

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN ERITROCITOS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DURANTE LA PASANTÍA EN EL LABORATORIO DE CIENCIAS BÁSICAS, UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO



Leidy Geraldine Balcazar Alarcon

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Sede Bogotá, Colombia
Mayo 2023**

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN ERITROCITOS Y PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE HONGOS Y BACTERIAS DURANTE LA PASANTÍA EN EL LABORATORIO DE CIENCIAS BÁSICAS, UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO



Leidy Geraldine Balcazar Alarcon

Código estudiantil UAN 1013653477

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de;
Médico Veterinario**

Director

Francisco Javier Vargas Ortiz MV, MSc, PhD

**Universidad Antonio Nariño
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Sede Bogotá, Colombia
Mayo 2023**

Tabla de contenido

Resumen	4
Introducción.....	7
Justificación	8
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Descripción de la institución	10
Objetivos Universidad Antonio Nariño.....	10
Misión	12
Visión	13
Valores	
.....	13
Funciones realizadas.....	14
Marco teórico	16
Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos.....	16
Para que se hace un ensayo de citotoxicidad	16
Que es un herbicida.....	16
Roundup (glifosato-isopropilamonio).....	16
Resorcinareno (Rsthio).....	17
Eritrocitos.....	17
Solución salina.....	17
Evaluación de pureza de hongos criopreservados.....	18
Que es un hongo.....	18

<i>Rhizopus spp</i>	19
<i>Geotrichum spp</i>	19
<i>Cladosporium spp</i>	20
<i>Mucor</i>	20
<i>Aspergillus</i>	20
<i>Aspergillus níger</i>	21
<i>Penicillium spp</i>	21
<i>Paecilomyces</i>	21
<i>Fusarium</i>	21
<i>Botrytis</i>	22
<i>Trichoderma</i>	22
Siembra nueva para purificar las colonias de bacterias.....	23
Que es una bacteria.....	23
Colonia de bacterias.....	23
Cultivo de bacterias.....	24
Agar nutritivo.....	24
Agar sangre.....	24
Actividades realizadas	25
Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos.....	25
Evaluación de pureza de hongos criopreservados.....	36
Siembra nueva para purificar las colonias de bacterias.....	43
Tinción de gram	46
Discusión	47
Conclusiones	50

Recomendaciones.....	51
-----------------------------	-----------

Resumen

El presente informe documenta las actividades realizadas durante las pasantías como modalidad de trabajo de grado realizadas en el laboratorio de ciencias básicas de la universidad Antonio Nariño donde se cumplió con un mínimo de 250 horas. Durante este tiempo como pasante obtuve diferentes destrezas, además se realizaron variedad de actividades y proyectos como el ensayo de citotoxicidad en eritrocitos, la evaluación de la pureza e identificación de hongos y evaluación de pureza de bacterias.

Durante el ensayo de citotoxicidad en eritrocitos se utilizó sangre humana, el herbicida glifosato (roundup®) y un resorcinareno (rsthio®) para inhibir el efecto citotóxico del glifosato, se realizaron varios ensayos pero el efecto que se esperaba no ocurrió ya que los resultados obtenidos indicaban que el resorcinareno no causa ningún efecto inhibitor de la citotoxicidad del herbicida glifosato sobre los eritrocitos, porque al mezclar el glifosato, el resorcinareno y los eritrocitos se generó una mayor pérdida eritrocitaria. Es importante realizar más ensayos de citotoxicidad ya que a menudo las personas tienen contacto directo o indirecto con glifosato a la hora de utilizarlo como herbicida en sus cultivos sin precaución alguna.

Los hongos son organismos eucariotas que tienen especies multicelulares como unicelulares, tienen un ciclo de vida diverso con reproducción sexual, asexual y parasexual. para la purificación y evaluación de hongos se utilizó agar sabouraud como medio para su crecimiento, aislamiento y conservación. los hongos que se usaron son: *Rhizopus spp*, *Geotrichum spp*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium spp*, *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Botrytis*, para fines educativos.

Otra actividad que se apoyó fue la evaluación de pureza de bacteria, para esto se utilizó agar nutritivo y agar base sangre para su crecimiento, luego de evaluar su purificación, estos se usaron con fines académicos.

Gracias a las pasantías realizadas en el laboratorio, se adquirieron nuevos conocimientos en el área de microbiología, micología y bioquímica aportando así nuevas experiencias en este campo.

Palabras clave: laboratorio, citotoxicidad, glifosato, eritrocitos, resorcinareno, hongos, bacterias, agar, microbiología

Summary

This report documents the activities carried out during the internships as a degree work modality carried out in the basic sciences laboratory of the Antonio Nariño University, where a minimum of 250 hours was completed. During this time as an intern I obtained different skills, in addition to a variety of activities and projects such as the cytotoxicity assay in erythrocytes, the evaluation of the purity and identification of fungi, and the evaluation of the purity of bacteria.

During the cytotoxicity test in erythrocytes, human blood, the herbicide glyphosate (Roundup®) and a resorcinarene (Rsthio®) were used to inhibit the cytotoxic effect of glyphosate, several tests were carried out but the expected effect did not occur since the results obtained indicated that resorcinarene does not cause any inhibitory effect on the cytotoxicity of the herbicide glyphosate on erythrocytes, because when mixing glyphosate, resorcinase and erythrocytes, greater erythrocyte loss was generated. It is

important to carry out more cytotoxicity tests since people often have direct or indirect contact with glyphosate when using it as a herbicide on their crops without any precaution.

Fungi are eukaryotic organisms that have multicellular and unicellular species, they have a diverse life cycle with sexual, asexual, and parasexual reproduction. for the purification and evaluation of fungi, sabouraud agar was used as a medium for their growth, isolation and conservation. the fungi that were used are: rhizopus spp, geotrichum spp, aspergillus, mucor, trichoderma, paecilomyces, penicillium spp, aspergillus niger, fusarium, botrytis, for educational purposes.

Another activity that was supported was the evaluation of the purity of the bacteria, for this purpose nutrient agar and blood-based agar were used for their growth, after evaluating their purification, these were used for academic purposes.

Thanks to the internships carried out in the laboratory, new knowledge was acquired in the area of microbiology, mycology and biochemistry, thus contributing new experiences in this field.

keywords: laboratory, cytotoxicity, glyphosate, erythrocytes, resorcinarene, fungi, bacteria, agar, microbiology

Introducción

La Universidad Antonio Nariño es una entidad privada de educación superior de Colombia, con sede principal en Bogotá, aunque cuenta con sedes en todo el territorio nacional. Poseen laboratorios de alta calidad dotados de variedad de recursos que son necesarios para las diferentes actividades realizadas por los estudiantes y docentes, bien sea en alguna asignatura o como trabajo de investigación, además tiene personal capacitado que apoyan las diferentes actividades.

El presente informe se realizó con el fin de describir y dar a conocer las diferentes funciones y actividades realizadas en el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño para trabajo de grado con modalidad pasantía el cual consta de una duración de más de 250 horas, las pasantías fueron realizadas durante el segundo semestre del 2022 y donde se apoyó diferentes tareas durante este tiempo, entre las que destaca el proyecto de ensayo de citotoxicidad en eritrocitos, en este ensayo se utilizó sangre de personas, el herbicida glifosato y para inhibir su efecto citotóxico se utilizó un resorcinareno, estos productos se usaron a concentraciones de 0.1 g, 0.001 g y 0.0075 g, se dejó en una incubadora durante 24 horas a una temperatura de 26°C y posteriormente se procedió a leer los resultados. Este ensayo se realizó con el fin de lograr la inhibición del efecto citotóxico que genera el glifosato en los eritrocitos, ya que a menudo las personas tienen contacto directo o indirecto con glifosato a la hora de utilizarlo como herbicida en sus cultivos sin precaución alguna.

Otras actividades que se apoyaron fue la purificación y evaluación de hongos y bacterias, los cuales fueron usados para las diferentes clases que se realizaban en el laboratorio de ciencias básicas.

Justificación

Lo que me llevó a escoger el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño para las pasantías que realice, fue porque era un lugar donde contaban con espacios modernos que cumplían con los estándares de calidad, infraestructura y bioseguridad. Además me brindó la posibilidad de entender cómo se trabaja en un laboratorio, cuenta con insumos, materiales y equipos necesarios, tiene personal capacitado el cual está pendiente de las actividades que se realizan día a día en este lugar.

El glifosato es un herbicida de uso común en cultivos, para la desecación de granos y, por vía aérea, como madurante de la caña de azúcar y como desecante del sorgo, por ello es necesario realizar investigaciones sobre posibles inhibidores de la citotoxicidad generada por este herbicida.

