



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

“HONGOS ENDÓFITOS CON POTENCIAL USO EN LA
DEGRADACIÓN DE ACEITES RESIDUALES”

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Marleyn Carolina Grijalva Guerra

Anthony Eloy Mendoza Zambrano

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, que existe, que lo he sentido a mi lado en este largo camino, que me permite tener la salud para poder realizar mis actividades cada día y experimentar esta maravillosa vida que ha preparado para mí. Porque el tiempo de Dios es perfecto.

Académicamente, agradezco al Dr. Milton Barcos por confiar en mí, y permitirme trabajar bajo su supervisión. A todos los profesores que hicieron posible esta travesía, enriqueciéndome con parte de su conocimiento para aplicarlo de la mejor manera. Gracias por su confianza.

Agradezco también, a mi ex esposo por su ayuda desinteresada y apoyo con el cuidado de nuestros hijos al momento de cumplir con mis objetivos para crecer profesionalmente. A mis amados hijos por tenerme paciencia y soportar mi ausencia cuando más necesitaban de mí. Gracias de todo corazón a todos quienes de una u otra forma aportaron positivamente en la lucha por alcanzar mis sueños.

DEDICATORIA

Dedico esta investigación principalmente a mis amados hijos Sebastián y Mylee por ser mi fuente de motivación e inspiración para superar cada obstáculo en mi vida y labrar un futuro prometedor.

A mi querida familia, quienes con sus palabras de aliento no me han dejado claudicar en mis momentos difíciles y me han enseñado a ser perseverante para cumplir con mis metas, especialmente a mi abuelita que siempre estuvo pendiente de mi todos estos años, a pesar de la distancia.

A mis compañeros y amigos, quienes me compartieron sus conocimientos, tristezas y alegrías durante este período de formación profesional, en fin, a todas las personas que estuvieron a mi lado apoyándome para culminar con éxito un capítulo más de mi vida.

EVALUADOR DEL PROYECTO

PhD. Milton Barcos

Tutor Proyecto Integrador

M.Sc. Diego Gallardo

Profesor Materia Integradora

M.Sc. Javier Oviedo

Co-Tutor Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde exclusivamente; y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

.....
Marleyn Grijalva

.....
Anthony Mendoza

RESUMEN

La contaminación causada por aceites residuales derivados del petróleo y de la industria alimenticia, ha elevado la concentración de estos contaminantes con graves desequilibrios ambientales. El aprovechamiento de microorganismos durante las últimas décadas permite brindar opciones de Biorremediación con grandes resultados. Este proyecto está enfocado en evaluar la capacidad de tolerancia de aislados fúngicos codificados como: C127, C156, C156L, CHJ, CHM, frente a estos contaminantes. Se realizaron dos ensayos en medio líquido y sólido, cuya fuente de carbono fue solamente aceite vegetal y lubricante, con tiempos de incubación diferentes, debido a la gran toxicidad que presentan los derivados del petróleo. Para determinar el crecimiento de los hongos, se consideró la biomasa y el halo micelial. No todas los aislados resultaron ser viables en los medios usados con aceites residuales, por lo que se debe considerar otros parámetros como la temperatura, la humedad relativa y el pH para un mejor desarrollo de los aislados fúngicos. No obstante, C156L y C127 usaron diferentes mecanismos para crecer en estas condiciones de manera eficaz, ya sea encostrando, encapsulando o asimilando el contaminante. Por lo tanto, estos microorganismos son los principales candidatos para uso potencial en plantas de tratamiento de agua residual o biorreactores.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
EVALUADOR DEL PROYECTO.....	iv
DECLARACIÓN EXPRESA	v
RESUMEN.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ABREVIATURA.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 1	4
INFORMACIÓN GENERAL	4
1.1 Importancia del agua.....	4
1.2 Tratamiento de aguas residuales.....	4
1.3 Contaminación del agua por aceites residuales.....	4
1.4 Aceites vegetales	5
1.5 Aceites minerales.....	5
1.6 Biorremediación	6
1.7 Hongos endófitos	6
1.8 Rutas biológicas para remoción de aceites.....	6
CAPÍTULO 2.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1 Hongos endófitos	8
2.2 Resiembra de aislados.....	8

2.3	Ensayo con medio mineral lubricante/aceite	9
2.3.1	Preparación de materiales	9
2.3.2	Elaboración del medio.....	9
2.3.3	Inoculación.....	10
2.3.4	Fase de incubación.....	10
2.3.5	Obtención de la biomasa micelial	10
2.4	Ensayo con medio agar lubricante/aceite	11
2.4.1	Preparación de materiales	11
2.4.2	Pre-selección del medio.....	11
2.4.3	Elaboración del medio.....	11
2.4.4	Inoculación.....	13
2.4.5	Fase de incubación.....	13
2.5	Análisis estadístico.....	13
	CAPÍTULO 3.....	14
	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	14
3.1	Efectividad fúngica	14
3.1.1	Ensayo con medio mineral lubricante	14
3.1.2	Ensayo con medio mineral aceite	15
3.1.3	Ensayo con medio agar lubricante.....	16
3.1.4	Ensayo con medio agar aceite.....	18
3.2	Tolerancia para crecer en medios contaminados	19
3.3	Obtención de fuentes de energía.....	19
3.4	Aplicabilidad.....	20
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	22
	BIBLIOGRAFÍA.....	23
	ANEXOS.....	26

ABREVIATURA

CE.- Contaminantes Emergentes

PCBs.- Policlorobifenilos

PTAR.- Plantas de tratamiento para aguas residuales

DQO.- Demanda Química de Oxígeno

PH.- Potencial de Hidrógeno

IR.- Infrarroja

HPLC.- Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

C127.- Aislado 127

C156.- Aislado 156

C156L.- Aislado 156 Lubricante

CHJ.- Aislado Hongo de Jaime

CHM.- Aislado Hongo de Mikel

PDA.- Papa Dextrosa Agar

FAO.- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

OMS.- Organización Mundial de la Salud.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes y valores para la preparación del medio PDA.....	8
Tabla 2. Componentes y valores para la preparación del medio mineral líquido.	9
Tabla 3. Componentes y valores para la preparación del agar aceite.	11
Tabla 4. Componentes y valores para la preparación del agar mineral inorgánico.	12
Tabla 5. Componentes y valores para la preparación del agar aceite de oliva.	12
Tabla 6. Diferencias en el crecimiento entre aislados al final del experimento.	19

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Biomasa del micelio en medio mineral líquido, ensayo-lubricante a los 15 y 30 días de incubación.....	15
Gráfico 2. Biomasa del micelio en medio mineral líquido, ensayo-aceite a los 10 y 15 días de incubación.	16
Gráfico 3. Curvas de crecimiento del halo en medio agar mineral inorgánico, ensayo-lubricante, a los 10 días de incubación.	17
Gráfico 4. Curvas de crecimiento del halo en medio agar aceite de oliva, ensayo-aceite, a los 10 días de incubación.	18
Gráfico 5. Etapas para el tratamiento de aguas residuales.	21

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Pasos para obtener la biomasa del micelio	26
Anexo 2. Biomasa micelial en medio mineral líquido, ensayo-lubricante a los 15 y 30 días de incubación.	27
Anexo 3. Biomasa micelial en medio mineral líquido, ensayo-aceite a los 10 y 15 días de incubación.	29
Anexo 4. ANOVA de biomasa micelial con lubricante.....	31
Anexo 5. ANOVA de biomasa micelial con aceites.....	32
Anexo 6. Promedios de biomasa micelial	33
Anexo 7. Crecimiento micelial ensayo medio agar/lubricante.....	34
Anexo 8. Crecimiento micelial ensayo medio agar/aceite.....	36

INTRODUCCIÓN

La contaminación es un proceso que surge por el entrada y/o exceso de elementos, compuestos, sustancias, mezclas, o energías que alteran el equilibrio entre la interacción de los componentes físicos, químicos y biológicos que conforman a un ecosistema (Knepper et al., 1999).

