

Ensayos

Identificación morfológica de hongos y bacterias en lodos de extracción de gas natural y de tratamiento de aguas residuales

Resumen

Los hongos y bacterias realizan funciones importantes en el suelo, su papel como degradadores de materia orgánica está ampliamente documentado. Sin embargo, son pocos los estudios existentes de la microbiota presente en lodos residuales, los cuales se generan en grandes cantidades en diversos procesos industriales. El objetivo de este experimento consistió en la caracterización de hongos y bacterias presentes en tres tipos de lodos residuales, el primero procedente de la extracción de gas natural por fracturación hidráulica y lodos del reactor biológico y lodos deshidratados de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ciudad Victoria, Tamaulipas (PTAR de Ciudad Victoria). Para ello se realizó la técnica de diluciones seriadas y siembra en placa en Agar Nutritivo y Agar Sabouraud Dextrosa, cuantificando las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias y hongos; además de su identificación a nivel género mediante las características microscópicas y macroscópicas. No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad UFC/g s.s. de bacterias ni de hongos presentes en los diferentes tipos de lodos residuales. Se encontraron cinco géneros de hongos: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium* y *Cladosporium*, y cuatro géneros de bacterias: *Bacillus*, *Diplococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

Abstract

Fungi and Bacteria carry out important functions in soil, their role as a degrading agent of organic matter is widely documented. However, studies about microbiota in residual sludge are scarce and more research is needed since sludge is generated in huge amounts in diverse industrial processes. The objective of this experiment focused on the characterization of fungi and bacteria present in three types of residual muds, one of them obtained from the extraction of natural gas from hydraulic fracturation process, another from a biological reactor and another came from dehydrated sludge from the waste-water treatment plant located in Ciudad Victoria, Tamaulipas (Ciudad Victoria's WWTP). Serial dilution technique was used along with cultures of nutrient agar and Sabouraud dextrose agar plates, measuring colony-forming units (CFU) for fungi and bacteria. Gender was also identified with microscopic and macroscopic characteristics. There were no significant differences in CFU/g s.s. in bacteria and Fungi for the different types of sludge. Five genders of Fungi were found: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium* and *Cladosporium*, and four genders of Bacteria: *Bacillus*, *Diplococcus*, *Staphylococcus* and *Micrococcus*.

Résumé

Les champignons et les bactéries réalisent des fonctions importantes dans le sol. Leur rôle de dégradateurs de matière organique est largement documenté. Néanmoins, il existe peu d'études sur les micro-organismes présents dans les boues résiduelles qui sont produites en grande quantité dans les divers processus industriels. L'objectif de cette expérience consiste à caractériser les champignons et les bactéries présents dans trois types de boues résiduelles dont le premier provient de l'extraction de gaz naturel par fracturation hydraulique, de boues du réacteur biologique et de boues déshydratées de la station d'épuration des eaux de Ciudad Victoria dans l'état de Tamaulipas (PTAR de Ciudad Victoria). Pour cela, a été réalisée la technique de dilutions en série et de semence en plaque dans l'Agar Nutritif et l'Agar Sabouraud Dextrose, en mesurant les unités formatrices de colonies (UFC) de bactéries et de champignons ainsi que leur identification du point de vue du genre selon leurs caractéristiques microscopiques et macroscopiques. Il n'a pas été trouvé de différences significatives entre la quantité UFC/g s.s. de bactéries et de champignons présents dans les différents types de boues résiduelles. Cinq genres de champignons ont été recensés : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium* y *Cladosporium* ainsi que quatre genres de bactéries : *Bacillus*, *Diplococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

Aracely Maldonado Torres,
Lucero Mariel López Moreno,
Saida Lucila Lores Cruz,
Eduardo Osorio Hernández.

Facultad de Ingeniería y Ciencias. Posgrado e Investigación. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Tamaulipas, México.

Palabras clave: hidrocarburos, lodos residuales, microorganismos, PTAR.

Introducción

Los microorganismos están presentes en todos los ambientes y desempeñan un papel importante en las interacciones que se llevan a cabo en los diferentes ecosistemas, además juegan un papel importante en las funciones y composición del suelo (Dominatti. Patterson, Mackay, 2010;

Aislabie y Deslippe, 2013), influyen en la formación de su estructura, en la descomposición de la materia orgánica, en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre y también son muy importantes en la represión de enfermedades y promoción del crecimiento de las plantas y cambios de vegetación (Garbeva, Van Ven, Van Elsas, 2004). Su gran diversidad metabólica contribuye al reciclado de nutrientes y éste a las funciones de los ecosistemas del suelo (Aislabie y Deslippe, 2013). Además de ser indicadores de su calidad (Wang, Shi, Lin, Chen, Chen, 2007), contribuyen a brindar soporte físico al facilitar la agregación de partículas (Dominatti et al., 2010) y movilizan nutrientes de minerales insolubles permitiendo que sean utilizados para el crecimiento de las plantas (Beltrán, 2014; Dominatti et al., 2010). Se estima que existen alrededor de 4600 genomas distintos por gramo de suelo, los cuales se encargan de realizar funciones variadas e indispensables (Kent y Triplett, 2002).

