



CENTRO INTEGRADO DE
FORMACIÓN PROFESIONAL
CERDEÑO

ELABORACIÓN DEL PNT (PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO) E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN LA SUPERFICIE DE LOS MÓVILES

AUTOR/A: MARIO GALÁN PEDRAYES

TUTOR/A: MARGARÍTA BANCES GONZÁLEZ

FAMILIA PROFESIONAL: SANIDAD

CICLO FORMATIVO: LABOTARORIO CLÍNICO Y BIOMÉDICO

FECHA DE PUBLICACIÓN:

Contenido

1. JUSTIFICACIÓN	3
2. RESUMEN / ABSTRACT	3
2.1. RESUMEN	3
2.1. ABSTRACT	3
3. OBJETIVOS	3
4. METODOLOGÍA.....	4
5. CONTENIDOS.....	4
5.1. INTRODUCCIÓN	4
5.2. PLANIFICACIÓN.....	5
6. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO	5
6.1. OBJETO	5
6.2. GENERAL	5
6.3. DESCRIPCIÓN	6
6.3.1. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MUESTRAS.....	6
6.4. PROCEDIMIENTO	7
6.4. CONTROL DE CALIDAD DEL ENSAYO	11
6.5. TRATAMIENTO DE RESULTADOS.....	11
6.6. CONSERVACIÓN Y ELIMINACIÓN DE MUESTRAS	11
6.7. ANEXO I – ELABORACIÓN, RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	11
6.7. ANEXO I.I. MEDIOS DE CULTIVO.....	11
6.7. ANEXO I.II. PROCEDIMIENTO DE LA TOMA DE MUESTRAS.....	15
6.7. ANEXO I.III. VISUALIZACIÓN, RECuento Y RESIEMBRA DE LAS PLACAS PETRI	18
6.7. ANEXO I.IV. RESIEMBRA	26
6.7. ANEXO I.V. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN	31
7. CRONOGRAMA.....	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. JUSTIFICACIÓN

El objetivo del proyecto es elaborar una sistemática sobre la toma de muestras en superficies de teléfonos móviles, para conocer las bacterias existente, ya que año a año el uso de este aumenta en todas las situaciones posibles, además de ser una potente e importante herramienta de trabajo en cualquier rama.

La realización del proyecto nos permitirá confirmar o descartar el mito urbano que afirma que las superficies móviles están llenas de bacterias, además de elaborar un PNT para la toma de muestras de la superficie.

Dado que cada día el mundo está más informatizado, realizaremos también videos sobre los procedimientos y estos se colgarán, junto con el PNT, en una página web realizada como apoyo al proyecto para servir de guía.

2. RESUMEN / ABSTRACT

2.1. RESUMEN

En la actualidad, el uso del teléfono móvil se ha vuelto constante, de forma que incluso mientras realizamos las tareas más rutinarias, como comer, lavarse los dientes o ir al servicio, lo utilizamos. El presente proyecto tiene como objetivo aclarar si los teléfonos móviles pueden ser un foco de bacterias, y si así es, hasta qué punto, además de servir de guía para la toma de muestras en la superficie de teléfonos móviles en forma de PNT para que cualquier persona pueda acceder a el documento en caso de que quiera repetir la práctica.

Palabras clave: PNT, teléfono móvil, bacterias presentes en móviles.

2.1. ABSTRACT

Currently, the use of mobile phones has become constant, to the point that we use them even while performing the most routine tasks such as eating, brushing our teeth, or using the bathroom. The objective of this project is to clarify whether mobile phones can be a source of bacteria, and if so, to what extent. Additionally, it serves as a guide for taking samples from the surface of mobile phones in the form of a PNT so that anyone can access the document in case they want to repeat the practice.

Keywords: PNT, mobile phone, bacteria present in mobile phones.

3. OBJETIVOS

Este proyecto tiene como objetivo principal:

- Elaborar la sistemática para la toma de muestras bacteriana y análisis de la superficie de los teléfonos móviles.

Pudiendo este objetivo desglosarse en:

- Realizar una correcta toma de muestras en una superficie.
- Elaborar medios de cultivo.
- Realizar el recuento de colonias en placas Petri.
- Elaborar un Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) para la toma de muestras.

4. METODOLOGÍA

Para la realización del proyecto se ha consultado varias fuentes:

- Búsqueda en motores online, como Google Académico, Pubmed o Scielo sobre la toma de muestras y las investigaciones y documentación sobre las bacterias presentes en los móviles.
- El equipo docente con experiencia en microbiología, documentación y toma de muestras, además de los conocimientos adquiridos durante el estudio del *ciclo formativo superior en laboratorio clínico y biomédico* en los módulos de *Gestión de muestras biológicas* y *Microbiología*.

5. CONTENIDOS

5.1. INTRODUCCIÓN

Con la llegada de los teléfonos móviles la comunicación entre personas ha mejorado considerablemente, y esto aumento de forma exponencial con la llegada del primer Smartphone, que además de permitir recibir y enviar llamadas y SMS (*Short Message Service*), permitía realizar muchas más funciones (agenda, entretenimiento, cámara, etc.).

Dado a la alta popularidad de los teléfonos móviles actuales, estos se usan en cualquier circunstancia y lugar (baños, cocinas, escritorios, etc.), provocando que puedan contaminarse con bacterias que puede ser dañinas para el ser humano, ya que aunque deberíamos limpiar asiduamente el teléfono tras realizar algún procedimiento que puede resultar insalubre, la realidad es que no es algo que la población suela realizar (esto es posible observarlo si nos fijamos en cualquier persona en su día a día).

Debido a su uso constante, se ha ido extendiendo el “mito” de que los teléfonos móviles contienen una gran cantidad de bacterias, por lo que el objetivo de este proyecto es comprobar si es cierto, y mientras se realiza, elaborar un PNT para la correcta toma de muestras, y realizar el recuento de las bacterias en la superficie de los teléfonos móviles.

Para ello seguiremos algunos procedimientos encontrados en páginas web de ciertos hospitales (adjuntados en la bibliografía).

Además, para la fácil difusión y visualización del PNT y la realización de las técnicas en el laboratorio, diseñaremos y programaremos una página web de carácter gratuito (<https://mariolaboratorio.000webhostapp.com/ProyectoPNT/index.html>) en la que poder observar videos, la documentación y otros datos de interés.

5.2. PLANIFICACIÓN

Se ha planificado el proyecto para intentar minimizar la posibilidad de contaminación de muestras, medios de cultivo, herramientas, y cualquier otro instrumento necesario para la realización de este. Para ello, se ha tenido en cuenta los periodos necesarios para la elaboración de los medios y el autoclavado de estos, la necesidad de esterilizar ciertos instrumentos (como los hisopos o los tubos de cristal con sus tapones) y los medios de cultivo a disposición en el C.I.F.P. Cerdeño, ya que ciertos protocolos observados utilizaban más agars (como el agar sangre) de los que se disponen en el centro.

Para el estudio de microorganismos se han utilizado tres agars:

- Agar PCA (Plate Count Agar): Utilizado para crecimiento general, ya que es un medio de cultivo para el recuento de aerobios, permitiendo la proliferación de gran número de bacterias.
- Agar MacConkey: Utilizado para el crecimiento de bacilos gran negativos y entéricos, ya que el cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de organismos grampositivos. Permite observar la variación de pH del medio al fermentar lactosa, cambiando este de color (1).
- Agar Verde Brillante: Utilizado para detectar la presencia de bacterias enteropatógenas, es un medio selectivo diferencial (2), permitiendo la proliferación de *Escherichia*, *Shigella*, y *Salmonella*.

6. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

6.1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto definir la toma de muestras e identificación de bacterias en superficies de teléfonos móviles.

6.2. GENERAL

Los teléfonos móviles se han ido instaurando en nuestra vida diaria cada vez más, hasta el punto de que muchas personas desarrollan fobia a la separación de estos aparatos (nomofobia) y, debido a su uso continuado, puede ser una gran reservorio de bacterias. Por ello se ha creado el mito de que pueden resultar muy perjudiciales para la salud de los humanos.

6.3. DESCRIPCIÓN

6.3.1. EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MUESTRAS

6.3.1.1. EQUIPOS

- Autoclave (COD. 0527814).
- Cabina de flujo laminar (COD. 11118CV).
- Estufa (COD. EE-0023).
- Balanza (COD G64321).
- Contador de colonias (COD 4905000).
- Agitador magnético (COD 239312, COD 239290, COD 07000242, COD 664843).
- Microscopio óptico (COD 474801).

6.3.1.2. MATERIALES

- EPIs (guantes y bata).
- Papel de filtro.
- Frasco lavador.
- Papel de aluminio.
- Asas de siembra.
- Guante térmico.
- Bobina de papel.
- 1 hisopo estériles.
- Tubo de 20 ml mínimo.
- Tapón estéril.
- Rotulador.
- Cita indicadora.
- Pesa sustancias.
- Espátula.
- Imán o mosca.
- 4 matraces 500 ml.
- Probeta de 500 ml.
- Mechero Bunsen.

- Portaobjetos.
- Puente de tinción.
- 4 placas Petri.
- Galerías APIs.

6.3.1.3. REACTIVOS

- Agua destilada.
- Alcohol 70%.
- Parafina.
- Agar PCA (COD 0053311).
- Agar MacConkey (COD 0010781).
- Agar (COD 204083).
- Agua de peptona (COD 201306999BL).
- Cristal violeta (COD 203091).
- Lugol (COD 203230).
- Decolorante (COD 203090).
- Safranina (COD 203090).
- James (COD 1009107780).
- TDA (1009121040).
- Nitratos 1 (COD 1009107910).
- Nitratos 2 (COD 1009107920).
- Voges proskauer 1 (COD 1009121050).
- Voges proskauer 2 (COD 1009121070).
- Suero salino estéril al 0,9%.

6.3.1.4. MUESTRAS

Un teléfono móvil.

6.4. PROCEDIMIENTO

- 1º. Realizamos los cálculos necesarios para las placas que necesitemos de PCA, MacConkey, verde brillante y agua peptona, teniendo en cuenta:

- a. El volumen de cada placa Petri (20 ml en nuestro caso).
 - b. Hallamos el volumen necesario (número placas Petri x volumen de cada placa).
 - c. La cantidad necesaria de sustancia por cada litro:
 - i. PCA 23 gramos por litro.
 - ii. Verde brillante 54,7 gramos por litro.
 - iii. MacConkey 50 gramos por litro.
 - d. Para el agua peptona, tomaremos 20 ml y, teniendo en cuenta que necesita 15 gramos por litro, la cantidad necesaria son 0,3 gramos.
- 2º. Calibramos la balanza de precisión que usaremos.
 - 3º. Con un pesa sustancias, pesamos las cantidades necesarias de cada sustancia.
 - 4º. Disolvemos el Agar en un matraz de 500 ml con agua destilada mientras el calentador-agitador magnético calienta.
 - 5º. Tapamos el matraz con papel de aluminio.
 - 6º. Introducimos la mosca o imán y regulamos la intensidad para que vaya disolviendo.
 - 7º. Cuando hierva apartarlo hasta que pare y volverlo a colocar.
 - 8º. Cuando vuelva a hervir, retirar y colocar en la cesta de autoclave.
 - 9º. Realizar el mismo procedimiento con los agares restantes y el agua peptona.
 - 10º. Se vierte el agua peptona en el tubo y se cierra con un cuarto de vuelta.
 - 11º. Tras esto, colocamos todos los objetos necesarios para autoclavar (Hisopos, tubos, tapones, asas de siembra, etc.) y colocamos cinta indicadora para confirmar el correcto autoclavado.
 - 12º. Ponemos el autoclave a 121°C durante 15 minutos.
 - 13º. Cuando acabe el autoclave, dispensamos los agares en campana de flujo laminar (previamente limpiada con alcohol al 70%) en las placas Petri necesarias.
 - 14º. Dejamos que solidifiquen siempre con la campana activa.
 - 15º. Tras solidificar, cogemos el teléfono móvil que se va a sembrar y se prepara el hisopo, las placas Petri y el agua peptona.
 - 16º. Cogemos el teléfono móvil y, tras mojar el hisopo en el agua peptona, se recorre la superficie del móvil mientras se va rotando el hisopo, primero en

vertical, y luego en horizontal (se ha evitado la cámara frontal por posibles daños).

