

# **ANEXOS**

## ÍNDICE

ANEXO I – Tinción de Gram.....	1
ANEXO II – Solución Phosphate Buffered Saline (PBS) .....	2
ANEXO III – Medio de cultivo sólido YEMA con Rojo Congo .....	3
ANEXO IV – Medio de cultivo líquido para la prueba de INDOL .....	4
ANEXO V – Medio de cultivo para Voges Proskauer y Rojo de Metilo .....	5
ANEXO VI – Reactivo de Kovacs para el Indol .....	6
ANEXO VII – Solución $\alpha$ -naftol.....	7
ANEXO VIII – Solución de Rojo de Metilo.....	8

## ANEXO I – Tinción de Gram

### a) Elaboración de los colorantes y reactivos:

#### a. Violeta de Genciana

Violeta de genciana	2,5 g
Alcohol	20 ml
Ácido láctico	25 g
Agua destilada	480 ml

#### b. Reactivo de Lugol

Yodo	1 g
Yoduro potásico	2 g
Agua destilada	300 ml

#### c. Fuchsin básica

Fuchsin fenicada de Ziehl	10 ml
Agua destilada	150 ml

### b) Procedimiento:

- Violeta de Genciana 1 minuto
- Lavado con agua destilada
- Reactivo de Lugol 1 minuto
- Lavado con agua destilada
- Alcohol 30 segundos
- Lavado con agua destilada
- Alcohol 30 segundos
- Lavado con agua destilada
- Fuchsin básica 3 minutos
- Lavado con agua destilada.
- Dejar secar

## Referencias

Willey, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J. (2014). *Prescott's Microbiology, ninth edition*. New York (USA): Mc Graw Hill, pp

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

## ANEXO II – Solución Phosphate Buffered Saline (PBS)

Preparación para 1 l:

Cloruro de sodio (NaCl)	27 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Agua destilada	1 l

### Procedimiento:

- Preparar 100 ml de ácido Clorhídrico (HCl) 1M agregando 8,62 ml de HCl concentrado a 91 ml de agua destilada previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 ml. Mezclar en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos y, posteriormente, aforar a 100 ml con agua destilada.
- Preparar 100 ml de Hidróxido de Sodio 10M (NaOH) agregando 40 g de NaOH a 40 ml de agua destilada previamente colocados en un vaso de precipitados de 250 ml. Mezclar con una barra magnética en una plancha agitadora, hasta que el NaOH se haya disuelto por completo, y aforar a 100 ml con agua destilada.
- Añadir las sales, siguiendo las cantidades de la tabla superior, a un vaso de precipitados, adecuado para el volumen de la solución por preparar.
- Añadir el 80% del volumen de agua destilada requerida y mezclar encima del agitador magnético hasta diluir las sales.
- Ajustar el pH a 7,4 con 1M HCl o 10M NaOH (según sea necesario), añadiendo las soluciones gota a gota.
- Aforar la solución con agua destilada hasta el volumen final requerido.
- Filtrar la solución con discos filtradores de 0.45 µm para eliminar partículas suspendidas.
- Esterilizar en autoclave.

### Referencias

Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). (2008) (1<sup>o</sup> ed., pp. 1-3). San Luís Potosí (México). Revisado en [http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_Buffer\\_PBS.pdf](http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_Buffer_PBS.pdf)

### ANEXO III – Medio de cultivo sólido YEMA con Rojo Congo

Preparación para 1 l:

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,2 g
Fosfato bipotásico	0,5 g
Sulfato magnésico	0,2 g
Cloruro sódico	0,1 g
Carbonato sódico	3 g
Rojo Congo (sol. 1%)	2,5 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

#### Preparación:

- Pesar los componentes y colocar en un matraz.
- Aforar el matraz hasta el volumen requerido.
- Adicionar el Rojo Congo (sol. 1%).
- Agitar para mezclar.
- Esterilizar en autoclave.
- Distribuir en las placas Petri.

#### Referencias

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

#### **ANEXO IV – Medio de cultivo líquido para la prueba de INDOL**

Se utilizó Agua de Peptona como medio de cultivo para llevar a cabo la prueba de INDOL.

Preparación para 1 l:

Peptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato bipotásico	5 g
Agua destilada	1000 ml

#### **Procedimiento:**

- a. Diluir los compuestos, previamente pesados, en agua destilada.
- b. Aforar hasta el volumen requerido.
- c. Esterilizar en autoclave.
- d. Distribuir en tubos de ensayos.

#### **Referencias**

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

## **ANEXO V – Medio de cultivo para Voges Proskauer y Rojo de Metilo**

Preparación para para 1 l:

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato bipotásico	1,5 g
Agua destilada	1000 ml

### **Procedimiento:**

- a. Mezclar los compuestos, previamente pesados, con agua destilada.
- b. Aforar hasta el volumen requerido.
- c. Esterilizar en autoclave.
- d. Distribuir en tubos de ensayo.

### **Referencias**

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

## ANEXO VI – Reactivo de Kovacs para el Indol

Preparación para 100 ml:

<b>p-dimetil-amino- benzaldehido</b>	<b>5 g</b>
Alcohol amílico	75 ml
Ácido clorhídrico concentrado	25 ml

### Procedimiento

- Diluir el p-dimetil-amino-benzaldehido en el alcohol amílico.
- Añadir el ácido clorhídrico concentrado.
- Guardar en un frasco con tapón esmerilado.

### Referencias

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.



## **ANEXO VII – Solución $\alpha$ -naftol**

Preparación para 100 ml:

$\alpha$ -naftol	5 g
Alcohol de 96°	100 ml

### **Procedimiento:**

- a. Diluir el  $\alpha$ -naftol en el alcohol de 96°.
- b. Guardar la solución en un frasco con cuentagotas.

### **Referencias**

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.

## **ANEXO VIII – Solución de Rojo de Metilo**

Preparación para 100 ml:

Rojo de Metilo	1 g
Alcohol de 96°	100 ml

### **Procedimiento:**

- a. Diluir el Rojo de Metilo en el alcohol.
- b. Guardar la solución en un frasco con cuenta gotas.

### **Referencias**

Giménez Hernández, E., Roig Picazo, L., Hernández Haba, J., Hernández Pérez, M., Ferrús Pérez, M. A., Castillo López, M. A., Montes Estellés, R., Botella Grau, S., Cuesta Amat, G., Jiménez Belenguer, A., González Pellicer, A., y Moreno Trigos, Y. (2006). *Prácticas de microbiología general. Primer curso, segundo semestre licenciado en biotecnología*. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia (UPV), pp 93-103-105-110.