

Ensayos

Actividad enzimática de un consorcio de cianobacterias en suelo contaminado con petróleo

Resumen

La contaminación por hidrocarburos es un problema ambiental que causa efectos negativos en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo; promueve la degradación y la pérdida de actividad biológica. El objetivo del estudio fue probar el efecto de diferentes concentraciones de petróleo (1000, 500 y 250 μl) en un consorcio de cianobacterias aisladas de suelo agrícola. El experimento consistió en la incubación aeróbica del consorcio por 14 días: a 20 g suelo seco se le adicionaron las diferentes concentraciones del petróleo, y a los días 1, 3, 5, 7 y 14 se tomaron muestras de cada tratamiento para su análisis. El consorcio presentó una disminución en la actividad enzimática (diacetato de fluoresceína) conforme se incrementó la concentración del petróleo (correlación negativa -0.359), sin llegar a inhibirla completamente. Entre el día uno a siete se observó un periodo de adaptación o aclimatación de las cianobacterias, y posterior al día siete, se tuvo la fase exponencial de crecimiento (día 14). Por lo anterior, el consorcio de cianobacterias podría ser evaluado como potencial bioremediador de suelo contaminado por hidrocarburos.

Abstract

Hydrocarbon pollution is an environmental problem that causes negative effects on the physical, chemical and biological properties of the soil; it promotes degradation and loss of biological activity. The aim of this study was to test the effect of different concentrations of crude oil (1000, 500 and 250 μl) in a consortium of cyanobacteria isolated from agricultural soil. The experiment consisted of aerobic incubation of the consortium for 14 days: different oil concentrations were added to 20 g of dry soil. On the 1st, 3rd, 5th, 7th and 14th days, samples of each treatment were taken for analysis. The consortium showed a decrease in enzyme activity (fluorescein diacetate) as the concentration of oil increased (negative correlation -0.359), without completely inhibiting it. From the 1st to the 7th day, a period of adaptation or acclimation of cyanobacteria was observed, and after the 7th day, the exponential growth phase (14th day) was reported. Therefore, the consortium of cyanobacteria could be evaluated as a potential bioremediator of soil contaminated by hydrocarbons.

Résumé

La contamination par les hydrocarbures est un problème environnemental qui cause des effets négatifs sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol, favorisant la dégradation et la perte d'activité biologique. L'objectif de cette étude a été de montrer l'effet de différentes concentrations de pétrole (1000, 500 y 250 μl) dans un conglomérat de cyanobactéries isolées du sol agricole. L'expérimentation a consisté à mettre en incubation aérobie le conglomérat pendant 14 jours. A 20 grammes de sol sec on a ajouté différentes concentrations de pétrole, et aux jours 1, 3, 5, 7 y 14, on a pris des échantillons de chaque traitement pour en faire leur analyse. Le conglomérat a présenté une diminution de l'activité enzymatique (fluorescéine diacétate) à mesure qu'augmentait la concentration de pétrole (corrélation négative -0.359), sans arriver à l'inhiber complètement. Entre le jour 1 et le jour 7 on a observé une période d'adaptation ou d'acclimation des cyanobactéries, et après le jour 7, on a eu la phase exponentielle de croissance (jour 14). Au vu de ces résultats, le conglomérat de cyanobactéries pourrait être considéré comme potentiel bioréparateur de sol contaminé par les hydrocarbures.

Andrés Francisco Martínez Rosales¹
Ma. Nieves Trujillo Tapia²
Eustacio Ramírez Fuentes³

Palabras clave: Bioindicador, Bioremediación, Degradación, Diacetato de fluoresceína.

Introducción

Los contaminantes en el ambiente pueden ser orgánicos e inorgánicos. Cuantitativamente, los contaminantes orgánicos de mayor preocupación son los hidrocarburos (HC) en sus diferentes fracciones (Chikere, Okpokwasili, Chikere, 2011). La contaminación con HC ha ido en aumento debido a la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados (Ferrera-Cerrato, 2006). Lo anterior ha

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

²Instituto de Ecología. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, México.

³Instituto de Recursos. Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, México.

provocado daños al ecosistema, a la calidad del suelo, y a la salud humana (Chen, Liao, 2006). La concentración del HC, el tamaño de la partícula del HC en la mezcla con el suelo, está en estrecha relación con la velocidad de disolución y el área superficial del soluto, son algunos de los factores que se deben considerar cuando se realizan estudios de toxicidad y que van a determinar la velocidad y grado de biodisponibilidad del contaminante, y por lo tanto, el efecto en el crecimiento y la actividad microbiana (Sikkema, De Bont, Poolman 1995).

