

MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE JAÉN



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE JAÉN**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**MANUAL DE PRÁCTICAS
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

CUATRO CICLO



AUTORES

Dra. Cinthya Santa Cruz López

MSc. Fransk A. Carrasco Solano

MSc. Marcela Saldaña Miranda

JAÉN – PERÚ, AGOSTO, 2023

MANUAL DE PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA

AUTORES

Dra. Cinthya Santa Cruz López

MSc. Fransk A. Carrasco Solano

MSc. Marcela Saldaña Miranda



UNIVERSIDAD NACIONAL
DE JAÉN

Universidad Nacional de Jaén

Fondo Editorial

Manual de Prácticas Microbiología Médica

Autores:

- © Dra. Cinthya Santa Cruz López
- © MSc. Fransk A. Carrasco Solano
- © MSc. Marcela Saldaña Miranda

Edición de:

- © Universidad Nacional de Jaén. Fondo Editorial
- Dirección: Km. 24 de la carretera Jaén – San Ignacio, Cajamarca – Perú.

<https://unj.edu.pe/>

1ra. Edición digital - agosto 2023

Hecho el depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú N^o: 2023-07578

ISBN: 978-612-48908-4-0

ÍNDICE GENERAL

Presentación	6
Normas y sugerencias para trabajar en el laboratorio	7
Práctica 1. Bioseguridad	8
Práctica 2. Materiales y equipos de laboratorio	13
Práctica 3. Morfología bacteriana y coloracion simple	19
Práctica 4. Coloraciones compuestas y especiales	22
Práctica 5. Preparacion de medios de cultivo	25
Práctica 6. Siembra y aislamiento de microorganismos	29
Práctica 7. Acción de los agentes físicos y químicos sobre el desarrollo bacteriano	34
Práctica 8. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	37
Práctica 9. Metabolismo de carbohidratos	40
Práctica 10. Metabolismo de compuestos nitrogenados	43
Práctica 11. Demostración de toxinas y enzimas bacteriana	46
Práctica 12. Recuento de microorganismos	49
Práctica 13. Micología general	53
Anexo 1	58
Anexo 2	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del microscopio binocular compuesto.	18
Figura 2. Frasco de agar Mac Conkey deshidratado	27
Figura 3. Siembra por diseminación en superficie en placas de agar.....	31
Figura 4. Técnicas de siembra aplicadas a medios de cultivo contenidos en tubos. A) siembra por estría simple; B) siembra mixta (picadura y estría); C y D) siembra por en agar inclinado y recto y; E) siembra con asa bacteriológica en medio líquido	32
Figura 5. Prueba de sensibilidad antimicrobiana a partir de un cultivo puro.	39
Figura 6. Preparación de diluciones y siembra por difusión en placa.	50
Figura 7. Cocos en racimos	59
Figura 8. Bacilos en cadenas	59
Figura 9. Cocos en tetradas y diplococos.....	59
Figura 10. Cocos en cadenas.....	59
Figura 11. Cocobacilos	59
Figura 12. Espirilos.....	59
Figura 13. Cocos Gram positivos y Gram negativos.....	60
Figura 14. Bacilos Gram positivos y Gram negativos.....	60
Figura 15. Cápsula bacteriana	60
Figura 16. Esporas bacterianas	61
Figura 17. Pruebas bioquímicas de identificación bacteriana.	61
Figura 18. Lectura de prueba de TSI. a). A/A, +++, -; B) K/A, +++, -.....	61
Figura 19. Lectura de prueba de LIA. A) K/K, -, -; B) K/K, -, +; C) K/A, +, -.....	62
Figura 20. Lectura de prueba de citrato. A) prueba de citrato negativa; B) prueba de citrato positiva.....	62

PRESENTACIÓN

El desarrollo de la microbiología como ciencia cobró gran importancia con el descubrimiento del microscopio. Este aparato permitió visualizar a organismos tan pequeños que no se podían observar a simple vista, pero su descubrimiento debió aguardar hasta el último tercio del siglo XVII.

Asimismo, el uso de técnicas básicas para aislar, observar y propagar microorganismos, que hoy en día se siguen aplicando con el apoyo del microscopio, han permitido establecer la participación de los microorganismos en el desarrollo de enfermedades. De esta manera, la Microbiología ha contribuido a lo largo del tiempo en la permanente batalla contra los gérmenes patógenos.

Considerando lo anterior, se elaboró este manual didáctico dirigido a jóvenes universitarios que inician su experiencia en el manejo de bacterias, hongos y parásitos, considerando de gran importancia cumplir las normas de bioseguridad y recomendaciones sobre los principales procedimientos que deberán aplicarse para manipular en forma adecuada a los microorganismos.

Es propósito de este manual presentar en forma secuencial una total de 16 prácticas en las que se detallan los objetivos, el material de laboratorio, procedimientos y técnicas empleadas usualmente en el laboratorio de microbiología para contribuir al proceso enseñanza-aprendizaje de los estudiantes, esperando que este sea de mucha ayuda en su formación.

Los Autores.

NORMAS Y SUGERENCIAS PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO

1. Usar guardapolvo o bata de laboratorio es indispensable durante el desarrollo de la práctica en el laboratorio.
2. El consumo de alimentos y bebidas en el ambiente de laboratorio no está permitido.
3. Las superficies de las mesas de trabajo deben ser limpiadas y desinfectadas antes y después de realizar las actividades.
4. Es necesario realizar un adecuado lavado de manos antes y después de cada práctica.
5. El material de laboratorio empleado para el desarrollo de la práctica debe ser entregado antes de abandonar el ambiente de laboratorio.
6. Los materiales y equipos de laboratorio deben ser manipulados con mucho cuidado para evitar accidentes.
7. Las indicaciones para realizar la clase práctica serán brindadas antes de iniciar la misma.
8. El trabajo no debe iniciarse si antes no se han recibido y comprendido las instrucciones, ya que un buen desempeño depende primordialmente entender lo que realizará.
9. No olvide anotar los resultados y explicaciones pertinentes.
10. Antes de iniciar el análisis las muestras deben estar correctamente rotuladas y no deben ser desechadas hasta la obtención del resultado correspondiente.
11. El material que se utilizará para la siembra, aislamiento e identificación de microorganismos debe ser previamente esterilizado.
12. En caso se produjera un accidente como derramar un cultivo sobre la mesa o el piso, una cortadura, quemadura u otro, es necesario dar aviso inmediato al docente.
13. El asa bacteriológica y micológica debe ser esterilizada (con ayuda del mechero) antes y después de ser utilizada.
14. No debe movilizarse por los ambientes del laboratorio cuando sostiene una muestra biológica, ya que puede ocasionar un accidente o generar aerosoles.

PRÁCTICA 1

BIOSEGURIDAD

1. Introducción

El trabajo en el laboratorio necesita de la aplicación de normas de bioseguridad que eviten o prevengan posibles accidentes por desconocimiento de la labor que se realiza. Por lo que, es sumamente necesario que los estudiantes que inician sus actividades en laboratorio sean conscientes de los riesgos a los que están expuestos y que cumplir con las medidas de bioseguridad establecidas permite el resguardo de su salud e integridad física.

2. Objetivos

- Conocer y promover las medidas de bioseguridad que deben aplicarse para el buen trabajo en el laboratorio.

3. Materiales

- Microscopios
- Material de vidrio
- Reactivos

4. Procedimiento

4.1. Experiencia 1: Terminología relacionada a la bioseguridad en el laboratorio

A. Bioseguridad.

La bioseguridad es un conjunto de medidas eficaces, cuya finalidad es evitar contaminación accidental con patógenos contenidos en las muestras biológicas. Asimismo, los riesgos relacionados a la exposición con agentes químicos, físicos y/o mecánicos. De modo que, estas normas son base para el buen manejo, transporte, conservación y desecho de sustancias potencialmente dañinas para el personal de laboratorio y la comunidad.

B. Agente biológico

Todo organismo vivo con capacidad de generar infección, enfermedad o muerte en el ser humano. Se incluyen los organismos genéticamente modificados y endoparásitos humanos capaces de causar infección o alergias.

C. Antisépticos

Se definen como agentes germicidas para ser usados sobre la piel y los tejidos vivos. Aunque algunos germicidas pueden ser utilizados como desinfectantes y antisépticos (alcohol 70 - 90%) a la vez. Sin embargo, su efectividad no es necesariamente la misma en cada caso, un buen antiséptico puede no ser eficaz como desinfectante y viceversa.

D. Área contaminada

Área del laboratorio donde se manipulan agentes patógenos.

E. Accidente de trabajo

Se trata de un evento que ocurre durante el tiempo de trabajo y puede ocasionar la inhabilitación temporal o permanente del trabajador afectado.

F. Incidente de trabajo

Situación de riesgo que podría conllevar a que ocurra un accidente de trabajo.

G. Desinfección

Proceso por el cual se eliminan los microorganismos patógenos de un material, utilizando agentes principalmente químicos. Estos compuestos presentan efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que sólo se emplean sobre materiales inertes.

H. Esterilización

Proceso que genera la inactivación total e irreversible de todas las formas de vida microbiana, mediante el empleo de agentes físicos y/o químicos.

I. Microorganismo

Se incluyen a las bacterias, hongos (levaduras), parásitos (protozoarios) y virus.

J. Sustancia infecciosa

Aquella sustancia que contiene microorganismos viables capaces de ocasionar enfermedades tanto en el hombre como en animales.

4.2. Experiencia 2: Manejo de desechos de laboratorio

Los desechos de las actividades realizadas en un laboratorio pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas. Por lo que se requieren medidas adecuadas para su manejo y eliminación

4.2.1. Clasificación de los Residuos según su Peligrosidad

Los residuos sanitarios, pueden agruparse en residuos biocontaminados, especiales y comunes, tal como se detalla a continuación:

A. Clase A: Residuos biocontaminados

- **Tipo A 1** (materiales en recolección de muestra sanguínea, tejidos), **Tipo A 2** (material biológico), **Tipo A 3** (sangre humana y productos derivados), **Tipo A 4** (quirúrgicos y anatomopatológicos) y **Tipo A 5** (animales contaminados).

B. Clase B: Residuos especiales

- **Tipo B1** (químicos peligrosos), **Tipo B2** (medicamento), **Tipo B3** (radioactivos).

C. Clase C: Residuos comunes

Tales como material de oficina, basura orgánica, entre otros.

4.2.2. Manejo y tratamiento de los desechos de residuos infecciosos

Un residuo infeccioso es aquella sustancia o material capaz de producir una enfermedad infecciosa. Para identificar estos residuos es necesario considerar la forma de transmisión, virulencia del microorganismo, susceptibilidad del hospedero, entre otros. Por lo que, todo laboratorio debe contar con directrices para el manejo y tratamiento de los desechos o residuos infecciosos, considerando lo descrito por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA), tal como se detalla a continuación:

- Separar e identificar los residuos infecciosos y su riesgo relativo; seguir normas de señalización, almacenamiento y transporte; elaborar un plan de formación para las personas expuestas; contar con normativa en caso de derrames o roturas de recipientes

accidentales y seguir un plan de contingencia frente al fallo de medidas de contención habituales.

