

Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química

Bacteria, nutrition and growth: a look from chemistry

Liliana Caycedo Lozano¹, Lucía Constanza Corrales Ramírez², Diana Marcela Trujillo Suárez³

Resumen

La nutrición es un conjunto de procesos y reacciones mediante las cuales los seres vivos toman del medio, en el que habitan, las sustancias químicas que necesitan para crecer, multiplicarse y hacer uso de la energía.

Las sustancias mencionadas anteriormente, se denominan nutrientes y son utilizadas con dos fines: energéticos cuando se requieren para el mantenimiento y biosintéticos cuando se demandan para la síntesis de componentes (anabolismo)

En el primer caso (energéticos) las bacterias se dividen en litótrofas cuando hacen uso de sustancias inorgánicas simples como (SH_2 , S, NH_3 , NO_2^- , Fe, entre otras); y organótrofas cuando su requerimiento es de sustancias orgánicas (carbohidratos, hidrocarburos, lípidos, proteínas y alcoholes entre otras). En el segundo caso (biosintéticos), se pueden diferenciar en: autótrofas, cuando la síntesis la realizan a partir de sustancias inorgánicas simples (CO_2) y heterótrofas cuando su fuente de carbono es orgánica, pero también pueden utilizar otros elementos distintos al C, que pueden ser captados en forma inorgánica. Sean autótrofas o heterótrofas, todas las bacterias requieren de una serie de sustancias químicas, que se pueden clasificar en macronutrientes o micronutrientes de acuerdo con la cantidad que de estas se requieran.

Palabras claves: nutrición, metabolismo, crecimiento, cultivo.

1. Docente, Programa de Ciencias Básicas. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Número de certificación CvLAC 0000660221
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9274-3148>.

2. Docente, Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Número de certificación CvLAC 000048264120121119123
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2398-348X>

3. Coordinadora de Laboratorio Sociedad Médica de Ortopedia y Accidentes Laborales-Clinica de Ortopedia y Accidentes Laborales COAL.
Número de certificación CvLAC 0001355381
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9462-0339>

Correo electrónico de correspondencia: lcaycedo@unicolmayor.edu.co

Abstract

Nutrition is a set of processes and reactions by which living beings take from the environment, in which they inhabit, the chemical substances they need to grow, multiply and make use of energy.

The aforementioned substances are called nutrients and are used for two purposes: energetic when required for maintenance and biosynthetics when required for the synthesis of components (anabolism).

In the first case (energetic) the bacteria are divided into lithotrophs when they make use of simple inorganic substances such as (SH_2 , S, NH_3 , NO_2^- , Fe, among others); and organotrophs when their requirement is for organic substances (carbohydrates, hydrocarbons, lipids, proteins and alcohols, among others). In the second case (biosynthetics), they can be differentiated into: autotrophs, when the synthesis is carried out from simple inorganic substances (CO_2) and heterotrophs when their carbon source is organic, but they can also use other elements than C, which they can be captured in inorganic form. Whether autotrophic or heterotrophic, all bacteria require a series of chemical substances, which can be classified into macronutrients or micronutrients according to the amount of these required of these substances that are required.

Keywords: nutrition, metabolism, growth, culture.

Introducción

Los avances en microbiología se deben en gran medida a la observación de fenómenos macroscópicos como, por ejemplo, la transformación que ocurre en los alimentos (en la que se arruinan las condiciones orgánolépticas de los mismos); en los anteriores cambios se infiere que los microorganismos hacen parte del ambiente natural. Uno de los aportes más interesantes para descifrar estos fenómenos ha sido el descubrimiento y la optimización de las condiciones para

el cultivo de los microorganismos. El primer medio de cultivo artificial líquido fue creado por Louis Pasteur en 1860, resaltando la importancia de las necesidades nutricionales de los microorganismos, los cuales debían ser proveídos en medios de cultivo para su aislamiento. El desarrollo del primer medio de cultivo sólido de Koch marcó el inicio, procesos infecciosos en humanos y animales de la evolución de los medios de cultivo bacteriano, en él se logró observar el crecimiento bacteriano en sustancias alimenticias preparadas en el laboratorio,

lo cual permitió observar el crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) que se les denomina **Cultivo**, los cuales presentan variedad de características.

El principal agente gelificante utilizado en medios de cultivo sólidos es el agar. Sin embargo, se han observado algunos límites en el uso de este, debido, a que algunas bacterias extremadamente sensibles al oxígeno no crecen en medios de agar, por lo que se propusieron y probaron otras alternativas; luego, el descubrimiento de agentes antimicrobianos y sus objetivos específicos provocó la aparición de medios selectivos. (1)

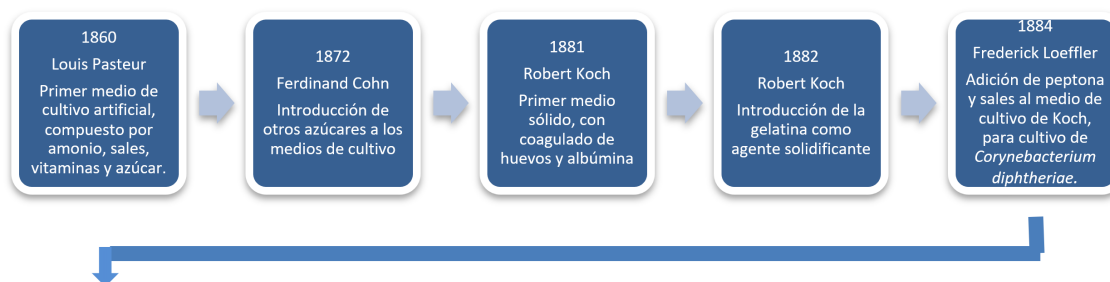
El medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones para que las bacterias se mantengan vivas y se desarrollen, factores como la naturaleza, el origen, las interacciones y el metabolismo bacteriano condicionan el tipo y composición del medio de cultivo. Sin embargo, son muchas las especies bacterianas que existen en la naturaleza que aún no son cultivables “in vitro”, esto se debe a dificultades tales como: ser microorganismos parásitos de otros; imposibilidad de reproducir las condiciones de

su ecoambiente natural; desconocimiento de los requerimientos específicos nutricionales, y, a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir (casos de simbiosis). Se estima que sólo alrededor del 1% de las bacterias del suelo y del 0,01 al 0,1 % de las bacterias marinas son cultivables.

En la composición de los medios de cultivo se encuentran sustancias químicas que proporcionan enriquecimiento como carbohidratos, suero, sangre completa, bilis, aminoácidos y vitaminas, entre otros.

Como agente solidificante de los medios de cultivo se utiliza el agar, este se licúa completamente a la temperatura de la ebullición del agua y se solidifica por debajo de 40°C. En general, no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es utilizado dentro de su metabolismo; la gelatina es otro agente solidificante, sin embargo, se emplea mucho menos ya que algunas bacterias provocan su licuefacción y en este caso se utiliza más como prueba de identificación.

Figura 1. Evolución de los medios de cultivo: desde el primer cultivo bacteriano (1860) hasta la culturómica, en la Tatacoa (Colombia).





Fuente: Autores.

Después de la aparición de técnicas moleculares en la década de 1970, como la PCR, la secuenciación y más particularmente la metagenómica, los microbiólogos han favorecido estas técnicas innovadoras en detrimento de la cultura. Sin embargo, la metagenómica presenta ciertas desventajas y en particular, un sesgo de profundidad, debido a la falta de sensibilidad de los cebadores utilizados, ya que no detecta bacterias presentes en concentraciones $<10^5$ bacterias por gramo de heces (2). Hace unos años, se desarrolló una nueva técnica de cultivo que utiliza una cantidad de medios y condiciones para extender el repertorio de bacterias (2); esta técnica demuestra la complementariedad entre metagenómica y culturómica. Por lo tanto, la identificación metagenómica de especies bacterianas existentes en una microbiota dada, puede ser explotada por la culturómica a través de la optimización de nuevos medios de cultivo específicos para el aislamiento de estas especies. Esta complementariedad permite que el culturismo se convierta en una técnica dirigida (1).

Requerimientos nutricionales y medios de cultivo

Para crecer, las bacterias necesitan un mínimo de nutrientes: agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales (3).

Se denomina cultivo puro o axénico al que contiene sólo un tipo de microorganismo,

éstos se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos provengan del mismo linaje. Los cultivos puros son esenciales para estudiar las características metabólicas e identificarlos. (4)

Nutrición bacteriana

Como nutrición se denomina al conjunto de procesos por los cuales los seres vivos toman del medio las sustancias que necesitan para su desarrollo (nutrientes) que requieren para su catabolismo (mantenimiento) y su anabolismo (crecimiento). De igual forma, las bacterias también realizan biosíntesis de nuevos compuestos celulares, que demandan energía procedente del medio ambiente. (4)

De acuerdo con la forma como las bacterias obtienen la energía, se clasifican en: **Quimiótrofas**, cuando la obtienen de sustancias orgánicas y **Fotótrofas**, cuando la obtienen de la luz. (5), mientras que, dependiendo de la ganancia energética, se clasifican en: **Litótrofas** (del griego *lithos* = piedra), cuando requieren sustancias inorgánicas como ácido sulfhídrico (H_2S), azufre elemental (S), amoníaco (NH_3), ion nitrito (NO_2^-), Hierro (Fe), entre otros y Organótrofas, las que requieren compuestos orgánicos como carbohidratos, hidrocarburos, lípidos y proteínas, entre otros. (4,5)

Los procesos biosintéticos, que le permiten suplir las necesidades de crecimiento

(plásticas) a las bacterias se dividen en dos grupos:

1. Por la utilización del carbono se clasifican en:
 - **Autótrofas:** las que crecen sintetizando sus materiales orgánicos a partir de sustancias inorgánicas tales como el CO_2 .
 - **Heterótrofas:** la fuente de carbono es orgánica, una de las más utilizadas, es el monosacárido Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).
 - **Mixótrofas:** son aquellas que pueden pasar de estadios autotróficos a heterotróficos y viceversa de acuerdo, a las condiciones en que se encuentren.
2. Por los requerimientos nutricionales se clasifican en:
 - **Auxótrofas,** cuando se comportan de manera exigente frente a algún requerimiento nutricional exógeno, generalmente por mutación genética.

- **Protótrofas,** cuando no son exigentes y se autoabastecen (4).

Las bacterias reaccionan con una serie de elementos químicos, y de acuerdo con las cantidades en que son requeridos se encuentran macronutrientes como C, H, O, N, P, S, K, Mg y **micronutrientes** como Co, Cu, Zn y Mo, los cuales se encuentran combinados en la naturaleza, formando parte de sustancias orgánicas y/o inorgánicas (3,6,7).

En las diferentes reacciones en las que intervienen, los elementos anotados anteriormente, forman iones que les permiten aumentar su estabilidad química y transportar electrones. La formación de iones positivos (cationes) o negativos (aniones) depende directamente de la configuración electrónica del elemento en estado basal y del carácter metálico del mismo. (8)

Tabla 1. Configuración electrónica y carácter metálico de algunos elementos implicados en la Nutrición Bacteriana.