En un ambiente contaminado se llevan a cabo diversos procesos químicos, físicos y biológicos que promueven la atenuación natural de los contaminantes. Entre los procesos biológicos, la biodegradación es uno de los mecanismos más efectivos, capaz de disipar a los contaminantes y transformarlos en un producto final inocuo (Gianfreda, Rao, 2004). Existen diferentes tipos de microorganismos como bacterias, hongos y cianobacterias que son capaces de eliminar algún tipo de contaminante.

Las cianobacterias son microorganismos procariontes fotosintéticos gram negativo, y muchas de ellas son fijadoras de nitrógeno atmosférico, se encuentran en diversos ecosistemas terrestres y acuáticos. Entre los efectos benéficos que las cianobacterias ofrecen o aportan al suelo y a la interface suelo-agua, se incluye la producción y liberación de exo-polisacáridos, su influencia en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, mejorando su estabilidad y agregación. En zonas tropicales con extracción de petróleo, se ha observado el desarrollo de tapetes de cianobacterias en la superficie de suelo y agua contaminados con petróleo (Chaillan, Gugger, Saliot, Couté, Oudot, 2006); la evidencia que apoye la capacidad de biodegradación de cianobacterias para la eliminación de petróleo crudo es aún limitada. Sin embargo, Kumar, Muralitharan,

Thajuddin, (2009), demostraron la efectividad de una cepa de cianobacteria del género *Phormidium* para degradar naftaleno y antraceno. Debido a la escasa información del efecto tóxico de HC para las cianobacterias de suelo (Megharaj et al., 2000), es importante realizar investigación en este campo.

Existen diferentes métodos para monitorear los daños al suelo provocados por los contaminantes. Entre

ellos está el uso de bioindicadores, además de ser confiables son rápidos y fáciles de determinar, (Rico-Martínez y Martínez-Jaramillo, 2009). La actividad enzimática microbiana ha sido utilizada para medir el impacto de la contaminación en el suelo, y como una herramienta de monitoreo para los procesos de descontaminación de un suelo contaminado (Rao, Scelza, Acevedo, Diez, Gianfreda, 2014). En particular, el uso de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF), es un método utilizado para evaluar los cambios en la actividad microbiana total del suelo (Adam, Duncan 2001), provocados por el efecto de contaminantes orgánicos e inorgánicos, entre ellos los hidrocarburos. El presente estudio tuvo como objetivo, probar el efecto de diferentes concentraciones de petróleo crudo en un consorcio de cianobacterias; para ello, se monitoreó la actividad enzimática microbiana, mediante el uso de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF). Con base en los resultados obtenidos, se pretende posteriormente probar que las cianobacterias son aptas para ser utilizadas en la bioremediación del suelo contaminado con hidrocarburo.

Materiales y métodos

Área de estudio

La muestra de suelo se obtuvo de Barra de la Cruz, a 25 kilómetros de las Bahías de Huatulco en la región costa, en el Municipio de Santiago Astata, en el Estado de Oaxaca, coordenadas 95° 97' 08" norte, 15° 84' 05" oeste. En el sitio existen plantaciones de plátano, limón y papaya, además se encuentra una laguna donde la comunidad se beneficia con cría de peces de agua dulce. El suelo es característico de la región costa y está expuesto a ser impactado por el derrame de crudo proveniente de la refinería ubicada en el Puerto de Salina Cruz, Oaxaca.

Acondicionamiento y caracterización físico-química del suelo

Se tomaron sub-muestras de suelo a una profundidad de 0-20 cm para formar una muestra compuesta de aproximadamente 5 kg, la muestra se colocó en bolsas de plástico previamente etiquetada y se llevaron al laboratorio de Biotecnología de la UMAR. Su acondicionamiento consistió en el secado del suelo a temperatura ambiente, se tamizó a través de una malla de 2 mm; se retiraron las piedras y restos vegetales

