

**Capítulo III: Prácticas de
laboratorio y cuestionario sobre
biotecnología ambiental**

Prácticas de laboratorio y cuestionario sobre biotecnología ambiental

Laboratory Practicals and Quiz on Environmental Biotechnology

Chicaiza-Ortiz, Cristhian David ^{1,2}   Rivadeneira-Arias, Virginia del Carmen ²  

Herrera-Feijoo, Robinson Jasmany³   Andrade, Jean Carlo ⁴  

¹ Shanghai Jiao Tong University, ² Universidad Regional Amazónica IKIAM, ³ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ⁴ Universidad Politécnica Salesiana

 DOI / URL: <https://doi.org/10.55813/egaea.cl.2022.18>

Resumen: El capítulo menciona varias prácticas de laboratorio, tales como: inoculación y aislamiento de microorganismos en diferentes muestras ambientales, identificación de microorganismos con el microscopio óptico mediante técnicas tintoriales, *Trichoderma* sp. como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis*), aislamiento de microalgas y cianobacterias en muestras de agua y suelo, fructificación del hongo *Pleurotus ostreatus* con potencial en la biodegradación de contaminantes. Además, se presentan cuestionarios de Biotecnología Ambiental con un total de 19 preguntas. En conclusión, este capítulo sirve de apoyo para los estudiantes, técnicos y/o docentes que estén interesados en realizar alguna práctica de laboratorio o a su vez estén en busca de respuestas típicas de Biotecnología Ambiental.

Palabras clave: Prácticas de laboratorio, cuestionarios, Biotecnología Ambiental, banco de preguntas.

Abstract:

The chapter mentions several laboratory practices, such as: inoculation and isolation of microorganisms in different environmental samples, identification of microorganisms with the optical microscope using tintorial techniques, *Trichoderma* sp. as a promoter of plant growth of passion fruit (*Passiflora edulis*), isolation of microalgae and cyanobacteria in water and soil samples, fructification of the fungus *Pleurotus ostreatus* with potential in the biodegradation of pollutants. In addition, environmental biotechnology questionnaires with a total of 19 questions are presented. In conclusion, this chapter serves as a support for

students, technicians and/or teachers who are interested in doing some laboratory practice or who are looking for typical answers on Environmental Biotechnology.

Keywords: Lab practicals, Environmental Biotechnology, quizzes, question bank.

3.1. Introducción

La necesidad de eliminar o minimizar los impactos ambientales negativos hacen necesario que los profesionales en la disciplina de la Biotecnología Ambiental, conozcan cómo analizar, evaluar e interpretar la calidad del entorno y la precisión de las medidas realizadas en campo o laboratorio. Para ello, el aprendizaje y fundamento de las técnicas analíticas resulta esencial para poder obtener una mayor seguridad en la discriminación y validación de resultados. El presente capítulo pretende servir de guía para la buena realización de prácticas que se efectúan en un laboratorio de Biotecnología Ambiental y poner a disposición del lector un cuestionario para su uso. Se describe también detalladamente tanto los procedimientos a seguir como las principales técnicas analíticas utilizadas, y el material básico empleado (Martínez et al., 2017).

Quienes acceden a un laboratorio deben saber que van a estar en contacto con procesos y productos químicos que, en su mayoría, pueden ser un riesgo. Así, es indispensable conocer los procedimientos de trabajo y las normas básicas de comportamiento en un laboratorio, con el fin de evitar accidentes o situaciones de riesgo. Según Torres (2016), para conocer los riesgos y las normas de trabajo en un laboratorio, se debe impartir primeramente información general que introduzca los aspectos y las normas básicas de funcionamiento tales como:

- Riesgos que pueden presentarse durante la realización de las actividades profesionales o de formación;
- Normas, precauciones y prohibiciones para evitar riesgos;
- Equipos de protección individual y colectiva que es necesario utilizar;
- Significado de los símbolos de marcado, frases de riesgo y normas de utilización que aparecen en los productos químicos; utilización de fichas de seguridad de productos;
- Señalización, normas y dispositivos de emergencia y contra incendios;
- Normas de actuación en casos de incidentes o emergencias;
- Hábitos personales y de trabajo en el laboratorio.

El otro tipo de información debe tratar situaciones más específicas relacionadas al desarrollo de actividades concretas de un laboratorio, advertencias de los riesgos que conllevan dichas tareas y los equipos e instalaciones a utilizar, incluyendo la peligrosidad de los productos que se van a utilizar, así como el

procedimiento a seguir en caso de que se presente el riesgo (Martínez et al., 2017). En el Ecuador, existe normativa que se puede consultar para conocer las medidas que deben adoptarse en la adecuada protección de la salud y seguridad dentro de la Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria del Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN-1 700.

3.2. Materiales y métodos

Esta unidad tiene varias prácticas de laboratorio que pueden replicarse en el laboratorio. Cada protocolo cuenta con una sección específica de los objetivos, fundamento teórico, materiales y metodología.

3.3. Resultados

Los resultados se centraron en el desarrollo de varias prácticas de laboratorio replicables.