Cuando empecé la pasantía en el laboratorio, se inició el proyecto de ensayo de citotoxicidad en eritrocitos en el cual tuve la oportunidad de participar, asimismo, gracias a las demás funciones que realice aprendí a identificar diferentes hongos y bacterias.

Objetivos

Objetivo general

Realizar un ensayo de citotoxicidad del glifosato sobre eritrocitos de sangre humana, además procedimiento de identificación de hongos y bacterias durante la pasantía desarrollada en el laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño como trabajo de grado.

Objetivos específicos

- Conocer las diferentes técnicas y herramientas de uso común en el laboratorio, de igual manera contribuir en las funciones, proyectos y trabajos que se realicen en el laboratorio de ciencias básicas de la universidad Antonio Nariño.
- Distinguir y reconocer algunos tipos de hongos y bacterias con ayuda de diferentes herramientas ofrecidas en el laboratorio.
- Realizar un ensayo de citotoxicidad del herbicida glifosato (Roundup®) sobre eritrocitos frescos adquiridos de muestras de sangre de personas y determinar el posible efecto de un Resorsinareno (Rsthio®) como inhibidor de la citotoxicidad.

Descripción de la institución

Universidad Antonio Nariño

Laboratorio de ciencias básicas - sede circunvalar

Los laboratorios de biología y química son una dependencia de la dirección nacional de laboratorios que trabaja en forma articulada con la facultad de ciencias de la Universidad Antonio Nariño. cuentan con espacios modernos que cumplen con los estándares de calidad, infraestructura y bioseguridad de la normatividad vigente.

Sus laboratorios cuentan con los insumos, materiales y equipos necesarios y suficientes para ofrecerles a los estudiantes de pregrado ambientes de trabajo adecuados para el desarrollo de actividades prácticas de las asignaturas que tienen componentes experimentales.

Tienen cobertura en la mayoría del territorio nacional, abarcando diferentes áreas del conocimiento.

Objetivos Universidad Antonio Nariño:

1. Acreditar los programas de pregrado y postgrado de acuerdo con las disposiciones gubernamentales nacionales e internacionales a un mínimo plazo.

2. Ampliar las oportunidades de acceso a quienes, en ejercicio de la igualdad de oportunidades, demuestren poseer las capacidades requeridas y cumplan las condiciones académicas exigidas. igualdad de oportunidades que se vea reflejada no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación en educación superior.

3. Propiciar condiciones, académicas y de bienestar, para que cada miembro de la comunidad educativa complete y cualifique su proyecto de vida de manera que posibilite su plena realización personal.

4. Fomentar medios y procesos de formación integral de ciudadanos con pensamiento autónomo y crítico, que permitan el desarrollo de la creatividad y procuren establecer compromisos al servicio de la construcción de futuro de la sociedad.

5. Estructurar programas de formación técnica, tecnológica, profesional y de postgrado acordes con los adelantos científicos y el actual proceso de globalización que permitan una mayor proyección de las regiones.

6. Impulsar dentro de un espíritu democrático, de respeto y de alta calidad, la libertad académica y la formación científica e investigativa.

7. Estimular el talento para la innovación, la producción y generación del conocimiento en los miembros de la comunidad educativa.

8. Incentivar, fortalecer y seguir desarrollando el quehacer investigativo con un sólido conocimiento de los antecedentes y los últimos avances de las ciencias, las artes y la tecnología.

9. Incorporar la investigación como fuente y componente de enriquecimiento de la gestión y la planeación de la universidad.

10. Dinamizar la estructura organizacional y los procesos de gestión, administración y evaluación, acorde con el dimensionamiento, la naturaleza, y la complejidad de la institución.

11. Identificar y responder proactivamente a los desafíos y cambios sociales, culturales, económicos y tecnológicos en los niveles local, regional y global.

12. Identificar nuevas tendencias y perspectivas de desarrollo y proponer elementos para aportar a la construcción de nuevos escenarios que caractericen el futuro del país.

13. Generar alternativas de formación continuada y permanente que respondan a la dinámica, evolución y crecimiento del conocimiento perteneciente a las disciplinas, profesiones, prácticas y oficios.

14. Realizar convenios, acuerdos o alianzas, con instituciones gubernamentales, no gubernamentales y sociales para la planeación y realización de proyectos, conjuntos de asesoría y consultoría que contribuyan al bienestar de las comunidades y los ciudadanos que las componen.

15. Fortalecer la relación entre universidad y su entorno e influir en el espacio de toma de decisiones del nivel local, regional y nacional.

16. Fortalecer la cultura y seguir desarrollando los procesos de autoevaluación y evaluación que conduzcan a consolidarse como una institución educativa autorregulada y en permanente crecimiento y consolidación.

Misión

Formar ciudadanos idóneos y competitivos, éticos y humanistas, con pensamiento autónomo y crítico, y personas altamente calificadas y comprometidas con los procesos de transformación positiva del país, fundamentados en la incorporación, difusión, generación e innovación del conocimiento universal.

Ejercer liderazgo educativo e investigativo, en ciencias, artes y tecnología, acorde con los procesos de globalización y adelantos científicos, que responda a los desafíos provenientes de los cambios locales, regionales, nacionales e internacionales.

Contribuir a la calidad y excelencia del talento humano mediante la formación académica e investigativa rigurosa que posibilite la creación y consolidación de grupos de investigadores que orienten el desarrollo científico, tecnológico, y artístico.

Contribuir a la democratización del conocimiento y promover la igualdad de oportunidades no sólo en el acceso sino en la posibilidad de concluir los ciclos de formación mediante la descentralización, la ampliación de la oferta educativa, la diversificación de programas, la generación de mecanismos de financiación y el establecimiento de sistemas de información.

Establecer los canales de comunicación con las comunidades y con sus líderes y gobernantes para realizar trabajos conjuntos que permitan la resolución de problemas, el mejoramiento de la calidad de vida y la generación de proyectos que procuren la satisfacción de las necesidades y anhelos de cambio.

Identificar nuevos escenarios, metas y perspectivas que permitan vislumbrar un proyecto futuro de localidad, región y país y trabajar para su realización.

Visión

Posicionarse como una de las mejores universidades del país, con pensamiento crítico, autónomo y global, acreditada nacional e internacionalmente, que al estar a la vanguardia del conocimiento, contribuye a la competitividad nacional en ciencias, artes y tecnología, es el reto de la Universidad Antonio Nariño.

Valores de la universidad antonio nariño

- Participación
- Autonomía
- Lealtad
- Confianza
- Honestidad
- Integridad

- Crítica.

Funciones realizadas

Descripción general de las funciones y actividades asignadas:

- Lavado, preparación y esterilización en autoclave del material que se va a utilizar.
- Destilar agua para uso general del laboratorio.
- Apoyo en el pesaje de fracciones: esto se realizó mediante el uso de una gramera.
- Procedimiento de percolación: se usaron 400 ml de etanol a una concentración del 70%, se pasó todo por percolación.
- Descongelamiento de células vero: se debe encender el baño serológico, cuando su temperatura esté en 37°C sacar las células del congelador (estas se encuentran en alícuotas) y sumergirlas en el agua sin introducir la tapa realizando movimientos de agitación para favorecer la descongelación.
- Seguimiento de células vero: el seguimiento se empezó a realizar 24 horas después de estar en la incubadora a una temperatura de 37°C y CO₂ al 5%, este seguimiento se hacía con el fin de ver la expansión de estas células.
- Introducción a la microbiología.
- Preparación de agar base sangre y agar nutritivo: se requieren para el pase de bacterias.
- Pase de bacterias: se usaron cajas de petri que contenían agar sangre y agar nutritivo, además se necesitaba de un asa estéril para el pase de diferentes bacterias, usando la técnica masiva y por agotamiento, esto se realizó para las clases que se hacían en el laboratorio de ciencias básicas, igualmente para dejar reservas en el laboratorio y por qué se solicitaron de otras sedes.

- Tinción de gram: se realizó para saber si la bacteria era gram positiva o gram negativa.
- Preparación de material y montaje para ensayo de glóbulos rojos: se requirió para el montaje de ensayo de citotoxicidad alistar los materiales un día antes.
- Lectura ensayos de hemoglobina.
- Preparación de agar sabouraud: se preparó y posteriormente se puso en cajas de petri para hacer pase de hongos.
- Pase de hongos: se realizó ya que se necesitaba que estuvieran puros porque había muchos que estaban contaminados.
- Identificación de hongos: se realizó su identificación por medio de impronta.