Los residuos producidos en los laboratorios se categorizan en: líquidos, sólidos y objetos punzantes - cortantes.

- **Residuos líquidos:** Los líquidos infecciosos que se generan en el laboratorio deben colocarse en un recipiente con solución de hipoclorito sódico recién preparada. Además, es necesario calcular el volumen máximo aceptable que asegure la eficacia del desinfectante. En caso de inóculos bacterianos en medios líquidos, se deben autoclavar antes de ser eliminados.
- **Residuos sólidos:** Frecuentemente se esterilizan utilizando una autoclave y la esterilización por incineración. Se debe contar con la asistencia de una empresa certificada en el tratamiento de estos residuos.
- **Objetos punzantes y cortantes:** Los recipientes deben ser rígidos, impermeables, resistentes a compuestos químicos y con cierre hermético.

4.3. Transporte de desechos infecciosos

- Las bolsas de color rojo rotuladas como “Riesgo Biológico” ó “Material Contaminado” son autoclavadas e incineradas.
- Las bolsas para recolectar residuos sólidos se diferenciar por colores: bolsas rojas (residuos biocontaminados), amarillo (residuos químicos) y negro (residuos comunes).
- Los residuos no deben almacenarse en el laboratorio más de 24 horas, posterior al llenado y cerrado de los recipientes.
- El almacenamiento y transporte debe realizarse en áreas específicas del laboratorio.
- El transporte puede efectuarse en un contenedor de polietileno de alta densidad, rígido, lavable, con bordes romos con tapas. Los residuos de riesgo no deben transportarse junto a residuos comunes.

- Evitar la formación de aerosoles durante el transporte de los residuos biológicos, para lo que se debe evitar los movimientos bruscos.

5. CUESTIONARIO

5.1. Mencione 05 normas de bioseguridad para el trabajo en el área de microbiología de un laboratorio.

5.2. ¿Cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo a su grupo de riesgo?

5.3. Esquematice 03 señales de seguridad y salud en el trabajo de laboratorio.

PRÁCTICA 2

MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

1. INTRODUCCIÓN

La microbiología es una ciencia cuyo estudio y comprensión requiere del conocimiento y manejo de materiales e instrumentos de uso común, lo que permitirá obtener resultados de válidos y confiables de los procedimientos realizados.

2. OBJETIVO

- Identificar los materiales y equipos utilizados con frecuencia en un laboratorio de microbiología, así como su correcto funcionamiento.

3. MATERIALES DE LABORATORIO

- Material de vidrio
- Material de metal
- Equipos de laboratorio

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Experiencia 1: Usos de material de vidrio

- **Tubos de ensayo:** Son tubos de vidrio neutro de diferentes medidas y volumen, con paredes gruesas, resistentes a altas temperaturas. Para emplearlos, deben estar esterilizados con su correspondiente tapón de algodón.
- **Tubo o campana de Durham:** Tubo pequeño con un extremo abombado, que se utiliza para observar la producción de gas en procesos de fermentación. Es necesario colocarlos en forma invertida dentro de un tubo de ensayo.
- **Placas Petri:** Son cajas cilíndricas de paredes gruesas con una tapa y una base, que se emplean para colocar los medios de cultivo sólidos.
- **Pipetas:** Son tubos cilíndricos largos. Son de dos tipos: **Graduadas (Terminales y No Terminales)** y **No Graduadas** (Llamadas también pipetas Pasteur). Las pipetas para ser utilizadas, deben ser taponadas

con algodón en la zona de la boquilla y envueltas en papel para ser esterilizadas.

- **Probetas:** Son recipientes cilíndricos graduados con una base plana, de diferente tamaño y capacidad. Se emplean para medir grandes volúmenes de líquidos.
- **Matraz Erlenmeyer:** De forma cónica, cuello corto y base plana. Se encuentran en diferentes tamaños y capacidades, y pueden estar o no graduados. Se utilizan para preparar soluciones y medios de cultivo.
- **Balones:** De forma redonda, cuello largo y base plana. Se utilizan para preparar soluciones y medios de cultivo.
- **Espátula de Drigalsky:** Son varillas de vidrio compacto que tienen forma triangular en uno de sus extremos. Facilita la siembra de bacterias por diseminación.
- **Baguetas o agitadores:** Son varillas de vidrio compacto, de extremos romos, se emplean para disolver sustancias en una solución.
- **Láminas porta y cubre objetos:** Las láminas portaobjetos con forma rectangular y pequeño grosor. Mientras que, los cubreobjetos son finas laminillas de menor tamaño, forma rectangular o cuadrada. Se emplean en la observación microscópica.
- **Frascos goteros:** Son frascos de vidrio transparentes o de color ámbar, con paredes gruesas.
- **Mortero y pilón:** Es un recipiente cóncavo de porcelana de paredes gruesas. Se emplea para triturar colorantes, tejidos u otros especímenes.
- **Jarra de Brewer:** Llamada también Campana de Anaerobios en cuyo interior se colocan los tubos o placas de Petri a incubar. La jarra presenta cierre hermético.

4.2. Experiencia 2: Usos de material de metal

- **Asas bacteriológicas:** Posee una base de platino, acero o aluminio y, un filamento que puede ser de nicromo, Wolframio o platino que termina en anillo (aro de 5mm), en punta y en ángulo recto (asa micológica). Se

utiliza para transportar, arrastrar, trasvasar inóculos de una solución madre a un medio de cultivo.

- **Canastillas:** Se utiliza para el transporte de los tubos u otro material.
- **Gradillas:** Sirven para colocar los tubos de forma recta durante el trabajo.
- **Espátulas:** Es de material inoxidable. Se utiliza para coger el material a pesar.

4.3. Experiencia 3: Equipos de laboratorio

- **Autoclave:** Equipo utilizado para esterilizar el material contaminado, medios de cultivo, entre otros. Generalmente trabaja a una temperatura de 121° C durante 15 a 20 minutos con una 1 atm de presión. Durante el proceso de autoclavado se destruyen todas las formas vegetativas y esporuladas de los microorganismos.
- **Horno:** Es un aparato empleado para esterilización por calor seco. Está constituido por una resistencia y un termostato que regula altas temperaturas (180° C).
- **Baño María:** Es un recipiente de forma rectangular, que está constituido en su parte inferior por una resistencia que va conectado a un termostato, que permite regular la temperatura; por encima se encuentra una cubeta en la que se coloca el agua a calentar. Se emplea para disolver medios de cultivo, inactivación de sueros, entre otros.
- **Incubadora:** Utilizada para la multiplicación de los microorganismos. Generalmente se emplean a una temperatura de 37° C por 18 a 24 horas.
- **Centrífuga:** Aparato para acelerar la separación de partículas sólidas suspendidas en líquidos. La velocidad de sedimentación de partículas en un líquido depende del tamaño de la partícula, peso, viscosidad del líquido y fuerza gravitacional.
- **Potenciómetro:** Se utiliza para medir el pH en soluciones buffer y medios de cultivo.
- **Refrigeradora:** Aparato que proporciona temperaturas muy bajas. Se emplean para almacenar medios de cultivo, sueros, reactivos y soluciones perecederas.

- **Balanza:** Se utiliza para pesar los medios de cultivo deshidratados, colorantes y otros.

4.4. Experiencia 4: Partes y funcionamiento del microscopio óptico

Microscopios: Son aparatos que incrementan el poder de resolución y tamaño de los microorganismos en cientos o miles de veces.

Componentes del microscopio

A. El sistema de soporte

El pie, bastidor, revólver (cambia objetivos) y platina

B. El sistema de aumento

Las lentes del microscopio se encuentran montadas en dos grupos. El primer grupo se halla arriba de la preparación que se va a examinar y se conoce como objetivo. El segundo se conoce como ocular y se encuentra en el extremo superior del tubo, por donde observa el microscopista.

B.1. Los objetivos

Aumento: El poder de aumento de cada objetivo se indica por un número grabado en la manga de la lente: El objetivo 10 aumenta 10 veces y el objetivo 40 aumenta 40 veces.

La abertura numérica (AN): Se visualiza en la manga de la lente, junto a la indicación del poder de aumento. Es directamente proporcional al poder de resolución.

En la manga del objetivo puede haber otros números: la longitud recomendada entre el objetivo y ocular, es generalmente de 160 mm

Distancia de operación del objetivo

Distancia entre la lente frontal del objetivo y portaobjetos cuando la imagen se encuentra enfocada. A mayor poder de aumento del objeto, disminuye la distancia de operación.

- Objetivo \times 10: distancia de operación es de 5 - 6 mm
- Objetivo \times 40: distancia de operación es de 0,5 - 1,5 mm

Poder de resolución

A mayor poder de resolución del objetivo, la imagen es más clara y aumenta la capacidad de observar, separar y aclarar detalles muy cercanos.

El aceite de inmersión incrementa el poder de resolución. Permite conservar los rayos luminosos que se perderían al usar un objetivo seco.

B.2. El Ocular

Aumento: El poder de aumento se encuentra marcado en el ocular:

- Un ocular $\times 4$, aumenta 4 veces la imagen que produce el objetivo.
- Un ocular $\times 10$, aumenta la imagen 10 veces. Para calcular el aumento total de la imagen observada, se multiplica el poder de aumento del objetivo por del ocular.

C. El sistema de iluminación

- **La fuente luminosa**

Se emplea principalmente luz eléctrica

- **El espejo**

Refleja los rayos de la fuente luminosa sobre el objeto.

- **El condensador**

Tiene por función llevar los rayos luminosos a un foco común sobre el objeto a examinar.

- **El diafragma**

Se utiliza para reducir o ampliar el ángulo y la cantidad de luz que ingresa a través del condensador. Por lo que, a más apertura del diafragma más se amplía el ángulo y en consecuencia aumenta la AN, observándose detalles más pequeños.

D. El sistema de ajuste

- **Tornillo macrométrico:** Se utiliza para aproximar del enfoque de la muestra examinada.
- **Tornillo micrométrico:** Se utiliza para que el objetivo se desplace lentamente y conseguir el enfoque adecuado del objeto.
- **El tornillo de ajuste del condensador:** Se utiliza para elevar o descender el condensador. Además, de aumentar la iluminación o reducirla.

- **Los tornillos para centrar el condensador:** Se utilizan para centrar el condensador en relación con el objetivo.
- **El elevador del diafragma:** Permite cerrar o abrir el diafragma.
- **Reguladores de la platina mecánica:** Útil para movilizar el portaobjetos sobre la platina.



Figura 1. Partes del microscopio binocular compuesto. (1) oculares; (2) escala de ajuste interpupilar; (3) cabezal; (4) anillo de dioptrías; (5) revolver; (6) objetivos; (7) platina; (8) palanca de diafragma; (9) condensador de abertura; (10) condensador de campo; (11) columna; (12) interruptor – perilla; (13) carro; (14) perilla del carro; (15) tornillo macrométrico; (16) tornillo micrométrico y (17) base.