de mayor tamaño (Forster, 1995). Posteriormente se le adicionó agua destilada para ajustar al 50% de la capacidad de retención de agua (CRA), se preincubó aeróbicamente por siete días a 25°C en un contenedor de plástico de 20 l, el cual contenía un recipiente con agua destilada para evitar desecación y otro recipiente con NaOH 1M para atrapar el CO₂ producido y evitar condiciones anaeróbicas; la pre-incubación de las muestras de suelo, además de permitir la mineralización de sustrato lábil (Kemmit, Lanyon, Waite, Wen, Addiscott, Bird, O'Donnell, Brooks, 2008), fue evitar interferencias debidas al tamizado, la humedad y contenido de restos vegetales (Sparling, Ross, 1993). La caracterización físico-química del suelo consistió en lo siguiente: tamaño de partícula, éste se calculó por el método del hidrómetro de Bouyoucus en 100g de muestra seca (Gee, Bauder, 1986), el pH se determinó en una relación de suelo-agua de 1:2.5 (p/v) y se utilizó un potenciómetro (Oakton, ph/mv/°C meter); la conductividad eléctrica (CE) se midió directamente con un conductímetro (OaktonCon110) en el extracto del suelo saturado (Richards, 1993). La capacidad de retención de agua (CRA), fue medida en muestras de suelo saturado con agua (Klute, 1986). La cantidad de fósforo disponible se obtuvo de acuerdo al método del ácido ascórbico-molibdato de amonio (Kuo, 1996), y el nitrógeno total se determinó por el método Kjeldal (Bremner, 1996).

Incubación aerobia

En el experimento se utilizó un consorcio de cianobacterias filamentosas (CB) compuesto por: *Fischerella sp.*, *Anabaenasp.*, y *Nostoc sp.*, aisladas de suelo agrícola de Bajos de Coyula (zona costera de Oaxaca) y cultivadas en condiciones de laboratorio (Martínez, 2010; Trujillo, Ramírez, 2010). El petróleo (HC) fue de tipo ligero y se obtuvo de la Refinería "Antonio Dovalí Jaime" de Salina Cruz, Oaxaca. Para la incubación aeróbica, se prepararon 90 muestras de 30 g c/u del suelo previamente acondicionado, y se colocaron en frascos de vidrio (120 ml). Se establecieron 6 tratamientos: T1=Suelo estéril sin CB + 500 µl de HC, T2= Suelo estéril + CB + 500 µl de HC, T3=Suelo sin esterilizar + CB + 1000µl de HC, T4= Suelo sin esterilizar + CB + 500 µl de HC, T5= Suelo sin esterilizar + CB + 250 µl de HC, T6= Suelo sin esterilizar + CB sin HC; como control, el suelo estéril y sin esterilizar,

ambos sin la adición de cianobacterias ni petróleo crudo. Al valor obtenido en cada día y tratamiento se le restó el valor del suelo control. A los tratamientos con cianobacterias, se adicionaron 5 ml del inoculo; y para los tratamientos con petróleo (HC) se utilizaron tres concentraciones: 250, 500 y 1000 µl; equivalente a 223, 447 y 895 ppm de hidrocarburos totales, respectivamente (Chaillan, Gugger, Saliot, Couté, Oudot, 2006). Las muestras previamente preparadas se introdujeron en jarras de vidrio de 945 ml junto con un frasco con agua destilada para evitar la desecación de la muestra de suelo. Todas las jarras se cerraron y almacenaron en obscuridad a 22°C ± 1. En el día 1, 3, 7 y 14, se seleccionaron al azar tres muestras de cada tratamiento, y se les realizó el análisis enzimático utilizando la técnica de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF).

Actividad enzimática (DAF)

La técnica se basa en la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (DAF) por diferentes enzimas (proteasas, lipasas y esterasas) que son abundantes en el suelo. La capacidad de hidrolizar la DAF, parece generalizada, especialmente entre los principales descomponedores del suelo: bacterias y hongos. Generalmente más del 90% del flujo de energía en el suelo pasa a través de los microorganismos descomponedores, por lo tanto, una prueba que mide dicha actividad, proporcionará una buena estimación de la actividad microbiana total en suelo (Adam, Duncan, 2001). El producto de la reacción enzimática con las células activas metabólicamente, es la fluoresceína, la cual se puede observar en un microscopio para fluorescencia, o bien, puede ser medida utilizando un espectrofotómetro a 490 nm (Green, Stott, Diack, 2006).