El término contaminantes emergentes (CE) es utilizado para definir compuestos tóxicos de naturaleza química, que no están controlados en algunos países (Kuster, 2009), por tanto, pasan inadvertidos. Los aceites residuales son CE, considerados como focos contaminantes del agua (Becerril Bravo, 2009), debido a su insolubilidad y difícil degradación (Shuval, Lampert, & Fattal, 1997); los aceites crean una fina capa que dificulta la penetración de luz y el intercambio gaseoso, lo que provoca la muerte de animales y plantas por eliminación de agentes contaminantes tóxicos (dioxinas, metales pesados, compuestos clorados, entre otros) (Hanisah, Kumar, & Tajul, 2013) (María, Patricia, Francisco, & Carlos, 2015).

Las plantas de tratamiento de agua no cuentan con un sistema eficiente para remover o degradar aceites residuales (Dougherty, Swarzenski, Dinicola, & Reinhard, 2010), por consiguiente, las sustancias lipídicas pueden taponar tuberías por adhesión a las paredes internas, reducir la efectividad de su diámetro y provocar obstrucciones, lo que da como resultado la disminución del tiempo de uso de la planta y el aumento de los costos de tratamiento del agua (Samsing et al., 2011).

Los CE son un gran problema para el medio ambiente, pero la Biorremediación se convierte en una solución viable, ya que usa mecanismos fisicoquímicos o metabólicos como estrategias enzimáticas que degradan y transforman estos contaminantes en sustancias inofensivas, o a su vez, los acumula sin efectos

secundarios para la salud ecosistémica (Kirk & Cullen, 1998). Por ende, los procesos biológicos poseen la característica de brindar gran eficacia a bajo costo (Kirk & Cullen, 1998).

Dentro de este contexto los hongos endófitos juegan un rol importante, pues, han demostrado una capacidad natural para la remoción de contaminantes xenobióticos (Siciliano et al., 2001). Esto promueve la identificación de hongos endófitos que posean la capacidad de mitigar la contaminación por presencia de estos aceites para el tratamiento de efluentes industriales.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar aislados de hongos endófitos con potencial uso en degradación de aceites residuales.

Objetivos específicos

- Experimentar con cinco tipos de aislados, para determinar su eficacia en la degradación de aceites residuales.
- Determinar el crecimiento de los hongos endófitos en presencia de dichos contaminantes.
- Valorar la respuesta de crecimiento de los aislados en ambientes contaminados con aceites residuales.

CAPÍTULO 1

INFORMACIÓN GENERAL

1.1 Importancia del agua

El agua es un requerimiento vital, necesario para el funcionamiento de nuestros procesos biológicos. En un contexto social, su presencia marca un bienestar económico, debido a su extracción en cantidades considerables provenientes de cuerpos de agua dulce con el fin de lograr abarcar las necesidades de zonas urbanas y rurales, que van de la mano con el crecimiento poblacional actual (Kulkarni & Dalai, 2006).

1.2 Tratamiento de aguas residuales

El agua cambia dependiendo del uso que se le dé. En promedio, países del primer mundo han logrado tratar el 70% de sus aguas residuales (Jafari, 2010). En países de mediano ingreso, este promedio desciende en un 28-38% y en países del tercer mundo, sólo el 8% de aguas residuales llega a alguna planta de tratamiento. No obstante, en el planeta, un alto porcentaje de aguas residuales no recibe ningún tratamiento, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2017).

1.3 Contaminación del agua por aceites residuales

Las sustancias hidrófobas de menor densidad como el aceite, al ingresar en un cuerpo de agua, se difunden hacia la superficie y alteran el intercambio de gases, gran parte de la radiación solar es desviada y absorbida, lo que disminuye la actividad fotosintética y aumenta la demanda química de oxígeno (DQO) (Jafari, 2010). Sumado a esto, se liberan subproductos dañinos como acrilamidas, hidrocarburos, dioxinas, metales pesados, entre otros (Jafari, 2010). Las grasas y aceites por su naturaleza oleosa forman una capa que se adhiere sobre la membrana celular de las bacterias para obstruir o inhibir el contacto con la materia orgánica y dificultar la

alimentación de los microorganismos (Marjadi & Dharaiya, 2010). Esto provoca graves problemas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), porque forman en la superficie de los sedimentadores una capa que atrae fracciones de materia orgánica, y los lodos activados reducen de manera significativa su rendimiento (Samsing et al., 2011).

1.4 Aceites vegetales

El aceite vegetal es utilizado de manera muy frecuente en hogares, restaurantes, instituciones, entre otros. Durante su utilización convencional como el proceso de frituras, el aceite vegetal sufre cambios y alteraciones en su composición química, razón por la cual, es necesario su desecho. La OMS (Organización Mundial de la Salud) manifiesta que el aceite vegetal saturado, desprende compuestos cancerígenos: furanos, bifenilos, policlorados y dioxinas (DL-PCBs), y que un litro de aceite residual puede contaminar la ingesta de agua de un individuo por más de un año y medio (Samsing et al., 2011).

Los compuestos desprendidos de aceites saturados son liposolubles, degradan con menor eficacia y se gasifican lentamente. Por lo tanto, los tejidos grasos vegetales y animales son los más vulnerables a una mayor acumulación de estas sustancias (Van den Berg et al., 2006). La concentración puede incrementar en toda la cadena trófica y generar acumulación de contaminantes persistentes, proceso conocido como biomagnificación (Kulkarni & Dalai, 2006).

1.5 Aceites minerales

El aceite mineral saturado está formado por varias sustancias tóxicas tales como metales pesados, (plomo, cadmio, mercurio, arsénico, cromo), benceno, hidrocarburos aromáticos, clorados y policlorobifenilos (PCBs), compuestos con varios efectos cancerígenos (OMS, 2016). Bajo condiciones no controladas, el aceite quemado, emite más plomo al aire que cualquier industria, según la EPA (Agencia de Protección Ambiental).

1.6 Biorremediación

En la actualidad se desarrollan técnicas biológicas con el propósito de remediar zonas contaminadas (Kulkarni & Dalai, 2006). La Biorremediación remueve contaminantes mediante distintas reacciones bioquímicas procedentes de poblaciones o consorcios de microorganismos (Benavides López de Mesa; MSc et al., 2006).

1.7 Hongos endófitos

Los hongos endófitos en sus primeros estudios fueron descritos como aquellos organismos de poca agresividad que se alojan dentro de los tejidos vegetales (Morales, 2005) y pueden vivir en ambientes cálidos y templados de plantas acuáticas y terrestres. Aunque logran alojarse dentro de la planta sin causar daño, bajo estrés también producen ataques oportunistas. (Giménez, 2009).

Una de las estrategias de supervivencia de estos hongos endófitos es el uso de enzimas como la lacasa y lignino peroxidasa dependientes del manganeso, que han logrado degradar estructuras muy complejas producidas por la naturaleza, entre ellas la lignina que es un compuesto muy parecido a la estructura de los aceites residuales (Performance, 2006).

1.8 Rutas biológicas para remoción de aceites

En la década de los 80s se demostró la capacidad de ciertos microorganismos fúngicos para remover de manera eficiente contaminantes. En la bioadsorción, la superficie de la célula capta iones que actúan como contaminantes mediante una interacción físico-química con ligandos propios de la superficie celular. En la bioacumulación los contaminantes ingresan a la célula por mecanismos metabólicos.

En la biodegradación no engloba el grado de alteración de una molécula, no produce energía en el transcurso, lo más adecuado es describir este proceso con el término de biotransformación, ya que un microorganismo modifica un compuesto, pero no lo mineraliza. Las sustancias obtenidas de esta reacción pueden llegar a ser más dañinas que las sustancias originales.

En la Mineralización los compuestos se convierten en CO_2 , H_2O y sustancias inorgánicas, debido a la acción de los microorganismos que originan a estas últimas en gran abundancia a causa del continuo reciclaje de átomos de carbono. Durante la mineralización los intermediarios metabólicos se convierten en compuestos orgánicos antes de ser consumidos como combustible durante la oxidación (Reyes Toriz, Cerino Córdova, & Suárez Herrera, 2006).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Hongos endófitos

Los aislados de diferentes organismos vegetales provienen del Bosque Seco de la costa ecuatoriana, específicamente halladas en las plantas de cacao y banano. Dichos hongos, pertenecen al banco de microorganismos del CIBE-ESPOL, los mismos que están conservados en agua y glicerina a -81°F o solamente con agua autoclavada para su reactivación.