Algunas especies de microorganismos son capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono, y de esta manera pueden digerir combustibles y disolventes orgánicos y transformarlos en productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua, o bien adsorberlos a su superficie (Ercoli, Galvéz, Videla, Cursi, Calleja, 1999; Velazco y Volke, 2002) proceso conocido como biorremediación (Aislabie y Deslippe, 2013). Una de las actividades con mayor generación de lodos residuales con alto contenido de hidrocarburos es la extracción de gas natural que ocasiona una gran cantidad de lodos residuales de perforación. Aislabie y Deslippe (2013) mencionan la presencia de bacterias heterótrofas como *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Mycobacterium* presentes en este tipo de sustratos e implicadas en el proceso de degradación de petróleo bajo condiciones aeróbicas, mientras que en sustratos con alto contenido de hidrocarburos se ha encontrado presencia de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* (Nwelang, Henri, George, Antai, 2008; Saadoun, Munir, Khalid, Mo`ayyad, 2008; Allamin, Ijah, Ismail, 2014). De igual forma se ha documentado que la exposición ambiental de microorganismos a metales pesados ha permitido que estos desarrollen un mecanismo de detoxificación que les permite tolerar concentraciones de cobre, mercurio, zinc, plomo, cobalto y cadmio en lodos

(Silver y Phung, 1996; Harrison, Ceri, Tunner, 2007; Aislabie y Deslippe, 2013).

Otro proceso industrial que genera grandes cantidades de lodos residuales es el tratamiento de aguas residuales para lo cual se utilizan algunas especies de microorganismos que descomponen la materia orgánica biodegradable y nutrientes como nitrógeno y fósforo, generando nuevas células y produciendo efluentes tratados que pueden verterse al medio ambiente sin riesgos de contaminación, así como lodos residuales, subproductos líquidos, sólidos o semisólidos formados de partículas no retenidas en dichos tratamientos biológicos de agua (Oropeza, 2006). Los lodos mencionados están constituidos por una gran diversidad de microorganismos, que interactúan entre sí para llevar a cabo la degradación de los contaminantes. Existen varios factores que favorecen el desarrollo de unas u otras especies, como la composición del agua residual, las características de la planta de tratamiento, el clima, la estacionalidad de los vertidos y volúmenes. De todo ello depende la existencia de uno u otro tipo siendo los más comunes bacterias, protozoos, hongos, algas, rotíferos, nematodos y pequeños invertebrados inferiores (Vilaseca, 2001). Los principales géneros de bacterias encontrados en lodos residuales de las plantas de tratamiento de aguas residuales son *Zooglea*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, además de hongos del género *Geotrichium*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, y *Alternaria* (Moeller y Tomasini, 2009). Estos lodos se consideran residuos de proceso y se generan en grandes cantidades a menudo sin tratamiento alguno, mientras que los lodos generados en la extracción de gas natural se clasifican como residuos peligrosos y se envían a confinamiento para su disposición final. Sin embargo, algunos autores indican que es posible adaptar los procesos de biorremediación de suelos para la remediación de lodos producidos en la perforación de pozos de petróleo y gas natural (Castorena-Cortés, Roldán-Castillo, Zapata-Peñasco, Reyes-Ávila, Quej-Aké, Marín-Cruz, Olguín-Lora, 2009). Por tal motivo identificar organismos en común en los diferentes tipos de lodos permitiría emplear en etapas futuras los microorganismos aislados de la PTAR de Ciudad Victoria, como opción en la biorremediación de los lodos residuales de extracción de gas natural.

El objetivo del presente estudio consistió en la identificación microbiológica de hongos y bacterias encontrados en lodos residuales procedentes de la extracción de gas natural (LREGN), el lodo residual deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria, Tamaulipas (LDPTAR) y en el reactor biológico de la PTAR mencionada (LRBPTAR); para identificar los microorganismos comunes en los tres tipos de lodos.

Materiales y métodos

Ubicación del experimento

El experimento se estableció bajo condiciones de laboratorio en las instalaciones de la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, ubicada en el Centro Universitario de Ciudad Victoria, Tamaulipas..

Procedencia de los lodos

Los sustratos analizados corresponden a lodo residual del proceso de extracción de gas natural mediante fractura hidráulica (LREGN), procedente de los pozos de extracción del sitio denominado Santa Anita ubicado en el municipio de Camargo, Tamaulipas; el cual se encuentra contaminado por hidrocarburos de fracción media y pesada en concentraciones de 27 167 mg/Kg y 79 489 mg/Kg respectivamente y a lodos procedentes del reactor biológico (LRBPTAR) y lodo deshidratado (LDPTAR) de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Cd. Victoria, Tamaulipas (PTAR de Ciudad Victoria), ubicada en las coordenadas 23°45´41.28" N y 99°4´42.08" W; la cual funciona con un proceso biológico, a base de lodos activados en su variante de zanjas de oxidación.

Diseño experimental

Se aplicó un experimento completamente al azar con cinco repeticiones para realizar la cuantificación de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC/g s.s.) con cinco repeticiones.

Aislamiento y purificación de microorganismos

El aislamiento de microorganismos se realizó mediante banco de diluciones y enumeración de viables en placa, utilizando Agar Nutritivo (AN) marca Dibico

para cuantificación de bacterias y Agar Sabourad Dextrosa (ASD) marca Difco para hongos. Para ello se pesaron 10 g de cada uno de los sustratos (lodo residual de proceso de extracción de gas natural y lodos de reactor biológico y deshidratado de una planta tratadora de aguas residuales), se colocaron a 105 °C por 24 h en estufa marca CENCO-R (Chicago, U. S. A.) pasadas las cuales se molieron en mortero y se prepararon diluciones iniciando en 10⁻¹ hasta 10⁻⁴. Posteriormente se tomó una alícuota de 100 µL correspondiente a la dilución 10⁻³ para el caso de hongos la cual se colocó en el centro de una caja de Petri con ASD y se dispersó con una varilla de vidrio previamente esterilizada hasta secar la gota en la superficie del medio de cultivo. El procedimiento se repitió para bacterias utilizando la dilución 10⁻⁴ y utilizando el AN. Este procedimiento se realizó por triplicado y se incubaron las muestras a 25 °C en ausencia de luz durante 72 h para bacterias y 96 h para el caso de hongos, al término de los cuales se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{g\ s.s.} = \frac{(NC * 1)}{FD * 1/V} * (P * FH)$$

