

RED DE CONTROL DE CALIDAD DE  
INOCULANTES

REDCAI

DOCUMENTO de PROCEDIMIENTOS de  
la REDCAI N<sup>ro</sup> 2

PROTOCOLO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE  
INOCULANTES QUE CONTIENEN *Azospirillum* sp.

2010

ISBN 978-987-98475-9-6



9 789879 847596

Cassán, Fabricio et al. Protocolo para el control de calidad de inoculantes que contienen *Azospirillum* sp. Documento de Procedimientos de la REDCAI número 2.

Fabricio Cassán; Claudio Penna; Cecilia Creus; Débora Radovancich; Emilia Monteleone; Inés García de Salamone; Luciana Di Salvo; Isabel Mentel; Julia García; María del Carmen Mayans Pasarello; Lina Lett; Mariana Puente; Olga Correa; Punschke Valerio, Karina; Rosana Massa; Alejandro Roosi; Marisa Díaz; Melina Catafesta; Silvia Righes; Susana Carletti y Enrique Rodríguez Cáceres.

1a ed.

Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2010.

13 p; CD-ROM

ISBN 978-987-98475-9-6

1. Microbiología Industrial. 2. *Azospirillum*. I. Fabricio Cassán; II. Claudio Penna; III. Cecilia Creus; IV. Débora Radovancich; V. Emilia Monteleone; VI. Inés García de Salamone; VII. Luciana Di Salvo; VIII. Isabel Mentel; IX. Julia García; X. María del Carmen Mayans Pasarello; XI. Lina Lett; XII. Mariana Puente; XIII. Olga Correa; XIV. Punschke Valerio, Karina; XV. Rosana Massa; XVI. Melina Catafesta; XVII. Alejandro Rossi; XVIII. Marisa Díaz; XIX. Silvia Righes; XX. Susana Carletti y XXI. Enrique Rodríguez Cáceres. II. Título CDD 660.62.

## ASOCIACIÓN ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA



### DIVISIÓN DE MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA Y AMBIENTAL



#### RED DE CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES Comisión Coordinadora

**Ing. Agr. Silvia Toresani**

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Rosario

**Ing. Agr. Ada Albanesi**

Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Santiago del Estero

**Ing. Agr. Silvia Benintende**

Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad Nacional de Entre Ríos.

**Bioq. Carlos Bonfiglio**

Síntesis Química S.A.

**Dr. Fabricio Cassán**

Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Qcas y Naturales-Universidad Nacional de Río Cuarto.

**Ing. Agr. Fernanda Gonzalez Fiqueni**

Laboratorios Biagro S.A.

**Lic. Lina Lett**

Facultad de Agronomía-Universidad Nacional del Centro.

**Bioq. Claudio Penna**

Nitragin Argentina S.A.

**Ing. Agr. Alejandro Peticari**

Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. IMYZA-INTA

**Mic. Alejandro Rossi**

Rizobacter Argentina S.A.

## PROTOCOLO PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN INOCULANTES DE *Azospirillum* sp.

**Autores:** Fabricio Cassán; Claudio Penna; Cecilia Creus; Débora Radovancich; Emilia Monteleone; Inés García de Salamone; Luciana Di Salvo; Isabel Mentel; Julia García; María del Carmen Mayans Pasarello; Lina Lett; Mariana Puente; Olga Correa; Karina Punschke Valerio; Rosana Massa; Melina Catafesta; Alejandro Rossi; Marisa Díaz; Silvia Righes; Susana Carletti y Enrique Rodríguez Cáceres.