Figura 1: laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Antonio Nariño

Marco teórico

Ensayo de citotoxicidad de eritrocitos

Para que se hace un ensayo de citotoxicidad:

Es para determinar si algún químico o droga hará algún efecto tóxico o carga sobre el medio o material genético de las células, observándose así la pérdida de integridad de la membrana tras la muerte celular (Promega, 2023).

Que es un herbicida

Es un producto químico o no químico que se utiliza para inhibir o interrumpir el desarrollo de plantas indeseadas, también conocidas como malas hierbas, en terrenos que han sido o van a ser cultivados (Agroavances, 2020).

Roundup (glifosato-isopropilamonio) :

Es un herbicida no selectivo, de aplicación post-emergente y acción sistémica, recomendado para el control de la mayoría de malezas anuales y perennes en crecimiento activo. El herbicida que cae al suelo es inactivado inmediatamente mediante una reacción que ocurre con las arcillas sin dejar residuos que pueden afectar las siembras inmediatas ni tampoco penetrar por las raíces de cultivos ya establecidos (Agroactivo, 2023).

Resorcinareno (Rsthio):

Son macrociclos derivados del resorcinol que poseen una gran versatilidad en el reconocimiento de sustancias. Son poco solubles en agua. Estos compuestos tienen la facultad de formar una cavidad tridimensional en donde se menciona que pueden alojar diferentes iones o moléculas neutras, por medio de interacciones como puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, catión- grupos pi e hidrofóbicas (Caicedo O, et al, 2019).

Eritrocitos

Los eritrocitos también llamados glóbulos rojos o hematíes, son células altamente especializadas que contienen hemoglobina (es uno de sus principales componentes), cuya función principal es el transporte de oxígeno a todas las células del cuerpo y la remoción del dióxido de carbono producto de la oxidación celular. El eritrocito normal, o normocito, es un disco ovalado y bicóncavo que carece de núcleo y de la mayoría de organelos (Mejía M, Marco A. Alzate, 2015).

Solución salina

La solución salina o suero fisiológico tiene como principio el cloruro de sodio, o sal. Su uso está enfocado en combatir los estados de deshidratación por pérdidas salinas, además de ser el vehículo para administrar y rebajar los medicamentos y electrolitos (Monografías plus).

Evaluación de pureza de hongos criopreservados.**Que es un hongo:**

Son organismos eucariotas que tienen especies multicelulares como unicelulares. Los hongos multicelulares se componen de hifas que son filamentos y su conjunto se conoce como micelio. Las hifas es la unidad básica de los hongos y tiene pared celular compuesta de quitina en vez de celulosa como las plantas. Hay hifas tabicadas o septadas que quiere decir que posee una pared interna que divide la hifa en células. Otras hifas no tienen septos y son conocidas como cenocíticas. Entre especies de hongos puede variar el tipo de hifa y es una característica usada para identificar y describir la especie (Mayaguez. 2019). Un hongo puede tener varios tipos de micelio dependiendo la etapa de su ciclo de vida. Los hongos tienen un ciclo de vida diverso con reproducción sexual, asexual y parasexual. Este último es un mecanismo en donde no se involucra meiosis y estructuras sexuales para intercambio de material genético. A través de la reproducción producen esporas que son estructuras que toleran condiciones adversas. Esto permite que el hongo colonice otros lugares cuando los factores abióticos son favorables para la germinación de esta. También, los hongos pueden crecer de forma indeterminada dependiendo de los recursos disponibles y las condiciones favorables para su desarrollo. Algunos hongos pueden producir estructuras que se pueden observar a simple vista conocidas como cuerpos fructíferos. Los hongos son heterótrofos que quiere decir que no produce su propio alimento y requiere de la liberación de enzimas para la degradación de componentes que son absorbidos. Los hongos ayudan al reciclaje de nutrientes en el ambiente. Entre los hongos hay saprobios que se alimentan de materia orgánica que descomponen, otros pueden ser parasíticos que dependen de un hospedero para sobrevivir. También hay especies de hongos que son depredadores de otros organismos. Estos organismos almacenan sus reservas de alimento como moléculas de glicógeno y lípidos. Son organismos de gran importancia por ser degradadores de hemicelulosa, celulosa y lignina que son componentes de la pared celular de las plantas y de difícil rompimiento. la taxonomía de

este grupo ha sido estudiada encontrando que evolutivamente están más relacionado a los animales que a las plantas como en la antigüedad los colocaban. a través de estudios filogenéticos, se reagrupan en 8 filos: mucoromycota, zoopagomycota, chytridiomycota, blastocladiomycota, cryptomycota, microsporidia, ascomycota y basidiomycota. (Mayaguez. 2019).

Rhizopus spp

Se encuentran en el polvo de las casas, suelo, frutas, nueces y semillas, también se presenta en alimentos en proceso de descomposición. son colonias de rápido crecimiento, las especies patógenas tienden a crecer mejor a 37°C, su crecimiento se inhibe con cycloheximidas (Rodriguez B, 2016).

Son de tamaño ilimitado (llegan a cubrir todo el medio de cultivo). son colonias blancas, al alcanzar la madurez (cuarto día) comienzan a adquirir una tonalidad gris oscura (la tonalidad se debe al desarrollo de las estructuras de reproducción asexual las endosporas), son vellosas algodonosas y secas (Rodriguez B, 2016).

Geotrichum spp

Es un ascomiceto, se encuentran como microbiota en humanos, en personas severamente inmunosuprimidas provoca casos de infecciones pulmonares. Es un hongo que puede afectar a frutas y verduras durante la postcosecha, se encuentra enmarcado dentro de los agentes externos que pueden dar lugar a la degradación, podredumbre, malos olores y pérdida de sabor en los productos. (Rodríguez B, 2016).

Cladosporium spp

Es un hongo filamentoso, perteneciente al filo ascomycota y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura (Insst, 2022).

Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoidales o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Los conidios se forman por gemación sucesiva del conidio anterior, estando el conidio más joven y pequeño al final de la cadena.

Macroscópicamente forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales, de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos verde oliva y, a veces, gris verdoso o marrones (Rodríguez B, 2016).

Mucor

Pertenece a la familia mucoraceae, orden mucorales, que forman delicados filamentos tubulares blancos y esporangios negros esféricos. se conocen comúnmente como mohos. Se encuentra con frecuencia sobre el pan mohoso y las patatas en putrefacción, que se ha aislado en ocasiones de casos de otomicosis en el ser humano (Cruz I, Marquez I, Garcia S, 2017).

Aspergillus

La familia aspergilla ceae está compuesta de aproximadamente 180 especies, de las cuales cinco o seis son patógenas oportunistas.

Estos hongos están muy difundidos, viven como saprofitos en el suelo, los vegetales en descomposición, cualquier tipo de materia orgánica, como pintura fresca, alimentos enlatados abiertos o ricos en carbohidratos, ropa vieja, reactivos químicos, cuartos de hospital e incluso lentes de contacto blandas (Rodriguez B, 2016).

Son colonias de crecimiento rápido (maduran en 3 días), de crecimiento ilimitado, con tonalidad verde a grisácea, con una textura de granulosa a pulverulenta (Rodríguez B, 2016).

A. niger

Es un hongo que produce un moho negro en vegetales -muy común en la lechuga, el tomate o la acelga y limón. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus*. Su hábitat natural es el heno y el compostaje (Rodríguez B, 2016).

Penicillium spp

Es un hongo filamentoso hialino, saprófito perteneciente al filo ascomycota.

Se desarrollan sobre los más diversos sustratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. (Carrillo I).

Paecilomyces

Comprende una gran cantidad de especies ubicuas, cosmopolitas, considerados agentes de biodegradación y de descomposición, además de estar presentes en el suelo, insectos, nematodos, maderas, aire y agua, entre otros sustratos (Cruz R, Vieille P, 2020).

Fusarium

Género de hongo filamentoso que se encuentra comúnmente en el sustrato. Debido a la gran variedad de especies que engloba este hongo podemos clasificarlos según la parte de la planta a la que afecte (Asp Ozono).

El hongo que provoca la fusariosis es un hongo saprófito, por lo que es capaz de sobrevivir en el agua y en la tierra por mucho tiempo. Se alimenta de materiales en descomposición que se encuentran en el sustrato. El fusarium tiene facilidad para desarrollarse en entornos con altas temperaturas y no excesiva humedad en el suelo. Además, los cortes y las heridas en las plantas favorecen la penetración de este hongo al interior de la misma infectándola, (Asp Ozono).