- 17°. Para sembrar la muestras, en cada placa Petri (PCA, verde brillante y MacConkey) se realiza un círculo en la zona superior de la placa y una raya en el medio.
- 18°. Tras realizar esto en cada placa, realizaremos una siembra por zigzag en cada placa.
- 19°. Lavamos la pantalla con alcohol de 70%,
- 20°. Se dejan incubando las placas a 37°C durante 24 horas agrupando como mucho en columnas de 6 y separando cada columna.
- 21°. Mientras incuban, preparamos otras placas de PCA (igual número que las sembradas) para una posible resiembra siguiendo los mismos pasos que para las primeras placas de PCA.
- 22°. Tras 24 horas, visualizamos los resultados, se recuentan y se resembran aquellas que nos parecen interesantes o representativas.
- 23°. Para la resiembra, se realiza en una cabina de flujo laminar (tras limpiarla con alcohol de 70%) y obtenemos una colonia aislada con un asa de siembra estéril.
- 24°. Realizamos una siembra masiva por superficie en las placas de PCA, etiquetando la placa de origen, el tipo y el usuario del teléfono móvil.
- 25°. Dejamos incubando a 37°C durante 24 horas.
- 26°. Tras 24 horas, realizaremos la lectura de las placas.
- 27°. Para la tinción de Gram, utilizamos los reactivos Lugol, cristal violeta, decolorante, safranina y agua destilada.
- 28°. En un portaobjetos, dejamos caer una gota de agua destilada estéril.
- 29°. Con un mechero bunsen encendido, obtenemos una colonia con un asa de siembra estéril y realizamos una emulsión con el agua destilada.
- 30°. Pasamos 2 – 3 veces el portaobjetos por encima de la llama del mechero y se deja secar.
- 31°. Colocamos en el puente de tinción los portaobjetos y se añade cristal violeta durante 1 minuto, tras el cual lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.
- 32°. Tras lavar, añadimos el Lugol y dejamos secar otro minuto y a continuación lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.
- 33°. Añadimos el decolorante durante 30 segundos, después lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.

- 34°. Finalmente, añadimos la safranina, dejamos actuar 1 minuto y lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión y dejamos secar.
- 35°. Tras secar, observamos las preparaciones a microscopio óptico X100, identificando que tipo de bacterias son (bacilos, cocos, grampositivos, gramnegativos, agrupaciones, etc.).
- 36°. Ahora, con las placas de PCA resemebradas, realizamos la preparación de la tira API.
- 37°. Rellenamos los pocillos de la base de agua destilada para crear un ambiente húmedo.
- 38°. Con el mechero bunsen encendido, cogemos una colonia de las placas de PCA.
- 39°. Realizamos una dilución de 0,5 en el estándar de McFarland de la colonia en 4 mililitros (mínimo) de suero salino estéril al 0,9%.
- 40°. Con una pipeta estéril y la tira en posición inclinada, rellenamos los pocillos teniendo en cuenta lo siguiente:
- En aquellas que el nombre esté rodeado por una caja (que son CIT, VP y GEL, como se puede observar en la imagen de debajo de la tira API), se debe rellenar el tubo incluida la cúpula.
 - En aquellas que estén subrayadas (que son ADH, LDC, H₂S, URE, como se puede observar en la imagen de debajo de la tira API) se crea una atmósfera anaerobia rellenando el tubo sin la cúpula, y rellenando la cúpula con aceite de parafina).
 - Para las otras pruebas, rellenar solo los tubos, sin incluir las cúpulas.
- 41°. Tras esto, cerramos con la tapa que incluye e introducimos en la estufa a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 18 – 24 horas de forma horizontal.
- 42°. Tras incubar la tira realizamos el revelado y la lectura según indica las instrucciones:
- Prueba TDA: Agregamos una gota del reactivo TDA. Un color marrón – rojizo indicará una reacción positiva.
 - Prueba VP: Agregamos una gota de los reactivos VP1 y VP2 y esperamos 10 minutos. Un color rosa o rojo en el tubo indicaría un resultado positivo.
 - Prueba IND: Se realiza la última y no se coloca la tapa, ya que los vapores pueden alterar los resultados. Añadimos una gota del reactivo de JAMES. Un color rosado difuminado por todo el tubo indicaría un resultado positivo.
- 43°. Tras realizar esto, por cada resultado positivo anotaríamos un + en la hoja de resultado que acompaña a la tira, sumando los + al final de la lectura

en grupos de 3 y se busca su resultado en el registro de los códigos de la tira API.

44°. Finalmente, con el código obtenido, se realiza una búsqueda en un registro de tiras APIs y definimos la bacteria que obtenemos.

6.4. CONTROL DE CALIDAD DEL ENSAYO

Para asegurar la esterilidad del hisopo con el que se han recogido la muestra, autoclavamos los hisopos junto con agua de peptona a 121°C, permitiéndonos asegurar su esterilidad. Además, la toma y siembra de muestras se realizará en cabina de flujo laminar para evitar la entrada de posibles contaminantes, permitiéndonos asegurarnos de que la flora resultante de en las placas procede únicamente del teléfono móvil que hemos sembrado.

6.5. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Realizamos un conteo de colonias sobre las primeras placas Petri de PCA para hallar una estimación de la población bacteriana del móvil. A parte de eso, podremos hallar la bacteria específica que formo la colonia mediante la tira API o su morfología mediante la tinción de Gram.

6.6. CONSERVACIÓN Y ELIMINACIÓN DE MUESTRAS

Las placas Petri sin cultivar se pueden conservar en nevera envueltas en papel de aluminio en la propia bolsa de las placas. Una vez cultivadas, se pueden conservar en nevera apilándolas de 6 en 6 pero no se puede asegurar que no exista contaminación.

6.7. ANEXO I – ELABORACIÓN, RESULTADOS Y CONCLUSIONES

6.7. ANEXO I.I. MEDIOS DE CULTIVO

Primero se colocan los EPIs necesarios (guantes y bata) y se desinfecta la meseta con alcohol al 70%, tras ello, se prepara el materiales y reactivos necesarios para esta parte del proyecto.

6.7. ANEXO I.I.I REACTIVOS NECESARIOS PARA LA ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Agar PCA.
- Agar MacConkey.
- Agar Verde brillante.
- Agua destilada.

6.7. ANEXO I.I.II MATERIALES NECESARIOS PARA LA ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Pesa sustancias.
- Espátula.
- Matraz de 500 ml.
- Mosca o imán.
- Papel de aluminio.
- Cinta indicadora.
- Rotulador.
- Probeta de 500 ml.
- Frasco lavador.
- Guante térmico.

6.7. ANEXO I.I.III. EQUIPO NECESARIO PARA LA ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- Balanza de precisión.
- Autoclave.
- Agitador-Calentador magnético.
- Cabina de flujo laminar.

6.7. ANEXO I.I.IV. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO PARA LA ELABORACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

El procedimiento para realizar las placas Petri es el siguiente:

- 1º. Se realizar la verificación de la balanza mediante una pesa regulada (en nuestro caso de 100g) y observando la desviación ocurrida al pesar:



Calibración de la balanza - Foto propia

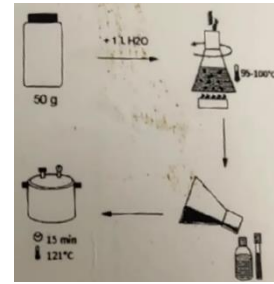
En nuestro caso la variación aceptable de la pesa es 0,02 gramos, así que una vez que comprobamos que se cumplen los requisitos, podemos pesar los medios.

Una vez pesado, debemos apuntarlo en la hoja de control de la balanza e indicar si es admisible o no el peso marcado (en este caso lo es), indicamos la fecha, el técnico que realiza la pesada, una firma y observaciones en el caso de que fueran necesarias

- 2º. Se realiza el cálculo para saber cuántos mililitros (ml) necesitaremos de cada cultivo. Para ello debemos saber cuántas placas deseamos hacer de cada medio (15 placas) y el volumen de cada placa (20 ml) y tras ello lo multiplicamos:

$$15 \text{ placas} \times 20 \text{ ml} = 300 \text{ ml de cada medio}$$

3º. Se realiza el cálculo necesario para cada medio de cultivo. Para ello observamos cada recipiente del agar deshidratado, donde nos indicará los gramos (gr) necesarios por cada litro de agua y el tiempo que debemos disolverlo en el calentador-agitador y en el autoclave, junto con la temperatura en grados centígrados necesaria para garantizar la esterilidad del medio, y realizando una regla de tres, obtendremos los necesarios para nuestras placas:



Instrucciones para realización del medio MacConkey – Foto propia

- a. Agar PCA: En las instrucciones indica que son necesarios 23,5 gr por cada litro de agua, por lo que si necesitamos 300 ml podemos realizar una regla de tres:

$$Gr\ necesarios = \frac{300\ ml \times 23,5\ gr}{1000\ ml} = 7,05\ gr\ de\ PCA$$

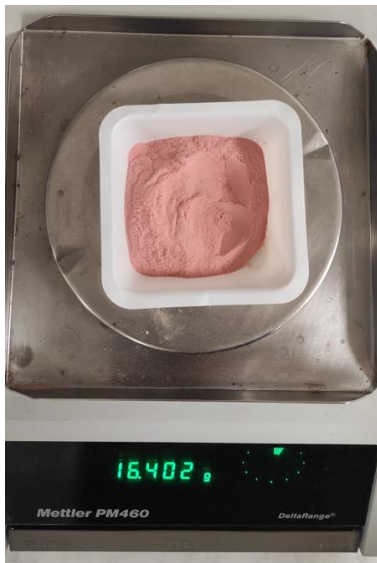
Además, se han preparado 14 placas más para las resiembras, pero estas han sido preparadas en otro matraz.

- b. Agar verde brillante: En las instrucciones nos indica que son necesarios 54,7 gr por cada litro de agua, por lo que si necesitamos 300 ml podemos realizar una regla de tres:

$$Gr\ necesarios = \frac{300\ ml \times 54,7\ gr}{1000\ ml} = 16,41\ gr\ de\ verde\ brillante$$

- c. Agar MacConkey: En las instrucciones nos indica que son necesarios 50 gr por cada litro de agua, por lo que si necesitamos 300 ml podemos realizar una regla de tres:

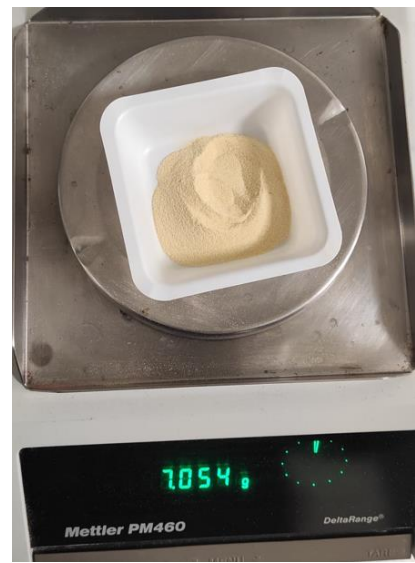
$$Gr\ necesarios = \frac{300\ ml \times 50\ gr}{1000\ ml} = 15\ gr\ de\ MacConkey$$



Verde brillante – Foto propia



MacConkey – Foto propia



PCA – Foto propia

- 4º. Una vez realizada la pesa de los medios, se vierten 300 ml de agua destilada midiéndolo con una probeta y se vierte junto con el medio de cultivo en un matraz de, mínimo, 500 ml, para que cuando hierva, no se salga del matraz.
- 5º. Se introduce en el matraz un imán o mosca y se coloca encima de un calentador-agitador tras tapar el matraz con papel de aluminio y cinta indicadora, se enciende el calentador-agitador y se dejan los medios hasta que hiervan.



Medios de cultivo disolviendo – Foto propia

- 6º. Una vez hiervan, se saca unos segundos del calentador-agitador hasta que deje de hervir, y se vuelve a colocar en él, hasta que vuelva a hervir.
- 7º. Tras esto, debemos autoclavar los medios a 121 °C durante 15 minutos para asegurar la esterilidad.
- 8º. Mientras autoclava, limpiamos la cabina de flujo laminar con alcohol de 70 % y la dejamos encendida con ultravioleta (UV).
- 9º. Una vez autoclavado, apagamos los UV y preparamos los materiales necesarios en la cabina. Una vez preparado todo vertemos los medios de cultivo en las placas de Petri debidamente rotuladas en la base y dejamos que enfrien en cabina de flujo laminar.

- 10º. Tras enfriar, las cerramos y las guardamos en un recipiente adecuado (a ser posible la propia bolsa de las placas Petri) y se guardan en nevera esperando para ser sembradas, colocadas boca abajo.

6.7. ANEXO I.II. PROCEDIMIENTO DE LA TOMA DE MUESTRAS

Primero se colocan los EPIs necesarios (guantes y bata) y se desinfecta la meseta con alcohol al 70%, tras ello, se prepara el materiales y reactivos necesarios para esta parte del proyecto:

6.7. ANEXO I.II.I. REACTIVOS NECESARIOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- Agua peptona.
- Agua destilada.