### 1. Marco teórico

En los últimos 25 años el uso de rizobacterias diazotróficas promotoras del crecimiento vegetal, ha ocupado un lugar relevante en los trabajos de microbiología agrícola a nivel mundial, debido a su capacidad de mejorar el rendimiento de los cultivos, preservar los ecosistemas agrícolas y reducir el impacto medioambiental del uso de fertilizantes minerales. La identificación y posible manipulación de rizobacterias promotoras del crecimiento, así como su asociación con plantas superiores, ha sido motivo de numerosas publicaciones en todo el mundo. Entre las asociaciones más exitosas, se describen aquellas establecidas entre gramíneas o no-leguminosas y bacterias rizosféricas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*. La bibliografía en general considera a *Azospirillum* como uno de los géneros de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal más estudiados en la actualidad debido a su capacidad de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies vegetales de interés agrícola en todo el mundo (Bashan et al. 2004). Los organismos pertenecientes a este género se clasifican como rizosféricos colonizando principalmente la zona de elongación y los pelos radiculares, algunas cepas de *Azospirillum* sp. pueden encontrarse en el interior de las plantas, por lo que se denominan endófitos facultativos (Figueiredo et al, 2008) A pesar de las diferentes formas de interacción estos diazótrofos, cuando se encuentran asociados a gramíneas, logran aumentos en la producción entre un 5 y un 30% (Baldani et al. 1983; Okon y Labandera, 1994). La capacidad de este microorganismo para promover el crecimiento vegetal fue inicialmente atribuida al proceso de la fijación biológica de nitrógeno, tanto en condiciones rizosféricas como endofíticas, pero este modelo ha tenido una menor significancia agronómica respecto de lo que se esperaba inicialmente. En contrapartida, uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal, estaría relacionado con la capacidad de esta bacteria para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tal como ácido indol acético; citocininas (Tien et al. 1979); giberelinas (Bottini et al. 1989) y etileno (Strzelczyk et al. 1994), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal. Desde una perspectiva revisionista, sabemos que numerosos trabajos detallan los efectos benéficos de la inoculación con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y mencionan los importantes cambios morfo-fisiológicos que ocurren en una planta inoculada; sin embargo, en muchos casos no se han identificado los compuestos o mecanismos responsables de generar esta respuesta.

#### 1.1. Inoculantes a base de *Azospirillum* sp. en nuestro país

Cuando se iniciaron los estudios sobre el género *Azospirillum* en la Argentina con el fin de introducirla como una rizobacteria de uso agrícola, uno de los principales inconvenientes, fue el de no contar con aislamientos locales de este microorganismo. Siguiendo los lineamientos propuestos por el laboratorio de la Dra. Johanna Döbereiner del Laboratorio de Agrobiología de EMBRAPA, en Brasil (Döbereiner and Day, 1976) y por el Dr. Yaacov Okon de la Universidad Hebrea de Jerusalem,

Israel (Okon et al. 1976) fueron obtenidos un número considerable de aislamientos presuntivos de este género, pero que debido a la ausencia de un método descriptivo simple y preciso o de técnicas moleculares confirmatorias, fueron considerados solo como presuntivos. Con esta premisa, se iniciaron los estudios tendientes a lograr aislar cepas bacterianas del género a partir de los principales cultivos de nuestro país, especialmente de maíz y trigo entre otros cereales. Luego de una extensa investigación sobre las propiedades fisiológicas de los aislamientos presuntivos del género, tal como el aprovechamiento de diferentes fuentes carbonadas y nitrogenadas, se desarrolló un medio de cultivo definido, sumamente útil para el reconocimiento y aislamiento de las cepas obtenidas en condiciones naturales. Las principales características de la identificación de los microorganismos en este medio fueron: (1) la coloración de las colonias de rojo escarlata y la estructura rugosa y aplanada de las mismas en su superficie, lo que permitió una fácil identificación y selección aún en presencia de otros microorganismos rizosféricos. Así, el medio propuesto por Enrique Rodríguez Cáceres en 1982, fue denominado RC (Fotografía 1). A partir de allí, con esta nueva herramienta metodológica se pudo aislar un gran número de cepas de diferentes cultivos y se logró constituir una colección de 64 cepas liofilizadas para su conservación en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) de INTA Castelar.