Las especies de fusarium se encuentran entre los patógenos de plantas más comunes y extendidos en el mundo (Asp Ozono).

Botrytis

Grupo de hongos fitopatógenos. En cultivos y bajo condiciones de humedad relativa alta, la podredumbre gris puede infectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas. el ataque no sólo se produce sobre cultivos en el campo o en invernaderos, donde el hongo destruye rápidamente los tejidos y coloniza la planta; sino que también provoca enfermedades en postcosecha, comenzando con una infección latente en el cultivo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Romero B, Granados E, 2018).

Trichoderma

Es un hongo aeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas.

Siembra nueva para purificar las colonias de bacterias

Que es una bacteria

Es un microorganismo unicelular. Por lo general su tamaño es de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm) y se presentan de diversas formas: esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirales), etc. Además, son muy abundantes en el planeta y pueden vivir en condiciones ambientales muy extremas. Son células procariotas con una estructura sencilla, no presentan núcleo ni, en general, orgánulos membranosos internos. Suelen tener pared celular compuesta por peptidoglicano y algunas también presentan flagelos, u otros componentes que aguardan similitud con este, que les permiten moverse (Ambientech, 2001 - 2023).

clasificación según la pared celular:

- gram + (positiva): capa gruesa de peptidoglucano (o mureína) en la pared celular.
- gram – (negativa): capa delgada de peptidoglucano (o mureína) en la pared celular.

La distinción gram se consigue según el resultado en la tinción gram. aquellas bacterias que se tiñen de color violeta son las gram + (positivas), mientras las que tiñen de color rosa-rojizo gram – (negativas), (Ambientech, 2001 - 2023).

Colonia de bacterias:

Agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una unidad formadora de colonia (ufc) sobre un medio sólido, su tamaño es variable generalmente es visible a simple vista (Bustos M, 2021).

Cultivo de bacterias:

El cultivo bacteriano es un método que permite la multiplicación de células bacterianas en o sobre un medio de cultivo bajo condiciones controladas de laboratorio. Las condiciones exactas requeridas para una replicación óptima dependerá de la especie bacteriana objetivo (Steward K).

Agar nutritivo

Es un medio de cultivo no selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de microorganismos que tienen requerimientos nutricionales escasos, su uso está descrito principalmente para procedimientos en el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria. La pluripectona y el extracto de carne aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano; el cloruro de sodio (nacl) mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril, para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y en este caso permite una clara visualización de las reacciones de hemólisis. (Caycedo L, 2021).

Agar sangre

El agar sangre es un medio no selectivo, compuesto por un agar base que contiene una fuente proteica al cual se le agrega de 5% a 8% de sangre ovina; el agar sangre, permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias (gram positivas y gram negativas), permite verificar capacidad hemolítica (medio diferencial), las hemólisis que se pueden evidenciar en este medio son: beta, alfa y gamma (Caycedo L, 2021).

El agar sangre está preparado con un medio de cultivo deshidratado denominado agar base sangre, el cual está compuesto por agar-agar, infusión de músculo de corazón, peptona, cloruro de sodio; el color del medio es ámbar claro; cuando se agrega la sangre, su color cambia a rojo cereza. La sangre utilizada para preparar el medio generalmente es sangre de cordero, pero también puede ser sangre humana o de caballo, y, al respecto es importante considerar que algunas bacterias varían el tipo de hemólisis de acuerdo con la naturaleza de la sangre. El uso se fundamenta en que la infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de bacterias y otros microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico (Caycedo L, 2021).

Actividades realizadas

Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos

Para este proyecto pude brindar mi apoyo y colaboración en las diferentes funciones y actividades que se requerían, se empezó con la preparación de todo el material:

- 33 tubos falcon estériles
- 4 tubos de muestra color lila con edta para recolecta de sangre
- Herbicida glifosato (Roundup®)
- Resorcinareno (Rthio®)
- Solución salina estéril (nacl 0,95%)
- Erlenmeyer 100 ml estéril

- Micropipeta
- Puntas estériles
- Vasija con hipoclorito
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Autoclave
- Tubos capilares para microhematocrito

La mayoría del material que se utilizó fue necesario esterilizarlo, incluso se requirió de una buena limpieza del lugar donde se iba a realizar el montaje, así mismo fue necesario el uso de mecheros debidamente encendidos ya que si aparecía algún contaminante esto alteraría los resultados.

Este montaje se tuvo que repetir varias veces porque al momento de observar por el microscopio los tratamientos realizados aparecían con contaminantes y esto alteraba los resultados, otra falencia al momento de preparar el material era el uso del autoclave, muchas veces este no quería funcionar adecuadamente y tocaba estarlo programando hasta que la puerta cerraba correctamente.

Una vez listo el material, se procedió al montaje de ensayo de glóbulos rojos de la siguiente manera:

- Se tomó muestra de sangre de una persona o+ (es un tipo de sangre universal) en 4 tubos de muestra lila que contienen EDTA.
- Se trasvaso la muestra de sangre a los tubos falcon suavemente por la pared del tubo.
- Se puso en el baño de María la solución salina a 37°C durante 15 minutos.



Figura 2: Baño de maria para laboratorio.

- Se realizaron lavados de los eritrocitos de la siguiente manera:
 - Se centrifugó los 4 tubos falcon que contenían la sangre a 3500 RPM durante 10 minutos.
 - Posteriormente con una micropipeta y puntas estériles se sacó el plasma de todos los tubos y se descartó en una vasija con hipoclorito.



Figura 3: Tubos falcon con sangre centrifugada.

- Lavado de eritrocitos:
 - A los glóbulos rojos que quedaron en cada tubo, se les añadió 3 ml de solución salina por la pared del tubo falcón muy suave para evitar una hemólisis.
 - Se homogeneizó suavemente y se centrifugó a 3500 RPM durante 10 minutos.
 - Se extrajo el plasma y solución salina de todos los tubos y se descartó en la vasija con hipoclorito, quedando solo los glóbulos rojos, (este procedimiento se repitió 3 veces).



Figura 4: Lavado de eritrocitos.

- Posteriormente se ajustó la concentración de glóbulos rojos con solución salina y se vertió los eritrocitos en los tubos capilares para microhematocrito, se centrifugó a 11000 RPM durante 10 minutos en la microcentrífuga quejando una concentración de 4%.



Figura 5: Ajuste de concentración de eritrocitos al 4%.

- De la siguiente manera se realizó la preparación de las mezclas del herbicida glifosato como producto citotóxico y del resorcinareno como producto inhibidor de la citotoxicidad a diferentes concentraciones:

Tubo #	Cantidad utilizada de agua destilada estéril	Concentración utilizada del Herbicida Glifosato (Roundup®)

1	10 ml	0,1 g
2	10 ml	0,01 g
3	10 ml	0,0075 g

Tabla 1: Mezcla de agua destilada esteril con las diferentes concentraciones del glifosato.

Tubo #	Cantidad utilizada de agua destilada esteril	Concentración utilizada del Resorcinareno (Rsthio®)
1	10 ml	0,1 g
2	10 ml	0,01 g
3	10 ml	0,0075 g

Tabla 2: Mezcla de agua destilada esteril con las diferentes concentraciones de resorcinareno.

Tubo	Glifosato mezcla	Resorcinareno mezcla	cantidad total en cada tubo
1 (0,1 g)	3 ml de 0,1 g	3 ml 0,1 g	6 ml
2 (0,001) g	3 ml 0,01 g	3 ml 0,01 g	6 ml
3 (0,0075 g)	3 ml 0,0075 g	3 ml 0,0075 g	6 ml

Tabla 3: Se mezcla 3 ml de cada producto según concentración y se deja actuar por 10

minutos .

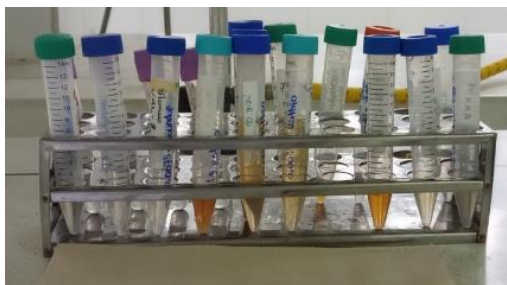


Figura 6: Productos preparados a diferentes concentraciones.