3.3.1. Tema: Inoculación y aislamiento de microorganismos en diferentes muestras ambientales.

3.3.1.1. Objetivos

- Desarrollar las técnicas comunes de inoculación en medios de cultivo y las técnicas de aislamiento en: frutos en descomposición, abonos, etc.
- Desarrollar habilidades en los estudiantes sobre la manipulación de materiales de laboratorio relacionadas a Biotecnología Ambiental

3.3.1.2. Fundamento teórico

Las bacterias crecen en la superficie de los medios de cultivo para producir colonias distintas. Las distintas bacterias producen colonias diferentes pero características, lo que permite una identificación presuntiva temprana y una fácil identificación de los cultivos mixtos. Hay muchos tipos diferentes de medios de cultivo. El agar se utiliza como agente gelificante al que se añade una variedad de nutrientes (por ejemplo, sangre, peptona y azúcares) y otros factores (tales como tampones, sales e indicadores). Algunos medios de cultivo no son selectivos (entre ellos; el agar sangre o el agar nutritivo) y en ellos crece una gran variedad de bacterias. Otros, como el agar MacConkey, son más selectivos mediante la adición de sales biliares que seleccionan las bacterias "tolerantes a la bilis" que se encuentran en el intestino grueso, como *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Los medios pueden hacerse aún más selectivos mediante la adición de antibióticos u otras sustancias inhibidoras, y los sofisticados

sistemas indicadores pueden permitir la fácil detección de bacterias definidas a partir de poblaciones mixtas (Lagier et al. 2015).

Además, estos microorganismos desempeñan un papel importante en todos los ecosistemas, interactuando a diario con las plantas, los animales y las personas. Los microorganismos son esenciales para el buen funcionamiento de los sistemas biológicos y la supervivencia de la vida, ya que participan en diversas actividades metabólicas, ecológicas y biotecnológicas. Es importante cultivar un organismo concreto y extraerlo de la población mixta en la que se encuentra para investigarlo. Los procedimientos de aislamiento se emplean para obtener un cultivo para su posterior observación y análisis (Mejía y Álvarez 2017).

El inóculo es la sustancia que se inocula en el medio. Las células se separan individualmente cuando se inyecta un medio como el agar nutricional u otros medios de agar en placas de Petri utilizando el método de "siembra en placa cruzada". Las células microbianas individuales se reproducen tan rápidamente durante la incubación que las colonias, que son visibles a simple vista, se forman en 18 a 24 horas. Cada colonia con un aspecto distinto es probablemente un cultivo puro de un solo tipo de bacteria. La siembra por estrías permite aislar las bacterias que producen colonias distintas y, en consecuencia, permite aislar las bacterias.

3.3.1.3. Materiales

Equipos e insumos

- Espátula;
- Vidrio reloj o aluminio;
- Cajas de Petri;
- Pipetas de 10 ml;
- Autoclave;
- Juegos de micropipetas;
- Cámara de flujo laminar;
- Balanza analítica.

Reactivos

- Agua destilada;
- Agar Nutritivo;
- Medio Sabouraud;
- Agua peptona estéril.

Muestras ambientales

Usar guantes, registrar fotográficamente (muestreo/fecha) y sellar bien la muestra (una cantidad menor a ½ libra o ¼ litro).

- Fruta con moho;
- Pan con moho;
- Lodo (de una PTAR);
- Suelo contaminado (con pilas, aceite usado, petróleo, etc.);

- Agua estancada;
- Otra muestra que pueda ser de interés ambiental.

3.3.1.4. Metodología

Se verifica que el material de cristalería está limpio y sin daños; colocar las cajas de Petri, tubos de ensayo, etc.; envolver adecuadamente y sellar los materiales.

Escriba su nombre en la parte posterior de la placa junto con el lugar de donde obtuvo la muestra, la fecha de inoculación y el medio de cultivo empleado.

La preparación de medios de cultivo (Agar nutritivo y SABOURAUD) y de agua peptona se lleva a cabo al preparar 350 ml de agar nutritivo y 350 ml de SABOURAUD. Se lleva a autoclave durante 25 minutos a 121 °C para la esterilización; se distribuye en las respectivas cajas de Petri; la preparación de Agua Peptona se prepara un volumen de 200 ml (6 tubos).

Aislamiento de microorganismos de suelo: se pesa 1 g de tierra/abono y se diluye en 9 ml de agua peptona estéril (10-1), se homogeniza y se deja reposar un momento para que los sólidos decantaran.

A partir de esta solución se realiza dos diluciones más (10-2 y 10-3) en agua peptona estéril. Para la inoculación se toma 1 ml de cada dilución y se siembra cada una en agar nutritivo con ayuda de un asa de Drigalsky. Finalmente se incuba las placas a temperatura ambiente por 4-7 días y se evalúa su crecimiento. Siembre por picadura en el centro, con una asa recta (sin anillo) las mismas bacterias por separado en tubos con medio sólido sin inclinar.

3.3.2. Tema: Identificación de microorganismos con el microscopio óptico mediante técnicas tintoriales

3.3.2.1. Objetivos

- Desarrollar las técnicas comunes de identificación microscópica con tinción Gram, de azul de metileno y rojo Congo.
- Desarrollar habilidades en los estudiantes sobre la manipulación de materiales y reactivos de laboratorio relacionadas a Biotecnología Ambiental.

3.3.2.2. Fundamento teórico

El microscopio óptico es un instrumento se utiliza para la identificación de los microorganismos. Entre su estructura es importante el poder de resolución que le caracteriza, el cual se define como la capacidad que posee un objetivo para distinguir la distancia mínima entre dos puntos del objeto. El poder de resolución de un objetivo es el responsable de la calidad, claridad, nitidez y fineza detallada de la imagen. Para aprovechar esta ventaja de los microscopios, se han

desarrollado técnicas tintoriales que destacan las características morfológicas de los microorganismos (López, et al. 2014).