2.2 Resiembra de aislados

Se utilizó un sacabocado de 5mm de diámetro para la inoculación de los hongos en medio PDA detallado en la Tabla 1, a partir de hongos ya cultivados en el CIBE. Los hongos se incubaron hasta que ocuparon toda la superficie del agar. Durante este tiempo se observó la viabilidad del aislado.

Tabla 1. Componentes y valores para la preparación del medio PDA.

Medio PDA	
Descripción	Concentración
Extracto de papa	4g
Dextrosa	20g
Agar	15g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: (Cañedo & Ames, 2004)

Se autoclavó el medio a 121°C durante 15 min, posteriormente se dispensó en cajas Petri. Previo al cultivo se realizó la esterilización de cajas y materiales en la cámara de flujo con luz UV durante 15 minutos. Finalmente, se tomó las porciones de agar con micelio de la parte externa del halo, debido a la presencia de esporas e hifas jóvenes.

2.3 Ensayo con medio mineral lubricante/aceite

2.3.1 Preparación de materiales

Para trabajar con medio mineral líquido se usaron 72 frascos previamente limpios y autoclavados, 36 para el bioensayo con aceite vegetal y 36 frascos para el bioensayo con lubricante, 6 frascos se usaron como control para cada ensayo, respectivamente.

2.3.2 Elaboración del medio

Se preparó 4000 mL de medio mineral líquido, detallado en la Tabla 2. En donde 2000 mL se usó para frascos con lubricante y 2000 mL, para frascos con aceite. Se bajó el pH a 6,2 con ácido sulfúrico (H_2SO_4). Posterior, se colocó 45 mL de dicho medio en cada frasco y 5 mL de lubricante y aceite vegetal, respectivamente. Se procedió a autoclavar todos los frascos por 15 minutos a 121°C y 20 libras de presión, para evitar cualquier tipo de contaminación.

Tabla 2. Componentes y valores para la preparación del medio mineral líquido.

Medio Mineral	
Descripción	Concentración
K ₂ HPO ₄	4,5 g
MgSO ₄ + 7h ₂ O	0,1 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
FeCl ₃	0,002 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Agua destilada	1000 mL

2.3.3 Inoculación

Previamente, los frascos y los materiales de cultivo son colocados en la cámara de flujo con luz UV durante 15 min. Para el cultivo de hongos, con la ayuda de un sacabocado se extrae de cada aislado sembrado en cajas Petri, una pequeña porción de agar colonizado y se inocula cada frasco con 6 réplicas por hongo. En los frascos con aceite se depositó un disco de 10 mm de diámetro y en los frascos con lubricante se depositó un círculo de 5 mm. Después de la siembra, todos los frascos se colocaron en un shaker a 110 rpm.

2.3.4 Fase de incubación

El bioensayo con aceite vegetal tuvo una fase de experimentación de 15 días. Su período de evaluación cualitativa y cuantitativa fue a los 10 días y al final del ensayo. Mientras que el período de evaluación del bioensayo con lubricante consumido fue de 30 días y su evaluación cualitativa y cuantitativa fue en dos etapas, a los 15 días y al final de la experimentación.

2.3.5 Obtención de la biomasa micelial

A los 10 días del bioensayo con aceite vegetal y a los 15, del bioensayo con lubricante consumido, se tomó la mitad de las réplicas de cada aislado, con el fin de determinar la biomasa total. Al finalizar el ensayo, se filtró el contenido de cada frasco independientemente con papel filtro Whatman. El hongo retenido fue colocado en una caja Petri y posterior pesado en la balanza analítica, dando como resultado el peso fresco del micelio. Luego dichos hongos fueron secados en la estufa por 17 horas a 67°C para evaporar todos los residuos, para obtener del peso seco micelial, finalmente el peso micelial del hongo fue obtenido con esta fórmula:

$$P_f - P_s = M$$

Donde P_f es el peso fresco, P_s es el peso seco y M es el peso del micelio, metodología aplicada según Solís Mardones & Loretto Pilar.

2.4 Ensayo con medio agar lubricante/aceite

2.4.1 Preparación de materiales

Para trabajar con medio agar, se usaron 30 cajas Petri esterilizadas, 15 para el bioensayo con aceite vegetal y 15 cajas para el bioensayo con lubricante. No se usaron cajas Petri como control.

2.4.2 Pre-selección del medio

Con la finalidad de usar el medio más apropiado para el crecimiento de hongos en agar aceite, se aplicaron varios tipos de metodologías para emulsionar el aceite con el medio agar. La metodología de la Tabla 3, no resultó adecuada debido a que impidió la solidificación del medio. Finalmente se escogieron las metodologías para medio lubricante y medio aceite de oliva, descritas en las tablas 4 y 5. Los valores de las tablas fueron calculados de acuerdo con las necesidades de la experimentación.

Tabla 3. Componentes y valores para la preparación del agar aceite.

Agar Aceite	
Descripción	Concentración
NaNO ₃	2,00 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄	0,50 g
FeSO ₄	0,01 g
K ₂ HPO ₄	1,00 g
Agar agar	12 g
Aceite	3%
Agua destilada	1000 mL

Fuente: (Koneman et al, 1975)

2.4.3 Elaboración del medio

En un matraz se preparó 300 mL de agar mineral inorgánico, el pH fue regulado a 6,2 con ácido sulfúrico (H₂SO₄). En otro matraz se preparó 300 mL de agar aceite de oliva,

cuyo pH fue 6,2. Se procedió a autoclavar los matraces para evitar cualquier tipo de contaminación. Posterior, se dispensó dicho medio en las cajas Petri.

Tabla 4. Componentes y valores para la preparación del agar mineral inorgánico.

Agar Mineral Inorgánico	
Descripción	Concentración
K ₂ HPO ₄	1,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/L
NaCl	0,5 g/L
MgSO ₄	0,5 g/L
FeSO ₄	0,002 g/L
CaCl ₂	0,002 g/L
Agua destilada	1000 mL
Lubricante	5 mL

Fuente: (Echeverri, Manjarrez, & Cabrera, 2010)

Tabla 5. Componentes y valores para la preparación del agar aceite de oliva.

Agar aceite de oliva	
Descripción	Concentración
Agar Sabouraud Dextrosa	6,5 g
Tween 20	2 mL
Aceite de Oliva	2 mL
Vitamina A	10 gotas
Agua destilada	100 mL

Fuente: (Robles, 2010)

2.4.4 Inoculación

Previamente, para evitar cualquier tipo de contaminación, las cajas Petri y los materiales de cultivo son colocados en la cámara de flujo con luz UV durante 15 min. Para el cultivo, con un sacabocado de 5 mm de diámetro, se extrajo de las cajas Petri con los aislados, una pequeña porción de agar y se colocó en la parte central de la caja Petri con el medio preparado, acción realizada por triplicado con cada uno de los 5 aislados utilizados, tanto para el agar mineral inorgánico como para el agar aceite de oliva.

2.4.5 Fase de incubación

Las placas sembradas fueron incubadas a 28 °C durante 10 días, como describe la metodología usada según (Martínez et al., 2015), período en el que se realizó la respectiva evaluación del crecimiento micelial, mediante la medición del diámetro del halo fúngico cada 24 horas, y el registro fotográfico realizado durante la experimentación.

2.5 Análisis estadístico

Los datos fueron tabulados en Microsoft Excel y procesados en el programa Infostat, donde se llevó a cabo el análisis de los datos. Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$). Además, se aplicó la prueba de Tukey, empleando el mismo nivel de significancia del 5%.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Efectividad fúngica

El éxito de la Biorremediación depende de los aislados correctos, de las condiciones ambientales y de la naturaleza del contaminante emergente.

