

2012

M^a Concepción Casado González
Gertrudis Torrico Cabezas
María Medina Anguita

NO COPIAR

MEDIOS DE CULTIVO EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Los medios de cultivo en microbiología..... | 3 |
| 2. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos | 4 |
| 3. La evolución de los medios de cultivo | 7 |
| 4. Tipos básicos de medios de cultivo..... | 8 |
| 5. Medios de cultivos comunes..... | 13 |
| 6. Bibliografía | 37 |

NO COPIAR

1. Los medios de cultivo en microbiología



Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el **Medio de Cultivo** y el crecimiento de los microorganismos es el **Cultivo**. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes.



El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.

La Gelatina es otro agente solidificante pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes.

También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el Rojo Fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido. La Violeta de Genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram-positivas).

2. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos

El desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son ajenos por completo al propio medio.

1- disponibilidad de nutrientes adecuados

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancia inductoras del crecimiento. Siempre han de estar presentes las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar.

Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, la

preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivo provocaban la pérdida de los factores nutritivos lábiles.

Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añade a muchos medios sustancias como suero, sangre, líquido ascítico, etc. Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica.

Muy a menudo se añaden al medio de cultivo ciertos colorantes, bien como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien por sus capacidades de ejercer de inhibidores selectivos de ciertos microorganismos.

2- consistencia adecuada del medio

Partiendo de un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido o sólido.

Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y de que otros tienen la capacidad de licuarla.

Actualmente los medios sólidos son de uso universal, por su versatilidad y comodidad, pero hay también gran cantidad de medios líquidos cuyo uso está ampliamente extendido en el laboratorio.

3- presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones.

4- condiciones adecuadas de humedad

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37°C proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseeque el medio.

5- Luz ambiental

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos.

6- pH

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH neutro, aunque los hay que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

7- Temperatura

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43°C. Otros como los psicrófilos crecen a 0°C y los termófilos a 80°C o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos). En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 37°C, y los saprofitos tienen rangos más amplios.

8- Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante)

3. La evolución de los medios de cultivo

Podemos decir que la microbiología empieza su verdadero desarrollo como ciencia en el momento en que se descubre el microscopio y comienza la observación de los primeros microorganismos, pero es indudable que la puesta a punto de los medios de cultivo y la utilización del agar como solidificante, marcan dos importantes puntos de inflexión en su evolución.

La primera noticia de la utilización de medios de cultivo nos llega del micólogo Brefeld, que consiguió aislar y cultivar esporas de hongos en medios sólidos realizados a base de gelatina.

Sin embargo este sistema no era adecuado para las bacterias (por su menor tamaño) y no fue hasta el año 1878 cuando Lister popularizó un método enfocado al cultivo puro basado en diluciones seriadas en un medio líquido.

Koch realizó sus investigaciones utilizando en un primer momento rodajas de patata como soporte nutritivo sólido, pero no tardó en recurrir al caldo de carne

líquido, diseñado por Loeffler, al que, en 1881, añadió gelatina, logrando un medio sólido transparente ideal para la observación de la morfología macroscópica de las colonias microbianas.

En el año 1882 tiene lugar uno de los grandes avances de la microbiología en relación con los medios de cultivo: el médico alemán Walter Hesse introduce el agar-agar (polisacárido extraído de algas rojas) como solidificante.

En 1887 un ayudante de Koch llamado Petri, comienza a utilizar placas de cristal planas, que se llaman desde entonces placas de Petri, para sustituir a las clásicas bandejas de vidrio cubiertas con campanas que se usaban hasta entonces.

Beijerinck y Winogradsky, que desde de 1888 realizaron sus investigaciones sobre las bacterias quimioautótrofas (utilización de nitrógeno y azufre sobre todo) tuvieron gran importancia en el desarrollo de los medios selectivos y de enriquecimiento. Diseñaron este tipo de medios de tal forma que su especial composición química favorecía el crecimiento de ciertos tipos de microorganismos que, en función de sus procesos metabólicos, eran los únicos capaces de utilizar para su desarrollo ciertos nutrientes del medio.

En 1892 Würtz impulsó el uso de los medios diferenciales, incorporando indicadores de pH a la composición de ciertos medios con lo cual se podía observar la producción de ácidos en la fermentación en ciertos microorganismos.

4. Tipos básicos de medios de cultivo

ATENDIENDO A SU ESTADO FÍSICO:

➤ **Medios de cultivo: Sólido y Líquido**

Una forma muy útil de poder aislar, identificar y conservar los microorganismos es mediante el uso de medios de cultivo, inicialmente ideados por Pasteur (que

como ya sabemos se considera el padre de la microbiología), quien se dio cuenta que los microorganismos podían crecer en soluciones que tuvieran azúcar y una fuente de nitrógeno.

De ese tiempo hasta acá, ha pasado mucha agua debajo del puente y actualmente existen medios muy especializados para microorganismos muy exigentes. La forma más sencilla de clasificar los medios de cultivo es por su consistencia...entonces aparecen los medios de cultivo sólidos y los medios de cultivo líquidos o también llamados caldos. En ambos medios debe haber una buena cantidad de nutrientes que faciliten el crecimiento bacteriano... y entonces cual es la diferencia?...pues la diferencia radica en la presencia de una sustancia que se llama Agar o “Agar-Agar” y que es la encargada de darle la solidez y consistencia al medio. Esta sustancia proviene, principalmente, de un alga llamada *Gelidium*, aunque muchos otros géneros pueden servir como fuente de este polisacárido (es decir, un azúcar grande formado por la unión de azúcares pequeños). Y como se obtiene del alga?...Se toman sus semillas, se lavan, se secan, se realizan procesos de extracción, filtración, purificación y desecación para que queden hojuelas o polvo y luego si adicionarla al medio de cultivo.

Fue, Robert Koch, médico alemán dedicado al estudio de los microorganismos y considerado uno de los autores de la “teoría microbiana”, quien empezó a cultivar y aislar microorganismos. Koch, buscando mejorar la técnica utilizada hasta ese momento, decidió solidificar los medios de cultivo añadiéndoles gelatina. Sin embargo, y a sugerencia de una ayudante, introdujo el agar.

Tiene alguna ventaja el uno sobre el otro? Pues la ventaja fundamental de usar un medio de cultivo líquido, es que permite que crezcan bacterias que se encuentran en muy poca cantidad, es decir, cuya concentración es muy baja en la muestra que estemos analizando. Para el caso del medio de cultivo sólido, la ventaja radica en que permite detectar los diferentes tipos de bacterias que puedan encontrarse en una sola muestra.....entonces el usar uno u otro medio de cultivo dependerá de lo que busquemos o queramos: aislar una bacteria que se encuentre en cantidades muy pequeñas (medio líquido) o todas las bacterias que puedan haber en una muestra (medio sólido)

➤ **Medios semisólidos**

Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias.

SEGÚN SU UTILIZACIÓN:

1) Medios comunes: Son aquellos que poseen los componentes mínimos para el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. El medio más común es el agar nutritivo o agar común, que resulta de la adición de agar al caldo nutritivo. Otros miembros de este grupo son el agar tripticase de soja, el agar Columbia, etc.

2) Medios de enriquecimiento: Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas, contienen factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Se hace por adición de sangre u otros productos biológicos (sangre, suero, leche, etc.) dichos factores. En ocasiones es posible añadir suplementos artificiales al medio de enriquecimiento del mismo (p. ej. Polivitex, Isovitalex, etc.) El gonococo, por ejemplo, requiere para su crecimiento estas sustancias que son aportadas por la sangre calentada y el chocolate.

