

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE COLOMBIA**

**MANUAL DE  
PROCEDIMIENTOS  
BANCO DE CEPAS Y GENES**

**Santafé de Bogotá, 1995**

**COORDINADORA: *MARTHA L. DIAZ TORRES*  
Bacterióloga C. M. C.**

## **TABLA DE CONTENIDO**

### **INTRODUCCION**

#### **1. PRESERVACION DE MICROORGANISMOS**

##### **1.1 METODOS**

###### **1.1.1 SUBCULTIVO**

###### **1.1.2 TRANSFERENCIA PERIODICA**

###### **1.1.2.1 TUBO DE ENSAYO**

###### **1.1.2.2 CON PARAFINA LIQUIDA**

###### **1.1.2.3 EN SUELO ESTERIL**

###### **1.1.3 CONGELAMIENTO**

###### **1.1.3.1 CONSERVACION A 4°C**

###### **1.1.3.2 CONSERVACION A -20°C Y -70°C**

###### **1.1.3.3 CONSERVACION CON NITROGENO LIQUIDO**

###### **1.1.4 LIOFILIZACION**

#### **2. PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACION DE MICROORGANISMOS EN EL IBUN.**

##### **2.1 SIEMBRA DEL MICROORGANISMO EN CALDO LB**

##### **2.2 LECTURA DE LA DENSIDAD OPTICA**

##### **2.3 CONSERVACION A -70°C**

##### **2.4 CONSERVACION A - 20°C**

##### **2.5 LIOFILIZACION**

##### **2.6 EVALUACION DE VIABILIDAD**

#### **3. MEDIOS DE CULTIVO**

#### **4. COLORANTES Y TECNICAS**

#### **5. ANTIBIOTICOS**

#### **BIBLIOGRAFIA**

## **INTRODUCCION**

El presente manual ha sido elaborado con el fin de orientar las actividades realizadas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Biotecnología, con un énfasis especial en el manejo técnico del proyecto Banco de Cepas y Genes; dando a conocer los diferentes métodos o procedimientos requeridos en la conservación y mantenimiento de microorganismos, así como en los diversos medios de cultivo comúnmente usados en el laboratorio.

Esperamos que éste manual cumpla con los objetivos propuestos y sea la base fundamental en el mejoramiento progresivo de éste proyecto.

# MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BANCO DE CEPAS Y GENES

## 1. PRESERVACION DE MICROORGANISMOS

Hay varias formas de preservar una bacteria, algunas bacterias resultan ser muy delicadas y requieren de métodos especiales. Entre los métodos tradicionalmente utilizados en preservación de microorganismos son el subcultivo, liofilización, congelamiento, metabolismo reducido y transferencia periódica, entre otras. Algunas especies requieren transferencia de días, semanas, meses o años.

### 1.1 METODOS

#### 1.1.1 SUBCULTIVO

Es la transferencia de microorganismos a tubos de ensayo con agar nutritivo inclinado o un medio específico a cada microorganismo. Este es un método utilizado como método de rutina en el manejo de cepas que se trabajan con determinada frecuencia. Uno de los más graves problemas que se puede presentar en éste método es la fácil contaminación de los tubos y del medio. En todos los métodos de subcultivo los tubos deben estar bien sellados y la frecuencia de subcultivo está dada según el tipo de microorganismo a preservar, que por lo general es de pocas semanas o una semana.

#### 1.1.2 METABOLISMO REDUCIDO TRANSFERENCIA PERIODICA

##### 1.1.2.1 TUBO DE ENSAYO

La frecuencia del subcultivo puede ser reducida manteniendo al microorganismo en un metabolismo reducido, con mínimos nutrientes en el medio de cultivo o por almacenamiento a bajas temperaturas ya sea cubriendo con glicerol al 50% o con parafina.

Un excelente medio utilizado es el *AGAR EXTRACTO DE CARNE* descrito por Kauffman (1966) Los tubos deben ser muy bien tapados y los microorganismos pueden sobrevivir varios años en un refrigerador normal, - 4 °C, el principio de éste método es mantener al microorganismo en un medio reducido de nutrientes.

##### 1.1.2.2 CON PARAFINA LIQUIDA

Otro método simple es la preservación con parafina líquida, en el que es adicionada parafina líquida estéril al tubo que contiene el medio de cultivo con el microorganismo crecido, los microorganismos se pueden conservar a 0-5°C, y con éste método puede ser empleado para hongos.

### **1.1.2.3 EN SUELO ESTERIL**

Es ampliamente utilizado en la preservación de microorganismos esporulados. Una suspensión de microorganismos es adicionada a suelo o arena estéril. La mezcla se seca a temperatura ambiente y se almacena en refrigerador.

### **1.1.3 CONGELAMIENTO**

La mayoría de las bacterias pueden ser preservadas por éste método. La reducción de la tasa metabólica y las bajas temperaturas promueven poca disponibilidad de energía para las reacciones bioquímicas del microorganismo.

Los principios generales son:

El rango de enfriamiento y congelamiento debe ser - 20 °C o menor, tanto más rápido sea éste mejor.

- Los electrolitos deben ser mantenidos a un mínimo.
- Se utilizan adyuvantes tales como el glicerol o dimetilsulfóxido el cual debe ser adicionado al medio de suspensión. Esto usualmente no es requerido para la bacteria, pero para otros materiales sí.
- Protección por la presencia de azúcares.