Donde:

UFC/g s.s.= Unidades formadoras de colonias/g de suelo seco

NC= Número de colonias en una caja

FD= Factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inoculó la caja

V= Volumen inoculado en la caja

P= Peso de muestra húmeda

FH= Factor de corrección de humedad (1 % humedad)

Los hongos y bacterias que se mostraron frecuentemente se purificaron utilizando el método de estriado para las bacterias en placas de AN y transfiriendo micelio por punción en cuatro puntos de una placa de ASD para hongos, este procedimiento se realizó por duplicado con el fin de tener una placa para utilizar en la identificación y otra de cultivo puro de reserva. Los cultivos aislados se incubaron por 72 h y se observaron las características macro y microscópicas de las colonias.

Caracterización macroscópica y microscópica de hongos y bacterias

Para la identificación de los hongos se observaron las características de las cepas tales como tamaño, color, tipo de micelio y forma de las colonias, se realizó la tinción con rojo Congo y lactofenol, además se utilizó el método con cinta adhesiva transparente (cinta Scotch) para observar al microscopio electrónico (Primo Star-Zeiss Thornwood, N.Y., E. U. A.) las diferentes estructuras tales como hifas, micelio, conidios y conidióforos. Se realizó la determinación taxonómica a nivel de género utilizando las claves dicotómicas propuestas por Barnett y Hunter (1972) y comparando las características de crecimiento. Para la identificación de bacterias se observaron las características macroscópicas de las colonias como tamaño, color, tipo de crecimiento y forma. Se realizó la tinción de Gram y se determinaron las características microscópicas de las bacterias como forma y disposición. Además se realizó la prueba de reacción al KOH para confirmación de la tinción de Gram. También se realizó la determinación a nivel de género (Figura 1), para lo cual se realizó una consulta bibliográfica sobre los géneros encontrados comúnmente en los lodos evaluados, para posteriormente comparar las características de las bacterias aisladas con los microorganismos reportados en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales y en sustratos contaminados con hidrocarburos según Realpe, Hernández y Agudelo (2002), de igual forma se consultó la base de datos de la Universidad de Pécs (2011), y el sitio de internet microbiologyinpictures.com (2016) y los manuales

para la identificación de bacterias fitopatógenas de Rodríguez (2001) y de Schaad, Jones, Chun (2001).

Análisis estadístico

En la cuantificación de unidades formadoras de colonias se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) en el programa estadístico SAS, para comparar las UFC/g s.s. de bacterias para los tres tipos de lodos analizados así como las UFC/g s.s. de hongos en los lodos estudiados.

Resultados

Cuantificación de microorganismos presentes en lodos contaminados por hidrocarburos y de la PTAR

En la cuantificación de bacterias y hongos no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) a pesar de que los lodos residuales utilizados tienen diferente origen y se encuentran sometidos a condiciones adversas. En la Tabla 1 se puede apreciar la cuantificación de microorganismos para los diferentes tipos de lodos residuales.

Caracterización e identificación de hongos y bacterias

Con base a las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas se identificaron los géneros de hongos *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Chrysosporium* (Tabla 2). Para los LREGN obtenidos por fracturación hidráulica y contaminados con hidrocarburos se aislaron los géneros *Aspergillus* (Figura 2), dos tipos de cepas del

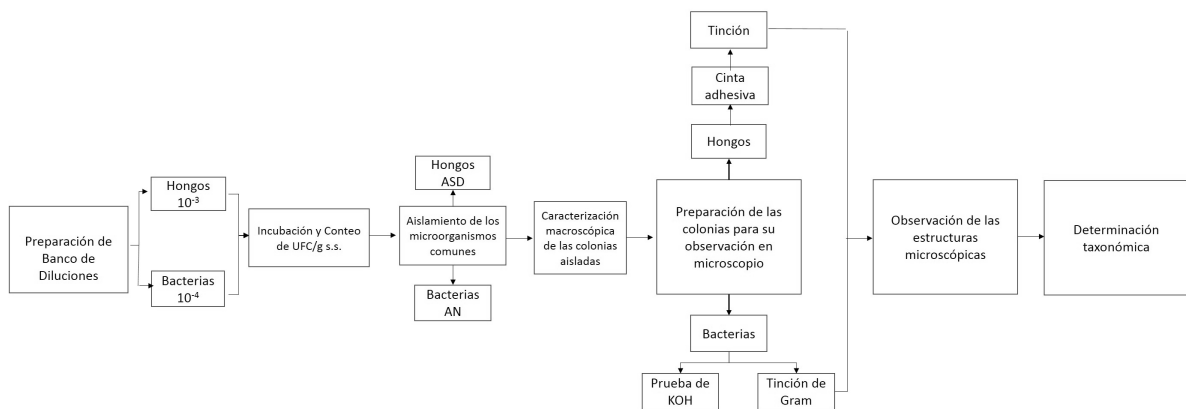


Figura 1. Metodología utilizada para el aislamiento y caracterización microbiológica de los lodos evaluados.

género *Penicillium* con características morfológicas diferentes (Figuras 3 y 4) y *Trichoderma spp.* (Figura 5). En cuanto a los LRBPTAR se encontró presencia del género *Chrysosporium* (Figura 6), mientras que en los LRBPTAR

y LDPTAR de Ciudad Victoria, se aislaron dos cepas diferentes del género *Cladosporium* (Figuras 7 y 8). Además en el LDPTAR de Ciudad Victoria se encontró presencia del género *Penicillium*.