Símbolo del elemento	Nombre	Configuración electrónica en su estado basal	Carácter Metálico
H	Hidrogeno	$1s^1$	No metal
C	Carbono	$[\text{He}] 2s^2 2p^2$	No metal
O	Oxígeno	$[\text{He}] 2s^2 2p^4$	No metal
N	Nitrógeno	$[\text{He}] 2s^2 2p^3$	No metal
P	Fósforo	$[\text{He}] 2s^2 2p^6 3s^2 3p^3$	No metal
S	Azufre	$[\text{Ne}] 3s^2 3p^4$	No metal

Símbolo del elemento	Nombre	Configuración electrónica en su estado basal	Carácter Metálico
K	Potasio	[Ar] 4s ¹	Metal
Mg	Magnesio	[Ne] 3s ²	Metal
Co	Cobalto	[Ar] 3d ⁷ 4s ²	Metal
Cu	Cobre	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ¹	Metal
Zn	Zinc	[Ar] 3d ¹⁰ 4s ²	Metal
Mo	Molibdeno	[Kr] 4d ⁵ 5s ¹	Metal

Fuente: Autores.

Así mismo, algunos de los nutrientes son incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares; otros, sólo se utilizan para la producción de energía, y no se incorporan directamente como material celular; y finalmente, unos pocos, pueden ejercer ambos roles.

Las bacterias heterótrofas, aunque no usan el CO₂ como fuente de Carbono ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para realizar reacciones de carboxilación en procesos anabólicos y catabólicos. Las reacciones de carboxilación se caracterizan químicamente, por hacer uso de las moléculas de CO₂ como reactivos para producir moléculas más complejas. (9)

Como se estableció anteriormente, la principal fuente de carbono inorgánica (**exógena**), para las bacterias, es el dióxido de carbono (CO₂); y las fuentes (**endógenas**)

orgánicas pueden ser azúcares y alcoholes. (10, 11). Así, el carbono es el elemento constituyente más abundante en las bacterias y, por tanto, dichos microorganismos producen, a su vez, biomoléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos.

Normalmente, las bacterias crecen a la concentración de CO₂ atmosférico (0.03%). De tal forma que, la composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo y por ende en la producción de metabolitos primarios y secundarios (12).

Tabla 2. Propiedades y Funciones de Macronutrientes.

Nutriente/ Fórmulas y Símbolos	Propiedades Generales	Función
Agua H_2O	El agua es un compuesto covalente polar. El gran dipolo presente en esta molécula explica muchas de sus propiedades, especialmente su acción como solvente y la formación de puentes de hidrógeno.	Las bacterias necesitan grandes cantidades de agua, es el principal constituyente del protoplasto bacteriano y es el medio donde ocurren las reacciones biológicas. La fuente de agua puede ser: endógena que procede de los procesos de óxido-reducción y exógena (la más importante) que procede del medio y se difunde a través de las membranas. El a_w corresponde a la actividad del agua, relacionada con las concentraciones de solutos (Sales inorgánicas en especial cloruro de sodio (NaCl) e Hidratos de Carbono) en los procesos osmóticos del transporte celular.
Dióxido de Carbono CO_2	El Dióxido de carbono corresponde a un compuesto covalente inorgánico, cuyo dipolo es igual a cero por lo tanto es una molécula apolar.	El dióxido de carbono es requerido por todo tipo de bacterias, las autótrofas lo requieren como fuente de carbono, y lo reducen usando la luz como fuente de energía (en el caso de las fotoautótrofas) u oxidaciones de determinadas sustancias inorgánicas (en el caso de las quimioautótrofas). Las arqueobacterias metanogénicas pueden usar el CO_2 como fuente de carbono e H_2 como proveedor de energía y a partir de los dos procesos se obtiene metano. Las heterótrofas, aunque no usan el CO_2 como fuente de carbono ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para realizar reacciones de carboxilación en procesos anabólicos y catabólicos.
Nitrógeno y Azufre N_2 y S	El nitrógeno a condiciones normales se encuentra en su forma estable molecular; los dos átomos del mismo elemento se unen por tres enlaces covalentes que originan una molécula covalente apolar. El azufre es un elemento no metálico que interviene en la formación de aniones.	Se encuentran en la célula en estado reducido. El nitrógeno hace parte del radical amino (NH_2^-), que se encuentra en los aminoácidos y las bases nitrogenadas; el radical sulfhidrilo ($-SH$) interviene en la formación de algunos aminoácidos (metionina, cisteína) y en coenzimas como la Acetil (CoA). Gran parte de las bacterias fotosintéticas y muchas de las heterótrofas asimilan estos elementos en forma combinada inorgánica y oxidada: como NO_3^- , por la acción de la nitrato- reductasa y nitrito- reductasa asimilatorias del nitrógeno. El sulfato (SO_4^{2-}) se activa con ATP, y luego se reduce hasta sulfito (SO_3^{2-}) y finalmente a anión sulfhidrilo (SH^-), que ya tiene el estado de reducción (-2) adecuado para la incorporación del azufre (S) elemental.
Sodio Na	El sodio es un elemento metálico perteneciente a los elementos alcalinos del grupo IA de la tabla periódica, por lo tanto, tiende a formar cationes con carga +1.	Requerido por las bacterias como ión sodio (Na^+). Según la preferencia de los microorganismos por este elemento se clasifican en: halófilos , aquellos que necesitan el Na^+ para crecer óptimamente como en las concentraciones de sodio en el agua de mar, éstos a su vez se dividen en <i>moderadamente halófilos</i> los cuales requieren de 6 a 15 % de NaCl (<i>Vibrio fischeri</i>), <i>discretamente halófilos</i> para los que requieren del 1 a 6% de NaCl y <i>halófilos extremos</i> cuando requieren entre 15 – 30% de NaCl. (<i>Halobacterium salinarium</i>). Otro grupo son los Halotolerantes , al que pertenecen los microorganismos que pueden soportar bajas concentraciones de NaCl en el medio ambiente, sin que se reduzca significativamente la actividad del agua (<i>Staphylococcus aureus</i>).

Nutriente/ Fórmulas y Símbolos	Propiedades Generales	Función
Fósforo P	El fósforo es un elemento no metálico, el cual hace parte de un gran número de moléculas altamente energéticas. Por sus características químicas corresponde a un no metal que tiende a formar aniones de carga -3 .	Se encuentra en forma de sales como fosfatos orgánicos o inorgánicos. Las bacterias que pueden usar los fosfatos orgánicos a través de enzimas (fosfatasa - fitasa) no dependen absolutamente de ellos, pueden recurrir igualmente a los fosfatos inorgánicos. El fósforo es utilizado principalmente en la síntesis de macromoléculas como los ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas y proteínas.
Sales minerales M (NM)Ox (sales oxácidas) M NM (sales hidrácidas)	Estos dos tipos de compuestos iónicos neutros, intervienen como fuente simultánea de aniones y cationes debido a la presencia en la misma molécula de elementos metálicos y no metálicos.	Se constituyen en fuente de aniones tales como cloruro (Cl^-) y de cationes como (Na^+) para la célula.
Catión proveniente del potasio (K) K^{+1}	El potasio, al igual que el Na, es un metal alcalino altamente reactivo por lo tanto alcanza la estabilidad química por la formación de cationes con carga $+1$.	Interviene en la activación de enzimas, participa en la síntesis de proteínas. En las bacterias Gram positivas está asociado con los ácidos teicoicos de la pared.
Catión procedente del magnesio (Mg) Mg^{+2}	El magnesio es un metal alcalinotérreo, el cual preferencialmente forma cationes con carga $+2$.	Interviene en la funcionalidad de ribosomas, membranas y ácidos nucleicos; se desempeña como cofactor en muchas reacciones, especialmente las que implican transferencia de grupos fosfato (PO_4^{-3}), por ejemplo, en las reacciones que requieren ATP. Igualmente, el Mg^{+2} interviene en procesos enzimáticos y es componente de las clorofilas y bacterioclorofilas de bacterias fotosintéticas.
Catión procedente del calcio (Ca) Ca^{+2}	El calcio es un metal alcalinotérreo, el cual preferencialmente forma cationes con carga $+2$.	Actúa en reacciones enzimáticas como cofactor de proteinasas, estabiliza la pared bacteriana, ayuda en la termorresistencia de la endospora bacteriana.
Cationes ferroso y férrico procedentes del hierro (Fe) Fe^{+2} y Fe^{+3}	El hierro posee la propiedad de alcanzar, mediante la formación de cationes, estados que a su vez permiten el transporte electrónico dependiendo del medio en el que se encuentren.	Generalmente se encuentra formando complejos en la naturaleza, como sales insolubles. Algunas bacterias disponen de una serie de moléculas, denominadas sideróforos, capaces de captar el hierro y que, además, constituye un factor de virulencia. El hierro, hace parte de muchas moléculas implicadas en procesos de respiración, como citocromos y ferroproteínas no hémicas (proteínas con Fe-S); interviene como cofactor en la función de ciertas enzimas (catalasas, peroxidasa, nitrogenasa y oxigenasa). Forma parte de los magnetosomas, de los cuales depende el comportamiento magnetotáctico capacidad de orientarse en el campo magnético de ciertas bacterias. Se encuentra bajo la forma de magnetita óxido de hierro ferromagnético (Fe_3O_4), pirita (FeS_2) y aggreiguita (Fe_3S_4).

M: Elemento Metálico

NM: Elemento no metálico.

Fuente: Autores.

Las propiedades que tienen las bacterias de metabolizar elementos y compuestos les ha conferido el uso de ser inoculantes biológicos en sistemas agrícolas, en los cuales favorece el desarrollo de las plantas, mediante diferentes mecanismos, tales como la fijación de nitrógeno, inducción de resistencia frente a patógenos, promoción de rizogéne-

sis y síntesis de fitohormonas estimuladoras del crecimiento vegetal, como el ácido indol acético (AIA); dentro de los géneros reportados como promotores del crecimiento vegetal (PGPR) se encuentran *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp.*, entre otros (13). Otros tipos de actividades promotoras del crecimiento vegetal,

asociadas a la disponibilidad de P en el suelo, son la solubilización ácida del P inorgánico y la mineralización del P orgánico. La solubilización de los compuestos inorgánicos insolubles como los fosfatos de calcio, se lleva a cabo por la producción de ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido 2-cetoglucónico, ácido glicólico, oxálico, malóni-

co y succínico), productos del catabolismo microbiano, y la consecuente sustitución del Ca^{++} . (14, 15).

Los micronutrientes o elementos traza, son aquellos que las bacterias necesitan en pequeñas cantidades, denominados también oligoelementos.

Tabla 3. Propiedades y Funciones de los Micronutrientes.