3) Medios selectivos: Son medios utilizados para favorecer el crecimiento de una población polimicrobiana. El fundamento de estos medios consiste en facilitar el crecimiento de una población microbiana específica. Un ejemplo de medio selectivo es el caldo de selenio que favorece el crecimiento de salmonellas y frena el del resto de enterobacterias.

4) Medios inhibidores: Cuando las sustancias añadidas a un medio selectivo impiden el crecimiento de una población microbiana, se denomina inhibidor. Los medios inhibidores son una variante más restrictiva de los medios selectivos. Los medios inhibidores se consiguen añadiendo sustancias antimicrobianas o de cualquier otra que inhiba completamente a una población determinada. Un medio inhibidor es el MacConkey que permite el crecimiento de las bacterias Gram negativas e impide el crecimiento de los Gram positivos.

5) Medios diferenciales: Se utilizan para poner en evidencia características de las bacterias.

diferenciar géneros o especies. La adición de un azúcar fermentable o un sustrato para este fin. El medio MacConkey es un medio diferencial porque permite distinguir la lactosa de aquellos que no lo hacen. También lo son el C.L.E.D. (lactosa +/-lactosa hemólisis), el SS (que es doblemente diferencial), etc.

6) Medios de identificación: Son los destinados a comprobar alguna cualidad o para reconocer la identidad de un microorganismo. Estos medios han de poseer para asegurar el crecimiento de los microorganismos, el sustrato específico que vaya a que nos muestre el resultado. El agar Kligler, el medio de Simmons y en general si se ha añadido un elemento diferencial de un microorganismo, son medios diferenciales. Actualmente están apareciendo en el mercado una gran cantidad de medios específicos para ciertos microorganismos, con lo cual se consigue simultáneamente abaratar el costo de la identificación. Son ejemplos de esto último los medios CPS ID3 o Uriline II para identificar los gérmenes urinarios más importantes a partir de la placa de cultivo en sustratos cromogénicos específicos.

7) Medios de multiplicación: Sirven para obtener una gran cantidad de células a partir de un cultivo aislado. Se emplean en la obtención de vacunas, en la investigación y en la industria. Para la multiplicación suelen ser líquidos. El caldo-infusión cerebro-corazón (BHI) es un ejemplo de estos medios.

8) Medios de conservación: Se utilizan para conservar una cepa que, por alguna razón, no se puede mantener. Fundamentalmente se utilizan como controles de calidad de las pruebas en el Laboratorio de Microbiología. En el laboratorio se pueden conservar las cepas de

- a) haciendo pases periódicos de placa a placa,
- b) mediante liofilización de una suspensión bacteriana, y
- c) congelando las cepas en leche descremada estéril al 0,1%.

9) Medios de transporte: Se usan para el transporte de muestras clínicas que no se pueden analizar inmediatamente. Su utilización debe hacerse introduciendo la torunda con la que se tomó la muestra en el interior del medio (generalmente en un tubo). Son ejemplos típicos de este tipo de medios Amies, Cary-Blair, etc.

ATENDIENDO A SU COMPOSICIÓN:

Según las sustancias que entren a formar parte en su composición, los medios de cultivo pueden ser clasificados en:

1) Medios complejos: Fueron los primeros utilizados, y los más empleados se preparan a partir de tejidos animales, y más raramente de vegetales. Su composición no es exactamente definida, y por consiguiente no es rigurosamente constante. Esto puede tener ciertos inconvenientes en condiciones experimentales, donde la reproductibilidad no podrá ser exacta. En la práctica corriente estos medios dan excelentes resultados y son los más empleados.

2) Medios sintéticos: Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua destilada en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida.

3) Medios semisintéticos: El gran número de factores de crecimiento exigidos para ciertos gérmenes hace que la fabricación de un medio sintético para estos gérmenes sea imposible o demasiado cara. En este caso se aportan los factores de crecimiento bajo la forma de un extracto orgánico complejo (extracto de levadura, extracto de tejidos, etc.). Ciertos gérmenes no crecen en ningún medio por muy enriquecido que esté éste, haciéndolo exclusivamente en células vivas con unas características determinadas. Ejemplos de este tipo son, aparte de los virus, las Chlamydias, Rickettsias, etc.

SEGÚN SU ORIGEN:

a) NATURALES: son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.

b) SINTÉTICOS: son los medios que contienen una composición química definida cuali y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.

c) SEMISINTÉTICOS son los sintéticos a los que se les añaden factores de

crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

5. Medios de cultivos comunes.

Son los más corrientemente utilizados, y aunque no vamos a enumerarlos todos, sí son los más conocidos en un laboratorio de Microbiología.

➤ **Agar nutritivo:**

El **Agar nutritivo** es un medio de cultivo usado normalmente como rutina para todo tipo de bacteria. Es muy útil porque permanece sólido incluso a relativas altas temperaturas. Además, el crecimiento bacteriano en este agar lo hace en la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas.

En un caldo de nutrientes, la bacteria crece en el líquido, y aparece como una sustancia espesa, con colonias difícilmente observables. El agar nutritivo contiene normalmente (w/v).

- 0.5 % Peptona
- 0.3 % extracto de carne/extracto de levadura
- 1.5 % agar
- 0.5% NaCl
- Agua destilada
- pH casi neutro (6.8) a 25 °C.



➤ **Agar sangre:**

Es un medio enriquecido que se utiliza además para la investigación de los diversos tipos de hemólisis (α , β ó γ). Se utiliza para el crecimiento de estreptococos. Para la preparación del agar sangre se puede utilizar el agar nutritivo enriquecido con cloruro sódico o un preparado enriquecido con otras sustancias como Columbia o el tripticase de soja. La adición de sangre a un medio de cultivo no proporciona las sustancias que están en el interior de los hematíes, pero sí puede añadir factores inhibidores del crecimiento bacteriano presentes en el suero. Este es un inconveniente que puede solucionarse calentando la sangre para romper los eritrocitos y para que se destruyan las sustancias inhibidoras, que son termolábiles. La sangre utilizada como aditivo a estos medios suele ser sangre de carnero diluida al 5%, pero en algunas ocasiones es necesario utilizar sangre de otras especies (caballo, conejo, humana), pues facilitan las reacciones hemolíticas o contienen determinados factores de enriquecimiento o no poseen sustancias inhibidoras del crecimiento de determinados gérmenes. Agar chocolate: El agar chocolate se obtiene calentando la sangre antes de adicionarla al medio base. Por esta razón el agar chocolate contiene hemoglobina, que aporta al medio un importante elemento para el crecimiento: el factor X o hemina termoestable. El agar chocolate es un

medio destinado principalmente al aislamiento de Neisserias (gonococos y meningococos) y Haemophilus, pero en él pueden crecer muchos otros microorganismos exigentes. El agar chocolate puede convertirse quizás en uno de los medios más enriquecidos si añadimos una mezcla de factores de crecimiento no contenidas en la sangre. Estas mezclas, denominadas de forma diferente según las casas comerciales (Polivitex, Isovitalex, etc.) contienen más de una docena de compuestos que confieren a este medio unas cualidades nutritivas extraordinarias. Por adición de uno o varios antibióticos pueden lograrse medios inhibidores o selectivos para el crecimiento de determinados microorganismos. Un ejemplo clásico es el Thayer-Martin, utilizado para el aislamiento del gonococo y que no es otra cosa que un agar chocolate enriquecido al cual se ha añadido una mezcla de tres antibióticos específicos que impedirán el crecimiento del resto de la flora acompañante. Agar MacConkey: Es un medio utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias. Es un medio inhibidor de los gérmenes Gram positivos por su contenido en cristal violeta y selectivo para enterobacterias por su contenido en sales biliares. En su composición lleva un azúcar (lactosa) y un indicador (rojo de metilo) que lo convierten en un medio diferencial. Los gérmenes que fermenten la lactosa producen una acidificación del medio que hacen aparecer de color rojo fuerte a las colonias resultantes. Las colonias lactosa negativas serán incoloras, apareciendo del mismo color que el medio subyacente (naranja).