Para cada día de muestreo (1, 3, 5, 7 y 14) de cada tratamiento y control, se pulverizó en un mortero 2 gr de suelo seco, después de colocarlos en tubos Falcón de 50 ml, adicionarles 20 ml de solución fosfato de sodio (NaH₂PO₄H₂O) 60 mM (tamponado a pH de 7.6), homogeneizarlos en un vortex, y adicionarles 100 µl de la solución DAF, con nueva agitación; las muestras se colocaron en baño María a 30°C durante 3 horas agitando cada 15 minutos de manera manual. Transcurrido el tiempo (3 h), se adicionaron 2 ml de acetona concentrada a cada tubo para detener la reacción enzimática, después de agitarlas vigorosamente y centrifugarlas a

5000 rpm durante 5 minutos, una alícuota de 5 ml del sobrenadante se leyó a una absorbancia 490 nm en un espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos se analizaron con una prueba de varianza de medidas repetidas, y la comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para establecer si existe o no diferencia significativa entre tratamientos. Se utilizó el programa Estadística versión 7 (StatSoft).

Resultados y discusión

Las características físicas, químicas y biológicas de un suelo, son determinantes para el establecimiento y la actividad de las cianobacterias. El suelo de Barra de la Cruz, Oaxaca, presentó un pH moderadamente alcalino (7.7) y una CE media 1.7 mS/m; el contenido de materia orgánica es alto (4.7%), al igual que el fósforo disponible (41.5 mg/kg) de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 0212 (NOM-021-RECNAT-2001). Por otra parte, la capacidad de retención de agua (CRA) fue del 67%, y los porcentajes de arena, arcilla y limo fueron 36, 24 y 40%, respectivamente; con los porcentajes anteriores se identificó la clase textural del suelo: franca (cuadro 1). Los valores reportados de las características químicas y físicas del suelo, se encuentran en el intervalo, en el cual las cianobacterias pueden crecer favorablemente; ambas características son indispensables para el establecimiento de los géneros de cianobacterias empleadas en el estudio (Trujillo, Ramírez, Cervantes, 2015; Thamizh, Sivakumar, 2011).

En los resultados correspondientes a la actividad enzimática, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y día de muestreo ($F_{20,50} = 2.50$,

Cuadro 1. Características físico-químicas del suelo de Barra de la Cruz, Oaxaca.

Característica	Valor
pH* (moderadamente alcalino)	7.7
CRA %	67
CE mS/m	1.7
N Total %	0.069
P disponible mg/kg* (alto)	41.5
Materia orgánica %* (alto)	4.7
Arena %	36
Arcilla %	24
Limo %	40
Clase textural	Franca

* Clasificación de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2001

$p = .0045$). El promedio de la concentración (\pm SD) de la DAF (mg de fluoresceína /g suelo seco /día) en los tratamientos durante los 14 días fue (Fig.1): T1=0.336 (\pm 0.02), T2=0.586 (\pm 0.01), T3=0.630 (\pm 0.01), T4=0.678 (\pm 0.02), T5=0.784 (\pm 0.01) y T6=0.901 (\pm 0.03).

El T1 presentó la actividad enzimática más baja; a pesar de haber sido esterilizado el suelo, la adición de HC promovió la actividad de enzimas extracelulares, las cuales pueden tener una función degradativa en el suelo (Gianfreda, Rao, 2004). Las enzimas extracelulares forman complejos con las arcillas y el humus del suelo (Tabatabai, 1994), de esta manera las enzimas se protegen de la esterilización y posteriormente presentan actividad al entrar en contacto con el HC. El suelo de Barra de la Cruz contiene un alto contenido de materia orgánica (4.7%) y alto porcentaje de arcilla (24%), por lo tanto, se podría esperar la formación de