#### **1.1.3.1 CONSERVACION A 4°C**

Por éste método puede la bacteria vivir por años o mucho más tiempo que a temperatura ambiente o a 37 °C.

Utilizando el medio adecuado para la bacteria en tubo inclinado.

#### **1.1.3.2 CONSERVACION A -20°C Y CONSERVACION A -70°C**

Para la conservación a -20°C se hace con glicerol al 50%, relación 1:1 partes iguales de medio con suspensión de microorganismos.

Para la conservación a -70°C se utiliza el medio de **Gherma** que se basa en leche descremada estéril y glicerol, los cuales actúan como crioprotectores de las células.

#### **1.1.3.3 ALMACENAMIENTO EN NITROGENO LIQUIDO**

Es la conservación en fase líquida o vapor. Se utiliza en un amplio rango de células biológicas como hongos, algas, bacterias, virus, protozoos, levaduras, células animales y vegetales. Es uno de los mejores métodos de preservación que mantiene la viabilidad de microorganismos por un largo período de tiempo sin ninguna alteración.

#### **1.1.4 LIOFILIZACION**

Es el proceso en el cual el vapor de agua es removido directamente de un producto congelado por sublimación.

Ha sido utilizado por varios años en la preservación de un amplio rango de material biológico. La viabilidad y mantenimiento de características se mantienen en la mayoría de géneros y especies.

Hay un congelamiento inicial que puede ser de varias formas: con dióxido de carbono, alcohol, sales y hielo o metales dieléctricos.

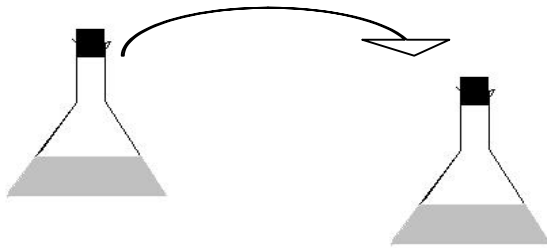
La reconstitución del material liofilizado es rápida por rehidratación.

## 2. PROCEDIMIENTO PARA LA CONSERVACION DE BACTERIAS

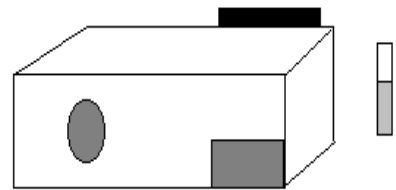
### 2.1 SIEMBRA DEL MICROORGANISMO EN CALDO LB

- 1) Cepa en agar o en medio liquido tomar con un asa una cantidad suficiente para inocular en medio liquido L.B.
- 2) Incubar en agitación 180 rpm a la temperatura y tiempo requerido para el crecimiento del microorganismo.

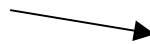
### 2.2. LECTURA DE LA DENSIDAD OPTICA



espectrofotometro

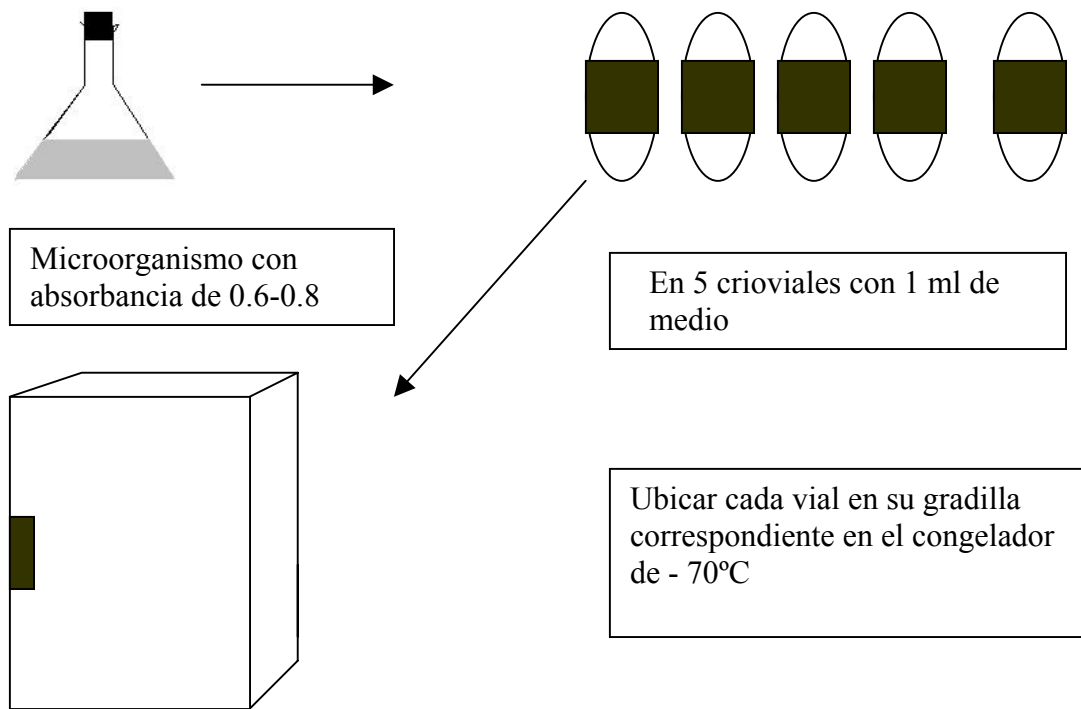


Tomar 1 ml de suspencion bacteriana y adicionarlos en otro erlenmeyer con 50 ml de caldo L.B. o el medio necesario.