➤ **Agar C.L.E.D.:**

El medio C.L.E.D. (Cistina Lactosa Electrólito Deficiente) está recomendado para el recuento e identificación presuntiva de los microorganismos de las vías urinarias. Su bajo contenido en electrolitos evita la invasión de los cultivos por *Proteus*. La presencia de lactosa en su composición le confiere el carácter de medio diferencial, aunque la interpretación sea diferente al anterior medio por la incorporación de otro indicador: el azul de bromotimol. Las colonias lactosa positivas aparecerán de color amarillo y las lactosa negativas lo harán con un color verdoso, blanco o azulado.



➤ **Agar S.S.:**

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia.

Fundamento

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial.

La selectividad, esta dada por la sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus* spp.

Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo.

Salmonella, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro. Para aumentar la selectividad, se recomienda incubar previamente la muestra en Selenito caldo (B02-120-05).

| Fórmula (en gramos por litro) | | Instrucciones |
|-------------------------------|---------|---|
| Pluripeptona | 5.0 | Suspender 60 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar. Calentar a ebullición durante 2 o 3 minutos. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar a 45-50°C y distribuir unos 20 ml por placa. Secar la superficie del medio unos minutos en la estufa. |
| Extracto de carne | 5.0 | |
| Lactosa | 10.0 | |
| Mezcla de sales biliares | 8.5 | |
| Citrato de sodio | 8.5 | |
| Tiosulfato de sodio | 8.5 | |
| Citrato férrico | 1.0 | |
| Agar | 13.5 | |
| Verde brillante | 0.00033 | |
| Rojo neutro | 0.025 | |
| pH final: 7.0 ± 0.2 | | |

Siembra

Sembrar por estriado la superficie del medio de cultivo.

Recomendaciones, se aconseja sembrar en forma conjunta una placa de agar E.M.B. (B02-101-05) o de agar Mac Conkey (B02-114-05).

Incubación

Durante 24-48 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

Resultados

| Microorganismos | Colonias |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Salmonella typhimurium ATCC 14028 | Transparentes, centro negro |
| Shigella flexneri | Incoloras |
| Shigella sonnei | Incoloras |
| Proteus mirabilis ATCC 43071 | Transparentes, centro negro |
| Escherichia coli ATCC 25922 | Rosadas a rojas |
| Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 | Rosadas cremosas y mucosas |
| Enterococcus faecalis ATCC 29212 | Incoloras, de muy escaso crecimiento |

Características del medio

Medio preparado: rojo naranja.

Almacenamiento:

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

| Presentación | |
|----------------------------|----------------------------|
| x 100g :Código: B02-138-05 | X 500g :Código: B02-138-06 |



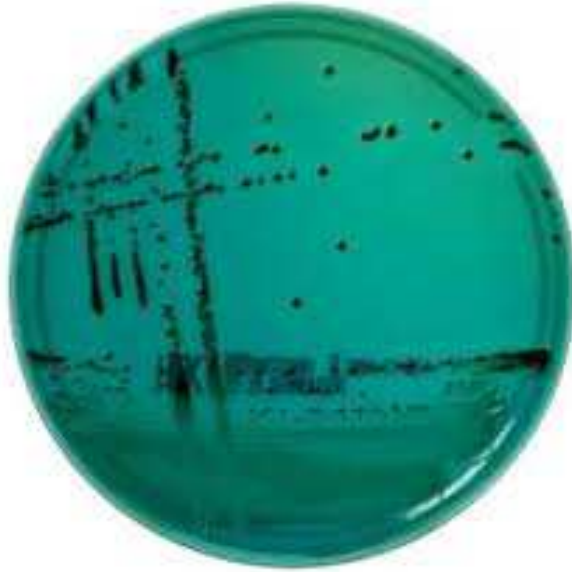
Escherichia coli

Salmonella

Shigella

➤ **Agar Hektoen :**

Es un medio más diferencial y menos selectivo que el agar SS. Se utiliza para facilitar el aislamiento de las enterobacterias. La presencia de tres azúcares (lactosa, sacarosa y salicilina) permiten ampliar el poder diferencial de este medio. Este medio es capaz de detectar los gérmenes formadores de SH₂, igual que el SS. Las cualidades del agar Hektoen se deben a su riqueza en peptonas y azúcares, que neutralizan el efecto inhibitor de las sales biliares respecto a ciertos gérmenes de cultivo delicado (Shigella en particular).El crecimiento de Salmonella es excelente, igual que el de Shigella, obteniéndose colonias más numerosas y voluminosas que en los medios selectivos usuales. La inhibición tiene lugar, esencialmente, sobre E. coli y en menor medida sobre Proteus y Citrobacter. Hay que señalar que el vibrión colérico crece bien en este medio.



➤ C.P.S. ID3. :

Medio cromogénico desarrollado por Biomerieux, que permite la identificación de *E. coli*, *P. mirabilis* y *E. faecalis*, con la simple visualización del cambio de color de la colonia sobre el medio (rojo burdeos, azul marrón). La identificación solo requiere la adición de un reactivo para confirmar o descartar la especie sospechada. Otros microorganismos diferentes requieren los sistemas de identificación habituales (API, p. ej) Granada, Islam o New GBS: Medios utilizados para detección de *Streptococcus agalactiae*, mediante la utilización de un sustrato cromogénico específico de este microorganismo.



➤ **Agar Mueller-Hinton:**

El Agar Mueller Hinton es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos aeróbicos por el método de Bauer-Kirby. Este medio también es conocido como Agar M-H.

Bauer, Kirby, Sherris y Tuck recomendaron el Agar de Mueller Hinton para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad a antibióticos, utilizando un solo disco impregnado con una alta concentración de un antimicrobiano. El Agar Mueller Hinton cumple con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud y está especificado en la FDA. Este medio es el seleccionado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) para realizar las pruebas de susceptibilidad, por su alta reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras y el crecimiento satisfactorio que presentan la mayoría de los patógenos no fastidiosos. Con este medio se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios sobre susceptibilidad antimicrobiana.

En este medio la infusión de carne y la peptona de caseína proveen la fuente de nitrógeno, vitaminas, carbón y aminoácidos. El almidón es agregado para absorber cualquier metabolito tóxico y el agar es adicionado como agente solidificante.

Infusión de Carne 300.0 Almidón. 1.5

Peptona de Caseína H 17.5 Agar Bacteriológico 17.0

pH 7.4 ± 0.2

Método:

Suspender 38 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles Para obtener desarrollo de Neisseria enfriar el medio a 45-50 °C y agregar sangre de borrego defibrinada estéril al 5% calentada a 80 °C. Para realizar pruebas de oxacilina y meticilina con estafilococcus , el medio deberá ser suplementado con 2% de cloruro de sodio.

Procedimiento:

Consultar las referencias apropiadas para la técnica de susceptibilidad en placa por el método de difusión.

Consultar las referencias apropiadas para la interpretación de resultados.

