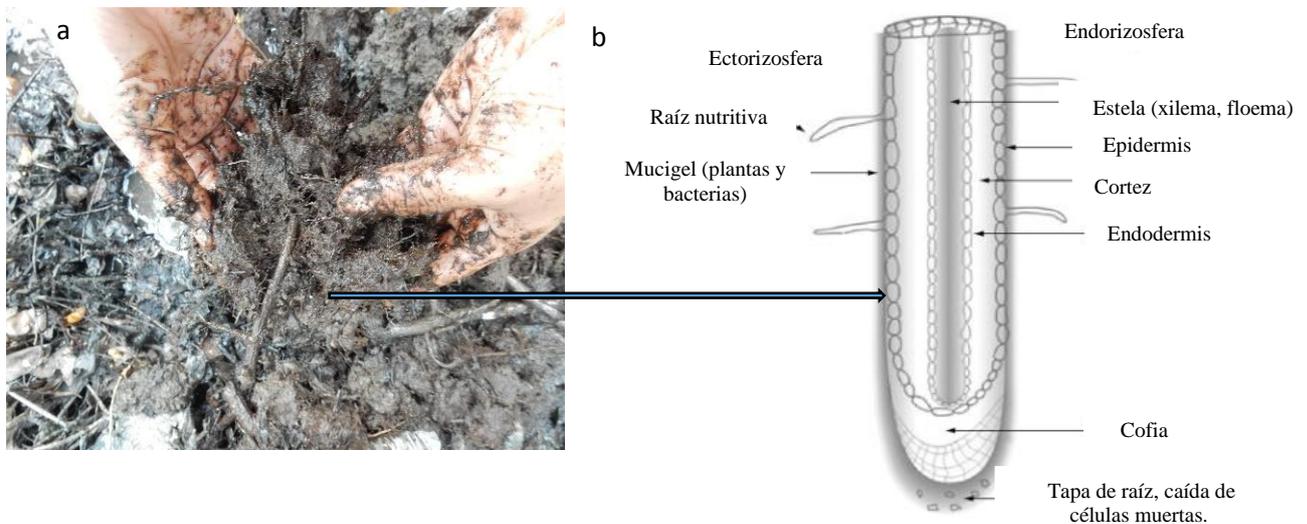


Figura 3. a) Rizosfera de mangle y b) partes que conforman una raíz nutritiva (Lynch y de Leij, 2012).

2.4.1. Actividad microbiológica en suelo y rizosfera de mangle

La actividad microbiológica en el suelo y rizosfera es el metabolismo aeróbico y anaeróbico derivado de la respiración de la microflora y microfauna. Se ha estimado que el 80% del metabolismo total en estos espacios es por la microflora. La actividad microbiana se evalúa de diferentes formas; (1) número de individuos. (2) peso de la biomasa por unidad de volumen de área de suelo o rizosfera (3) actividad metabólica (frecuencia medida como la cantidad de dióxido de carbono en respiración) (Brady y Weil, 2008). La comunidad microbiana en estos espacios del suelo es la responsable de la degradación de compuestos

orgánicos, mineralización y translocación de nutrientes a la planta (Manoharachary y Mukerji 2006).

Las bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP) y hongos asociados en forma mutualista con las plantas (hongos micorrícicos arbúscular) desarrollan actividades específicas en suelo y rizosfera de mangle localizado en zonas anegadas. La actividad de estos microorganismos se evalúa con la población de unidades formadoras de colonias de bacterias, con porcentajes de colonización de cada estructura intraradical del hongo micorrícicos arbúsculo y las morfosporas en el suelo. Las BSP y la micorriza están relacionadas con la disponibilidad de fósforo para microorganismos y plantas. La disponibilidad del fósforo es mediado por la mineralización, inmovilización de la fracción orgánica, donde los procesos de sorción/desorción y precipitación/solubilización son mediados desde la fracción inorgánica (Frossard *et al.*, 2000). El P orgánico puede mineralizarse biológicamente, mientras que los microbios mineralizan los compuestos orgánicos en busca de C y, por lo tanto, liberan P asociado con C o bioquímicamente, las bacterias reducen específicamente P a través de la liberación de la enzima fosfatasa (Kertesz y Frossard, 2015). Los HMA su actividad relacionada con la nutrición de la plantas es la translocación de los fosfatos del suelo a la planta.

2.4.1.1. Bacterias solubilizadoras de fosfato

Las BSP que solubilizan activamente el fósforo (P) representan del 10 al 40 % de la población microbiana del suelo (Fernández y Rodríguez, 2005). El P es un elemento esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas; representa aproximadamente el 0.2% del peso seco de una planta. El P es el segundo después del nitrógeno entre los nutrientes minerales que más comúnmente limita el crecimiento de los cultivos (Azziz *et al.*, 2012; Tak *et al.*, 2012).

En promedio, el contenido de fósforo del suelo es de aproximadamente 0.05% (p/p); sin embargo, solo el 0.1% de este fósforo está disponible para uso en plantas (Zhu *et al.*, 2011). Estos microorganismos crecen en medios con fosfato tricálcico, apatita o materiales insolubles similares como única fuente de fosfato y no solo asimilan el elemento sino que solubilizan una gran proporción del mismo, liberándolo en cantidades superiores a sus demandas nutricionales. El principal mecanismo microbiológico por el cual los compuestos fosfatados son movilizados es la disminución del pH del medio por la liberación de ácidos orgánicos (Alexander, 1980).

Se han aislado de distintos suelos BSP pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia* (Nahas, 1996; Kumar *et al.*, 2001).

2.4.1.2. Hongos micorrícicos arbusculares

Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) forman asociaciones mutualistas y simbióticas con las raíces de más del 80% de las plantas terrestres. Los hongos son incapaces de completar su ciclo de vida en ausencia de una raíz hospedero. Sus esporas pueden germinar y crecer en ausencia de un hospedero, pero su crecimiento de hifas es muy limitado (Kohki *et al.*, 2005).

Los HMA en su asociación mutualista con las plantas le generan ventajas diversas; toma de nutrientes de baja disponibilidad o de poca movilidad en el suelo, se evita la acción de microorganismos patógenos en la raíz, aumentando la tolerancia de la planta a condiciones de stress abiótico en el suelo, entre otros beneficios (Barrer, 2009).

Las estructuras típicas de HMA son los arbusculos (Figura 4) que poseen forma de árbol y constituyen ramificaciones de las hifas dentro de las células vegetales, su función radica en el intercambio de nutrientes. Las vesículas son de forma ovoide y pueden formarse inter o extracelularmente, aquí es donde se almacenan las sustancias de reserva y polifosfatos. Las esporas son de forma globosa, extracelulares, su función principal es almacenamiento y propagación dentro del cual cuando las esporas germinan sus hifas recorren el suelo en busca de la raíz y cuando la encuentran se da el proceso de infección por medio de un apresorio cuando la simbiosis queda establecida el potencial de exploración del hongo es mayor (Nardini *et al.*, 2011).

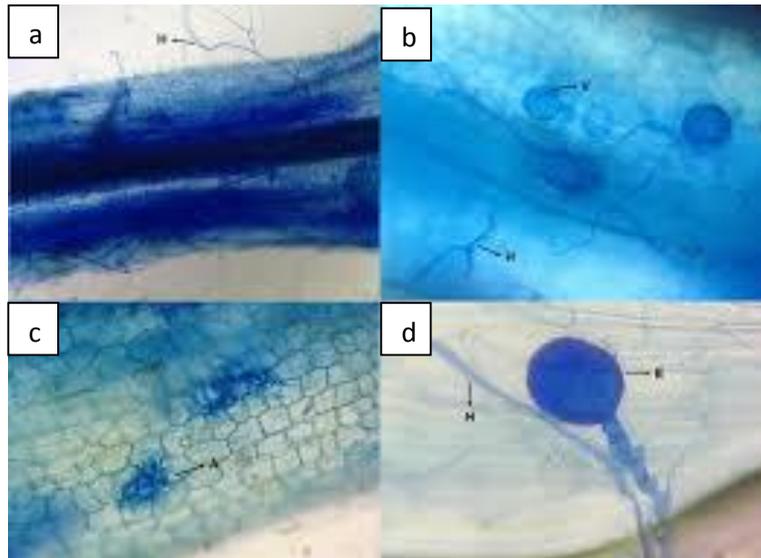


Figura 4. Estructuras del hongo micorrícico arbuscular. a) Hifa, b) arbúsculo, c) vesícula y d) espora (Camargo-Ricarde *et al.*, 2012).

La diversidad de los HMA en el ambiente es numerosa, actualmente se clasifica según Redecker *et al.*, 2013 en 4 órdenes, 11 familias y 25 géneros (Cuadro 1). La identificación de los géneros y especies del HMA, es de gran importancia por la función que estos desempeñan en el suministro de nutrientes y su nivel de resistencia a factores ambientales. Al respecto Schüßler (2015); Blaszkowski (2015); INVAM (2015); consideran que las características morfológicas para clasificarlas a nivel de género y especie son; pared y estratos de pared (número, tipo, grosor, arreglo, ornamentaciones); hifas de origen (forma, pared, zona de oclusión); citoplasma (en esporas maduras, en esporas jóvenes); estructuras especializadas para la germinación (cámaras, escudos, estratos germinales).

Cuadro 1. Clasificación de especie de hongos micorrícicos arbuscular

Orden	Familia	Género
Diversisporales	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> sp1
		<i>Acaulospora</i> sp2
		<i>Acaulospora scrobiculata</i>
		<i>Diversispora</i> sp
Glomerales	Glomeraceae	<i>Diversispora Aurantium</i>
		<i>Claroideoglopus</i>
		<i>claroideum</i>
		<i>Funneliformis mosseae</i>
		<i>Funneliformis geosporum</i>

Fuente: Schüßler y Walker, 2010

2.5. El petróleo y su interacción con bacterias y hongos

2.5.1. Definición y propiedades químicas del petróleo intemperizado

El petróleo intemperizado o degradado se define como aquél material cuyo estado físico corresponde a un sólido, ya que no presenta ningún grado de fluidez a temperatura ambiente (Rodríguez, 2014). El petróleo intemperizado, es el petróleo crudo expuesto a condiciones ambientales al menos durante 20 años (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004). El petróleo crudo intemperizado es una mezcla de compuestos recalcitrantes de petróleo fresco. Contienen una mezcla compleja de compuestos que se pueden categorizar en cuatro fracciones: saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Maletic *et al.*, 2012) (Figura 5).

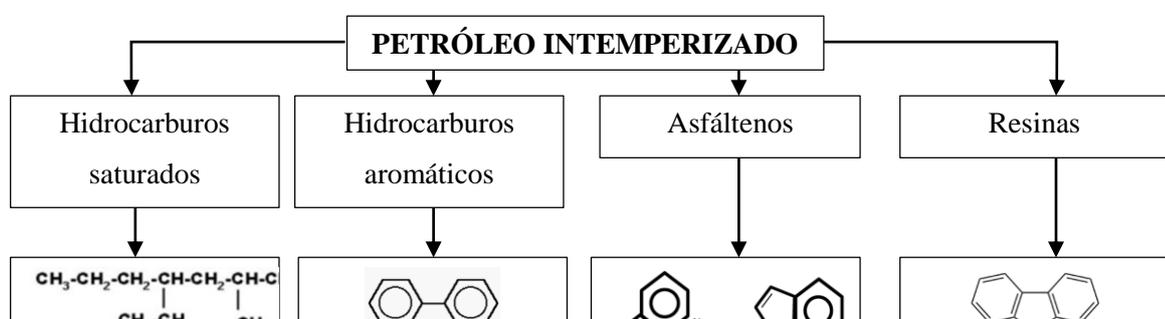


Figura 5. Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado (Navarro *et al.*, 2004; Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; Botello, 2005; Delgado, 2006).

2.5.2. Características de los hidrocarburos

Hidrocarburos saturados ramificados con la fórmula general (C_nH_{2n+2}) constituidos por cadenas ramificadas de átomos de carbono (Galvéz y Baldomero, 2012); átomos de carbono desde C1 hasta C40 y en ocasiones se han reportado cadenas con más de 60 átomos de carbono (Botello, 2005). Son sólidos hidrófobos y, por consiguiente, son difíciles de degradar debido a su escasa solubilidad en agua y biodisponibilidad (Maletic *et al.*, 2012).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) lo conforman aquellos compuestos cuya estructura molecular se origina por la unión de tres o más anillos bencénicos, siendo ejemplos de estos: pireno, criseno, benzoantraceno, benzopireno, benzofluoreno, benzofluoranteno y perileno (Botello, 2005). Se caracterizan por su escasa solubilidad en agua, baja a moderada volatilidad, acumulándose sobre sedimentos y arcillas. Una vez acumulados pueden sufrir foto-descomposición UV, siendo además degradados total o parcialmente por algunos microorganismos (Marín, 2003). Su vida media varía de 1 semana a 2 meses para ambientes acuáticos, de 2 meses a 2 años en suelos y de 8 meses a 6 años en sedimentos (Botello, 2005).

Asfáltenos son moléculas grandes dispersadas coloidalmente en aceite (Maletic *et al.*, 2012), están constituidos por una acumulación de láminas poliaromáticas condensadas, unidas por cadenas saturadas (Wauquier, 2004). Incluyen en su estructura agregados poliaromáticos, fenoles, ácidos grasos, metaloporfirinas (Fernández *et al.*, 2006).

Resinas son moléculas con un fuerte carácter aromático, conteniendo heteroátomos (N, O, S y a veces Ni y V) (Wauquier, 2004; Maletic *et al.*, 2012). Las resinas están constituidas por compuestos piridinicos, quinolinas, tiofenos, carbazoles, sulfóxidos y aminas (Fernández *et al.*, 2006).

Las cuatro fracciones de hidrocarburos son recalcitrantes, difíciles de degradar, de gran tamaño y de cadenas complejas, son persistentes en el ambiente degradando la calidad del suelo y el desarrollo normal de las plantas y los microorganismos (Fernández *et al.*, 2006).

2.5.3 Efecto del petróleo en bacterias y hongos micorrícicos arbusculares

Los hidrocarburos del petróleo ejercen un efecto negativo en el crecimiento y actividad de bacterias y hongos de asociación mutualista del suelo y rizosfera, sin embargo según Prince y Drake (1999) existen 60 de bacterias y 80 de hongos que se adaptan y degradan hidrocarburos. La degradación de hidrocarburos del petróleo puede ser bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Maier y Gentry, 2015). En particular el estudio de las BSP y los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) en ambientes anaeróbicos y contaminados con petróleo han sido poco estudiados. A continuación se mencionan algunos reportes científicos que indican resultados del efecto del petróleo en BSP y HMA.

Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2016), evaluó a la población de BSP asociadas al pasto *Leersia hexandra* en suelo anegado y contaminado con 5574 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo intemperizados y encontró un efecto positivo del petróleo alcanzando 700×10^3 UFCg⁻¹ en rizosfera y un efecto rizosfera de 8.64. Los autores recomiendan que la rizosfera puede ser un estimulador de la remoción de hidrocarburos.

López-Jiménez *et al.*, (2019) trabajó rizosfera y suelo de *Languncularia racemosa* en suelo sin y contaminado con petróleo intemperizado, se encontraron $10^5 \times 10^3$ UFC en rizosfera del suelo con 10 389 mg/kg HTP, con un efecto rizosfera de 5.0 veces mayor respecto al suelo no rizosférico. Los autores recomiendan a la rizosfera de mangle blanco como posible bioestimuladora de los hidrocarburos del petróleo intemperizado.

Alarcón *et al.*, (2019) encontraron que después de 24 h de contaminación en suelo con plantas (*Clitotia ternatea* y *Brachiaria*), las poblaciones más altas de BSP se encontraron en el control, y las poblaciones más bajas se obtuvieron con 12000 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo. En contraste, a los 60 y 240 días, el suelo sin contaminación mostrando poblaciones más bajas de BSP que los tratamientos contaminados.

Hernández-Ortega *et al.* (2012), establecieron un experimento con *Melilotus albus* en suelo con hidrocarburos totales del petróleo derivados del diésel, evaluó la asociación del HMA y encontró que la colonización se incrementa en suelo con diésel.

Alarcón *et al.* (2019), reportó que la colonización de HMA en ambas especies de plantas (*Clitotia ternatea* y *Brachiaria*) y el número de esporas disminuyeron significativamente a medida que aumentó la concentración de petróleo crudo; sin embargo, a los 240 días, se registró el mayor número de esporas del HMA en tratamientos con 6000 y 12000 mg/kg.

Ryszka *et al.* (2019), encontró que las concentraciones medias de aceite mineral e hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo fueron 46 473mg/kg. Las raíces de las plantas tolerantes al petróleo recolectadas se analizaron mediante microscopía óptica y se identificaron los HMA asociados mediante la secuenciación de los genes 18S rRNA SSU.