En las últimas décadas diferentes estudios se han centrado en aprovechar las interacciones de los hongos endófitos con los contaminantes dando como resultado, soluciones muy viables para contrarrestar sus efectos nocivos, con poca o ninguna repercusión. Los resultados de este trabajo revelan la capacidad de estos organismos para adaptarse a contaminantes, sobre todo en lugares donde sus concentraciones exceden el rango de tolerancia y causan grandes problemas de salud.

Denotando la metodología empleada en este estudio, muchos autores consideran como una estrategia óptima, elegir aislados a través de repetitivas evaluaciones de crecimiento poblacional en siembras ricas en hidrocarburos, para evaluar la supervivencia y adaptación del hongo frente a sus altas concentraciones. Por otro lado, en la metodología para microorganismos lipolíticos, se usa agar Dextrosa Sabouraud, un medio de peptona para favorecer el crecimiento de hongos primarios (dermatofitos y dimórficos) (Echeverri et al., 2010).

3.1.1 Ensayo con medio mineral lubricante

El gráfico 1 representa la biomasa micelial de los aislados utilizados. A los 15 días se evaluó la mitad de las réplicas de cada aislado, donde las barras grises indican que el peso de CHM, C127, C156 y C156L tienen valores aproximados. Mientras que las barras negras muestran los datos obtenidos a los 30 días. La biomasa de C156L en la segunda etapa del ensayo aumentó significativamente, lo que refleja una adaptación muy rápida incluso en condiciones desfavorables, en comparación a los aislados C127, C156 y CHM que limitaron su aumento de biomasa. En cuanto a CHJ,

es el aislado con menos peso micelial a lo largo del experimento, lo que demuestra que no es apta para este tipo de contaminante. Por lo tanto, no todos los aislados resultaron ser viables en este medio con lubricante, lo que queda demostrado con los bajos valores obtenidos de peso micelial, en comparación al aceite vegetal. Todos estos cambios en la biomasa de los aislados durante la experimentación son observados en el anexo 1.

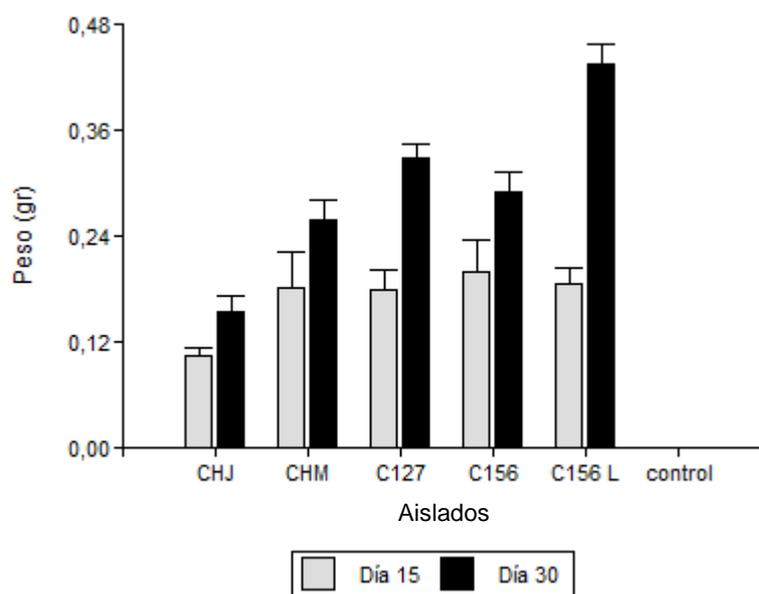


Gráfico 1. Biomasa del micelio en medio mineral líquido, ensayo-lubricante a los 15 y 30 días de incubación.

3.1.2 Ensayo con medio mineral aceite

En el gráfico 2 se muestran las diferencias en la biomasa micelial entre los aislados evaluados, a los 10 días observando un peso similar entre C156L y CHJ. A los 15 días de incubación las barras negras indican la eficacia de C156L para crecer y adaptarse en este medio contaminado, ya que en sólo 5 días su biomasa se duplicó. En cuanto a C127 y C156 obtuvieron los valores más bajos de biomasa micelial al final del experimento, seguidos por CHM y CHJ. Todos estos cambios durante la experimentación son observados en el anexo 3.

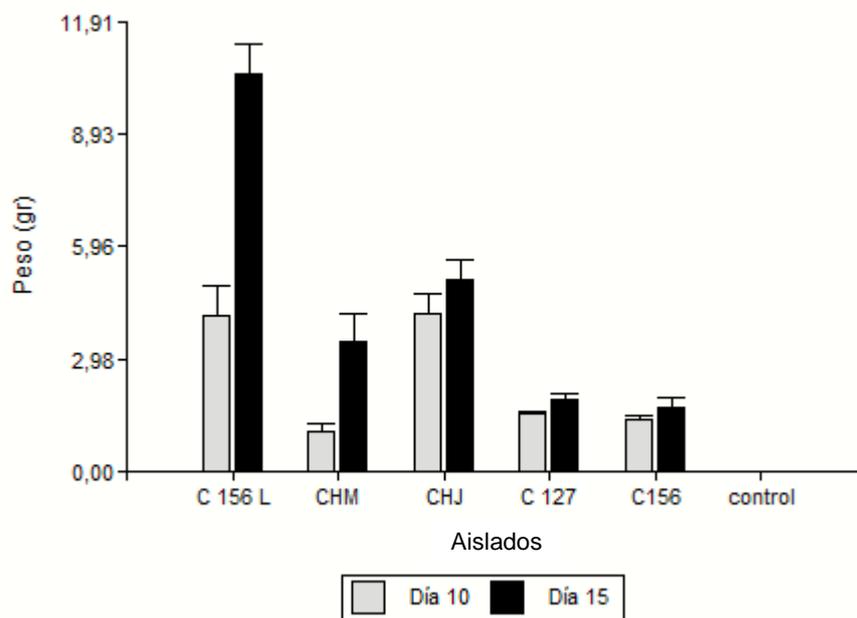


Gráfico 2. Biomasa del micelio en medio mineral líquido, ensayo-aceite a los 10 y 15 días de incubación.

3.1.3 Ensayo con medio agar lubricante

El gráfico 3 muestra la capacidad de los hongos para crecer en ambientes que contienen sustancias tóxicas como el lubricante, siendo los aislados C156 y C156L las que tuvieron un mejor desarrollo en menor tiempo, el crecimiento del aislado C127 es bastante considerable, mientras que el crecimiento del aislado CHM fue más lento bajo estas condiciones. En el aislado CHJ durante los 2 primeros días del experimento se observó el halo de crecimiento, no obstante, en los días posteriores dio lugar al desarrollo de pequeñas colonias en forma de halo en todo el agar.

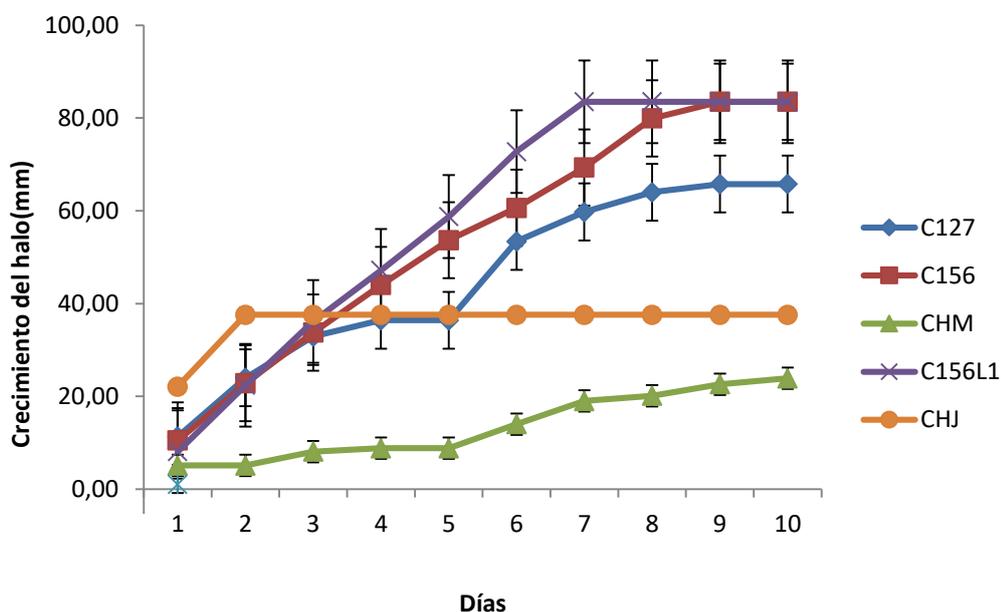


Gráfico 3. Curvas de crecimiento del hongo en medio agar mineral inorgánico, ensayo-lubricante, a los 10 días de incubación.