5. CUESTIONARIO

- 5.1. ¿Por qué es importante conocer el uso de los materiales de laboratorio?
- 5.2. ¿Qué instrumentos de laboratorio utilizarías para?: Medir 1 ml de un líquido, observar microorganismos de un charco y cultivar bacterias y hongos
- 5.3. ¿Qué materiales de laboratorio se pueden esterilizar en una autoclave?

PRÁCTICA 3

MORFOLOGÍA BACTERIANA Y COLORACION SIMPLE

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias poseen una amplia diversidad en tamaño y forma. Pueden observarse con ayuda de la luz del microscopio con morfología esférica (cocos), alargada (bacilos), espiralada (espirilos y espiroquetas), entre otros.

Los cocos se observan como células esféricas aisladas, en pares (diplococos), en cadenas (estreptococos), o dependiendo de los planos de división (en tétradas o en grupos arracimados). Mientras que, los bacilos pueden variar considerablemente en longitud, con extremos suavemente redondeados, o cuadrados.

Por otro lado, los bastones curvos, o espirilos, varían desde microorganismos pequeños, en forma de coma, o levemente helicoidales con una sola curvatura, o con forma de espiroquetas largas y sinuosas.

2. OBJETIVOS:

- Reconocer y diferenciar la morfología de las bacterias, así como evidenciar la motilidad en preparaciones en fresco.

3. MATERIALES:

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Asas bacteriológicas
- Mechero
- Láminas con preparaciones fijadas
- Microscopio
- Aceite de cedro
- Algodón
- Alcohol
- Muestras: orina, yogurt, pus de herida, saliva, sarro dentario

4. PROCEDIMIENTO:

4.1.Experiencia 1: Determinación de motilidad.

- Colocar la muestra de orina previamente homogenizada en un tubo, calibrarlo con otro tubo de las mismas dimensiones conteniendo agua.
- Centrifugar 3500rpm durante 5min
- Eliminar el sobrenadante
- Colocar una gota del sedimento de orina en una lámina portaobjetos limpia y cubrir con laminilla.
- Observar al microscopio con objetivo seco (40 X)
- Esquematizar lo observado.

4.2.Experiencia 2: Coloración simple

- En una lámina portaobjeto colocar cada muestra por separado (yogurth, pus de herida, orina, saliva) y realizar el frotis.
- Dejar secar a temperatura ambiental o con ayuda de un mechero.
- Cubrir el frotis seco con azul de metileno y dejar actuar durante 5 minutos.
- Lavar el frotis con un chorro de agua ligero.
- Secar el frotis al medio ambiente o al calor suave de un mechero.
- Observar microscópicamente a objetivo 100x.
- Esquematizar lo observado.

4.3.Experiencia 3: Coloración negativa

- En una lámina portaobjeto colocar una gota de nigrosina o tinta china y otra de la muestra (sarro dentario).
- Mezclar y extender ligeramente.
- Secar el frotis al medio ambiente.
- Observar al microscopio a objetivo 100x y esquematizar.

4.4.Experiencia 4: Reconocimiento morfológico en láminas fijadas.

- Observar y reconocer en láminas preparadas la forma bacteriana (bacilos, cocos, espirilos).
- Esquematizar según corresponda.

5. CUESTIONARIO

- 5.1.** ¿En qué se diferencia la motilidad y movimiento browniano en bacterias?
- 5.2.** Mencione 5 ejemplos de bacterias con forma de cocos, bacilos y espirilos
- 5.3.** Mencione 3 ejemplos de colorantes básicos y ácidos, y su utilidad.

PRACTICA 4

COLORACIONES COMPUESTAS Y ESPECIALES

1. INTRODUCCIÓN

Las tinciones bacterianas son de gran importancia en la microbiología, debido a que permiten conocer las características de las bacterias. Las técnicas de coloración doble o compuesta permiten la utilización de dos colorantes, uno es el colorante primario y el segundo es el colorante de contraste. Mientras que, las tinciones especiales van dirigidas a detectar ciertos componentes de la bacteria como flagelos, esporas, cápsulas, para lo cual se utilizan tinciones de naranja de acridina, rojo de Congo, etc.

2. OBJETIVOS

- Diferenciar entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Identificar a los bacilos ácido alcohol resistentes.
- Realizar técnicas de coloración que permitan observar estructuras específicas de la célula bacteriana.

3. MATERIALES

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Asas bacteriológicas
- Mechero
- Láminas con preparaciones fijas
- Microscopio
- Aceite de cedro
- Algodón
- Alcohol
- Muestras: jugo de frutas, orina, saliva, etc.

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Experiencia 1: Coloración Gram

- Sobre una lámina portaobjeto limpia, colocar la una gota de la muestra homogenizada (orina, jugo de frutas, etc.) y realizar un frotis (extendido y fijado).
- Cubrir el frotis con cristal violeta y dejar actuar durante 3 minutos.
- Lavar con chorro de agua leve, luego agregar lugol y dejar actuar durante 1 minuto.
- Lavar a chorro de agua leve y decolorar con alcohol acetona durante 30 segundos.
- Nuevamente, lavar a chorro de agua leve y cubrir el frotis con safranina, dejando actuar durante 1 minuto.
- Lavar a chorro de agua leve y secar al medio ambiente o al calor suave del mechero.
- Observar al microscopio a objetivo 100x y esquematizar.

4.2. Experiencia 2: Coloración de Ziehl -Neelsen

- En una lámina portaobjetos limpia, colocar una gota de la muestra (esputo) y realizar un frotis.
- Cubrir el frotis con solución de Fucsina fenicada y calentar ligeramente hasta la emisión de vapores sin llegar a hervir.
- Repetir esta operación tres veces en un tiempo de 3 - 5 minutos.
- Lavar el frotis con un chorro de agua leve.
- Decolorar el frotis con alcohol ácido por 30 segundos.
- Lavar a chorro de agua leve y cubrir el frotis con azul de metileno durante 1 minuto
- Lavar a chorro de agua y secar al medio ambiente o al calor suave del mechero.
- Observar microscópicamente con objetivo 100x y esquematizar.

4.3. Experiencia 3: Coloración de cápsula

- Sobre una lámina portaobjeto limpia, colocar una gota de la solución de Rojo de Congo al 1%

- Agregar el cultivo bacteriano y mezclar con la solución de Rojo de Congo.
- Realizar el frotis circular de un diámetro de 2 cm. y dejar secar a temperatura ambiental.
- Fijar el frotis con solución de alcohol ácido al 2%.
- Después, teñir con solución de cristal violeta al 1% durante 1 a 3 minutos.
- Lavar con agua, secar, observar al microscopio a objetivo 100x y esquematizar.

4.4.Experiencia 4: Reconocimiento morfológico en láminas fijas.

- Observar y reconocer la forma y agrupación bacteriana (bacilos, cocos, espirilos) en láminas preparadas.
- Realizar los esquemas correspondientes.

5. CUESTIONARIO.

- ¿Cuál es el fundamento de la coloración Gram?
- ¿Cuál es el fundamento de la coloración del Ziehl Neelsen?
- ¿Cómo actúa el colorante Rojo Congo?

PRÁCTICA 5

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. INTRODUCCIÓN

Los medios de cultivo se definen como sustratos nutritivos donde se colocan microorganismos por un tiempo determinado y a una temperatura adecuada, permitiendo su desarrollo y multiplicación. Todo medio de cultivo debe contener fuentes de carbono, nitrógeno, presentar un equilibrio ácido – base (pH) y estar libre de gérmenes contaminantes.

Los microorganismos tienen diferentes requerimientos nutritivos, los que se toman en cuenta para seleccionar un medio de cultivo, ya que su composición varía de acuerdo a las exigencias del germen. Los medios de cultivo de acuerdo a su consistencia puede ser líquidos o también denominados caldos, semisólidos y sólidos (como el agar con agente solidificante).

2. OBJETIVOS

- Preparar medios de cultivo líquidos, sólidos y semisólidos
- Conocer las pautas para servir medios de cultivos sólidos, semisólidos y líquidos en los recipientes correspondientes.

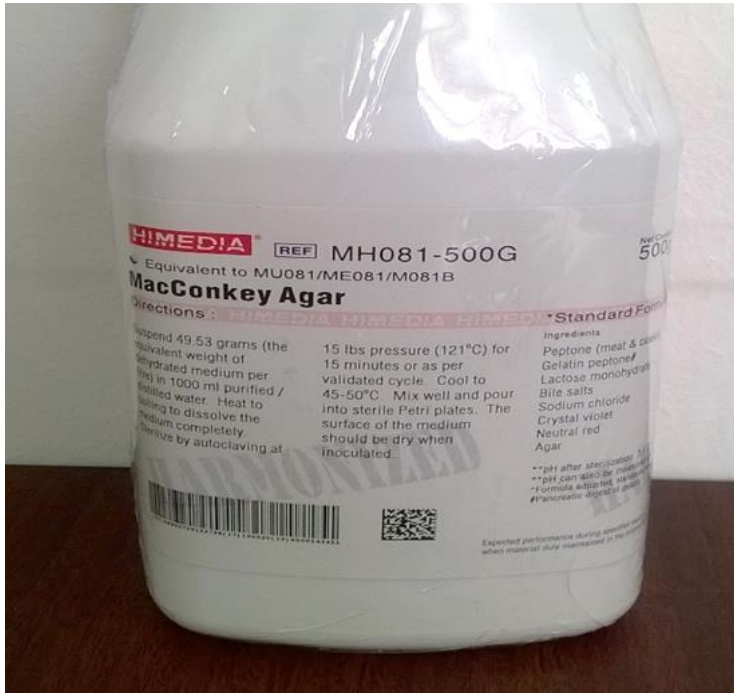
3. MATERIALES

- Agar Mac Conkey deshidratado
- Agua destilada.
- Balanza Analítica.
- Matraz de 250 ml.
- Probeta de 500 ml.
- Algodón
- Espátulas
- Baño maría
- Autoclave.
- Alcohol

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Preparación de medio de cultivo

- Para pesar el medio de cultivo deshidratado, la balanza analítica debe estar previamente calibrada (calibrar la balanza llevando a cero).
- Pesar los ingredientes de acuerdo a la fórmula que viene en el frasco del medio de cultivo, calculando las cantidades necesarias para los volúmenes requeridos (revisar el frasco que contiene el medio donde el fabricante menciona la cantidad de agar necesario por cada litro de agua, a partir de ello realizar una regla de tres simple y establecer la cantidad de agar que necesita).
- Una vez pesado el agar debe verterse con cuidado en un matraz limpio.
- Enseguida medir en una probeta la cantidad de agua destilada que necesita y agregarla al matraz que contiene el medio de cultivo.
- Disolver la mezcla en baño maría o con cuidado frente al mechero, de modo el agua y el medio se mezclen homogéneamente.
- Una vez disuelto el medio, colocar un tapón de algodón y envolver con papel Kraft la boca del matraz y llevar a la autoclave a 121 °C por 15 minutos, para esterilizar el medio de cultivo.
- El control de esterilidad se realiza llevando el medio a incubación a 37°C durante 18 a 24 horas.
- Para preparar el agar sangre, se debe disolver 200 mL de agar nutriente estéril en baño maría y luego dejar enfriar a 45 – 50°C y agregar aprox. 10 ml (5%) de sangre de carnero o bovino desfibrinada o citrada.
- Homogenizar y verter el medio inmediatamente a placas Petri o tubos de prueba estériles. Posteriormente, dejar solidificar el medio de cultivo.