- Se realizó la preparación de los tratamientos con el herbicidas Glifosato y el Resorcinareno que se prepararon anteriormente, más los glóbulos rojos:

Producto	Tratamiento	# de réplicas	Concentración y cantidad del producto	Hematocrito 4%	Cantidad total del tratamiento
Glifosato (Roundup)	1	3	0,1 g (1ml)	1 ml	2 ml
	2	3	0,01 g (1ml)	1 ml	2 ml
	3	3	0,0075 g (1ml)	1 ml	2 ml
Resorcinareno (Rsthio)	4	3	0,1 g (1ml)	1 ml	2 ml
	5	3	0,01 g (1ml)	1 ml	2 ml
	6	3	0,0075 g (1ml)	1 ml	2 ml
Mezcla de Roundup +	7	3	0,1 g (1ml)	1 ml	2 ml
	8	3	0,01 g (1ml)	1 ml	2 ml

Rsthio	9	3	0,0075 g (1ml)	1 ml	2 ml
---------------	---	---	----------------	------	------

Tabla 4: Tratamientos preparados a diferentes concentraciones.



Figura 7: Tratamientos preparados y réplicas de cada uno.

- Controles:

control glóbulos rojos + s.s			
# Réplicas	Cantidad de hematocrito	Cantidad s.s	
3	1 ml	1 ml	

Tabla 5: Control de eritrocitos a una concentración del 4%, mezclados con solución salina.

Control glóbulos rojos		
# Réplicas	Cantidad de hematocrito	

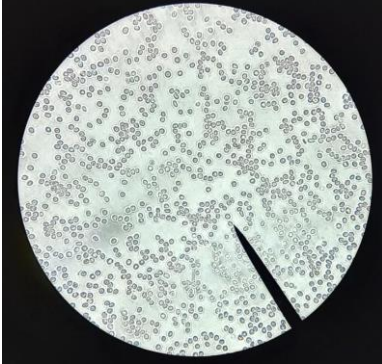
3	1 ml	
---	------	------------------------------------------------------------------------------------

Tabla 6: Control de eritrocitos a una concentración del 4%.

- Una vez terminados los tratamientos se procedió a pasarlos a la incubadora a 26°C durante 24 horas y al día siguiente se realizó lectura colocando una gota de 10 µl de cada tratamiento en diferentes láminas y se le colocó una laminilla encima, esto se realizó solo para una réplica de cada tratamiento y posteriormente por medio del microscopio se observó cada lámina, encontrando los siguientes resultados:

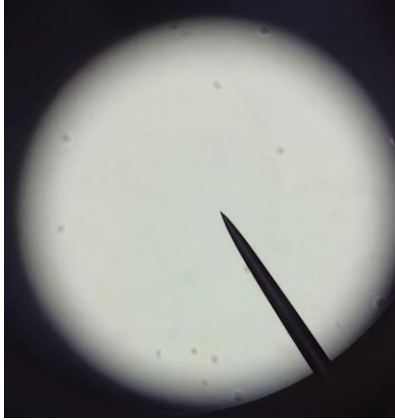
Tratamiento 1 Réplica 1		
# GR sanos	8	
# GR hinchados	1	
# GR crenados	1	
# GR muertos	-	

Tabla 7: Al mezclar el Glifosato con los eritrocitos a una concentración de 0.1 g, sólo se evidenciaron 8 eritrocitos sanos, 1 hinchado y 1 crenado, no se logran observar los muertos.

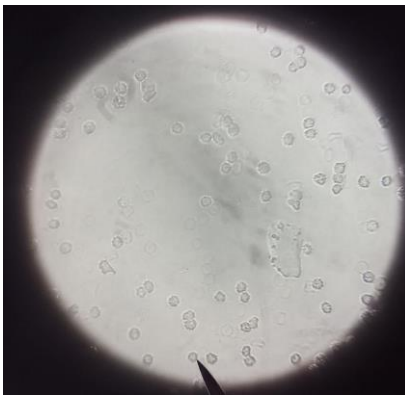
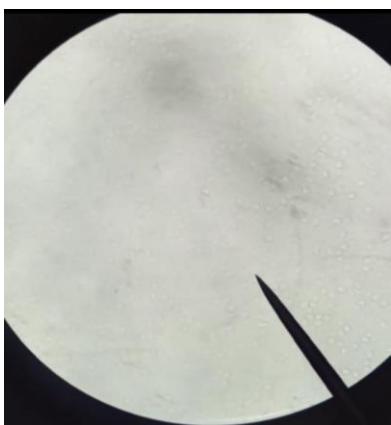
Tratamiento 2		
Réplica 1		
# GR sanos	12	
# GR hinchados	18	
# GR crenados	2	
# GR muertos	-	

Tabla 8: Al mezclar el Glifosato con los eritrocitos a una concentración de 0.01 g, sólo se evidenciaron 12 eritrocitos sanos, 18 hinchados y 2 crenados, no se logran observar los eritrocitos muertos.

Tratamiento 3		
Réplica 2		
# GR sanos	14	
# GR hinchados	4	
# GR crenados	32	

# GR muertos	66
---------------------	----

Tabla 9: Al mezclar el Glifosato con los eritrocitos a una concentración de 0.0075 g, sólo se evidenciaron 14 eritrocitos sanos, 4 hinchados, 32 crenados y 66 muertos.

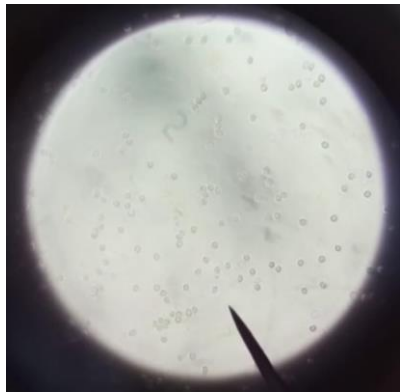
Tratamiento 4		
Réplica 1		
# GR sanos	45	
# GR hinchados	3	
# GR crenados	1	
# GR muertos	-	

Tabla 10: Al mezclar el Resorcinareno con los eritrocitos a una concentración de 0.1 g, sólo se evidenciaron 45 eritrocitos sanos, 3 hinchados, 1 crenado y no se logran observar los eritrocitos muertos.

Tratamiento 5		
Réplica 1		
# GR sanos	88	

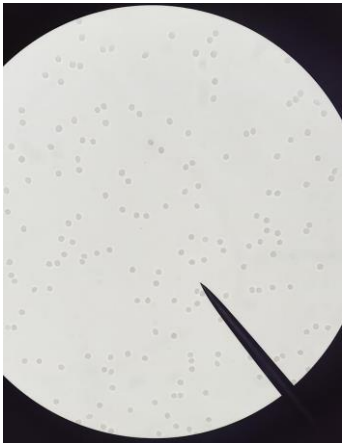
# GR hinchados	2	
# GR crenados	13	
# GR muertos	22	

Tabla 11: Al mezclar el Resorcinareno con los eritrocitos a una concentración de 0.01 g, sólo se evidenciaron 88 eritrocitos sanos, 2 hinchados, 13 crenados y 22 muertos.


Tratamiento 6		
Réplica 1		
# GR sanos	204	
# GR hinchados	5	
# GR crenados	31	
# GR muertos	32	

Tabla 12: Al mezclar el Resorcinareno con los eritrocitos a una concentración de 0.0075 g, sólo se evidenciaron 204 eritrocitos sanos, 5 hinchados, 31 crenados y 32 muertos.

Tratamiento 7 y 8	
Réplica 1	

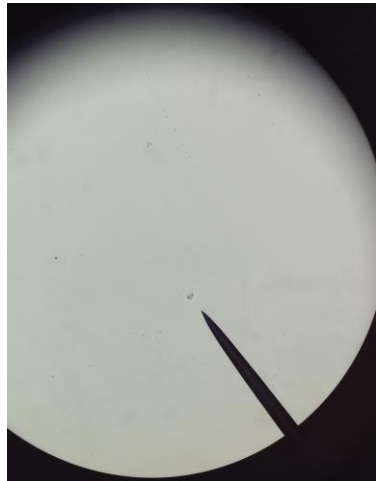
# GR sanos	-	
# GR hinchados	-	
# GR crenados	-	
# GR muertos	-	
Hemólisis		

Tabla 13: Al mezclar el Glifosato y Resorcinareno con los eritrocitos a una concentración de 0.1 g y 0.01 g se evidencio hemólisis total de los tratamientos 7 y 8 .