Almacenamiento: 2-30° C.

Caducidad: 5 años en frasco cerrado.



➤ **Agar Trypticase de soja:**

Es un medio utilizado para el crecimiento de gérmenes exigentes, como Brucella, Neisseria o Streptococcus. Es un medio muy enriquecido, pero no es diferencial. Caldo tioglicolato con resazurina: Es un medio recomendado para controles de esterilidad. Permite el cultivo de aerobios, anaerobios y microaerófilos. Tiene un bajo potencial redox que, al aumentar, se manifiesta por un color rosa del medio.



➤ **Agar Chapman o manitol salino:**

Agar Manitol salado o siglas **en inglés MSA** (Mannitol salt agar) es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología. Permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras. Este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (~7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococci* (y 'Micrococcaceae) debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias.² Además contiene manitol y un indicador de Ph; rojo de fenol.

Coagulase-positiva *Staphylococci* produce colonias amarillas con zonas amarillas, mientras que coagulase-negativa *Staphylococci* produce colonias rojas o ligeramente rosadas sin cambio alguno al medio. Si un organismo es capaz de fermentar el manitol, un subproducto ácido es creado que hace que el rojo de fenol cambie a amarillo. Se usa para el aislamiento selectivo de colonias de *Staphylococci* sospechosas de ser patógenas.

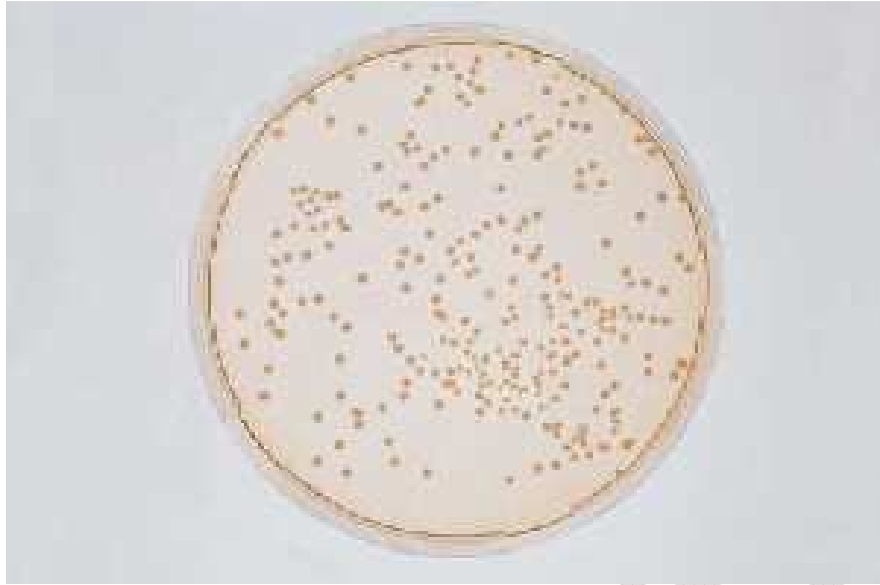
Posibles Resultados

- Gram - : crecimiento inhibido

Composición Típica

El agar manitol salado suele tener la siguiente composición.

- 5.0 g/L enzima digestiva de caseína
- 5.0 g/L enzima digestiva de tejido animal
- 1.0 g/L extracto de carne de vaca
- 10.0 g/L D-manitol
- 75.0 g/L NaCl
- 0.025 g/L rojo de fenol
- 15.0 g/L agar
- pH 7.4 ± 0.2 at 25 °C



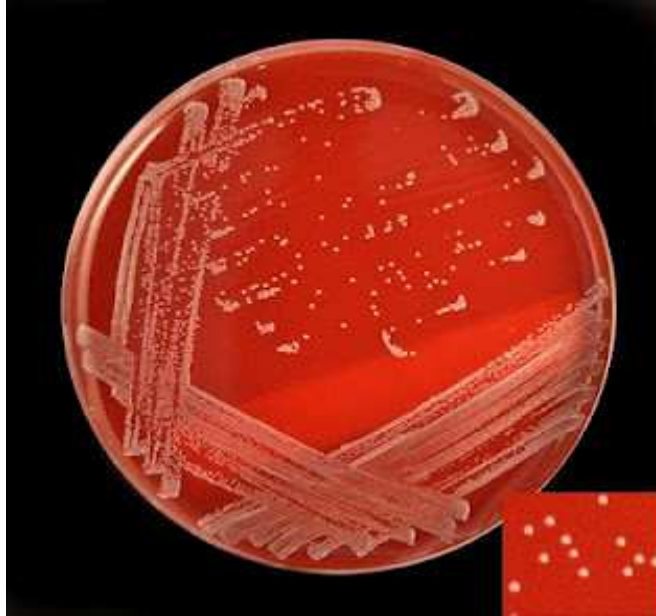
➤ **Agar Baird-Parker:**

Permite el crecimiento de estafilococos coagulasa positivos, a la vez que los diferencia del resto.



➤ Medio de Loeffler:

Es un medio específico para el cultivo de *Corynebacterium diphtheriae*.



➤ Agar Desoxicolato Citrato Lactosa Sucrosa (DCLS):

Similar al agar SS. Es un medio diferencial e inhibidor a la vez.

➤ Agar Kligler:

El agar medio de Kligler (TSI, Triple Sugar Iron) es un medio diferencial que puede ayudarnos a distinguir entre especies de enterobacterias de acuerdo a su capacidad (o falta de ella) para:

- Metabolizar lactosa, sacarosa o ambas
- Producir ácido mediante fermentación
- Producir gas durante la fermentación
- Generar ácido sulfhídrico

Los componentes del medio y sus funciones

a) Rojo fenol

Un indicador de pH. En medios *ácidos* (debajo de 6.8) se torna *amarillo*. En

medios *alcalinos* (arriba de 8.2) se torna *rojo*.

b) 1,0% de lactosa y 1,0% de sacarosa

Su fermentación produce una *gran cantidad de ácidos*.

c) 0,1% de glucosa

Su fermentación produce una *pequeña cantidad de ácidos*.

d) Sulfato ferroso ($FeSO_4$)

Nos permite averiguar si la bacteria pueden producir H_2S (*ácido sulfhídrico*).

Interpretación de resultados

Se debe examinar la parte superior e inferior del medio y valorar la coloración

a) En el extremo superior

Rojo.- No fermentan lactosa, sacarosa o ambas.

Amarillo.- Fermenta lactosa, sacarosa o ambas.

Explicación: El tinte amarillo indica un pH bajo debido a la producción de ácidos en grandes cantidades por la fermentación de la lactosa y/o sacarosa. Si la bacteria no fermenta lactosa y/o sacarosa la producción de ácidos es nula o, en caso de las enterobacterias, mínima (ya que todas fermentan la glucosa, generando ácidos en pequeñas cantidades) aunque no lo suficiente para contrarrestar la alcalinidad del medio, la cual se manifiesta con un intenso color rojo.

b) Extremo inferior

Rojo.- Sin fermentación, la bacteria es un aerobio obligado.

Amarillo.- Fermentación, la bacteria es un aerobio facultativo.

Negro.- Producción de H_2S .

Grietas, burbujas o elevación del medio.- Producción de gas.

Explicación: La coloración sigue el mismo patrón, indicando el pH en base a la fermentación de carbohidratos. La presencia de un color rojo a este nivel, no sólo nos dice que la bacteria no fermenta lactosa y sacarosa, además es indicativo de

que no fermenta glucosa y por tanto necesita oxígeno para oxidar éstos carbohidratos y obtener energía de ellos, siendo así un microorganismo aerobio obligado.