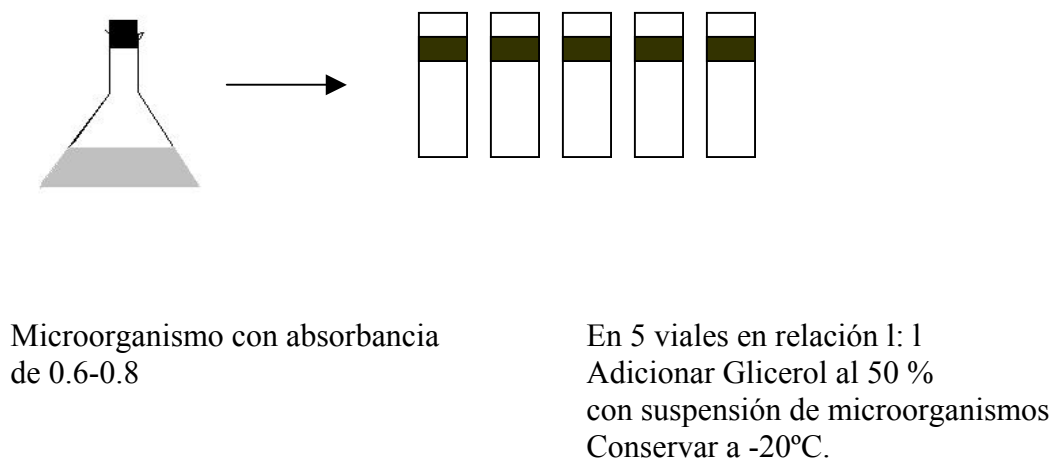


Hacer una primera lectura sin incubación siempre utilizando la celda blanco con medio, leer cada hora hasta llegar a una absorbancia de 0.6-0.8 a una longitud de onda de 600 nm