- Por cada litro de agua, se emplean 49,53g de agar. Por lo tanto, si se utilizará 250ml de agua destilada, se tendrían que pesar 12,38g de agar deshidratado.
- La cantidad de agua destilada a utilizar depende de cuantas placas con el medio de cultivo se necesiten servir

Figura 2. Frasco de agar Mac Conkey deshidratado

4.2.Experiencia 2: Repartición del medio de cultivo en placas Petri

- Para servir el medio de cultivo en las placas, este debe encontrarse a una temperatura entre los 45 - 50°C.
- Encender los mecheros para mantener la esterilidad (también se puede utilizar la cabina de bioseguridad).
- Frente al mechero se debe quitar la envoltura de la placa y del matraz que contiene el medio.
- Retirar el tapón al matraz con medio de cultivo y sostenerlo, sin dejar que caiga sobre la mesa de trabajo.
- Levantar la tapa de la placa Petri estéril y agregar lentamente el medio de cultivo a la placa (15-25mL por 4mm de espesor) y tajarla con cuidado
- Realizar movimientos rotatorios a la placa cerrada, sobre la mesa de trabajo, de modo que el medio se distribuya por toda la placa y no se formen burbujas.
- Finalmente dejar solidificar el medio de cultivo aproximadamente 15 a 20 minutos.

- Para el control de esterilidad se debe llevar el medio de cultivo a la incubadora a 37°C durante 18 a 24 horas (previo a su utilización).

4.3.Experiencia 3: Repartición de medio de cultivo líquido y semisólido en tubos

- Para poder servir, el medio de cultivo debe encontrarse a una temperatura entre los 45 - 50°C.
- Se debe encender los mecheros para mantener la esterilidad (también se puede utilizar la cabina de bioseguridad).
- Quitar la cubierta del matraz que contiene el medio frente al mechero, con el meñique de una mano retirar el tapón del tubo y con el meñique de la otra mano retirar el tapón del matraz con el medio de cultivo.
- Recuerde que debe flamear la boca de los tubos antes de verter el medio y después de hacerlo, de igual forma debe flamear la boca del matraz antes y después de servir el medio.
- Vaciar aprox. 5mL del medio de cultivo al tubo estéril.
- Flamear la boca de ambos recipientes, cubrir con sus respectivos tapones y colocar los tubos sobre una gradilla.

5. CUESTIONARIO

5.1.¿Para qué se utiliza un medio de cultivo?

5.2.¿Que son los medios de transporte?, brinde 3 ejemplos.

5.3.Mencione tres ejemplos de medios de cultivo selectivo diferencial para enterobacterias

PRÁCTICA 6

SIEMBRA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

1. INTRODUCCIÓN

La siembra es el paso inicial en el estudio de las características culturales de un microorganismo. Además, mediante el aislamiento se pueden separar las distintas especies microbianas mixtas. Las técnicas de aislamiento, permiten la obtención de microorganismos a partir de muestras complejas (suelo, agua, alimentos, entre otras) donde se encuentra una gran variedad de microorganismos, además de comprobar si el cultivo obtenido es puro. Los cultivos puros están confirmados por un solo tipo de microorganismo y son de gran importancia para conocer las características morfológicas, de tinción actividad bioquímica, entre otras.

La técnica de siembra seleccionada dependerá de la consistencia del medio de cultivo (líquido, semisólido, sólido), si se encuentra en placa o tubo y la finalidad de la siembra (aislar, recuento, antibiograma, metabolismo bacteriano, etc.)

2. OBJETIVOS

- Realizar las diferentes técnicas siembra en medios sólidos, líquidos y semilíquidos.

3. MATERIALES

- Muestra: Cultivos Bacterianos.
- Placas Petri con agar nutritivo y agar Mac Conkey.
- Tubos con agar nutritivo inclinado.
- Tubos con caldo nutritivo.
- Tubos con medio SIM
- Asas bacteriológicas: en anillo y punta.
- Asa de Drigalsky.
- Estufa calibrada a 37° C.
- Alcohol y algodón

4. PROCEDIMIENTO

Antes de realizar las experiencias se debe considerar lo siguiente:

- Limpiar y desinfectar el área de trabajo.
- Colocar el material requerido sobre la mesa de trabajo
- Evitar las corrientes de aire en el ambiente seleccionado.
- No hablar durante la realización de la siembra de microorganismos.
- Esterilizar el asa bacteriológica antes y después de sembrar.
- Utilizar medios de cultivo esterilizados.

4.1.Experiencia 1: Siembra por diseminación en superficie en placas de agar

Se emplean porque permiten diferenciar a los gérmenes que se encuentran de acuerdo a sus características culturales.

- Tomar la muestra con el asa bacteriológica estéril y realizar un estriado muy junto en el primer tercio de la placa (agotamiento) y luego realizar estrías más separadas en forma de zigzag hasta el lado opuesto. También se puede realizar el estriado utilizando los cuadrantes de la placa; en forma de T; estría radiada o estría continua.
- Con el asa extender un volumen de 0.1 ml de muestra sobre una placa con medio sólido.
- Llevar las placas a incubar 37°C por 24h, observar y esquematizar.

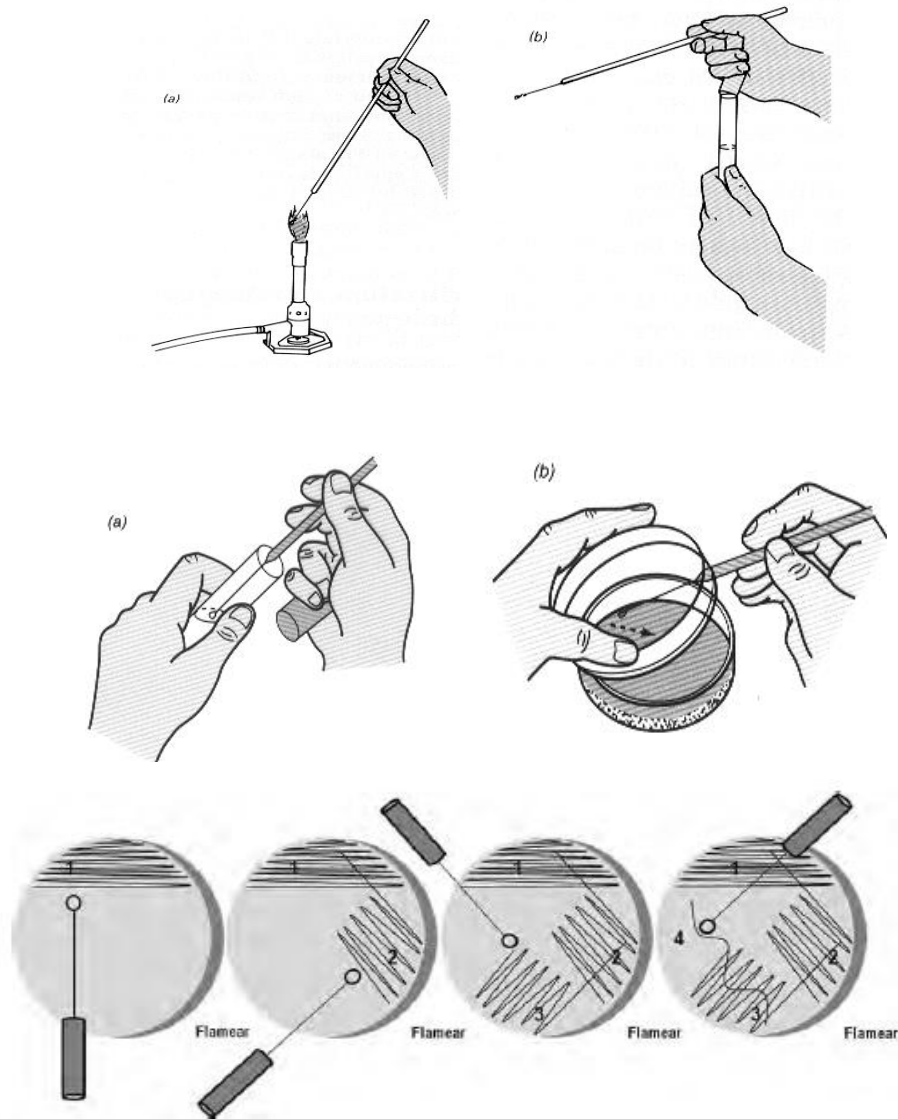


Figura 3. Siembra por diseminación en superficie en placas de agar. Fuente: Ramírez J, Medina Y, Uscanga I. Manual de laboratorio de microbiología. Xalapa – Veracruz: Universidad Veracruzana; 2018.

4.2.Experiencia 2: Siembra por difusión en placa vertida

Utilizada para el recuento total de bacterias a partir de una muestra líquida.

- Se coloca una alícuota de muestra (1ml) sobre la superficie de una placa Petri estéril vacía.
- Luego agregar 15 - 20ml de agar nutritivo a 45 – 50° C.
- Homogenizar el medio de cultivo mediante movimientos de rotación y traslación.

- Dejar solidificar de 15 a 20 minutos sobre una superficie plana.
- Las placas se llevan a incubación durante 24h a una temperatura de 37°C.

4.3. Experiencia 3: Siembra en tubos con agar inclinado

- Se realiza mediante estriado en la superficie inclinada. En ciertos casos, también se realiza una puntura hasta las dos terceras partes de profundidad, utilizando asa bacteriológica en punta.

4.4. Experiencia 4: Siembra en medios líquidos

- La siembra se realiza llevando el inóculo o muestra al medio líquido. Para ello se emplea el asa bacteriológica en anillo, también pueden emplearse pipetas estériles.

4.5. Experiencia 5: Siembra en medios semisólidos

- Sembrar la colonia bacteriana en el medio de cultivo por puntura (utilizando el asa en aguja). Posterior a la inoculación, agitar suavemente los tubos por rotación entre las palmas de las manos para obtener buena dispersión.

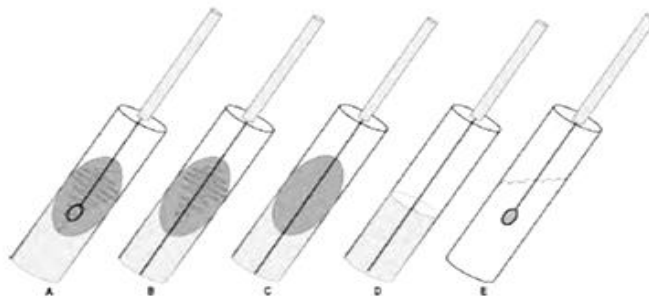


Figura 4. Técnicas de siembra aplicadas a medios de cultivo contenidos en tubos. A) siembra por estría simple; B) siembra mixta (picadura y estría); C y D) siembra por en agar inclinado y recto y; E) siembra con asa bacteriológica en medio líquido. Fuente: Díaz R, Gamaso C, López-Goñi I. Manual práctico de microbiología. 3ª Edición. Barcelona: MASSON; 2005.