Garcés-Ruiz *et al* (2019) mostraron que en las plantas (*Piper sp*, *costus sp*, *colothea*, *anthurium sp*, *Euterpe precatoria*, *geonoma macrostachys*, *cyathea sp*, *caladium sp*, *cordia*, *cydanthus bipartitus*, *faracea sp*, *paullinia sp*) se encontraban HMA y esporas en concentraciones altas de hidrocarburos, de las esporas encontradas solo el 35% se logró identificar y 75% de las especies no pudieron ser identificadas, lo que sugiere posibles nuevas especies asociadas con raíces de plantas en condiciones altamente contaminadas con hidrocarburos.

CAPÍTULO III. OBJETIVO

3.1 Objetivo General

Delimitar la distribución de los hidrocarburos totales del petróleo en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans*, para relacionar el efecto de la contaminación en la sostenibilidad del bosque de manglar basado en la población de bacterias solubilizadoras de P, estructura fúngicas en raíz terciaria y cuaternaria, y morfoesporas del HMA en suelo con diferentes contenidos de hidrocarburos del petróleo.

3.2 Objetivo Específico

1. Determinar la concentración de hidrocarburos totales del petróleo en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans*, para delimitar zonas con niveles de contaminación.
2. Evaluar la población de BSP en suelo y rizosfera, estructuras intraradicales en raíz terciaria y cuaternaria, y morfoespecies del hongos micorrícicos arbusculares (HMA) de *L. racemosa* y *A. germinans*.
3. Realizar un análisis comparativo de la BSP, estructura intraradicales y morfoespecies del HMA por zonas sin y contaminadas con petróleo degradado proveniente de derrames desde hace 50 años en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans*.

CAPÍTULO IV HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis General

La distribución espacial de los hidrocarburos totales del petróleo en los suelos del bosque de mangle depende de la retención del petróleo intemperizado en la rizosfera de *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans* y suelo no rizosférico, así mismo estos niveles de contaminación localizados en rizosfera y suelo afectan la rizoestimulación de las bacterias de vida libre y hongos de asociación mutualista.

4.2 Hipótesis Específica

1. La tipología de suelos según los contenidos de hidrocarburos totales del petróleo depende de la acumulación de petróleo intemperizado en suelo, rizosfera de *L. racemosa* y rizosfera de *A. germinans*
2. La rizosfera de *L. racemosa*, la rizosfera de *A. germinans* en suelo con diferentes niveles de hidrocarburos totales del petróleo inducen diferencias en la población de bacterias solubilizadoras de P, colonización del hongo micorrícico arbuscular, y cantidad y especies de morfo esporas del suelo.
3. Los niveles altos de contaminación y el tipo de mangle en los suelos inducen disminución en la población de bacterias solubilizadoras de P, colonización del HMA, la cantidad y género de morfo esporas.

CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco ubicado en Periférico Carlos A. Molina s/n, km. 3.5, Huimanguillo, Tabasco. El proceso de investigación consistió de cuatro etapas secuenciales: Etapa I. Trabajo de campo. Etapa II. Tipología de suelo. Etapa III. Trabajo en laboratorio. Etapa IV. Análisis estadísticos (Figura 6).

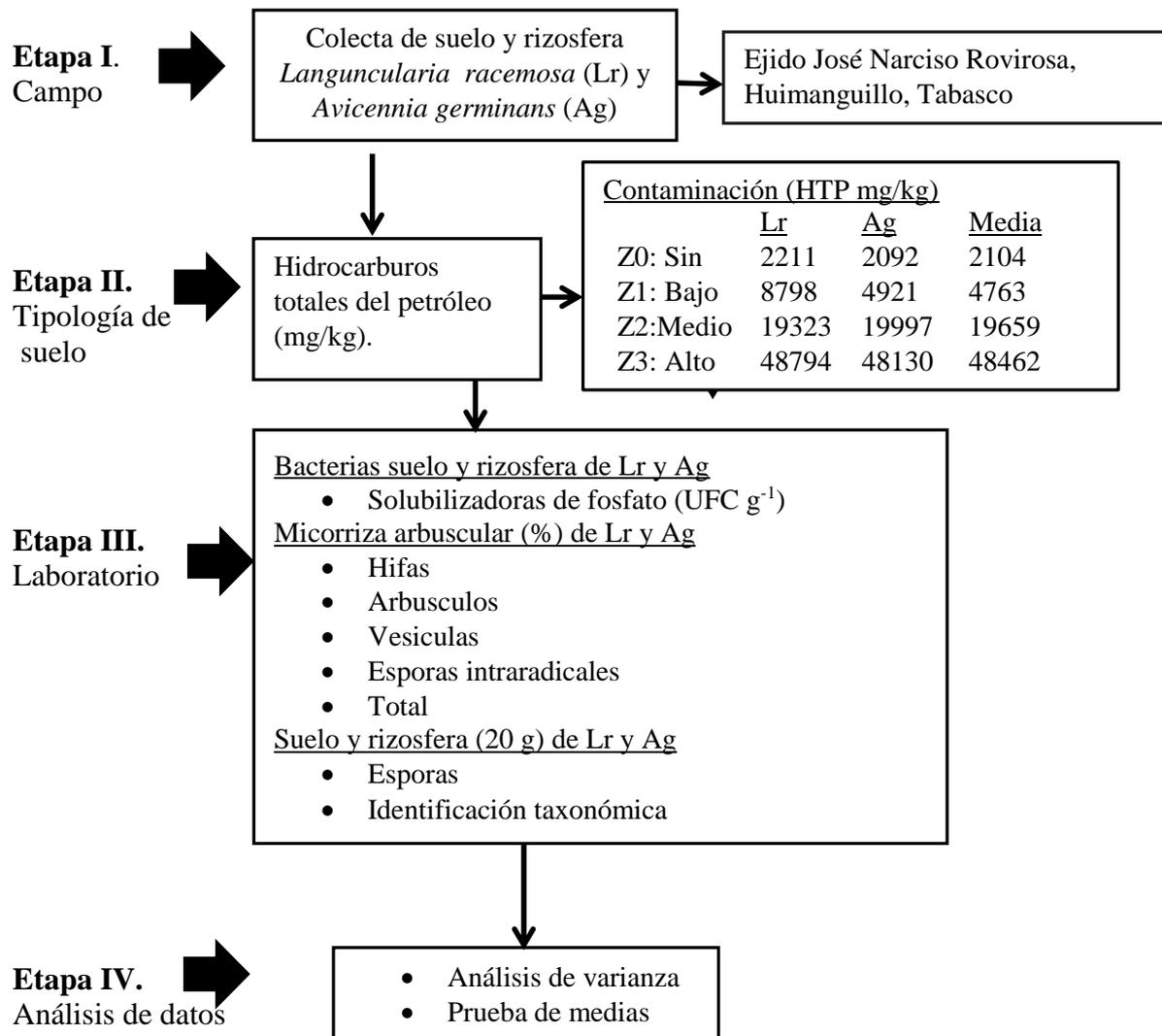


Figura 6. Flujograma del proceso de investigación.

5.1. Etapa I. Trabajo de Campo

5.1.1. Sitio de estudio y muestras colectadas

El río Tonalá se ubica en la frontera de los estados de Veracruz y Tabasco en el sureste de México. El área de manglar en estudio se ubica en La Venta Tabasco (MVT) en la cuenca baja del Río Tonalá a 1.2 km al oeste del Complejo Procesador de Gas La Venta (Figura 7). Las coordenadas UTM del polígono son 388170 a 388300 y 2000320 a 2000380 en Zona 15. El área evaluada abarca 8000 m² de un Histosol impactado desde 1967 por derrames crónicos de petróleo y de lodos de perforación del pozo petrolero La Venta 248 (López-Jiménez *et al.*, 2019).

En el área existe dos especies de mangle de origen natural *Laguncularia racemosa* (Lr) y *Avicennia germinans* (Ag) (Figura 8). Las características de Lr y Ag son; Lr (15 ± 5.8 m de altura, diámetro del tallo a 1.5 m de la base del tallo es 51.96.6 ± 5.094 cm.) y Ag (11.9 cm altura y 14.10±8.3 cm. de diámetro del tallo). El clima es tropical húmedo con lluvias en verano, la precipitación anual acumulada es 2 024.1 mm, 1 169.1 mm de evaporación y la temperatura alcanza un promedio anual de 26.4 °C (Díaz *et al.*, 2006).

Investigamos dos especies de mangles verdaderos en el MVT que se distribuyen de manera irregular en el área de estudio que contiene en la superficie y espesor del horizonte superficial (0-30 cm) diferentes concentraciones de petróleo intemperizado. En la Figura 9, se observan las coordenadas geográficas y el patrón de distribución de nueve puntos ubicados según los niveles de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en cada especie de mangle. En el mapa se ubican 9 punto simboliza un individuo adulto de mangle. Al norte y sur de cada punto se tomó una muestra de suelo, raíz (terciaria y cuaternaria) y una de rizosfera.

En Febrero 2019, 1-3 h antes de la marea alta, muestras de suelo, raíz y rizosfera (0-30 cm) de *L. racemosa* (Figura 10a) y *A. germinans* (Figura 10b) representativas de cada especie, fueron recolectadas 36 muestras de cuatro puntos ubicadas al norte y sur de cada puntos, y según el nivel de HTP [sin HTP (Z0), nivel bajo (Z1) y medio (Z2)], y 18 de seis puntos para nivel alto (Z3). Para las muestras de raíz se colectaron raíces nutritivas juveniles terciarias y cuaternarias unidas a la planta. La rizosfera colectada es el suelo que permaneció adherido a la raíz después de agitar suavemente, y el suelo no rizosférico fue el que se desprendió después de sacudir la raíz. Las muestras de rizosfera y suelo fue dividido en tres partes; una parte se usó para análisis químicos, otra para bacterias solubilizadoras de P y otra para la identificación de morfoesporas del HMA.



Figura 7. Ubicación geográfica del bosque de mangle evaluado.

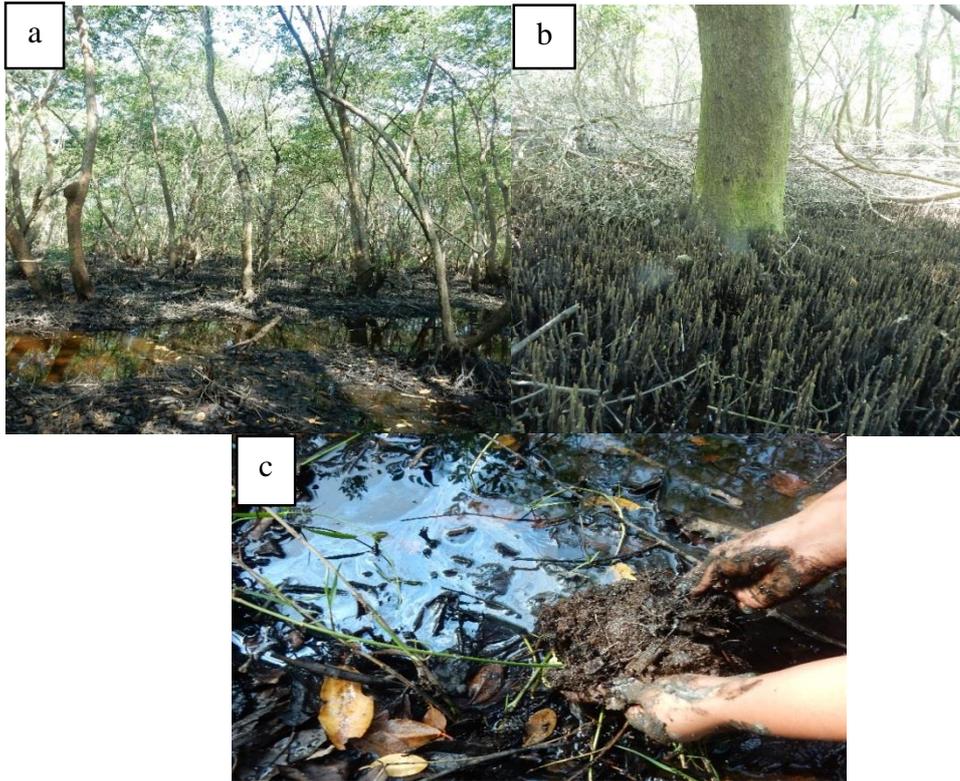


Figura 8. Panorámica del sitio de estudio. a) *Laguncularia racemosa* L., b) *Avicennia germinans*, c) suelo con rasgos de petróleo intemperizado (Fotografías cortesía Rivera-Cruz, 2019).

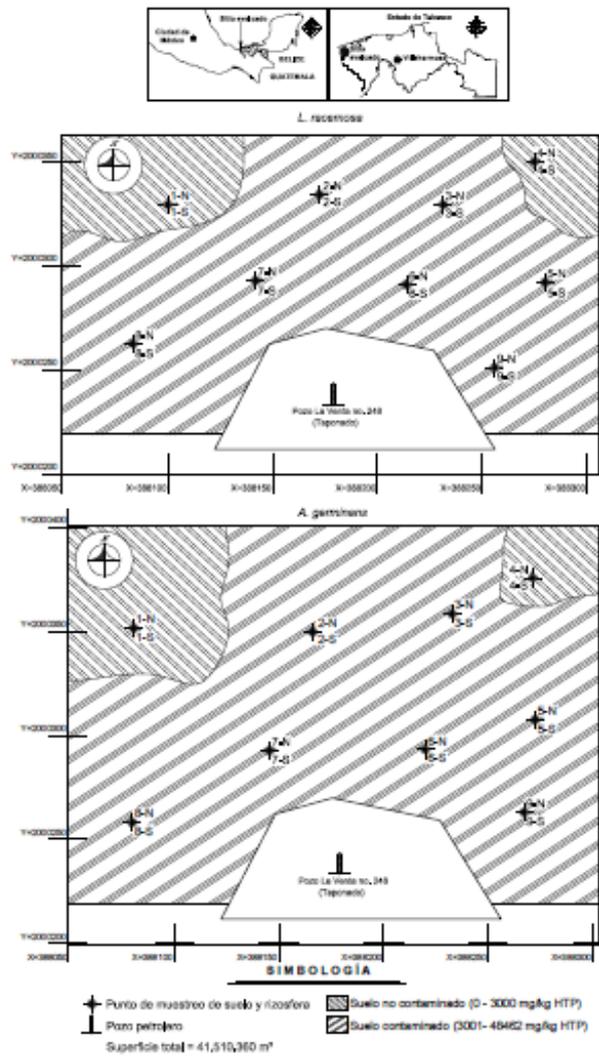


Figura 9. Coordenadas geográficas de nueve puntos (norte y sur) para muestrear suelo y rizosfera de *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans* en suelo sin y contaminado con petróleo intemperizado.

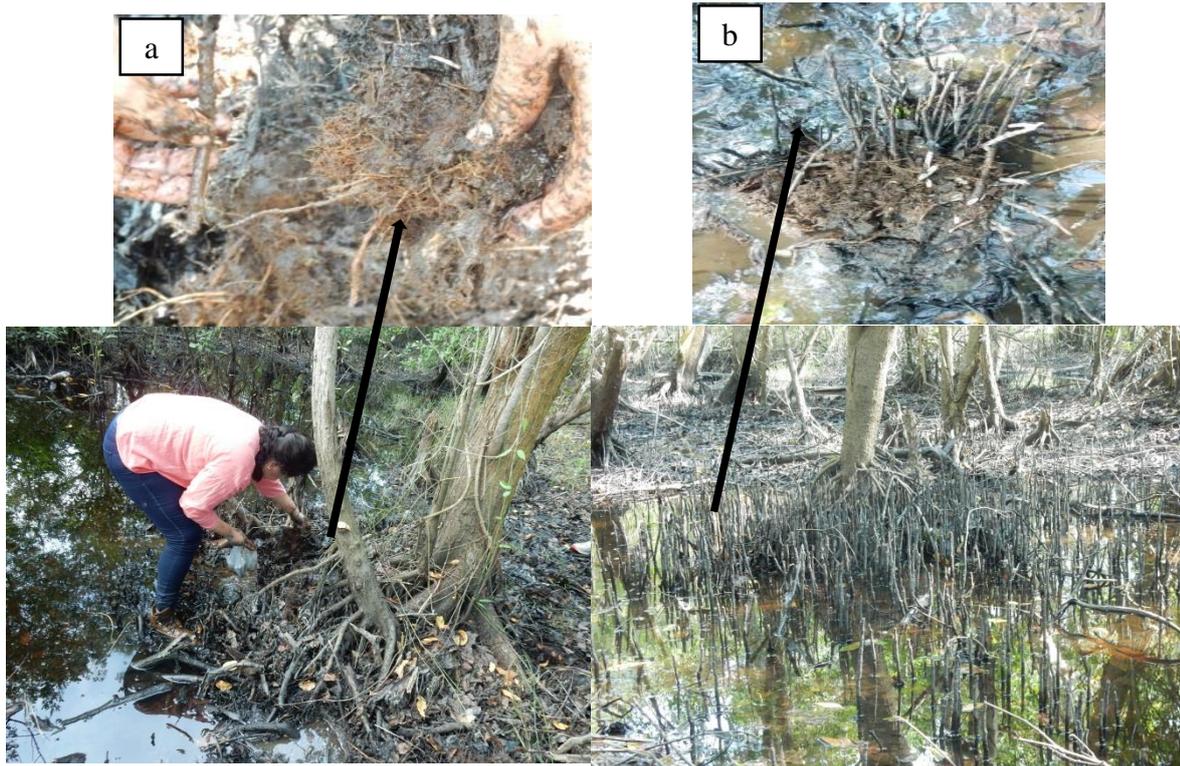


Figura 10. Muestreo de rizosfera de *L. racemosa* (a) y *A. germinans* (b). (Fotografías cortesía Rivera-Cruz, 2019).