### 2.3 CONSERVACION DE MICROORGANISMOS A - 70°C

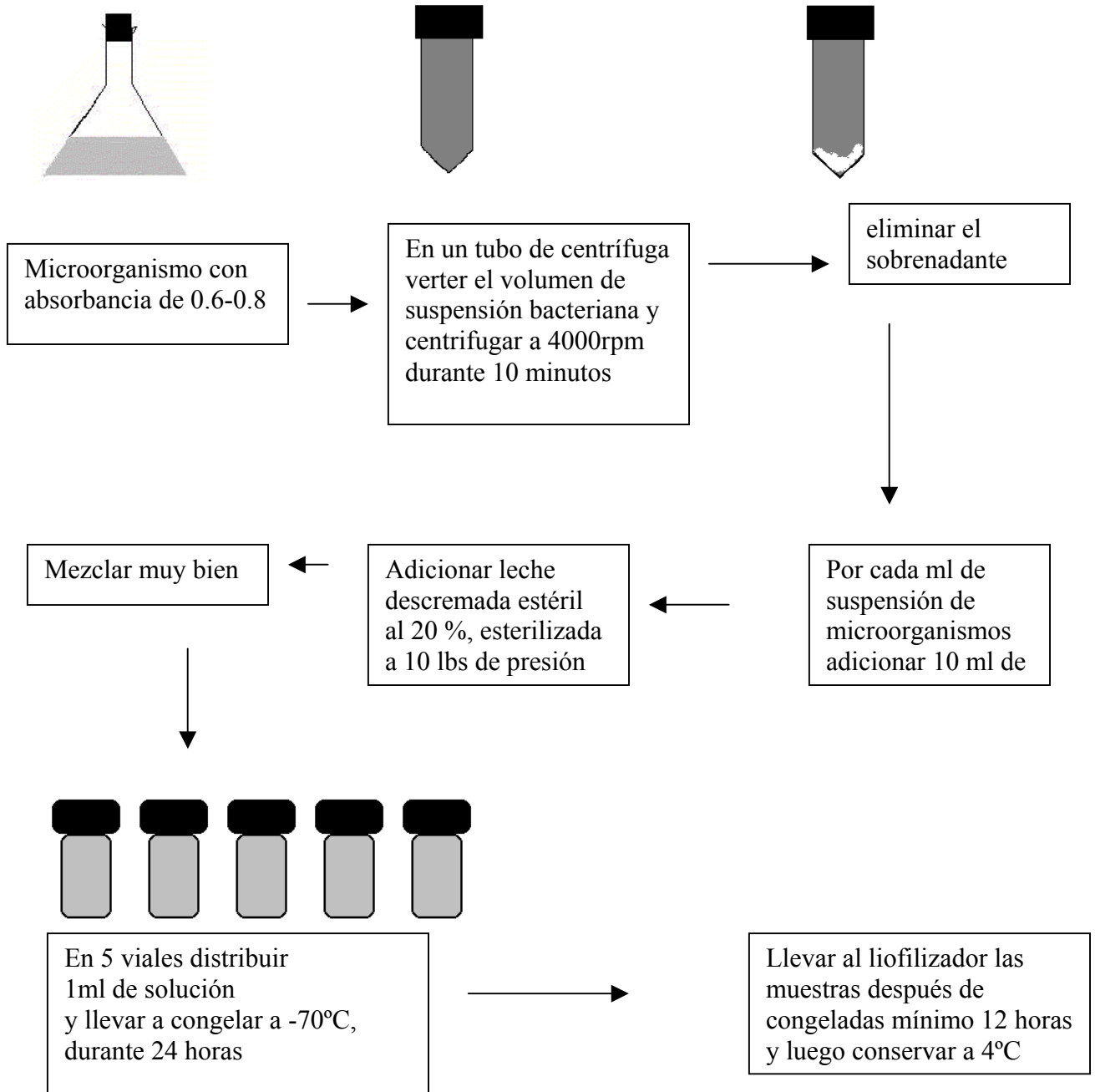


### 2.4 CONSERVACION DE MICROORGANISMOS A - 20°C



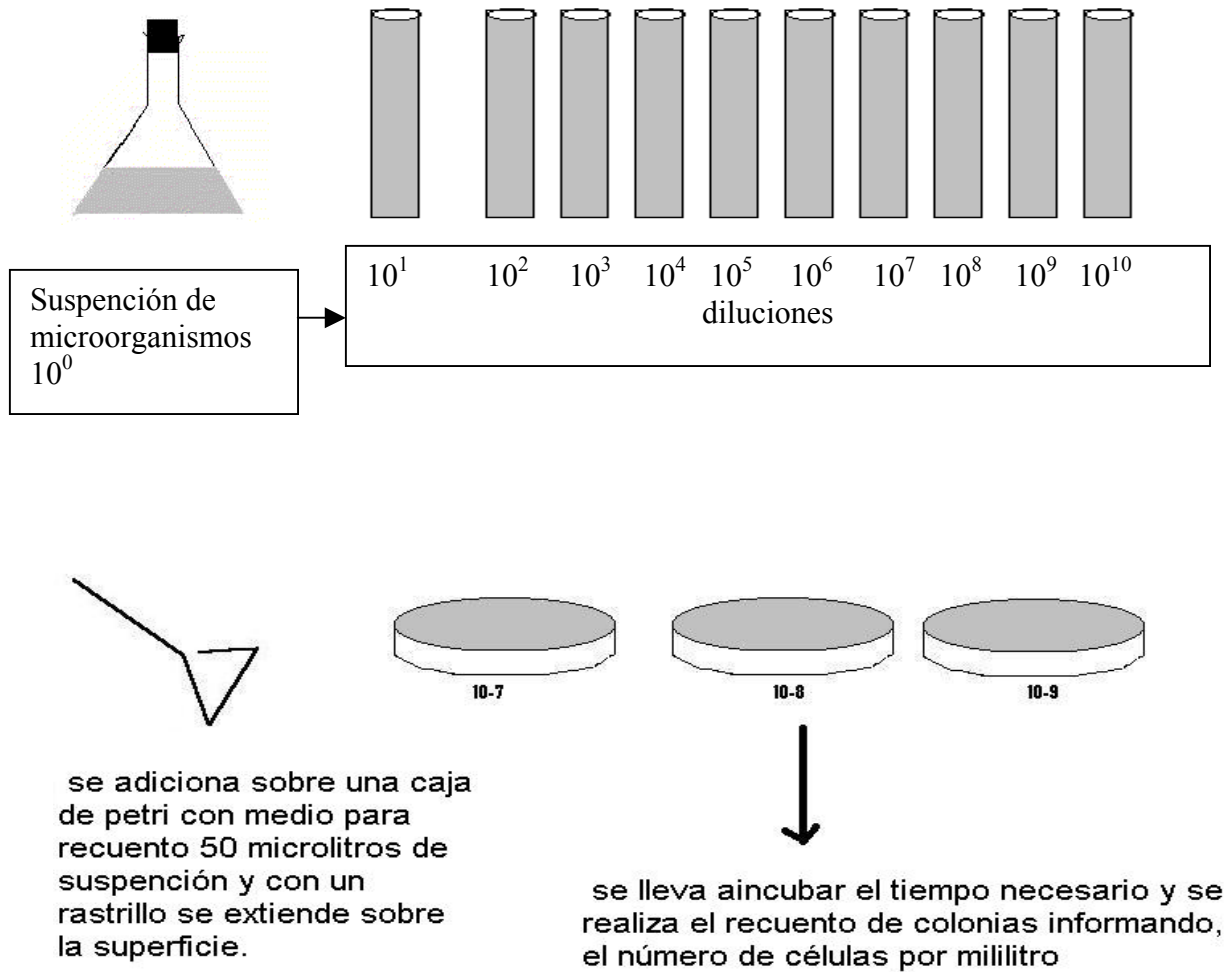


## 2.5 LIOFILIZACION



## 2.6 EVALUACION DE VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS

### RECUENTO EN PLACA



### 3. MEDIOS DE CULTIVO

Medio de cultivo es la creación de un ambiente óptimo a los microorganismos facilitándoles los nutrientes necesarios para el crecimiento y favoreciéndoles un desarrollo metabólico normal.