5. CUESTIONARIO

- 5.1. ¿Por qué es importante realizar adecuadamente la siembra de microorganismos?
- 5.2. Mencione que técnicas de siembra se pueden realizar en cada medio de cultivo.
- 5.3. ¿Para qué se utiliza la siembra de difusión en placa vertida?

PRÁCTICA 7

ACCIÓN DE LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS SOBRE EL DESARROLLO BACTERIANO

1. INTRODUCCION

Prácticas de la vida cotidiana como la potabilización del agua, la pasteurización de la leche o la refrigeración de los alimentos, tienen por objeto controlar las poblaciones microbianas. Este control es necesario para prevenir la transmisión de enfermedades, evitar la contaminación de algunos productos, la contaminación ambiental, entre otros.

Gran variedad de agentes físicos y químicos son útiles para provocar la muerte bacteriana o minimizar su multiplicación. Entre ellos se encuentran las radiaciones ultravioletas, la temperatura, los agentes desinfectantes, entre otros.

2. OBJETIVO

- Demostrar la acción de agentes físicos y químicos sobre diferentes especies bacterianas.

3. MATERIALES

Cultivo de Cepas Bacterianas (18 - 24 horas) de:

- *Escherichia coli*
- *Bacillus thuringiensis*

Medios de Cultivo:

- Caldo nutritivo a pH 3, 7 y 10.
- Agar Nutritivo.

Reactivos:

- Alcohol al 70%.
- Formol al 10%
- Fenol al 1%
- Lejía (Hipoclorito de sodio al 5%)

Equipos:

- Baño maría.
- Lámpara de luz Ultravioleta.

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Acción de los agentes químicos

- Colocar en diferentes tubos de ensayo 0,5 ml de las soluciones desinfectantes (Alcohol al 70 %, Formol al 10 %, Fenol al 1% y Lejía), luego adicionar a cada tubo 0,5 ml de un cultivo bacteriano.
- Mezclar las soluciones y someterlos a diferentes periodos de tiempo (5, 15, 30 y 60 minutos).
- Después de cada tiempo de exposición, replicar los cultivos en placas de agar nutritivo.
- Incubar los cultivos durante 18 a 24 horas a 37 °C.
- Leer los resultados y comparar de acuerdo a las especies estudiadas.

4.2.Experiencia 2: Acción de la temperatura

- Sembrar las cepas bacterianas en tubos con caldo nutritivo e incubar a 37° C durante 18 a 24 horas.
- Someter a temperatura de ebullición durante los siguientes periodos de tiempo: 1, 5, 15, y 30 minutos.
- Después de cada exposición replicar los cultivos sobre placas con Agar nutritivo.
- Incubar los cultivos a 37° C durante 18 a 24 horas.
- Leer los resultados y comparar el comportamiento de acuerdo a las especies probadas.

4.3.Experiencia 3: Acción de la luz ultravioleta

- Sembrar las cepas bacterianas en agar nutritivo.
- Exponer las placas (retirando la tapa) a la acción de la luz ultravioleta a una distancia de 30 centímetros, durante diferentes periodos de tiempo (30, 60, 120 y 240 segundos).

- Tapar las placas e incubarlas a 37°C durante 24 horas
- Leer los resultados y comparar.

4.4.Experiencia 4: Acción del pH

- Sembrar las cepas bacterianas en tubos con caldo nutritivo a diferentes concentraciones de pH 3, 7, y 10.
- Incubar los tubos a 37° C durante 24 horas.
- Leer los resultados y comparar de acuerdo a las especies estudiadas

5. CUESTIONARIO.

5.1.¿Cuál es la acción de la radiación UV sobre el desarrollo bacteriano?

5.2.¿Cuál es la acción de la lejía y el alcohol sobre el crecimiento bacteriano?

5.3.Definir que es desinfectante y un antiséptico

PRÁCTICA 8

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

1. INTRODUCCIÓN

El antibiograma permite demostrar la susceptibilidad *in vitro* de un microorganismo frente a diversos antibióticos, pudiendo así el clínico seleccionar el o los antibióticos adecuados en la terapia específica de las infecciones bacterianas.

Cabe señalar que, el antibiograma se debe realizar a partir de un solo tipo de microorganismo, es decir, con un microorganismo en cultivo puro. Por lo que, no se debe utilizar una población mixta de microorganismos y se deberán realizarse tantos antibiogramas como microorganismos significativos se encuentren en la muestra clínica.

2. OBJETIVO

- Demostrar la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a los antibióticos.

3. MATERIALES

- Cepa Bacteriana: Cultivo de 16 a 18 horas de incubación de la cepa problema, en caldo nutritivo o caldo tripticasa de soya.
- Medio de Cultivo: agar Müller Hinton.
- Hisopos o torundas de algodón estéril.
- Discos de sensibilidad: Penicilina, ampicilina, clindamicina, cefalotina, cefotaxime, ceftriaxone, gentamicina, amikacina, amoxicilina, ciprofloxacina, norfloxacina, ácido nalidixico, imipenem, meropenem.
- Pinzas.
- Guantes
- Mecheros
- Alcohol y algodón

4. PROCEDIMIENTO

Recomendaciones para realizar un antibiograma

- El antibiograma no se debe realizar sobre una población mixta de microorganismos.
- Previamente se debe realizar el aislamiento y cultivo puro de los distintos microorganismos encontrados en la muestra clínica.
- Realizar un antibiograma para cada tipo de microorganismos de significación clínica observado.
- No incluir un número elevado de antibióticos (5-6 sensidiscos).

4.1.Experiencia 1: Método de disco - difusión en agar (Kirby Bauer)

A. Preparación del Inóculo

- Sembrar la cepa problema en tubos con caldo nutritivo e incubar durante 16 a 18 horas a 37°C.
- Ajustar la concentración del inóculo al tubo N° 0,5 de la escala de Mac Farland, diluyendo en solución salina estéril.

B. Inoculación en la Placa

- Tomar el inóculo bacteriano del tubo, introduciendo un hisopo estéril y humedeciéndolo completamente.
- Eliminar el exceso del inóculo, restregando el hisopo por las paredes del tubo.
- Sembrar el inóculo cubriendo toda la superficie de la placa de Agar Müller – Hinton (siembra en césped).

C. Posicionar los discos de sensibilidad:

- Una vez seca la superficie de la placa (5 minutos después de la inoculación), colocar los discos de sensibilidad con ayuda de una pinza o aguja estéril.
- Mantener una distancia prudente entre cada disco (20- 25mm), presionar ligeramente. En placas de 100mm de diámetros se pueden colocar de 5- 6 discos de sensibilidad.
- Dejar reposar 5 minutos e incubar las placas a 37°C durante 18 a 24 horas.

D. Lectura

- Medir los halos inhibición y comparar con las tablas del manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana del Instituto Nacional de Salud del Perú.
- Interpretar los resultados.

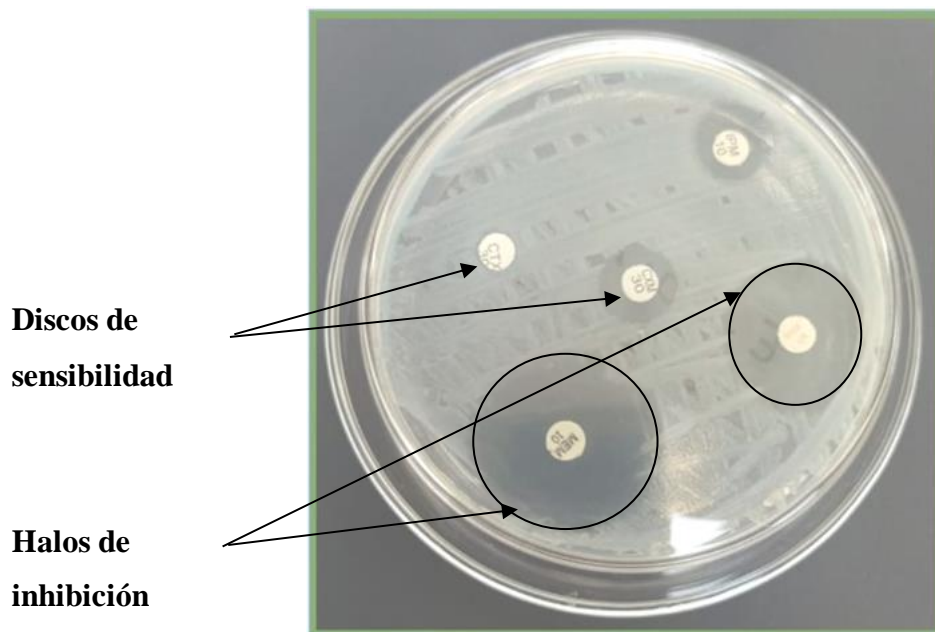


Figura 5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana a partir de un cultivo puro.

5. CUESTIONARIO.

- 5.1.** Mecanismo de acción de los siguientes antibióticos: ampicilina, doxiciclina, trimetopim y bacitracina
- 5.2.** ¿Qué es el nefelómetro de Mac Farland y cuál es su utilidad?
- 5.3.** ¿Qué antibióticos se utilizan en caso de un antibiograma para *E. coli* uropatógena?

PRACTICA 9

METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

1. INTRODUCCION

Las bacterias para sobrevivir y multiplicarse requieren de un sistema eficaz generador de energía. En la fermentación, las moléculas de carbohidratos suelen degradarse en dos fragmentos, uno termina oxidando al segundo, generando energía en forma de ATP.

Estas pruebas bioquímicas se integran dentro del grupo que estudia la determinación de la capacidad de un microorganismo para utilizar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de cultivo básico, originando un pH ácido. El medio de cultivo lleva incorporado un indicador de color (rojo fenol), que vira de color rojo a pH alcalino y amarillo a pH ácido.

2. OBJETIVO

- Demostrar la oxidación, fermentación y generación de productos finales o intermedios del metabolismo utilizados para identificar un microorganismo.

3. MATERIALES:

- **Cepas Bacterianas:** Cultivo de 24 horas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Shigella sp.*
- **Medios de Cultivo:**
 - Medio O – F.
 - Caldo RM - VP
 - Agar Almidón
 - Agar Citrato de Simmons
 - Agar TSI (hierro triple azúcar)
- **Reactivos:**
 - Solución de lugol.
 - Solución de alfa naftol.
 - Solución de KOH al 10%.

Rojo de metilo.

Parafina o cera estéril

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Prueba de Oxidación - Fermentación de glucosa

- Inocular el cultivo de *E. coli* en 2 tubos con medio O – F.
- Añadir 1.5 gr de parafina estéril a uno de los tubos.
- Incubar los tubos a 37° C durante 24 a 48 horas.
- Realizar el mismo procedimiento con *P. aeruginosa*.
- Observar, comparar los resultados y esquematizar.