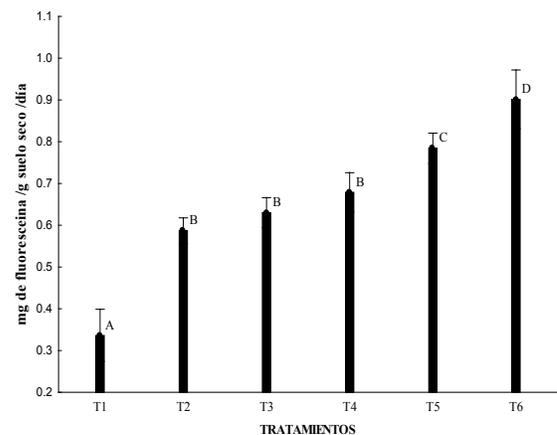


Figura 1. Concentración de Diacetato de Fluoresceína en cada tratamiento: T1=Suelo estéril sin CB + 500 μ l de HC, T2= Suelo estéril + CB + 500 μ l de HC, T3=Suelo sin esterilizar + CB + 1000 μ l de HC, T4= Suelo sin esterilizar + CB + 500 μ l de HC, T5= Suelo sin esterilizar + CB + 250 μ l de HC, T6= Suelo sin esterilizar + CB sin HC. CB (cianobacterias), HC (hidrocarburos). Valor promedio en cada tratamiento y barras del error estándar, n=12; las letras iguales no son significativamente diferentes a $P < 0.05$.

complejos de enzima-adsorbidas a la arcilla, y enzimas unidas con humus.

El T2 tuvo 1.7 veces más concentración de fluoresceína con respecto al T1, esta diferencia es debida a la presencia de las cianobacterias, ya que en ambos tratamientos se utilizó suelo estéril e HC. La concentración de CO₂, producto de la respiración microbiana fue mayor en el T2 (datos no mostrados) con respecto a T1.

Los T2, T3 y T4 fueron estadísticamente iguales, con un promedio de 0.62 mg de fluoresceína /g suelo seco /día. La cantidad de HC adicionado (500 y 1000 μ l) en

los anteriores tratamientos afectó de manera negativa la actividad enzimática microbiana, ya que dicha actividad fue menor con respecto al T5 (250 µl) con la menor concentración del HC.

La concentración de fluoresceína fue menor en 30, 25 y 13%, en el T3, T4 y T5, con respecto al T6 (sin HC). En el T6 se obtuvo la mayor actividad de la hidrólisis de DAF con 0.901 mg de fluoresceína / g suelo seco / día. Con los resultados anteriores, se observó que a mayor concentración del HC, la actividad enzimática disminuye (correlación negativa -0.359). Si bien, la actividad enzimática no fue inhibida en su totalidad con la concentración del HC utilizada, sí existe un efecto negativo en dicha actividad (Fig. 1). Patel, Kumal N., Kumal R., Khan (2013), reportaron una disminución en la actividad enzimática dependiente de la concentración de pireno (6, 3 y 1.5 ppm) en la cianobacteria *Anabaena fertilissima*. Rao, Megharaj, Singleton, McClure, Naidu (2000), encontraron que el crecimiento y el tamaño de la población de las microalgas *Chorococcum sp.* y *Scenedesmus sp.* fue severamente afectado en la concentración media (2.52 mg kg⁻¹) y alta (5.93 mg kg⁻¹) cuando fueron expuestas a los hidrocarburos del petróleo.

El efecto tóxico de los HC y en general de los compuestos lipofílicos, afectan la membrana citoplasmática (doble capa lipídica y proteínas unidas a la membrana citoplasmática) y a los constituyentes de la membrana (porinas, proteínas de unión, proteínas de membrana y lipoproteínas). Como resultado de la acumulación de moléculas lipofílicas, la membrana pierde su integridad y se observa un aumento en la permeabilidad de los protones y los iones; lo cual trae como consecuencia la lisis celular.

La actividad enzimática de DAF ha sido considerada como un índice adecuado de la actividad enzimática global. Con respecto al bioensayo de 14 días, la actividad enzimática (DAF) fue en aumento en todos los tratamientos con respecto al tiempo transcurrido, con excepción del día 7 en donde se observa un ligero decremento (Fig. 2). En el día 14 se registró el valor promedio mayor (0.968 mg de fluoresceína / g suelo seco / día), y fue significativamente diferente (F(15, 40)=2.7285, p=.00575) en comparación a los demás días: 1=0.552, 3=0.641 y 7=0.507mg de fluoresceína /g suelo seco /día, respectivamente.