## **1.2. *Azospirillum brasilense* Az39**

Desde 1981 y hasta 1995, se realizó en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola INTA-IMYZA, un intenso programa para seleccionar e identificar cepas de *Azospirillum* sp. potencialmente aplicables en agricultura y evaluar su capacidad de promover el crecimiento en especies cultivables tal como trigo y maíz en campos experimentales de la provincia de Buenos Aires (Rodríguez Cáceres et al. 2005). La información obtenida permitió comprobar el efecto positivo de la inoculación con *A. brasilense* en ambas especies vegetales y seleccionar las cepas Az39 (obtenida de raíces de trigo cultivado en suelos de Marcos Juárez) y Cd (cepa de colección) como las de mejor performance dentro del grupo, debido a su capacidad de incrementar los rendimientos de ambos cultivos desde un 13% hasta un 33%. Considerando los antecedentes generados por este programa, el SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria) postuló, de común acuerdo con las empresas de inoculantes de nuestro país, a la cepa nativa Az39 de *A. brasilense*, como la estirpe recomendable para la fabricación de inoculantes destinados inicialmente a los cultivos de maíz y trigo en la República Argentina.

## **2. Protocolo para la evaluación de inoculantes que contienen *Azospirillum* sp.**

### **2.1. Conservación de las muestras**

En el caso que las muestras sean transportadas al laboratorio en su envase original, éstos deberán mantenerse durante el transporte y almacenamiento de acuerdo a las condiciones recomendadas por el fabricante. Rápidas variaciones de temperatura pueden provocar cambios de humedad en los productos sólidos por condensación o inducir cambios fisiológicos en los microorganismos. Para el caso de la muestra patrón, deberá mantenerse a temperatura ambiente y alejada de la luz directa.

### **2.2. Fraccionamiento de muestras para la obtención de alícuotas**

Dependiendo de la disponibilidad y tamaño de las muestras, éstas pueden ser fraccionadas siguiendo las siguientes recomendaciones:

### Inoculante líquido acuoso

- Sanitizar los envases con alcohol 70°
- Homogeneizar por agitación manual.
- Bajo llama o flujo laminar, con jeringa y aguja o pipeta estéril, se extraen 10 ml del producto.

### 2.3. Recuento de células viables de *Azospirillum* sp. mediante la técnica de siembra en placa por extensión en superficie en medio Rojo Congo (RC).

#### Inoculante líquido acuoso. Preparación del homogenato.

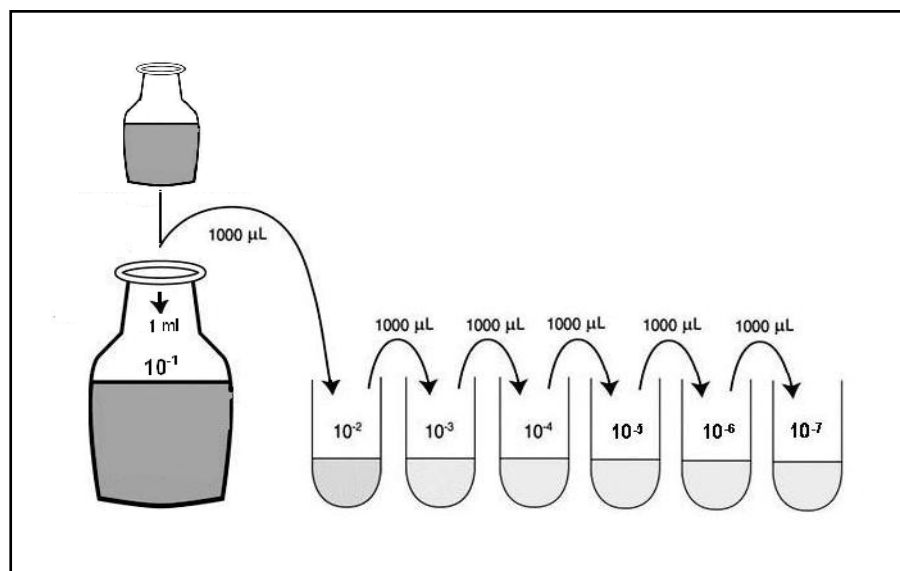
- Agitar vigorosamente el envase durante 30 segundos.
- Extraer 10 ml del producto bajo llama de mechero o flujo laminar, con jeringa y aguja o pipetas estériles.
- Diluir con 90 ml de Solución fisiológica, una solución de Tween 80 al 0.01% (v/v). Para ello, agregar 0,360 ml de solución stock de Tween 80 por cada 90 ml de solución fisiológica.
- Esta se considera la dilución  $10^{-1}$ .