4.2.Experiencia 2: Prueba de Rojo de Metilo

- Inocular una cepa de *E. coli* y *K. Pneumoniae* por separado en 2 tubos caldo RM –VP.
- Incubar los tubos a 37° C durante 24 a 48 horas.
- Agregar a los cultivos 5 gotas del reactivo rojo de metilo y homogenizar.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.3.Experiencia 3: Prueba de Voges Proskauer

- Inocular 2 tubos de prueba con caldo RM – VP con una cepa de *E. coli* y de *K. Pneumoniae*, respectivamente.
- Incubar a 37° C durante 24 a 48 horas.
- Agregar 3 gotas de KOH al 10% y luego una gota de alfa naftol, mezclar y llevar a incubación a 37° C durante 30 minutos.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.4.Experiencia 4: Hidrólisis del almidón

- Sembrar un cultivo de *B. anthracis* y de *E. coli* (de 24 horas) en placas conteniendo agar almidón. La siembra debe realizar por puntura.
- Incubar las placas a 37°C durante 24 horas.
- Agregar a cada placa la solución de lugol.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.5.Experiencia 5: Prueba del citrato de sodio

- Inocular un cultivo de *E. coli* y *K. pneumoniae* en tubos con agar citrato de Simmons. La siembra se realiza por estría sobre la superficie inclinada.
- Incubar los tubos a 37°C durante 24 – 48 horas.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.6.Experiencia 6: Fermentación de los tres azúcares

- Sembrar una cepa de *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *Peudomonas. aeruginosa*, en tubos con TSI, por separado, utilizando siembra por puntura y estriado en la superficie inclinada.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Observar, Interpretar y esquematizar.

5. CUESTIONARIO.

5.1. Fundamento de la prueba de fermentación de azúcares

5.2. ¿Cómo reacciona la bacteria *E. coli* a las pruebas de indol, rojo de metilo, Vogues Proskauer y citrato?

5.3. Fundamento de las pruebas de Rojo de metilo y Vogues Poskauer

PRÁCTICA 10

METABOLISMO DE COMPUESTOS NITROGENADOS

1. INTRODUCCION

Las bacterias requieren de un sistema eficaz generador de energía para sobrevivir y multiplicarse. Por lo que, ciertos organismos producen enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar, descarboxilar o desaminar los compuestos nitrogenados, cuyos productos finales se utilizan en la identificación de especies bacterianas.

2. OBJETIVO

- Demostrar los procesos del metabolismo de compuestos nitrogenados en diversas especies bacterianas.

3. MATERIALES:

- **Cepas bacterianas:** Cultivo de 24 horas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris* y *Shigella sonnei*
- **Medios de Cultivo:**
 - Caldo peptonado.
 - Agar hierro con lisina (LIA)
 - Caldo urea.
 - Agar hierro tres azúcares (TSI)
 - Caldo nitrato.
 - Medio de gelatina.
 - Agar gelatina
- **Reactivos:**
 - Reactivo de Kovac's.
 - Solución Acética de Ácido sulfanílico al 0,8%.
 - Solución acética de naftil amina al 0,5%.
 - Solución de cloruro de mercurio (HgCl₂).

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Hidrólisis de urea

- Sembrar un cultivo *Proteus vulgaris* y de *E. coli* (no superior a 24 horas de antigüedad), en tubos que contengan caldo de Christensen.
- Incubar los tubos a 37°C durante 24 – 48 horas.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.2.Experiencia 2: Hidrólisis de la gelatina

- Sembrar una cepa de *E. coli* y de *S. aureus* en placas con Agar gelatina (utilizando siembra por puntura).
- Incubar los tubos a 37°C durante 48 – 72 horas.
- Agregar la solución de cloruro de mercurio (HgCl₂).
- Observar, interpretar y esquematizar.

4.3. Experiencia 3: Producción de indol

- Cultivar cepas de *E. coli* y de *K. pneumoniae* (por separado), en tubos con caldo peptonado.
- Luego, agregar unas gotas del reactivo de Kovac's por las paredes del tubo.
- Observar la formación de un anillo rojizo en la zona de reacción.
- Esquematizar.

4.4.Experiencia 4: Reducción de nitratos

- Sembrar una cepa de *E. coli* y de *Acinetobacter sp.* (por separado) en tubos con caldo nitrato. Para ello, utilizar el asa bacteriológica en aguja.
- Agregar tres gotas del reactivo A y tres gotas del reactivo B.
- Observar, comparar y esquematizar.

4.5.Experiencia 5: Descarboxilación y desaminación de la lisina

- Sembrar cepas de *S. typhi*, *S. sonnei* y de *P. vulgaris* en medio LIA (por separado), realizando primero una puntura y luego estriado en la superficie inclinada con la aguja bacteriológica.
- Incubar los tubos a 37°C durante 24 horas.
- Observar, interpretar y esquematizar.

4.6.Experiencia 6: Producción de hidrógeno sulfurado

- Sembrar cepas de *Salmonella typhi* y *Shigella sonnei* en tubos con TSI (por separado), realizando primero una puntura y luego estriado en la superficie inclinada con la aguja bacteriológica.
- Incubar a 37°C durante 24 horas.
- Observar, interpretar y esquematizar.

5. CUESTIONARIO

5.1.Fundamento de la prueba de descarboxilación y desaminación de la lisina en agar LIA

5.2. Fundamento de prueba de indol

5.3. Mencione el nombre científico de tres bacterias que hidrolizan la urea

PRÁCTICA 11

DEMOSTRACIÓN DE TOXINAS Y ENZIMAS BACTERIANAS

1. INTRODUCCION

Las toxinas de origen bacteriano pueden clasificarse en endotoxinas y exotoxinas. Las endotoxinas bacterianas son las toxinas biológicas más potentes conocidas. Estas enzimas son producidas sólo por bacterias Gram negativas y principalmente son lipopolisacáridos. Mientras que, las exotoxinas son producidas fundamentalmente por bacterias Gram positivas. Además, tienen naturaleza proteica y termolábil, por lo que, pueden ser inactivadas o destruidas por enzimas proteolíticas.

2. OBJETIVO

- Evidenciar la acción de diversas toxinas y enzimas bacterianas que constituyen factores de virulencia.

3. MATERIALES

- **Cepas Bacterianas:** Cultivo de 18 horas de: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus* del grupo viridans, *E. coli*, *Pseudomonas sp.* y *Neisseria sp.*

- **Medios de Cultivo:**

Placas con agar sangre de carnero al 5%.

- **Reactivos**

Peróxido de hidrógeno

Reactivo de oxidasa (Clorhidrato de tetrametilparafenilendiamina)

Lugol

Solución de Penicilina G sódica

Almidón al 1%

- **Otros**

Láminas portaobjeto.

Papel filtro (Whatman N° 02)

Hisopos

Mechero
Placas Petri
Asas bacteriológicas
Tubos de ensayo
Alcohol
Algodón
Aguja N° 21

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Experiencia 1: Prueba de Catalasa.

- Colocar sobre una lámina portaobjeto limpia, una gota de solución de peróxido de hidrógeno.
- Adicionar sobre el peróxido de hidrógeno, una gota del cultivo de *S. aureus*.
- Observar y evidenciar la presencia de burbujas (liberación de oxígeno) que indican una prueba positiva.
- Realizar el mismo procedimiento con una cepa control catalasa negativo

4.2. Experiencia 2: Prueba de Oxidasa.

- Colocar sobre una lámina portaobjeto o dentro de una placa petri limpia un pedazo de papel de filtro.
- Colocar de 8-10 gotas de reactivo de oxidasa sobre el papel de filtro.
- Agregar una azada del cultivo de *Pseudomonas sp.* o *Neisseria sp.* sobre el papel con el reactivo.
- La aparición de un color negro o púrpura oscuro indica una prueba positiva.
- Realizar el procedimiento con una cepa control negativa.

4.3. Experiencia 3: Prueba de coagulasa.

- Extraer sangre venosa en un tubo vacuteiner con anticoagulante (tubo color violeta)
- Centrifugar la muestra sanguínea durante 10 min 2500rpm
- Posteriormente, depositar 0.5ml de plasma en un tubo estéril y añadir 0.5ml de cultivo de *Staphylococcus aureus*.

- Incubar a 37°C durante 4 horas. La lectura se debe realizar cada 30 minutos hasta la formación de coágulos de fibrina. Si no se observa coágulo al cabo de 4 horas, dejarlo incubar por 24 horas.
- Observar e interpretar

4.4. Experiencia 4: Demostración de hemolisinas.

- Sembrar en una placa de agar sangre un cultivo joven de *Streptococcus sp.* mediante la técnica de agotamiento por estría (realizar la misma operación con otras cepas bacterianas).
- Además, tomar muestra de hisopado faríngeo y sembrar en una placa de agar sangre.
- Incubar a 37°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas
- Reconocer los tipos de hemólisis (alfa, beta y gamma hemólisis)
- Esquematizar sus resultados.

4.5. Experiencia 5: Determinación cualitativa de betalactamasas clásicas: técnica yodométrica rápida.

- Depositar en un tubo de ensayo, 0,1 ml de solución de Penicilina G sódica a 6 000 ug /ml.
- Inocular una cepa bacteriana joven (de 18 a 24 horas de incubación) en la suspensión de solución de penicilina.
- Agitar el tubo durante 30 segundos y luego dejar reposar la mezcla a temperatura ambiental durante 1 hora.
- Después del periodo de reposo, agregar dos gotas de almidón al 1% a la suspensión bacteriana y luego una gota de solución yodurada agitando el tubo durante un minuto.
- Se considera presencia de betalactamasas clásicas cuando se observa una decoloración rápida de azul intenso formado recientemente.

5. CUESTIONARIO.

5.1. Mencione el nombre científico de dos bacterias alfa y beta hemolíticas

5.2. Utilidad de la prueba de coagulasa

5.3. Fundamento de la prueba de catalasa

PRÁCTICA 12

RECUENTO DE MICROORGANISMOS

1. INTRODUCCION

Para el recuento de microorganismos se evalúa el número de microorganismos aerobios mesófilos viables y el número de coliformes totales y fecales. El método para la determinación de microorganismos aerobios mesófilos viables, se basa en la presunción de que cada célula bacteriana puede crecer en un medio de cultivo solido formando colonias. En los alimentos es uno de los indicadores microbianos de la calidad del producto, también puede asumirse la presencia de gérmenes patógenos que pueden causar alteraciones del producto, haciéndolo inadecuado para el consumo humano.

Mientras que, la Numeración de bacterias coliformes por el método del número más probable (NMP) se utiliza para indicar una contaminación potencialmente peligrosa por el hecho de que el hábitat natural de los coliformes, incluyendo a *Escherichia coli*, son las heces humanas y de animales de sangre caliente.

2. OBJETIVO

- Aplicar las técnicas de recuento microbiano, así como adquirir destreza en la preparación y manejo de técnica de diluciones.