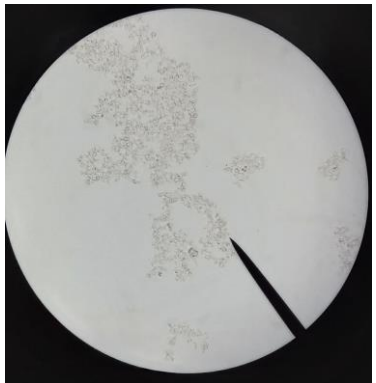
Tratamiento 9		
Réplica 1		
# GR sanos	1	
# GR hinchados	-	
# GR crenados	-	
# GR muertos	-	
Muchos restos celulares		

Tabla 14: Al mezclar el Glifosato y Resorcinareno con los eritrocitos a una concentración de 0.075 g se evidencio muchos restos celulares en el tratamiento 9 y un solo eritrocito sano.

Evaluación de pureza de hongos criopreservados

Durante la pasantía, otra función asignada era realizar pase e identificación de hongos hasta purificarlos, esto se realizó utilizando agar sabouraud para su crecimiento, en la etiqueta del producto se encontraban las instrucciones indicando que para un litro de agua se usaban 65.0 gramos del producto, se preparó 300 ml del agar, posteriormente se dejó hervir y se esterilizó en el autoclave junto con las cajas de petri, una vez terminada la esterilización, como las cajas quedaban mojadas se procedió a dejarlas en el horno para eliminar exceso de agua.

Luego que se secaron las cajas de petri, se procedió a dejarlas junto al mechero encendido para evitar que se contaminaran ya que este alcanza a cubrir 2 metros evitando así la proliferación de microorganismos, se espero a que se enfriara un poco el agar y luego se sirvió en las cajas de petri quedando cada una con 25 ml de este agar, se espero a que se gelificaran y con ayuda de un asa esteril se realizaron los pases de hongos, terminado este procedimiento se pasaron a la incubadora a 26°C y se dejaron durante 4 días para su crecimiento.

Esta purificación y pase de hongos se utilizaron para las clases que se realizaban en el laboratorio de ciencias básicas como fines académicos, otros se hicieron para dejar reserva en el laboratorio. Hubo unos hongos que después de los 4 días que se dejaron en la incubadora, al momento de revisarlos estaban contaminados y se tuvo que repetir el procedimiento hasta que se observara su pureza.

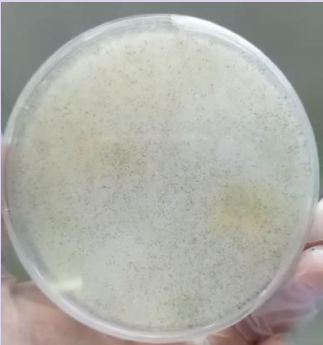

Impronta de hongos:


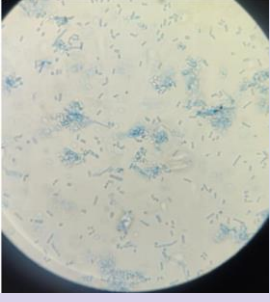
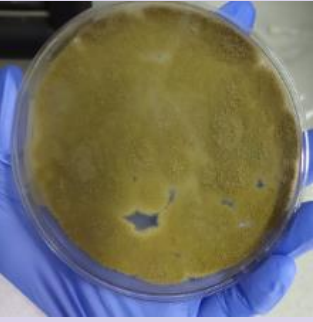
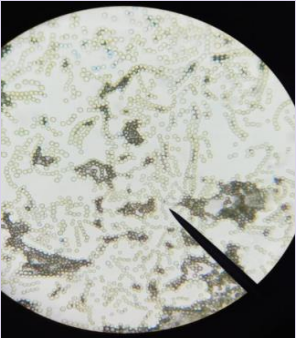
Para confirmar que fuera el hongo correcto y que estuviera puro, se realizaron improntas colocando en una lámina una gota de azul lactofenol y posteriormente encima de

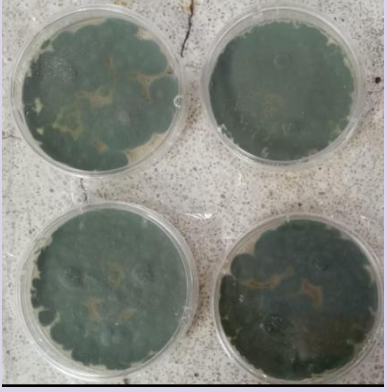


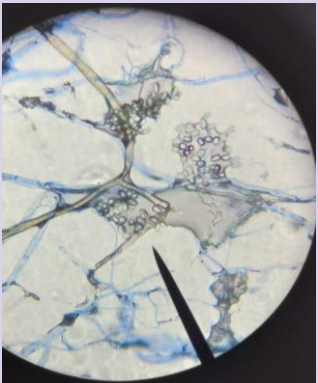
este se colocó la cinta que contenía el hongo (debe tener contacto con el reactivo), luego se procedió a observarse por el microscopio usando los diferentes objetivos y se describió cada hongo según la imagen microscópica.



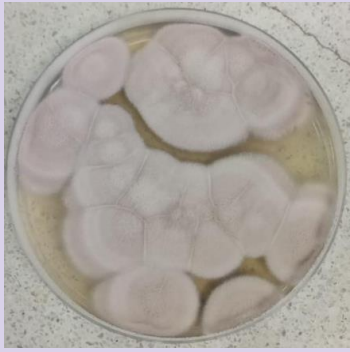
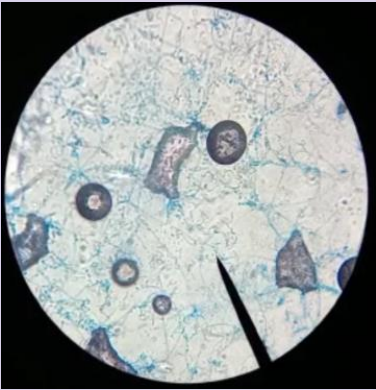



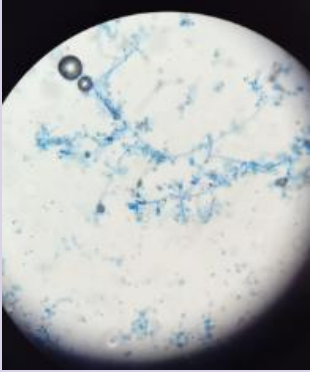


Figura 8: Microscopio

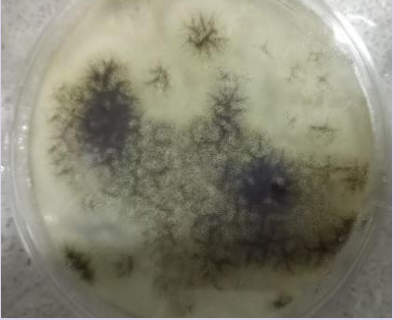
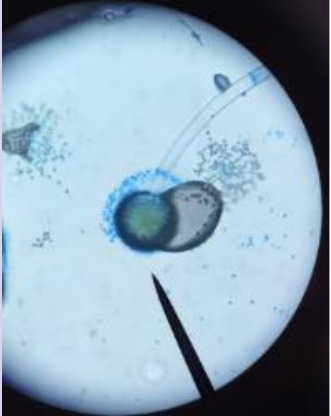
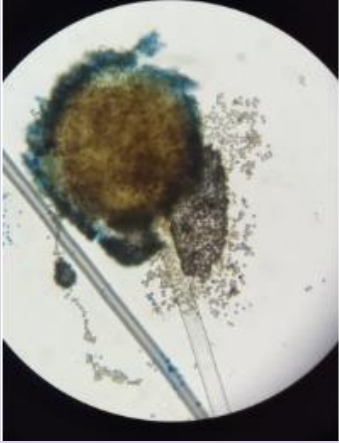
Hongo	Imagen macroscópica	Imagen microscópica
<i>Rhizopus spp</i>	 <p>Colonia madura algodonosa de color blanco grisáceo.</p>	 <p>Esporangiosporas hialinas y ligeramente café, hongo con hifas hialinas no septado, con esporangióforos largos, color azul.</p>

<p><i>Geotrichum</i> <i>spp.</i></p>	 <p>Colonia en crecimiento, su tamaño es ilimitado, son de color blanco - beige, de aspecto veloso.</p>	 <p>Hongo hialino con hifas septadas, con artrosporas de forma cilíndrica y gruesas, su coloración es azul.</p>
<p><i>Aspergillus</i></p>	 <p>Colonia madura, con esporas de color verdosa amarillenta, su textura es polvoreante plana.</p>	 <p>Hongo con hifas llamadas conidióforos, estos son largos, las hifas hialinas son septadas, es un hongo de color verde claro y oscuro.</p>