Aunque los microorganismos vivos se pueden observar directamente en el microscopio óptico, la mayoría de las veces es necesario teñirlos para que sea mucho más fácil su identificación. Teñir ocasiona una reacción de intercambio de iones del colorante a lugares activos de la superficie o interior de las estructuras de la célula, esto va a permitir contrastar mucho más el microorganismo con respecto al medio que le rodea (González, et al. 2020). Así pues, el teñir tiene las siguientes funciones:

1. Permite hacer visibles a los objetos microscópicos y transparentes;
2. Revela su forma y tamaño;
3. Muestra la presencia de estructuras internas y externas;
4. Produce reacciones químicas específicas.

Las tinciones se pueden clasificar como simples cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un sólo colorante (azul de lactofenol o tinta china); tinción diferencial, cuando se visualiza más de un color porque se utiliza más de un colorante (Gram o Ziehl-Neelsen). Algunas técnicas tintoriales como Gram o Ziehl Neelsen requieren antes de su proceso la fijación de las muestras, con la finalidad de preservar la arquitectura estructural y química de las células. Existen dos tipos de fijadores: físicos y químicos. Los métodos químicos ofrecen mejores resultados para la fijación, ya que son líquidos con potencial alto de difusión intracelular y detienen procesos enzimáticos que provocan autólisis (López, et al. 2014).

3.3.2.3. Tinción Gram

3.3.2.3.1. Materiales

Material

- Asa bacteriológica;
- Portaobjetos;
- Mechero Bunsen con manguera;
- Piseta;
- Goteros para cada reactivo;
- Encendedor.

Equipos

- Microscopio;
- Cronómetro digital.

Reactivos

- Solución de cristal violeta;

- Solución de lugol;
- Solución de alcohol acetona;
- Safranina;
- Aceite de inmersión;
- Agua destilada.

3.3.2.3.2. Metodología

- Colocar en el portaobjetos una microgota de agua;
- Realizar una extensión con el material a estudiar y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica;
- Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen, cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor, empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano;
- Añadir la solución de cristal violeta hasta cubrir la muestra (área del frotis) y se deja actuar durante 10s;
- Lavar el portaobjetos, se cubre la preparación con Lugol y se deja actuar durante 10s antes de la decoloración con acetona;
- Lavar el exceso de yodo. Añadir las gotas suficientes de alcohol acetona, hasta decolorar (o máximo 10s);
- Lavar inmediatamente el portaobjetos con agua mediante el chorro de la piseta;
- Aplicar el colorante de contraste safranina cubriendo la muestra, durante 10s;
- Lavar con agua mediante el chorro de una piseta y dejar secar al aire;
- Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X.

3.3.2.4. Tinción de azul de metileno o de Loeffler

3.3.2.4.1. Materiales

Material

- Asa bacteriológica;
- Portaobjetos;
- Mechero Bunsen con manguera;
- Piseta;
- Goteros para cada reactivo;
- Encendedor.

Equipos

- Microscopio;
- Cronómetro digital.

Reactivos

- Azul de metileno;

- Agua destilada;
- Aceite de inmersión.

3.3.2.4.2. Metodología

1. Colocar en el portaobjetos una microgota de agua;
2. Realizar una extensión con el material a estudiar y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica;
3. Fijar el frotis con calor pasando el portaobjetos de 3 a 4 veces por encima de la llama del mechero Bunsen, cuidando que no se exceda la temperatura de exposición al calor, empleando como referencia que el calor del portaobjetos pueda ser tolerable para la parte interna de la mano;
4. Cubrir el frotis con colorante azul de metileno durante 3 min;
5. Lavar con agua y dejar secando al aire;
6. Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X.

3.3.2.5. Tinción con rojo Congo

3.3.2.5.1. Materiales

Material

- Asa bacteriológica;
- Portaobjetos;
- Mechero Bunsen con manguera;
- Pisseta;
- Goteros para cada reactivo;
- Encendedor.

Equipos

- Microscopio;
- Cronómetro digital.

Reactivos

- Rojo Congo;
- Agua destilada;
- Mordente de cápsula.

3.3.2.5.2. Metodología

1. Colocar en el portaobjetos una microgota de rojo Congo;
2. Realizar una extensión con el material a estudiar y homogeneizar con ayuda del asa bacteriológica;
3. Cubrir el frotis con mordente de cápsula por 3 min;
4. Lavar con agua y dejar secar al aire;

5. Observar al microscopio con objetivos de 40X y 100X.

3.3.3. Tema: *Trichoderma* sp. como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis*)

3.3.3.1. Objetivos

- Evaluar el efecto de la cepa *Trichoderma harzianum* sobre la germinación y el crecimiento temprano del maracuyá.
- Desarrollar habilidades en los estudiantes sobre la manipulación de materiales de laboratorio relacionadas a Biotecnología Ambiental

3.3.3.2. Fundamento teórico

El maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener) es un cultivo tropical promisorio para Colombia, que ocupa el segundo lugar en producción a nivel mundial. La zona bananera del departamento del Magdalena tiene características agroecológicas adecuadas para su cultivo. Sin embargo, desde el año 2006 se ha registrado una importante disminución de la producción en esta zona, originada por el desestímulo en el manejo agronómico del cultivo y el abandono por problemas fitosanitarios, provocados principalmente por patógenos (Cubillos, Valero y Mejía, 2009).

Para contrarrestar la incidencia de plagas y enfermedades se ha planteado la implementación de plaguicidas químicos; sin embargo, éstos resultan altamente tóxicos y dañinos para el medio ambiente, contaminando suelos, aire y los mantos acuíferos, además de crear resistencia genética en los fitopatógenos a los ingredientes activos (Morinigo et al., 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas para el manejo de enfermedades en las plantas, cuyas acciones sean principalmente amigables con el medio ambiente y sean económicamente viables (Melo y Granada, 2021).