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC/g s.s.) de hongos y bacterias en los diferentes tipos de lodos.

Sustrato/Microorganismos	Hongos (UFC/g s.s.)		Bacterias (UFC/g s.s.)	
Lodo de extracción de gas natural	2 400	A	1 362 000	A
Lodo de reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria	4 000	A	2 316 000	A
Lodo residual de la PTAR de Ciudad Victoria	9 400	A	928 000	A

En cada columna letras similares (A) indican igualdad de acuerdo a la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

Tabla 2. Características morfológicas de los hongos aislados en los diferentes tipos de lodos residuales.

Lodo Residual	Características		Género
	Macroscópicas	Microscópicas	
	Colonia en capas, centro negro y elipses blancas y negras alternadas. Abundante presencia de micelio, con apariencia polvosa.	Hifa septada, conidióforos alineados arriba. Células conidiogénas fialídicas, conidióforos hialinos de pared delgada con forma de árbol. Conidios unicelulares.	<i>Aspergillus</i>
	Colonia esponjosa, verde oscuro con blanco en las orillas, revés con aspecto rugoso, presencia de micelio.	Hifa septada, verde brillante, conidióforos en forma de pincel con fialides ramificadas, células conidiogénas en grupos grandes, conidios pluricelulares agrupados y alineados en la punta de las fialides.	<i>Penicillium</i>
Extracción de Gas Natural	Colonia con crecimiento en capas circulares al inicio verde oscuro, se torna blanco algodonosa, presencia abundante de micelio con aspecto polvoriento. El revés es de color beige amarillento con aspecto rugoso.	Hifa septada, conidióforos con fialides ramificadas que forman un pincel, células conidiogénas en grupos grandes, conidios pluricelulares.	<i>Penicillium</i>
	Colonia algodonosa, blanca se torna verde oscuro a amarillento con micelio blanco irregular, el revés presenta un aspecto amarillo rugoso. Presencia de esporas y exudados color ámbar.	Hifas septadas y alargadas de color verde-azuladas, ramificadas conidióforos hialinos, erectos, ramificados y no verticiliados. Conidios unicelulares de apariencia hialina, circular, lisos aislados o en pequeñas masas en la punta de las fialide.	<i>Trichoderma</i>
Reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria	Las colonias de crecimiento rápido, blancas al inicio y después de exponer a la luz, color crema con textura granular, de micelio blanco.	Conidios piriformes enclavados en bases truncadas, formados intercaladamente, lateralmente o terminalmente, con paredes lisas, conidios de una sola célula.	<i>Chrysosporium</i>
Reactor biológico y lodo deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria	Colonias aterciopeladas, vellosas, con pliegues radiales de color crema, que se oscurecen en tonos verde oliva o gris verdoso.	Hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos.	<i>Cladosporium</i>
Lodo deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria	Colonia verde oscuro, presencia abundante de micelio con aspecto polvoriento. El revés es de color beige amarillento con aspecto rugoso	Hifa septada, conidióforos con fialides ramificadas que forman un pincel, células conidiogénas en grupos grandes, conidios pluricelulares.	<i>Penicillium</i>

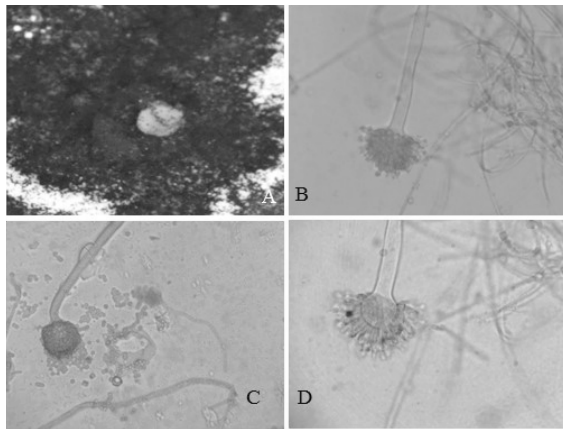


Figura 2. A) Características macroscópicas de *Aspergillus sp.*, aislado en el lodo residual de extracción de gas natural, B) y C) detalles de conidios y conidióforos, hifas septadas, D) características de la métula conteniendo los conidios.

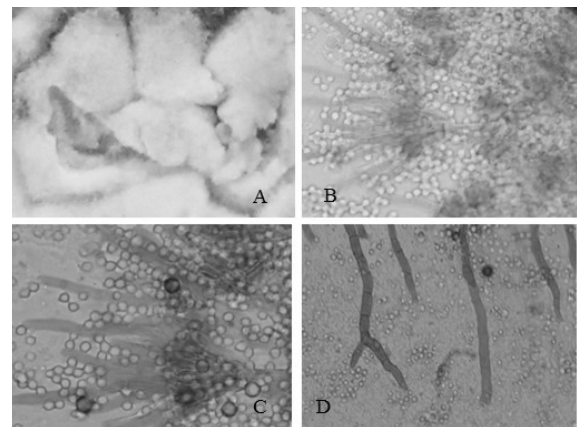


Figura 3. A) Aspecto y coloración del crecimiento de *Penicillium sp.*, encontrado en el lodo de extracción de gas natural contaminado por hidrocarburos, B) y C) características de la métula y conidióforos, D) detalle de los conidios e hifa septada.