Existió un aumento de la actividad enzimática conforme pasaron los días en los tratamientos con cianobacterias, ésto significa que las cianobacterias tuvieron un periodo de adaptación o aclimatación al HC, del día 1 al 7. El tiempo de aclimatación varía enormemente, puede ser de horas o hasta meses, y va a depender del tipo de contaminante, su concentración y otras condiciones como la temperatura, pH, aireación (Martin, 1999). Posteriormente del día 7 al 14 se incrementó la actividad enzimática en 1.04 veces, iniciando así la fase exponencial de crecimiento. Margesin R., Walder G., Schnnier F. (2000), reportaron resultados similares, el incremento de la DAF en un suelo contaminado con HC, se observó a la segunda semana de iniciada la cinética. Las cianobacterias tienen un papel importante en el suelo, a través de diversas actividades como la fijación de nitrógeno, la excreción de polisacáridos, entre otras (Whitton, 2000); establecen relaciones con los microorganismos del suelo y juntos posiblemente lleven a cabo la degradación de los HC (Chaillan, Guggier, Saliot, Couté, Oudot, 2006).

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación: los HC (en la concentración utilizada) tuvieron un efecto negativo en las cianobacterias al disminuir su actividad enzimática, sin inhibirla completamente. El incremento de la actividad enzimática microbiana en suelo, fue evidente cuando se utilizaron las cianobacterias.

Finalmente, consideramos potencialmente viable el consorcio de cianobacterias evaluado para su uso en la bioremediación de suelo contaminado con HC (Radha, Pranita, Kaushik, 2008); sin embargo, para comprobarlo, es necesario llevar a cabo bioensayos en diferentes tipos de suelo contaminado, monitorear la degradación del hidrocarburo y hacer un seguimiento de las poblaciones microbianas **T**

Bibliografía

- Adam G., Duncan H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 33. 943-951.
- Bremner J. M. (1996). Nitrogen-Total. In: *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*, D. L.

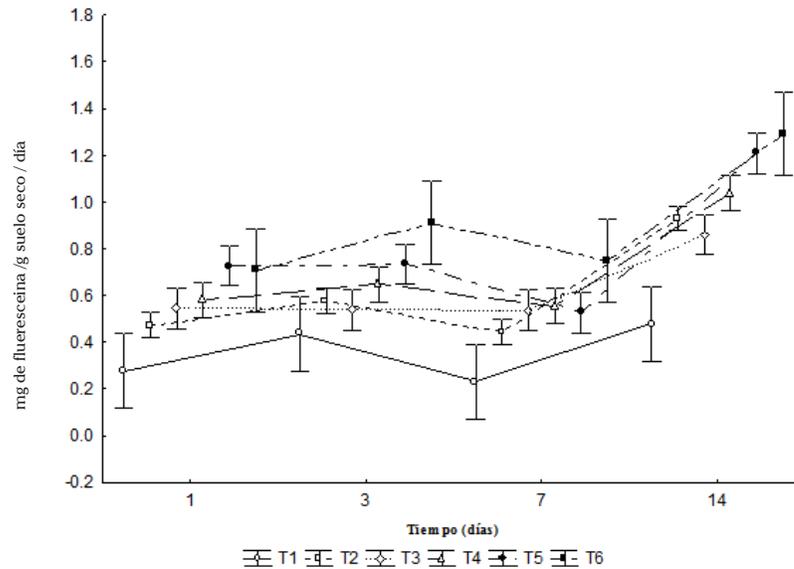


Figura 2. Concentración de fluoresceína, en los diferentes tratamientos durante el bioensayo de 14 días: T1=Suelo estéril sin CB + 500 μ l de HC, T2= Suelo estéril + CB + 500 μ l de HC, T3=Suelo sin esterilizar + CB + 1000 μ l de HC, T4= Suelo sin esterilizar + CB + 500 μ l de HC, T5= Suelo sin esterilizar + CB + 250 μ l de HC, T6= Suelo sin esterilizar + CB sin HC. CB (cianobacterias), HC (hidrocarburos). Valor promedio en cada día y barra del error estándar, n=3.