Además del efecto biocontrolador de patógenos, se ha comprobado que la inoculación del género *Trichoderma* aporta otros beneficios a las plantas; a través de la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes en formas disponibles para la planta; por medio de la actividad solubilizadora de fosfatos, promueve el crecimiento y el desarrollo de los cultivos, produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal, y la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas libera factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas. *T. harzianum* ha sido destacado como promotor del crecimiento vegetal en cultivos de berenjena, frijol, café, tomate, papa, maracuyá, entre otros (Camargo y Ávila, 2014).

3.3.3.3. Materiales

Material

- Asa bacteriológica
- Cajas Petri
- Papel filtro
- Algodón
- Semillas de maracuyá
- Cepa *Trichoderma* sp.
- Suelo abonado con lombricomposto
- Cinta métrica

Equipos

- Autoclave
- Incubadora

Reactivos

- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 1%
- Agua destilada

3.3.3.4. Metodología

Previamente, reactivar las cepas en cajas Petri con agar avena, incubándose a una temperatura de 25°C durante 5 d. A partir de estos cultivos esporulados, se prepararon suspensiones del orden de 10^4 , 10^8 conidios/mL en agua destilada estéril.

Germinación in vitro de semillas

1. En cajas Petri, colocar círculos de papel filtro sobre algodón y fueron esterilizadas en autoclave a 121°C con 15 PSI por 15 min.
2. Adicionar agua destilada estéril a cada caja hasta saturar el soporte.
3. Colocar 15 semillas de maracuyá obtenidas de frutos maduros previamente desinfectadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%.
4. Seguir un diseño experimental de bloques al azar en arreglo factorial con dos repeticiones por tratamiento, tomando como factores la cepa *Trichoderma* sp. y dos concentraciones del inóculo (10^4 , 10^8 conidios/mL).
5. A cada unidad experimental, inocular con 1 ml de la suspensión de *Trichoderma* sp. de la cepa y la concentración correspondiente. Al tratamiento testigo (sin inocular) sólo agregar 1 ml de agua destilada estéril.
6. Mantener todas las cajas en oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, en una incubadora.
7. Realizar observaciones diarias durante 15 días, registrando el número de semillas germinadas, considerando semillas germinadas aquellas cuya radícula alcanzó 2 mm de longitud.

8. A partir de los datos registrados, determinar el porcentaje de germinación (PG) expresado como el porcentaje total de semillas germinadas a los 15 d. A esta variable también se le llama capacidad de germinación. El índice de velocidad de germinación (IVG) se calculó de acuerdo con la fórmula propuesta por Brown y Mayer (1988):

$$IVG = \frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \dots + \frac{P_n}{T_n}$$

dónde: P = número de semillas germinadas; T = tiempo en que germinaron; y n = d del último control.

9. El tiempo medio de germinación (TMG) calcular de acuerdo con García, et al. (1982):

$$TMG = \frac{[(x_1 d_1) + (x_2 d_2) + \dots + (x_{15} d_{15})]}{x_{15}}$$

donde: x₁, x₂, x₁₅ son las semillas germinadas en el d 1, 2, 15; d₁, d₂,... d₁₅ son los días de incubación, y X₁₅ es el número total de semillas germinadas en el d 15 cuando se realizó el conteo final de semillas germinadas.

Desarrollo de plántulas

10. Tomar 2 semillas de cada tratamiento y cada una sembrar a 1 cm de profundidad en recipientes con 250 g de suelo abonado con lombricomposto previamente esterilizado en autoclave a 121°C con 15 PSI por 30 min.
11. Inocular nuevamente con 4 ml de las suspensiones de 10⁴, 10⁸ conidios/mL de *Trichoderma* sp. y un testigo sin inocular.
12. Mantener las plántulas en condiciones de invernadero con humedad relativa de 70- 80% y temperatura de 31-34°C, donde el volumen de aire, luminosidad y ataque de plagas se controlen con riego diario por nebulización cada 30 min durante 10 s.
13. Utilizar un diseño de bloques completos al azar, con dos factores, conformado por la cepa *Trichoderma* sp., y las dos concentraciones del inóculo. Cada tratamiento contó con dos repeticiones.
14. Después de dos meses, registrar el número de hojas verdaderas, medir la altura, el grosor del tallo en la base y la longitud de la raíz con la ayuda de un metro, y determinar el peso seco total de cada una de las plantas.
15. Presentar los resultados en una tabla similar a la tabla 9 que se presenta a continuación, según el número de cepas disponibles en el laboratorio.

Tabla 1
Tabla de medias

Tratamientos	LT (cm)	GTB (mm)	NHV	LR (cm)	PST (g)
TCN-014-10 ⁴	17,4 bc	0,98 b	7,0 b	9,4 c	0,195 bc
TCN-014-10 ⁶	19,5 b	1,32 a	7,0 b	12,2 b	0,243 ab
TCN-014-10 ⁸	23,7 a	1,12 b	8,5 a	14,2 a	0,335 a
TCN-005-10 ⁴	16,9 bc	0,93 bc	6,8 b	9,3 c	0,193 bc
TCN-005-10 ⁴	18,4 bc	1,09 b	7,0 b	10,2 c	0,243 ab
TCN-005-10 ⁴	20,1 ab	1,12 b	7,8 ab	13,0 ab	0,235 b
Testigo sin inocular	14,5 c	0,84 c	5,0 c	7,5 d	0,108 c

Nota: Medias para la longitud del tallo (LT), grosor del tallo en la base (GTB), número de hojas verdaderas (NHV), longitud de la raíz (LR) y peso seco total (PST); de las plántulas de maracuyá establecidas en el invernadero durante dos meses. **Fuente:** (Cubillos-Hinojosa, Valero & Mejía, 2009).