5.1.2. Propiedades químicas del suelo

El suelo es un Histosol con horizonte superficial fábriico (9.4-0 cm de profundidad), otro hémico (0-40 cm), uno sáprico (41-44 cm) y a mayor profundidad (>44 cm) existe suelo mineral, aparentemente relacionado con el relleno de la construcción del terraplén del pozo petrolero (Figura 8). El suelo y rizosfera de Z0, Z1, Z2 y Z3 ubicados en el espesor (0-40 cm) contenía material orgánico (hémico, fibrico, sáprico), textura limosa arcillosa, pH en agua fuertemente ácido (4.8 a 5.0), CE salina (4.7 a 5.15 dSm⁻¹), COS muy alto (32.5 a 34.8%) y P_{disponible} muy altos (383.5 a 447 mg/kg).

5.2. Etapa II. Tipología de suelo

5.2.1. Clasificación y delimitación de zonas

La tipología de zonas por niveles de contaminación para *L. racemosa* y *A. germinans* se realizó agrupando muestras por contenidos de HTP (mg/kg) en rizosfera y suelo no rizosférico. Se determinaron cuatro zonas (Z) según niveles de contaminación por tipo de mangle en un área de 8000 m². Para Lr (Z0: 2111, Z1: 4605, Z2: 19323, Z3: 48794) y para Ag (Z0: 2091, Z1: 4921, Z2: 19996 y Z3: 48130). El nivel de contaminación Z0 (sin contaminación) se determinó aplicando el criterio básico de límite máximo permisible (LMP) de 3000 mg de hidrocarburos fracción pesada establecido en la normativa mexicana para suelo con uso forestal (DOF, 2013). Las otras tres zonas con nivel contaminado superiores al LMP; Z1, Z2 y Z3.

El suelo y rizosfera de *L. racemosa* para Z0 quedó integrado por los puntos (1S, 1N, 4S y 8N), Z1 (4S, 6S, 6N, 7N), Z2 (3S, 3N, 5S, 5N) y Z3 (2N, 2N, 7S, 8S, 9S, 9N). El suelo y rizosfera de *A. germinans* quedó Z0 (1S, 1N, 3N, 3N), Z1 (2S, 2N, 6S, 6N), Z2 (7S, 7N, 8S, 8N) y Z3 (4S, 4N, 5N, 5N, 9S, 9N) (Figura 8). Los valores promedios de HTP de suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* definieron cuatro niveles de concentraciones; Z0 (2104 ± 103), Z1 (4763± 256) Z2 (19659±465) y Z3 (48462±879).

5.3. Etapa III. Trabajo en laboratorio

5.3.1. Hidrocarburos totales del petróleo

Se utilizó rizosfera (10g) y suelo no rizosférico (10g) de *L. racemosa* y *A. germinans* para la extracción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en equipo soxhlet mediante el método 3540B (USEPA, 1996) (Figura 11). La muestra se acidificó con HCl, después se secó con MgSO₄. El solvente se evaporó durante ocho horas y el peso seco del extracto se cuantificó por gravimetría según lo establecido en la norma NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006).

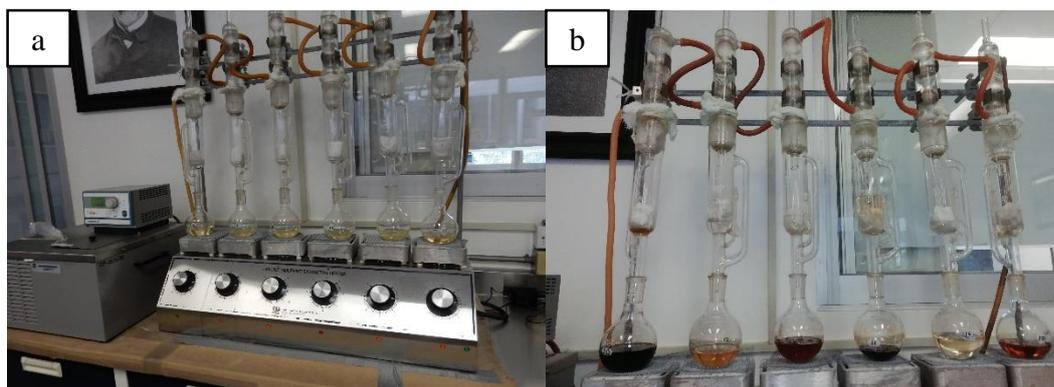


Figura 11. Extracción de hidrocarburos totales del petróleo. a) Equipo soxhlet para extracción, y b) lavado del petróleo en suelo con cloruro de metileno al 98% de pureza.

5.3.2. Análisis de bacterias solubilizadoras de fosfatos

La población de bacterias solubilizadoras de P (BSP) en suelo y rizosfera, se realizaron usando el método de cuenta viable por dilución seriada en medios de cultivos específicos (Madigan *et al.*, 2015). El medio de cultivo fue Pikovskaya: 10 g glucosa, 5 g Ca_3PO_4 , 0.1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl, 0.5 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 0.5 g extracto de levadura, 0.002 g MnSO_4 , 15 g agar y 1000 mL de agua destilada (Pikovskaya, 1948), y su preparación se observa en la Figura 12 a, b. La técnica de cuenta viable consiste en pesar 10 g de suelo fresco y diluir en 90 mL de agua destilada estéril, después se agita durante 10 minutos a 180 rpm, luego se extrae una alícuota de 1.0 mL para realizar las diluciones, para sembrar en caja Petri de cada dilución se toma una alícuota de 0.1 mL, y se coloca sobre la superficie del medio de cultivo, en seguida se incubaron a 30 °C por durante 48 h para bacterias (Figura 13). Las UFC g^{-1} se cuantifican y se reportan por gramos de rizosfera y suelo seco.

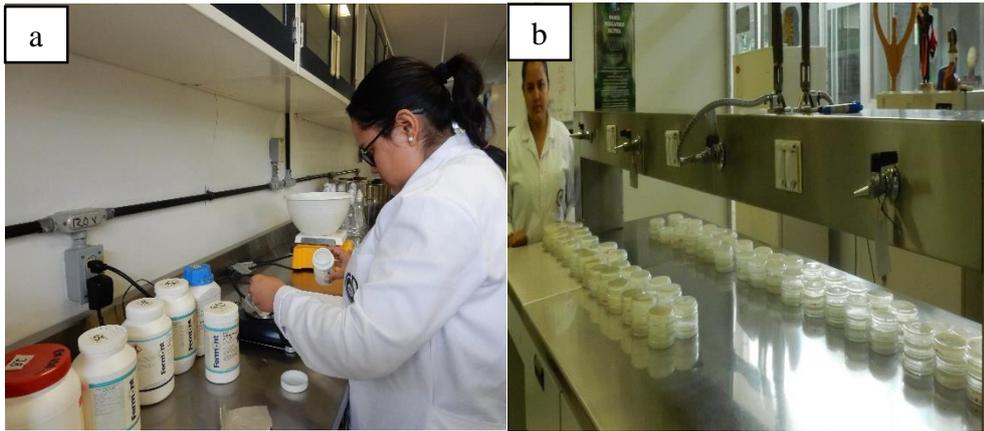


Figura 12. a) Preparación de medio de cultivo Pikovskaya, y a) medios de cultivo contenido en caja Petry.

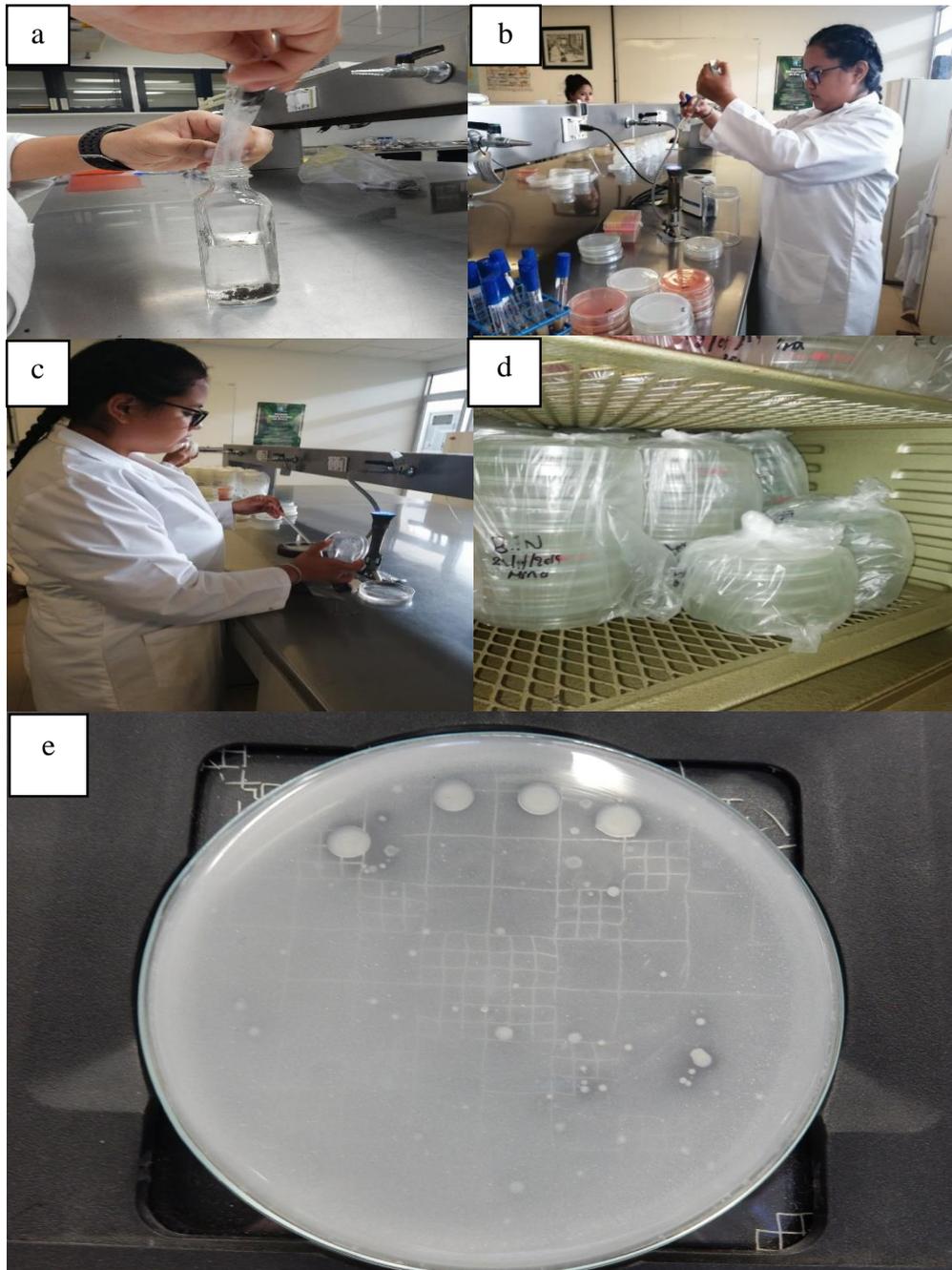


Figura 13. Técnica de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar:
a) Mezcla muestra y agua estéril, b) inoculación de muestra, c) homogenización de la mezcla,
d) incubación, e) conteo de unidades formadoras de colonias.

5.3.3. Análisis de colonización del hongo micorrícico arbuscular

5.3.3.1. Tinción y montaje de raíz

Las muestras de raíces fueron clareadas con 10% KOH por 144 horas a 30°C (temperatura ambiente), y teñidas con azul tripano (Phillips y Hayman, 1970). Se lavaron con agua de la llave hasta dejarlas sin suelo 18 raíces de *L. racemosa* y 18 de *A. germinans*. Se seleccionaron raíces terciaria y cuaternarias. De cada raíz se tomaron por triplicado 15 trozos (1.5 cm). Las raíces de 1.5 cm fueron colocadas en una cápsula de plástico, seguidamente fueron inmersas en KOH al 10% durante 144 horas a 30°C (Figura 14b y c), al finalizar este tiempo, las cápsulas fueron lavadas con agua al corriente (Figura 14d) y luego sumergidas en peróxido de hidrógeno comercial al 3% durante 10 minutos, para después ser sumergidas en HCl al 10% por 5 min, posteriormente fueron lavadas nuevamente con agua a corriente e inmersas en azul tripano al 0.05% durante 72 horas, pasado el tiempo de la tinción se desechó el azul tripano y se sumergieron en el lactoglicerol para eliminar el exceso de colorante.

Las raíces teñidas se fijaron en el portaobjeto, con la ayuda de una aguja para acomodarlas, en cada porta objeto se montaron 60 raíces fueron empleada por cada muestra o tipo de raíz montando 15 raíces (Figura 15a y b) y fueron 4 portaobjetos para raíz terciaria y 4 portaobjetos para raíz cuaternaria por cada rango de contaminación, por último se observó al microscopio compuesto (motic digital microscope, DMB3-223, NTSC System) con el objetivo 40X (Figura 15c).

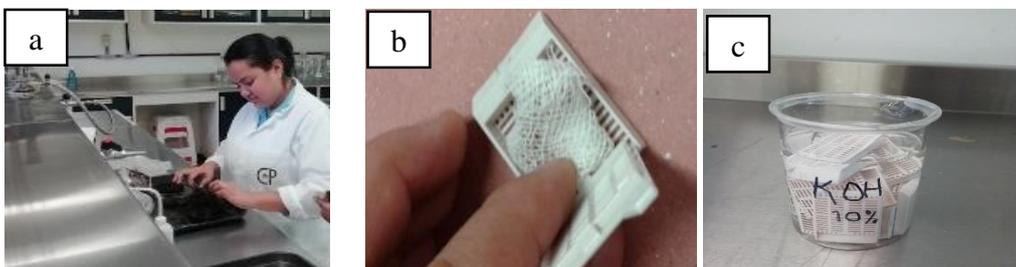




Figura 14. a) Selección de raíz terciaria y cuaternaria, b) raíz en cápsula, c) raíz en KOH (10%) por 144 h, d) lavado con agua al corriente, e) raíz en peróxido de hidrógeno, f) raíz en HCl al 10%, g) tinción en azul tripano.

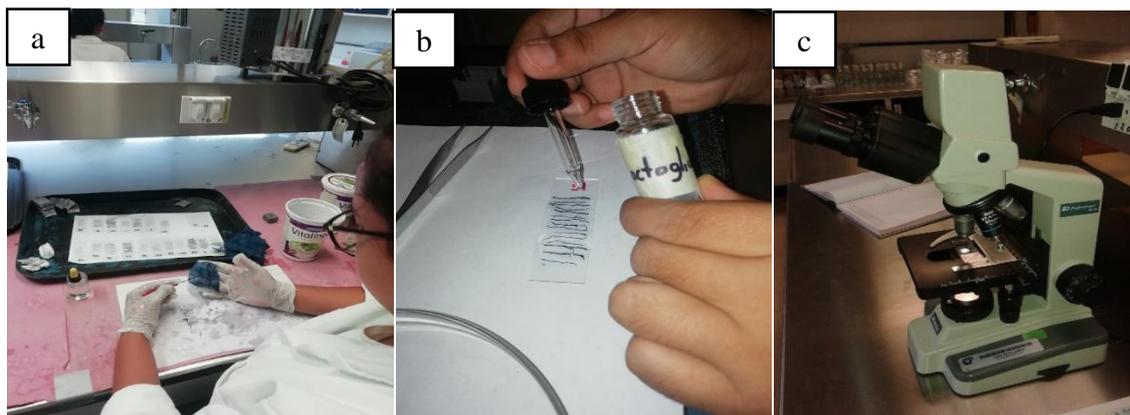


Figura 15. a) Montaje de raíz, b) aplicación de lactoglicerol, y c) observación al microscopio

5.3.3.2. Extracción y conteo de esporas micorrícicas

Para la extracción de esporas el suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* se secó bajo techo y se tamizó en la malla 2 mL de diámetro, se tomaron 10 g de suelo y 10 g de rizosfera. La extracción de esporas micorrícicas fue realizada en 20 g de muestra bajo la metodología de tamizado y decantación de Germann y Nicolson (1963) modificada por Daniels y Skipper (1982).