Nutriente/ Fórmulas y símbolos	Propiedades Generales	Función
Manganeso Mn	El Manganeso es un metal de transición que cuenta con múltiples estados de oxidación que le permiten actuar como agente oxidante o reductor.	Cofactor de ciertas enzimas y a veces puede sustituir al Mg^{+2} , presente en algunas superóxido dismutasas o en la enzima que rompe el agua del fotosistema II, en los fotótrofos oxigénicos.
Cobalto Co	El Cobalto es un metal de transición que forma compuestos estables especialmente con los estados de oxidación $+2$ y $+3$.	Se requiere casi exclusivamente para la síntesis de la vitamina B12. (si se suministra esta vitamina al medio, la bacteria se vuelve independiente del cobalto libre). También tiene funcionabilidad en las transcarboxilasas (bacterias del ácido propiónico).
Zinc Zn	El zinc es un metal de transición por su ubicación en la tabla periódica; sin embargo, tiene propiedades semejantes a algunos elementos alcalino térreos (Grupo II A), debido a que cuenta con los orbitales s y d llenos. Su estado de oxidación preferente es $+2$.	Interviene en la estabilización de complejos enzimáticos como las ADN y ARN polimerasas, presente en las enzimas anhidrasa carbónica, y alcohol deshidrogenasa.
Molibdeno Mo	El molibdeno es un metal de transición que cuenta con varios estados de oxidación; siendo el más común el $+4$.	Interviene en la síntesis de las molibdoflavoproteínas, implicadas en la asimilación de nitratos. Igualmente, participa como cofactor, junto con el Fe, en el complejo nitrogenasa de las bacterias fijadoras de N_2 atmosférico (nitrogenasa y nitrato reductasa y sulfito oxidasa, algún formato deshidrogenadas y oxotransferasas).
Níquel Ni	Es un metal de transición. Su estado de oxidación más común es $+2$; pero adicionalmente, puede trabajar con estados: 0, $+1$ y $+3$. En las hidrógenasas cumple un papel fundamental como agente oxidante.	Participa en la mayoría de las funciones de las hidrogenasas, coenzima F_{430} de los metágenos y en las deshidrogenadas del monóxido de carbono y ureasa.
Selenio Se	El selenio es un elemento considerado no metal; presenta varias formas alotrópicas y tiene como estados de oxidación: $+/- 2, 4, 6$.	Se encuentra en enzimas como la formato deshidrogenasa y el aminoácido selenocisteína.
Tungsteno o Wolframio W	Es un metal de transición que trabaja con estados de oxidación positivos y que da lugar en algunas ocasiones a compuestos débilmente ácidos.	Forma parte de las formato deshidrogenadas y oxotransferasas de los microorganismos hipertermófilos.
Vanadio V	El vanadio es un metal que forma cationes en especial con estado de oxidación $+5$.	Hace parte de las enzimas vanadio nitrogenasa y bromoperoxidasa. Algunas veces los microorganismos por mutaciones, son incapaces de elaborar sustancias esenciales para su desarrollo, convirtiéndose así, en microorganismos auxotróficos con respecto a esa sustancia.

Fuente: Autores.

De otro lado, se encuentran los **Factores de crecimiento**, que se refieren a moléculas específicas que algunas bacterias requieren en muy pequeña cantidad para crecer. Suelen ser coenzimas o sus precursores, como vitaminas, que determinadas bacterias no pueden sintetizar por sí mismas, al carecer en parte o totalmente de una ruta biosintética. Igualmente, en este grupo se incluyen algunos aminoácidos y las bases nitrogenadas purinas y pirimidinas, como, por ejemplo, las bacterias del género *Brucella* que requieren como factores de crecimiento en sus medios de cultivo la biotina, niacina, tiamina y ácido pantoténico. *Haemophilus* necesita como suplementos nutricionales los grupos hemo y nicotinamida adenina dinucleótido (Factor X y Factor V) (16).

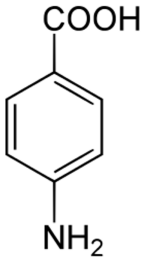
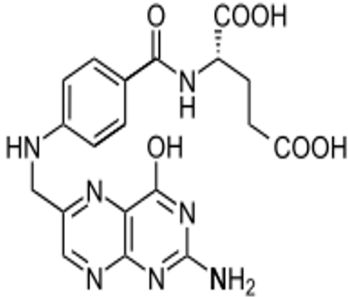
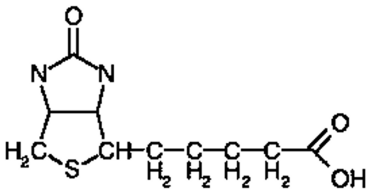
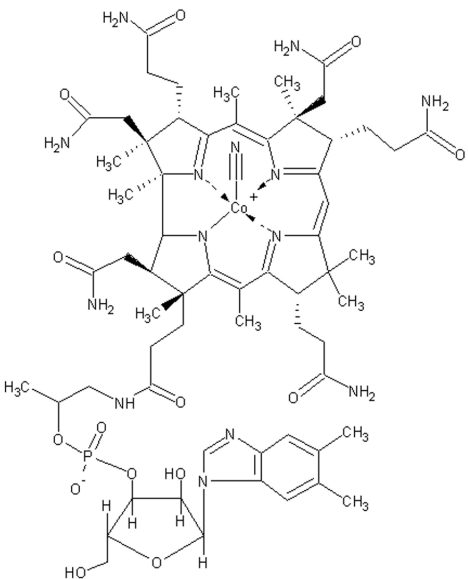
El *Faecalibacterium prausnitzii*, por ejemplo, requiere una gran cantidad de vitaminas para crecer, como biotina, ácido fólico, riboflavina o vitamina B12, que no puede sintetizar, así como otros factores de crecimiento como los ácidos grasos volátiles (ácido acético, ácido propiónico o ácido valérico) (17). Dunn y colaboradores, mostraron en 1946, que solo dos aminoácidos eran esenciales para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, ácido glutámico y valina, mientras que para el crecimiento de *Lactobacillus brevis*, se requerían al menos 15 aminoácidos (18). Este alto requerimiento de aminoácidos puede explicarse por el hecho de que el medio base utilizado en ese momento no era rico en nutrientes comunes. De hecho, hoy en día, *Lactobacillus brevis* crece en un agar COS (Columbia

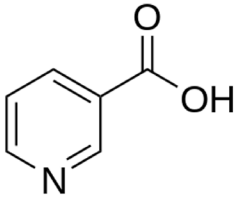
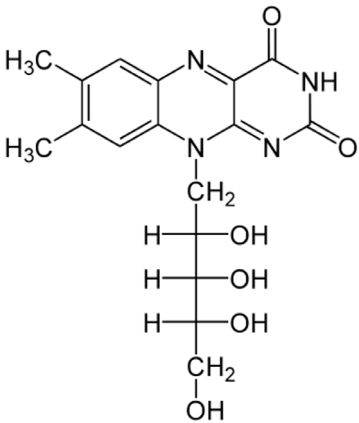
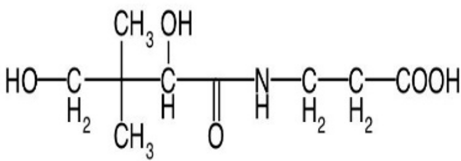
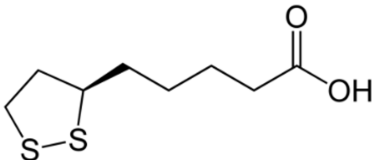
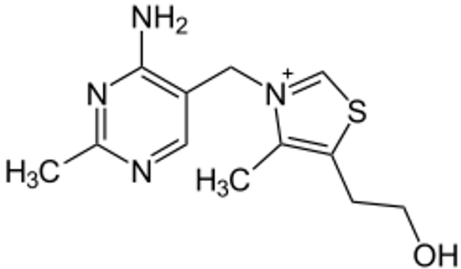
Blood Agar) (Biomérieux, Marcy l'Étoile, Francia), no suplementado con aminoácidos, pero compuesto de hidrolizado de caseína y peptona proteosa, fuentes importantes de aminoácidos (19).

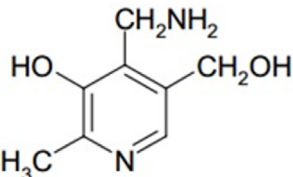
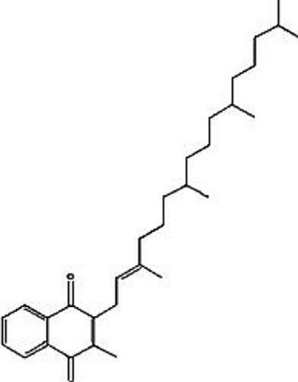
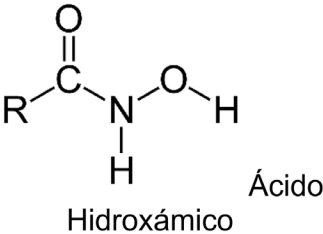
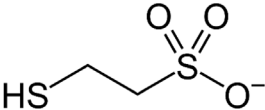
En los aminoácidos que conforman las proteínas, las cadenas laterales pueden estar ordenadas en sentido horario o antihorario – orientaciones que los químicos llaman “D” y “L” –, encontrándose casi siempre en la forma L. Al respecto, Matthew Waldor, y sus colegas encontraron que ciertas bacterias convierten aminoácidos específicos en formas D cuando necesitan retardar su crecimiento (20).

Las bases de purina y pirimidina, son necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos, de hecho, algunas bacterias del ácido láctico necesitan adenina, guanina, timina o uracilo para crecer. Este es el caso en particular de *Leuconostoc mesenteroides*, para la cual la guanina es esencial en su desarrollo (21).

Tabla 4. Factores de crecimiento Bacteriano.

Factor	Fórmula	Función
Ácido p-aminobenzoico (PABA) Ácido 4-amino benzoico $C_7H_7NO_2$		Precursor del ácido fólico, el cual es indispensable para el desarrollo de la bacteria y sobre el cual tienen efecto algunos antibióticos.
Ácido fólico Vitamina B9 $C_{19}H_{19}N_7O_6$		Interviene en el metabolismo de compuestos de un C del anillo bencénico del ácido ocasionando la transferencia de grupos metil.
Biotina Vitamina H o Vitamina B7 $C_{10}H_{16}N_2O_3S$		Biosíntesis de ácidos grasos; promoviendo betadecarboxilaciones; fijación de CO_2
Cobalamina Vitamina B12 $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$		Interviene en reacciones de reducción y transferencia de restos monocarbonados; síntesis de desoxirribosa.