Como se observa en las fotografías del anexo 7, el lubricante no ha sido utilizado por los hongos, no obstante, para lidiar con la presencia del contaminante, este es acumulado en los bordes de la caja Petri en forma de costra, mecanismo que funciona para remover estos contaminantes de manera más sencilla, por tanto, su uso en biorremediación no queda descartada del todo. Se necesitan estudios posteriores para constatar que algún porcentaje del lubricante este siendo asimilado por los hongos como fuente de carbono, pero no se descarta su tolerancia para crecer en medios con pocos nutrientes y altos grados de contaminación.

El ensayo con medio líquido dio como resultado la efectividad del aislado C156L frente al lubricante, al igual que en medio sólido, este aislado mostró ser la más eficiente, lo que corrobora su uso potencial en medios controlados, como plantas de tratamiento de agua o birreactores.

3.1.4 Ensayo con medio agar aceite

El gráfico 4 muestra el crecimiento exponencial de los aislados evaluados durante la fase de incubación. El aislado CHJ fue quien mejor se adecuó a las condiciones expuestas y alcanzó el desarrollo en el cuarto día del experimento, pero esto no significa que haya asimilado el aceite, la explicación es que este tipo de microorganismos son oportunistas. Los aislados C127 y C156, aunque no lograron el crecimiento completo, toleraron la presencia de aceite vegetal. El aislado C156L mostró tener una tolerancia baja, al igual que CHM. El anexo 8 muestra que el aislado C156 en los últimos días de experimentación empezó a mostrar halos de color melocotón, por ende, se puede especular la producción de metabolitos que interactúan con el aceite y causan cambios en su estructura. Por otro lado, CHJ al décimo día incubación, mostró la presencia de colonias distribuidas en círculos formando halos en toda la caja Petri además se evidenció el encapsulamiento del aceite presente en el agar.

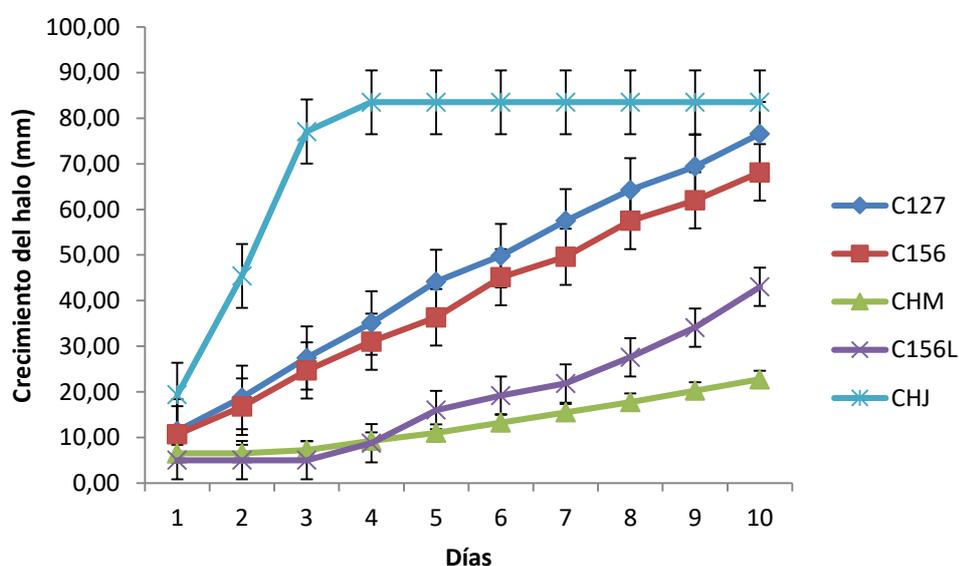


Gráfico 4. Curvas de crecimiento del hongo en medio agar aceite de oliva, ensayo-aceite, a los 10 días de incubación.

El ensayo con medio líquido dio como resultado la efectividad de los aislados C156L y CHJ en aceite vegetal, sin embargo, en medio sólido este aislado no mostró ser la más eficiente, no obstante, dicha cualidad fue dada por el aislado C127 que alcanzó el crecimiento máximo durante la fase de incubación, y demostró su capacidad para adaptarse en medios contaminados.

3.2 Tolerancia para crecer en medios contaminados

La aparición de un halo alrededor de las colonias nos indica la presencia de actividad lipolítica por acción de las lipasas y la tolerancia para crecer en medios contaminados, como lubricante y aceite. En la tabla 6 se muestra el crecimiento micelial a los 10 días de incubación de los aislados.

Tabla 6. Diferencias en el crecimiento entre aislados al final del experimento.

Aislados	Medio Agar Lubricante	Medio Agar Aceite
	10 días	
C156L	+++	+
C156	+++	++
C127	++	+++
CHJ	-	+++
CHM	+	+

- : no se evidencia formación del halo

+ : Tamaño de crecimiento del halo 10mm

++ : Tamaño de crecimiento del halo 45mm

+++ : Tamaño de crecimiento del halo 70mm

3.3 Obtención de fuentes de energía

Para los ensayos en medio mineral líquido, se utilizó la fórmula que se menciona en la tabla 2, siendo las únicas fuentes de carbono el aceite de oliva y el lubricante para cada experimento, por lo tanto, se corrobora que son la fuente de alimento para aumentar la biomasa de los aislados usados.

Para solidificar los medios de cultivo detallados en las tablas 4 y 5 se añadió, agar-agar para lubricante y agar-agar Sabouraud dextrosa para aceite de oliva, como fuente de carbono para el crecimiento micelial de los hongos utilizados. Sin embargo, es muy clara su tolerancia para crecer en medios contaminados y con bajos nutrientes.

El análisis del medio mineral líquido respalda la hipótesis de la tolerancia de estos microorganismos para crecer en ambientes de alta toxicidad, así como el uso de lubricante y aceite para formar estructuras durante su desarrollo. Mientras que el ensayo en el medio sólido constata que efectivamente el desarrollo puede darse bajo estas condiciones, lo que no queda claro es el porcentaje de consumo en estos contaminantes, los cuales pueden ser analizados en un futuro con espectrofotometría infrarroja (IR).

3.4 Aplicabilidad

Estudios de IR y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) mostrarán la verdadera capacidad para remover aceites residuales en cuerpos de agua contaminados, como plantas de tratamiento de aguas residuales. La remoción de estos contaminantes, por acción de los aislados, se llevaría a cabo en la etapa del tratamiento secundario con lodos activados, al momento de la digestión aeróbica, cuyo producto final generalmente es dióxido de carbono y agua.

En el gráfico 5 se aprecian las cuatro etapas del proceso de tratamiento de aguas residuales. Una etapa fundamental es el pre tratamiento ya que se extrae la mayor cantidad de grasas mediante procesos físicos y químicos que resultan ser poco eficaces y costosos. Por lo tanto, el uso de estos microorganismos en esta fase con lodos activados es crucial para la degradación total de estos contaminantes y al final del proceso obtener abono orgánico.