3. MATERIALES

- Muestra: agua, leche, jugos u otros
- Tubos de 150 x 15 mm conteniendo 9ml de solución salina o agua peptonada.
- Pipetas de 1 ml graduada al 0.1 terminal
- Agar Plate Count licuado y temperado a 44 - 45 C°
- Caldo lactosado bilis verde brillante (BRILLA), en tubos de 150 x 15 mm conteniendo campanas de Durham invertidos.
- Estufa de incubación

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Numeración de microorganismos aerobios mesófilos viables

a) Preparación de las diluciones:

- Colocar solución salina (SSF) o agua peptonada en cuatro tubos (enumerar los tubos)
- Con una pipeta estéril, agregar 1 ml de la muestra y transferir al tubo N°1
- Homogenizar el contenido del tubo N°, aspirando 10 veces con la pipeta para obtener una dilución de 1/10.
- Transferir 1 ml a otro tubo que contenga 9 ml de SSF y mezclar con una nueva pipeta estéril para obtener la dilución de 1 /100.
- Repetir esta operación hasta obtener la dilución de 1/10000

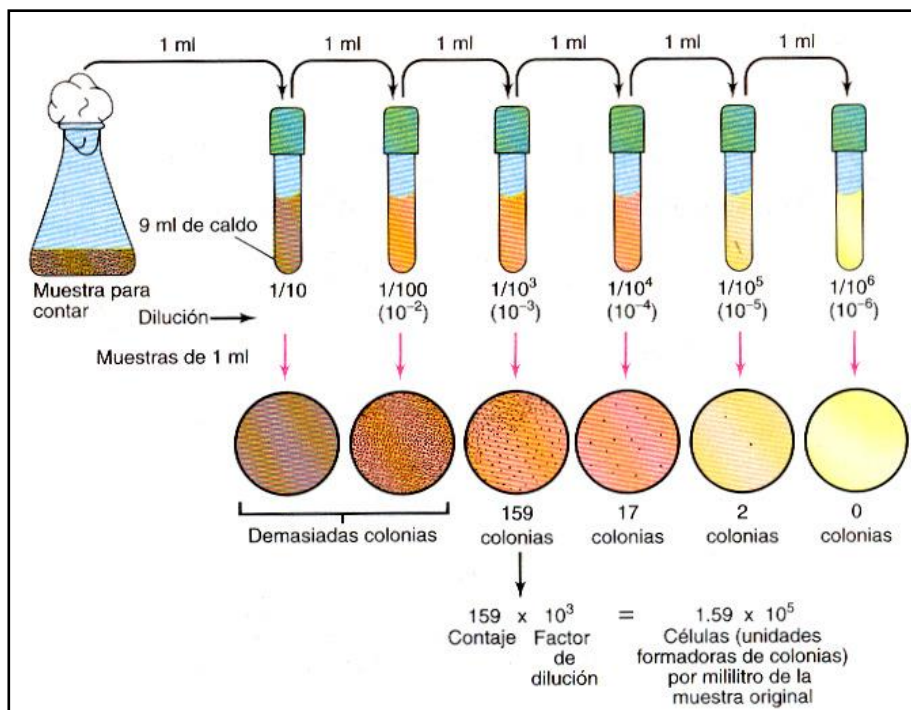


Figura 6. Preparación de diluciones y siembra por difusión en placa. Fuente: Díaz R, Gamaso C, López-Goñi I. Manual práctico de microbiología. 3ª Edición. Barcelona: MASSON; 2005.

b) Siembra por el método de placa vertida

- Agregar alícuotas de 1ml en placas Petri (por duplicado). A partir de la dilución de 1/10 hasta 1/10000 preparadas previamente.

- En cada placa Petri, adicionar 15 - 20 ml de agar Plate Count (cada una de las placas debe contener las diferentes diluciones preparadas). Se recomienda que entre la preparación de la dilución y la adición del agar no transcurran más de 10 minutos.
- Mezclar las alícuotas con el agar mediante movimientos de rotación de las placas Petri.
- Dejar solidificar el agar de 15 – 20 min
- Incubar las placas a 37C° durante 24- 48 horas.
- Para el recuento seleccionar 2 placas que correspondan a una dilución que contengan entre 30 y 300 colonias.
- Se debe considerar la media aritmética de los dos recuentos y multiplicar por el factor de dilución. El resultado se reporta como numero de microorganismos aerobios mesófilos por mililitro o gramo. (UFC/ml o UFC/g).

4.2. Experiencia 2: Numeración de bacterias coliformes - colimetria / Numero Más Probable (NMP)

a) Preparación de las Diluciones

- Aspirar 1 ml de la muestra con ayuda de una pipeta estéril y transferir al tubo N°1 que contiene agua peptonada, mezclar cuidadosamente aspirando 10 veces con la pipeta obteniendo una dilución de 1/10
- Transferir con la misma pipeta 1 ml al segundo tubo, conteniendo 9 ml de agua peptonada y mezclar con una nueva pipeta estéril, obteniendo una dilución de 1/100
- Repetir esta operación hasta obtener una dilución de 1/1000.

b) Siembra

- Se realiza en una serie de 3 tubos por cada dilución, para ello se pipetea 1 ml de la dilución de 1/10 y se transferirá a cada uno de los tubos en cada serie que contiene caldo BRILLA.
- Realizar la misma operación con cada una de las diluciones.
- Incubar los tubos a 35C° - 37C° por 24 – 48 horas.
- Después de 24 horas de incubación anotar los tubos que muestren producción de gas (campana elevada)

- Para obtener el NMP, anotar el número de tubos que mostraron producción de gas para cada una de las diluciones de la serie de 3 tubos y referir este valor a la tabla de NMP.

5. CUESTIONARIO

5.1.¿Para qué sirve la técnica del número más probable?

5.2.Fundamento del medio BRILLA

5.3.¿Para qué se utiliza la siembra en placa vertida?

PRÁCTICA 13

MICOLOGÍA GENERAL

1. INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucariotas, de mayor tamaño y complejidad que las bacterias. Tienen distribución mundial, encontrándose en todos sus hábitats como saprófitos o patógenos de plantas, animales o del hombre. Se distinguen de otros eucariontes, como los animales, por ser inmóviles y, de las algas y plantas, por carecer de pigmentos fotosintéticos.

En este grupo de organismos se encuentran formas unicelulares (levaduras) o pluricelulares (filamentosos). Los hongos filamentosos (mohos) tienen una estructura vegetativa característica denominada hifa. El conjunto de hifas ramificadas constituye el micelio. Las hifas de algunos hongos presentan tabiques transversales o septos y se conocen como hifas cenocíticas.

2. OBJETIVO

- Identificar las características morfológicas micro y macroscópicas de los hongos.

3. MATERIALES:

- Láminas fijas.
- Muestras: tejidos vegetales, frutas, pan u otros afectados por hongos.
- Medios de cultivo: Agar Saboraud, agar czapek.
- Reactivos: Hidróxido de potasio al 10% y 40%.
- Colorantes: Azul de algodón lactofenol.
- Bisturí, pinzas, asa micológica.
- Láminas y laminillas.
- Mechero.
- Microscopio.

4. PROCEDIMIENTO

4.1.Experiencia 1: Estudio de la morfología celular de los hongos

- Preparar montajes en fresco con azul de algodón o hidróxido de potasio a partir de muestras conteniendo hongos.
- También, se observarán láminas fijas al microscopio utilizando lentes objetivos secos.
- Los hongos unicelulares deben observarse al microscopio con lentes objetivos de inmersión.
- Esquematar.

4.2.Experiencia 2: Estudio macroscópico de las colonias de hongos

- Observar y describir las características de las colonias de hongos cultivados en placas y tubos de Agar Sabouraud.
- Esquematar.

4.3.Experiencia 3: Cultivo de Hongos

- Para cultivar hongos ambientales se deberá exponer una placa Petri con agar Sabouraud al medio ambiente y dejar 5 minutos.
- Luego incubar las placas a 25° C o temperatura ambiente durante 7 a 14 días.
- Observar las características de las colonias y estudiar la morfología celular.
- Para cultivar hongos patógenos se, deberá obtener la muestra asépticamente (escamas de piel, pelo, uñas, tejidos vegetales, etc) y colocar una porción de la muestra con la ayuda de una pinza o el asa micológica sobre una placa Petri con agar Sabouraud.
- Cuando se trata de esputo, secreciones u otros fluidos, la siembra se realiza con el asa bacteriológica por el método del estriado.
- Incubar las placas a temperatura de 37° C durante 7 días. Las levaduras patógenas desarrollarán después de 24 horas de incubación.
- Observar y esquematizar.

5. CUESTIONARIO.

- ¿En qué se diferencian los mohos de las levaduras?
- ¿Qué son las micotoxinas?
- ¿Cuáles son los medios de cultivo que se usan para la siembra de mohos y levaduras?

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Atlas A. Microbiología, fundamentos y aplicaciones. México: Edit. CESCO; 1990.
2. Baylet y Scott. Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires: Edit. Panamericana Argentina; 2001.
3. Brock T, Madigan M, Mertinko J. Biología de los microorganismos. México: Edit. Prentice hall Hispanoamericana S.A; 2002.
4. Díaz R, Gamaso C, López-Goñi I. Manual práctico de microbiología. 3ª Edición. Barcelona: MASSON; 2005.
5. García - Rodríguez J, Picazo J. Microbiología médica general. 3ª Edición. Madrid: Editorial Harcourt Brace; 2000.
6. García P, Fernández M. Microbiología Clínica Aplicada. España: Ediciones Díaz de Santos; 1997.
7. Instituto Nacional de Salud. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. Serie de Normas Técnicas N^o 18. Perú: Ministerio de Salud; 2005.
8. Brooks GF, Carroll K, Butel JS, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19a ed. México: Editorial Manual Moderno; 2008.
9. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Woods G, Schreckenberger P. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6a ed. USA: Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
10. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock- Biología de los Microorganismos. 12ª ed. España: Editorial Pearson; 2009.
11. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 7a ed. España: Ed. Editorial Harcourt/brace; 2013.
12. Prescott LJ, Harley DK. Microbiología. 7a ed. México: Ed. Mc Graw Hill; 2013.
13. Rojas W, Amaya J, Aristizabal B, Cano L, Gómez L, Lopera D. Inmunología De Rojas. 16ª ed. México: Edit. Corporación para investigaciones Biológicas; 2012.
14. Stanier R, Ingraham J, Wheelis M, Painter P. Microbiología. 2a ed. España: Ed. Reverte; 2005.
15. Ryan J, Ray GC. Microbiología médica: una introducción a las enfermedades infecciosas. 4a Edición. México: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 2005.
16. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Lima: Ministerio de Salud – INS; 2002.

17. Aquiahuatl MA, Pérez ML. Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
18. Ramírez J, Medina Y, Uscanga I. Manual de laboratorio de microbiología. Xalapa – Veracruz: Universidad Veracruzana; 2018.
19. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud; 2002.
20. Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex;1999.
21. Barrantes E, Martínez JC. Atlas de microbiología médica. Costa Rica: Editorial UCR; 2004.

ANEXO 1

LECTURA DE SIEMBRA

A. En medios sólidos:

Las primeras colonias aparecen a las 12 y 18 horas y cuando se inicia la observación del cultivo. En las colonias se estudia:

- **Tamaño.** El diámetro de las colonias se expresa en mm.
- **Forma.** Puede ser puntiforme, circular, concéntrica, fusiforme, irregular, filamentosa, filiforme, rizoide, etc.
- **Bordes.** Entero, ondulado, lobulado, aserrado, filamentoso, rizado.
- **Elevación.** Plana, elevada, umbilicada, convexa, umbeliforme, monticular, etc.
- **Superficie.** Lisa, rugosa, mucoide, granular, etc.