Factor	Fórmula	Función
Niacina ácido nicotínico $C_6H_5NO_2$		Precursor del cofactor NAD; para la transferencia de cargas en las reacciones Redox.
Riboflavina Vitamina B2 $C_{17}H_{20}N_4O_6$		Precursor de los cofactores FAD y FMN
Ácido pantoténico Vitamina B5 $C_9H_{17}NO_5$		Precursor de la CoA, Tiamina (vitamina B1). Interviene en reacciones de Descarboxilación de compuestos como transcetolasas, vitamina B6 (piridoxal, piridoxamina). Así como en Transformaciones de aminoácidos y cetoácidos de los grupos de la Vitamina K y quinonas. Transportadores de electrones (ubiquinonas).
Ácido lipoico 6,8-ácido tiótico $C_8H_{14}O_2S_2$		Promueve la transferencia de grupos acilo en la descarboxilación del piruvato y cetoglutarato.
Tiamina vitamina B1 $C_{12}H_{17}N_4OS$		Actúa como coenzima en procesos de descarboxilaciones y función de transcetolasa

Factor	Fórmula	Función
Vitamina B6 $C_8H_{11}NO_3$ (Grupo piridoxal – piridoxamina; derivados del fosfato de piridoxal)		Actúa como coenzima en la transformación de aminoácidos y cetoácidos.
Grupo Vitamina K ; quinonas		Transporte de electrones, síntesis de esfingolípidos.
Hidroxamatos; esteres del ácido hidroxámico		Compuestos que unen hierro, solubilización del hierro y transporte al interior celular
Coenzima M (CoM); anión sulfonato		Requerido por ciertos metanógenos, participa en la metanogénesis.

Fuente: Autores.

Crecimiento Bacteriano

Se define como crecimiento de cualquier sistema biológico al aumento de la masa celular que implica su multiplicación (22). En organismos unicelulares que se dividen por fisión o por gemación, lo que ocurre es un aumento de la población. El crecimen-

to bacteriano se puede observar desde dos puntos de vista: a escala individual y a escala poblacional.

A escala individual, incluye una serie de procesos que hacen referencia al ciclo celular, en los cuales se encuentran: inicio y transcurso de la replicación cromosómica y de los plásmidos; segregación del cromoso-

ma y los plásmidos a las células hijas; síntesis de precursores de membranas y pared celular y señales que coordinan la replicación genómica con la división celular (23). Por su parte, el crecimiento a nivel poblacional incluye: la cinética de crecimiento; factores que afectan el tiempo de generación y los factores ambientales que limitan el crecimiento (24).

Métodos para la cuantificación del crecimiento bacteriano

1. Por la medida del consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito en particular por unidad de tiempo. En este caso el consumo de oxígeno (QO_2) y consumo de gas carbónico (QCO_2), se determinan por el respirómetro de Warburg o mediante la producción de ácidos.

2. Por métodos turbidimétricos, el fundamento de estos métodos radica en la interacción de la luz con un cultivo bacteriano. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula “relativamente” pequeña suspendida en agua, por lo tanto, dicha dispersión es proporcional a la masa del cultivo. Esta medición se puede realizar con dos tipos de equipos.

- Espectrofotómetro: mide la densidad óptica (D.O.), es decir la absorbancia. En esta técnica hay que realizar una curva estándar para relacionar los valores de A (absorbancia) con la masa bacteriana en la muestra problema.

- Nefelómetro: difiere del espectrofotómetro en cuanto a que su dispositivo sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente y lo que mide es la luz dispersada directamente por la preparación, esto le otorga mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.
- Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser; para que la medida sea correcta, es necesario que la densidad de células sea del orden de 10^5 por ml.
- Recuento de viables: se realiza sembrando un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman, ya que cada una de estas deriva de una célula aislada; para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC. En ciertas ocasiones, en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de $0.2 \mu m$ de tamaño de poro), la cual se coloca en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

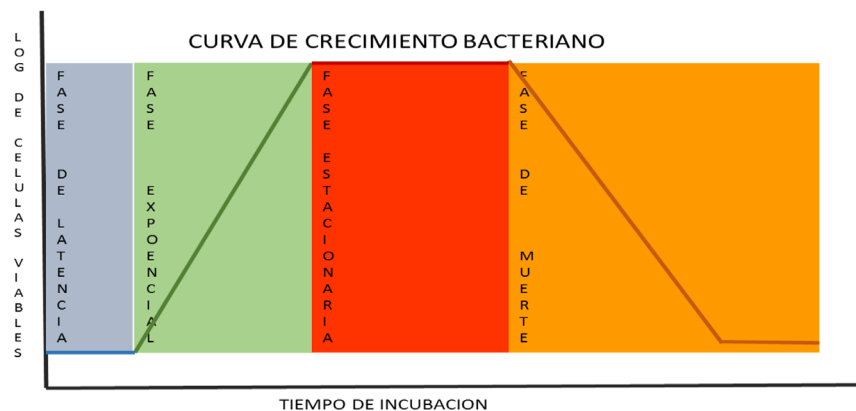
- Medida del número de partículas: En este método se utilizan contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero pueden dar una idea del tamaño de las partículas.
- Medida de parámetros bioquímicos: en este caso pueden ser la cantidad de ADN, ARN, proteínas o peptidoglicano, entre otros por unidad de volumen de cultivo (25, 26, 27, 28).
- Fase exponencial o logarítmica: Tanto la velocidad de crecimiento como el consumo de nutrientes son máximos, las bacterias tienen un tiempo de generación mínimo y corresponde a la fase de infección y multiplicación del agente infeccioso dentro del organismo.
- Fase estacionaria: No se incrementa el número de bacterias y estas presentan un metabolismo diferente al de la fase exponencial; se observa acumulación y liberación de metabolitos secundarios que tienen importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones. Esta fase sucede porque se agotan uno o varios nutrientes esenciales en el medio, bien ser porque, los productos de desecho liberados en la fase de crecimiento exponencial convierten el medio en inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores que limitan su crecimiento

Ciclo de Crecimiento de Poblaciones.

En un medio líquido se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución del crecimiento bacteriano:

- Fase de adaptación: Las bacterias acomodan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales y de nutrientes para iniciar el crecimiento exponencial.
- Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo (29, 30).

Figura 2. Curva de crecimiento Bacteriano.



Fuente: L. Corrales.

Factores condicionantes del desarrollo bacteriano

Las bacterias se encuentran en la naturaleza en constante interrelación con otros organismos vivos y de esta interacción incide en su desarrollo. Por ejemplo, las bacterias endofíticas, las cuales son, bacterias beneficiosas para las plantas que prosperan dentro de ellas y pueden mejorar su crecimiento; esto se puede relacionar con una mejor absorción de nutrientes que regula el crecimiento y la síntesis de fitohormonas relacionadas con el estrés (31).

Temperatura: Para cada microorganismo existe una temperatura de crecimiento adecuada; en este sentido, se observa una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento, a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento hasta que se alcanza la temperatura óptima y por encima de esta, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

El incremento de la velocidad de crecimiento en relación con el aumento de la temperatura se debe al incremento de la velocidad de las reacciones enzimáticas; mientras que, el crecimiento escaso o nulo a temperaturas bajas en relación con la óptima, se debe a la reducción de la velocidad de reacción enzimática y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos (32). Así mismo, la muerte ocurre a altas temperaturas debido a la desnaturalización de las proteínas y también a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que, a temperaturas bajas, el metabolismo celular se enlentece y las células paran de crecer, pero no mueren y pueden recuperar su capacidad de división si aumenta posteriormente la temperatura; lo que no ocurre en el caso contrario de altas temperaturas donde los microorganismos mueren, lo que permite esterilizar por calor y no por frío.

Tabla 5. Clasificación Bacteriana de acuerdo con las temperaturas Cardinales para su desarrollo.

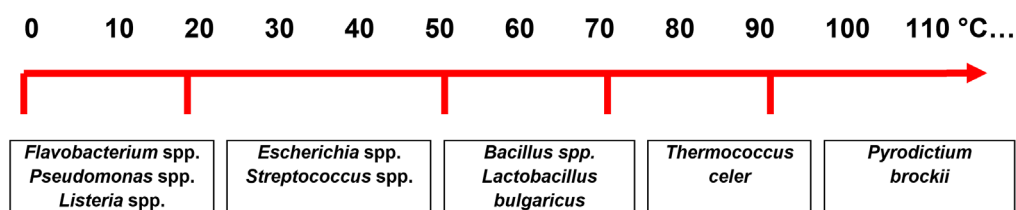
CLASIFICACIÓN	T. MÍNIMA	T. ÓPTIMA	T. MÁXIMA
PSICROTROFOS O PSICROTOLERANTES	-5 °C	0 °C	35 °C
PSICRÓFILA	0 °C	12 – 15 °C	20°C
MESÓFILA	20°C	35 – 37°C	42°C
TERMÓFILA	42°C	56°C	80°C
HIPERTERMÓFILA	60°C	80 °C	Más de 110 °C
TERMÓTROFOS	15 – 20 °C	30 – 40 °C	45 – 50 °C

Fuente: Tomado de Conceptos Básicos de Microbiología.

Los microorganismos implicados en la generación de infecciones son los mesófilos y algunos psicrotrofos, sus temperaturas óptimas de crecimiento coinciden con las

corporales; estas bacterias, pueden producir además toxinas que causan intoxicaciones alimentarias (33).

Figura 3. Rangos de temperatura en el crecimiento bacteriano.



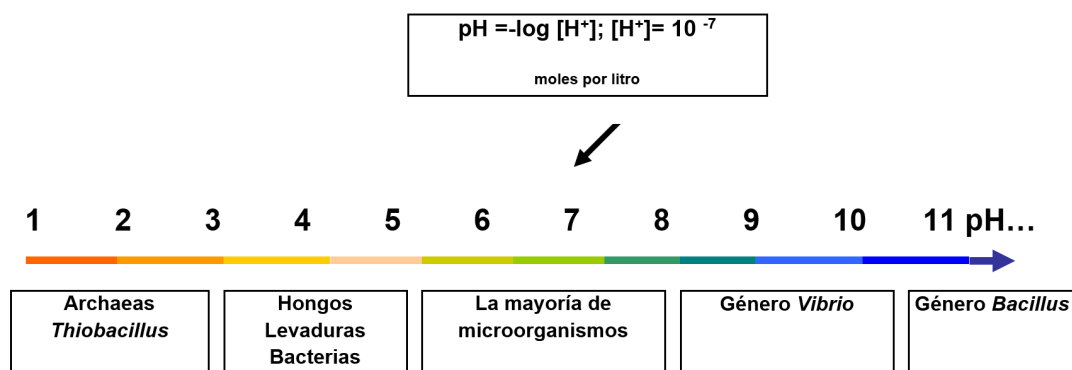
Fuente: Tomado de Conceptos básicos de microbiología. Corrales L y González A.

El pH: Las condiciones de pH del medio regulan, a su vez, el pH interno de la bacteria e influyen en el transporte de hidrogeniones a través de membrana citoplasmática. La mayoría de microorganismos que se desarrollan a pH 7 se denominan **neutrófilos**, los **acidófilos** se desarrollan a pH inferior a 5 y los que se desarrollan a pH mayores de 8 se denominan **basófilos** o **alcalófilos**. (33).

• *Rangos de pH y el crecimiento de algunos microorganismos*

El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de un gradiente en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplasmática.

Figura 4. Rangos de pH en el crecimiento bacteriano.