La presencia de coloración amarilla nos indica fermentación de carbohidratos, aunque sea sólo de glucosa (si el otro extremo es rojo) y esta función metabólica es típica de anaerobios facultativos.

Si la bacteria puede reducir el SO_4 (sulfato ferroso) a H_2S (ácido sulfhídrico), este se combinará con el Fe (hierro) para formar FeS (sulfuro de hierro) el cual proporciona un aspecto negro al extremo inferior. La producción de gas dentro del agar provocará grietas, burbujas o desplazamiento del mismo hacia arriba.

Reacciones típicas de algunas enterobacterias

a) *Shigella dysenteriae* produce la disentería bacilar

Fermenta glucosa (pero no lactosa), no produce gas ni H_2S

Extremo superior.- Rojo

Extremo inferior.- Amarillo

b) *Salmonella typhimurium* produce envenenamiento por alimentos

Fermenta glucosa (pero no lactosa), produce gas y H_2S

Extremo superior.- Rojo

Extremo inferior.- Negro y amarillo, con elevación del medio

c) *Salmonella typhi* produce la fiebre tifoidea

Fermenta glucosa (pero no lactosa), no produce gas, produce H_2S

Extremo superior.- Rojo

Extremo inferior.- Negro y amarillo

d) *Aerobacter aerogenes* similar a *Klebsiella* pero no es respiratoria

Fermenta glucosa y lactosa, produce gas, y no produce H_2S

Extremo superior.- Amarillo

Extremo inferior.- Amarillo con elevación del medio

e) *Escherichia coli* es la bacteria más común de la flora intestinal

Fermenta glucosa y lactosa, produce gas, y no H₂S

Extremo superior.- Amarillo

Extremo inferior.- Amarillo con elevación del medio

f) *Citrobacter freundii* no patógena

Fermenta glucosa y lactosa, produce gas y H₂S

Extremo superior.- Amarillo

Extremo inferior.- Amarillo y negro con elevación del medio

g) *Proteus vulgaris* produce infecciones de las vías urinarias, altamente móvil

Fermenta glucosa y lactosa, produce gas y H₂S

Extremo superior.- Amarillo

Extremo inferior.- Amarillo y negro con elevación del medio

h) *Klebsiella pneumoniae* produce neumonía en pacientes debilitados, nosocomial

Extremo superior.- Amarillo

Extremo inferior.- Amarillo y negro o rojo con elevación del medio

i) *Pseudomonas aeruginosa* es parte de la flora intestinal, produce infección de heridas

No fermenta carbohidratos

Extremo superior.- Rojo

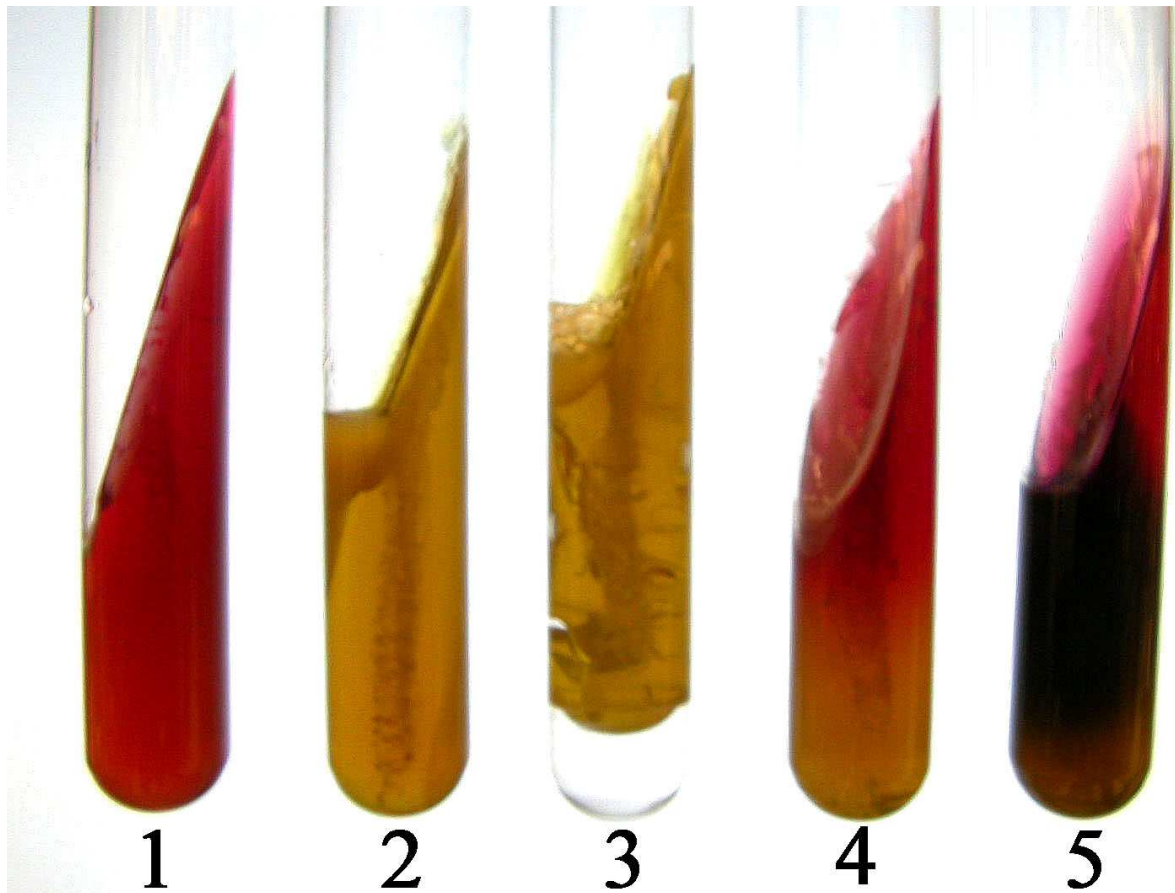
Extremo inferior.- Rojo

j) *Alcaligenes faecalis* es un patógeno oportunista

No fermenta carbohidratos

Extremo superior.- Rojo

Extremo inferior.- Rojo



➤ **Agar Levine ó EMB (Eosina azul de metileno):**

El Agar Eosina y Azul de Metileno es un medio utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos. Este medio también es conocido como Agar EMB por sus siglas en inglés.

La fórmula original del Agar EMB fue desarrollada por Holt-Harris y Teague. El uso de la eosina y del azul de metileno permite la diferenciación de las colonias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras. La sacarosa está incluida en el medio para detectar a los miembros del grupo coliforme que fermentan más rápidamente la sacarosa que la lactosa. Este medio se considera superior al Agar ENDO, ya que resulta ser un medio más sensible, estable y seguro y permite una diferenciación mas temprana entre las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Holt-Harris y Teague desarrollaron posteriormente la formulación para el Agar de Levine para la diferenciación de organismos coliformes fecales y no fecales.

Este medio permite diferenciar al grupo Salmonella y otros organismos lactosa

negativos de organismos coliformes. El Agar EMB es una combinación de la fórmula original y la de Levine donde las peptonas proveen la fuente de nitrógeno, la eosina y el azul de metileno son colorantes que se combinan para formar un precipitado a pH ácido. Los colorantes actúan como inhibidores e indicadores. Los carbohidratos proporcionan la fuente de energía, las fosfatos actúan como buffer y el agar como agente solidificante.