Los pasos fueron los siguientes; 1) de cada una de las 72 muestras tomadas de suelo y rizosfera de mangle blanco y negro (20g) se colocó en un vaso de precipitado. 2) Se le agregaron 800 mL de agua y se agitó con una varilla de vidrio durante 30 segundos, se dejó reposar por 1 minuto. 3) Se pasó en tamices de 500 μm 44 μm (este proceso se realizó 5 veces para cada una de las muestras). 4) se dejó correr agua sobre el tamiz para quitar restos del suelo menores a 44 μm 5) en un tubo para centrifuga de 12 mL se colocaron 6 mL de sacarosa al 20%, seguidamente se colocaron 4 mL de sacarosa al 60% con una pipeta desde el fondo del tubo soltando la sacarosa de manera lenta para que no se mezclara con la sacarosa al 20%, esta última se subió a medida que se soltó la sacarosa de 60% y así obtener el gradiente de sacarosa. 6) El contenido retenido en el tamiz de 44 μm se vertió sobre el gradiente de sacarosa para centrifugarlo a 2500 rpm durante cinco minutos. 7). El sobrenadante obtenido se pasó a un tamiz de 44 μm de diámetro y se lavó con abundante agua corriente para después colocarlo en una caja Petri (Figura 16). Las esporas del extracto de agua destilada fueron observadas a través del estereoscopio, separadas de manera manual y el conteo de esporas se realizó con un estereoscopio marca Zeiss Stemi DV4 (Figura 16g).

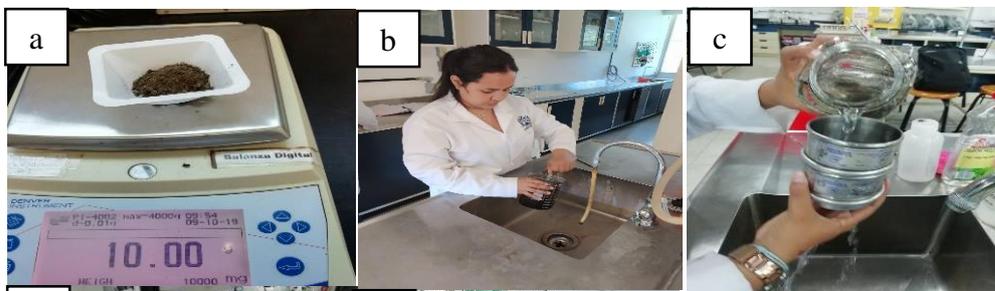


Figura 16. Extracción y conteo de esporas en suelo y rizosfera. a) Peso de muestra, b) agitar y reposo de muestra, c) tamizar y lavar con agua, d) gradiente de sacarosa, e) colocar tamiz al tubo, f) colocar esporas en caja Petri, y g) conteo de esporas en estereoscopio

5.3.3.3. Aislado e identificación taxonómica de especies

Para tomar las esporas del extracto, se aglomeran las esporas y la materia orgánica en el centro de la caja Petri (Figura 17a) con un movimiento oscilatorio y con una aguja de disección se separaron las esporas de la materia orgánica, se tomaron con pipeta Pasteur (modificada) y se colocaron sobre un portaobjeto suspendidas en una gota de PVLG+ Melzer (1g de yodo, 3g de yoduro de potasio y 5g de hidrato cloral) (Figura 17b) y se cubren con un cubreobjeto. Las laminillas con esporas se colocan en un horno de secado de esterilización a 49 °C (Figura 17c) para su posterior observación en el microscopio óptico IROSA-Iroscope MG-18 a 40X para su taxonomía.

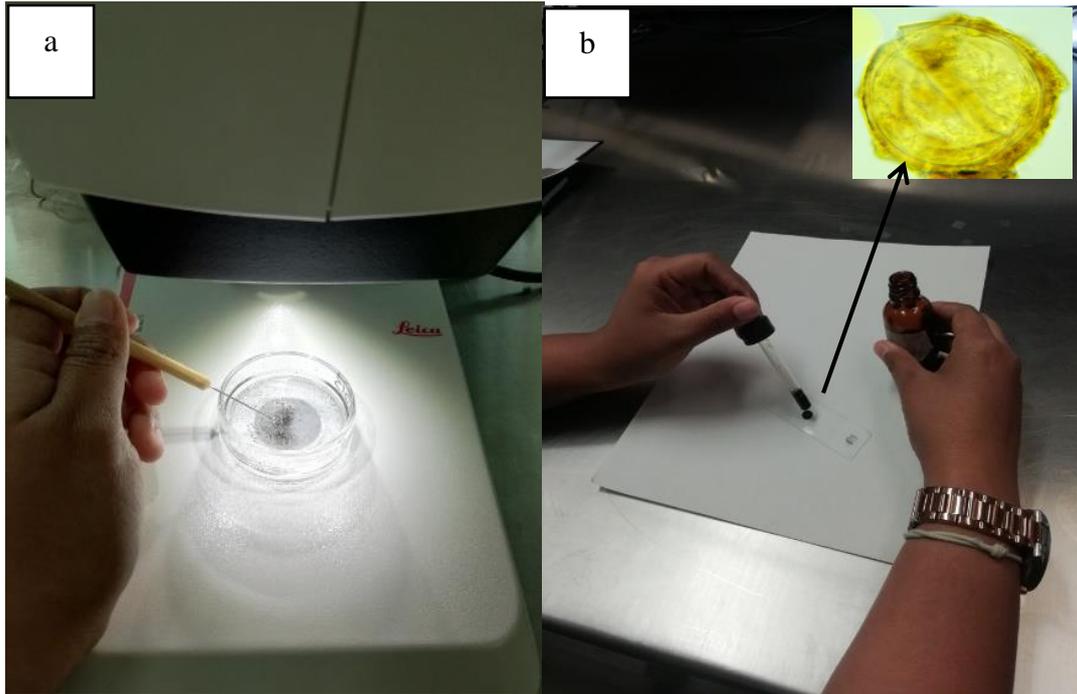


Figura 17. Aislado de esporas del suelo. a) Separar esporas de la materia orgánica, y b) esporas suspendida con gota del reactivo PVLG+Melzar.

5.3.3.4. Identificación taxonómica de especies

La nomenclatura sigue la clasificación de Schußler & Walker (2010) y la referencia de la clasificación de los HMA Glomeromycota de Redecker *et al.*, (2013). Para la identificación taxonómica de especies de esporas montadas en PVLG más reactivo Melzer se observaron en microscopio óptico con contraste de interferencia Nomarski, (IROSA- Iroscope MG-18) a 40X y 100X, midiendo con reglilla micrométrica acoplada al ocular, se consideró la morfología de cada uno de los morfotipos, tomando en cuenta: tipo de esporas (Glomoide, Acaulospora), diámetro de esporas e hifas, pared y estratos de pared (número, tipo arreglo, ornamentaciones); hifas de origen (forma, pared, zona de oclusión); citoplasma (esporas maduras y esporas jóvenes) así como la reacción de los estratos con reactivo Melzer, la morfología de éstas se compararon con las descripciones del Internacional Vesicular Arbuscular Culture Collection (INVAM, 2019) y de Blaszkowski de la Universidad de Agronomía de Szczecin, Polonia (Blaszkowski, 2015), tomando en cuenta la filogenia y taxonomía de Glomeromycota (Schußler, 2015). Las esporas se fotografiaron en microscopio óptico IROSA- Iroscope MG-18, con cámara digital industrial

UCMOS03100KPA, software de digitalización de imágenes Top View versión x86, 3.7.7892.

5.4. Etapa VI. Análisis estadísticos

La delimitación de zonas de estudio para *L. racemosa* y *A. germinae* se realizó en base al promedio de los HTP por punto. Se utilizó el procedimiento de Duncan ($p=0.05$) con el programa Statistical Analysis System versión 8.01 (SAS, 2005) para: 1) Las medias de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) según la distribución en suelo y rizosfera por zona, 2) la media de las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato, suelo rizosférico y no rizosférico de Lr y Ag según los niveles de HTP por zona, 3) la media de cada estructura fúngica por tipo zona y tipo de mangle y 4) la media de esporas intraradicales por zona y tipo de mangle.

CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Hidrocarburos totales del petróleo en rizosfera y suelo

Las medias de los contenidos de HTP muestran diferencias estadísticas significativas entre la rizosfera, suelo de *L. racemosa* (*Lr*) y *A. germinans* (*Ag*) en cada zona (Duncan, $p < 0.05$), en adición, la fracción pesada excede el límite máximo permisible en tres zona de acuerdo a la regulación mexicana (DOF, 2013). Los resultados más sobresaliente incluyen las diferencias en las concentraciones de HTP entre la rizosfera y suelo no rizosférico de *Lr* y *Ag* (Figura 18, Cuadro 2). El contenido de HTP en la rizosfera de *Lr* fue 0.95 y 48 % y en *Ag* 19 y 59 % veces menor que en el suelo no rizosférico de la Z1 y Z3, respectivamente.

Los índices de TPH en el suelo respecto a la rizosfera de *Lr* y *Ag* en la Z1, Z2 y Z3 fueron más altos en la Z3, el índice fue 1.94 en *Lr* y 2.47 en *Ag*. En la Z0, el mayor contenido de HTP de origen biogénico fue en la rizosfera de *Lr* y *Ag* y solo en la Z2 de las tres zonas contaminadas la rizosfera de *Ag* acumula mayor TPH (17566 mg/kg).

En la Z1 el mayor contenido de aceite fue encontrado en el suelo de *Ag* (5434 mg/kg); en la Z2 la más alta concentración se encontró en suelo de *Ag* con 20978 mg/kg. Vale la pena señalar los resultados obtenidos en la Z3 fue porque la cantidad promedio de aceite en el suelo de *Lr* y *Ag* fueron 64244 y 68547 mg/kg respectivamente, y quizás derivados de goteo de petróleo proveniente de tubería vieja e inactiva localizada en el subsuelo, ser parte de la contaminación crónica que se acumuló en los cincuenta años por la perforación y mantenimiento del pozo La Venta 248 (Figura 18).

Los HTP derivados del petróleo degradado (PD) estuvo presente en la rizosfera y suelo no rizosférico (capa 0-30 cm de profundidad) de *L. racemosa* y *A. germinans* en las tres de cuatro zonas de estudio con niveles altos de HTP. Similares resultados han sido reportados en suelo y rizosfera de *L. hexandra* que habita humedales adyacentes a infraestructuras petroleras; entre 292 a 4148 mg/kg de HTP en rizosfera y 4135 a 11148 en suelo (capa, 0-30 cm) (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016). López-Jiménez *et al.*, (2019) reportaron una distribución irregular de los HTP en la rizosfera de *L. racemosa* y suelo orgánico, al respecto en una zona de estudio encontraron mayor contenido de HTP derivados del PD en rizosfera

con 7513 mg respecto al suelo (5108 mg) en el espesor de 0-30 cm; pero estos autores también informaron que en zonas muy contaminadas la mayor acumulación se localizó en suelo no rizosférico con 22962 mg respecto a rizosfera (5900 mg HTP). Rivera-Cruz *et al.* (2002) discuten que la retención de aceite en el suelo es debido a los altos contenidos de materia orgánica que lo caracterizan, presenta afinidad para la retención de los hidrocarburos, al respecto observaciones directas en el Histosol con mayor contaminación en esta investigación fue la capa superficial con material orgánico fibrica, hémica y sáprica permanecen cubiertos con aceite crónico.

La cantidad de TPH se distribuye igual en la rizosfera y suelo no rizosférico con niveles de contaminación bajos (Z1) y medios (Z2), pero en la Z3 los TPH son mayores en el suelo no rizosférico (Figura 18) esto sugiere dos situaciones para las dos primeras zonas; (a) que el mangle *L. racemosa* y *A. germinans* es dominante en el área conteniendo una rizosfera con raíces nutritivas de anclaje (capa 0-40 cm) que bioestimula la degradación de HTP, y (b) que los altos contenidos de materia orgánica que caracterizan al Histosol (capa 0-40 cm) estimulan la degradación. Sin embargo, en la Z3 se manifiesta a un más que la rizosfera de manera natural induce la fitorremediación de hidrocarburos, al ser menores los HTP respecto al suelo no rizosférico en *Lr* y *Ag*; una explicación es que la presencia de raíces en el suelo generan condiciones aeróbicas y nutritivas para el establecimiento de los microorganismos que degradan y estabilizan hidrocarburos (Muratova *et al.*, 2012), otra explicación es el alto contenido de carbono orgánico que caracterizan al Histosol, al respecto Brady y Weil (2008) en suelo orgánico la población de microorganismos es estimulada en su crecimiento basado en el cometabolismo sostenido en carbono de origen biogénico y antropogénicos. Este proceso de atenuación natural o fitorremediación de hidrocarburos en el bosque de manglar ubicado en suelos de humedales del trópico, de acuerdo a Björklöf *et al* (2008) se realiza por organismos anaeróbicos y aeróbicos, y es una tecnología reconocida por varios autores que indican una remoción entre 60 a 72% TPH en 180 días (Rivera-Cruz *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2015).

La acumulación de HTP en el suelo de la Z3 es derivado del vertido de desechos de perforación en los años 50, y ha permanecido bajo condiciones anaeróbicas la mayor parte del años, de acuerdo a Pravecek *et al* (2005) y Madigan *et al* (2015), estas condiciones inducen una tasa más lenta de degradación del aceite debido a la falta de oxígeno para capturar electrones.

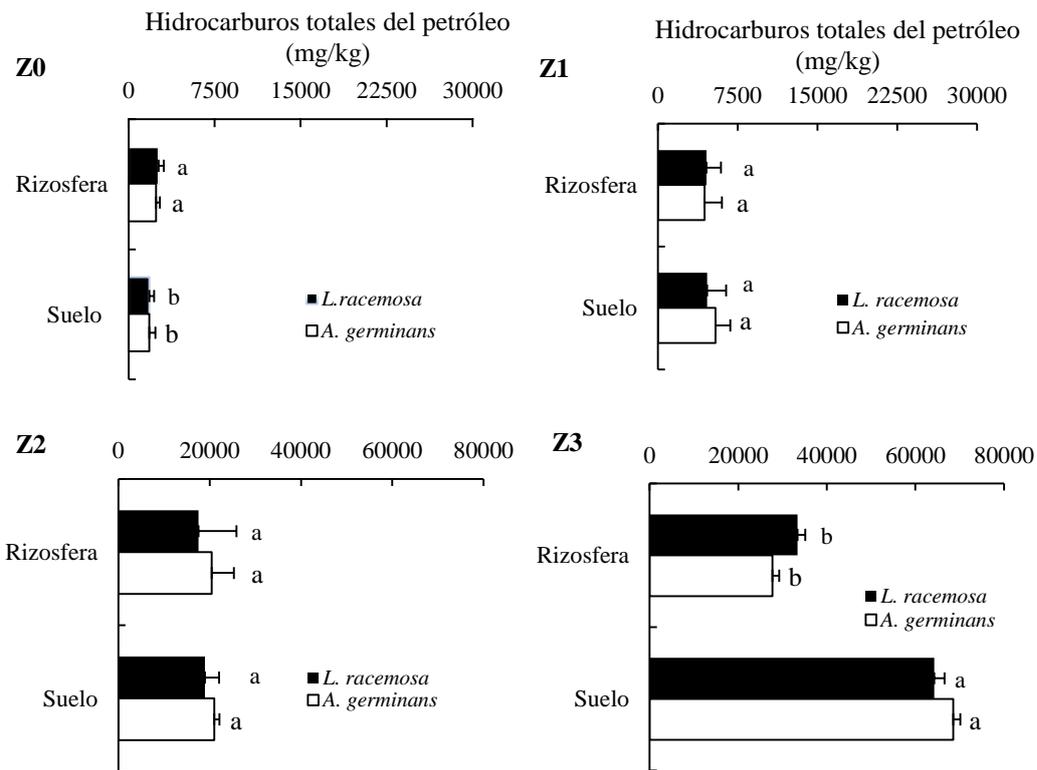


Figura 18. Distribución espacial de hidrocarburos totales en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* en cuatro zonas del bosque. Letras diferentes indican que hay diferencias significativas (Duncan $p < 0.05$).