Fuente: Tomado de Conceptos básicos de microbiología. Corrales L y González A.

El pH en los medios de cultivo suele bajar, lo cual confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. Es así como, las bacterias lácticas, por ejemplo, producen grandes cantidades de ácido lác-

tico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) y como consecuencia de esto, el pH del medio de cultivo disminuye a valores inferiores a los soportables por otras bacterias.

Tabla 6. Rangos de pH para el crecimiento bacteriano.

Microorganismo	Rango	Óptimo
Acidófilos	1-5,5	2-3
Neutrófilos	5,5-7,5	6,5-7,0
Basófilos o Alcalófilos	8,5-11,5	9,0-10,0

Fuente: Corrales L y González A.

Actividad del agua

El agua como compuesto químico, está constituido por moléculas que presentan una geometría molecular de la cual resulta un momento dipolar elevado. La polaridad de la molécula y, por tanto, el sinnúmero de interacciones que éste compuesto propicia, se explica por el ángulo de enlace de $104,9^\circ$, esta particularidad se constituye en un factor determinante en las atracciones intermoleculares, los puentes de hidrógeno, la solubilidad y la tensión superficial. (34)

Las propiedades antes mencionadas influyen directamente en la “actividad de agua” (a_w); la cual se define como la relación entre la presión de vapor de agua del sustrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua pura (P_0); por tanto, la actividad del agua incide en el curso de reacciones químicas y bioquímicas.

Si los microorganismos se encuentran en un sustrato con una actividad de agua demasiado baja el crecimiento se detiene, esta detención no suele llevar a la muerte del microorganismo, sino que se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo; en el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada.

En relación con la actividad del agua se encuentran microorganismos **osmotolerantes**, cuando crecen en un rango amplio de a_w , un ejemplo es el *Staphylococcus aureus* que crece a concentraciones de sal 3M; **osmófilos** son aquellos que crecen en ambientes con altas actividades y cuando crecen en ambientes muy secos o con bajas actividades reciben el nombre de **xerófilos**. (5, 33, 35)

Potencial de óxido-reducción (REDOX)

Las reacciones de óxido reducción son aquellos que se caracterizan por la presencia simultánea de una sustancia oxidante (gana electrones) y un agente reductor (pierde electrones) (8). El potencial redox mide la tendencia a ganar o a perder electrones, lo que ocasiona un cambio en el estado de oxidación de cada especie, según sea el caso.

Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno (O_2). Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores; cuando una bacteria requiere un ambiente oxidante, desarrolla un metabolismo oxidativo (respiratorio) en cambio cuando requiere ambientes reductores optan por un metabolismo fermentativo.

Una bacteria es aerobia cuando necesita del oxígeno para vivir y es anaerobia en dos casos, cuando no lo necesita, denominada “anaerobia tolerante” o cuando muere en presencia del oxígeno “anaerobias estrictas”. Dentro de este grupo de bacterias se encuentran algunas que llevan a cabo un metabolismo oxidativo porque usan otro aceptor final de electrones que actúa como oxidante ambiental, ejemplo, de éstas son las que “respiran” nitratos (NO_3^-), sulfatos (SO_4^{2-}) u otros compuestos capaces de aceptar electrones y funcionan como agentes oxidantes.

En el curso de ciertas reacciones metabólicas redox se forman compuestos altamente reactivos (radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células. Las células se protegen de estos compuestos por la síntesis de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasa y catalasa. Las bacterias anaerobias estrictas carecen éstas o las tienen en niveles muy bajos de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. (5, 36)

De otra parte, existen bacterias reductoras de metales como *Geobacter sulfurreducens*, las cuales transfieren electrones más allá de sus membranas externas a los óxidos de Fe (III) y Mn (IV); en este sentido, los óxidos metálicos insolubles en el medio ambiente representan un depósito común y vasto de energía para algunos microorganismos respiratorios capaces de transferir electrones a través de sus membranas aislantes a los aceptores externos, un proceso denominado transferencia de electrones extracelular (37).

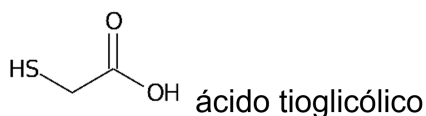
Medios de cultivo

Caldos de Enriquecimiento: contienen agentes inhibidores a baja concentración, que retrasan el crecimiento de la microbiota contaminante y permiten el crecimiento del microorganismo que se quiere recuperar (29).

Caldo nutritivo con Extracto de Carne y NaCl (Cloruro de Sodio): es utilizado para la recuperación de microorganismos no exigentes; se puede suplementar con extracto de levadura, peptonas, glucosa, y otros componentes.

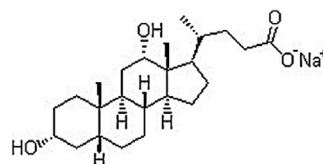
Caldo Tioglicolato: se suplementa con caseína, extracto de levadura, carne y tioglicolato. Para el aislamiento de anaerobios, se añaden además hemina y vitamina K.

El tioglicolato es un compuesto derivado del ácido tioglicólico, rico en átomos de azufre que facilita, el transporte de electrones.



Es el caldo más utilizado en microbiología clínica porque ofrece un bajo potencial redox, por lo cual permite el óptimo desarrollo de las bacterias anaerobias. Favorece también el crecimiento de aerobios, microaerófilos e incluso de microorganismos exigentes (38).

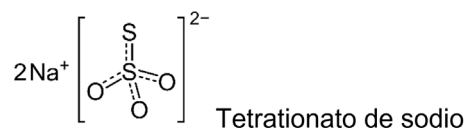
Caldo Gram negativos (GN): contiene agentes inhibidores a baja concentración como el citrato y desoxicolato (sal biliar), los cuales inhiben el desarrollo de las bacterias Gram positivas y retrasan el crecimiento de las coliformes; se utiliza como medio de enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* en muestras de heces e hisopados rectales.



Desoxicolato de Sodio

Caldo selenito F: Contiene como agente inhibidor el selenito de sodio (Na_2SeO_3), el cual inhibe los enterococos y retrasa el crecimiento de las coliformes, se puede añadir cisteína que favorece el crecimiento de *Salmonella*.

Caldo tetracionato: Contiene sales biliares y tetracionato sódico (se genera en la reacción de tiosulfato con yodo), los cuales inhiben las bacterias Gram positivas y las coliformes que no tienen la enzima tetracionato reductasa. Se utiliza como medio de enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella*.



El tetracionato de sodio es una sal proveniente del anión sulfito (SO_3^-), enriquecido con otro átomo de azufre que incrementa la densidad electrónica y, por lo tanto, facilita el transporte de electrones.

Caldo peptona complementada: medio con pH 8,4 que se utiliza como enriquecimiento para el aislamiento de especies de *Vibrio*, antes de pasar a subcultivos en medios más selectivos.

Caldo tioglicolato Campy: es un medio semisólido por la adición de agar, similar en componentes al caldo tioglicolato suplementado con antibióticos. Se utiliza para el enriquecimiento de especies de *Campylobacter* antes de subcultivar en medios más selectivos.

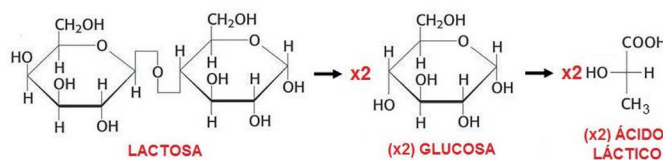
Caldo Todd-Hewitt con sangre y antibióticos: compuesto por infusión cerebro corazón, peptona, glucosa $C_6H_{12}O_6$, cloruro de sodio, NaCl, fosfato de sodio, Na_3PO_4 y carbonato de sodio, Na_2CO_3 . Como inhibidores contiene ácido nalidixico ($C_{12}H_{12}N_2O_3$) y gentamicina ($C_{21}H_{43}N_5O_7$) o colistina ($C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$), se utiliza como medio de enriquecimiento para *Streptococcus agalactiae* de muestras genitales (16, 39).

Caldo con carne picada: caldo nutritivo al cual se le añaden trozos de carne como fuente de proteínas, posee un bajo potencial redox, lo cual favorece la recuperación de anaerobios, mejor cuando se añade una capa de parafina líquida, la cual, se utiliza para aislar el cultivo bacteriano del O_2 del ambiente.

Leche con tornasol: caldo enriquecido al cual se le añade leche (descremada), su uso se fundamenta en la capacidad de ciertos microorganismos de producir determinadas reacciones metabólicas como fermentación de la lactosa, caseólisis (peptonización), y coagulación de la caseína $C_{38}H_{57}N_9O_9$. Estas reacciones se ponen de manifiesto mediante un indicador redox y de pH, como el tornasol.

La caseína es una proteína sobre la cual actúa la enzima caseinasa, rompiendo los enlaces peptídicos y la estructura cuaternaria, originando asociaciones más pequeñas que pueden aglutinarse cuando se alcanza el punto isoelectrico. El crecimiento se interpreta de la siguiente manera:

Color rosado en el medio de cultivo: Fermentación de la lactosa y por lo tanto es una reacción ácida, en la cual, como producto de la reacción se obtiene el ácido láctico:



Cuando no hay cambio de color en el medio de cultivo, no se ha producido fermentación de la lactosa ni se han utilizado las sustancias nitrogenadas del medio. De otra parte, un color azul en el medio de cultivo, indica que el microorganismo ha utilizado las sustancias nitrogenadas del medio, produciendo reacción alcalina.

Un color blanco en el medio de cultivo, indica que se ha producido una peptonización de la proteína de la leche (digestión), y el tornasol se reduce a una leucobase. La producción de coágulo, indica coagulación de la leche, se alcanza el punto isoelectrico de la proteína y la producción de gas, por la aparición de burbujas (CO_2 y H_2) en el medio.

Caldo verde brillante bilis al 2%: es un medio selectivo recomendado para la prueba confirmatoria en la detección del grupo coliforme en aguas, leche, derivados lácteos y otros productos de importancia sanitaria, mediante la determinación del NMP (número más probable). La bilis y el verde brillante inhiben el desarrollo indeseable de la flora acompañante de los coliformes e incluso suprimen el crecimiento de los anaerobios fermentadores de la lactosa como es el caso de *Clostridium perfringens*. La presencia de gas después de 24 – 48 horas a 35° C de incubación se considera como prueba positiva para la presencia del grupo *Coli* – *Enterobacter* (40).

Medios de cultivo en placa de aislamiento primario de uso rutinario

- No Selectivos: para cultivo de una amplia variedad de organismos difíciles de crecer “in vitro”. A menudo están enriquecidos con nutrientes como: sangre, suero, hemoglobina, factores de crecimiento X, V, aminoácidos, y vitaminas entre otros.
- Selectivos: de moderada o de alta selectividad, a los cuales se les añaden sustancias que inhiben el crecimiento de ciertos grupos bacterianos permitiendo a la vez el crecimiento de aquellas que se desean seleccionar. Algunas sustancias inhibitoras son el cristal violeta que inhibe las bacterias Gram posi-

vas. Otra manera es modificar la fuente de carbono; si se sustituye la glucosa por maltosa, se seleccionan aquellos microorganismos capaces de metabolizarla.