3.3.4.Tema: Aislamiento de microalgas y cianobacterias en muestras de agua y suelo

3.3.4.1. Objetivos

- Identificar microalgas y cianobacterias de muestras terrestres y acuáticas.
- Cuantificar microalgas y cianobacterias que se encuentran en muestras de agua y tierra.

3.3.4.2. Fundamento teórico

Las cianobacterias y microalgas son organismos, que han evolucionado desde el origen de la tierra adaptándose a diferentes ecosistemas, además de ser capaces de realizar fotosíntesis mediante pigmentos que les permiten usar la luz como fuente de energía (Hernández-Pérez y Labbé, 2014; Llopiz, 2016).

Asimismo, estos microorganismos poseen compuestos bioactivos con diversos usos potenciales, fundamentalmente en biomedicina, agropecuaria, cosmética (Llopiz, 2016), así como son de suma importancia dentro de la industria farmacéutica por los metabolitos secundarios producidos, mientras que en el campo de biorremediación generan combustibles, electricidad y son utilizados para el tratamiento de aguas residuales (Morales et al., 2022).

Los estudios de bioprospección de microorganismos fotosintéticos son utilizados como recursos biológicos para la producción de biofertilizantes, pigmentos y exopolisacáridos son de interés científico ya que pueden generar información

sobre biodiversidad, taxonomía, bioquímica, nutrición y biotecnología de cultivos de estos microorganismos fotosintéticos (Morales et al., 2022).

3.3.4.3. Materiales

- Asa bacteriológica;
- Cajas Petri;
- Muestras ambientales;
- Recipientes para recolección de muestras de orina;
- Cinta masking;
- Guantes;
- Portaobjetos;
- Cubreobjetos.

Equipos

- Incubadora;
- Microscopio;
- Cámaras Neubauer.

Reactivos

- Alcohol al 70%;
- Agua destilada;
- Nitrofoska foliar (NKP) 1% m/v.

3.3.4.4. Metodología

Recolección de muestra

Previo a la práctica se recogerán y etiquetarán las muestras ambientales, por lo que será necesario usar 2 frascos para recoger orina. El primero deberá ser llenado con una muestra de tierra y el segundo con una muestra de agua. Es importante tener en cuenta que las muestras deben ser recolectadas de zonas de colores verdosos, las cuales muestran presencia de organismos fotosintéticos. Paralelamente, se debe tomar datos de ubicación geográfica de los lugares donde las muestras serán recolectadas.

Preparación de cultivos

La preparación de medios de cultivo (Agar nutritivo, Nitrofoska foliar) y de agua peptona se lleva a cabo al preparar 350 ml de agar nutritivo y 350 ml de Nitrofoska foliar. Se lleva a autoclave durante 25 minutos a 121 °C para la esterilización; se distribuye en las respectivas cajas de Petri; la preparación de Agua Peptona se prepara un volumen de 200 ml (6 tubos).

Para preparar un litro de medio de cultivo Nitrofoska foliar se diluye 3 mL de Nitrofoska foliar en 997 mL de agua destilada estéril.

Aislamiento de microorganismos fotosintéticos del suelo

1. Con la ayuda de unas tijeras, en condiciones de esterilidad junto al mechero, cortar las raíces de las plantas y colocarlas en dos cajas de Petri estériles;
2. Tomar 5 g del suelo de la rizósfera de las plantas leguminosas y se coloca en dos cajas de Petri estériles, a la una caja se le añadió 5 mL de medio de cultivo Nitrofoska foliar;
3. Incubar las cajas de Petri en condiciones de luminosidad bajo una lámpara fluorescente lateral marca Philips Daylight de 40 W. Después de transcurrido un mes aproximadamente, aparecen las primeras poblaciones de microalgas y cianobacterias;
4. Realizar réplicas hasta que la especie se encuentre pura.

Aislamiento de microorganismos fotosintéticos del suelo

1. Se pesa 1 g de tierra y se diluye en 9 ml de agua peptona estéril (10-1), se homogeniza y se deja reposar un momento para que los sólidos decanten;
2. A partir de esta solución se realizarán dos diluciones más (10-2 y 10-3) en agua peptona estéril;
3. Para la inoculación se toma 1 ml de cada dilución y se siembra cada una en agar nutritivo con ayuda de un asa de Drigalsky. Finalmente se incuba las placas a temperatura ambiente y se evalúa su crecimiento.

Aislamiento de microorganismos fotosintéticos de agua

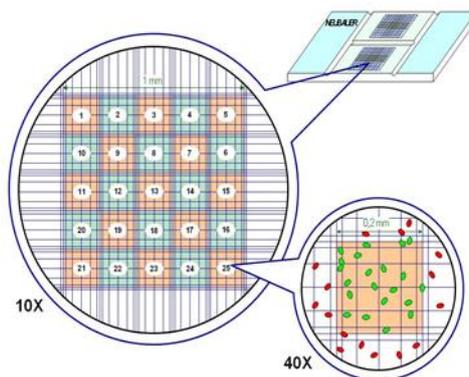
1. Agitar siempre de forma vigorosa la botella que contiene la muestra de agua antes de tomar cantidad alguna de la misma;
2. Preparar diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10.000 y usando una pipeta distinta y estéril para cada situación;
3. Sembrar 0,5 ml de la muestra original y 0,5 ml de las diluciones anteriormente preparadas en placas de agar nutritivo. Generalmente, es preferible usar las dos o tres últimas diluciones.