- Sparks Ed. Soil Science Society of America, Inc. USA, pp. 1085-1122.
- Chaillan F., Gugger M., Saliot A., Couté A., Oudot J. (2006). Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere*. Vol.62. 1574-1582.
- Chen, S., Liao C. (2006). Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Science Total Environmental*. Vol. 366. 112-123.
- Chikere C. B., Okpokwasili G. C., Chikere B. O. (2011). Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *3 Biotech*. Vol. 1. 117-138.
- Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N., Poggi-Varaldo H., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana Microbiología*. Vol. 48(2). 179-187.
- Forster, J. C. (1995). Soil sampling, handling, storage and analysis. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Kassem, A. & P. Nannipieri Eds. Academic Press. San Diego, CA., pp: 49-51.
- Gee G. W., Bauder J. W. (1986). Particle size analysis. In: *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. A. Klute Ed. Soil Science Society of America, Inc. USA. pp. 383-411.
- Gianfreda L., Rao M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol 35. 339-354.
- Green V. S., Stott D. E., Diack M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 38. 693-701.
- Kemmitt S. J., C. V. Lanyon, I. S. Waite, Q. Wen, T. M. Addiscott, N. R. A. Bird, A. G. O'Donnell, Brookes P. C. (2008). Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass- a new perspective. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol.40. 61-73.
- Klute A. (1986). Water retention: Laboratory Methods. In: *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods*, A. Klute Ed. Soil Science Society of America, Inc. USA. pp. 635-662.
- Kumar M. S., G. Muralitharan, Thajuddin N. (2009). Screening of a hypersaline cyanobacterium,

- Phormidium tenue, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnol Lett.* Vol. 31.1863-1866.
- Kuo, S. (1996). Phosphorus, Chapter 32, In: *Methods of soil Analysis Part 3-Chemical Methods*, (Ed. J. M. Bartels). SSSA, Madison, Wisconsin USA.
- Margesin R., Walder G., Schnner F. (2000). The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol.* Vol. 20. 313-333.
- Martinez A. K. (2010). Establecimiento de las condiciones de cultivo de cianobacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de suelos cultivados de papaya. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca.
- Martin A. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, second edition. USA. 453 pp.
- Megharaj M., Singleton I., McClure N. C., Naidu R. (2000). Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* Vol. 38. 439-445.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Diario Oficial de la Federación. México, 31 de diciembre 2002.
- Patel J. G., Kumar N. J. L., Kumar R. N., Khan S. R. (2013). Chronic toxicity of high molecular weight polynuclear aromatic hydrocarbon-pyrene on freshwater cyanobacterium *Anabaena fertilissima* Rao. *International Journal of Environment.* Vol. 2(1). 175-183.
- Radha P., Pranita J., Kaushik B. D. (2008). Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability- promises and challenges. *Indias J. Microbiol.* Vol. (48).89-94.
- Rao M. A., Scelza R., Acevedo F., Diez M. C., Gianfreda L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere.* Vol. (107).145-162.
- Richards L. A. (1993). *Diagnostico y Rehabilitación de Suelos Salinos y Sódicos*. Dpto. de Agricultura de los E. U. Editorial Limusa: México.
- Rico-Martínez, Martínez-Jerónimo. (2009). *Ecotoxicología general*. En: Jaramillo-Juárez, Rincón-Sánchez y Rico-Martínez (Coord.) *Toxicología Ambiental*. Textos Universitarios. U. A. A. y U. de G. México.
- Sikkema J., De Bont J. A. M., Poolman R. (1995). Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* Vol. 52(2). 201-222.
- Sparling G. P., Ross D. J. (1993). Biochemical methods to estimate soil microbial biomass: Current developments and applications. In: *Soil Organic Matter Dynamics and Sustainability of Tropical Agriculture*. Mulongoy K. and Merckx R. (eds.) Wiley-Sayce Co-Publication. Leuven, U. K. pp. 21-37.
- Tabatabaia M. A. (1994). Soil Enzymes. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties*, S. H. Mickelson Ed. Soil Science Society of America, Inc. USA. pp. 775-834.
- Tamizh S. K., Sivakumar K. (2011). Cyanobacterial diversity and related physico-chemical parameters in paddy fields of Cuddalore district, Tamilnadu. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology.* Vol. 1(2). 7-15.
- Trujillo-Tapia Ma. N., Ramírez-Fuentes E. (2010). Producción de maíz en temporal con el uso de algas verde-azules en la costa de Oaxaca. *AgroProduce.* Vol. 27. 21-25.
- Trujillo-Tapia Ma. N., Ramírez-Fuentes E., Cervantes-Hernández P. (2015). Presence and variation of cyanobacteria related to soil physical properties along the coast of Oaxaca, México. *Journal of Tropical Ecology.* In press.
- Whitton B. A. (2000). Soils and rice-fields. Chapter 8. In: Whitton B. A. and Potts M. (eds.). "The ecology of Cyanobacteria". Kluwer Academic Publishers. 233-255.