6.7. ANEXO I.II.II. MATERIALES NECESARIOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- Pesa sustancias.
- Espátula.
- Matraz de 500 ml.
- Mosca o imán.
- Papel de aluminio.
- Cinta indicadora.
- Rotulador.
- Probeta de 500 ml.
- Frasco lavador.
- Guante térmico.
- Hisopos estériles.
- Tubos de 10 ml estériles.
- Tapones estériles para los tubos.

6.7. ANEXO I.II.III. EQUIPO NECESARIO PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- Balanza de precisión.
- Autoclave.
- Agitador-Calentador magnético.
- Cabina de flujo laminar.

6.7. ANEXO I.II.IV. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS

- 1º. Se realizar la calibración de la balanza mediante una pesa regulada (en nuestro caso de 100g) y observando la desviación ocurrida al pesar.
- 2º. Se realiza el cálculo para saber cuántos mililitros (ml) necesitaremos de cada cultivo. Para ello sabemos que necesitaremos, mínimo, 10 ml en cada tubo (aunque no tiene porque se exacto, con que el extremo del hisopo pueda

sumergirse sería suficiente), y realizaremos 20 tubos para tener alícuotas estériles en caso de necesitarlas en un futuro. Por lo tanto:

$$10 \text{ ml} \times 20 \text{ tubos} = 200 \text{ ml de agua peptona}$$

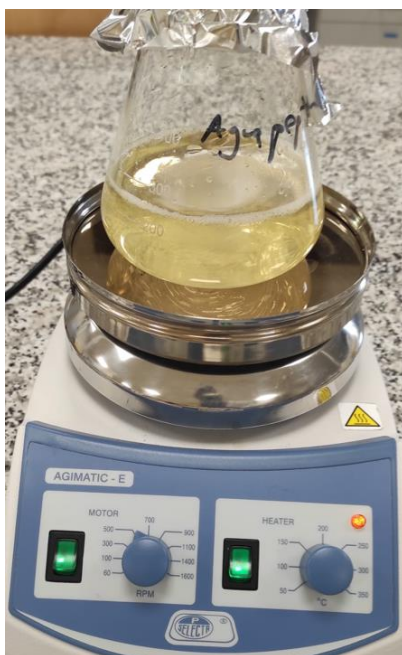
- 3°. Se realiza el cálculo necesario para obtener 200 ml de agua peptona, en las instrucciones nos indica que son necesarios 15 gr por cada litro de agua, por lo que si necesitamos 200 ml podemos realizar una regla de tres:

$$Gr = \frac{15 \text{ gr} \times 200 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 3 \text{ gr necesarios de agua peptona}$$

En nuestro caso hemos pesado 3,002 gramos de agua peptona.



Agua peptona – Foto propia



Disolviendo agua peptona – Foto propia

4°. Una vez realizada la pesa de los medios, se vierten 200 ml de agua destilada midiéndolo con una probeta y se vierte junto con el medio de cultivo en un matraz de, mínimo, 500 ml, para que cuando hierva, no se salga del matraz.

5°. Se introduce en el matraz un imán o mosca y se coloca encima de un calentador-agitador tras tapar el matraz con papel de aluminio y cinta indicadora, se enciende el calentador-agitador y se deja el agua peptona hasta que hierva.

6°. Mientras dejamos calentando y agitando el agua peptona, y siempre revisando que no se salga, preparamos, mínimo, 20 hisopos, 20 tubos y 20 tapones resistentes a 121 °C y los llevamos al autoclave.

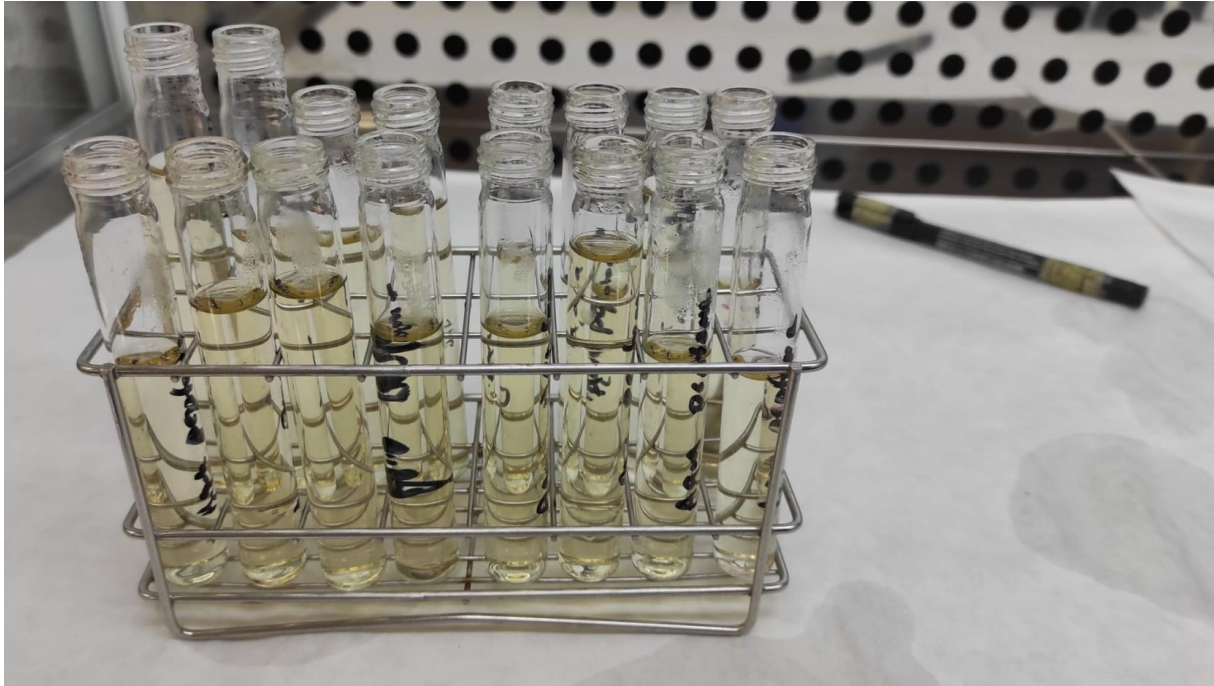
7°. Una vez hierva, se saca unos segundos del calentador-agitador hasta que deje de hervir, y se vuelve a colocar en él, hasta que vuelva a hervir.

8°. Tras esto, debemos autoclavar el agua peptona y el material ya preparado a 121 °C durante 15 minutos para asegurar la esterilidad.

- 9°. Mientras autoclava, limpiamos la cabina de flujo laminar con alcohol de 70% y la dejamos con UV.

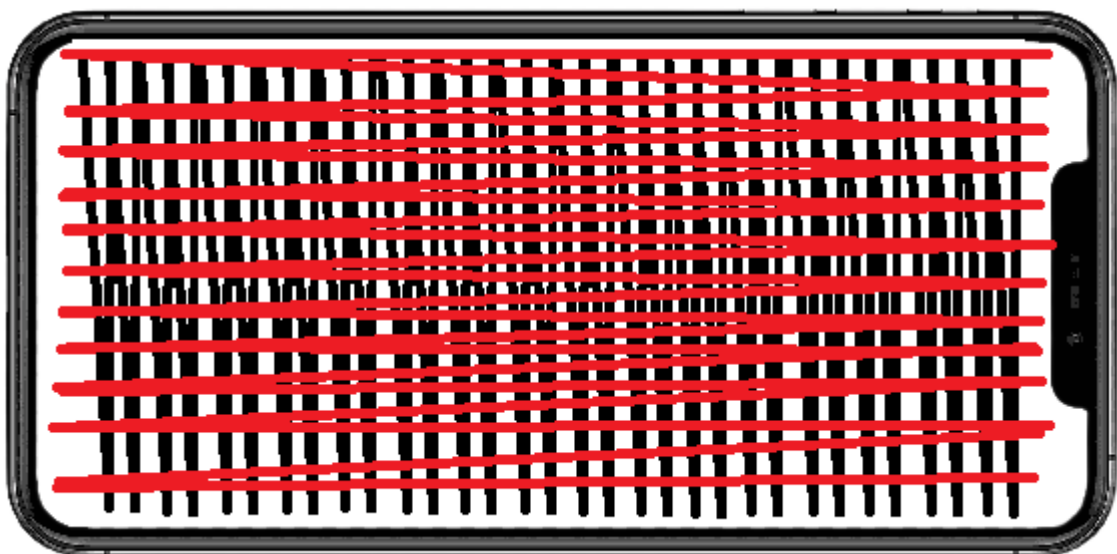
10°. Una vez autoclavado, apagamos el UV y preparamos los materiales necesarios para la toma de muestras y las placas de Petri preparadas anteriormente en la cabina de flujo laminar.

11°. Sacamos los tubos y los colocamos en una gradilla dentro de la cabina, dispensamos el agua peptona de forma que quede lo suficiente en cada tubo como para que impregne varias veces el extremo del hisopo.



Agua de peptona distribuida en los tubos – foto propia

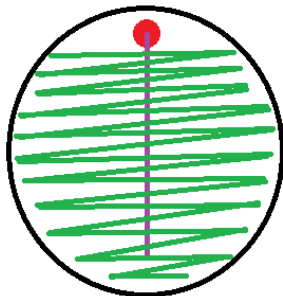
- 12º. Se recogen los móviles de los participantes en el estudio previo y se apuntan sus datos. Para asegurar su anonimato y protección de datos, se realiza una codificación de datos donde a cada persona se le dará un número, que irá rotulado en cada placa.
- 13º. Para la recogida de muestras, tomamos el móvil en cuestión y, con el hisopo humedecido y tras eliminar el exceso de agua peptona presionándolo con el borde del tubo, recorremos toda la pantalla móvil, primero el horizontal y a continuación en vertical, rotándolo mientras lo hacemos para coger la mayor superficie posible.



Camino recorrido por el hisopo (rojo horizontal, negro vertical) – Imagen editada por el Mario Galán Pedrayes

- 14°. Tras esto, con el hisopo realizamos un círculo pequeñito en cada placa mientras rotamos el hisopo, y tras realizar esto, en cada placa hacemos una línea desde el círculo y lo sembramos de forma masiva.

En rojo se representa el círculo realizado al principio en cada placa.



En morado se representa la línea vertical desde el círculo hasta el final de la placa.

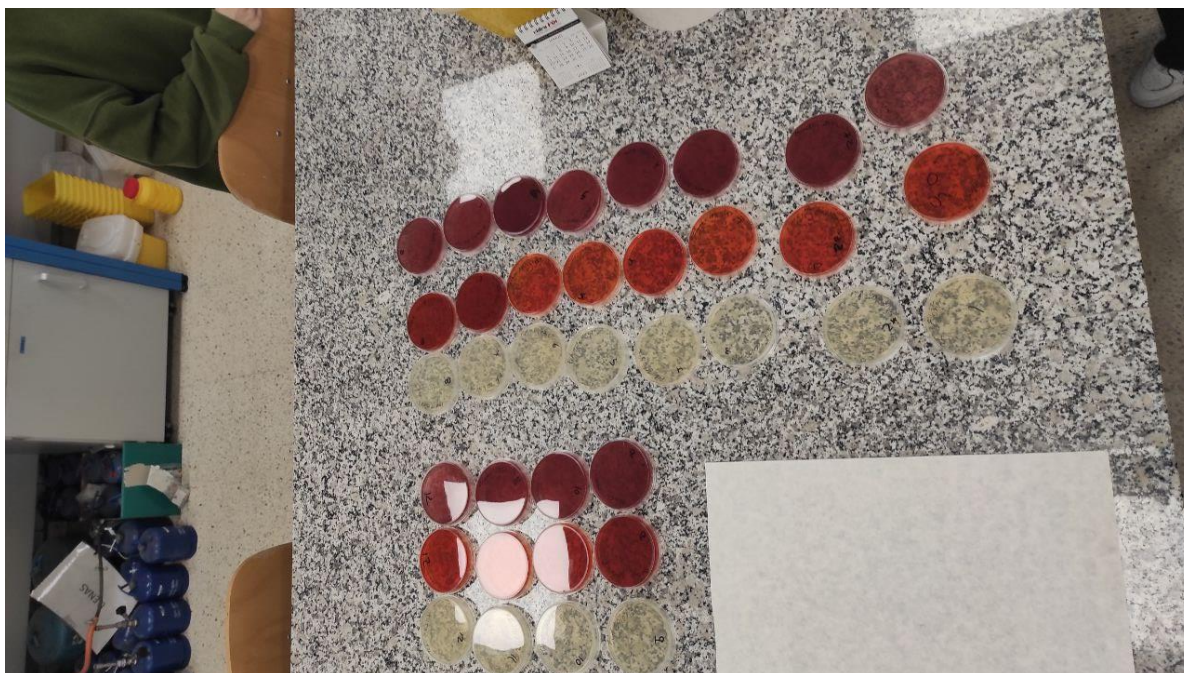
En verde se representa la siembra realizada en la placa (también se debe sembrar la parte del círculo rojo, pero para que el dibujo quedará más claro, en ese caso no se ha pintado).