Conteo de microalgas y cianobacterias en cámara de Neubauer

1. Se deben transferir entre 10 a 15 microlitros de la dilución hacia la cámara de recuento de Neubauer, pero lo más importante es que la cámara quede completamente llena pero no en exceso para evitar que la lámina que la cubre se mueva por acción de la dilución transferida (figura 35);
2. Hay que contar todas las células que están dentro de cada cuadrado mediano y aquellas que están tocando los lados superior y derecho de dicho cuadrado (aunque estén parcialmente fuera). Siguiendo este criterio, en la figura se contarían las células en color verde, y no se contarían las células en color rojo.

Figura 1

Conteo en la cámara de Neubauer



Nota: Fuente: Mikros testak.org. s.f.

- Si hemos contabilizado N células en uno de los cuadrados grandes (o sea, en 25 cuadrados medianos), la concentración de nuestra muestra será:

$$N \times 10^4 \text{ cel/ml}$$

- Si para hacer el recuento hemos tenido que concentrar o diluir la muestra inicial, hemos de tener en cuenta este factor de concentración-dilución (f):

$$N \times 10^4 \times f \text{ cel/ml}$$

suspensión celular inicial = suspensión celular diluida x factor de concentración-dilución.

Identificación de microorganismos fotosintéticos

Cada muestra recolectada se analiza usando el microscopio óptico para detectar los grupos de microalgas presentes. Para ello, se observa los caracteres morfológicos que fueron comparados con claves taxonómicas. Se recomienda consultar el “Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador”.

Sistema de alto rendimiento para la determinación de concentración celular mediante espectrofotometría

La metodología propuesta se basa en el desarrollo de una curva de calibración que describe la relación entre la concentración celular de una muestra algal y su densidad óptica. Esta relación matemática permitirá evaluar la tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas mediante mediciones rápidas por espectrofotometría.

- Evaluar la densidad óptica de cada una muestra de microalgas mediante espectrofotometría.
- Colocar 7 mL en la cubeta de cuarzo de 10 mL, y medir su absorbancia a 750nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Spectronic).

3. Usar la siguiente ecuación para realizar mediciones rápidas de la concentración celular de una muestra de microalgas en base a su absorbancia (Chicaiza Ortiz, et al., 2021).

$$CC = 2 * 10^7 * A - 2,5 * 10^5$$

donde CC corresponde a la concentración celular de una muestra de microalgas y A representa la absorbancia medida a 750 nm para esa misma muestra.

3.3.5. Tema: Fructificación del hongo *Pleurotus ostreatus* con potencial en la biodegradación de contaminantes

3.3.5.1. Objetivos

- Evaluar el crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos de cacao, bajo condiciones ambientales controladas temperatura, humedad, iluminación y aireación.
- Determinar el tiempo transcurrido a partir de la siembra hasta la fructificación y aparición de los primeros primordios.
- Establecer el tiempo transcurrido en la obtención de la primera cosecha, es decir, el tiempo a partir de la cual la muestra se colocó en producción hasta el primer corte de hongos en estado maduro.
- Controlar varios factores, como son la luz, temperatura, humedad, plagas, para obtener un completo desarrollo de *Pleurotus ostreatus* y fijar el número de cosechas obtenidas.
- Evaluar los cuerpos fructíferos producidos, mediante varios parámetros como son el color, sabor, olor, tamaño, peso fresco, la eficiencia biológica y la tasa de producción para establecer la calidad del hongo obtenido.
- Investigar sobre las posibles aplicaciones del hongo en diferentes campos, y la importancia de la producción del mismo.

3.3.5.2. Fundamento teórico

El cultivo de hongos comestibles del género *Pleurotus* spp., comúnmente conocidos como hongos ostra u orellanas, fue realizado por primera vez en el mundo a principios del siglo pasado y se ha incrementado en las últimas cinco décadas, alcanzando el 14,2% de la producción total de hongos comestibles en el mundo en el año de 1997, siendo China el principal productor con el 86,8% (Garzón y Cuervo, 2008) de la producción mundial y con cerca de 800.000 toneladas producidas al año. Este mayor crecimiento se debe al valor nutricional del hongo, características organolépticas y fácil disponibilidad de materiales utilizados para el sustrato. En la tabla 10 se observa la taxonomía de *Pleurotus* spp.

Clasificación taxonómica del hongo *Pleurotus ostreatus*

Tabla 2

Clasificación taxonómica del hongo

Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Homobasidiomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>P. ostreatus</i>
Nombre binomial	<i>P. ostreatus</i> Champ.

Nota: Fuente: Garzón y Cuervo, 2008.

Características fisiológicas

Es un hongo degradador de materia orgánica que se alimenta principalmente de lignina y celulosa, estas son azúcares que se encuentran disponibles en la materia muerta como paja, cacao, maíz, caña, trigo, cebada, etc; potencialmente también se ha determinado su degradación como materiales recalcitrantes (Urdiales Jarro, et al., 2022), lo que sugiere una potencial aplicación en biorremediación. Además, el micelio debe tener a su disposición la fuente de carbono que constituye la base nutricional de su crecimiento.

Características morfológicas

Se encuentra constituido de: Sombrero (Pielo), Pie reducido (Estipite) y Láminas (Himenio). En la figura 36 se observa una ilustración de la morfología del hongo (Uribe, 2014).

- Sombrero: forma de paraguas, más o menos circular, su desarrollo se da en forma de una ostra u oreja;
- Láminas: dispuestas radialmente como varillas de un paraguas, que va desde el pie que lo sostiene, hasta el borde, son anchas, blancas o cremas;
- Pie: es firme, blanco, algo peludo en la base, ligeramente duro.