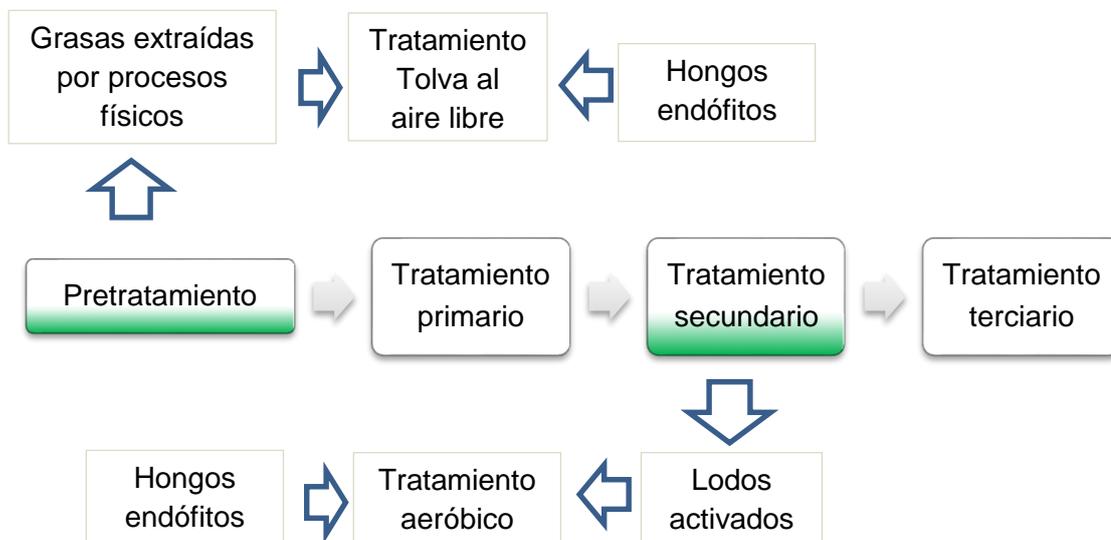


Gráfico 5. Etapas para el tratamiento de aguas residuales.

Los lodos activos deshidratados que resultan del tratamiento secundario, deben depositarse en una forma amigable con el ambiente para remediar en el menor tiempo posible y reducir la contaminación. Si los fangos contienen sustancias tóxicas es recomendable usarlos en rellenos sanitarios o incinerarlos. No obstante, si los lodos están libres de contaminantes, pueden ser usados como compost para jardinerías.

El mecanismo usado por los aislados evaluados para el tratamiento de derivados de hidrocarburos consiste en encostrar el contaminante y brindar una ruta de biorremediación que facilite su remoción en cuerpos de agua contaminados. Muy importante para la Amazonía ecuatoriana, debido a la alta demanda de lubricantes vertidos en zonas de gran importancia biológica, en las que se realizan actividades petroleras que alteran los ecosistemas y derivan en la pérdida de biodiversidad.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. Se evidencio la tolerancia de los aislados C156L, CHJ y C127 para crecer en medios contaminados con aceites residuales de origen vegetal y derivados del petróleo.
2. La eficiencia de los aislados C156L y C127 para tolerar el aceite vegetal fue evidente, pues, la cantidad de aceite disminuyó al final del ensayo, al comparar los frascos que contenían el medio mineral y los aislados, con los frascos control.
3. Debido a la alta toxicidad del lubricante, la efectividad de los aislados fue baja, no obstante, ciertos aislados (C156L, C156 y CHJ) encostraban y aislaban el contaminante a los extremos de la caja Petri para permitir el crecimiento de las hifas.

Recomendaciones

1. Para prevenir la contaminación en las placas con aceite, se debe colocar un antibiótico (cloranfenicol) en el medio agar aceite de oliva, y evitar la aparición de bacterias que afecten el desarrollo del experimento.
2. Realizar nuevos ensayos con los aislados promisorios evaluando diferentes parámetros que mejoren la eficiencia en la degradación de los contaminantes.
3. Identificar los metabolitos secundarios producidos por los aislados promisorios mediante IR o HPLC para conocer los compuestos que provocan la degradación de los contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Becerril Bravo, J. E. (2009). Contaminantes emergentes en el agua. *Revista Digital Universitaria*, 10(8), 1–7. <https://doi.org/10.2225/vol14-issue6-fulltext-8>
- Benavides López de Mesa; MSc, J., Quintero, MSc, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Cip. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, www.cipotato.org
- Dougherty, J. A., Swarzenski, P. W., Dinicola, R. S., & Reinhard, M. (2010). Occurrence of Herbicides and Pharmaceutical and Personal Care Products in Surface Water and Groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *Journal of Environment Quality*, 39(4), 1173. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0189>
- Echeverri, G., Manjarrez, G., & Cabrera, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Ciencias Biomédicas*, 8(13), 76–86.
- Hanisah, K., Kumar, S., & Tajul, A. (2013). The Management of Waste Cooking Oil: A Preliminary Survey. *Health and the Environment Journal*, 4(1), 76–81. Retrieved from <http://hej.kk.usm.my/pdf/HEJVol.4No.1/Article08.pdf>
- Jafari, N. (2010). Review of pollution sources and controls in Caspian Sea region. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 2(2), 25–29.
- Kirk, T. K., & Cullen, D. (1998). *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*.
- Knepper, T. ., Sacher, F., Lange, F. ., Brauch, H. ., Karrenbrock, F., Roerden, O., & Lindner, K. (1999). Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management*, 19(2), 77–99. <https://doi.org/10.1016/S0956->

053X(99)00003-3

- Kulkarni, M. G., & Dalai, A. K. (2006). Waste cooking oil - an economic source for biodiesel: a review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45, 2901–2913. <https://doi.org/10.1021/ie0510526>
- Kuster, M. (2009). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Elsevier B.V.*, 358(August), 294–306.
- María, M.-R., Patricia, N.-Y., Francisco, Y., & Carlos, V.-E. (2015). Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. y *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Química Viva -Número*, 1(14), 90–102. Retrieved from <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v14n1/marquez.pdf>
- Marjadi, D. S., & Dharaiya, N. A. (2010). Analysis of Edible Oil Contaminated Soil Within North Gujarat Region, (December), 287–291.
- Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., Del, L., Reynoso, C., Rodríguez, G. E., & Agüero, M. S. (2015). Evaluación del crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Agrocybe aegerita* sobre orujos de pera. *Anales de Biología*, 37, 1–10. <https://doi.org/10.6018/analesbio.37.1>
- Performance, R. (2006). Tropical and Subtropical Agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 1(6), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.06.019>
- Reyes Toriz, E., Cerino Córdova, F., & Suárez Herrera, M. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*, IX(31), 59–64. Retrieved from http://ingenierias.uanl.mx/31/31_remocion.pdf
- Robles, M. G. (2010). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Ministerio de Salud Del Perú, Instituto Nacional de Salud*, Volumen 16, Números 9-10.
- Samsing, F., Bustos-López, C., Schoffer, J., Mattar, C., González, A., Robles, C., ...