Dibujo de la siembra de las placas, siembra por agotamiento – Ilustración propia

- 15°. Tras la toma de muestras de cada móvil (y cambiando de hisopo tras cada móvil), se lava la pantalla del móvil con alcohol de 70% y se devuelve al dueño.
- 16°. Las placas se dejan incubando en la estufa a 37°C durante 24 horas, agrupando como mucho en columnas de 6 y dejando separación entre cada columna.

6.7. ANEXO I.III. VISUALIZACIÓN, RECuento Y RESIEMBRA DE LAS PLACAS PETRI

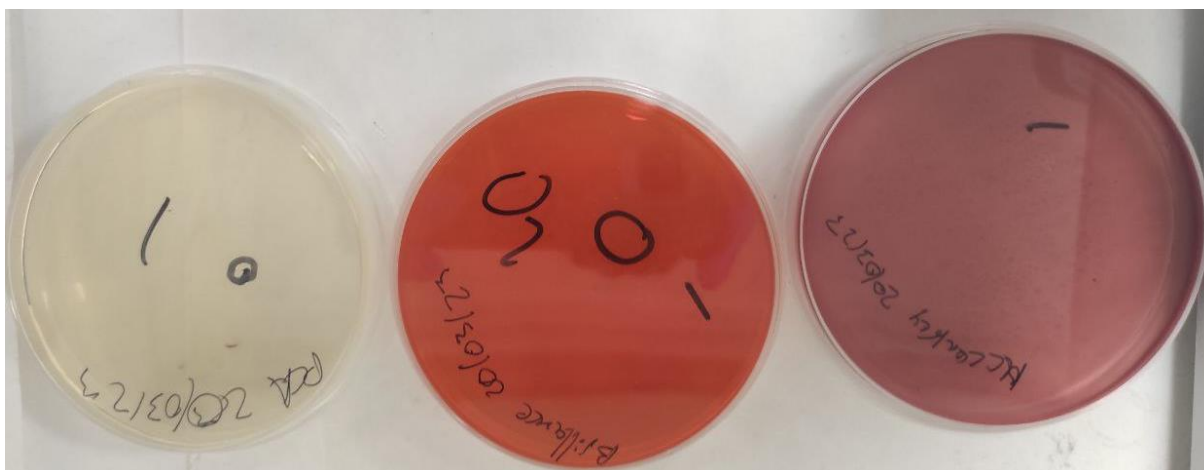
Una vez pasadas las 24 horas, se realiza la visualización de las placas, para ello hemos extendido las placas en la meseta y se ha observado cuales de ellas tienen colonias, cuantas tienen y el tipo de estas.



Placas de Petri una vez cultivadas – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.I. MUESTRA Nº 1

En la placa número 1 en el PCA solo se observa 1 colonia de aspecto amarillento, transparente, mucosa y pequeña. En la placa de Agar Verde Brillante (VBA) se observan 2 colonias, donde la número 1 es pequeña y de aspecto seco y transparente y la colonia número 2 es mucosa y mayor, con mayor mucosidad en el centro como si fuera un volcán. La placa de MacConkey no presenta crecimiento.



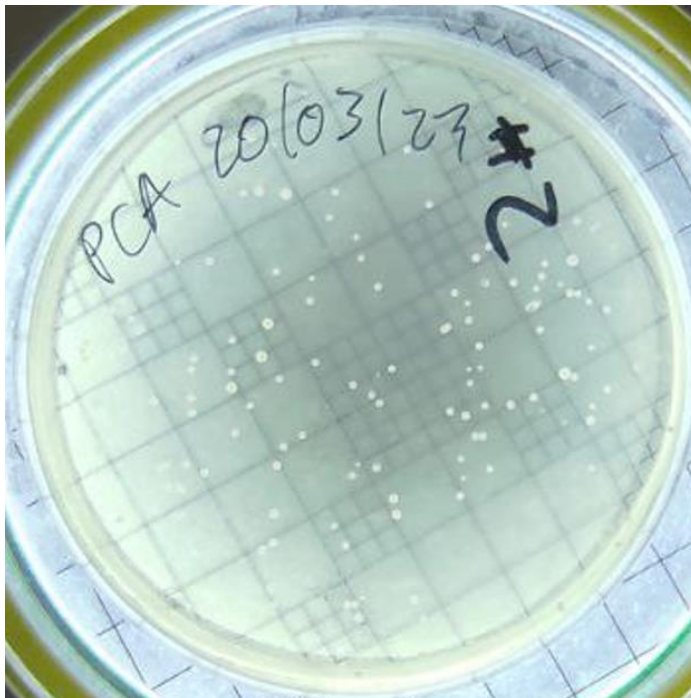
Placa número 1 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.II. MUESTRA Nº 2

En la placa número 2 en el PCA se recuentan 136 colonias, de aspecto mucoso, amarillo claro y pequeñas. En la placa de Agar Verde Brillante (VBA) se observan 2 colonias de aspecto mucoso y semitransparente. En la placa de MacConkey no tiene colonias.



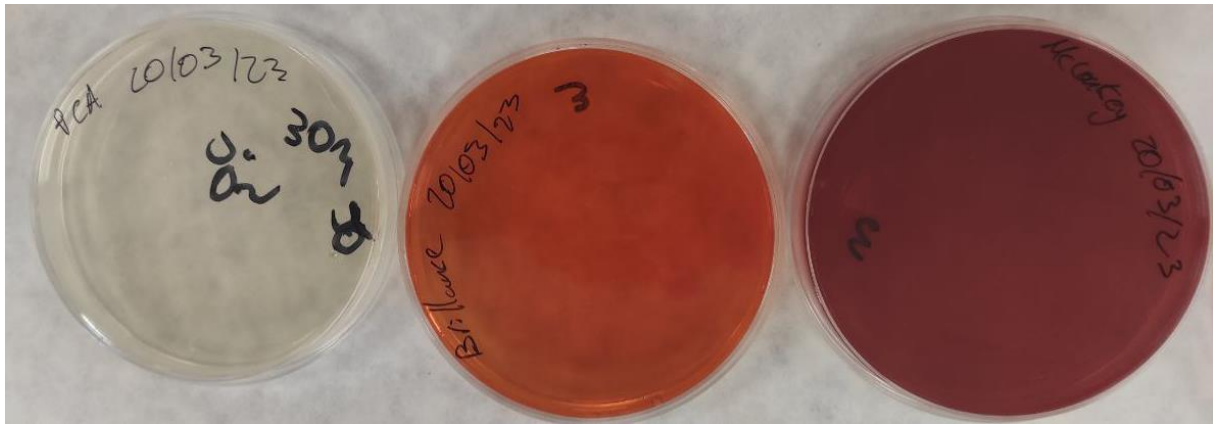
Placa número 2 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia



Placa de PCA número 2 en el visor para el recuento de colonias – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.III. MUESTRA Nº 3

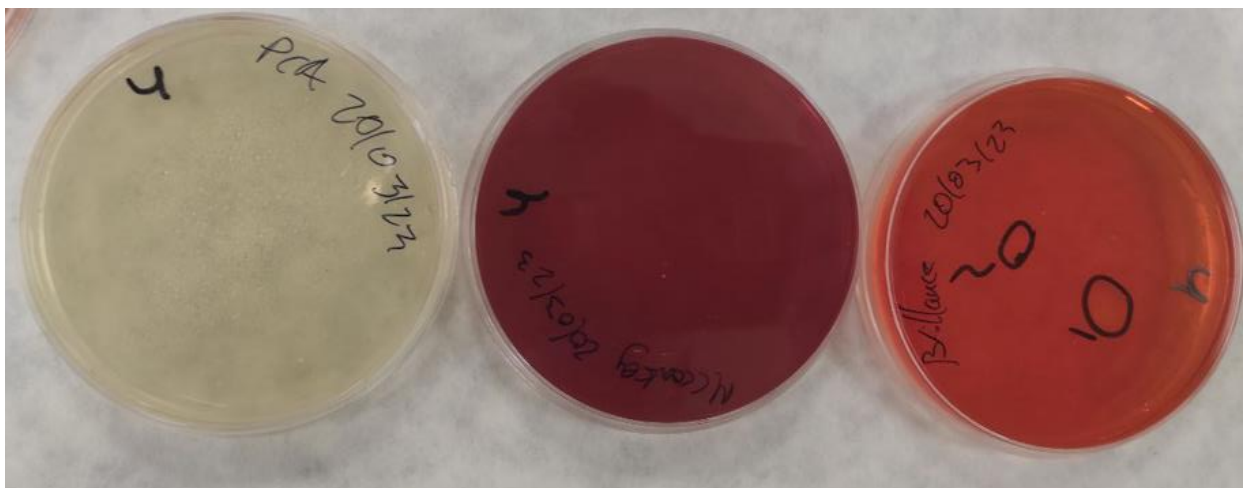
En la placa número 3 se recuentan en el PCA 4 colonias pequeñas, amarillas y mucosas. No ha crecido nada ni en Agar Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.



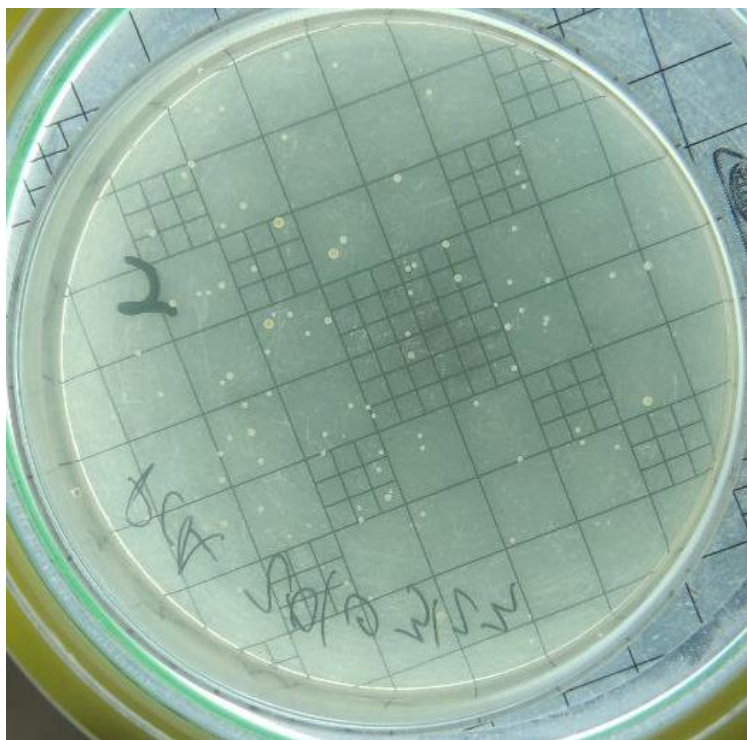
Placa número 3 de PCA, MacConkey y Brillante de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.IV. MUESTRA Nº 4

En la placa número 4 en el PCA se recuentan 101 colonias de aspecto mucoso, amarillo semitransparente y pequeñas (unas pocas con un halo seco super pequeño alrededor). En la de Agar Verde Brillante (VBA) han crecido 2 colonias, siendo la número 1 de mayor tamaño, casi transparente y aspecto mucoso y la número 2 más pequeñita, amarilla y mucosa. En la placa de MacConkey no ha crecido nada.