Cuadro 2. Concentración de hidrocarburos totales del petróleo por zonas según rizosfera y suelo de *L. racemosa* y *A. germinans*

Zona/ HTP (mg/kg)	Punto	<i>L. racemosa</i>		<i>A. germinans</i>	
		Rizósfera	Suelo	Rizósfer a	Suelo
Hidrocarburos totales del petróleo (mg/kg)					
Z0: 2111	1	2232	1795	1587	1795
	2	2492	1795	2584	2330
	3	2808	2330	2684	1796
	4	2973	1259	2697	1259
\bar{x} :		2626	1795	2388	1795
CV		12	5	22	100
Z1:4605	1	3178	5500	3380	3585
	2	3187	2780	3593	4828
	3	5470	4390	4262	7900
	4	6500	5839	6381	5438
\bar{x} :		4584	4627	4404	5438
CV		36	100	31	41
C2: 19323	1	15025	19700	15918	18781
	2	16203	20000	20398	23176
	3	20357	20416	19801	18781
	4	18681	21706	19940	23176
\bar{x} :		17566	15955	19014	20978
CV		14	4	11	15
C3: 48794	1	22266	57058	22497	40359
	2	23406	71428	23956	48654
	3	24671	57058	24800	77522
	4	32971	71428	25000	107654
	5	33534	57058	33799	68547
	6	63221	71428	36227	68547
\bar{x} :		33345	64244	27713	68547
CV		46	15	21	44

6.2 Bacterias solubilizadoras de P en rizosfera y suelo

La población de BSP mostró diferencias significativas en rizosfera y suelo no rizosférico por efecto de los niveles de contaminación en las cuatro zonas (Duncan $p < 0.05$). Las poblaciones de BSP fueron más abundantes en el suelo no rizosférico en las cuatro zonas, excepto en la Z3 en donde fueron mayores en la rizosfera de Ag (Cuadro 3). La mayor población de BSP (70×10^2 UFC) en suelo de *L. racemosa* de la Z2 y rizósfera de *A. germinans* de la Z3 con 50×10^2 UFC. Sin embargo, no se encontró efecto rizosférico

inducido por *L. racemosa* en las cuatro zonas y en las Z0, Z1 y Z2 de *A. germinans*, pero sobresale el efecto rizosfera de *A. germinans* en la Z3.

El efecto del PD sobre la población de BSP en rizosfera de Lr fue negativo en comparación con el alto nivel en suelo no rizosférico con 50×10^2 UFC en suelo sin contaminación y 47×10^2 en suelo contaminado de Lr. Se distingue el efecto positivo del petróleo en la población de BSP en rizosfera y suelo de Ag que alcanzaron 28×10^2 y 30×10^2 UFC en suelo y rizosfera de Ag (Cuadro 3).

Las BSP han sido reportadas por varios investigadores en sedimentos y raíz de manglar asociadas a la solubilización de fosfatos, en cantidades de 10^3 a 10^6 UFC, así mismo la abundancia de especies es mayor en Lr respecto a Ag. Las especies asociadas a la raíz de Lr y Ag reportadas por Holguin *et al.* (2006); Kathiresan y Selvam (2006); Tam y Diep (2017) son; *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Vibrio proteolyticus*, *Paenibacillus macerans*, y *Xanthobacter agilis*, y solo *Bacillus licheniformis* asociada a Ag.

Nuestros resultados indican que la población de BSP es baja entre el rango 12 a 70×10^2 UFC g^{-1} s.s en suelo y rizosfera de Lr y Ag en zonas sin y con PD, así mismo encontramos un efecto negativo de la rizosfera de Lr en las cuatro zonas, y en tres zonas (Z0, Z1 y Z2) de Ag, siendo mayor las poblaciones de BSP en suelo no rizosférico. Resultados contrarios fueron reportados por Tam y Diep (2017) con poblaciones altas (10^6 y 10^7 UFC g s.s) en suelo rizosférico de *Rhizophora mucronata* y *Bruguiera cylindrica* en Mekong Delta (Vietnam), y López-Jiménez *et al.* (2019) con 10^3 UFC en rizosfera de *L. racemosa* sin y con PD de La Venta Tabasco, México. El incremento de las BSP en suelo no rizosférico puede ser según Gyaneshwar *et al.* (2002); Rosatto-Moda *et al.* (2014), a que en suelos Histosol presenta altos contenidos de portadores orgánico de carbono y fósforo (inositol phosphates, ácidos nucleicos y fosfolípidos) que contiene hierro, aluminio, calcio y fósforo permitiendo la colonización de grupos microbianos benéficos para los servicios ambientales (Brady y Weil, 2008), al respecto el suelo evaluado en esta investigación contiene muy altos COS (32 a 34.8%) y fósforo disponible (383 a 447 mg/kg).

La BSP fueron incrementadas en la rizosfera y suelo no rizosfera de Ag en suelo contaminado con PD, mientras que en Lr fueron menores, y esto puede ser el patrón de distribución del sistema radicular de la especie (raíces aéreas o neumatóforos y nutritivas), Ag desarrolla

mayor cantidad, tamaño de raíces alimenticias y neumatóforos respecto a *Lr*, los neumatóforos de *Ag* cubren la superficie del suelo tanto en época de inundación como de sequía e incorpora oxígeno a la rizosfera y suelo no rizosfera con PD. El oxígeno desempeña un papel importante en la colonización de BSP y que el fosfato sea absorbido por la planta (Behera *et al.*, 2016). En general, se acepta que el mecanismo de solubilización de fosfato mineral por bacterias solubilizadoras de fosfato está asociado con la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Goldstein, 1995), que a través de su grupo hidroxilo y carboxilo quelatan los cationes unidos al fosfato, convirtiéndolo en forma soluble (Kpombrekou y Tabatabai, 1994) tanto en rizosfera como en suelo orgánico del bosque del manglar.

Cuadro 3. Poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato en rizosfera y suelo de *L. racemosa* y *A. germinans* en suelo sin y con petróleo intemperizado

Zona/HTP (mg/kg)	<i>L. racemosa</i>		Efecto	<i>A. germinans</i>		Efecto
	Rizosfera	Suelo		Rizosfera	Suelo	
	10^2 UFC g ⁻¹			10^2 UFC g ⁻¹		
0:2104	25d	50b	0.5	13e	13e	1.0
1:4763	12de	44bc	0.27	16de	37c	0.43
2:19659	29d	70a	0.41	18de	19de	0.94
3:48462	21d	27d	0.77	50b	33c	1.5
Contaminación						
Sin	25b	50a	0.5	13c	13c	1.0
Con	18c	47a	0.38	28b	30b	0.93

Medias con diferentes letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$, $n=9$).

6.3. Micorriza arbuscular en *L. racemosa* y *A. germinans*

Se observó simbiosis micorrícica en raíces terciarias y cuaternarias de *Lr* y *Ag* en todas las zonas y evidenció diferencias estadísticas en el porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas y esporas asociadas a raíz terciaria y cuaternaria de las dos especies de mangle (Duncan $p < 0.05$). El porcentaje de hifas (96 a 100%), arbusculos (98 a 100%) y esporas (97 a 100%) en raíz terciaria y cuaternarias, sin diferencias estadísticas se observaron en *Ag* de las cuatro zonas, y solo en la Z0 raíz terciaria de *Lr* el porcentaje de arbusculos (98%) y esporas intraradicales (98%) son similares a la colonización de raíz de terciaria *Ag* (Cuadro 4). Sobresale el mayor porcentaje de vesículas (14 a 21%) en raíz terciaria y (12 a 18%) en

cuaternaria de *Lr* asociadas a las cuatro zonas, siendo menores las vesículas en raíz terciaria y cuaternaria (2 a 6%) de *Ag* establecida en las cuatro zonas.

El efecto del PD en el porcentaje de hifas, arbusculos y esporas en raíces terciarias de *Lr* fue negativo, pero positivo en raíz cuaternaria, y sobresale que las vesículas son favorecidas por el PD en raíz terciaria, pero en cuaternaria disminuyen 12.5% respecto al suelo sin PD. La respuesta del HMA asociado a raíz terciaria y cuaternaria de *Ag* fue positiva a la exposición al PD con un 99% de arbusculos y 99% de esporas (raíz terciaria), y en raíz cuaternaria (98% hifas, 98% arbusculos y 98% esporas).

La colonización total del HMA asociada a raíz terciaria y cuaternaria de *Lr* y *Ag* en la zona sin (Z0) y contaminadas con PD en general es alta al estar en el rango de 68 a 76%. Sin embargo existen algunas diferencias; la mayor colonización total del HMA (76%) en raíz terciaria de *Lr* y *Ag* fue en Z0 y Z3, que contiene 2104 y 48462 mg de PD respectivamente, y en raíz cuaternaria la mayor colonización (76%) en *Ag* de Z1 y Z3 (Figura 19).

Estudios previos han mostrado que la simbiosis de HMA nativos con plantas presentan resistencia a factores de estrés como temperatura, pH, salinidad, humedad del suelo, contaminantes inorgánicos y orgánicos tales como los hidrocarburos del petróleo (Gao *et al.*, 2011; Alejandro-Córdova *et al.*, 2017; Salam *et al.*, 2017). En este estudio se confirma la existencia de HMA asociados a *L. racemosa* y *A. germinans* bajo condiciones de saturación permanente, como reporta Wang *et al.*, (2010). HMA asociado a diferentes especies de manglares tales como *B. gymnorhizal*, *A. ilicifolius*, *K. candel*, *A. marina*, *A. corniculatum*, *S. caseolaris* y *S. apetala*.

Sobresale en esta investigación que no hubo efecto alguno del PD en los HMA asociada a raíz terciaria y cuaternaria de *A. germinans*, pero si hubo efecto ligero negativo en el rango de 6.52, 13.3 y 3.06 % de 4763, 19659 y 48462 mg/kg de PD en hifas, arbusculos y esporas intraradicales asociadas a raíz terciaria de *L. racemosa*, y en raíz cuaternaria solo las vesículas disminuyen 12.5% respecto al porcentaje en raíz sin PD. La resistencia de HMA asociado a *L. racemosa* y *A. germinans* a los hidrocarburos derivados del PD fue similar a los resultados obtenidos por Alarcón *et al.* (2006) y Franco-Ramírez *et al.* (2007) al evaluar especies de HMA en *Echinocloa polystachya* en suelo con hidrocarburos del petróleo. Esta respuesta se atribuye a que los HMA limpian su propio ambiente, al ser saprofitos,

degradadores, mineralizadores y transportadores de minerales del suelo a la planta, ellos utilizan la materia orgánica e hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía liberando nutrientes y CO₂ (Gao *et al.*, 2011; Roupael *et al.*, 2015; Paterson *et al.*, 2016).

Entre los factores que contribuyen a la colonización del HMA se encuentran los siguientes; (1) es el sistema radical de la especie vegetal, en este caso *A. germinans* se caracteriza por la abundancia de raíces alimenticias y neumatóforos más desarrollados respecto a *L. racemosa* en el suelo orgánico con petróleo, lo que pudo incrementar la disponibilidad de CO₂ en la micorrizosfera estimulando el crecimiento del tubo germinal de las esporas y el micelio (Sbrana 2006) y (2) el nivel de tolerancia de sus morfoespecies al PD. Al respecto en estudio se demostró que nueve morfoespecies de HMA asociadas con *L. racemosa* y *A. germinans* se establecen en suelo sin y con PD.

De la Providencia *et al.* (2015) detectaron algunos *Glomeromycota* como *Claroideoglossum*, *Diversispora*, *Rhizophagus*, and *Paraglossum* asociados con *Eleocharis obtusa* and *Panicum capillare* en suelo contaminado con petróleo crudo. Alejandro *et al.*, (2017) reporta que *R. fasciculatus*, *R. intraradices*, *F. aff. geosporum*, *D. eburnean*, *A. gerdemannii*, *R. clarus*, *Diversispora* sp y *C. lamellosum* se asocian a *L. hexandra* en suelo contaminado con hidrocarburos totales del petróleo. También se ha informado que el establecimiento de especies micorrícicas el sistema de raíces de algunas plantas pueden contribuir a la degradación de los hidrocarburos aromáticos prolicíclicos y a reducir su toxicidad (Binet *et al.*, 2000; Joner and Leyval, 2003; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

Cuadro 4. Colonización de hongos micorrícicos arbusculares en raíz terciaria y cuaternaria de *L. racemosa* y *A. germinans*

Mangle/Zona	Colonización de HMA (%)
-------------	-------------------------

	Raíz terciarias				Raíz cuaternarias			
	HF	ARB	VES	ES	HF	ARB	VES	ES
<i>L. racemosa</i>								
Z0	92b	98a	16b	98a	80b	83c	16a	92b
Z1	86b	76b	27a	94b	91a	92b	13b	96a
Z2	87b	91ab	14b	97ab	94a	94b	12b	96a
Z3	86b	89b	21a	95ab	85b	85c	18a	90b
<i>A. germinans</i>								
Z0	100a	99a	2d	99a	98a	98a	4d	98a
Z1	96a	98a	4c	97a	100a	100a	6c	100a
Z2	97a	98a	2b	100a	98a	98a	3d	98a
Z3	100a	100a	5c	100a	100a	99a	5c	99a
<i>L. racemosa</i>								
Sin petróleo	92B	98A	16B	98A	80C	83C	16A	92B
Con petróleo	86B	85B	21A	95B	90B	90B	14B	94B
<i>A. germinans</i>								
Sin petróleo	100A	99A	2D	99A	98A	98A	4C	98A
Con petróleo	97A	99A	4C	99A	99A	99A	4C	99A

HF: Hifa. ARB: Arbusculo. VES: Vesícula. ES: Espora. Medias con diferentes letras minúsculas por columna indican diferencias estadísticas significativas. Medias con diferentes letras mayúsculas por columna indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p < 0.05$, $n=9$). Z: Zona.

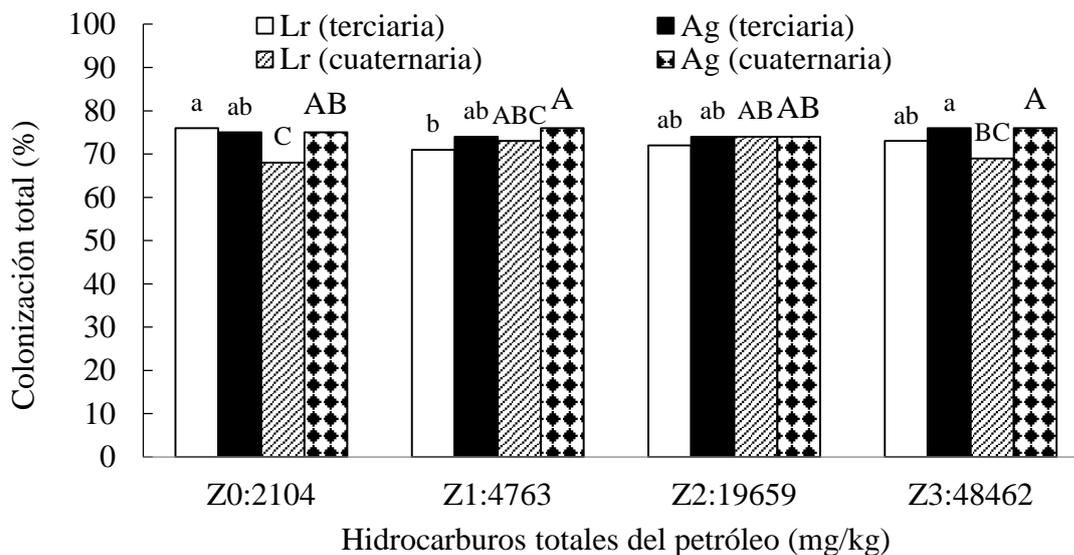


Figura 19. Colonización total de hongos micorrícicos arbusculares en raíz terciaria y cuaternaria de *L. racemosa* y *A. germinans* en suelo sin y con petróleo degradado. Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias estadísticas significativas para raíz terciaria. Medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias estadísticas significativas para raíz cuaternaria (Duncan, $p < 0.05$, $n=9$)

6.4. Descripción de especies de hongos micorrícicos arbusculares en el manglar

Nueve morfoespecies de HMA fueron identificados en suelo de *L. racemosa* y *A. germinans* con y sin PD: (1) *Diversispora aurantium* Blaszk., V. Blanke, C. Renker & F. Buscot, (2)

Acaulospora scrobiculata Trappe, J.B. Morton & Benny, (3) *Funneliformis. mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe, (4) *Funneliformis. Geosporum* (Nicol. & Gerd.) C. Walker, (5) *Claroideoglosum claroideum*, N.C. Schenck & G.S. Sm, (6) *Diversispora* sp. Tul. & C. Tul. Piroz. & Dalpé, (7) *Acaulospora* sp2 Gerd. & Trappe emend. S.M. Berch. J.B. Morton & Benny, (8) *Acaulospora elegans* F. M Rothwell & Trappe J.B. Morton & Benny (Cuadro 5).