B. En medios líquidos:

- **Superficie.** Se forma una película, un anillo, una membrana o una masa floculenta.
- **Turbidez.** Uniforme, granular, floculento, en copos.
- **Sedimento.** Se forma en la base del tubo, en proporción variable. Puede ser granular, floculento, en copos o viscoso.

C. En medios semisólidos:

- El tipo de crecimiento puede ser filiforme, arborescente, extendida, papilada, etc.
- El medio tioglicolato permitirá que los microorganismos desarrollen y se ubiquen en la superficie o en el fondo del tubo de acuerdo a sus requerimientos de oxígeno (aeróbicos, microaerofílicos, aerobios facultativos y anaeróbicos)

ANEXO 2

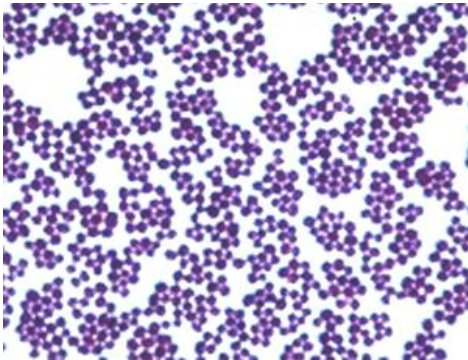


Figura 7. Cocos en racimos. Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex;

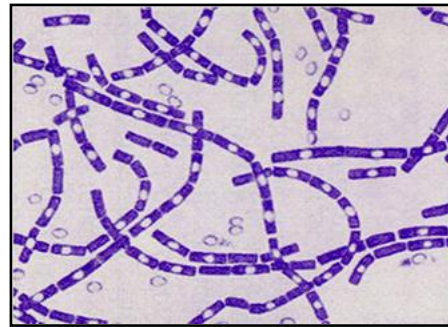


Figura 8. Bacilos en cadenas Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

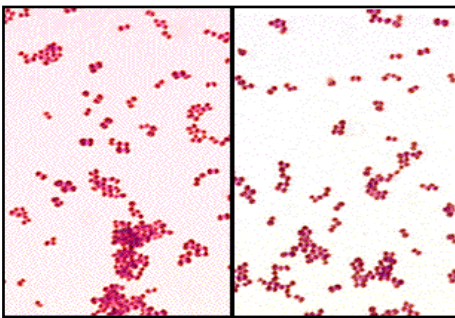


Figura 9. Cocos en tetradas y diplococos. Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

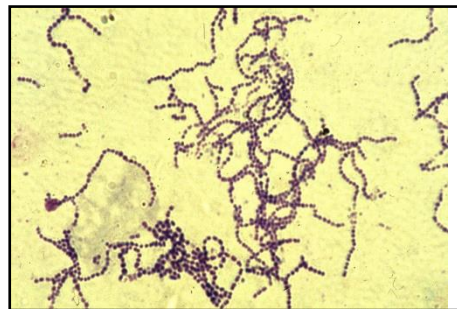


Figura 10. Cocos en cadenas. Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

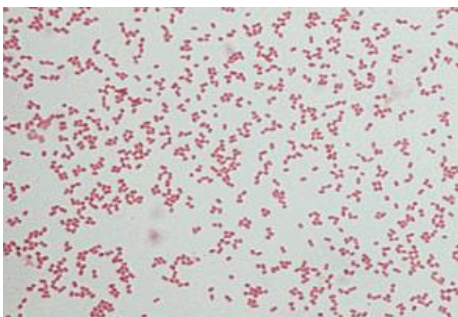


Figura 11. Cocobacilos. Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

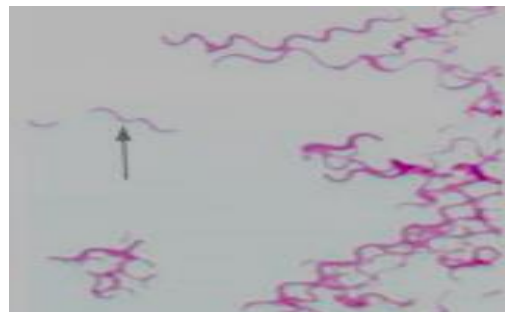


Figura 12. Espirilos. Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición. Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

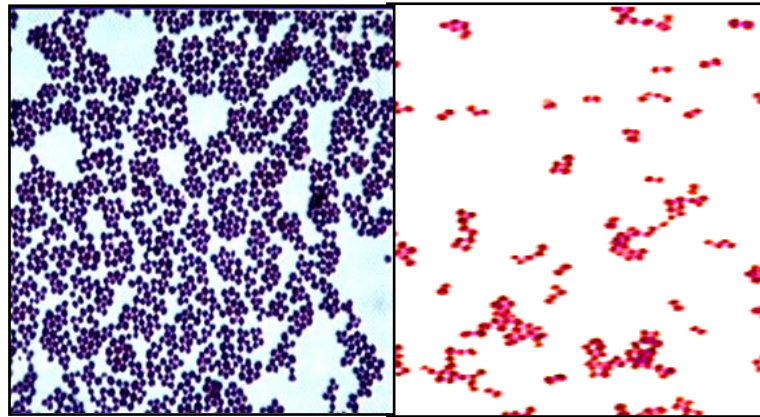


Figura 13. Cocos grampositivos y gramnegativos.
Fuente: Escobar A. Atlas de bacteriología. 2ª Edición.
Barcelona: Editorial Scheramex; 1999.

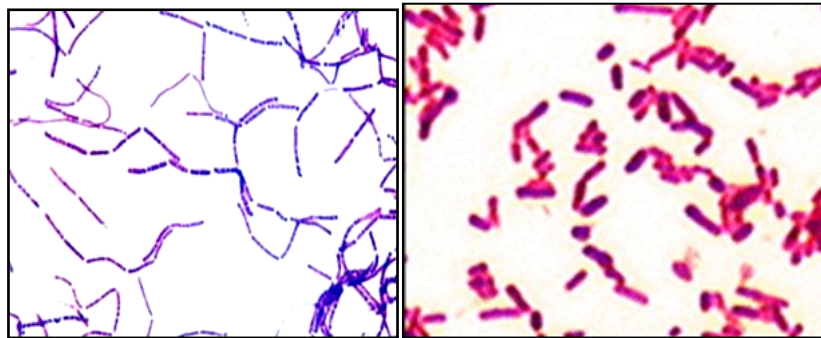


Figura 14. Bacilos Gram positivos y Gram negativos.
Fuente: Barrantes E, Martínez JC. Atlas de microbiología
médica. Costa Rica: Editorial UCR; 2004.

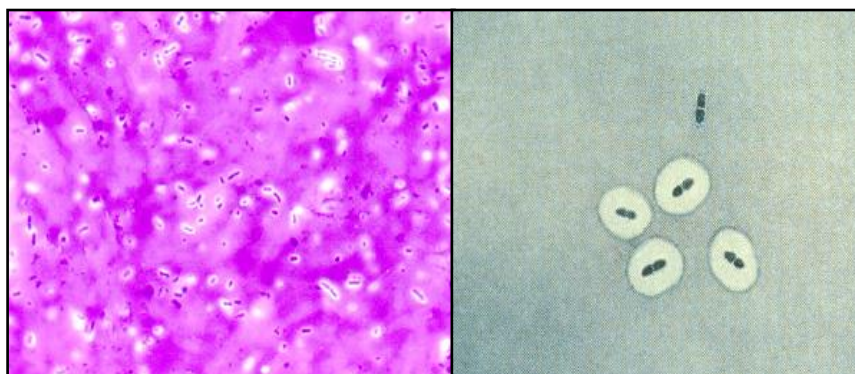


Figura 15. Cápsula bacteriana. Fuente: Barrantes E, Martínez
JC. Atlas de microbiología médica. Costa Rica: Editorial
UCR; 2004.

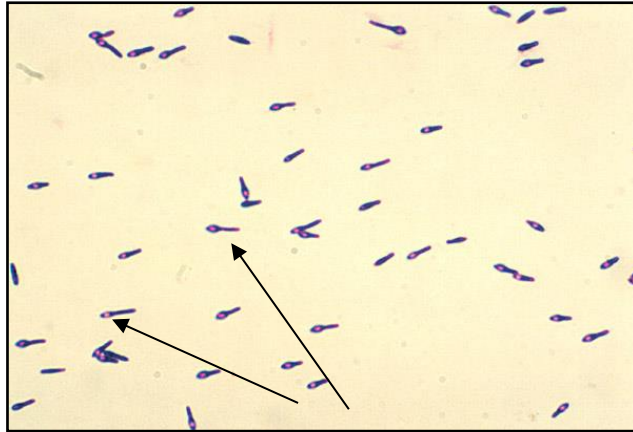


Figura 16. Esporas bacterianas. Fuente: Barrantes E, Martínez JC. Atlas de microbiología médica. Costa Rica: Editorial UCR; 2004.



Figura 17. pruebas bioquímicas de identificación bacteriana. A) Prueba de citrato, B) Prueba de LIA, C) Prueba de TSI, D) Prueba de indol



Figura 18. lectura de prueba de TSI. A) A/A, +++, -; B) K/A, +++, -

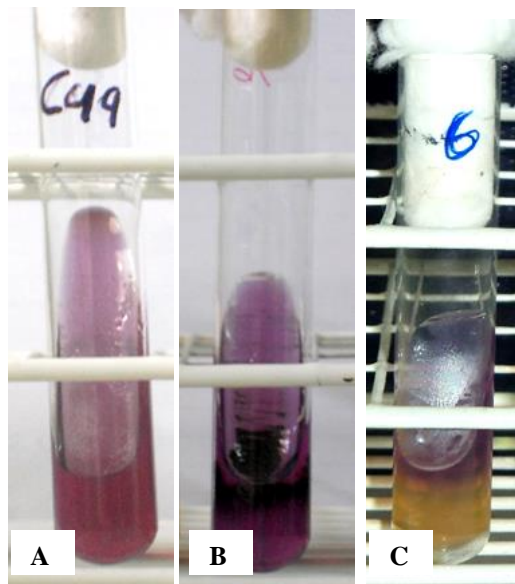


Figura 19. lectura de prueba de LIA. A) K/K, -, -; B) K/K, -, +; C) K/A, +, -

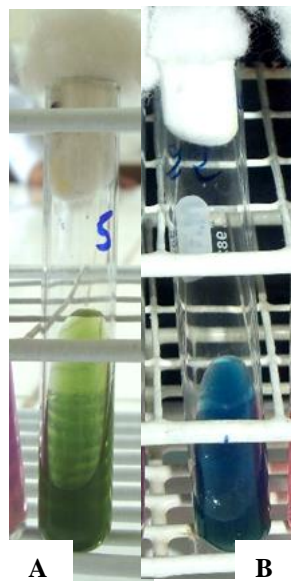


Figura 20. lectura de prueba de citrato. A) prueba de citrato negativa; B) prueba de citrato positiva

ISBN: 978-612-48908-4-0