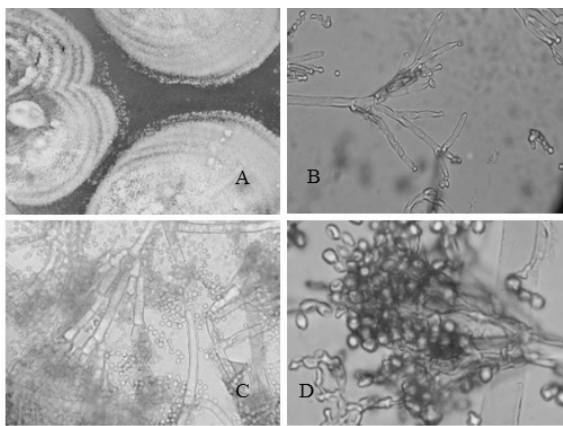


Figura 4. A) Detalles macroscópicos de las colonias de *Penicillium sp.*, B) detalle de las métulas e hifas, C) detalle de los conidióforos, D) conidióforos y conidios.

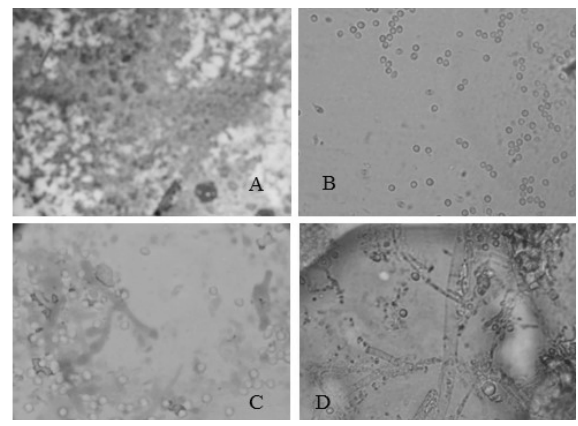


Figura 5. A) Aspecto y coloración del crecimiento de *Trichoderma sp.*, aislado del lodo de extracción de gas natural, B) detalles de los conidios, C) y D) características microscópicas de la conidióforos y detalle de las hifas.

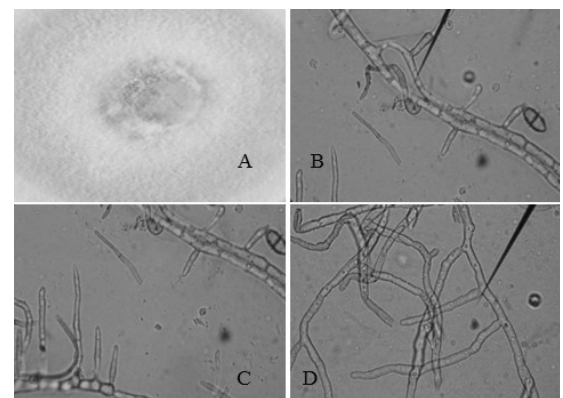


Figura 6. A) Colonia blanca con crema de *Chrysosporium*, aislada del reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria, Tamaulipas, B) Conidios y micelio, C) hifa septada en forma irregular y D) hifas.

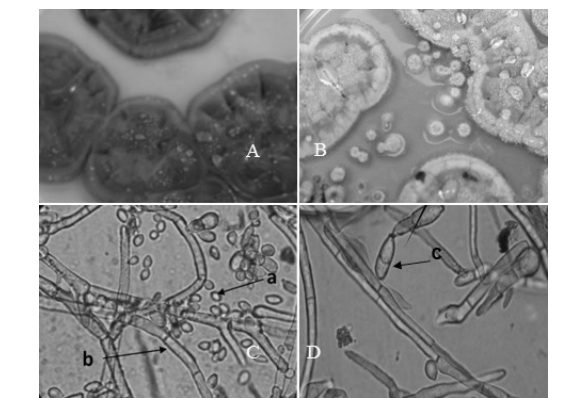


Figura 7. A) Colonias verde oliva de *Cladosporium sp.*, presente en el reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria, B) colonias que se tornaron gris verdoso después de 5 días de incubación, C) a-conidios y b-micelio septados, D) c- conidios con forma de escudo que presenta cicatriz.

En cuanto a las bacterias encontradas en los lodos residuales, en los LREGN se identificaron los géneros *Diplococcus* (Figura 10), *Micrococcus* (Figura 11), *Staphylococcus* (Figura 12) y *Bacillus* (Figura 9), este último género también fue aislado de los LRBPTAR

(Figura 14) y del LDPTAR de Ciudad Victoria (Figura 15), de igual forma el género *Micrococcus* fue aislado del LRBPTAR (Figura 13). Las características micro y macroscópicas de estos microorganismos se pueden observar en la Tabla 3.

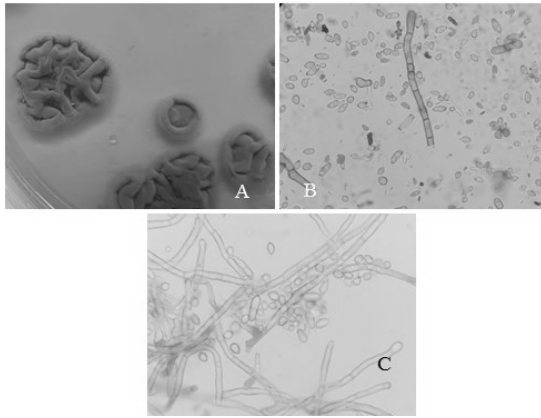


Figura 8. A) Colonias de *Cladosporium sp.*, aisladas en el lodo deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria, B) hifa septada y C) conidios.