Composición:

Digerido Pancreático de Gelatina 10.0 Lactosa 5.0

Sacarosa 5.0 Fosfato Dipotásico 2.0

EosinaY 0.4 Azul de Metileno 0.065

Agar Bacteriológico 15.0

pH 7.2± 0.2

Método:

Suspender 36 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Procedimiento:

1. Recolectar las muestras y sembrarlas tan pronto lleguen al laboratorio, sembrando las placas por estría.

2. Incubar las placas 35- 37°C durante 18 a 24 horas y observar el crecimiento.

Las colonias de Salmonella y Shigella son translúcidas, de color ámbar o incoloras. Los coliformes que utilizan la lactosa y/o sacarosa producen colonias de color azul a negro con centros oscuros y brillo metálico. Otros coliformes como Enterobacter presentan colonias mucosas de color rosa. Las cepas de

Enterococcus faecalis son parcialmente inhibidas.



➤ **Agar Cetrimida. Agar King:**

Uso

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* a partir de diversas muestras.

Principio

La cetrimida (Bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibe el crecimiento de las bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. La base de Agar Cetrimida promueve la producción de pirocianina y fluoresceína que se observan con luz ultravioleta en los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, lo que puede considerarse como prueba presuntiva para su identificación. Posteriormente se puede realizar la prueba de oxidasa. Sembrar la muestra de ensayo en la superficie del medio de cultivo por estría cruzada. Incubar 24 – 48 h a 35°C.

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA
Agar Cetrimida Cloruro de magnesio 13.6 0.3 1.4 Peptona de gelatina Sulfato de potasio pH 7.2 ± 0.2 20.0 10.0

Preparación

Rehidratar 45.3 g del medio en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Si se requiere el medio para caracterización bioquímica, distribuirlo en tubos de ensayo y después de esterilizar dejar enfriar en posición inclinada. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

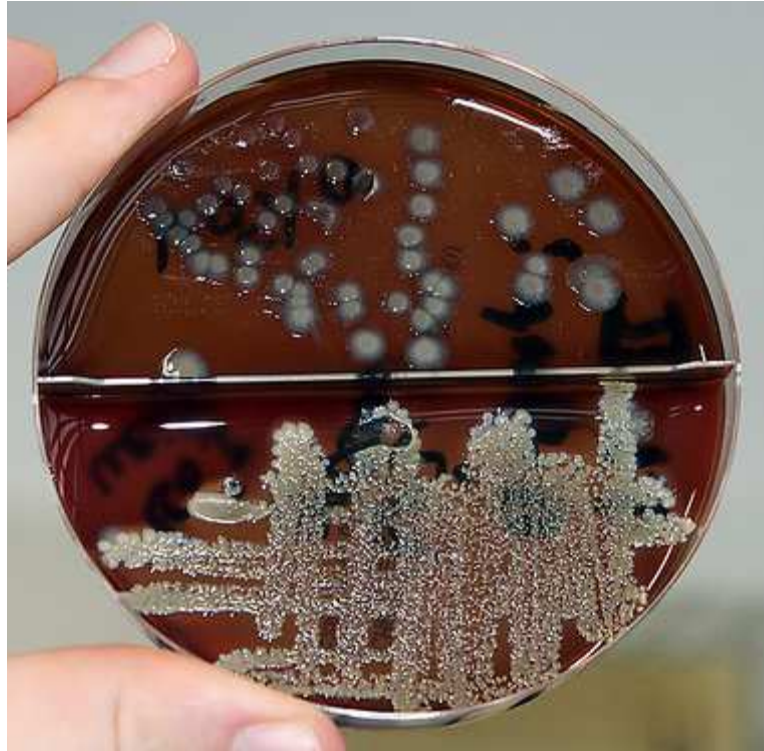
Microorganismo

Pseudomonas aeruginosa *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*



➤ **Agar Schaedler:**

Es un medio con sangre y vitamina K muy adaptado para el cultivo de anaerobios.

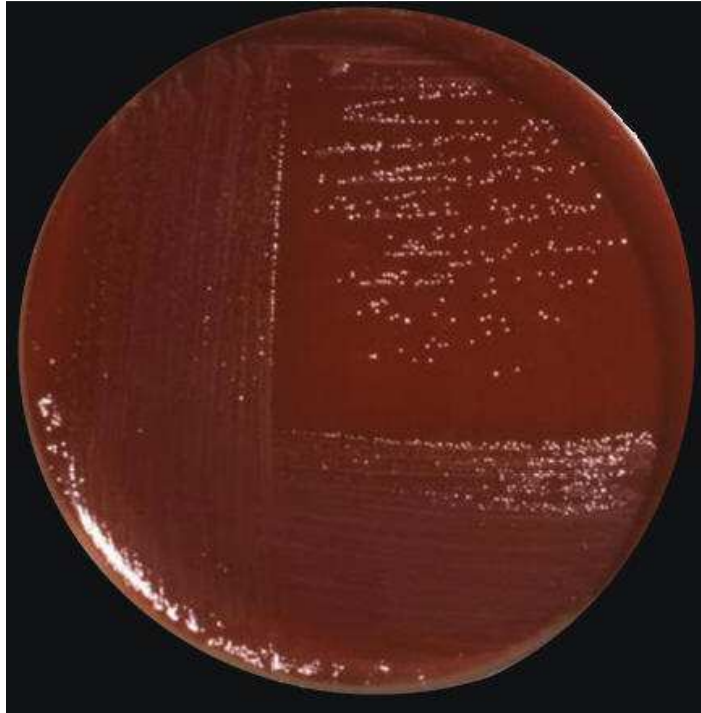


➤ **Agar Gardnerella:**

Agar con sangre humana más una mezcla de antibióticos que permiten la observación de colonias betahemolíticas características de Gardnerella vaginalis

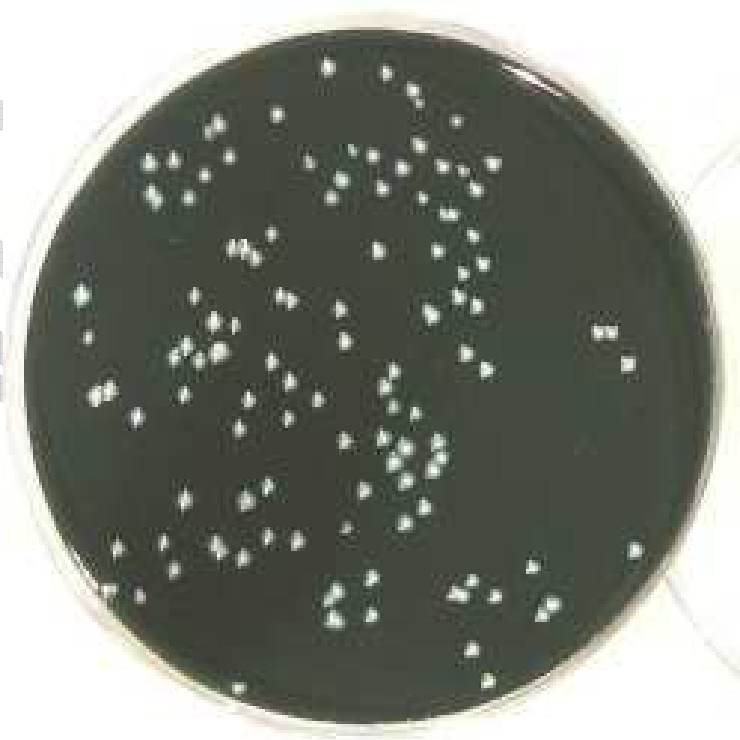
➤ **Campyloesel:**

Se utiliza para el aislamiento de Campylobacter intestinales creciendo a 42° C en microaerofilia.