<p><i>Penicillium</i></p>	 <p>Colonia circular u ovoide, crecen rápido, con faciculos, al inicio son de color blanco, con el tiempo su color se vuelve verde.</p>	 <p>Hongo hialino septado, sus conidióforos son simples o ramificados, sus ramificaciones son similares a un pincel, con coloración azul.</p>
<p><i>Botrytis</i></p>	 <p>Colonia de color café amarillenta grisaseo, de crecimiento moderado, textura lanosa.</p>	 <p>Hongo con micelio hialino septado con perforación en el centro, con ramificaciones alternas o rectas.</p>

<p><i>Fusarium</i></p>	 <p>Colonia va de color blanco, beige, salmón, amarillo, violeta, rosa. Su textura es algodonosa.</p>	 <p>Hongo con micelio hialino ramificado y tabicado con esporóforos en forma de fiálides y conidios, con tamaños y formas variables. tiene macroconidios falciformes con varios septos. las esporas tienen forma de media luna.</p>
<p><i>Paecilomyces</i></p>	 <p>Colonia de color blanco al inicio y con el tiempo toma un color rosa-lilaceo, con textura lanosa a polvorienta.</p>	 <p>Hongo con hifa hialina septada, conidióforos irregulares y verticilados, las fialidas son alargadas y en racimo.</p>

<p><i>Trichoderma</i></p>	 <p>Colonia que al inicio su coloración es blanco amarillosa y más tarde es blancoverdosas con textura correosa.</p>	 <p>Hifas hialina, septadas, ramificadas, con pared rugosa, dan origen a conidióforos ramificados irregularmente piramidales, posee fiálides agrupadas, en forma cilíndrica. los conidios con pared rugosa de forma globosa.</p>
<p><i>Mucor</i></p>	 <p>Colonia joven es blanca pero cuando esta vieja toma una tonalidad café, su consistencia es un poco algodonosa</p>	 <p>Se observa un esporangio simple con liberación de esporas, con esporangióforo hialino y largo no septado.</p>

<p><i>Aspergillus</i> <i>Níger</i></p>	 <p>Colonia de color blanco amarillento con puntos negros verdosos, por el otro lado son color crema, es hongo que crece rápido, su textura es como algodónosa.</p>	  <p>Hongo con hifas hialinas septadas, con esporas esféricas dentro de la color es amarillento café y negro.</p>
--------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Siembra nueva para purificar las colonias de bacterias

Para la siembra de bacterias se usó el agar base sangre y agar nutritivo.

- En el envase del agar se encontraban las instrucciones de cuánto se debía utilizar para su preparación (el agar viene deshidratado en polvo).
- Se calculaba la cantidad haciendo una regla de 3 cuando se iba a preparar el agar nutritivo o agar base sangre y posteriormente se mezclaba con agua en un erlenmeyer.

- Después de haber mezclado el agar bien sea nutritivo o agar base sangre, se llevaba a una plancha de calentamiento donde tocaba esperar a que hirviera (esto con el fin de que al momento de usarlo se gelificara) y después de esto, se dejaba en el autoclave con las cajas de petri para su esterilización.



Figura 9: Agar esteril y plancha con Agar hirviendo.

- El autoclave duraba 2 horas esterilizando, luego que acababa, se dejaba todo junto a un mechero encendido para que se mantuviera esteril y así evitar que se contaminaran.
- Para el agar base sangre, se esperaba a que estuviera tibio para poder verter la sangre (Se utilizaba sangre de uno mismo o de los profesores).
- Posteriormente se servía el agar en las cajas de petri y se esperaba a que se gelificara.



Figura 10: Cajas de petri con agar Nutritivo.

- Cuando el agar ya se había gelificado se procedió a realizar los pases de bacterias usando un asa que se esterilizaba seguido en el mechero y las bacterias que se usaron provenían de cajas de petri viejas.



Figura 11: Esterilización de asa.

- Para los pases de bacterias se usó el método masivo y por agotamiento, las bacterias que se usaron provenían de otras cajas de petri que habían de reserva.

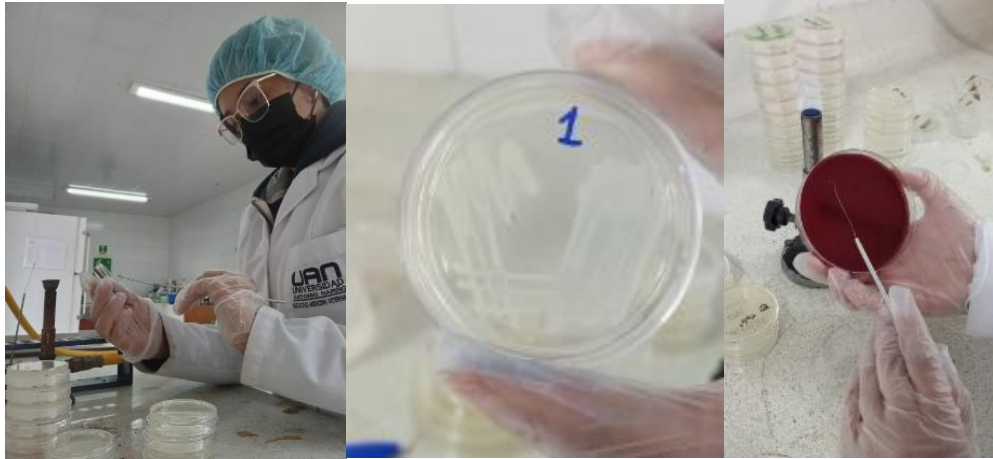


Figura 12: Pase de bacterias, método masivo y por agotamiento.

- Una vez hecho los pases de bacterias se dejaron en una incubadora a 37°C durante 24 horas, posterior se revisó caja por caja y se colocaban en la nevera, las que quedaban mal o contaminadas se volvían a realizar.



Figura 13: Incubadora

Tinción de gram

- Para poder identificar las bacterias gram positivas y gram negativas se usaron láminas donde se colocaba la bacteria y posteriormente se usaban los diferentes químicos para esta tinción de la siguiente manera:

1. Cristal violeta: Se aplicó en gran cantidad, tapando la lámina en su totalidad, se dejó durante un minuto, posteriormente se retiró el producto lavando la lámina con abundante agua.
2. Lugol: Se aplicó en gran cantidad, tapando la lámina en su totalidad, se dejó durante un minuto, posteriormente se retiró el producto lavando la lámina con abundante agua.
3. Alcohol Acetona: Se aplicó en gran cantidad, tapando la lámina en su totalidad, se dejó durante 40 segundos, posteriormente se retiró el producto lavando la lámina con agua.
4. Fucsina: Se aplicó en gran cantidad, tapando la lámina en su totalidad, se dejó durante un minuto, posteriormente se retiró el producto lavando la lámina con agua.

Una vez terminado los anteriores pasos, se dejó secar la lámina y posteriormente se observó en el microscopio para clasificar la bacteria.



Figura 14: Tinciones de Gram

DISCUSIÓN

Ensayo de citotoxicidad en eritrocitos:

Estudios *in vitro* han mostrado que el glifosato es citotóxico para células tanto humanas como de otros animales, asimismo, se ha demostrado que las formulaciones comerciales como el Roundup son más tóxicas que el compuesto activo y esto se ha atribuido a la presencia de adyuvantes en las formulaciones comerciales (Martinez A, et al, 2007).

No se conoce el mecanismo de citotoxicidad del Glifosato, se cree que puede involucrar cambios en la permeabilidad de las membranas o en la actividad de enzimas mitocondriales que conducirán a la muerte celular. (Martinez A, et al, 2007).

Los resorcinarenos son macrociclos derivados del resorcinol que poseen una gran versatilidad en el reconocimiento de sustancias. Son poco solubles en agua. Estos compuestos forman una cavidad tridimensional en donde pueden alojar diferentes iones o moléculas neutras, por medio de interacciones como puente de hidrógeno, dipolo-dipolo, catión- grupos pi e hidrofóbicas (Caicedo O, et al, 2019).

El Rsthio es un resorcinareno, el cual fue utilizado para contrarrestar el efecto citotóxico que causa el glifosato en los eritrocitos de las personas. En este estudio se evidencio que los eritrocitos al ser mezclados con Glifosato (Roundup®) a diferentes concentraciones 0.1 g, 0.01 g y 0.0075 g, hay mayor pérdida de la viabilidad celular al aumentar la concentración del producto.

Al mezclar los eritrocitos con el resorcinareno, a concentraciones de 0.1 g, 0.01 g y 0.0075 g, también se evidencia daño celular al aumentar la concentración del producto, este resultado no se esperaba, ya que la idea era que no causara ningún efecto en los eritrocitos.