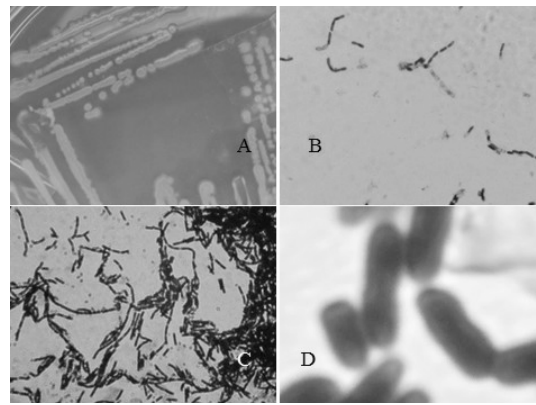


Figura 9. A) Aspecto y crecimiento de las colonias de *Bacillus spp.*, aisladas de lodos residuales de la extracción de gas natural, B) aspecto de las cadenas de bacilos, C) cadenas de bacilos teñidos de Gram y D) ampliación bacilos teñidos.

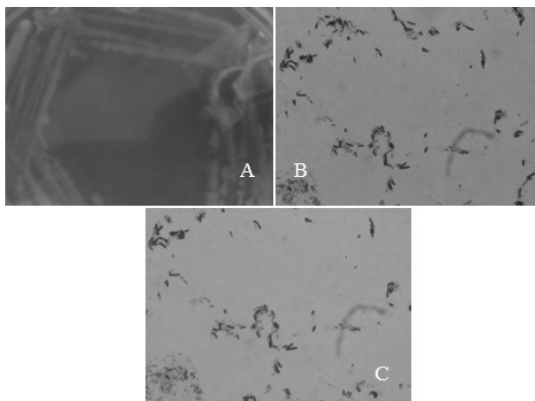


Figura 10. A) Aspecto y crecimiento de las colonias de *Diplococcus sp.*, aisladas del lodo de extracción de gas natural, B) y C) Características microscópicas que muestran los cocos en cadena semejando bacilos.

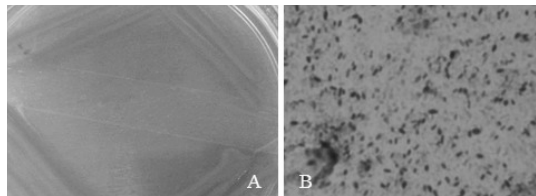


Figura 11. A) Aspecto y crecimiento de las colonias de *Micrococcus* de los lodos de extracción de gas natural aisladas en agar nutritivo, B) características microscópicas de la colonia.

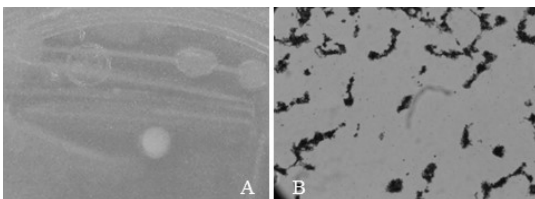


Figura 12. A) Aspecto y crecimiento de las colonias de *Staphylococcus spp.* en agar nutritivo, B) características microscópicas de la colonia.

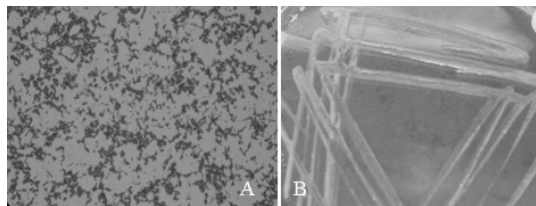


Figura 13. A) Tinción de Gram de *Micrococcus* aislado del reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria, Tamaulipas, B) crecimiento en placa.

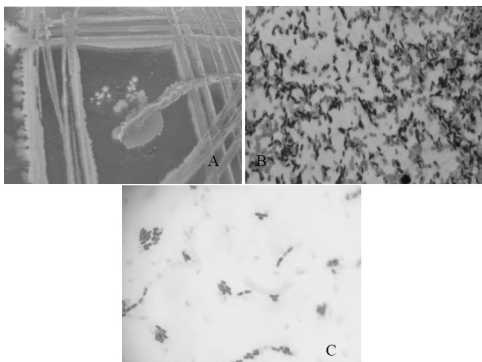


Figura 14. A) Crecimiento rizado de las colonias de *Bacillus* aislado del reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria, B) Tinción de Gram, C) bacilos en cadena.

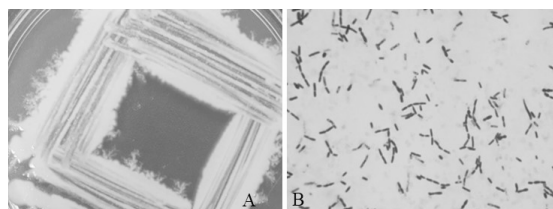


Figura 15. A) Colonias de *Bacillus sp.*, aislados del lodo deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria, Tamaulipas, B) Bacilos grampositivos.

Tabla 3. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias aisladas de los lodos.