Los medios de cultivo que se requieren en el laboratorio de Microbiología se pueden trabajar en forma líquida o sólida, esto depende las necesidades y variables requeridas. El medio sólido es aquel al que se le incorpora un polisacárido extraído de algas marinas llamado agar-agar, formado por agarosa y agarpectina, aunque el trabajo de laboratorio resulta más fácil por la existencia en el mercado de los medios ya preparados.

#### MEDIOS DE CULTIVO BASICOS

##### NUTRITIVOS NO SELECTIVOS

##### MEDIO LB ( Luria Bertani Medium)

Triptona 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Agua destilada 1000 ml

pH= 7.0

Agar 1.5 %

Esterilizar por autoclave 121°C\*20 MIN\*15 Libras de presión

##### AGAR SANGRE DE CORDERO Y AGAR CHOCOLATE

Agar base ( agar tripticasa de soya o agar proteasa peptona)

Se calienta la base hasta disolución completa, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Dejar enfriar a temperatura de 50°C y agregar sangre d cordero en proporción del 5%. Mezclar suavemente para evitar la formación de espuma y distribuir en cajas de petri.

El agar chocolate puede prepararse por calentamiento, de un agar sangre a 80°C por 10 minutos, mezclando constantemente para evitar formación de precipitado; Otra manera de preparar el agar chocolate es usando como base agar Muller Hinton, pesar doble cantidad de agar de la indicada en las instrucciones y adicionar igual volumen de una solución de hemoglobina al 2 %. Los dos medios son preparados en matraces individuales, esterilizados en autoclave 121°C por 15 minutos y mezclados cuidadosamente.

##### MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

##### MEDIO PARA Acetobacter

Extracto de levadura 0.5 %

Manitol 2.5 %

Peptona 0.3 %

Agar 2.5 %

**MEDIO ( para evidenciar oxidación)**

Etanol 3%

CaCO<sub>3</sub> 2 %

Agar 2%

Formación de ácidos formado por una zona clara alrededor del inóculo

Otro medio es

Extracto de levadura 3 %

Etanol 2%

Bromocresol verde 0.0022%

Agar 2.0 %

El Gluconobacter cambia el indicador de verde a amarillo. El Acetobacter continúa del mismo color. Para diferenciar Acetobacter con el Gluconobacter es por la oxidación del etanol a ácido acético y a CO<sub>2</sub> H<sub>2</sub> O en el caso del Acetobacter

**MEDIOS DE CULTIVO PARA Agrobacterium**

MEDIO YM

( cells LBA 4404 )

Extracto de levadura 0.4 g

Manitol 10.0 g

NaCl 1.7 g

MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.2 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*3H<sub>2</sub>O 0.5 g

Agua destilada 1000 ml

pH = 7.0

Esterilizar a 121°C a 15 libras de presión \* 20 min

## **MEDIO PY**

Peptona de caseína 5 g

Extracto de levadura 3 g

Agar 15 g/l

Agua destilada 1000 ml

Esterilizar a 15 lbs de presión, 121°C por 20 minutos

Después añadir :

Calcio estéril solución 10.47 g/100ml de Calcio (  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ), esta solución está concentrada 100x

Ác Nalidíxico 20 mg/ml

Streptomicina 100mg/ml

gramos  $\text{CaCl}_2 = 10.47 \text{ g} \cdot \frac{\text{PM. CaCl}_2}{\text{PM CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}}$

## **LB (para Agrobacteria)**

Agua destilada 100 ml

Triptona 5g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 5g

Autoclavar y dejar enfriar para adicionar hormonas o suplementos

## **MS30**

Murashige and skoog powder ( para 1000ml)

Sucrosa 30g

Agua destilada 1000ml

Agar -agar 0.7%

pH 5.8 con NaOH

## **MEDIO YEB**

Extracto de levadura 1 g

Extracto de carne 5 g

Peptona 5g

Sacarosa 5g

Sulfato de Magnesio 0.5g

Agua destilada 1000ml

## **OTROS MEDIOS PARA Agrobacteria**

Glucosa 20 g

Extracto de Levadura 10 g

$\text{CaCO}_3$  20 g

Agar 20 g  
Agua destilada 1000 ml  
Esterilización normal.

### **MEDIO PARA Agrobacteria**

Glucosa 10 g  
Extracto de Levadura 10 g  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g  
Agar 20 g  
Agua destilada 1000 ml  
Esterilización normal

### **MEDIO DE MANTENIMIENTO Agrobacterium tumefaciens**

Sacarosa 0.5 g  
Caldo de Nutritivo 0.8 g  
Extracto de levadura 0.1 g  
Agua destilada 100ml  
Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

### **STOCK DE MINERALES**

NaMoO<sub>4</sub> p/v  
CaCl<sub>2</sub> 0.24 %  
CaCl<sub>2</sub> 0.03%  
FeCl<sub>3</sub> 0.15%  
CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 0.27%  
MgSO<sub>4</sub> 0.17%  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.10%  
25ml (V/V)

**MEDIO PARA CRECER Enterococcus faecalis. BM 4110 : Tn 1545**

Para un volumen de 100 ml

Solución A : 3.8 g de Reinforced Clostridium Medium.

0.1 ml MgSO<sub>4</sub> 1M

CSP 50 ml Agua

Solución B : 1.9 g /50 ml Na<sub>2</sub> B- Glicerofosfato ( Sigma MW : 216 ) Solución C : 100 ml de una solución stock de eritromicina que contiene 10 mg/ml en etanol del 95 %.