6.4.1. *Diversispora aurantium* Blaszk, Tadych y Madej

Las esporas nacen solas en el suelo o algunas veces en las raíces; naranja (5B8) a umber crudo (5F8); globosa a subglobosa; (55) 97 (-120) μm de diámetro; a veces ovoide; 65-105 x 95-140 μm ; con una sola hifa, raramente con dos. Estructura subcelular de las esporas: consiste en una pared con tres capas (sw11-3). Capa 1 evanescente, hialina, (0.5-) 0.9 (-1.5) μm de espesor antes de la desintegración, muy adherida a la capa 2, lisa en esporas juveniles, deteriorando gradualmente y desprendiéndose al final de la formación de la capa 2, siempre ausente en esporas maduras. Capa 2 flexible a semiflexible (plegado cuando se separa de la capa laminada 3), hialina, lisa, (0.7-) 1.1 (-1.5) μm de grosor, desprendiéndose con la edad, raramente presente en esporas maduras. Las capas 1 y 2 son continuas con una hifa subtiende de dos capas de esporas juveniles. Laminado de capa 3, liso, naranja (5B8) a número bruto (5F8), (2.0-) 6.1 (-8.8) μm de espesor en esporas maduras, formado por síntesis gradual de láminas muy delgadas, de aproximadamente 0.5 μm de espesor en la espora y sub enunciada hifa; la primera lámina es altamente flexible y frecuentemente se separa de la capa 2 en esporas trituradas. Las capas de la pared de esporas 1-3 no reaccionan en el reactivo de Melzer. Las capas 1 y 2, cuando no están deterioradas, se hinchan en montantes a base de ácido láctico. La capa 3 parece estar cubierta de ampollas o rodeada de una aureola (Schüßler y Walker, 2010) (Cuadro 5).

6.4.2. *Acaulospora scrobiculata* Trappe

Las esporas nacen solas en el suelo; producido lateralmente en el cuello de un sáculo esporífero; blanco amarillento (3A2) a amarillo pálido (3A3); globosa a subglobosa; (90-) 120 (-135) μm de diámetro. La estructura sub celular de las esporas consiste en una pared

de esporas y dos paredes internas de germinación. Pared de esporas compuesta de tres capas (sw11-3). Capa 1 evanescente, hialina, (1.0-) 1.7 (-2.5) μm de espesor, firmemente adherida a la capa 2, continua con la pared de un cuello de espátula esporífero, con frecuencia completamente caído en esporas maduras. Laminado de capa 2, blanco amarillento (3A2) a amarillo pálido (3A3), (3.2-) 5.5 (-8.8) μm de espesor, adornado con hoyos distribuidos uniformemente; hoyos circulares a elipsoides, 1.2-2.5 μm de diámetro cuando se ven en una vista en planta y 0.5-1.0 μm de profundidad en una vista en sección transversal. Capa 3 flexible, hialina, (0.4-) 0.7 (-0.8) μm de espesor, a veces separándose ligeramente de la capa 2. Las capas 1-3 no reaccionan en el reactivo de Melzer. La pared de germinación 1 consta de dos capas hialinas flexibles (gw111 y 2), firmemente adheridas entre sí en esporas moderadamente trituradas, pero que generalmente se separan en esporas vigorosamente trituradas; cada capa ca. 0,5 μm de espesor. Ninguna de estas capas se tiñe en el reactivo de Melzer. La pared de germinación 2 contiene dos capas (gw211 y 2). Capa 1 flexible, (1.7-) 2.2 (-2.7) μm de espesor, cubierta con un material granular, dispersándose frecuentemente en esporas trituradas. Plástico de capa 2, 0.5-1.2 μm de grosor y 5.5-12.0 μm de grosor en esporas trituradas en agua y PVLG, respectivamente, teñidas de blanco rojizo (8A2) en el reactivo de Melzer (Schüßler y Walker, 2010) (Cuadro 5).

6.4.3. *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson & Gerd).

En esta especie las esporas se encuentran individuales en el suelo, también se pueden encontrar en agregados sueltos o esporocarpos compactos de color amarillo pálido al amarillo dorado, globosos o subglobosa de (80-) 185 (-280) μ de diámetro, puede ser irregular de 80-140 x 195-280 μ con una sola hifa de sostén, estos esporocarpos pueden tener 2 a 5 esporas rodeadas por un Peridio hifal, las esporas están constituidas por tres capas (L1,L2, L3): L1 es una capa mucilaginosa, hialina de (0.5-) 1.1 (-2.0) μ de espesor, esta capa tiene una coloración blanco rojizo con el reactivo de melzer, normalmente es esporas jóvenes, L2 es una capa semiflexible, hialina de (0.8) 1.2 (-1.8) μ de espesor, es suave y gruesa, que raramente se observa en esporas maduras en las que se encuentran fragmentos descompuestos, L3 es una capa laminada de color amarillo pálido a amarillo dorado con un espesor de 73 (2.8-) 4.5 (-7.2) μ de espesor, la hifa de sostén es color amarillo pálido a amarillo dorado, tiene forma de embudo con un (12.5) 25 (-30) μ de ancho en la base que se une a la espora (Blaszkowski, 2015).

6.4.4. *Funneliformis geosporum* (T.H. Nicolson & Gerd)

En esta especie las esporas son de color amarillo marrón (más frecuente) a naranja marrón, son de 3 forma globosa o subglobosa, en algunos casos irregular su tamaño (120-) 176 (240) μ , está compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L1 esta capa es hialina, con $< 1 \mu$ de espesor, no existe reacción al reactivo de Melzer y se degrada formando una capa granular con desprendimientos, L2 es una capa rígida y laminada, color amarillo marrón a naranja marrón con un espesor de 6.14μ , L3 es una capa semirrígida de entre 1 y 2.5μ de espesor, muy adherida a L2 pero diferenciadas por el color de amarillo al naranja marrón, la hifa de sostén tienen forma recurvada de ancho en la unión de la espora de (16-) 24 (-32) (INVAM, 2015).

6.4.5. *Glomus claroideum* N.C. Schenck & G.S. Sm.

Deporte solo en el suelo; amarillo pálido (4A3) a naranja grisáceo (5B5); globosa a sub globosa; (95) 135 (-190) μm de diámetro; a veces ovoide; 95-110 x 110-160 μm ; con una hifa subordinada. La estructura subcelular de las esporas consiste en una pared que contiene cuatro capas (swl1-4) (Cuadro 5). La mayoría de las esporas juveniles tienen una pared con las capas 1 y 2 solamente. Las capas 3 y 4 se forman sucesivamente con la edad. Capa 1 mucilagenosa, hialina, (1.5-) 2.1 (-2.8) μm de espesor, firmemente adherida a la capa 2, manchada de rosa (12A4) a rojo púrpura (14A8) en el reactivo de Melzer, generalmente ausente o muy deteriorado en las esporas maduras. Capa 2 semipermanente, semiflexible, liso, hialino, (2.2-) 3.3 (-3.9) μm de espesor, no reactivo en el reactivo de Melzer. Capa 3 laminado, liso, amarillo pálido (4A3) a naranja grisáceo (5B5), (2.9-) 5.9 (-8.1) μm de espesor, compuesto de subcapas fuertemente adherentes, $< 0.5 \mu\text{m}$ de espesor. Capa 4 flexible, lisa, hialina, (0.4-) 0.5 (-0.6) μm de espesor, que generalmente se separa de la capa 3 en esporas trituradas, pero unida a la superficie interna de la capa laminada de una hifa subyacente. Presenta hifas amarillo pálido (4A3) a naranja grisáceo (5B5); recta a curva; cilíndrico o en forma de embudo; (8.3-) 12.1 (-15.4) μm de ancho en la base de esporas. Pared de hifas que subtiende amarillo pálido (4A3) a naranja grisáceo (5B5); (2.7-) 3.7 (-4.7) μm de espesor en la base de la espora; compuesto de tres capas (shwl1-3) continuas con las capas 1-3 de la pared de esporas; capa 1 rara vez presente en esporas maduras (Schüßler y Walker, 2010).

6.4.6. *Diversispora* sp

Las especies de este género son hongos hipogeos o parcialmente epigeos, que forman micorrizas arbusculares con o sin vesículas, con o sin células hipogeas auxiliares, se forman en sáculos esporígeos (esporas acaulosporoides), también pueden tener una formación en el que hay una base bulbosa en un a hifa esporígeas (espora gigasporoide) o esporas glomoides, se diferencia de otras familias de las diversisporales ya que posee esporas glomoides, y la germinación no está acompañada de un escudo de germinación, también porque sus esporas glomoides tiene una estructura de pared exterior delgada y de estructura laminada y una interior que no reacciona con el reactivo de melzer (Schüßler y Walker, 2010) (Cuadro 5).

6.4.7. *Acaulospora* sp1 y sp2

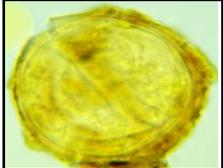
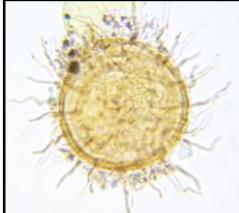
Las esporas de hongos del género *Acaulospora* se desarrollan lateralmente desde el cuello de un sáculo esporífero (Morton, 2000; Morton y Benny 1990). Las esporas son sésiles, es decir, no se forma un pedicelo (una rama corta del cuello espumoso del sáculo). La pared de las esporas más juveniles consiste en una sola capa continua con la pared de una hifa sacácea esporífera. Entonces, una capa laminada se diferencia. En la mayoría de las especies, es de color. Puede ser liso u ornamentado. Probablemente todas las especies de *Acaulospora* diferencian posteriormente una tercera capa de pared de esporas, aunque es invisible o muy difícil de exhibir en algunos taxones, por ejemplo, en *Ac. paulinae* Blaszk.. Una vez que la pared de esporas está completamente diferenciada y las esporas se han expandido, se forman una o dos paredes de germinación internas, discretas y separadas, flexibles a semiflexibles: la primera es de una o dos capas y la segunda de dos o tres capas. En la mayoría de las especies, la capa externa de la pared de germinación más interna está adornada con cuentas (excrecencias granulares). En algunas especies, está adornada con perillas o es lisa. La segunda o tercera capa de esta pared generalmente se tiñe intensamente en el reactivo de Melzer; rara vez se tiñe débilmente o no es reactivo en este reactivo (Schüßler y Walker, 2010) (Cuadro 5).

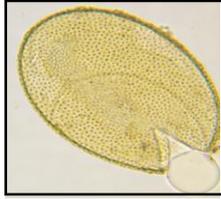
6.4.8. *Acaulospora bireticulata* F.M Rothwell y Trappe

Las esporas de esta especie se forman solo en el suelo; desarrollan lateralmente en el cuello de un sáculo esporífero; sésil; naranja claro (5A5) a marrón amarillento (5E8); globosa a subglobosa; (150-) 190 (-210) µm de diámetro; a veces irregular; 130-180 x 170-250 µm.

La estructura subcelular de las esporas consiste en una pared de esporas y dos paredes internas de germinación. La pared de esporas contiene tres capas (sw11-3) (Cuadro 7). Capa 1, que forma la espota surafce, evanescente, amarillo claro (4A4) a amarillo albaricoque (5B6), (0.7-) 1.1 (-2.0) μm de espesor, estrechamente unido a la pared 2, continua con la pared de un saco esporífero, generalmente completamente caído en esporas maduras. Laminado de capa 2, adornado, naranja claro (5A5) a marrón amarillento (5E8), (6.8-) 7.1 (-7.4) μm de espesor; la ornamentación consiste en espinas hialinas a blancas amarillentas (3A2), (0.7-) 1.0 (-1.7) μm de altura y crestas que forman un retículo cuadrilátero a heptagonal cuando se observa en una vista en planta; crestas hialinas a blanco amarillento (3A2), (2.2-) 3.7 (-4.4) μm de alto, (1.0-) 1.6 (-2.5) μm de ancho en la base, (1.2-) 2.7 (-4.4) μm de ancho en la parte superior, (1.2-) 3.9 (-6.6) μm de alto cuando se ve en una vista transversal. Laminado de capa 3, hialino, (0.8-) 1.2 (-1.6) μm de espesor, generalmente fuertemente adherido a la capa 2. Pared de germinación 1 compuesta de dos capas semirrígidas, hialinas (gw111 y 2). Capa 1 (0.4-) 0.5 (-0.7) μm de espesor, rara vez se separa de la capa 2. Capa 2 (1.0-) 1.4 (-1.5) μm de espesor. La pared de germinación 2 consta de dos capas (gw211 y 2). Capa 1 flexible, hialina, ca. 0,5 μm de espesor, cubierto con pequeños gránulos. Capa 2 (3.4-) 4.5 (-5.9) μm de espesor, firmemente adherida a la capa 2, manchando de rojo pálido (7A3) en el reactivo de Melzer (Schüßler y Walker, 2010) (Cuadro 5).

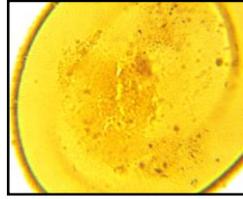
Cuadro 5. Diversidad de morfoespecies en suelo de *L. racemosa* y *A. germinans*

Especie	Descripción morfológica	Especie	Descripción morfológica
	Estrato: E1. Permanente, flexible o semiflexible. E2. Laminado, liso E3. Flexible, lisa. Hifa: intra y extraradicales. Color: amarillo-café Tamaño: 130.14 μm		Estrato: E1. Estrato: ornamentada con proyecciones muy providentes. Color: café-amarillo Tamaño: 59 μm
<i>Diversispora Aurantium</i> Blaszk., V.			



*Acaulospora
scrobiculata* Trappe.
J.B. Morton & Benny

Revisión para identificar los diferentes morfotipos encontrando:
Estrato: Evanéscente, Laminado, Flexible.
Hifa: intraradicales se desarrollan paralelas entre sí.
Color: amarillo- café
Tamaño: 117.17 µm



Acaulospora SP1
Gerd. & Trappe emend.
S.M. Berch. J.B. Morton
& Benny

Estrato:
Ornamentada con
depressiones redondas.
Color: café-naranja
Tamaño: 138.92



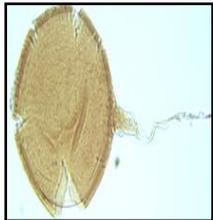
*Funneliformis
mosseae* (Nicol. &
Gerd.) Gerd. &
Trappe.

Estratos:
Mucilagenosa, Semiflexible lisa,
Laminado. Hifa: intra y
extraradicales.
Color: amarillo brillante
Tamaño: 96.48 µm



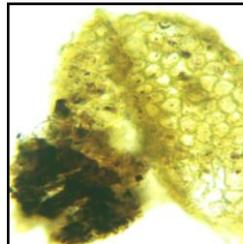
Acaulospora SP2 Gerd. &
Trappe emend. S.M.
Berch. J.B. Morton &
Benny

Estrato:
Ornamentada con
depressiones amorfas.
Color: beige-café
Tamaño: 117.74 µm



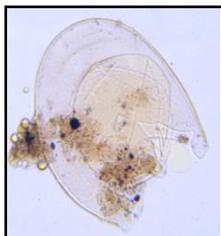
*Funneliformis
geosporum* (Nicol. &
Gerd.) C. Walker

Estratos:
Evanescente, halina, Lamiando,
Semirrígida.
Hifas: intra y extraradicales.
Color: café oscuro
Tamaño: 129.35 µm



*Acaulospora bireticulata o
elegans* F. M Rothwell
& Teappe
J.B. Morton & Benny

Estratos:
Evanescen, Lamina, Laminado. Sin
reacción al Melzer.
Color: amarillo marrón
Tamaño: 189.14 µm



*Claroideoglossum
claroideum* N.C.
Schenck & G.S. Sm.

Estrato:
E1. Mucilagenosa
E2. Semipermanente
E3. Laminado, liso
E4. Flexible, lisa. Hifa: intra y
extraradicales.
Color: transparente-beige
Tamaño: 81.28 µm

6.5. Morfoespecies en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* contaminado con petróleo

En *L. racemosa* se identificaron ocho morfoespecies no encontrándose *Acaulospora bireticulata* o *elegans*, y en *A. germinans* siete morfoespecies se identificó a *Acaulospora bireticulata* o *elegans*, pero no a *Diversispora* sp y *Acaulospora* sp2 (Cuadro 6).

El número promedio de esporas de cada morfoespecie mostro diferencias estadísticas (Duncan $p < 0.05$) entre las diferentes zonas y tipo de mangle (Cuadro 6). El mayor número de esporas *Diversispora aurantium* (54), fueron encontradas en *Lr* en suelo sin PD (Z0), por otro lado *Claroideoglopus claroideum* (31); *Funneliformis geosporum* (27) se observaron en Z2 (19659 mg/kg) y *Acaulospora scrobiculata* (29) en Z3 (48469 mg) de *Ag*. Por otro lado las morfoespecies *F. mosseae*, *Diversispora* sp, *Acaulospora* sp1, *Acaulospora* sp2, *A. bireticulata* o *elegans* estaban en cantidades inhibidas y bajas (0 a 5) en suelo sin y contaminado. Destaca un ejemplar de *Diversispora* sp y *Acaulospora* sp2 en Z2 y Z0 con *Lr* y *A. bireticulata* o *elegans* en Z2 (19659 mg de petróleo) de *Ag*.