#### Agitar entre 15 y 20 minutos en cualquiera de las siguientes condiciones:

- Agitador de golpes con un erlenmeyer de 250 ml (punto 3 o similar).
- Agitador orbital con un erlenmeyer de 500 ml a 150 rpm (2,5 de excentricidad).
- Agitador magnético con un erlenmeyer de 250 ml a 300–350 rpm con barra magnética teflonada (40 x 7 mm facetada con anillo).

#### 2.3.2. Preparación de las diluciones de trabajo

- Retirar el erlenmeyer del agitador (la dilución  $10^{-1}$  deberá estar homogénea, evitando la precipitación o la separación de fases)
- Extraer 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  preferentemente con pipeta automática y colocarlo en un tubo de ensayo que contenga 9.0 ml de solución fisiológica estéril.
- A esta dilución se la denomina  $10^{-2}$ . Homogeneizar durante 20 segundos en vortex.
- Repetir el paso anterior hasta completar la dilución  $10^{-7}$  como se indica en el esquema que se presenta a continuación.



### 2.3.3. Siembra de las diluciones

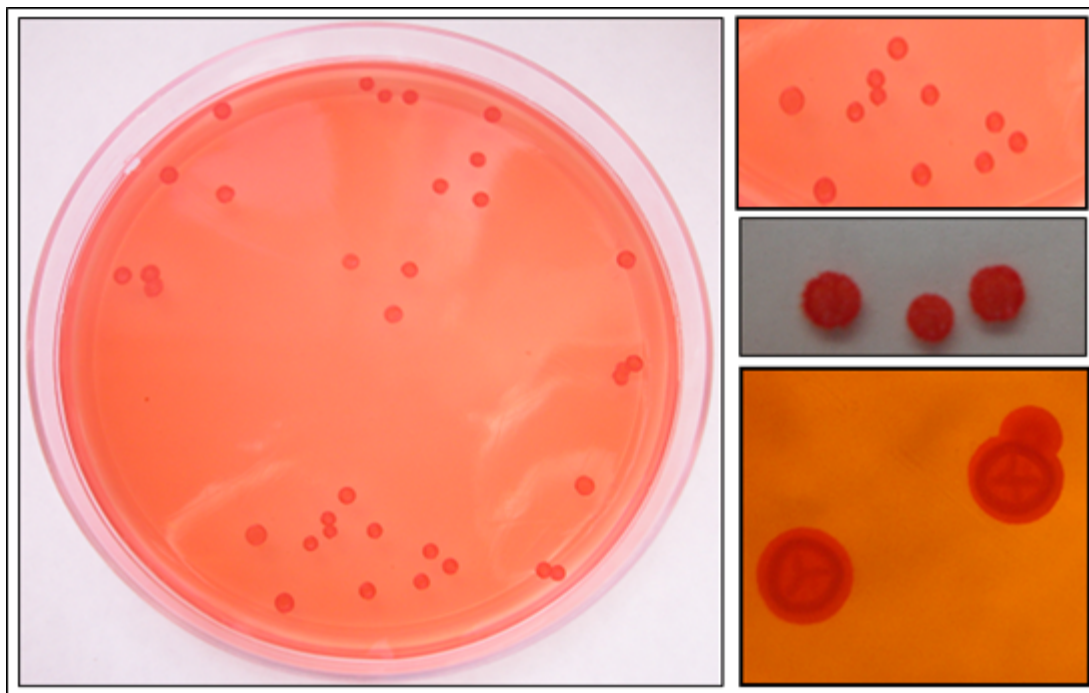
- Sembrar por triplicado y por extensión en superficie con espátula de Drigalski las diluciones  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en placas de Petri conteniendo el Medio RC (15-20 ml), de acuerdo con Rodríguez Cáceres (1982). El ansa a emplear en la siembra, podrá ser construida con una varilla de vidrio (preferentemente de 4 mm de diámetro); un ansa de platino acondicionada; un electrodo de soldar, etc.
- Secar las placas en estufa previa a su utilización.
- Comenzar por la mayor dilución y para ello colocar 0.1 ml en el centro de la placa y con espátula de Drigalski previamente esterilizada, extender el líquido sobre la superficie.
- Dejar 15 minutos con el agar hacia abajo hasta que se absorba totalmente el líquido.