**MEDIO PARA MANTENIMIENTO DE Pseudomona**

**YDC Agar**

Extracto de levadura 10g Dextrosa (glucosa ) 10 g

CaCO<sub>3</sub> 20g

Agar 1Sg

Agua destilada 1000ml

pH:neutro

**CETRIMIDE AGAR**

Peptona de gelatina 20 g

MgCl<sub>2</sub> 1.5g

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10g

N-cetyl N-N-N Trimetil Bromuro 0.3g

Agar 12 g

Agua destilada 1000 ml

### **BROLACIN AGAR**

Extracto de carne	3.0 g
Peptona	4.0 g
Caseína peptona	4.0 g
Lactosa	10 g
L-Cysteina	0.13 g
Bromotimol	0.02 g
Agar	15 g agua destilada 1000
	pH: 7.2-7.4 Esterilizar normal

### **MAC CONKEY AGAR**

pH = 7.2 Esterilizar 121°C x 15 min

Peptona de Caseína	17.0g
Peptona de Carne	3.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.5 g
NaCl	5.0 g
Rojo Neutro	0.03 g
Cristal Violeta	0.001 g
Agar	13.5 g
Agua destilada	1.000ml

### **MEDIO DE CULTIVO PARA Rhizobium**

#### **MEDIO YMB**

Manitol	10.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub>	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agua destilada	1 litro
pH=	6.8
Esterilizar 121°C*15 libras de presión * 30 min	



### **MEDIO YMA**

Manitol	10.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.5 g

Agua destilada 1 litro

Agar	15 g
------	------

Rojo Congo ( 0.25 g / 100 ml ) 10 ml

\* Azul de bromotimol ( 0.5 g / 100 ml ) 5 ml

Esterilizar 121°C\*15 libras de presión \* 30 min

### **MEDIO PARA AISLAMIENTO DE ( Serratia)**

#### **DTC Agar**

Deoxyribonucleasa agar	21 g
------------------------	------

Toluidina azul	0.05g
----------------	-------

Agar	2.5g
------	------

Agua destilada	500ml
----------------	-------

Autoclavar 121°C por 15 min. enfriar a 50°C y adicionar 5ml ( 500mg) de Cefalotina

Se evidencia halo rojo.

### **MEDIO DS ( medio para Xanthomonas y Agrobacterium )**

Celobiosa	10 g
-----------	------

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
---------------------------------	-----

NaCl	1 g
------	-----

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3 g
--------------------------------------	-------

Agar	15 g
------	------

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

## **OTROS MEDIOS DE CULTIVO**

### **AGAR Salmonella Shigella (SS)**

Extracto de carne	5.0g
Proteasa peptona	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	8.5 g
Citrato sódico	8.5 g
Tiosulfato sódico	8.5 g
Citrato férrico	1.0 g
Agar	3.5g
Verde brillante	0.00033g
Rojo neutro	0.025g
El pH final del medio es 7.0	
Agua destilada 1 litro	

### **AGAR SULFITO BISMUTO**

Extracto de carne	5.0 g
Peptona	10.0 g
Glucosa	5.0 g
Fosfato disódico	4.0 g
Sulfato ferroso	0.3 g
Indicador de sulfito bismuto	8.0 g
Agar	20.0 g
verde brillante	0.025 g
pH= 7.0	

Este medio no se debe esterilizar porque pierde su selectividad.

Para rehidratar el medio se suspenden 52 gramos de sulfito de bismuto en 1000ml de agua destilada fría y se lleva a punto de ebullición hasta disolver el medio por completo.

## **CALDO SELENITO**

Peptona	5.0g
Lactosa	4.0g
Selenito de sodio	4.0 g
Fosfato monoácido de potasio	3.5 g
Fosfato diácido de potasio	6.5 g

pH = 7.0

Para rehidratar el medio se suspenden 23 gramos de polvo en 1000ml de agua destilada fresca y se calienta hasta punto d ebullición. No sobrecalentar ni esterilizar el medio en autoclave. Refrigerar a 4°C en lugar oscuro. Si aparece un precipitado rojo el medio debe descartarse.

## **AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO ( TSI)**

Extracto de carne	3.0g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	15.0g
Proteasa peptona	5.0 g
Lactosa	10.0g
Sacarosa	10.0g
Glucosa	1.0g
Sulfato ferroso	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Agar	15.0g
Rojo de fenol	0.024g
Cloruro de sodio	5.0g
Agua destilada	1000ml

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Inclinar los tubos de tal manera que queden con 2.5 cm de fondo y 3.5cm de tendido.

### **AGAR LISINA HIERRO (LIA)**

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Glucosa	1.0 g
Lisina	10.0g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.04g
Púrpura de bromocresol	1 0.02g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml

Ajustar pH = 6.7 Esterilizar a 121°C por 12 minutos Inclinar los tubos con un fondo de 2.5 cm y un tendido de 3.5 cm

### **AGAR UREA**

Peptona	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Glucosa	1.0g
Fosfato de potasio monobásico	2.0 g
Rojo de fenol	0.012g
Urea	20.0g

Agua destilada 100ml  
Ajustar pH = 6.8-6.9  
Esterilizar por filtración.  
Disolver 15g de agar en 900ml de agua destilada y esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar a 50-55°C. Agregar 100ml de la solución filtrada. Mezclar y didtribuir en tubos estériles.