Procedencia del lodo	Características		Género
	Macroscópicas	Microscópicas	
Extracción de gas natural	Colonia circular pequeña e irregular, color marfil o blanquizco. Borde ondulado de consistencia lechosa y orilla muy marcada.	Bacilos con bordes lisos y marcados, sueltos o agrupados en cadenas largas, grampositivos, reacción negativa a prueba de KOH.	<i>Bacillus</i>
	Colonia circular con bordes ondulados, aparentan varias capas de diferentes tonalidades de blanco a marfil. Apariencia lechosa e irregular.	Cocos pequeños, aislados o en cadenas de 3, con estructura fuertemente marcada. grampositivos, reacción negativa a prueba de KOH.	<i>Diplococcus</i>
	Colonia circular de bordes regulares, color amarillo mostaza de consistencia cremosa. Crecimiento liso sin ondulaciones.	Cocos en su mayoría aislados, en pares aislados y en cadenas cortas hasta de 4 organismos. grampositivos y negativos para prueba de KOH.	<i>Micrococcus</i>
	Colonias de tamaño mediano y forma circular con bordes lisos, de aspecto gelatinoso y crecimiento ligeramente elevado, de coloración amarillo claro.	Cocos esféricos, de tamaño pequeño, sueltas o en cadenas de 2 a 3, grampositivos, con reacción negativa en la prueba de KOH.	<i>Staphylococcus</i>
Reactor biológico de la PTAR de Ciudad Victoria	Colonias redondas de color amarillo, cremosas.	Células esféricas dispuestas en masas irregulares, racimos o tétradas, grampositivas con reacción negativa a la prueba con KOH.	<i>Micrococcus</i>
Reactor biológico y lodo deshidratado de la PTAR de Ciudad Victoria	Colonias con aspecto mucoso, de bordes ondulados, color beige.	Bacilos grampositivos, con reacción negativa al KOH	<i>Bacillus</i>

Conforme al análisis microscópico de las bacterias aisladas todas las especies aisladas resultaron positivas a la tinción de Gram lo cual se corroboró con la prueba del KOH, de igual forma las especies encontradas en el LREGN dieron positiva a la prueba de la enzima catalasa. Por otra parte el género *Bacillus* se encontró en todos los sustratos analizados, sin embargo las colonias aisladas del LREGN no presentan crecimiento rizado como en los lodos de la PTAR de Ciudad Victoria, por lo cual se pueden considerar especies diferentes.

Discusión


Aun cuando los lodos residuales tienen diferente origen, no se encontró diferencia significativa en la cantidad de UFC/g s.s., esto puede deberse a que los tres tipos contienen una gran cantidad de materia orgánica que provee el carbono necesario para estos microorganismos (Grijalba, 2013). En el LREGN se obtuvieron 1.362×10^6 UFC/g s.s. de bacterias, valor considerablemente mayor a lo reportado en estudios previos de microorganismos en suelo contaminado con petróleo crudo, donde se reportan hasta 8×10^4 UFC/g s.s. en los primeros 10 cm de suelo, dentro de los cuales se identificaron los géneros *Penicillium*,

Aspergillus y *Rhizobium*, en cuanto a bacterias reportan 7×10^2 UFC/g s.s. UFC consideradas degradadoras de hidrocarburo a una profundidad de 20 cm; sin embargo, estos autores no realizaron la caracterización de las bacterias encontradas (Allamin *et al.*, 2014). Por otra parte el género *Penicillium* ha sido reportado por diversos autores como degradador de hidrocarburos (Saadoun *et al.*, 2008; Allamin *et al.*, 2014). Este microorganismo crece en colonias verde oscuro con conidióforos de paredes lisas, con células aisladas o en cadena comportamiento también observado en las especies encontradas en este estudio. De igual forma el género *Aspergillus* esta reportado como degradador de hidrocarburos de distintas fracciones (Allamin *et al.*, 2014) aislados de suelo contaminado con petróleo crudo. Nwelang *et al.*, (2008) mencionan que algunas especies de hongos entre ellos *Aspergillus spp.*, son capaces de iniciar la degradación de n-alcanos por oxidación subterminal. En cuanto a *Trichoderma*, Saadoun *et al.*, (2008) reportan su aislamiento de suelo contaminado por derrame de crudo, y algunos autores reportan que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como fuente de carbono como celulosa, quitina, pectina y almidón (Harman y Kubicek, 1998).

Respecto a los géneros de bacterias encontrados en el lodo de extracción de gas natural *Bacillus* y *Staphylococcus* fueron reportados por Mythili y Karthikeyan (2011) como tolerantes al cromo VI considerado un elemento potencialmente tóxico y cancerígeno, el cual es removido hasta en un 86% y 74% respectivamente de un efluente de curtiembre por estos microorganismos. Dentro de las bacterias utilizadas para la degradación de hidrocarburos se han aislado varios géneros entre los cuales se encuentran *Bacillus* y *Micrococcus*, que se han encontrado en tanques de almacenamiento de petróleo (Toledo, 2013), estos géneros son capaces de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos y crudo, además de que tienen la capacidad de producir polímeros extracelulares que emulsionan diferentes hidrocarburos.

Los géneros de bacterias aislados en los LRBPTAR y LDPTAR, *Bacillus spp.* y *Micrococcus spp.* y los géneros *Cladosporium* y *Penicillium* correspondientes a hongos coinciden con lo encontrado por Moeller y Tomasini (2009) en lodos activados. Tirado, Dayal y Valéro, (2000) mencionan que el lodo residual sirve como medio de cultivo adecuado para el género *Bacillus*.

Conclusiones

No se encontró diferencia en la cantidad de UFC/g s.s. para bacterias ni para hongos entre los lodos residuales evaluados. En los LREGN y el LRBPTAR se identificó en común el género de bacterias *Micrococcus*; además los diferentes lodos residuales estudiados presentan en común el género *Bacillus* siendo este el género predominante. En cuanto a la presencia de hongos para el LREGN y el LDPTAR se identificó el género *Penicillium*, mientras que los lodos de la PTAR de Ciudad Victoria comparten el género *Cladosporium*. Los microorganismos encontrados en los LREGN son tolerantes a altas concentraciones de hidrocarburos por lo que es posible que al encontrarse en sustratos con alto contenido de materia orgánica sean capaces de utilizarlos como fuente de carbono y realizar su degradación. Además debido a que los LREGN comparten géneros de hongos y bacterias con los lodos procedentes de la PTAR de Ciudad Victoria, los cuales son considerados como residuos de proceso, estos últimos podrían ser ocupados a futuro para la bioestimulación de sustratos contaminados por hidrocarburos de fracción media y pesada. 