La mayor cantidad de esporas totales (90) se localizaron en suelo sin PD (Z0) de *Lr*, y asociadas a *Ag* de suelo con PD (Z1, Z2 y Z3) se contaron 61, 81 y 62 esporas totales, respectivamente.

Cuadro 6. Morfoespecies de HMA en suelo de *L. racemosa* y *A. germinans* según la zona sin y con petróleo degradado

Morfoespecie	<i>Laguncularia racemosa</i>			<i>Avicennia germinans</i>				
	Zona (concentraciones de petróleo mg/kg suelo seco)							
	Z0	Z1	Z2	Z3	Z0	Z1	Z2	Z3
	Número de esporas (20 g de suelo)							
<i>Diversispora aurantium</i>	54a	4de	18c	10d	3de	24b	20b	21b
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	4c	6b	4c	5c	3c	8b	1cd	29a
<i>Funneliformis mosseae</i>	1b	3a	3a	4a	0	1b	0	1b
<i>Funneliformis geosporum</i>	1de	10c	0	4d	18b	5d	27a	1de
<i>Claroideoglopus claroideum</i>	26ba	10c	15b	17b	2d	23ba	31a	10c
<i>Diversispora</i> sp	0	0	1a	0	0	0	0	0
<i>Acaulospora</i> sp1	3a	5a	0	3a	0	0	1ab	0
<i>Acaulospora</i> sp2	1a	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. bireticulata</i> o <i>elegans</i>	0	0	0	0	0	0	1a	0
Total:	90A	38BC	41D	43E	26ED	61C	81B	62C

Letras diferentes por hilera (por especie de morfoespora) indica diferencias estadísticas significativas por efecto de la especie vegetal y el nivel de contaminación con petróleo (Duncan $p < 0.05$, $n=8$)

En nuestro estudio la alta tolerancia al petróleo crudo degradado fueron de las especies *Funneliformis geosporum*, *Claroideoglopus claroideum* y *Acaulospora scrobiculata* asociadas *A. germinans*, el número de esporas de estas especies incrementa las dos primeras en la Z2 y la tercera especie en suelo con mayor petróleo (Z3) comparada con el suelo sin

PD (Z0), seguida de *Diversispora aurantium* que se localizó en suelo con baja y media contaminación. Con esto se puede decir que estas especies se han adaptado a las condiciones de estrés inducidas por hidrocarburos del petróleo degradado en el bosque de manglar. Otras investigaciones han reportado similares resultados con otras morfoespecies; Alejandro-Córdova *et al.* (2017) indica que *Diversispora* sp asociadas a *L. hexandra* muestra adaptación a HTP. Franco-Ramírez *et al.*, (2007) encontró que *Acaulospora laevis*, *A. gerdemannii*, *Glomus ambisporum*, y *Glomus sinuatum*, asociadas a *Echinochloa polystachya* están adaptadas a suelo con 70 g/kg de HTP.

La adaptación de morfoespecies de HMA a condiciones de estrés encontrados en esta investigación puede ser atribuido a diversas razones; Primero la micorrizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* ya que puede propiciar temperatura y luminosidad que incrementa la producción de esporas (Guadamarra y Álvarez, 1999), segundo rasgos morfológicos funcionales específicos de exudados de la raíz y fotosíntesis de la hoja cada tipo de mangle, tercero exudados de la raíz como los flavonoides que provocan una fuerte respuesta quimiotáctica en los HMA y tercero altos contenido de P disponible (Marschner, 2012; He *et al.*, 2019).

CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN

La acumulación de hidrocarburos residuales totales del petróleo fue igual en suelo y rizosfera de *L. racemosa* y *A. germinans* en dos zonas contaminadas, pero fue menor en la rizosfera en la Z3 bajo estudio, que son adyacentes a la infraestructura petrolera.

La presencia de hidrocarburos totales del petróleo en concentraciones hasta 19659 mg/kg estimuló la población de bacterias solubilizadoras de P en suelo de *L. racemosa*, pero en dosis más alta la inhibió hasta un 46%. En rizosfera y suelo de *A. germinans* la población de bacterias solubilizadoras de P fue estimulada con 48462 mg/kg.

La raíz terciaria y cuaternaria de *A. germinans* permitió la simbiosis micorrícica en mayor cantidad que *L. racemosa* en las cuatro zonas bajo estudio. El porcentaje de vesículas en raíz terciaria fue mayor en *L. racemosa* siendo estimuladas por la contaminación en un 23.8%. Las estructuras fúngicas (hifas, arbusculos y esporas intraradicales) en raíz terciaria y cuaternaria de *A. germinans* no fueron afectadas por la contaminación con petróleo degradado.

Ocho y siete morfoespecies de HMA fueron identificadas en *L. racemosa* y *A. germinans*. *Diversispora aurantium* asociada a *L. racemosa* fueron mayores en suelo sin contaminación, y esta especie estuvieron estimulando *A. germinans* en la Z1, Z2 y Z3 respecto a la Z0 plantada con *A. germinans*. La especie *Funneliformis geosporum* y *Claroideoglossum claroideum* fueron estimuladas en un 33 y 93.5% en la Z2 y Z1 asociadas *A. germinans*.

Los resultados sugieren que *A. germinans* es sostenible en zonas contaminadas con hidrocarburos. Es bioestimuladora de la población de bacterias solubilizadoras de P y los hongos micorrícicos arbusculares para la atenuación de la contaminación por hidrocarburos, con alta población de bacterias en suelo con 48462 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo derivados del petróleo crudo degradado. Sin embargo, el suelo de la zona 3 con concentraciones superiores a 48462 mg/kg requiere un pretratamiento físico para retirar el aceite del subsuelo y ponerlo en contacto con el sistema rizosférico de las dos especies de mangle.

CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA

- Alarcón A., Delgadillo-Martínez J., Franco-Ramírez A, Davies F.T.Jr., and Ferrera-Cerrato R. 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Internacional de Contaminación Ambiental*, 22: 39-47.
- Alejandro-Córdova A., Rivera-Cruz M.C., Hernández-Cuevas L.V., Alarcón A., Trujillo-Narcía A., and García-de la Cruz R. 2017. Responses of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Grass *Leersia hexandra* Swartz Exposed to Soil with Crude Oil. *Water Air Soil Pollution*, 228(65): 1-12.
- Atlas R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45: 180-209.
- Alarcón A., Díaz M.G., Cuevas L.V.H., Cote R.E., Ferrera-Cerrato R., Suarez J.J.A., and Rodríguez O.F. 2019. Impact of Crude Oil on Functional Groups of Culturable Bacteria and Colonization of Symbiotic Microorganisms in the *Clitoria-Brachiaria* Rhizosphere Grown in Mesocosms. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2):343-353.
- Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, 491 p.
- Amador L.E.L. 2019. Manglar. *In*: [www. hppt//ecud.cu/manglar](http://www.hppt/ecud.cu/manglar). Consultado 31/01/2020.
- Anónimo 2020. Características de diagnóstico de suelos orgánicos. http://www.edafologia.net/programas_suelos/practelas/taxoil/comun/f68745org.htm . Consultado 10/03/2020.
- Azziz G., Bajsa N., Haghjou T., Taulé C., Valverde Á., Igual, J. M., and Arias A. 2012. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. *Applied Soil Ecology*, 61: 320-326.
- Berg G. and Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68:1-13
- Björklöf K., Salminen J., Sainio P., and Jørgensen K. 2008. Degradation rates of aged petroleum hydrocarbons are likely to be mass transfer dependent in the Weld. *Environmental Geochemistry and Health*, 30: 101-107.

- Behera B.C., Singdevsachan K.S., Mishra R.R., Sethi B.K., Dutta S.K., And Thato H.N. 2016. "Phosphate Solubilising Bacteria from Mangrove Soils of Mahanadi River Delta, Odisha, India" *World Journal of Agricultural Research*, 4 (1):18-23.
- Binet P., Portal J. M., and Leyval C. 2000. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil*, 227: 207-213
- Baltz D.M. and Yáñez-Arancibia A. 2013. Ecosystem-based management of coastal fisheries in the Gulf of Mexico: environmental and anthropogenic impacts and essential hábitat protection. *In: Day J.W and Yáñez Arancibia A (Eds). The Gulf of México Origin, Waters, and Biota Series Volume 4 Ecosystem-Based Management. Harte Institute for Gulf of Mexico Studies. Texas A & M University Press. College Station, TX. pp: 337-370.*
- Barrer S. E.2009. Arbuscular mycorrhizal fungi as alternative to sustentable agriculture. *Bióloga. Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 7 (1):123-132.
- Blaszowski J. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), endogone and complexipes Species deposited in the Departament of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland. <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>. Consultada Enero 2020.
- Botello A. V. 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *En: Botello, A. V., J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México Contaminación Ambiental: Diagnostico y Tendencia. Univ. Autón. de Campeche. Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. pp: 264-265.*
- Brady N. and R. Weil. 2008. *The nature and properties of soils*. 14th ed. Pearson-Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 975 p.
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. Interacción planta-hongos micorrícicos arbusculares. *Rev. Chap. Serie Ciencias Forestales y Ambientales*, 18:409-422.
- Calicdan A.M., Rebanco C., Ancog R., and Baguion N. 2015. Assessment of mangrove flora of Palaui Island Protected Landscape and Seascape (PIPLS) San Vicente, Sta. Ana Cagayan valley, Philippines. *Asian Journal of Conservation Biology*, 4 (1): 15-19

- Camargo-Ricarde S.J., Montaña M.N., De la Rosa-Mera C.J., y Montaña A.A. 2012. Micorriza: Una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, 13 (7): 1-19.
- Castillo-Rodríguez F. M.D., Roldan R. R., Blasco P., Huertas R.M.J., Caballero F.J., Moreno-Vivian D.C., y Luque-Romero M.M. 2005. *Biología Ambiental*. Editorial Tébar. Madrid, España. 616 p.
- Cevallos M.A., Encarnación S., Leija A., Mora Y., and Mora J. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-hydroxybutyrate. *Journal Bacteriology*, 178:1646-1654.
- Chandra B.B., Kumar S.S., Ranjan M.R., Kumar S.B., Kumar D.S., and Nath T.H. 2016. Phosphate Solubilising Bacteria from Mangrove Soils of Mahanadi River Delta, Odisha, India. *World Journal of Agricultural Research*, 4 (1): 18-23
- CONABIO-CONANP. 2009. Mangle blanco (*Laguncularia racemosa*). Fichas de especies mexicanas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México, D.F. pp:1-5.
- CONABIO, 2017. Biodiversidad Mexicana. Ecosistema. Manglares. <https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/manglares>. Consultada 13/03/2020.
- Cowan J.H., Yáñez-Arancibia A., Sánchez-Gil P., and Deegan L.A. 2013. Estuarine nekton. *In*: J.W. Day, B.C. Crump, W.M. Kemp y A. Yáñez-Arancibia (Eds). *Estuarine Ecology*. 2a ed. Wiley-Blackwell, John Wiley and Sons, Inc. Publications. Hoboken, Nueva Jersey. USA. pp: 327-356.
- Curran M. 1985. Gas movements in the roots of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Functional Plant Biology*, 12(2): 97-108.
- Das S., De M., Ganguly D., Maiti T.K., Mukherjee A; Jana T.K., and De T.K. 2012. Depth integrated microbial community and physico-chemical properties in mangrove soil of Sundarban. *Indian Adv. Microbiology*, 2: 234-240.
- de la Providencia E. I., Stefani F. O. P., Labridy M., St- Arnaud M., and Hijri M. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity associated with *Eleocharis obtusa* and *Panicum capillare* growing in an extreme petroleum hydrocarbon-polluted sedimentation basin. *FEMS Microbiology Letters*, 362: 1-9.
- DOF, (Diario Oficial De La Federación). 2006. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría método de prueba. Dirección de normalización. SEMARNAT, México D.F. 23 p.

- DOF, (Diario Oficial De La Federación) 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaria del Medio Ambiente. México D.F. 21 p.
- Dueñas L. H., y Nieto R. C. 2010. Dendrología Tropical: Estudio y caracterización dendrológica de las principales especies forestales de la Amazonia Peruana. Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios. Perú. 244 p.
- Daniels B. A., and Skipper H.D. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. *In*: N. C. Schenck (Ed.). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. The American Phytopathological Society. Publ., st. Paul, MN, USA pp: 29-36
- Daniel T. 2016. *Avicennia (Acanthaceae: Avicennioideae)* in North America and Mesoamerica. Proceedings of the California Academy of Sciences, 63(5) 163-189.
- Delgado J.G. 2006. Asfáltenos composición, agregación y precipitación. Mérida-Venezuela: Laboratorio de Formulación, Interfaces, Reología y procesos. Universidad de los andes. Mérida, Venezuela. 36 p.
- Díaz P.G., Ruiz C.J.A., Medina G.G., Cano, G.M.A., y Serrano A.V. 2006. Estadísticas Climáticas Básicas del Estado de Tabasco (Periodo 1961-2003). No. 12. México: INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Cotaxtla
- Franco-Ramírez A., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Pérez-Moreno J., and 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.
- Fageria N.K. and Stone L.F. 2006. Physical, chemical and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition*, 29(7):1327-1356.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2007. *The World's Mangroves 1980-2005*. V. 153. FAO. Roma. 82p.
- Fernández M. y Rodríguez H. 2005. El papel de la solubilización de fósforo en los biofertilizantes microbianos. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 39(3): 27-34.
- Ferreira T.O., Vidal-Torrado P., Otero X.L., y Macias F. 2007. ¿Los sustratos de los manglares son sedimentos o suelos? Un estudio de caso en el sureste de Brasil. *Catena*, 70:79-91.

- Flores-Mireles A.L., Winans S.C., and Holguin G. 2007. Molecular Characterization of Diazotrophic and Denitrifying Bacteria Associated with Mangrove Roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(22):7308-7321.
- FitzPatrick E.A. 1987. Suelos. Su formación, clasificación y distribución. Editorial Continental S.A. de C.V. México D.F. 430 p.
- Frossard E., Condron L.M., Oberson A., Sinaj S., and Fandeu J.C. 2000. Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal Environmental Quality*, 29:15-23.
- Gao Y., Li Q., Ling W., and Zhu X. 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 185 (2-3): 703-70.
- Goldstein H.A 1995. "Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria," *Biological Agriculture and Horticulture*, 12: 185-93.
- Gyaneshwar P., Naresh G., Kumar L., Parekh J., and Poole P. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245: 83-93.
- Gundlach R. E. 2018. Oil-related mangrove loss east of Bonny River, Nigeria. In C. Makowski and C. Finkl (Eds.), *Threats to Mangrove Forests Hazards, Vulnerability and Management* (pp. 267-321). Springer. Boca Raton, FL, USA.
- Gerdemann J. W. and Nicholson T. H. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of British Mycological Society*, 46: 235-244.
- Guadamarra P. and Álvarez S. 1999. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, México. *Mycorrhiza*. 8:267-270.
- Garcés-Ruiz M., Senés-Guerrero C., Declerck S., and Cranenbrouck S. 2019. Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants growing in a petroleum-polluted soil of the Amazon region of Ecuador. *Microbiology Open*, 8(4): e00703.
- Hernández-Ortega A.H, Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Zavaleta-Mancera H.A., López-Delgado H.A. and 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: S319eS324.