### **AGUA PEPTONADA**

Bactopeptona	20g
Cloruro de sodio	5g
Agua destilada	1000ml

No ajustar pH. Esterilizar a 121°C por 15 min.  
Bactotripton a al 1%,Casitona al 1.5%, o Tripticasa al 1.5% pueden sustituir la bactopeptona.

### **MEDIO DE MOTILIDAD**

Extracto de carne 3g  
Peptona 10g  
Cloruro de sodio 5 g  
Agar 4 g  
Agua destilada 1000ml

### **TERRIFIC BROTH**

BactoTryptona 12 g  
Extracto de levadura 24 g  
Glicerol 4 ml  
Agua desionizada 900 ml

Esterilizar 121°C \* 20 min\* 15 lbs

Cuando la solución esté a 60°C adicionar por lo menos a 100 ml de agua estéril una solución de 0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. ( esta solución es hecha para disolver 2.31 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 12.54 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 90 ml de agua desionizada)

Después de que las sales están disueltas se ajusta el volumen a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza en autoclave por 20 min 121°C\* 15 libras de presión

### **MEDIO PARA HONGOS**

#### **MEDIO GLUCOSADO SABOURAUD**

Glucosa 40.0g  
Peptona 10.0g  
Agar 20g  
Agua destilada 1000ml  
Ajustar pH = 5.6 y esterilizar a 120°C por 15 minutos.

## **MEDIO PARA LA CONSERVACION DE -70°C**

### **MEDIO DE GHERNA**

Caldo de Casoy	3 g
Glucosa	0.5 g
Leche descremada pulverizada	2g
Glicero	1 4ml
Agua destilada	100ml

Esterilizar a 10 libras de presión por 15 minutos.

### **MEDIO PARA LIOFILIZADOS**

(Actinomycetos)  
Broth 50% vol/vol  
Suero de caballo 50% vol/vol  
Sacarosa 7% peso/vol  
Se puede obtener viabilidad de 10 años.

## 4. COLORANTES Y TECNICAS

### COLORACION DE GRAM

#### a. Solución de oxalato de amonio-cristal violeta

Etanol ( 96 % ) 2.0ml

Cristal Violeta 0.4g

Oxalato de Amonio 0.8g

Agua destilada 98.0ml

Preparación :

Disolver el cristal violeta en el etanol, agrgar 18 ml de agua destilada.

Disolver aparte el oxalato en 80 ml de agua destilada. Unir las dos preparaciones y mezclar muy bien.

#### b. Solución de yoduro de Potasio

.Cristales de yodo 1.0 g

Ioduro de potasio 2.0g

Preparación :

Disolver en 5 ml de agua destilada, llevarlo a un volumen final de 240ml con

Agua destilada, Agregar 60ml de bicarbonato de sodio al 5% en agua.

Mezclar muy bien.

#### c. Safranina o Fuscina

Safranina 25.0g

Etanol (96%) 10.0g

Agua destilada 100.0ml

disolver la safranina en el alcohol. Agregar el agua destilada y mezclar bien.

### TECNICA:

- Fijar el frotis con calor
- Agregar cristal violeta, dejar un minuto.
- Lavar.
- Aplicar lugol, dejar un minuto.
- Lavar.
- Decolorar con etanol al 95 %
- Agregar safranina o Fuscina, dejar diez segundos
- Lavar y secar.

### GIEMSA O WRIHT

Es útil para la demostración de H. capsulatum.

#### a. Buffer.

KHpPO4 1.63g

NaHPO4 3.20g

Agua destilada 1000ml

pH = 7.0

**b. Colorante**

Polvo Wright 0.3g

Glicerol 3.0g

Metanol 97.0ml

**Preparación**

- a. Macerar el polvo en un mortero.
- b. Añadir el glicerol y seguir macerando.
- c. Añadir alcohol y mezclar.
- d. Dejar en la oscuridad aproximadamente un mes.
- e. Filtrar.

**TECNICA COLORACION DE GIEMSA**

- Fijar el extendido con metanol
- Colocar sobre la lámina colorante de Giemsa, por 5 minutos
- Lavar con agua
- Secar con aire.
- Observar al microscopio.

**TINTA CHINA**

Se utiliza para la demostración de cápsulas de levaduras

- Colocar una gota de tinta china negra sobre una lámina portaobjeto
- Agregar una gota de agua.
- Colocar una asada del microorganismo a examinar.
- Cubrir con una laminilla
- Observar al microscopio.

**AZUL DE LACTOFENOL**

Es el montaje más usado para el estudio microscópico de cultivo de hongos. Azul de algodón Azul de China Merck 0.05g

ácido láctico 20.0g

Cristales de fenol 20.0g

Glicerina 40.0g

Agua destilada 20 ml

Preparación :

- a. Agregar el ácido láctico y la glicerina al agua destilada, mezclando fuertemente.
- b. Agregar los cristales de fenol y agitar.
- c. Calentar suavemente al baño maría, con agitación constante, hasta que desaparezcan los cristales.
- d. Agregar el azul de algodón y mezclar fuertemente.



## **HIDROXIDO DE POTASIO AL 10% o AL 20%**

KOH 10.0g

Agua destilada 100.0ml

Tinta Parker Azul-Negra. 11.5ml

Preparación;

- Agregar los cristales d hidróxido al agua destilada.