Agradecimientos

Las autoras agradecen al CONACYT por las becas de Maestría y Doctorado otorgadas.

Bibliografía

- Aislabie, J. and J. R. Deslippe. (2013). Soil microbes and their contribution to soil services. *Soil Microbial Diversity*. In: Dymond, J. R. (Ed). (2013). *Ecosystem services in New Zealand- Conditions and Trends*. Manaaki Whenua Press Lincoln: New Zealand.
- Allamin, I. A., U. J. J. Ijah, H. Y. Ismail and M. A. Isa. (2014). Distribution of hydrocarbon degrading fungi in soil in Kukawa, Borno State, Nigeria. *Merit Research Journal of Environmental Science and Toxicology* Vol. 2(7):135-140.
- Barnett, H. y B. Hunter. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3a edición. Burgess Publishing Company. Lincoln United Kingdom: 241 Pp.
- Beltrán, M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria* Vol. 15 (1):101-113.
- Castorena-Cortés, G., T. Roldán-Castillo, I. Zapata-Peñasco, J. Reyes-Ávila, L. Quej-Aké, J. Marín-Cruz and P. Olguín-Lora. (2009). Microcosm assays and Taguchi experimental design for treatment of soil sludge containing high concentration of hydrocarbons. *Bioresource Technology* 100 (23):5671-5677.
- Dominatti, E., M. Patterson, A. Mackay. (2010). A framework for classifying and quantifying natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics*. Vol. 69 (1): 1858-1868.
- Ercoli, E., J. Galvéz, C. Videla, E. Cursi y C. Calleja. (1999). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. INGEPET. Lima Perú. 99 Pp.
- Espinoza, L. A., M. L. McNeal, J. H. Nguten. (1998). Nutrient and metals trends as a result of biosólidos application to a South Florida citrus grove. *Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings* Vol. 57(1): 39-50.
- Garbeva, P., J. Van Ven and J. Van Elsas. (2004). Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology* Vol. 42 (1):243-270.

- Grijalba, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE* Vol. 4 (1): 1-13.
- Harman, G. E. y C. P. Kubicek. (1998). *Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics*. CRC Press. London United Kingdom. 300 Pp.
- Harrison, J. J., H. Ceri, and R. Tunner. (2007). Multiresistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews in Microbiology* Vol. 5 (1) :928-938.
- Kent, A. D. and E. W. Triplett. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology* Vol. 56: 211-236.
- Microbiologyinpictures.com. [En línea]. Disponible en: <http://www.microbiologyinpictures.com/bacteriainphotos/bacteria-photo-gallery.php#saureus> Fecha de consulta: 20 de mayo de 2016.
- Moeller, G. y A. C. Tomasini O. (2009). Microorganismos y factores ambientales. En Moeller, C., G., L. Sandoval Y., E. Ramírez C., L. Cardoso V., V. E. Escalante E. y A. C. Tomasini O. (Eds). *Operación y Mantenimiento de plantas de tratamientos de lodos activados* (pp. 101-120). México DF. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Mythili, K. y B. Karthikeyan. (2011). Bioremediation of tannery effluent and its impact on seed germination (blackgram and sunflower). *Current Botany* Vol.2 (8):40-45.
- Nwelang, G., F. Henri, E.N. George and S.P. Antai. (2008.) Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing microorganism in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal Biotechnology* Vol. 7 (8):1075-1080.
- Oropeza, G. N. (2006). Lodos residuales: estabilización y manejo. *Caos Conciencia* Vol. 1: 51-58.
- PTE-TTK (Pécsi Tudományegyetem. Természettudományi Kar). (2011). Gram-Negatív Baktériumok. [En línea]. Disponible en: <http://ttk.pte.hu/quercus/Felmondas.htm> Fecha de consulta: 20 de mayo de 2016.
- Realpe, M. E., C. A. Hernández y C. I. Agudelo. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica* Vol. 22 (2):106-109.
- Rodríguez M., M. (2001). Manual para la identificación de Bacterias fitopatógenas. UACH. México. 119 pp.
- Saadoun, I., J. M. Munir, M. H. Khalid, S. Mo'ayyad. (2008). Microbial population of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (The Badia Region). *Brazilian Journal Microbiology* Vol. 39: 453-456.
- Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. (2001). *Laboratory Guides for identification of plant pathogenic bacteria*. 3^o edition. American Phytopatology Society.164 pp.
- Silver, S. y L. T. Phung. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Reviews in Microbiology* Vol. 50: 753-789.
- Tirado, M, R. Dayal T. y J. R. Valéro. (2000). Reúso de lodos residuales como medio de cultivo para la producción de un biocontrol, en Ciencia y conciencia compromiso nacional con el medio ambiente: Memorias Técnicas [En línea]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/tratagua/mexicona/R-0178.pdf> Fecha de consulta: 20 de mayo de 2016.
- Toledo, F. L. (2013). Caracterización de bacterias para la descontaminación de hidrocarburos. Editorial Académica Española. España. 196 pp.
- Velasco, J. A. y T. L. Volke S. (2002). El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica* Vol. 66:41-53.
- Vilaseca, M. (2001). Observación microscópica de fangos activados. *Universidad Politécnica Catalunya. Boletín Intexter* Vol. 119(1): 67-72.
- Wang, Y.P., J. Y. Shi, Q. Lin, X.C. Chen and Y. X. Chen. (2007). Heavy metal availability and impact on activity of soil microorganism along a Cu/Zn contamination gradient. *Journal of Environmental Sciences* Vol. 19 (7):848-853.