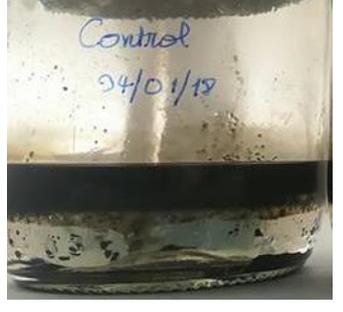
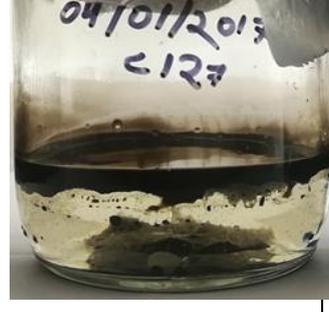
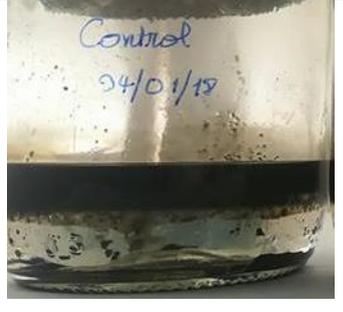
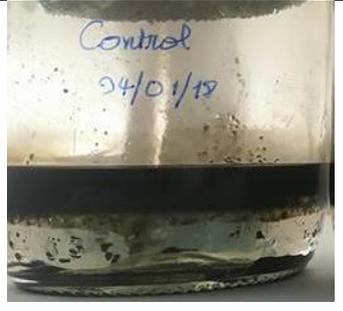
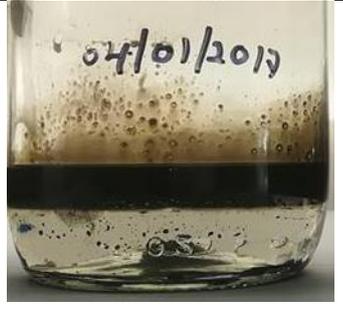
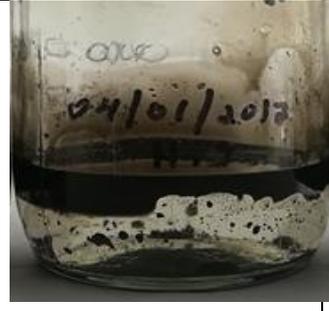
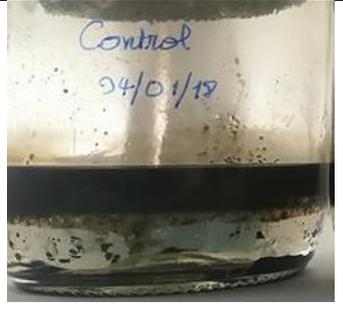
- Valdovinos, C. (2011). Insumos utilizados en la preparación de alimentos en producción porcina y su potencial de contaminación por dioxinas en la carne. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 43(3), 287–294. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2011000300011>
- Shuval, H., Lampert, Y., & Fattal, B. (1997). Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Science and Technology*, 35(11–12), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00228-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00228-X)
- Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Labelle, S., Beaumier, D., Roy, R., ... Lee, K. E. N. (2001). Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 1–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2469>
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., ... Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences*, 93(2), 223–241. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl055>

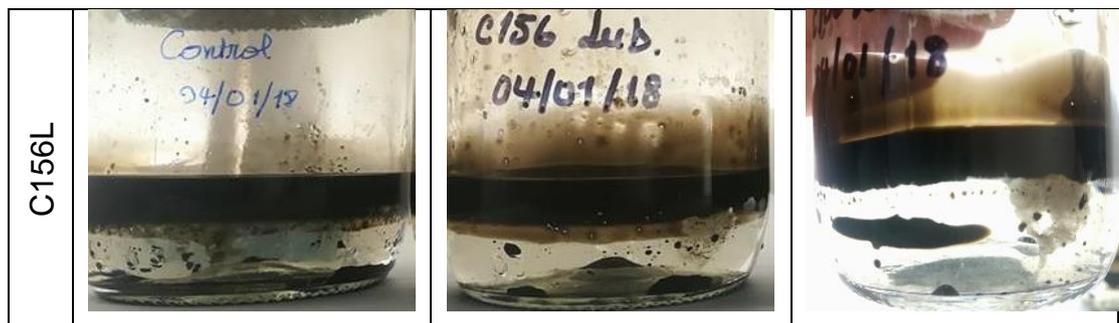
ANEXOS

Anexo 1. Pasos para obtener la biomasa del micelio

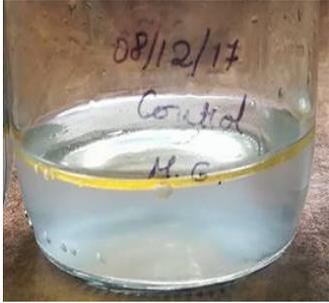
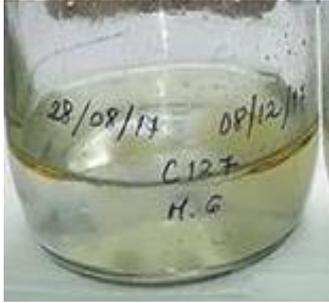
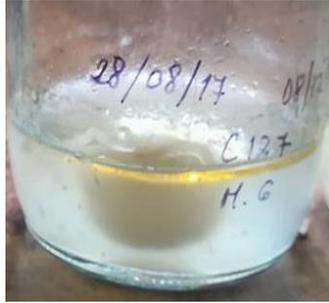
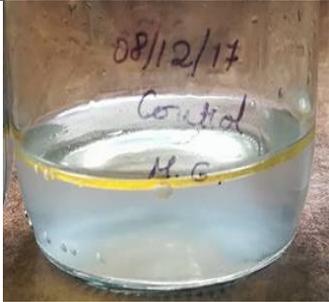
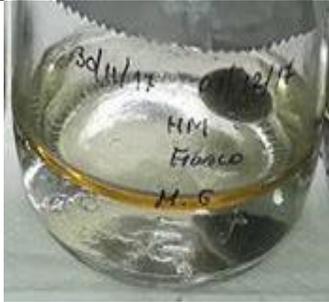
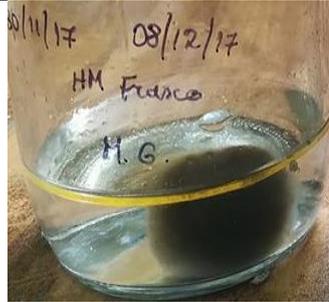
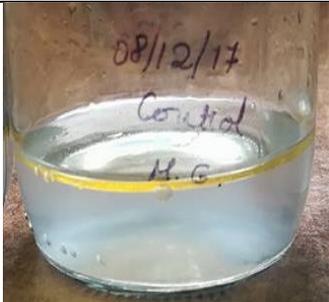
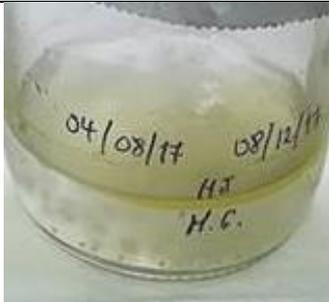
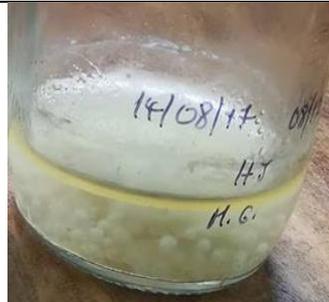
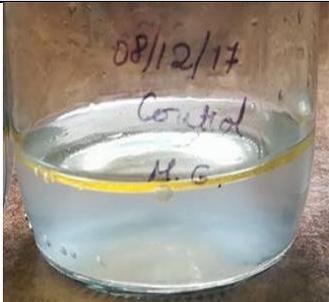
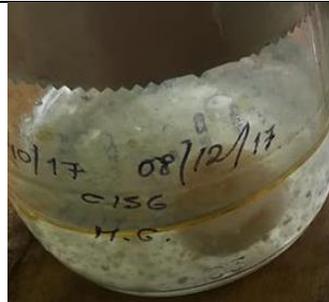


Anexo 2. Biomasa micelial en medio mineral líquido, ensayo-lubricante a los 15 y 30 días de incubación.

Aislado	Control	15 días	30 días
C127	 <p>Control 04/01/18</p>		 <p>04/01/2018 C127</p>
CHM	 <p>Control 04/01/18</p>	 <p>04/01/18</p>	 <p>04/01/18</p>
CHJ	 <p>Control 04/01/18</p>	 <p>04/01/2018</p>	 <p>04/01/2018</p>
C156	 <p>Control 04/01/18</p>	 <p>04/01/18</p>	 <p>C156 04/01/18</p>



Anexo 3. Biomasa micelial en medio mineral líquido, ensayo-aceite a los 10 y 15 días de incubación.