' Mezclar hasta disolver completamente.

Agregar la tinta parker azul-negra.

Mezclar bien.

TECNICA:

- Colocar una gota de KOH en una lámina portaobjetos

\*Adicionar la muestra a examinar

- Colocar una laminilla
- Calentar suavemente a la llama, sin dejar hervir.
- Observar al microscopio

Se recomienda leer la lámina 15 o 20 minutos para permitir un a mejor penetración de la tinta. Cuando se usa en DMSO no se debe calentar.

## **ANTIBIOTICOS**

### **AMPICILINA (Amp).**

#### **MODO DE ACCION:**

Es un derivado de la penicilina, que destruye el crecimiento celular por la interferencia con una reacción terminal en la síntesis de la pared celular.

#### **MECANISMO DE RESISTENCIA:**

El gen de resistencia (bla), es una enzima periplásmica, específica B - Lactamasa, la cual cliva el anillo B - Lactámico del antibiótico.

#### **SOLUCION STOCK DE TRABAJO (100mg/ml solución Stock).**

100 mg de Ampicilina mas 1 ml de agua, pasar por filtro estéril. Adicionar 1ml de solución stock, directamente a un litro de medio,(concentración final: 100 mg/ml).

### **CLORANFENICOL (Cm).**

#### **MODO DE ACCION:**

Es un agente bacteriostático, que interfiere con la síntesis de proteína bacterial, por la unión a la subunidad 50s de los ribosomas.

#### **MECANISMO DE RESISTENCIA:**

El gen de resistencia (cat), una acetil transferasa especifica, que acetila y a la vez inactiva el antibiótico.

#### **SOLUCION STOCK DE TRABAJO (20mg/ml solución Stock):**

20 mg de cloranfenicol y adicionar 1ml de etanol (en cámara de extracción de vapores). Adicionar 1ml de solución Stock directamente a un litro de medio,(concentración final: 20 mg/ml).

**- KANAMICINA (Km).**

**MODO DE ACCION:**

Es un agente bactericida, que se une a los ribosomas 70s, e interfiere en la lectura del RNA mensajero.

**MECANISMO DE RESISTENCIA:**

El gen de resistencia (kan), una enzima especifica que modifica el antibiótico y evita su interacción con ribosomas.

**SOLUCION STOCK DE TRABAJO (30 mg/ml ó 50 mg/ml solución Stock).**

60 ó 100 mg de cañamicita y disolver en 2 ml de agua, pasar por filtro estéril. Adicionar 1 ml de solución Stock a 1 litro de medio, (concentración final 30 ó 50 mg/ml), dependiendo sobre el tipo de medio.

**ESTREPTOMICINA (Sm).**

**MODO DE ACCION:**

Es un agente bactericida, que se une a la subunidad 30s de los ribosomas e interfiere con la lectura del RNA mensajero.

**MECANISMO DE ACCION:**

El gen de resistencia (str), una enzima especifica que modifica el antibiótico e inhibe su unión al ribosoma.

**SOLUCION STOCK DE TRABAJO:**

200 mg de estreptomicina y 2 ml de agua, pasar por un filtro estéril. Adicionar 1ml de solución Stock a 1 litro de medio, (concentración final: 100 mg/ml).

**TETRACICLINA (Te).**

**MODO DE ACCION:**

Agente bacteriostático que evita la síntesis de proteína bacterial, por la unión a la subunidad 30s del ribosoma.

#### MECANISMO DE ACCION:

El gen de resistencia (tet), una proteína específica que modifica la membrana bacterial y evita el transporte del antibiótico al interior de la célula.

#### SOLUCION DE TRABAJO (15 mg/ml de solución Stock):

15 mg de tetraciclina y disolver en 0.5 ml de agua y 0.5 de etanol, sellar muy bien los frascos. Adicionar 1 ml de solución Stock, directamente a 1 litro de medio (concentración final: 15 mg/ml).

#### OTROS ANTIBIOTICOS.

##### **RIFAMPICINA** (50 mg/ml de solución Stock):

100 mg de rifampicina y disolver en 2 ml de metanol, agitar inmediatamente en vortex para evitar que la rifampicina se sedimente en el fondo del tubo.

Adicionar 5 gotas de NaOH 10N, para facilitar la disolución de la rifampicina.

Adicionar 2ml de la solución Stock, directamente a 1 litro de medio, (concentración final: 100 mg/ml).

La rifampicina es sensible a la luz, por lo tanto debe almacenarse en la oscuridad.

##### **ACIDO NALIDIXICO**

100 mg de ácido nalidíxico y disolver en NaOH 1N. Adicionar 0.3 ml de solución Stock directamente a 1 litro de medio, (concentración final: 30 mg/mL).

## **BIBLIOGRAFIA**

- KIRSOP B.E, Maintenance of Microorganisms and cultured cells. Academic press. 1991 capítulo III.
- ANDREW M.E.H. ; RUSSELL A.D. The Revival of Injured Microbes. Academic Press. 1984. capítulo 6.
- LAPAGE S.P AND JEAN E. SHELTON . Culture collections. cap II, pag 136.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Microbiología medica, manual de Procedimientos. Ministerio de Salud. 1988. 169-170 y 217-220.