➤ **Agar BCYE (Buffer Charcoal Yeast Extract):**

Se utiliza para el aislamiento de bacterias del género Legionella



➤ Löwenstein-Jensen:

Es esta una base para la preparación de varios medios destinados al aislamiento, cultivo y diferenciación de micobacterias.

Fundamento

Los nutrientes de este medio basal, más los aportados por el agregado de la mezcla de huevos, constituyen un rico soporte para el crecimiento de una gran variedad de micobacterias. El verde de malaquita inhibe a gran parte de la flora acompañante. Con el agregado de glicerina se estimula el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, aunque gran parte de *M. bovis* es inhibido. Agregando un 5% de NaCl, se pueden seleccionar micobacterias tolerantes a la sal, como es el caso de *M. smegmatis*.

| Fórmula (en gramos por litro) | | Instrucciones |
|-------------------------------|------|---|
| Fosfato monopotásico | 2.5 | Suspender 37,3 g del polvo en 600 ml de agua destilada y agregar 12 ml de glicerina. Calentar agitando continuamente y hervir un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C aproximadamente. Mezclar asépticamente un litro de huevo íntegro, evitando la formación de burbujas de aire y agregar al medio base. Mezclar el huevo y la base hasta uniformar. Distribuir en recipientes estériles adecuados y tapar herméticamente. Colocar los mismos en posición inclinada y coagular a 85-90°C durante 45 minutos. |
| Sulfato de magnesio | 0.24 | |
| Citrato de magnesio | 0.6 | |
| Aspargagina | 3.6 | |
| Harina de papa | 30.0 | |
| Verde de malaquita | 0.4 | |
| pH final: 4.8 ± 0.1 | | |

Siembra

Se recomienda, en procedimientos de rutina, inocular la muestra previamente decontaminada, sobre la superficie del medio de cultivo.

Incubación

A 35-37°C. A los 7 días de incubación, se observa por primera vez si hubo crecimiento. Luego, observar cada semana, hasta un total de 8 semanas.

Resultados

Observar las características morfológicas y la presencia o ausencia de pigmento en las colonias.

| Microorganismos | Crecimiento | Características de las colonias |
|----------------------------|-------------|--|
| Mycobacterium tuberculosis | Excelente | Grandes, secas, amarillentas, granulares |
| Mycobacterium avium | Excelente | Lisas, sin pigmentos |
| Mycobacterium gordonae | Excelente | Lisas |
| Mycobacterium bovis | --- | --- |

Medio preparado: verde pálido, opaco.



6. Bibliografía

- ✓ <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm>
- ✓ <http://claudiazambrano.wordpress.com/2011/05/25/medios-de-cultivo-solido-y-liquido/>
- ✓ http://perso.wanadoo.es/sergioram1/medios_de_cultivo.htm
- ✓ http://es.wikipedia.org/wiki/Agar_nutritivo
- ✓ <http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&hs=nnD&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=ejYdw5VNAhDxqM:&imgrefurl=http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/13/diagnosticola.htm&imgurl=http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/13/images/agar.jpg&w=327&h=221&ei=xCRHULuNMamo4gTL1YAY&zoom=1&iact=rc&dur=473&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=133&tbnw=161&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:2,s:0,i:19&tx=62&ty=85>
- ✓ http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&hs=CA&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=apELE9B8T9H_RM:&imgrefurl=http://www.dqtqjas.com/2006/07/11/algas-comestibles/&imgurl=http://www.dqtqjas.com/wp-content/uploads/2006/07/agar-agar.jpg&w=512&h=384&ei=MyVHUJHzNMv44QTM64G4DQ&zoom=1&iact=hc&vpx=113&vpy=156&dur=3638&hovh=194&hovw=259&tx=173&ty=97&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=148&tbnw=205&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73
- ✓ <http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&hs=7qD&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=aq5lzUp4PTZ5LM:&imgrefurl=http://microblog.me.uk/268&imgurl=http://microblog.me.uk/wp->

content/uploads/Agars_CLED.jpg&w=336&h=337&ei=kiVHUIv0OYS C4gTNgoD4Aw&zoom=1&iact=hc&vpx=475&vpy=142&dur=1066&hovh=225&hovw=224&tx=108&ty=120&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=151&tbnw=151&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:2,s:0,i:79

✓ <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/salmoshigagar.htm>

✓ http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=H221QiW7RMbaUM:&imgrefurl=http://iws2.collin.edu/dcain/CCCCD%2520Micro/salmonellashigella_plates.htm&imgurl=http://iws2.collin.edu/dcain/CCCCD%252520Micro/SS%252520plate.jpg&w=796&h=303&ei=ESdHUJqAM07R4QTAooDACg&zoom=1&iact=hc&vpx=736&vpy=130&dur=630&hovh=138&hovw=364&tx=214&ty=98&sig=105321012481154472983&page=2&tbnh=79&tbnw=207&start=10&ndsp=15&ved=1t:429,r:4,s:10,i:119

✓ http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&hs=xeY&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvns&tbnid=coSongo8e2Z8NmM:&imgrefurl=http://www.gefor.4t.com/bacteriologia/medios_de_cultivo.html&imgurl=http://www.gefor.4t.com/concurso/bacteriologia/agar_hektoen.jpg&w=327&h=314&ei=oydHUNfKC8yP4gTI6lGoBA&zoom=1&iact=hc&vpx=104&vpy=147&dur=1589&hovh=220&hovw=229&tx=134&ty=67&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=155&tbnw=157&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73

✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=7TjollLVJa-PavM:&imgrefurl=http://www.bioanalitica.com/product.php%3Fid_producto%3D3663&imgurl=http://www.bioanalitica.com/img/c/65-large.jpg&w=300&h=300&ei=DChHUNrwKMWA4gSXtIDQDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=270&vpy=145&dur=1223&hovh=225&hovw=225&tx

[=90&ty=119&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=157&tbnw=148&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:1,s:0,i:73](https://www.google.es/search?q=%EF%83%98%09C.P.S.+ID3.+:&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&um=1&ie=UTF-8&hl=es&tbn=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=idHUM7bOeWM4gTCqIGAAw&biw=1138&bih=520&sei=CChHUPjiFe7O4QTtulH4Bg#um=1&hl=es&client=firefox-a&rls=org.mozilla:es-ES%3Aofficial&tbn=isch&sa=1&q=Agar+Mueller-Hinton:+&og=Agar+Mueller-Hinton:+&gs_l=img.3..0i33i24i7.76524.79280.2.79631.2.2.0.0.0.0.123.241.0j2.2.0...0.0...1c.JnQpcPRWTKM&pbx=1&bav=on.2,or.r_gc.r_p_w.r_qf.&fp=27bc3684315f5aef&biw=1138&bih=520)

✓ https://www.google.es/search?q=%EF%83%98%09C.P.S.+ID3.+:&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&um=1&ie=UTF-8&hl=es&tbn=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=idHUM7bOeWM4gTCqIGAAw&biw=1138&bih=520&sei=CChHUPjiFe7O4QTtulH4Bg#um=1&hl=es&client=firefox-a&rls=org.mozilla:es-ES%3Aofficial&tbn=isch&sa=1&q=Agar+Mueller-Hinton:+&og=Agar+Mueller-Hinton:+&gs_l=img.3..0i33i24i7.76524.79280.2.79631.2.2.0.0.0.0.123.241.0j2.2.0...0.0...1c.JnQpcPRWTKM&pbx=1&bav=on.2,or.r_gc.r_p_w.r_qf.&fp=27bc3684315f5aef&biw=1138&bih=520