### 2.3.4. Incubación

- Incubar las placas invertidas en estufa entre 28 y 30°C. Si por cuestiones de espacio fuera necesario apilar las placas, tomar la precaución de no exceder las 6 placas.

### 2.3.5. Lectura

- Se realiza a los 4 días y se verifica a los 6 días desde la siembra.
- Se cuentan las placas que presentan entre 30 y 300 colonias verificando la proporcionalidad entre diluciones. Si dos diluciones sucesivas presentan placas entre los valores mencionados, se realiza el cálculo correspondiente para cada dilución, según la fórmula descrita a continuación y luego se promedia el resultado obtenido. Las colonias típicas de *Azospirillum* sp. son normalmente rojas escarlata, circulares, convexas de 1-3 mm de diámetro y con los bordes elevados como se muestran en la Fotografía 1.



**Fotografía 1.** Aislamiento de colonias de *Azospirillum brasilense* Az 39 en placas de Petri conteniendo medio de cultivo RC, de acuerdo a Rodríguez Cáceres, (1982). Crédito: Mariana Punte (placa), Luciana Di Salvo (colonias superiores) y Lina Lett (colonias inferiores).

### Fórmula:

- El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc.ml<sup>-1</sup>) y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{ufc.ml}^{-1} = \text{N}^{\circ} \text{ de colonias contadas} \times 10 \times \text{factor de dilución}$$

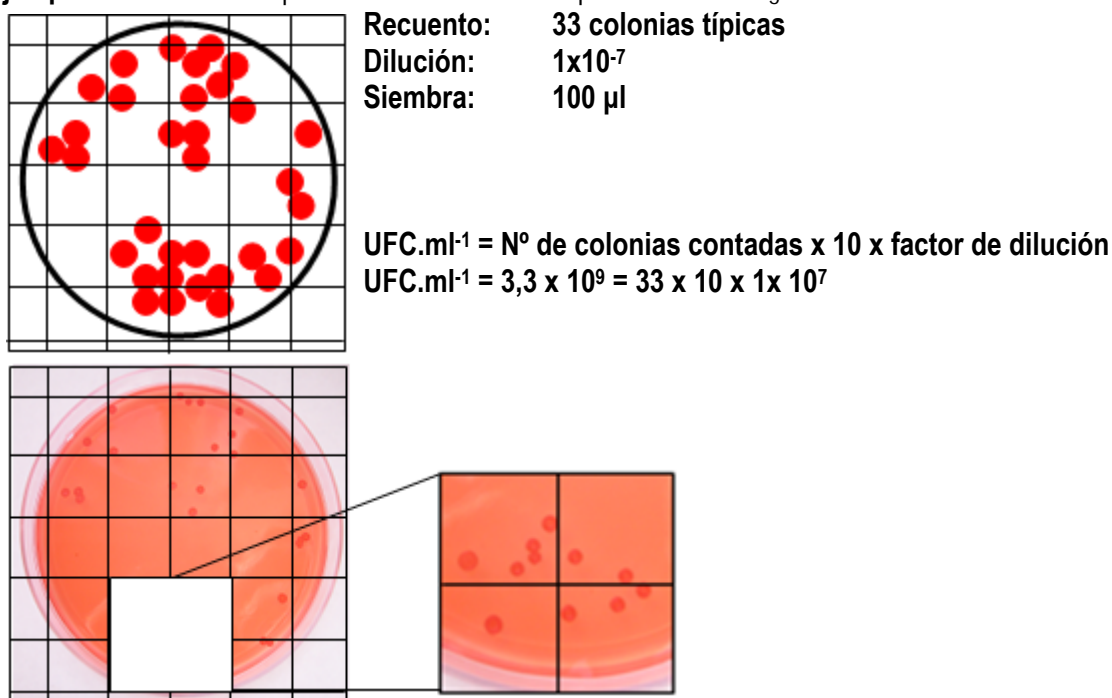
### Referencias:

Nº de colonias: es el promedio del número de colonias presentes en las tres placas de lectura.

Factor de siembra: es 10 si se usa 0,1ml para la siembra en la placa.

Factor de dilución: es la inversa de la dilución en la que se realiza el recuento de colonias para la obtención del resultado.

**Ejemplo 1:** Recuento esquemático de colonias en placa. Crédito fotográfico: Mariana Puente.



## 6. Procedimiento de referencia para la detección de microorganismos contaminantes.

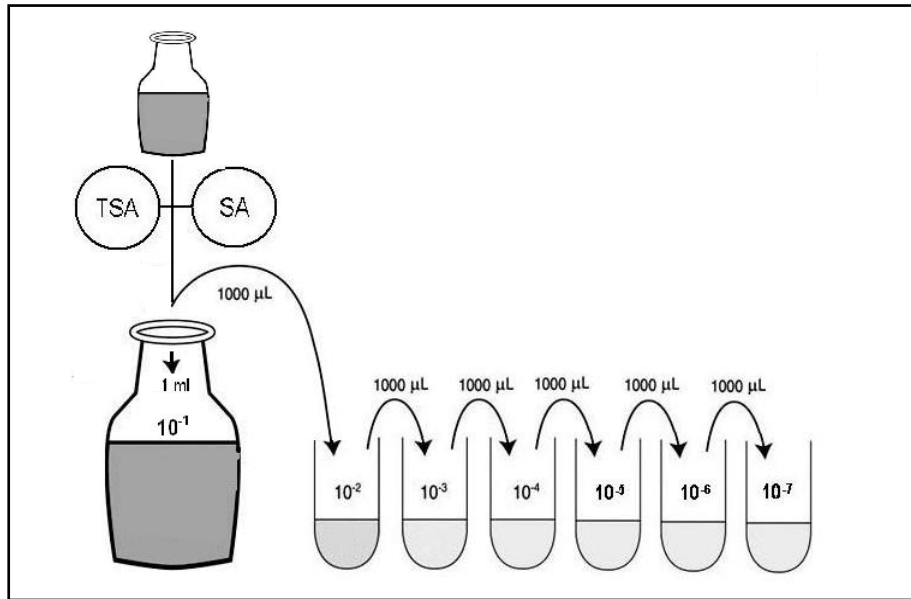
Para la evaluación de microorganismos contaminantes sugerimos la siembra directa desde el envase contenedor, con ansa y por agotamiento en placas con Medio TSA (Agar Trypticasa Soya) para bacterias en general y Agar Sabouraud para hongos saprofiticos. Adicionalmente sugerimos la realización de la coloración de Gram y la observación de una muestra directa al microscopio.