- Enriquecidos: algunos microorganismos no son capaces de desarrollarse en medios de cultivo normales, para cultivarlos se requiere añadir sustancias altamente nutritivas como sangre, suero, cofactores, vitaminas, extractos de tejidos animales y las bacterias que crecen en ellos se denominan exigentes o fastidiosas (41).

Los medios enriquecidos en los cuales se suprime el crecimiento de la flora competitiva normal se hacen mediante el uso de antibióticos específicos, como kanamicina ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$) y vancomicina ($C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$).

Agar Cled (cistina, lactosa, deficiente en electrolitos):

Es un medio no selectivo diferencial, recomendado para el análisis bacteriológico de orina ya que en él crecen la gran mayoría de las bacterias, tanto Gram negativas como Gram positivas, patógenas de vías urinarias. Debido a que en su composición tiene deficiencia en electrolitos (no contiene cloruro de sodio), impide que las colonias del género *Proteus* invadan la placa de cultivo (efecto swarming), por lo tanto, este medio facilita el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

El único carbohidrato que contiene es la lactosa; la cistina, facilita el crecimiento de las bacterias coliformes dependientes de ella y el azul de bromotimol funciona como indicador, el cual permite distinguir las colo-

nias de bacterias fermentadoras de las que no lo son ya que vira a amarillo en pH ácido y se torna de un color azul más intenso en pH alcalino (42).

Foto 1. Agar CLED, de izquierda a derecha: medio sin sembrar, microorganismo no fermentador de lactosa, microorganismo fermentador de lactosa.



Fuente: L. Corrales.

Agar Nutritivo

Es un medio de cultivo no selectivo, utilizado para el aislamiento y recuento de microorganismos que tienen requerimientos nutricionales escasos, su uso está descrito principalmente para procedimientos en el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria. La pluripectona y el extracto de carne aportan nutrientes para el desarrollo bacteriano; el cloruro de sodio (NaCl) mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril, para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales y en este caso permi-

te una clara visualización de las reacciones de hemólisis.

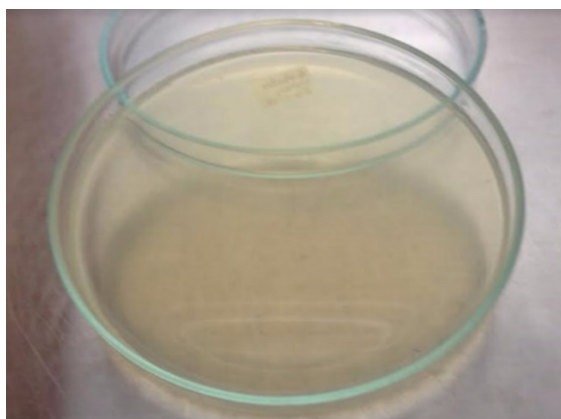
Agar BHI (infusión cerebro-corazón)

La infusión cerebro-corazón es una fórmula que contiene muchos nutrientes ya sea como caldo o medio sólido y opcionalmente con sangre adicional. Los componentes clave incluyen infusión de distintos tejidos animales con el agregado de peptona, tampón fosfato (HPO_4^-) y una pequeña concentración de glucosa que proporciona la fuente de energía accesible.

Este medio en presentación de caldo se emplea con frecuencia como medio para hemocultivo y como medio base para muchas pruebas metabólicas, en especial para la identificación del género *Streptococcus*. Cuando al medio se le adiciona 6.5% de

cloruro de sodio, las sales activas actúan como agentes diferenciales y selectivos, los cuales interfieren en la permeabilidad y el equilibrio eléctrico y osmótico en microorganismos intolerables a esta sal (43).

Foto 2. Agar BHI sin sembrar.



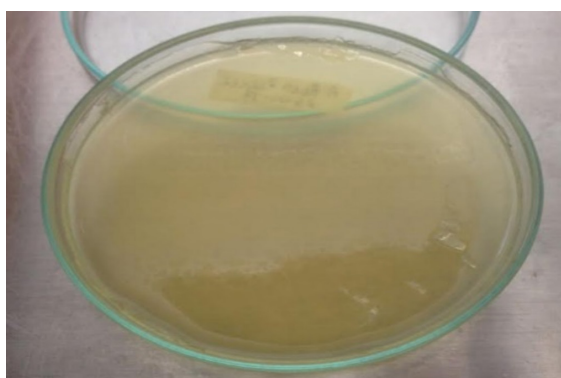
Fuente: L. Corrales.

Agar TSA (triptona-soja)

Medio rico de uso general para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Se produce por digestión enzimática de la soja y de la caseína, con frecuencia se

utiliza como agar base para otros tipos de medios tales como agar sangre o chocolate. En este medio pueden crecer microorganismos exigentes como algunas especies de *Brucella*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Neisseria* y *Vibrio* (16).

Foto 3. Agar tripticasa Soja.



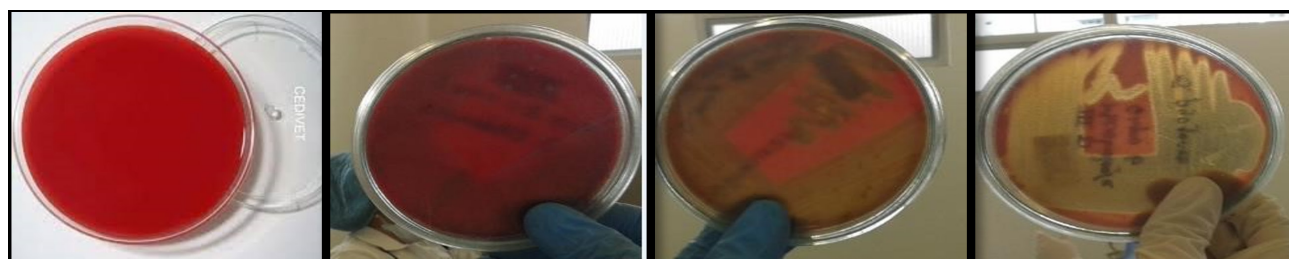
Fuente: L. Corrales.

Agar Sangre

El agar sangre es un medio no selectivo, compuesto por un agar base que contiene una fuente proteica al cual se le agrega de 5% a 8% de sangre ovina; el agar sangre,

permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias (Gram positivas y Gram negativas), permite verificar capacidad hemolítica (medio diferencial), las hemólisis que se pueden evidenciar en este medio son: beta, alfa y gamma.

Foto 4. Hemólisis en agar sangre. De izquierda a derecha: agar sangre sin sembrar, producción de hemólisis gamma, hemólisis alfa y hemólisis beta.



Fuente: L. Corrales.

El agar sangre está preparado con un medio de cultivo deshidratado denominado agar base sangre, el cual está compuesto por agar-agar, infusión de músculo de corazón, peptona, cloruro de sodio; el color del medio es ámbar claro; cuando se agrega la sangre, su color cambia a rojo cereza. La sangre utilizada para preparar el medio generalmente es sangre de cordero, pero también puede ser sangre humana o de caballo, y, al respecto es importante considerar que algunas bacterias varían el tipo de hemólisis de acuerdo con la naturaleza de la sangre. El uso se fundamenta en que la infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de bacterias y otros microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Hemolisinas: cerca del 35% de las toxinas producidas por las bacterias son del tipo “Toxinas membranolíticas” (TM). La característica más importante de los efectos de estas toxinas es sobre la organización en la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática de células humanas y/o animales. La pérdida de la integridad de la membrana conlleva a un desbalance osmótico, reflejado por la hinchazón de la célula debido al ingreso de agua y desorden del gradiente electroquímico que conduce a la lisis y muerte celular, contribuyendo a la virulencia de la bacteria y jugando un rol importante en la patogenia bacteriana. Las TM fueron identificadas “in vitro” por su característica de lisar glóbulos rojos sensibles de humanos y otras especies animales, con la aparición de un halo de hemólisis alrededor de las colonias bacterianas en agar sangre. Sin embargo, actualmente se sabe con certeza que la

mayoría de hemolisinas bacterianas actúan sobre células distintas a los glóbulos rojos, causando daño tisular o muerte de muchos de los animales de experimentación. Es por esta razón, que se propuso el término “citotoxina” o “toxina citolítica” para describir correctamente el rango de sus actividades biológicas (16, 44).

Como se expuso anteriormente, en el agar sangre, se pueden diferenciar tres tipos de hemólisis:

Hemolisis alfa: Lisis parcial de los glóbulos rojos, con un halo de color verdoso alrededor de las colonias, debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina, con la liberación de un producto de degradación llamado biliverdina por el peróxido de hidrógeno generado en el metabolismo de los microorganismos.

Hemolisis beta: Lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, traslúcido alrededor de la colonia, estas hemolisinas interactúan con el colesterol en la membrana celular, dando como resultado el deterioro de esta estructura celular protectora. La estreptolisina, una exotoxina que causa la lisis completa de los hematíes, (Estreptolisina O, citotoxina sensible al oxígeno. Estreptolisina S, citotoxina oxígeno estable.)

Hemolisis gamma: Ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de las colonias (45).

Agar Chocolate

Este medio permite el crecimiento de microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales, como es el caso de algunos *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Neisserias* patógenas; corresponde a la misma fórmula del medio agar sangre, en el cual, por calentamiento a 60°C se lisan los glóbulos rojos, éstos al ser lisados liberan la hemoglobina y otros nutrientes como factor X (hemina) y factor V (Nicotin Adenin Dinucleótido - NAD).

El dinucleótido de nicotinamida y adenina, más conocido como NAD⁺ en su forma oxidada y NADH en su forma reducida, corresponde a una coenzima que se encuentra en las células vivas; está compuesta por dos nucleótidos unidos por sus grupos fosfatos, uno de ellos una base de adenina y el otro de nicotinamida. Su función principal es intervenir en el intercambio de electrones e hidrogeniones en la producción de energía celular (46) (47). El factor X, denominado hemina y también protoporfirina es un pigmento que contiene hierro (Fe) y suministra los compuestos tetrapirrólicos necesarios para la síntesis de citocromos y enzimas. Este medio de cultivo, es muy nutritivo por la presencia de peptona, tripteína, extracto de levadura, extracto de corazón y almidón, se pueden agregar suplementos definidos que proporciona el factor V, vitaminas, aminoácidos, coenzimas, glucosa, iones férricos (Fe⁺³) y otros factores que favorecen el crecimiento de especies exigentes (48, 49).

Foto 5. Agar Chocolate.

Fuente: L. Corrales.