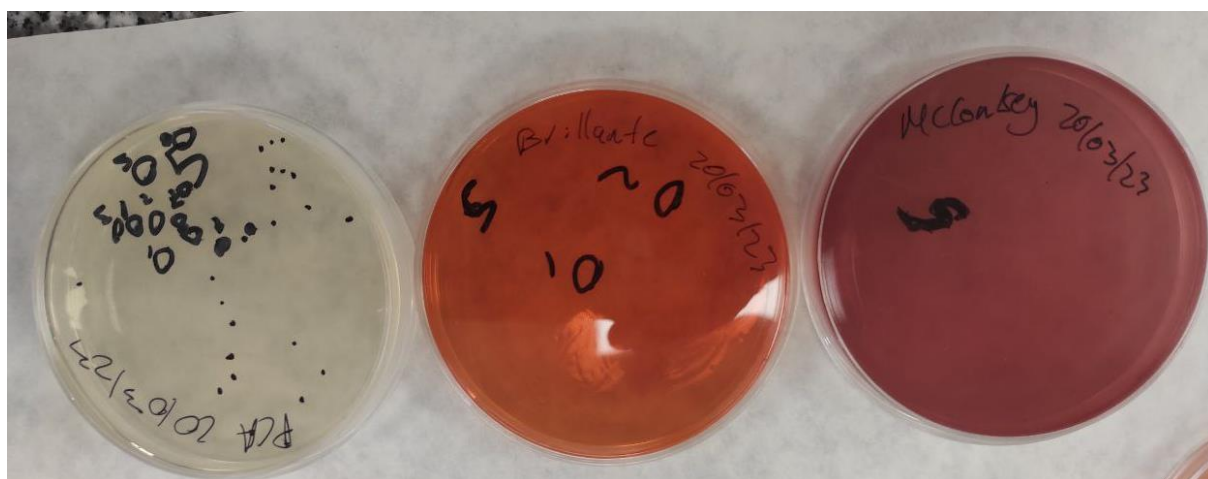
Placa número 4 de PCA, MacConkey y Brillante de izquierda a derecha – Foto propia



Placa de PCA número 4 en el visor para el recuento de colonias – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.V. MUESTRA Nº 5

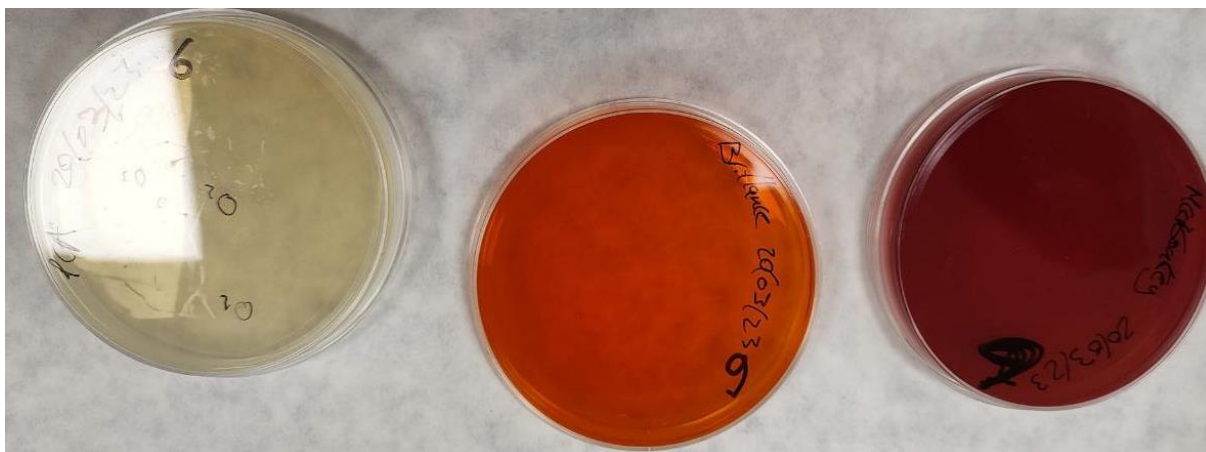
En la placa número 5 en el PCA se recuentan 33 colonias de aspecto mucoso, pequeño y más amarillas que en el resto de las placas. En la de Agar Verde Brillante (VBA) han crecido 2 colonias mucosas, semitransparentes y pequeñas. En la placa de MacConkey no ha crecido nada.



Placa número 5 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.VI. MUESTRA Nº 6

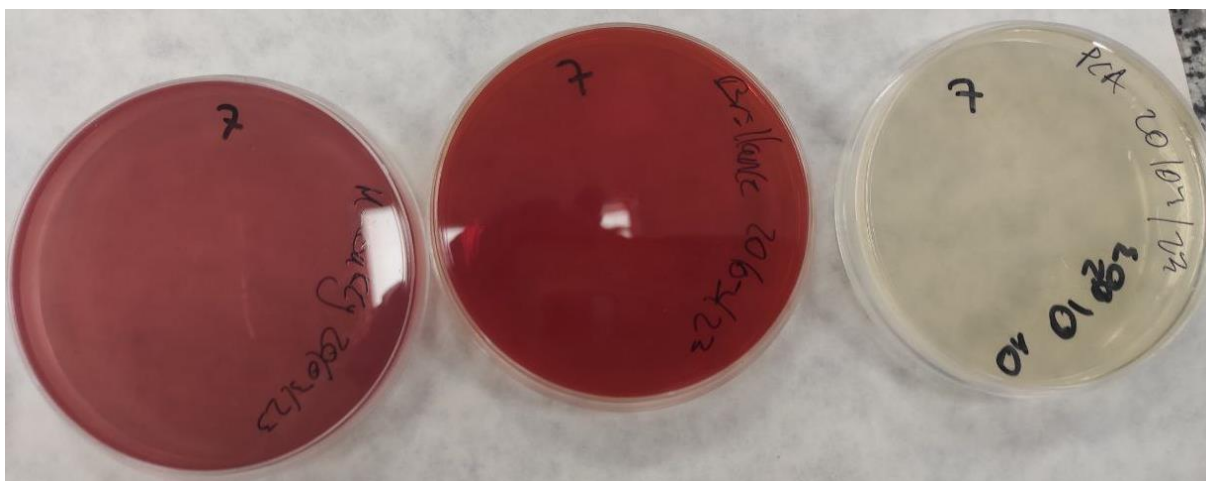
En la placa número 6 en el PCA se recuentan 3 colonias muy pequeñitas de aspecto mucoso y amarillo (aunque se observa con dificultad). No ha crecido nada ni en Agar Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.



Placa número 6 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.VII. MUESTRA Nº 7

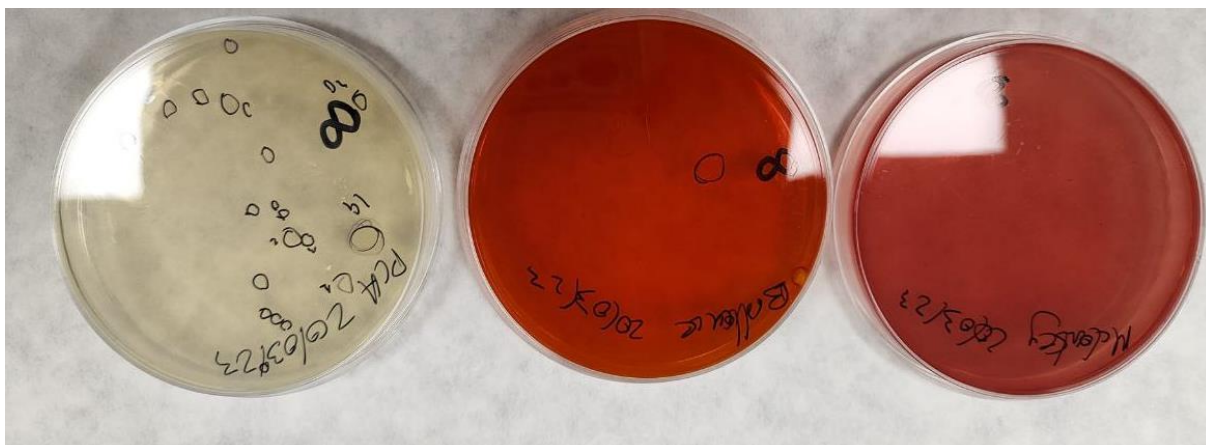
En la placa número 7 de PCA se recuentan 1 colonias de aspecto pequeño, siendo la número 3 mayor que el resto y más transparente que el resto. No ha crecido nada ni en Agar Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.



Placa número 7 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.VIII. MUESTRA Nº 8

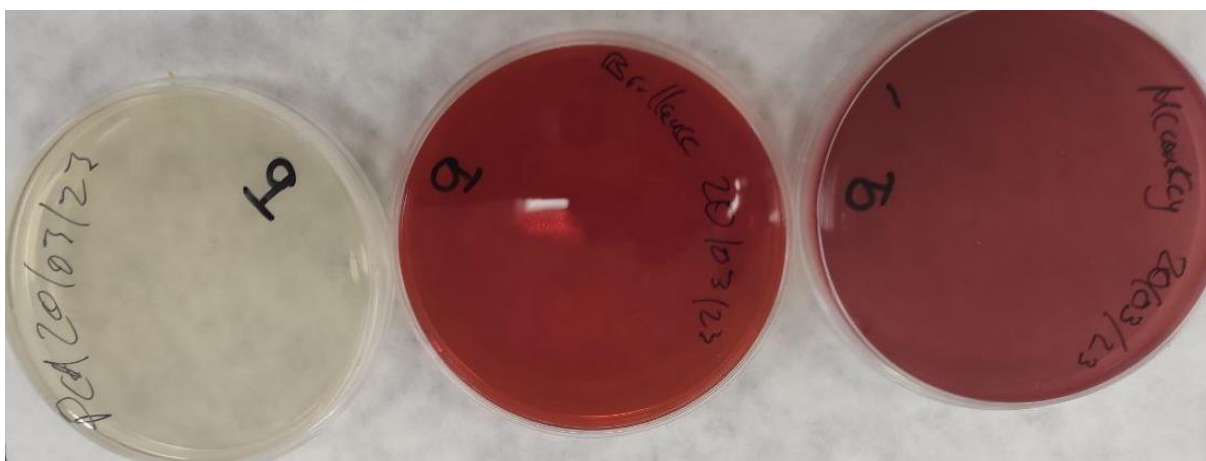
En la placa número 8 se recuentan 20 colonias en el PCA, siendo la número 19 de mayor tamaño que el resto, de aspecto mucoso, amarillo, transparente y gelatinoso. En la de Verde Brillante (VBA) ha crecido 1 colonia transparente y seca. En la placa de MacConkey no ha crecido nada.



Placa número 8 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.IX. MUESTRA Nº 9

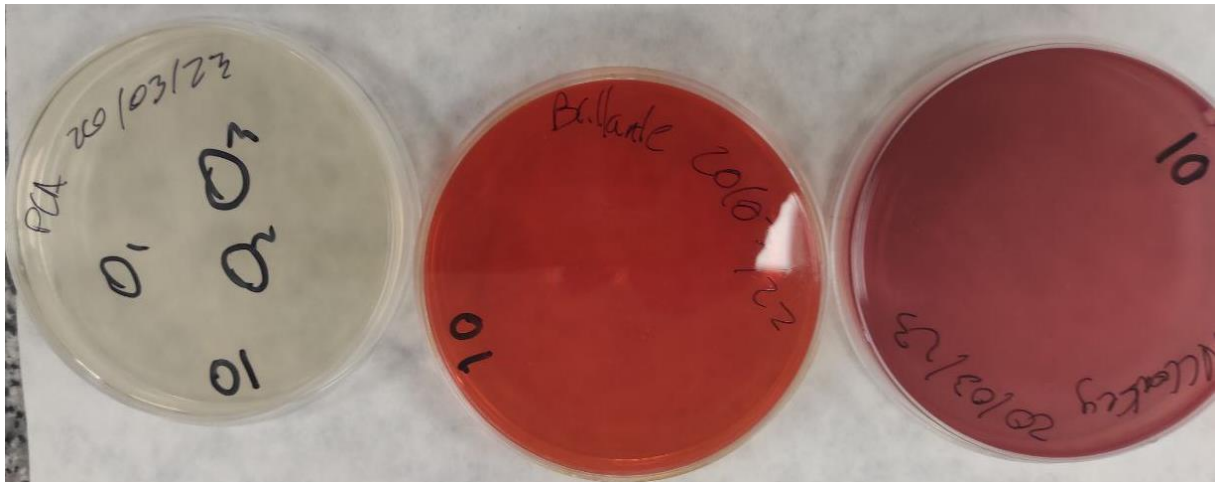
En las placas número 9 en el PCA hay 30 colonias pequeñas (de hecho, -no queda claro si son colonias o simples motas de polvo) y no ha crecido nada ni en Verde Brillante ni en MacConkey.



Placa número 9 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.X. MUESTRA Nº 10

En las placas número 10 en el PCA se recuentan 3 colonias de aspecto amarillento y transparente, mucoso y pequeñas. No ha crecido nada ni en Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.