### 6.1. Siembra en medios de cultivo para la detección o cuantificación de contaminantes

#### 6.1.1. Siembra

- Sembrar en superficie un ansa cargada obtenida de manera directa de la muestra sin quemar el ansa en el momento de realizar el estriado por agotamiento como se indica en el esquema que se presenta a continuación.
- Incubar en estufa a 28-30°C las placas de Agar TSA durante 48-72 horas y a 24°C las placas de Agar Sabouraud durante 72 horas.





## 6.2. Observación de preparados teñidos según Gram modificado por Hucker.

### 6.2.1. Preparación del frotis

- En un portaobjeto limpio, colocar una gota del material a analizar
- Extender con ansa y fijar cortando varias veces la llama oxidante de mechero.
- Proceder a la tinción.

### 6.2.2. Técnica de tinción

#### a. Reactivos

- Preparación de los reactivos y soluciones según figura en el ANEXO. Si se dispone del kit comercial, proceder según descripción del fabricante.

#### b. Tinción del frotis

- Bañar con la solución de trabajo de cristal violeta durante 1 minuto.
- Escurrir y lavar con agua.
- Bañar con lugol y dejar actuar durante 1 minuto. Escurrir y lavar con agua.
- Decolorar con alcohol hasta total arrastre del colorante.
- Escurrir y lavar con agua.
- Bañar con safranina 2 a 3 minutos. Escurrir y lavar con agua.
- Secar y observar al microscopio.

### 6.2.3. Registro

- Se busca la presencia de microorganismos con características tintoriales y morfologías no compatibles con *Azospirillum* sp., es decir bastones Gram (+) o Gram (-) de gran tamaño, cocos y vibrios. Adicionalmente se debe determinar la morfología celular de *Azospirillum* sp. debido a su dimorfismo celular.

### 6.3. Observación de un preparado directo (fresco).

- En un portaobjeto limpio, colocar una alícuota del material a analizar (una gota del formulado si el inoculante es líquido y si es sólido, una gota de la dilución  $10^{-1}$  dejando sedimentar el particulado).

- Cubrir con cubreobjeto.
- Proceder a la observación en el microscopio.

### 6.3.1. Registro

- Las bacterias del género son bastones Gram (-) móviles, pero su forma y movilidad dependen del estado fisiológico en el que se conserva la muestra. Se busca la presencia de microorganismos con características morfológicas compatibles a las mencionadas y con alta movilidad en forma de espiral.

## 6.4. Determinación de pH

### 6.4.1. Inoculante líquido acuoso

- Se mide directamente del producto.

## 7. Procedimiento para la capacidad diazotrófica microaerófila de colonias presuntivas

Debido a que es frecuente observar dimorfismo de colonias en placas de medio RC inoculadas con *Azospirillum* sp., nuestra estrategia para asumir la presencia del microorganismo de manera presuntiva, se basa en la evaluación de la capacidad bacteriana de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia. Procedimiento modificado de Döbereiner et al. (1996).

### 7.1. Preparación del medio

- Preparar medio NFb semisólido como se menciona en punto 2 del Anexo Metodológico y como se presenta en la Fotografía 2.
- Cargar frascos estériles de 10 ml de capacidad con 5 ml de medio recién esterilizado.

### 7.2. Siembra

- La siembra se realiza a partir de la o las colonias presuntivas obtenidas en el medio RC.
- Picar una colonia con ansa en rulo y sembrar en profundidad en el medio semisólido.
- Incubar entre 4 y 6 días en estufa a 28-30°C.
- Se considera el crecimiento presuntivo, en aquellos casos en los que se observa la presencia de una nube o halo de crecimiento por debajo de la superficie del medio de cultivo, como se observa en la Fotografía 2.



**Fotografía 2.** Crecimiento de *Azospirillum brasilense* Az39 en medio NFb semisólido y evaluación de la capacidad diazotrófica en condiciones de microaerofilia, de acuerdo con Döbereiner et al. (1995). Crédito fotográfico: Carolina Castaño.