Aislado	Control	10 días	15 días
C127			
CHM			
CHJ			
C156			



Anexo 4. ANOVA de biomasa micelial con lubricante

Análisis de la varianza

dia	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
quince	peso	18	0,78	0,69	31,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,09	5	0,02	8,74	0,0011
cepa	0,09	5	0,02	8,74	0,0011
Error	0,02	12	2,0E-03		
Total	0,11	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12231

Error: 0,0020 gl: 12

cepa	Medias	n	E.E.	
control	0,00	3	0,03	A
CHJ	0,10	3	0,03	A B
C127	0,18	3	0,03	B
CHM	0,18	3	0,03	B
C156 L	0,18	3	0,03	B
C156	0,20	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Análisis de la varianza

dia	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
quince	peso	18	0,78	0,69	31,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,09	5	0,02	8,74	0,0011
cepa	0,09	5	0,02	8,74	0,0011
Error	0,02	12	2,0E-03		
Total	0,11	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12231

Error: 0,0020 gl: 12

cepa	Medias	n	E.E.	
control	0,00	3	0,03	A
CHJ	0,10	3	0,03	A B
C127	0,18	3	0,03	B
CHM	0,18	3	0,03	B
C156 L	0,18	3	0,03	B
C156	0,20	3	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 5. ANOVA de biomasa micelial con aceites.

Análisis de la varianza

dia	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
diez	peso	18	0,88	0,83	34,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	44,52	5	8,90	17,33	<0,0001
cepa	44,52	5	8,90	17,33	<0,0001
Error	6,17	12	0,51		
Total	50,69	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,96586

Error: 0,5138 gl: 12

cepa	Medias	n	E.E.	
control	0,00	3	0,41	A
CHM	1,06	3	0,41	A
C156	1,37	3	0,41	A
C 127	1,54	3	0,41	A
C 156 L	4,13	3	0,41	B
CHJ	4,20	3	0,41	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

dia	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
quince	peso	18	0,96	0,94	23,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	208,63	5	41,73	53,83	<0,0001
cepa	208,63	5	41,73	53,83	<0,0001
Error	9,30	12	0,78		
Total	217,94	17			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,41464

Error: 0,7752 gl: 12

cepa	Medias	n	E.E.	
control	0,00	3	0,51	A
C156	1,72	3	0,51	A B
C 127	1,93	3	0,51	A B
CHM	3,46	3	0,51	B C
CHJ	5,07	3	0,51	C
C 156 L	10,55	3	0,51	D

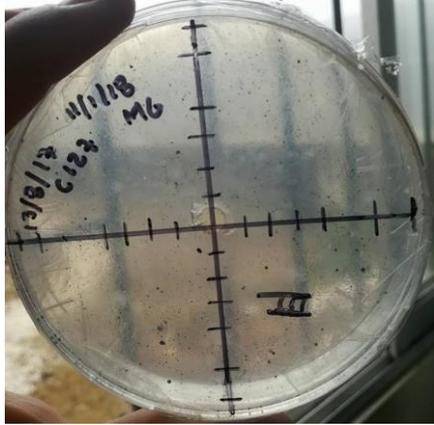
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

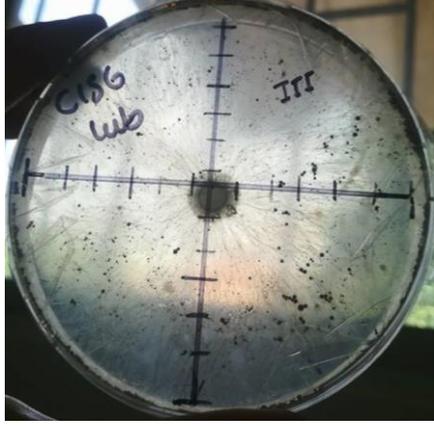
Anexo 6. Promedios de biomasa micelial

Aislado	Peso micelial lubricante		Peso micelial aceite	
	Día	Diámetro	Día	Diámetro
C127	15	0,22 ± 0,03	10	1,54 ± 0,06
CHM	15	0,18 ± 0,04	10	1,06 ± 0,22
CHJ	15	0,10 ± 0,01	10	4,20 ± 0,54
C156	15	0,20 ± 0,04	10	1,37 ± 0,14
C156L	15	0,18 ± 0,02	10	4,13 ± 0,82
C127	30	0,33 ± 0,01	15	1,93 ± 0,16
CHM	30	0,26 ± 0,02	15	3,46 ± 0,72
CHJ	30	0,15 ± 0,02	15	5,07 ± 0,57
C156	30	0,35 ± 0,05	15	1,72 ± 0,22
C156L	30	0,43 ± 0,02	15	10,55 ± 0,79

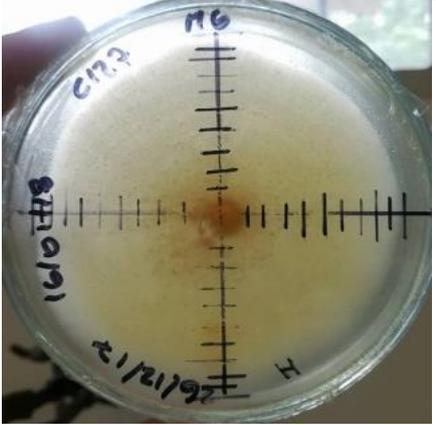
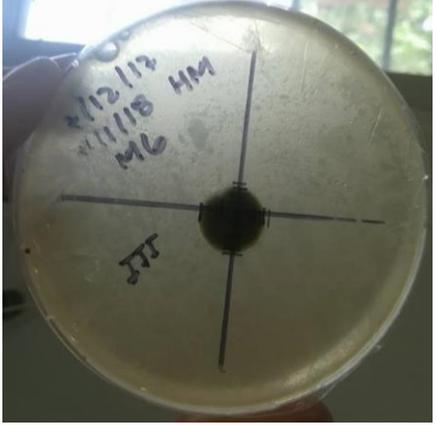
Crecimiento de aislados estudiados; ± error estándar

Anexo 7. Crecimiento micelial ensayo medio agar/lubricante

Aislados	Día 3	Día 10
C127	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '13/08/13', '11/11/13', 'C127', and 'MG'. A Roman numeral 'II' is written in the bottom left quadrant. The agar surface shows minimal, sparse growth.	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '11/11/13', 'MG', 'C127', and '11/13/13'. A Roman numeral 'II' is written in the bottom right quadrant. The agar surface shows more visible, though still sparse, growth.
CHM	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '11/11/13', 'CHM', and '10'. A Roman numeral 'I' is written in the bottom left quadrant. The agar surface shows moderate, scattered growth.	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '11/11/13', 'CHM', and '10'. A Roman numeral 'III' is written in the top left quadrant. The agar surface shows significantly increased growth, appearing as a dense, dark, fuzzy layer.
CHJ	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '11/11/13', 'CHJ', and '10'. A Roman numeral 'II' is written in the top right quadrant. The agar surface shows moderate, scattered growth.	 A petri dish with a grid. Handwritten text includes '11/11/13', 'CHJ', and '10'. A Roman numeral 'II' is written in the bottom left quadrant. The agar surface shows moderate, scattered growth, similar to Day 3.

C156	 <p>A top-down view of a petri dish lid. The lid is marked with a vertical and a horizontal line intersecting at the center. Handwritten text in black ink includes '2017/1/13' at the top, '11-118' below it, 'C156' to the right of the center, and 'MB' below 'C156'. The letter 'Fl' is written to the left of the center. The lid shows some condensation and a dark spot at the center.</p>	 <p>A top-down view of a petri dish lid, similar to the one in the top-left. The handwritten text includes '2017/1/13' at the top, '11-118' below it, 'C156' to the right of the center, and 'MB' below 'C156'. The letter 'Fl' is written to the left of the center. The lid shows some condensation and a dark spot at the center.</p>
C156L	 <p>A bottom-up view of a petri dish lid. The lid is marked with a vertical and a horizontal line intersecting at the center. Handwritten text in black ink includes 'C156' and 'MB' to the left of the center. The letter 'Fl' is written to the right of the center. The lid shows some condensation and a dark spot at the center.</p>	 <p>A bottom-up view of a petri dish lid. The lid is marked with a vertical and a horizontal line intersecting at the center. Handwritten text in black ink includes 'C156' and 'MB' to the left of the center, and 'IRI' to the right of the center. The lid shows some condensation and a dark spot at the center.</p>

Anexo 8. Crecimiento micelial ensayo medio agar/aceite

Aislados	Día 3	Día 10
C127		
CHM		
CHJ		