Agar Mueller Hinton

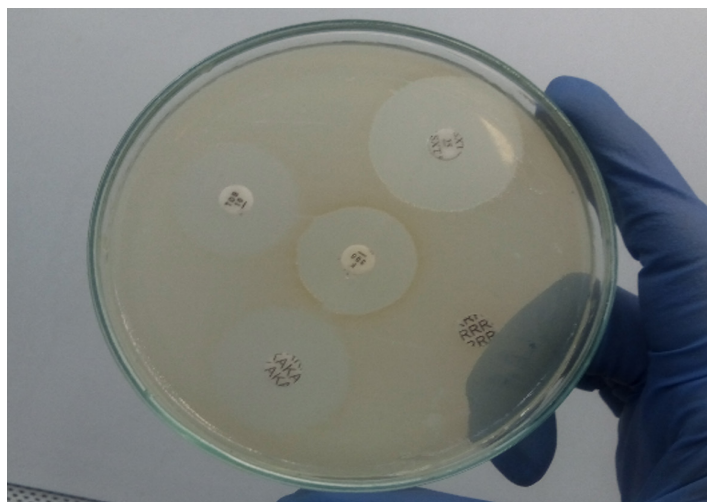
Es un medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad frente a antimicrobianos y recomendado por el Comité de la Organización Mundial de la Salud para la estandarización de pruebas de susceptibilidad por no contener sustancias inhibidoras de los antimicrobianos, por ejemplo, el PABA (ácido p-amino benzoico), que anula la actividad de sulfamidas, así como por su reproductibilidad. Además, es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes. El agar Mueller-Hinton, se utiliza para la realización del ensayo de difusión en placa, en tanto que el caldo Mueller-Hinton se emplea para la determinación de la concentración mínima inhibidora en el ensayo de diluciones seriadas (50).

Solo bacterias aeróbicas o facultativas que crecen satisfactoriamente en agar Mueller Hinton, sin suplementar, podrían ser testeadas en este medio. Para los test con cepas que no crecen satisfactoriamente en Mueller Hinton no suplementado como *S. pneumoniae*, estreptococos β hemolíticos y del grupo Viridans, se requiere adicionar sangre de oveja desfibrinada al medio fundido y enfriado, en una concentración final de 5 % (V/V) (51).

Tabla 7. Variación de la actividad de diferentes antimicrobianos con el cambio del pH del medio.

AUMENTO DE LA ACTIVIDAD		DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD	PEQUEÑOS CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD
pH ácido	pH alcalino	pH ácido	Aumento o disminución del pH
Amoxicilina Ampicilina Carbenicilina Cloxacilina Piperacilina Tetraciclina Doxiciclina Minociclina Nitrofurantoina	Amicacina Netilmicina Estreptomicina Tobramicina Claritromicina Eritromicina Ac. Nalidixico Quinolonas Fluoradas	Azitromicina Claritromicina Clindamicina Metronidazol	Penicilina Cefalotina Cefalexina Cefoperazona Ceftazidima Ceftriaxona Cloranfenicol Polimixina B Sulfonamidas Trimetoprima

Fuente: Corrales L y González A.

Foto 6. Prueba de sensibilidad y resistencia a antibióticos por el método Kirby Bauer en Agar Muller Hinton.

Fuente: L. Corrales.

Agar Gardnerella

Es un medio parcialmente selectivo y de diferenciación para el aislamiento de *Gardnerella vaginalis* a partir de muestras clínicas. El medio está suplementado con peptona de proteasa para mejorar el crecimiento de *Gardnerella*. Se añade anfotericina B para reducir el crecimiento de las levaduras como *Candida spp.* que también son frecuentes en las muestras vaginales, se añade

sangre humana como nutriente y para detectar la beta-hemólisis difusa característica de este microorganismo (49). La detección del organismo en medios utilizados sistemáticamente es difícil dado que la *Gardnerella* y otras bacterias tales como lactobacilos y estreptococos pueden producir alfa hemólisis en medios con sangre de carnero, no obstante, en medios con sangre humana, produce la beta-hemólisis característica (52, 53).

Agar Thayer Martin

Utilizado para el aislamiento del gonococo, este medio es un agar chocolate enriquecido al cual se ha añadido una mezcla de tres antibióticos específicos que inhiben el crecimiento del resto de la flora acompañante (51). Es selectivo para la recuperación de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* por la presencia de suplemento de antibióticos constituido por vancomicina, colistina, nistatina y trimetoprima que inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y Gram negativos y candidas, y sin efecto inhibitorio para neiserias. El medio de cultivo es altamente nutritivo ya que contiene agar base GC, hemoglobina y el suplemento de enriquecimiento Vitox o Isovitallex que contiene: vitamina B12, L-glutamina, CIH guanina, adenina, ac. p-aminobenzoico, L-cistina, NAD (coenzima I), cocarboxilasa, nitrato férrico $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, CIH tiamina, CIH cisteína y glucosa (54, 55).

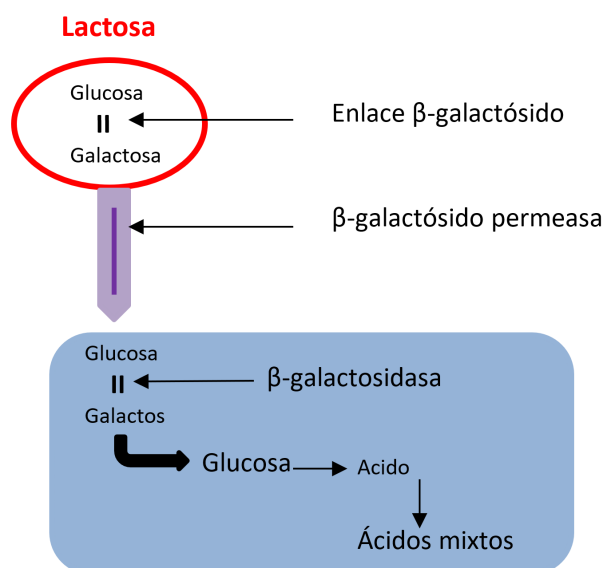
Agar Mac Conkey

Es un medio selectivo porque contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y de algunas Gram negativas exigentes y diferencial por la lactosa que proporciona la única fuente de carbono para el desarrollo bacteriano.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir

de muestras clínicas, aguas y alimentos; todas las especies de la familia Enterobacteriaceae se desarrollan con buen crecimiento. La bacteria requiere dos enzimas para degradar el azúcar, la lactosa permeasa (galactósido permeasa), que transporta el disacárido al interior de las células y la B-galactosidasa, que cataliza la hidrólisis de lactosa en sus dos monosacáridos glucosa y galactosa. Las bacterias que sintetizan las dos enzimas son fermentadoras rápidas y las bacterias que solo sintetizan la B-galactosidasa son fermentadoras lentas; el indicador es el rojo neutro, así que en medio ácido se observa de un color rosa intenso o fucsia en las colonias o alrededor de las mismas que corresponde a la reacción de fermentación positiva (16, 50).

Figura 5. Proceso Físicoquímico para la fermentación de la Lactosa.

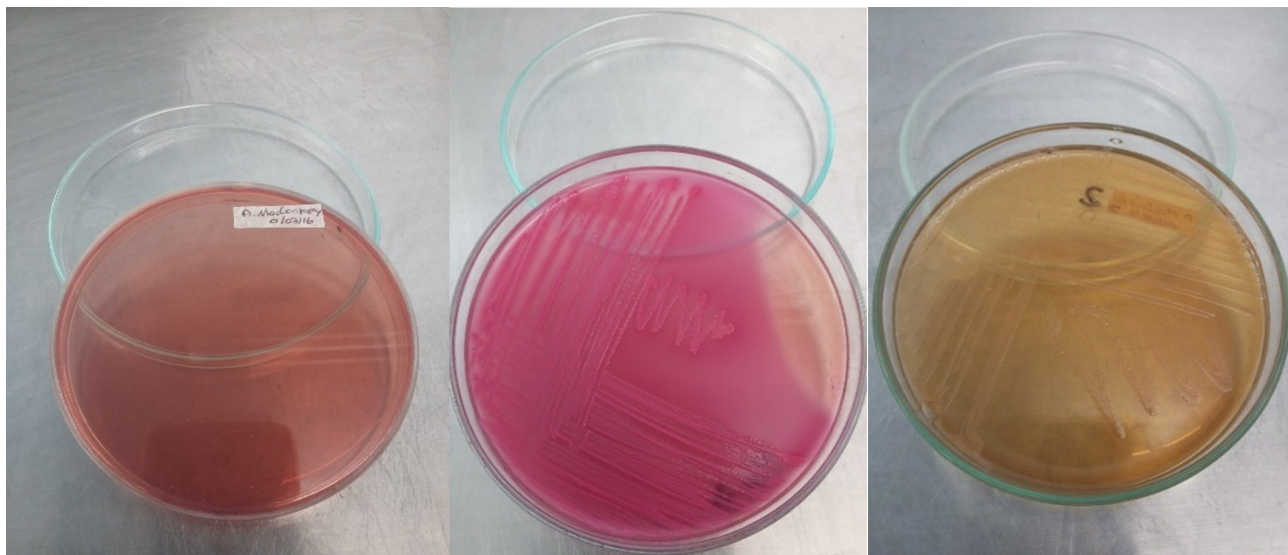


Fuente: L. Corrales.

Se recomienda el uso de este medio en muestras clínicas con posible flora microbiana mixta, tales como procedentes de la orina, sistema respiratorio, heridas y otras,

porque permite la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otras bacterias Gram negativas en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa (56).

Foto 7. Agar Mac Conkey (De izquierda a derecha: Medio sin sembrar, fermentación de lactosa positiva y fermentación de lactosa negativa).



Fuente: L. Corrales.

Agar Endo

Es un medio importante para el examen microbiológico del agua potable y residual, los productos lácteos y los alimentos. El medio se utiliza aún en microbiología clínica y en otros sectores para el aislamiento y la diferenciación de la familia Enterobacteriaceae. La selectividad del agar Endo, se debe a la combinación del sulfito de sodio (Na_2SO_3) con la fucsina básica, lo cual ocasiona la supresión parcial de los microorga-

nismos Gram positivos (57). Los coliformes fermentan la lactosa, produciendo colonias color rosa oscuro a rojizo con un brillo metálico verdoso iridiscente y una coloración similar en el medio. Las colonias de microorganismos que no fermentan la lactosa son incoloras o de color rosa pálido en contraste con el fondo rosa claro del medio (58).

Foto 8. Endo en microplacas deshidratadas para ser utilizado en la técnica de filtración por membrana, para análisis microbiológico del agua. (a la izquierda medio hidratado sin membrana de filtración, derecha medio con crecimiento bacteriano de coliformes totales después de incubación).



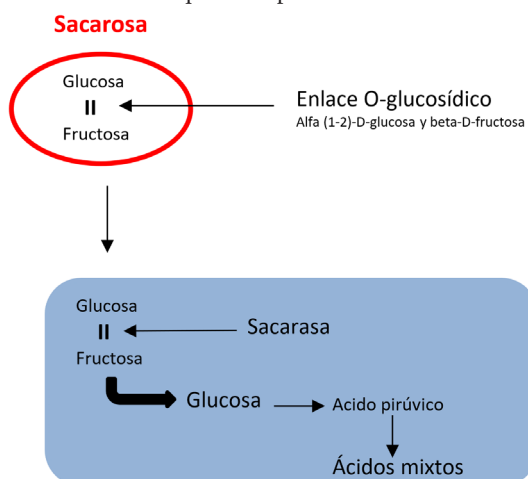
Fuente: L. Corrales.