Figura 2
Morfología del hongo Pleurotus ostreatus



Nota: Fuente: Uribe, 2014.

Producción de hongos

El ciclo de vida de los hongos, inicia a partir de una espora la cual generará el micelio primario. Este micelio primario, comienza a desarrollarse y crecer de manera vegetativa, es decir, sin formar los cuerpos reproductores. Al finalizar este crecimiento, las células serán capaces de cambiar su estructura celular que finalmente se desarrollarán en los cuerpos reproductores.

En el momento de que la espora germina, un pequeño filamento inicial comienza a aparecer, este filamento es llamado hifa. Esta hifa continúa creciendo, generando una red más densa llamada micelio. Luego de estar desarrollado completamente el micelio, este estará listo para generar los cuerpos reproductores, los cuales son el producto que se cosechará, en este caso, la Orellana (Uribe, 2014).

Los pasos básicos en el cultivo de los hongos, en general, tienen parámetros similares para su producción, variando entre una especie y otra los requerimientos nutricionales, pH, temperatura, CO₂, etc.

A continuación, se muestran los pasos generales que se deben tener en cuenta al producir hongos comestibles según Carvajal (2010):

1. Preparación del medio de propagación de las esporas en cajas de Petri o tubos de ensayo;
2. Germinación de las esporas en medios aislados de cualquier tipo de contaminación (asepsia completa), para desarrollar una excelente cepa madre;
3. Desarrollo completo del micelio en el medio de propagación que generalmente es agar;
4. Preparación de los granos de cereal donde se desarrollará la semilla del hongo a cultivar;

5. Mezcla de la semilla de granos inoculados, con el sustrato específico para el hongo a cultivar;
6. Etapa de incubación del sustrato en ambiente controlado con temperatura y humedades relativas entre los 23 – 27 °C y 90 – 100 % respectivamente. Esta hace referencia a la etapa vegetativa;
7. Etapa productiva del cultivo, se manejan temperaturas entre 16 – 20 °C, humedad relativa entre 80 – 90 % y CO₂ en mínimas concentraciones.

Caracterización de la materia prima

Se muestran los parámetros óptimos que debe tener los residuos para el correcto desarrollo del Hongo, pero hay que tener en cuenta que dependen principalmente de las condiciones ambientales y del tipo de sustrato sobre el cual se desarrollan.

Tabla 3

Parámetros para el crecimiento de Pleurotus ostreatus

Parámetro	%
Contenido de agua	88,89
Carbohidratos totales	7,74
Proteínas	2,27
Lípidos	0,1
Cenizas totales	1,0

Nota: Fuente: Carvajal, 2010.

Condiciones de incubación

La incubación tarda de 22 a 30 días y es necesario que la temperatura en el sitio de incubación permanezca de 23 a 24 °C, el área de incubación debe ser un lugar oscuro, fresco y cerrado para mantener la humedad de 70 a 80% (Carvajal, 2010).

Condiciones de fructificación.

Se aumentó la humedad de un 80 a 93% para inducir a la formación de cuerpos fructíferos, esta etapa se puede realizar en el mismo cuarto de incubación, si tosa las bolsas están cubiertas por el micelio, asimismo se debe manejar una temperatura de 16 a 18 °C (Carvajal, 2010).

3.3.5.3. Materiales

Material

- Sustrato de cacao;

- Fundas plásticas;
- Rotulador.

Reactivos

- Micelio de *Pleurotus ostreatus*;
- Agua destilada;
- Solución de Benomyl 0,02%.

3.3.5.4. Metodología

1. Sembrar *Pleurotus ostreatus* en el sustrato seco de cacao previamente tratado con Benomyl al 0,6% por 30 minutos una vez que se ha desarrollado en el trigo (para la siembra el sustrato de cacao debe estar lo más finamente dividido con el objetivo de que el hongo pueda aprovechar al máximo los nutrientes que este necesita para su crecimiento);
2. Colocar una cantidad adecuada de sustrato sembrado, hasta llenar a la mitad una funda transparente;
3. Rotular las fundas y colocar en un lugar fresco que se encuentre completamente oscuro y con calefacción para lograr una temperatura de 28°C (estas condiciones se deben mantener por al menos 14 días);
4. Observar durante los 14 días como los micelios de *Pleurotus ostreatus* se han esparcido completamente rodeando todo el sustrato, logrando así una apariencia algodonosa;
5. Mantener el material en condiciones de humedad, luz por 12 horas y oscuridad por el mismo período de tiempo en el día, dependiendo de que tanto se mantengan estas condiciones se podrá observar en mayor o menor tiempo, la fructificación del hongo;
6. Mantener a las setas en un espacio suficiente para expandirse;
7. Regar agua frecuentemente para evitar que estas se deshidraten;
8. Cosechar las setas al cabo de 4 o 5 días, para ese procedimiento solo se necesita cortar el hongo fructificado con la ayuda de un bisturí. Si se mantienen nuevamente las condiciones antes mencionadas se puede lograr una segunda y hasta tercera cosecha.

3.4. Discusión

La inoculación y el aislamiento de microorganismos en distintas muestras ambientales es una etapa importante para entender la ecología microbiana, las ciencias ambientales y la biotecnología. Las prácticas propuestas consideran el crecimiento de microorganismos en condiciones específicas de laboratorio para su posterior aislamiento, incluyendo bacterias, microalgas u hongos con sus

usos potenciales en diversas áreas. La microscopía óptica es una técnica muy utilizada para identificar microorganismos, que se ve complementado con técnicas tintoriales, para la identificación de grupos específicos de microorganismos.