✓ <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20MUELLER%20HINTON.pdf>

✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&hs=uoY&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbn=isch&tbnid=ECxUtKeRTIWujM:&imgrefurl=http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/1574/3/Presentacion-de-un-caso-clinico.-Sepsis-por-Chromobacterium-violaceum&imgurl=http://www.portalesmedicos.com/imagenes/publicaciones/2/0906_sepsis_Chromobacterium_violaceum/hemocultivo_sucultivo_agar.jpg&w=287&h=259&ei=DCpHUNKxHsWA4gSXtIDQDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=112&vpy=153&dur=187&hovh=207&hovw=229&tx=93&ty=56&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=155&tbnw=173&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73

✓ http://es.wikipedia.org/wiki/Agar_manitol_salado

✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbn=isch&tbnid=33g0dN01Qxh0IM:&imgrefurl=http://85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/1_05469_0500.html&imgurl=http://85.238.144.18/analytics/Micro_Manual/TEDISdata/prods/4973-1_05469_0500-

[1.jpg&w=300&h=199&ei=YCtHUPeeLc764QTIw4DYDw&zoom=1&iact=hc&vpx=125&vpy=175&dur=972&hovh=159&hovw=240&tx=163&ty=33&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=151&tbnw=210&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73](http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=L8xM33YHPWopfM:&imgrefurl=http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/16C2DB9AC27A14E0C12574DE004DDB3D/%3Fopendocument%26LG%3DEN%26&imgurl=http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/16C2DB9AC27A14E0C12574DE004DDB3D/%2524file/BK055%252520-%252520BM067%252520-%252520BT005%252520-%252520Baird-Parker%252520RPF%252520-%252520Staphylococcus%252520aureus%252520d%2525C3%2525A9tour%2525C3%2525A9%252520copie.jpg&w=756&h=764&ei=wStHUOzaA6fk4QTo74C4Dw&zoom=1&iact=hc&vpx=103&vpy=145&dur=377&hovh=226&hovw=223&tx=156&ty=108&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=150&tbnw=148&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73)



http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvnsb&tbnid=L8xM33YHPWopfM:&imgrefurl=http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/16C2DB9AC27A14E0C12574DE004DDB3D/%3Fopendocument%26LG%3DEN%26&imgurl=http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/16C2DB9AC27A14E0C12574DE004DDB3D/%2524file/BK055%252520-%252520BM067%252520-%252520BT005%252520-%252520Baird-Parker%252520RPF%252520-%252520Staphylococcus%252520aureus%252520d%2525C3%2525A9tour%2525C3%2525A9%252520copie.jpg&w=756&h=764&ei=wStHUOzaA6fk4QTo74C4Dw&zoom=1&iact=hc&vpx=103&vpy=145&dur=377&hovh=226&hovw=223&tx=156&ty=108&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=150&tbnw=148&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73



http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=KWtKhASmAGtmIM:&imgrefurl=http://diferiatrabajo.blogspot.com/2010/02/medio-de-loeffler-medio-de-tindale.html&imgurl=http://4.bp.blogspot.com/_tKPi6CX3hIq/S3W791yBfYI/AAAAAAAAA8/PC4whxjOvgQ/s320/D3.bmp&w=320&h=308&ei=LCxHUPCbFZL74QTb8IGIBQ&zoom=1&iact=hc&vpx=101&vpy=152&dur=225&hovh=220&hovw=229&tx=140&ty=92&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=166&tbnw=150&start=0&ndsp=11&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73



<http://skhamp.wordpress.com/2011/03/30/agar-medio-de-kligler-uso-e-interpretacion/>

- ✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=owuDbVGKUU8hOM:&imgrefurl=http://www.marietta.edu/~spilatr/biol202/labresults/kligler.html&imgurl=http://www.marietta.edu/~spilatr/biol202/labresults/kligler_iron.jpg&w=1479&h=1058&ei=yS1HUI BM8Tb4QTj1ICgBA&zoo m=1&iact=hc&vpx=123&vpy=162&dur=754&hovh=190&hovw=266&t x=183&ty=110&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=155&t bnw=217&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:0,s:0,i:73
- ✓ <http://www.mcd.com.mx/pdfs/AGAR%20EOSINA%20Y%20AZUL%20DE%20METILENO.pdf>
- ✓ <http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=qmlfcElwf27JRM:&imgrefurl=http://superdinosaurioazul.blogspot.com/2011/11/especies-patogenas.html&imgurl=http://www.vgdusa.com/images/difco-biplate.jpg&w=252&h=252&ei=TC9HUKKcJMik4ATmjoEI&zoom=1&i act=hc&vpx=102&vpy=121&dur=420&hovh=201&hovw=201&tx=111 &ty=136&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=149&tbnw=1 25&start=0&ndsp=12&ved=1t:429,r:6,s:0,i:92>
- ✓ <http://www.buenastareas.com/ensayos/Agar-Cetrimida/994175.html>
- ✓ <http://precisionmicroslides.com/products/microslides/cet-mac-microslide>
- ✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=ICFbL8R2E4MZ-M:&imgrefurl=http://www.flickriver.com/photos/lange17/2138218228/&imgurl=http://farm3.static.flickr.com/2351/2138218228_6a6546a1e7.jp g&w=500&h=375&ei=rTFHULTiJMil0AXwuoC4Aw&zoom=1&iact=h c&vpx=314&vpy=157&dur=2555&hovh=194&hovw=259&tx=105&ty= 91&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=150&tbnw=182&st art=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:1,s:0,i:76

✓ http://www.google.es/imgres?hl=es&client=firefox-a&sa=X&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&prmd=imvns&tbnid=azN4L-AH-NoKwM:&imgrefurl=http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/jejuni.htm&imgurl=http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/jejuni_medium.jpg&w=433&h=440&ei=bjJHUPmZBKap0QXDuYCwBw&zoom=1&iact=hc&vpx=877&vpy=144&dur=2180&hovh=226&hovw=223&tx=117&ty=114&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=155&tbnw=158&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:4,s:0,i:85

✓ http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&hs=LQZ&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=ioVDQOoTv8CdFM:&imgrefurl=http://www.rapidmicrobiology.com/news/Show_News_List.php%3Fsector%3DAI%26m%3DJULY%25202008&imgurl=http://www.rapidmicrobiology.com/news/995h32p.JPG&w=250&h=254&ei=HTNHUNXrNIImV0QWZqoHICQ&zoom=1&iact=hc&vpx=717&vpy=128&dur=2566&hovh=203&hovw=200&tx=107&ty=87&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=153&tbnw=151&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:3,s:0,i:82

✓ <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lowesteinjensen.htm>

✓ <http://www.google.es/imgres?um=1&hl=es&client=firefox-a&sa=N&rls=org.mozilla:es-ES:official&biw=1138&bih=520&tbm=isch&tbnid=KGdaLxiyCmthkM:&imgrefurl=http://mikrobiologia.sote.hu/html/gyakszig/2-20a.htm&imgurl=http://mikrobiologia.sote.hu/images/aok/2/20a.jpg&w=423&h=602&ei=HjRHUMabJMXa0QWNIYGIDQ&zoom=1&iact=hc&vpx=364&vpy=127&dur=260&hovh=268&hovw=188&tx=137&ty=152&sig=105321012481154472983&page=1&tbnh=164&tbnw=127&start=0&ndsp=10&ved=1t:429,r:1,s:0,i:76>