## Referencias Bibliográficas

- Baldani, VLD.; Baldani, JI & Döbereiner, J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen in wheat. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 29 (8): 869-881.
- Bashan, Y.; Holguin, G. y de-Bashan L. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Can. J. Microb. 50: 521-577.
- Bottini, R.; Fulchieri, M.; Pearce, D. y Pharis, R. 1989. Identification of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, and Iso-A<sub>3</sub> in cultures of *A. lipoferum*. Plant Physiol. 90: 45-47.
- Döbereiner, J., and Day J. M. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites, p. 518-538. In W. E. Newton and C. J. Nyman (ed.), Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation.
- Döbereiner, J.; Baldani V. y Baldani I. 1995. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. MAARA-EMBRAPA-CNPAB. Brasilia, Brazil.
- Figueiredo M.; Burity H.; Stamford N. and Santos C. 2008. Microorganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaiba: Agrolivros. 100 pp.
- Okon, Y and Labandera, C. 1994. Agronomic application of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 26 (12): 1591-1601
- Okon, Y.; Albrecht, S. and Burris, R. 1977. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Applied and Environ. Microb. 85-88.
- Rodríguez Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental and Microbiology 44 (4): 990-991.
- Rodríguez Cáceres, E.; González Anta, G.; López J.R.; Pacheco Basurco, J.C, and Parada, J.L. 1995. Response of field grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in semiarid region of Argentina. Arid Soil Research and Rehabil.10:13-20
- Strzelczyk, E.; Kamper, M. y Li, C. 1994. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. Microbiol. Res. 149: 55-60.
- Tien, T.; Gaskin, M. y Hubbell, D. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.

## ANEXO METODOLOGICO

### 1. Medio agar-RC (agar-Rojo Congo)

Componente	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de Levadura	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.015 g
DL-ácido málico	5.0 g
KOH	4.8 g
(1) Solución de Rojo Congo	15.0 ml
Agar	20.0 g
H <sub>2</sub> O	1000 ml

*Ajustar a pH 7 con 0.1 N de KOH*

#### (1) Solución de Rojo Congo

Componente	Cantidad
Rojo Congo	2,5 g
Água	1000 ml

### 2. Medio NFb semisólido, para evaluar la actividad diazotrófica microaerofílica

Componente	Cantidad
Ácido D-málico	5.0 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Ca <sub>2</sub> Cl.2H <sub>2</sub> O	0.02 g
(2) Sn de Azul de bromotimol	2.0 ml
(3) Sn de micronutrientes	2.0 ml
FeCl <sub>3</sub> .6 H <sub>2</sub> O	0.015 g
KOH	4.5 g
Agar	1.8 g
Agua Destilada	1000 ml

*Ajustar a pH 6.8 con 0.1 N de KOH*

#### (2) Solución básica de Azul de bromotimol

Componente	Cantidad
Azul de bromotimol	0,5 g
OHK 0.2 N	100 ml

### (3) Sn de micronutrientes

Componente	Cantidad
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,286 g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,235 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,024 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,008 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,2 g
H <sub>2</sub> O	200.0 ml

### 3. Solución stock de Tween 80 al 2,5 % (p/v)

Componente	Cantidad
Tween 80	5 g
Agua destilada csp.	200 ml

### 4. Técnica de tinción de Gram modificada por Hucker

#### Reactivo de cristal violeta

*Solución Madre de cristal Violeta (A)*

Cristal violeta	5 g
Alcohol 95°	25 ml

*Solución Madre de oxalato de amonio (B)*

Oxalato de amonio	2 g
H <sub>2</sub> O destilada	200 ml

Preparar las soluciones A y B por separado y utilizar una **solución de trabajo** preparada con 4 ml de solución A; 36 ml de agua destilada y 160 ml de solución B.

#### Solución de lugol

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml

#### Reactivo de safranina

Safranina	2.5 g
Alcohol 95°	100 ml