Se profundiza en *Trichoderma* sp, un género de hongos con propiedades promotoras del crecimiento de las plantas para ser utilizado como biofertilizante en el cultivo de maracuyá; también se destacó el uso de otro hongo, *Pleurotus ostreatus*, un hongo con potencial en la biodegradación de contaminantes recalcitrantes. Las prácticas de laboratorio implicadas en la inoculación y aislamiento de microorganismos, la identificación mediante microscopía óptica y tinción, y el estudio de *Trichoderma* sp., microalgas y cianobacterias, y *Pleurotus ostreatus* en procesos de biorremediación pueden reducir el impacto ambiental de los contaminantes y promover prácticas sostenibles, no solo a nivel laboratorio, sino que pueden ser escaladas en plantas pilotos o comerciales.

3.5. Conclusiones

Las prácticas de laboratorio descritas en este capítulo serán una herramienta de aprendizaje para los estudiantes, técnicas de laboratorio y docentes. Se explica en todas las prácticas un fundamento teórico en base al método científico, que permiten entender los fundamentos teóricos previos a la experimentación. Por otra parte, el banco de preguntas y respuestas sobre Biotecnología Ambiental resolverá algunas dudas para aquellas personas cuyos intereses estén relacionados a esta área de conocimiento, además sirve para generar una base de datos que se podría utilizar en cuestionarios. Asimismo, se crea un debate para el mundo de la ciencia, dado que las preguntas abiertas tienen distintas posibles respuestas.

Referencias Bibliográficas

- Attias, N., Reid, M., Mijowska, S. C., Dobryden, I., Isaksson, M., Pokroy, B., ... & Abitbol, T. (2021). Biofabrication of nanocellulose–mycelium hybrid materials. *Advanced Sustainable Systems*, 5(2), 2000196.
- Cámara de conteo Neubauer improved. (s.f.). *Mikros testak.org*. Obtenido de http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php

- Camargo-Cepeda, D. F., & Ávila, E. R. (2014). Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura*, 11(1), 91-100.
- Carvajal-Millán. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 87-96.
- Chicaiza Ortiz, C., León Chimbolema, J., Godoy Ponce, S., Alvarado Ávila, G., & Chicaiza Ortiz, A. (2021). Ensayos de laboratorio para la obtención de biomasa algal en un fotobiorreactor discontinuo. *Revista Científica Y Tecnológica UPSE*, 8(1), 01-07. <https://doi.org/10.26423/rctu.v8i1.541>
- Cubillos-Hinojosa, J., Valero, N., & Mejía, L. (2009). *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81-86.
- Forman, G. S., & Carvalho, C. (2018). Design of sustainable textiles through biological systems and materials—innovative narratives within the circular economy. In *Textiles, identity and innovation: Design the future* (pp. 373-378). CRC Press.
- Gaitán-Hernández, R., Salmones, D., Pérez-Merlo, R., & Mata, G. (2006). Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. *Instituto de Ecología, AC, Xalapa, México*.
- Garzón Gómez, J. P., & Cuervo Andrade, J. L. (2008). Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. *NOVA- Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 6(10), 126–140.
- González-Meléndez, R., Cuevas, B., Cortes, M., & Sánchez, M. (2020). Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico. Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN: 978-607-30-3771-6
- H, Hector, Michelle Mejía, and María Álvarez. 2017. "Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y Aire)." *Mente Joven* 6: 09-20. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3666.
- Jones, M., Gandia, A., John, S., & Bismarck, A. (2021). Leather-like material biofabrication using fungi. *Nature Sustainability*, 4(1), 9-16.
- Lagier, Jean-Christophe, Sophie Edouard, Isabelle Pagnier, Oleg Mediannikov, Michel Drancourt, and Didier Raoult. 2015. "Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology." *Clinical microbiology reviews* 28 (1): 208-236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25567228>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones

básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18.

- Martínez Guijarro, R. Aguado García, D. y Aguas Vivas Pachés Giner, M. (2017). Manual de prácticas de laboratorio: evaluación de la calidad ambiental. Valencia, Spain: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/ereader/bibliotecaups/57455?page=13>.
- Melo, A., & Granada, D. (2021). Desarrollo de microeconomías regionales en la producción de aceites esenciales cosechados en suelos mineros-atn/rf 16110 Producto 16: Informe de implementación de ensayo piloto.
- Morinigo, I. A., Vega, G. D., Lesmo, N. D., Velázquez, J. A., Gennaro, K. H., y Alvarenga, J. D. (2019). Efecto del formulado comercial de *Trichoderma harzianum* en semillas de trigo. *Intropica*, 14(2), 104-111. <https://doi.org/10.21676/23897864.3095>
- Parmar, S., & Sharma, V. K. (2020). Endophytic fungi mediated biofabrication of nanoparticles and their potential applications. In *Microbial endophytes* (pp. 325-341). Woodhead Publishing.
- Torres Cartas, S. (2016). Química: prácticas de laboratorio. Valencia, Spain: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/57408>.
- Urdiales Jarro, J., Molina López, F., Chicaiza Ortiz, C., Alvarado Ávila, G., Navarrete Villa, V., & Ramos, I. (2022). Degradación de colillas de cigarrillos mediante *Pleurotus ostreatus* para su aprovechamiento como papel. Conferencia Congreso de Gestión Ambiental y Conservación de la Biodiversidad. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6582177>
- URIBE, F. Y. D. S. (2014). *Cultivo de orellas (Pleurotus ostreatus) en cinco sustratos generados en los procesos productivos agropecuarios, en dos épocas de siembra, en el municipio de ituango*. 1–92