- Herrera S.J.A., Camacho R.A., Pech M.E., Pech J., Ramírez R., y Teutli H.C. 2016. Dinámica del carbono (almacenes y flujos) en manglares de México. *Terra Latinoamericana*, 34: 61-72.
- He F., Chen H., and Tang M. 2019. Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities Are Influenced by Host Tree Species on the Loess Plateau, Northwest China. *Forests* 10 (930): 1-16.
- Holguin G., Guzman M. A., and Bashan Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 101(3): 207-216.
- Holguin G., González-Zamorano G.P., de-Bashan L.E., Mendoza R., Amador E., and Bashan Y. 2006. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development-a case study. *Science of the Total Environment*, 363: 260-274.
- Holmer M. 2003. Mangroves of Southeast Asia. *In*: Black DK and Shimmield BG (Eds). *Biogeochemistry of Marine Systems*. Editorial Blackwell Publishing Ltd. CRC Press, Carlton, Victoria, Australia. pp:1-34
- Hossain M.D. y Nuruddin A.A. 2016. Suelo y manglar: una revisión. *Revista de Ciencia y Tecnología Ambientales*, 9(2):198.
- Hossain M.Z., Aziz C.B., y Saha M.L. 2012. Relaciones entre las propiedades fisicoquímicas del suelo y los recuentos bacterianos viables totales en los manglares de Sunderban, Bangladesh. *Dhaka Univ. Journal Biology Society*, 21:169-175.
- Ibáñez J. J. y Manríquez C. F. J. 2013. Solonchaks (WRB). Suelos Salinos un Universo invisible bajo nuestros pies. Los suelos y la vida. <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2013/12/17/144776>. Consultado 07/02/2020.
- INVAM (International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi). (2019). <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/ambisporaceae/> ambispora/gerdemannii,20/07/2019; <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/claroideoglomeraceae/claroideoglomus/lamellosum/>,07/2019. <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/diversisporaceae/diversispora/eburneum/>, 21/07/2019; <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/funneliformis/geosporum/>,21/07/2019; <http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/funneliformis/mosseae/>,22/

- 07/2019;<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/clarum>, 22/07/2019;
<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/intraradices>,22/07/2019;<http://invam.wvu.edu/the-fungi/classification/glomaceae/rhizophagus/fasciculatum>, 23/07/2019.
- Jian S.Q.; Wu Z.N., Hu C.H.; and Zhang X.L. 2016. Sap flow in response to rainfall pulses for two shrub species in the semiarid Chinese Loess Plateau. *Journal Hydrology Hydromec*, 64: 121-132.
- Joner E. J. and Leyval C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology*, 37: 2371-2375.
- Justin S. H. F. W and Armstrong, W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist*, 106: 465-495.
- Kathiresan K., Saravanakumar K., Anburaj R., Gomathi V., Abirami G., Sahu S.K., and Anandhan S. 2011. Microbial enzyme activity in decomposing leaves of mangroves. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 2 (3) 382-389.
- Kathiresan K. 2012 Importance of Mangrove Ecosystem. *International Journal of Marine Science*, 2: 70-89.
- Kathiresan K. and Selvam M.M. 2006. Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. *Botanica Marina*, 49: 86-88
- Kpombrekou K. and Tabatabai M.A 1994. "Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks", *Soil Science*, 158:442-453.
- Kirk, J.L., Moutoglis P., Klironomos J., Lee H., and Trevors J.T. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and in vitro transformed carrot root cultures. *Plant Soil*, 270:23-30.
- Kertesz A.M. and Frossard E. 2015. Biological Cycling of Inorganic Nutrient and Metals in Soils and Their Role in Soil Biogeochemistry. pp: 471-503 *In: Paul AE (Ed). Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. Elsevier, San Diego CA. USA*
- Krzic M 2004. *Vital soil science.* (UBC,Vancouver).
<https://classification.soilweb.ca/gleysol/>
- Kohki A., Ken-Ichi M and Hideo H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature International Journal of Science*, 435:824-827.

- Kumar V., Behl, R. K., and Narula N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiological research*, 156(1): 87-93.
- Linsingen V.L., Cervi A. C., and Guimarães O. 2009. Sinopse taxonômica da família Combretaceae R. Brown na região sul do Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, 23(3):738-750.
- Lynch J. M., and de Leij F. 2012. Rhizosphere. *In: eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000403.pub2
- Little I.D., Holtzmann K., Gundlach R.E., and Galperin Y. 2018. Sediment Hydrocarbons in Former Mangrove Areas, Southern Ogoniland, Eastern Niger Delta, Nigeria. *In: C. Makowski and W.C. Finkl (Eds). Threats to Mangrove Forests Hazards, Vulnerability, and Management.* (pp. 323-342). Springer, Boca Raton, FL, USA.
- Liao C., Liang X., Lu G., Thai T., Xu W., and Dang Z. 2015. Effect of surfactant amendment to PAHs-contaminated soil for phytoremediation by maize (*Zea mays* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112: 1-6.
- López-Jiménez J.G., Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A, Aceves-Navarro L.A., Sol-Sánchez A., and Sarracino-Martínez O. 2019. *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) y bacterias terrestres asociadas medio siglo después de la contaminación crónica por hidrocarburos. *International Journal Tropical Biology*, 67(6):1194-1209.
- Lovelock C.E.; Andersen K.; and Morton, J.B. 2003. Arbuscular mycorrhizal communities in tropical forests are affected by host tree species and environment. *Oecologia*, 135: 268-279.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., and Clark D.P. 2015. Brock. *Biología de los microorganismos.* (12^a. ed). Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1259 p.
- Maier, M.R. and J.T. Gentry. 2015. Microorganism and Organic Pollutants. *In: Pepper L.I., Gerba P.CH., Gantry JT (Eds).. Environmental Microbiology.* 3er. Ed. Elsevier San Diego CA. USA. 705 p.
- Media Cybernetics. 2001. Image-Pro Plus version 4.5.1.22 for windows. Silver Spring: Media Cybernetics Inc.
- Maletić S., Rončević S., Dalmacija B., Agbaba J., Watson M., Tubić A., and Ugarčina-Perović S. 2012. Characterization of weathered petroleum hydrocarbons during a landfarming bioremediation study. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(11): 1671-1685.

- Marín G.R. 2003. Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 336 p.
- Martin M., Celi L., Bonifacio E., Nardi S., y Barberis E. 2006. Características de la materia orgánica del suelo en un histosol línico del sistema de morain alpino. *Ciencia del suelo*, 171(7): 527-540.
- Marschner P. 2012. Rhizosphere Biology. *In*: Marschner P (Ed). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Third Edition. Elsevier. San Diego CA.USA. pp: 369-388.
- Mitsh W. J. and Gosselink J.G. 2000. *Wetlands*. John Wiley. New York, NY, USA. 920 p.
- Miller S.P. and Sharitz R.R. 2000. Manipulation of flooding and arbuscular mycorrhiza formation influences growth and nutrition of two semi-aquatic grasses. *Functional Ecology*, 14:738-748.
- Moreno A.N.M. y Calderón J.H.M. 2011. Cuantificación de materia orgánica y caracterización físico-química del suelo de manglar en la Bahía Hooker, Isla San Andrés-Colombia. *Actas de la Conferencia Global sobre Calentamiento Global*, 11-14 de julio de 2011, Lisboa, Portugal, pp: 1-7.
- Morton J.B. 2000. International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal (INVAM) West Virginia University. Available at: <http://invam.wvu.edu/>. Consultada, 09/20/2019.
- Morton J.B. y Benny G.L. 1990. Clasificación revisada de hongos micorrícicos arbusculares (*Zygomycetes*): un nuevo orden, Glomales, dos nuevos subórdenes, Glomineae y Gigasporineae, y dos nuevas familias, Acaulosporaceae y Gigasporaceae, con una enmienda de Glomaceae. *Micotaxon*, 37: 471-491
- Manoharachary Ch. and Mukerji G.K. 2006. Rhizosphere Biology-an Overview. *In*: Mukerji, K. G., Manoharachary, C., and Singh, J. (Eds.). *Microbial activity in the rhizosphere*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. pp: 1-12.
- Muratova Y. A., Golubev N. S., Dubrovskaya V. E., Pozdnyakova N. N., Panchenko V. L., Pleshakova V. E., Chernyshova P. M., and Turkovskaya V.O. 2012. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology*, 56: 51-57.
- Nardini C., Di Salvo L., y García I. 2011. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. *Revista Argentina of Microbiology*, 43:311-312.

- Nwoko C.O. 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *Geoscience and Environment Protection*, 2:9-14.
- Nahas E. 1996. Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(6) 567-572.
- Nandy P. and Ghose M. 2001. Photosynthesis and water-use efficiency of some mangroves from Sundarbans, India. *Journal of Plant Biology*, 44(4): 213-219.
- Navarro L., Álvarez, M., Grosso J.L., y Navarro U. 2004. Separación y caracterización de resinas y asfáltenos provenientes del crudo Castilla. Evaluación de su interacción molecular. *CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 2: 53-67.
- Olguín E J., Hernández M.E., y Sánchez-Galván G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Internacional de Contaminación Ambiental*, 23(3): 139-154.
- Gálvez M. y López P.B. 2012. EL petróleo y el gas natural, materias primas para la industria química. En: Ortuño V. A. (ed). *Introducción a la química industrial*. Ed. Reverté S.A. Barcelona, España. pp: 293-340.
- Paredes M.M. y Espinosa V. D. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: una revisión crítica. *Terra Latinoamericana*, 28: 61-70.
- Paterson E., Sim A., Davidson J., and Daniell T. J. 2016. Arbuscular mycorrhizal hyphae promote priming of native soil organic matter mineralization. *Plant Soil*, 408:243-254.
- Patra K. J., Mishra R. R., and Thatoi H. 2020. *Biotechnological. Utilization of Mangrove Resources*. Elsevier, Australia. <https://www.elsevier.com/books/biotechnological-utilization-of-mangrove-resources/patra/978-0-12-819532-1.19> de nobember 2019.
- Pezeshki S. R. 2001. Wetland plant responses to soil flooding. *Environmental and Experimental Botany*, 46(3):299-312.
- Phillips J. M., and Hayman D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1): 158-161.
- Pikovskaya R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with their vital activities of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17:362-370.
- Pinton R., Varanini Z., and Nannipieri P. 2001. The Rhizosphere as a Site of Biochemical Interactions Among Soil Components, Plantas and Microorganisms. *In: Pinton, R., Varanini Z. and Nannipieri P. (Eds). The*

- Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. Marcel Dekker. New York, USA. pp: 1-18.
- Pravecek L. T., Christaman F. R., and Pfaender K. F. 2005. Impact of imposed anaerobic conditions and microbial activity on aqueous-phase solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 286-293
- Purnobasuki H. 2013. Characteristics of Root Caps in Four Root Types of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *American Journal of Plant Sciences*, 4:853-858
- Prince R.C. and Drake E.N. 1999. Transformation and fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. In *Biorremediation of Contaminated Soils*. David M Kral, Marian K. Viney (Eds). *Agronomy A Series of Monographs*. Madison Wisconsin USA. pp. 89-110.
- Rambok E., Gandaseca S., Ahmed O.H., y Majid N.M.A 2010. Comparación de las propiedades químicas del suelo seleccionadas de dos bosques de manglares diferentes en Sarawak. *Journal Environmental Society*, 6: 438-441.
- Radwan S.S, Al-Awadhi H., Sorkhoh N.A., and El-Nemr I.M. 1998. Rhizospheric, microorganismos que utilizan hidrocarburos como contribuyentes potenciales a la fitorremediación para el desierto Kuwaití. *Revista de Microbiología*. 153: 247-251
- Redecker D., Schüßler A., Stockinger H., Stürmer S., Morton J., and Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 23: 515-531.
- Rivera-Cruz M. C., Ferrera-Cerrato R., Volke H. V., Rodríguez V. R., y Fernández L. L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana*, 20(4):423-434.
- Rodríguez-Rodríguez N., Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Almaráz-Suárez J.J., and Salgado-García S. 2016. Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leersia hexandra* in degraded soil. *Water Air Soil Pollution*, 227 (319):1-14.
- Rosatto-Moda L., Mello-Prado R., Castellanos-González L., Reyes-Hernández A., G Caione G., and Silva-Campos NC. 2014. Solubilización de fuentes de fósforo asociadas a un compuesto orgánico enriquecido con biofertilizantes. *Agrociencia*, 48:489-500.
- Rouphael Y., Franken P., Schneider C., Schwarz D., Giovannetti M., and Agnolucci M. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi act as bio-stimulants in horticultural crops. *Science Horticulture*, 196: 91-108.

- Rivera-Cruz M.C y Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia*, 29:369-376.
- Rodríguez L. 2014. Efectúa PEMEX recolección de petróleo intemperizado. *Heraldo*. Periódico en línea recuperado de: <http://elheraldodepozarica.com.mx/estado/papantla/6449-efectua-pemex-recoleccion-de-petroleo-intemperizado.html>.
- Ryszka P., Zarzyka-Ryszka M., Anielska T., Choczyński M., and Turnau K. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi from petroleum-impacted sites in the Polish Carpathians. *International biodeterioration and biodegradation*, 138: 50-56.
- SAS (Statistical Analysis System). 2005. User's guide, version 9.1.3. Cary: SAS Institute, Inc.
- Saravanakumar K., Anburaj R., Gomathi V., and Kathiresan K. 2016. Ecology of soil microbes in a tropical mangrove forest of south east coast of India. *Biocatal Agricola Biotechnology*, 8: 73-85.
- Sbrana C. 2006. Fungal recognition response to host derived signals by arbuscular mycorrhizal fungi. In K. G. Mukerji, C. Manoharachary, and J. Singh (Eds.), *Microbial activity in the rhizosphere*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg Germany. pp: 223-239.
- Sah K D., Sahoo A. K., Gupta S. K., and Banerjee S. K. 1989. Mangrove vegetations of sunderbans and their effect on the physicochemical and nutrient status of the soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B Biological sciences*, 55(2): 125-132.
- Schüßler A. 2015. Glomeromycota Phylogeny. Disponible en: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>. Consultado en Enero de 2020.
- Schüßler A. and C. Walker. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, England. 56 p. www.amfphylogeny.com. Consultado en Enero de 2020.
- SEMARNAT. 2019. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/manglares-mexicanos#multimedia>.
- Sukardjo S. 1994. Suelos en los bosques de manglares de la Reserva Natural de Apar, Tanah Grogot, Kalimantan Oriental, Indonesia. *Stud del sudeste asiático*, 32: 385-398.

- Thanh T.H., and Ngoc D.C. 2017. Isolation and Characterization of Bacteria of Mangrove Rhizosphere in the Mekong Delta, Vietnam. *International Journal of Innovations in Engineering and Technology*, 9(1): 69-79.
- Thibodeau F. R. and Nickerson N. H. 1986. Differential oxidation of mangrove substrate by *Avicennia germinans* and *Rhizophora mangle*. *American Journal of Botany*, 73(4): 512-516.
- Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M., Lagunes-Espinoza L.C., Palma-López D.J., Sánchez-Soto S., y Ramírez V. G. 2014. Uso de fertilizantes orgánicos en la enmendación de un Fluvisol restaurado tras la contaminación con petróleo. *Interciencia*, 39: 266-273.
- Tak H. I., Ahmad F., Babalola O. O., and Inam A. 2012. Growth, photosynthesis and yield of chickpea as influenced by urban wastewater and different levels of phosphorus. *International Journal of Plant Research*, 2: 6-13.
- Twilley R.R. 1988. Coupling of mangroves to productivity of estuarine and coastal waters. *In: Jansson B.O. (Ed). Coastal-Offshore ecosystem interactions. Springer Verlag. Berlin, pp: 155-180.*
- Thatoi H., Chandra B.B., Rashmi R.M., and Kumar S.D. 2013. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Annals of Microbiology*, 63: 1-19.
- Twilley R.R., Snedaker S.C., Yáñez-Arancibia A., and Medina E. 1996. Biodiversity and ecosystem processes in tropical estuaries: perspectives on mangrove ecosystems. *In: H.A. Mooney, J.H. Cushman, E. Medina, O.E. Sala, E.D. Schulze, (Eds). Functional roles of biodiversity: A global perspective. ICSU/UNEP/SCOPE John Willey & Sons Ltd. Nueva York, EUA. pp: 327-370.*
- Ukpong I.E. 1991. El rendimiento y la distribución de especies a lo largo de los gradientes de salinidad del suelo de los manglares en el sureste de Nigeria. *Plant Ecology*, 95:63-70.
- USEPA. 1996. EPA-3540C. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>.
- Vartapetian B. B., Andreeva I. N., Generozova I. P., Polyakova L. I., Maslova I. P., Dolgikh Y. I., and Stepanova A. Y. 2003. Functional electron microscopy in studies of plant response and adaptation to anaerobic stress. *Annals of Botany*, 91(2):155-172.

- Vázquez P., Holguín G., Puente ME, López-Cortés A., y Bashan Y. 2000. Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados con la rizosfera de manglares en una laguna costera semiárida. *Biología y fertilidad de los suelos*, 30 (5-6): 460-468.
- Wang Y., Qiu Q., Yang Z., Hu Z., Fung-Yee T N., and Xin G. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungi in two mangroves in South China. *Plant Soil*, 331:181-191.
- Wanderley C.I.P.M., Maia C.L., and Cavalcanti M.A. 2012. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(3):1165-1173.
- Wauquier J.P. 2004. *El refino del petróleo*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 462 p.
- WRB (World Reference Base for Soil Resources). 2015. *El suelo es un recurso natural, imprescindible para la vida en la Tierra*. Estudios de clasificación de los suelos de Aragón. <http://www.suelosdearagon.com/contenido.php?padre=9%7C31&IDContenido=31>. Consultado, 07/02/2020.
- Zhang J., Cai L., Yuan D., and Chen, M. 2004. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in mangrove superficial sediments of Deep Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6): 479-486.