Placa número 10 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.XI. MUESTRA Nº 11

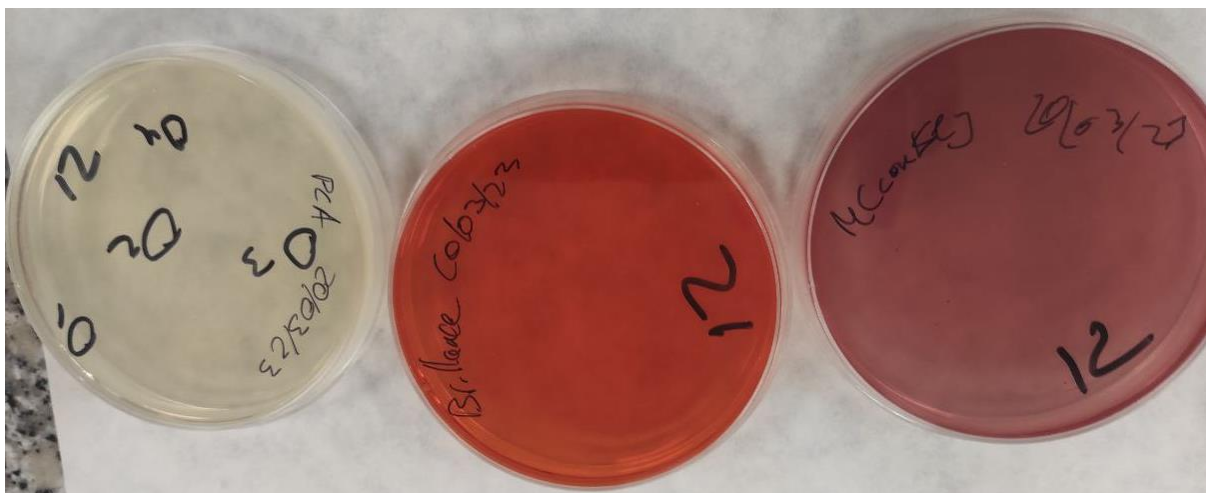
En la placa número 11 en el PCA se recuentan 3 colonias de aspecto amarillo y transparente, pequeñas y mucosas. No ha crecido nada ni en Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.



Placa número 11 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.XII. MUESTRA Nº 12

En la placa número 12 en el PCA se recuentan 4 colonias de aspecto mucoso, amarillento, brillantes y pequeñas. No ha crecido nada ni en Verde Brillante (VBA) ni en MacConkey.

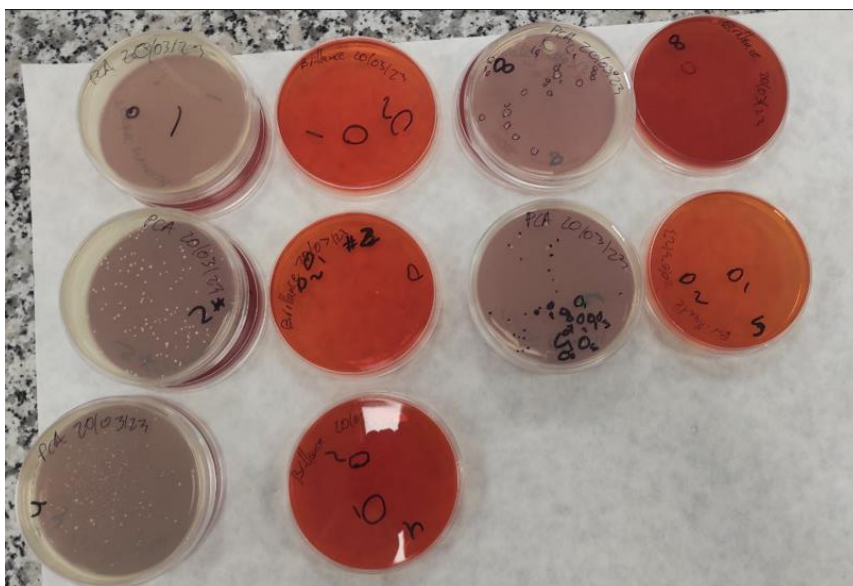


Placa número 12 de PCA, Brillante y MacConkey de izquierda a derecha – Foto propia

6.7. ANEXO I.III.XIII. RESULTADOS GLOBALES

Tras observar las placas de Brillante en las que ha crecido, se ha decidido resembrar estas, para poder realizar pruebas bioquímicas y conocer de que bacteria se trata.

Las colonias de las placas de Verde Brillante (VBA) se han resembrado por aislamiento para realizar pruebas bioquímicas de confirmación.



Placas de cultivo de las cuales han crecido cultivos en las placas de Brillante – Foto propia.

6.7. ANEXO I.IV. RESIEMBRA

Una vez observados los resultados, Se realizó la resiembra de las placas de Verde Brillante que presentan crecimiento. La resiembra consiste en obtener una colonia aislada con un asa de siembra estéril, y extenderla mediante siembra masiva por la superficie de una placa que cumpla las características optimas generales para la reproducción de las colonias (3).

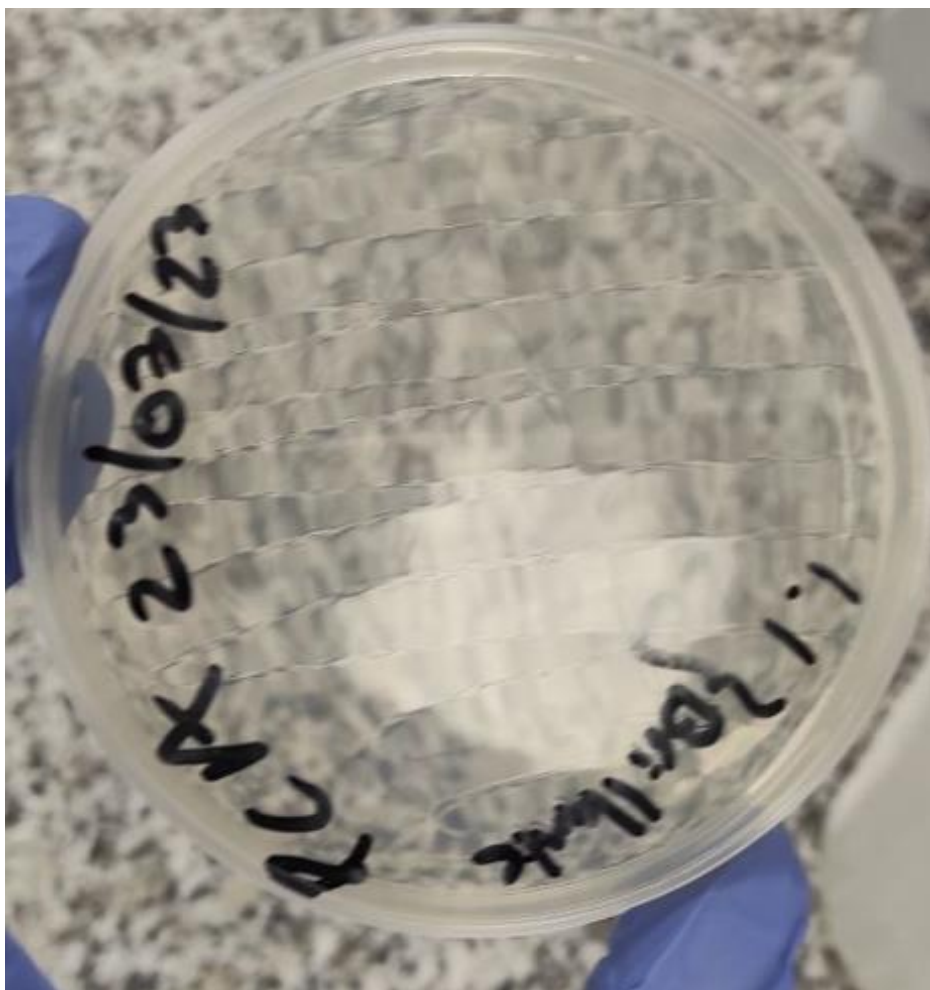
Se resembrará una colonia en cada placa de PCA que habíamos preparado para ello, identificando cada placa de PCA con un código que indicará la placa de la que proviene la colonia, la colonia sembrada y el medio del que se ha cogido: X.Ymedio, representando:

- X = Número de placa del que proviene el cultivo.
- Y = Número de colonia que se ha resembrado.
- Medio= Medio de cultivo del que se ha cogido la colonia (en nuestro caso siempre Brillante).

La resiembra se realizará en cabina de flujo laminar tras la limpieza de esta con alcohol de 70%.

6.7. ANEXO I.IV.I. PROCEDIMIENTO DE RESIEMBRA

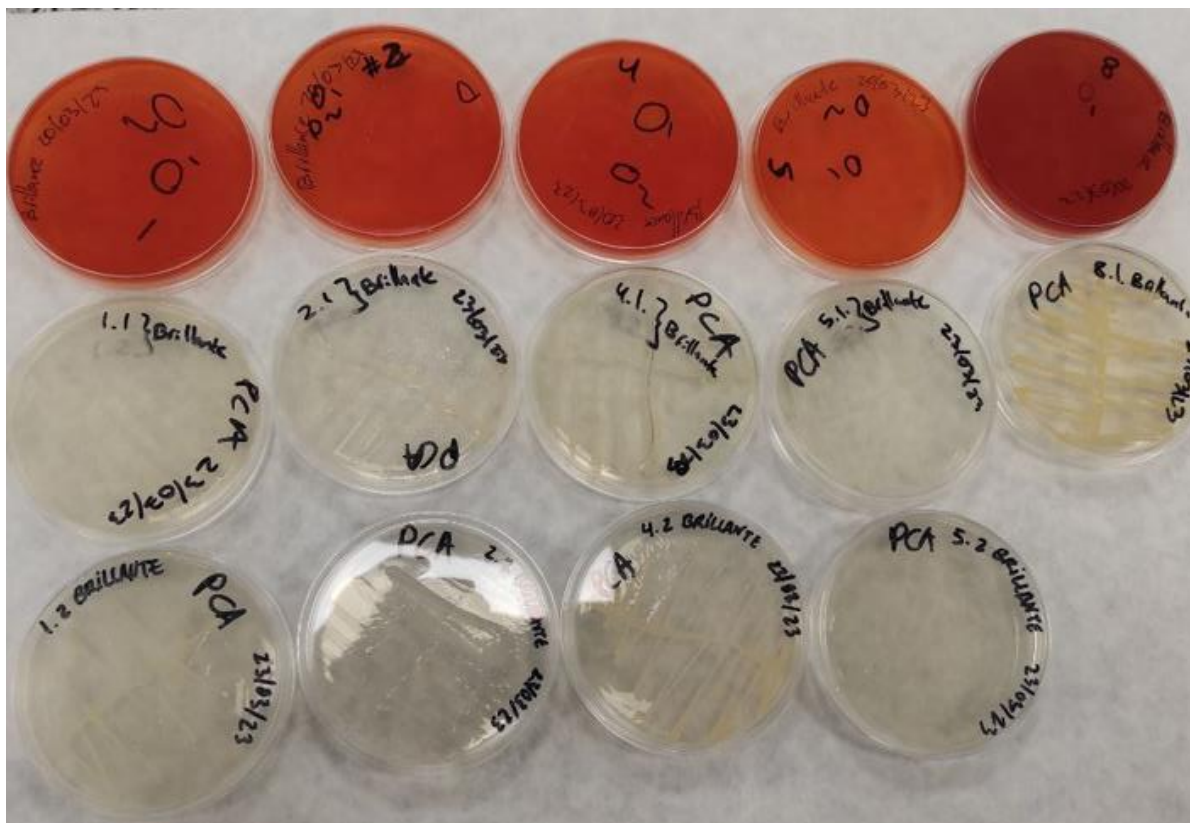
- 1º. Se preparan los materiales necesarios en la cabina de flujo laminar.
- 2º. Con el asa de siembra desechable, cogemos una colonia y la extendemos por la placa de PCA correspondiente en estrías de forma masiva.
- 3º. Se dejan incubando en estufa a 37°C durante 24 horas.