Al mezclar los eritrocitos con el Glifosato (Roundup®) y Resorcinareno (Rsthio®) sin importar la concentración se evidencio los tratamientos hemolizados en su totalidad y al observar por el microscopio sólo se observó restos celulares.

Se necesitan más estudios sobre posibles inhibidores que actúen sobre el efecto citotóxico que causa el glifosato en los eritrocitos, ya que el glifosato es un producto que se ha utilizado para controlar malezas y erradicar cultivos ilícitos, la mayoría de los cultivadores y demás personas han incrementado significativamente el uso del glifosato sin tener en cuenta la afectación que estos tienen sobre los ecosistemas y la salud del ser humano.

Es necesario profundizar más sobre los efectos y mecanismos de acción de estos pesticidas sobre la salud humana, así como alternativas para su tratamiento.

Evaluación de pureza de hongos criopreservados:

Un hongo es un organismo eucariota que pertenece al reino Fungi. Los hongos forman un grupo polifilético y viven sobre materias orgánicas en descomposición.

Las paredes celulares de los hongos están formadas por quitina. Aquellos que fructifican logran producir esporocarpos (Definicion.De, 2023).

La alimentación de los hongos se conoce como osmotrofia (los nutrientes son absorbidos de sustancias disueltas), mientras que la digestión es externa y segrega enzimas. Gracias a su capacidad de descomponer la materia muerta de animales y plantas, los hongos cumplen un rol importante en los ciclos biogeoquímicos (Definicion.De, 2023).

Al momento de realizar los pases de hongos e identificación, se evidencio que el hongo *penicillium* era el que siempre contaminaba los demás hongos así se tuviera precaución, el hongo *Geotrichum spp*, fue el que más se dificulto su crecimiento ya que al dejarlo en la incubadora a 26°C durante 4 días no crecía, por eso se decidió coger un disco de reserva que estaba en el congelador en una alícuota, se puso en agar sabouraud, luego en una incubadora a 26°C durante 4 días y así fue como creció, los hongos que se purificaron fueron: *Rhizopus spp*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium spp*, *Aspergillus níger*, *Fusarium*, *Botrytis*. Se logró la viabilidad en la conservación de las cepas

de hongos aislados e identificados para su posterior utilización como era en las clases que se realizaban en el laboratorio.

La descripción clara y concisa de la morfología macro y micro me permitió identificar el género del hongo, al inicio fue con gran dificultad ya que era algo que yo nunca había hecho pero luego con el tiempo y la práctica logre identificar cada hongo.

Siembra nueva para purificar las colonias de bacterias:

Las bacterias fueron descritas por primera vez por el naturalista holandés Antoni van Leeuwenhoek, las observó con la ayuda de un microscopio simple construido por él mismo. Comunicó su descubrimiento a la Real Sociedad de Londres en 1683, pero la bacteriología no se desarrolló como ciencia hasta mediados del siglo XIX.

Los microorganismos crecen fácilmente cuando se les facilitan todas las condiciones necesarias para su multiplicación. De esta manera una sola bacteria puede dar lugar a la generación de miles de millones de individuos en pocas horas, esto se confirmó al momento de realizar los pases de bacterias sobre agar base sangre o agar nutritivo y posteriormente dejándolos en una incubadora a 37°C durante 24 horas, pasado este tiempo al evaluar las colonias se evidencio su rápido crecimiento, estas bacterias también se usaron en las diferentes clases que se dictaban en el laboratorio de ciencias básicas de la universidad Antonio Nariño.

Al trabajar con bacterias logre reconocer cuales eran gram positivas y gram negativa, es importante que este tipo de pasantía se siga realizando para estimular a los estudiantes y sientan interés al trabajar en los laboratorios.

Gracias a esta práctica como pasantía de trabajo de grado, se adquirió gran conocimiento en las áreas de microbiología, micología y bioquímica. El periodo de pasantías resultó ser beneficioso en este campo.

Conclusiones:

Durante las pasantías como modalidad de trabajo de grado, se realizaron diferentes funciones y actividades en el laboratorio de ciencias básicas de la universidad Antonio Nariño, lo que me permitió adquirir experiencia en el montaje de un ensayo con fines de investigación.

En la evaluación de pureza de hongos criopreservados y bacterias, me permitió de manera clara, entender cómo se realizan los pases hasta lograr la purificación de las colonias, incluso a distinguir los diferentes tipos de hongos.

Tanto las bacterias como los hongos necesitan medios de cultivo específicos para su desarrollo como: Agar sabouraud, agar base sangre, agar nutritivo, que cuentan con sustancias nutritivas para que las bacterias y hongos se desarrollen en condiciones favorables.

En el ensayo de citotoxicidad en eritrocitos, los resultados obtenidos en este estudio indican una alta citotoxicidad celular a diferentes concentraciones del producto glifosato. Las personas que tienen contacto directo o indirecto con Glifosato deben tener mayor precaución.

Se realizaron varias repeticiones del ensayo de citotoxicidad en eritrocitos, mostrando en todos que el resorcinereno no contrarresta el efecto citotóxico del glifosato en los eritrocitos, asimismo al utilizarlo solo con los eritrocitos también se evidencia pérdida eritrocitaria.

Recomendaciones:

Es fundamental que se sigan realizando este tipo de pasantías con modalidad de trabajo de grado porque nos permite adquirir experiencia en las investigaciones que se realicen allí.

Se debe seguir fortaleciendo el conocimiento de los estudiantes para su formación como profesionales.

Se recomienda hacer mayor investigación sobre el efecto de glifosato (Roundup®) en los eritrocitos, ya que, es un herbicida que es usado en Colombia en aspersion de cultivos, para la desecación de granos y, por vía aérea, como madurante de la caña de azúcar y como desecante del sorgo.

Se recomienda hacer más ensayos con posibles inhibidores del glifosato puesto que el Resorcinareno fue ineficaz y el glifosato por lo general es usado en muchos cultivos.

Bibliografía:

1. Ambientech, 2001 - 2023: <https://ambientech.org/bacteria>
2. Agroavances,2020: <https://agroavances.com/sabiasque-detalle.php?idsab=491#:~:text=un%20herbicida%20es%20un%20producto,o%20van%20a%20ser%20cultivados.>
3. Agroactivo, 2023: <https://agroactivocol.com/producto/sanidad-vegetal-alimentos-saludables/herbicidas-quimicos/no-selectivos/herbicida-glifosato-roundup-activo/>
4. Asp ozono: <https://www.aspozono.es/que-es-y-como-ataca-el-fusarium.asp>
5. Bustos m. universidad cristóbal colón. studocu. 2021: <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-cristobal-colon/bioquimica/colonias-bacterianas/11145401>
6. Carrillo l: <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/5penicilios.pdf>
7. Caycedo L, Corrales L, Trujillo D, 2021, Scielo:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702021000100049&lng=pt&tlng=es
8. Caicedo O, et al, 2019, Universidad Santo Tomas:
<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/22583/2019obradithcaicedo3.pdf?sequence=3>
9. Cruz i, Marquez I, Garcia S,. 2017:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0185-33092017000300397
10. Cruz R, Vieille P 2020: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s0716-10182020000300263&script=sci_arttext

11. INSST. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. 2022:
<https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/cladosporium-spp#:~:text=cladosporium%20es%20un%20hongo%20filamentoso,de%20color%20hialino%20a%20marr%3%b3n>.
12. Martínez B., Danay InfanteI , Yusimy Reyes 2013. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1 (2013): 1-11
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>
13. Mejía M, Marco A,. Alzate. Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ingeniería.Revista Ingeniería. 2015:
<http://www.scielo.org.co/pdf/inge/v21n1/v21n1a03.pdf>
14. Monografias Plus: <https://www.monografias.com/docs/eritrocitos-en-soluciones-salinas-fku7rxtfj8gny>
15. Promega, 2023: <https://worldwide.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/#:~:text=los%20ensayos%20de%20citotoxicidad%20miden,hayan%20filtrado%20hacia%20el%20exterior>.
16. UPRM-Mayaguez. 2019: <https://www.uprm.edu/labs3417/wp-content/uploads/sites/176/2019/10/los-hongos-ed-sept-2019.pdf>
17. Rodriguez B, 2016, atlas de identificación micológica:
<https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/18/rhizopus-spp/>
18. Romero B, Granados E, 2018:
<https://www.syngentaornamentales.co/news/articulo/botrytis-biologia-del-patogeno-la-base-de-un-control-quimico-eficiente>
19. Steward K, Inmunología y Microbiología: <https://www.newscourier.com/immunology/articles/an-introduction-to-culturing-bacteria-355566>