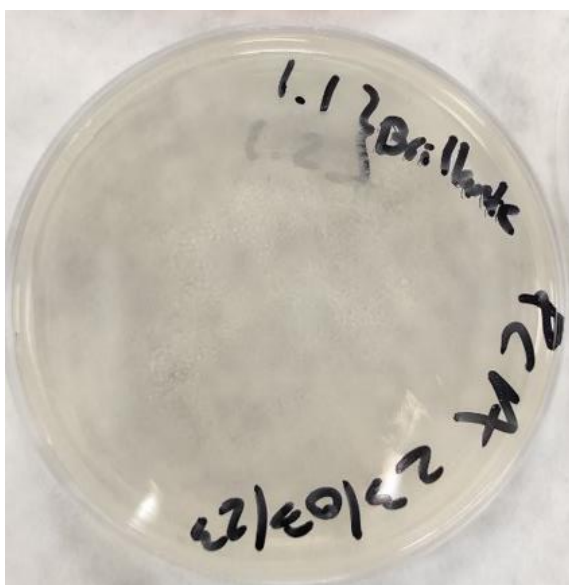
Placa de PCA con la resiembra de la placa número 1, colonia número 1 de Brillante – Foto propia

6.7. ANEXO I.IV.II. RESULTADO DE LA RESIEMBRA

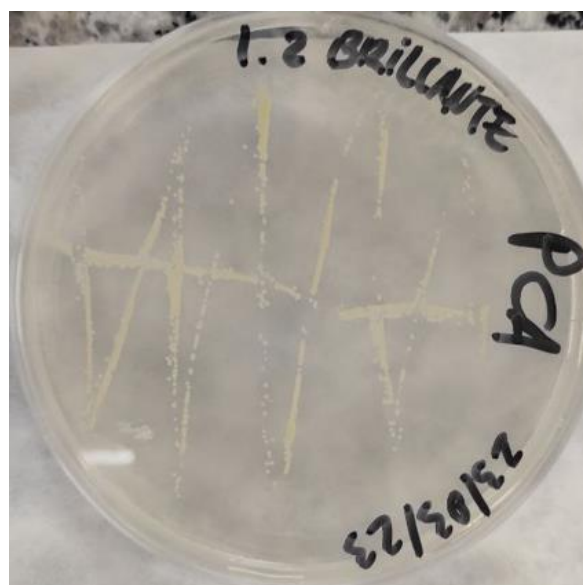
Tras incubar las placas de PCA durante 24 horas, hemos realizado la lectura de las placas resembradas:



Placas de PCA resembradas tras incubar – Foto propia



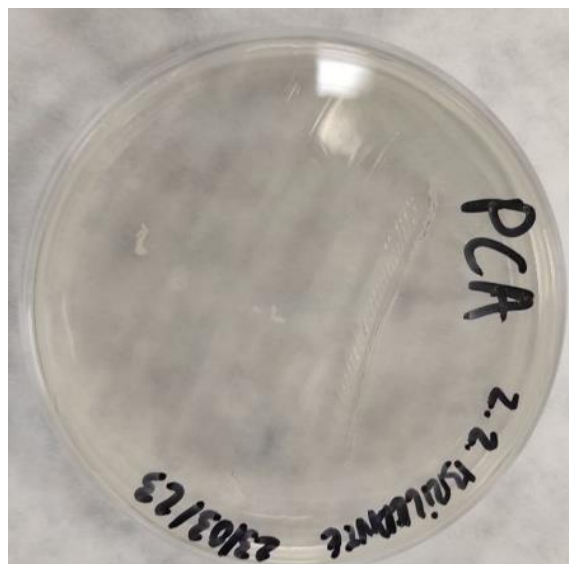
Placa 1.1 resembrada – Foto propia



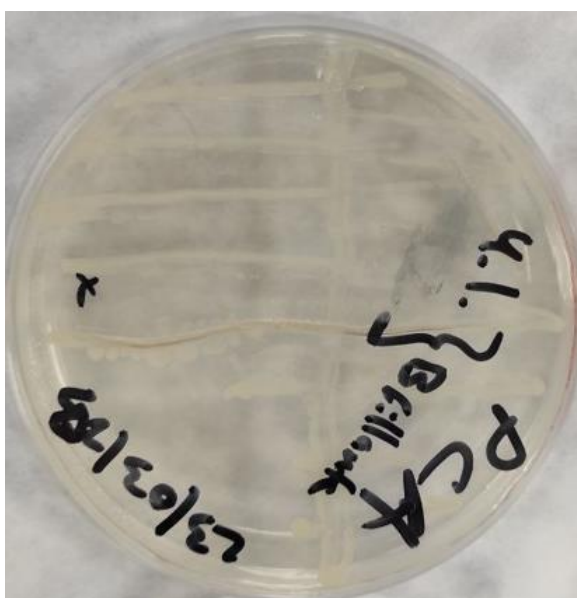
Placa 1.2 resembrada – Foto propia



Placa 2.1 resembrada – Foto propia



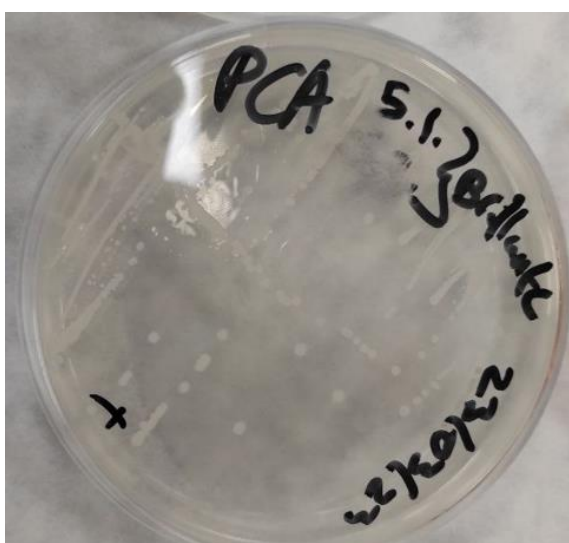
Placa 2.2 resembrada – Foto propia



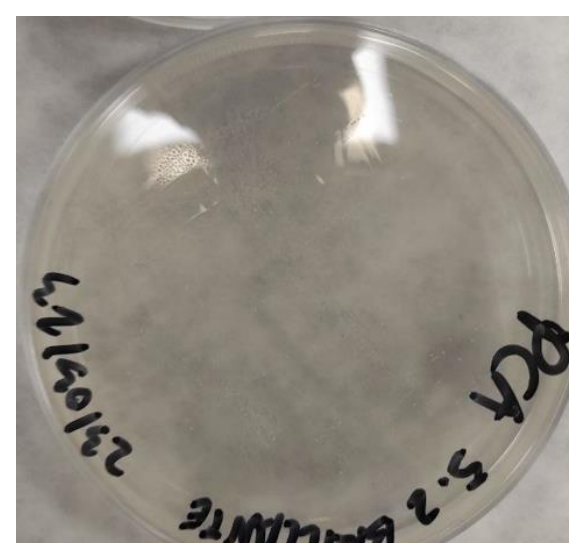
Placa 4.1 resembrada – Foto propia



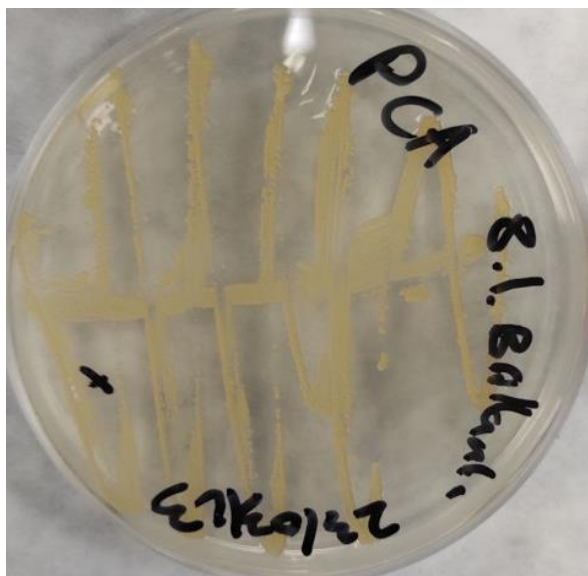
Placa 4.2 resembrada – Foto propia



Placa 5.1 resembrada – Foto propia



Placa 5.2 resembrada – Foto propia



Placa 8.1 resembrada – Foto propia

Como podemos observar, se observan colonias de distinta morfología (esto se puede deducir al realizar la observación macroscópica). Un ejemplo es la diferencia entre la placa 4.2 (amarilla y mucosa) y la placa 5.1 (más blanca y seca).

Tras examinar las placas, hemos decidido realizar las pruebas de las siguientes placas:

- 4.1.
- 4.2.
- 5.1.
- 8.1.

Se han decidido estas ya que son las 4 más diferenciadas (por ejemplo, podemos deducir por la observación 1.2. y la 4.2 parecen el mismo tipo de bacteria).

6.7. ANEXO I.V. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

Se ha realizado la una tinción de Gram para observar la bacteria, y la tira API para determinar a qué especie de bacteria pertenece.

6.7. ANEXO I.V.I. TINCIÓN DE GRAM

Para la tinción de Gram se necesitan los siguientes reactivos:

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Decolorante.
- Safranina.

- Agua destilada.

Además, se necesitará un puente de tinción donde colocar los portaobjetos, portaobjetos, un mechero y un asa de siembra.



Reactivos necesarios para la tinción de Gram – Foto propia.

6.7. ANEXO I.V.I.I. EMULSIÓN DE LA COLONIA

- 1º. Encendemos el mechero para asegurar un entorno de esterilidad.
- 2º. Para la emulsión dejamos caer una gota de agua destilada en el portaobjetos.
- 3º. Recogemos una colonia con el asa de siembra.
- 4º. Realizamos la emulsión en el agua destilada.
- 5º. Pasamos 2 – 3 veces el portaobjetos por encima de la llama y se deja secar.

6.7. ANEXO I.V.I.II. TINCIÓN DE LA COLONIA

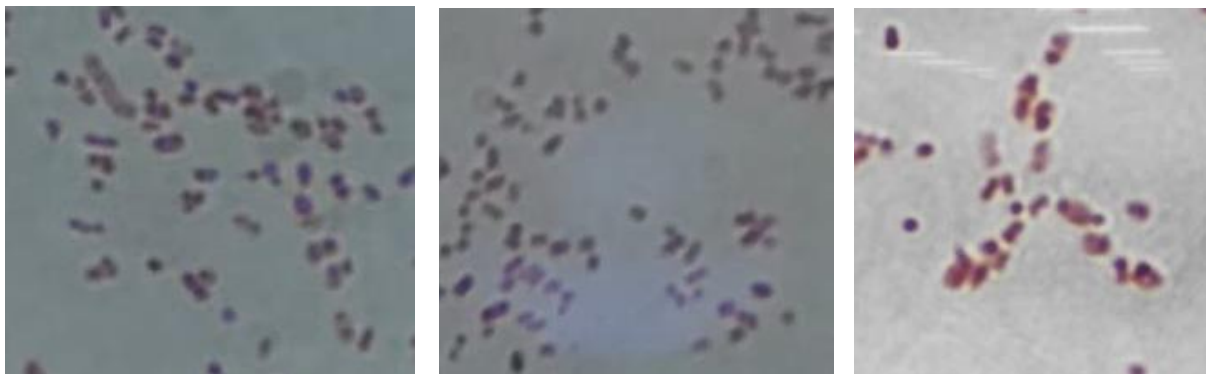
- 6º. Colocamos en el puente de tinción los portaobjetos y se añade cristal violeta durante 1 minuto, tras el cual lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.
- 7º. Tras lavar, añadimos el Lugol y dejamos secar otro minuto y a continuación lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.
- 8º. Añadimos el decolorante durante 30 segundos, después lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión.
- 9º. Finalmente, añadimos la safranina, dejamos actuar 1 minuto y lavamos con agua destilada sin dejar caer el chorro directamente en la emulsión y dejamos secar.

10º. Tras secar, observamos las preparaciones a microscopio óptico X100.

6.7. ANEXO I.V.I.III. RESULTADOS DE LA TINCIÓN

Tras realizar la tinción de Gram hemos observado los resultados al microscopio óptico, primero enfocando en x10 y x40, y finalmente, y usando aceite de inmersión, con x100. Los resultados son los siguientes:

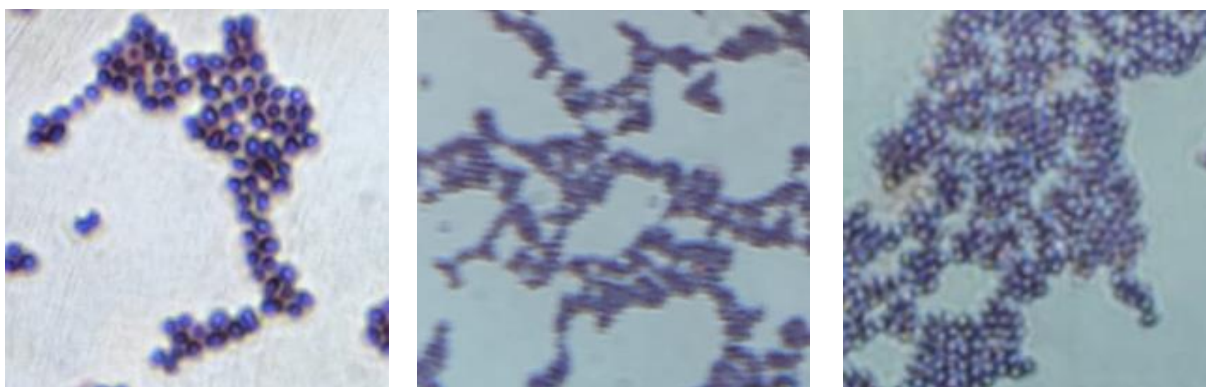
COLONIA 4.1. RESULTADOS



Colonia 4.1. – Foto propia

En la colonia número 4 se observan cocos gramnegativos agrupados en parejas (diplococos) o en racimo (estafilococos), lo que nos puede indicar un gran número de bacterias (por ejemplo, *Neisseria meningitidis*) (4) (5) (6), para determinar la bacteria, serían necesarias pruebas de identificación que no hemos podido realizar por falta de tiempo y medios.

COLONIA 4.2. RESULTADOS

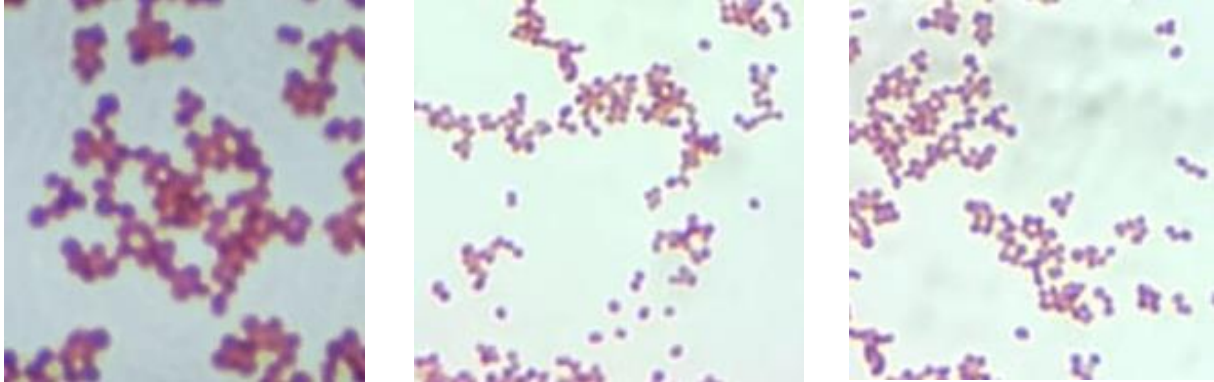


Colonia 4.2. – Foto propia

En la colonia 4.2. se observan cocos grampositivos agrupados en racimos (estafilococos), lo que podría indicar un *Staphylococcus aureus* o un *Staphylococcus epidermidis*, ya que el *aureus* ha colonizado a una parte importante de la población (sobre el 26%) (7), y el *epidermidis* forma parte del microbiota normal de la piel. Para

determinar la bacteria, serían necesarias pruebas de identificación que no hemos podido realizar por falta de tiempo y medios.

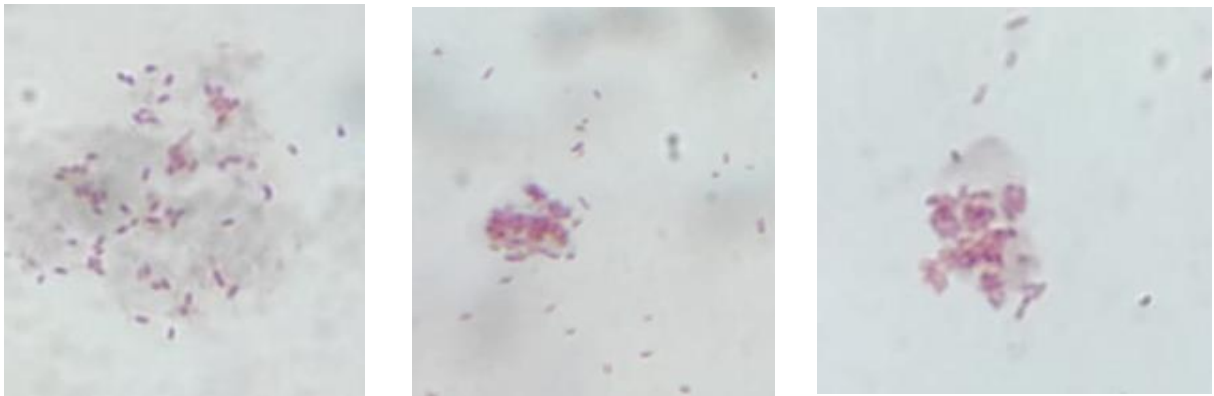
COLONIA 5.1. RESULTADOS



Colonia 5.1. – Foto propia

En la colonia 5.1. se observan cocos gramnegativos que forman cadenas (estreptococos) y racimos (estafilococos), pudiendo indicar lo mismo que la colonia 4.1. Para determinar la bacteria, serían necesarias pruebas de identificación que no hemos podido realizar por falta de tiempo y medios.

COLONIA 8.1. RESULTADOS



Colonia 8.1. – Foto propia

En la colonia 8.1. se observan bacilos gramnegativos, formando agrupaciones de empalizada o sueltos, pudiendo indicar un gran número de bacterias, como la *Escherichia coli*, bacteria que forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal, y que puede encontrarse en los móviles debido a su uso sin lavarse las manos tras defecar. Para determinar la bacteria, serían necesarias pruebas de identificación que no hemos podido realizar por falta de tiempo y medios.

6.7. ANEXO I.V.II. GALERÍA API

Las galerías API son una serie de tarjetas que disponen de varios microtubos con ciertos reactivos, que, tras adicionar la solución con la bacteria y seguir las instrucciones, dependiendo de sus resultados se rellena una hoja de resultados, que da un código que es identificativo de una bacteria en específico.

6.7. ANEXO I.V.II.I. INOCULACIÓN DE LA TIRA API

Para la preparación de la tira API debemos de seguir las instrucciones que la acompañan.

- 1º. Rellenar los pocillos de la base de agua destilada para crear un ambiente húmedo.
- 2º. Realizar una dilución de 0,5 en el estándar de McFarland de la colonia en 4 mililitros (mínimo) de suero salino estéril al 0,9%.
- 3º. Con una pipeta estéril y la tira en posición inclinada, ir rellenando los pocillos teniendo en cuenta lo siguiente:
 - a. En aquellas que el nombre esté rodeado por una caja (que son CIT, VP y GEL, como se puede observar en la imagen de debajo de la tira API), se debe rellenar el tubo incluida la cúpula.
 - b. En aquellas que estén subrayadas (que son ADH, LDC, H₂S, URE, como se puede observar en la imagen de debajo de la tira API) se crea una atmósfera anaerobia rellenando el tubo sin la cúpula, y rellenando la cúpula con aceite de parafina).
 - c. Para las otras pruebas, rellenar solo los tubos, sin incluir las cúpulas.
- 4º. Tras esto, se cierra con la tapa que incluye y se introduce en la estufa a $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de 18 – 24 horas de forma horizontal.



Tira API tras rellenar los pocillos, sin incubar – Foto propia

6.7. ANEXO I.V.II.II. LECTURA DE LA TIRA API

Tras incubar la tira realizamos el revelado y la lectura según indica las instrucciones:

- Prueba TDA: Agregamos una gota del reactivo TDA. Un color marrón – rojizo indicará una reacción positiva.

- Prueba VP: Agregamos una gota de los reactivos VP1 y VP2 y esperamos 10 minutos. Un color rosa o rojo en el tubo indicaría un resultado positivo.
- Prueba IND: Se realiza la última y no se coloca la tapa, ya que los vapores pueden alterar los resultados. Añadimos una gota del reactivo de JAMES. Un color rosado difuminado por todo el tubo indicaría un resultado positivo.

Tras realizar esto, por cada resultado positivo anotaríamos un + en la hoja de resultado que acompaña a la tira, sumando los + al final de la lectura en grupos de 3 y se busca su resultado en el registro de los códigos de la tira API.



Tira API tras la incubación y el revelado – Foto propia

Hoja de resultados de la tira API – Foto propia

En la foto superior podemos ver el proceso de cómo se iría rellenando la hoja de resultados, sumando los positivos y obviando los negativos, por lo tanto, el código que nos daría sería el 0006000:

Hoja de resultados de la tira API rellenada – Foto propia

Al buscar este código en los registros de las bacterias nos hemos encontrado con que el código no existe:

0 005 773	BONNE IDENTIFICATION	600
Erwinia nigrifluens	Zid=98.2 T=0.98	
0 006 002	IDENTIFICATION ACCEPTABLE	AC
Acinetobacter spp	Zid=87.4 T=0.81 (GEL	10
0 006 005	FAIBLE DISCRIMINATION	LO
Pseudomonas cepacia	Zid=49.8 T=0.81 (AMY	24
Aer.salmonicida	Zid=41.9 T=0.73 (ANY	5
Ps.pseudomallei	Zid= 6.4 T=0.60 (MAN	75
	(SOR	75
-IMPORTANT ! cf INTROD. 'ID.PRESOMPTIVE' -IMPO		
0 006 006	BONNE IDENTIFICATION	6
	AU GENRE	T
Pseudomonas cepacia	Zid=50.8 T=0.78 (ARA	1
Ps.fluoresc./putida	Zid=26.4 T=0.67 (ARA	2
Ps.aeruginosa	Zid=12.9 T=0.58 (ADH	1
	(ARA	
Pseudomonas spp	Zid= 5.8 T=0.50 (GEL	

Códigos de las tiras API – Foto propia

Como podemos observar, el código 0006000 no está contemplado (aunque nos puede hacer sospechar de una *Pseudomona*), eso indica que durante el proceso ha ocurrido algún error o interferencia. Probablemente esto es debido a que los reactivos estuvieran contaminados, ya que en las prácticas de microbiología durante el cursos, al realizar una tira API con cepas patrón identificadas, las tiras API tampoco arrojan un resultado claro, dando como resultado un código inexistente en todos los participantes (profesores y alumnos).

Debido a esto, sería necesario realizar otras pruebas de identificación con las que no contamos en el C.I.F.P. Cerdeño.

7. CRONOGRAMA

- Día 20/03/2023 – lunes: Se han realizado los medios de cultivo PCA, McConkey y brillante y se han autoclavado y vertido.
- Día 21/03/2023 – martes: Se ha preparado el agua de peptona para la toma de muestras y se ha autoclavado.
- Día 22/03/2023 – miércoles: Se ha realizado la siembra de las placas anteriormente nombradas y se han realizado más placas de PCA para la resiembra (PCA2 a partir de ahora).
- Día 23/03/2023 – jueves: Se ha visualizado, realizado el recuento y resembrado las placas sembradas, resembrando aquellas que proliferaron en el brillante, pasándolas a PCA2.
- Día 27/03/2023 – lunes: Hemos seleccionado las placas de la resiembra de las que se harán las pruebas, realizado la prueba de la tira API y se la hemos dejado incubando a 37°C durante 18 - 24 horas.
- Día 28/03/2023 – martes: Hemos realizado la lectura de la tira API, la tinción de Gram y su visualización al microscopio.
- Día 19/04/2023 – miércoles: Se ha elaborado parte de la documentación del proyecto.
- Día 27/04/2023 – jueves: Se ha enviado el proyecto para revisión del tutor individual.
- Día 12/05/2023 – viernes: Se ha realizado las modificaciones indicadas por los tutores del proyecto, realizando una nueva composición de los bloques del proyecto.
- Día 14/05/2023 – Domingo: Se ha revisado el proyecto, corrigiendo faltas de ortografía, reestructurando frases y comprobando el formato del documento.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agar MacConkey [Internet]. Wikipedia. 2021. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Agar_MacConkey
2. BRILLIANT GREEN AGAR (BGA) [Internet]. Available from: https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=064-PA0045_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=064-PA0045#:~:text=Descripci%C3%B3n%3A%20El%20Agar%20Verde%20Brillante
3. Weng Alemán Z, Esther Díaz Rosa O, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? Revista Cubana de Higiene y Epidemiología [Internet]. 2005 Dec 1. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032005000300006#:~:text=La%20resiembra%20peri%C3%B3dica%20es%20una
4. Bush LM. Introducción a las bacterias gram negativas [Internet]. Manual MSD versión para público general. Manuales MSD; 2022. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias-gram-negativas#:~:text=Las%20bacterias%20gramnegativas%20est%C3%A1n%20encerradas>
5. Bacteria_Gram_negativa [Internet]. www.quimica.es. Available from: https://www.quimica.es/enciclopedia/Bacteria_Gram_negativa.html#:~:text=Los%20cocos%20Gram%2Dnegativos%20causan
6. Mollinedo Patzi MA, Gonzáles Villalobos C. Bacterias Gram Negativas. Revista de Actualización Clínica Investiga [Internet]. :2609. Available from: http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000005&script=sci_arttext&tIng=es
7. Cifuentes D. M, Prado Jiménez V, Ojeda S. A. Prevalencia de portación de staphylococcus aureus y S. aureus meticilino resistente en estudiantes de medicina y población general. Rev chil infectol [Internet]. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-245447>