Agar Eosina Azul De Metileno (EMB)

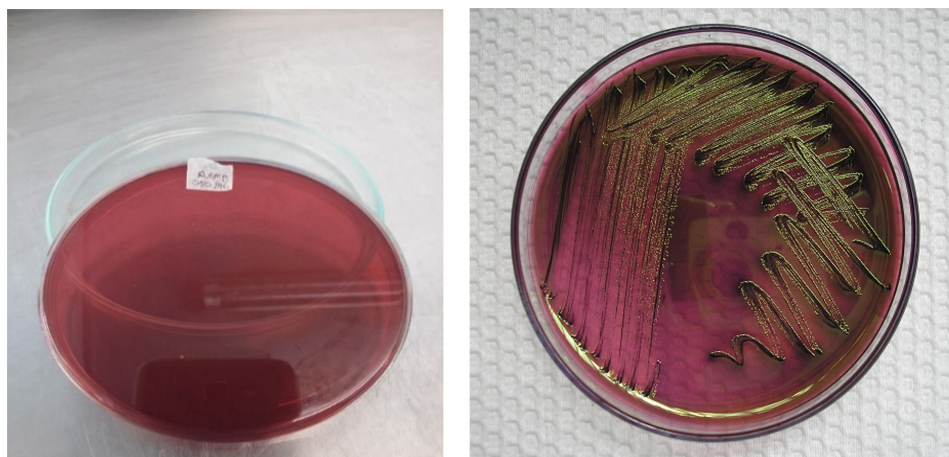
Este medio de cultivo tiene como inhibidores los colorantes eosina y azul de metileno; como hidratos de carbono, lactosa y sacarosa y como indicador eosina y azul de metileno. Permite la diferenciación de colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan; el contenido de eosina y azul de metileno inhiben el de-

sarrollo de microorganismos Gram positivos. La presencia de sacarosa permite, para algunos miembros del grupo coliforme, fermentarla con más facilidad que la lactosa. Las colonias lactosa positiva presentan un color azul o moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras y las que son negativas se observan incoloras o rosa pálido transparentes (59).

Figura 6. Procesos Físicoquímicos para la fermentación de la sacarosa.



Fuente: L. Corrales.

Foto 9. Agar EMB sin sembrar y con fermentación de azúcares positivo.

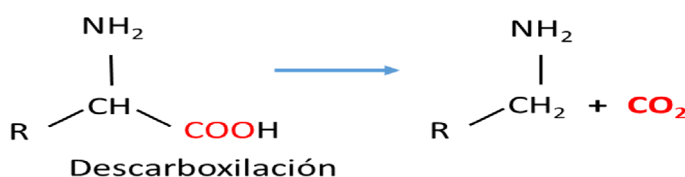
Fuente: L. Corrales.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

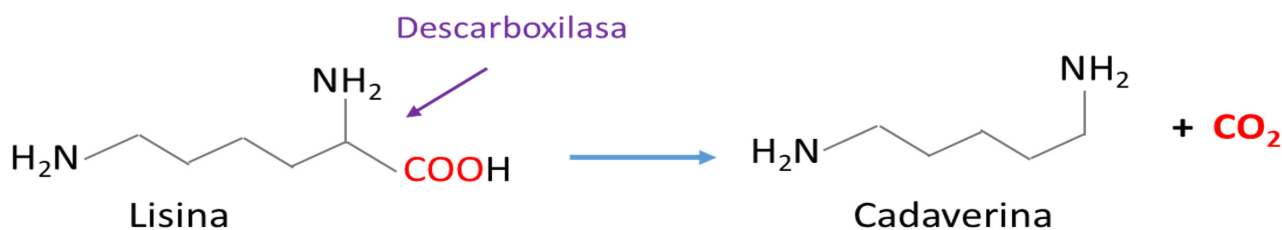
Contiene como inhibidor cloruro de sodio (NaCl), tres hidratos de carbono: xilosa ($C_5H_{10}O_5$), sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) y lactosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), el indicador es el rojo fenol y la fuente de azufre es el tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$). La xilosa es una aldo-pentosa, un monosacárido que contiene cinco átomos de carbono y un grupo funcional aldehído (-CHO) que tiene un isómero funcional que es la xilulosa ($C_5H_{10}O_5$) (50, 60).

Es un medio selectivo para aislamiento y diferenciación de Enterobacterias entero-

patógenas como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia*. La fermentación de los azúcares (xilosa, lactosa y sacarosa) producen cambio de color de rojo a amarillo por el indicador rojo de fenol, debido a la oxidación del grupo carbonilo. El Tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) y la sal férrica (Citrato férrico) revelan la formación de ácido sulfhídrico (H_2S) por la precipitación de sulfuro de férrico (Fe_2S_3) de color negro presente en las colonias; los microorganismos productores de cadaverina, se evidencian por la formación de un color rojo púrpura alrededor de las colonias dado por el aumento del pH (16).

Figura 7. Reacción general de descarboxilación.

Fuente: L. Caycedo

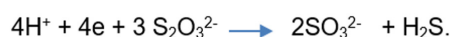
Figura 8. Reacción de Descarboxilación del aminoácido lisina.

Fuente: L. Caycedo

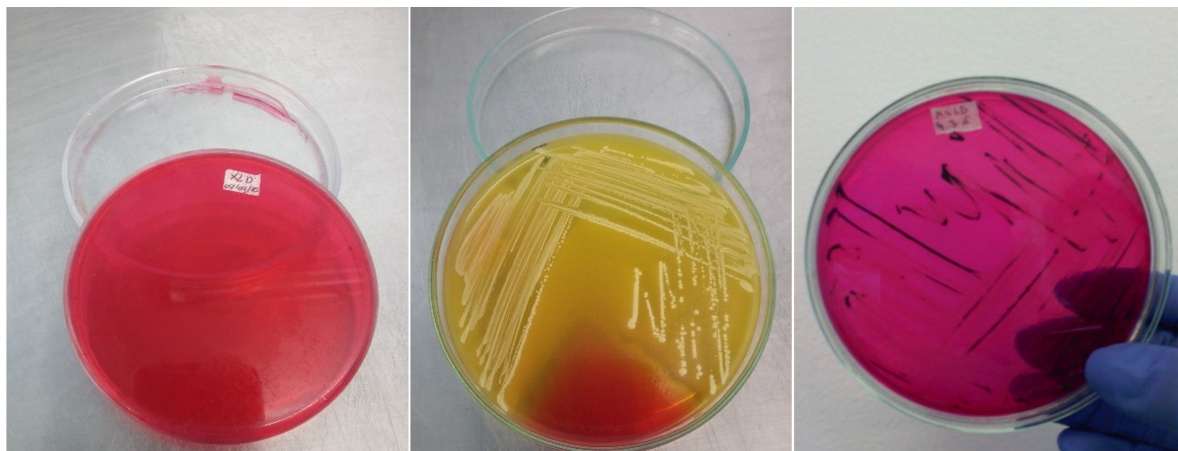
De otro lado, las proteólisis de las proteínas producen aminoácidos individuales; ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente el azufre de los diversos aminoácidos azufrados, produciendo H_2S gaseoso, peptona, cisteína, cistina, metionina y tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) los cuales son fuente de azufre. Las enzimas responsables de esta actividad son la cisteína desulfhidrasa y la tiosulfato reductasa.

El catabolismo anaerobio de la cisteína produce H_2S , ácido pirúvico y amoníaco. El anión tiosulfato $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ reemplaza al grupo sulfato ($\text{SO}_4^{=}$) como aceptor de electrones y

es la fuente de azufre del microorganismo, según la siguiente reacción:



El H_2S es un gas incoloro, su producción se detecta cuando el gas reacciona con ciertos metales, como plomo (Pb), hierro (Fe) o bismuto (Bi) originando sulfuros (60, 61). Por lo anterior, es necesario un segundo indicador, así que se propicia la reacción con una sal fuerte de hierro (citrato de amonio férrico), lo cual produce un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso metálico (FeS).

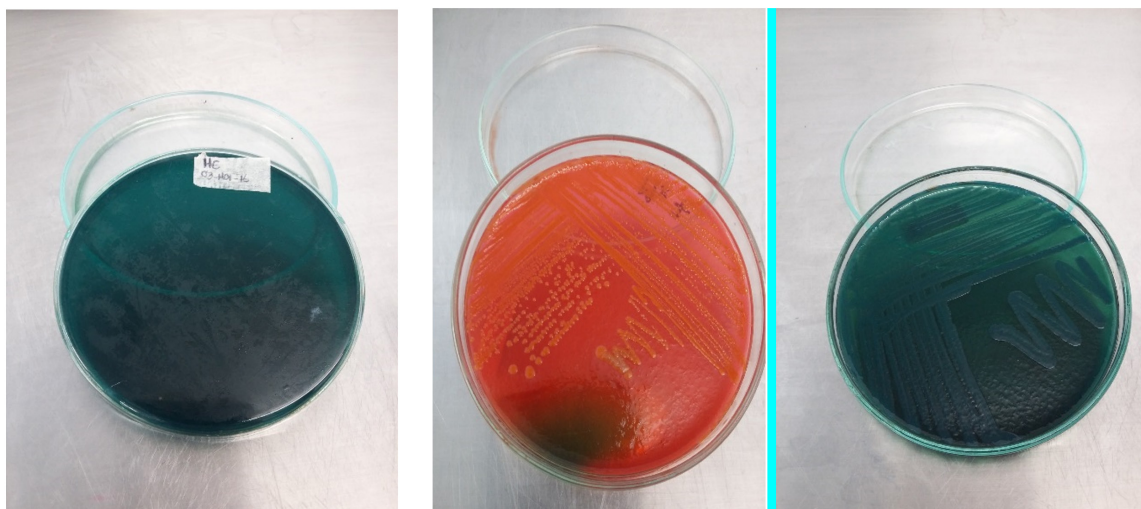
Foto 10. Agar XLD. (De izquierda a derecha agar XLD sin sembrar, Fermentación de azúcares positivo, descarboxilación de lisina y producción de H_2S).

Agar Hektoen Enterico

Este medio contiene como inhibidor sales biliares, como hidratos de carbono lactosa, sacarosa y salicina, posee dos indicadores: azul de bromotimol y fucsina ácida y como fuente de azufre tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). La salicina es un glucósido β -alcohólico, conformada por glucosa y alcohol salicílico que están unidos por un puente éter acetálico, la presencia del alcohol ligado al azúcar aumenta la solubilidad debido a la formación de puentes de hidrógeno.

La presencia de los dos indicadores diferencia las colonias de bacterias fermentadoras de las no fermentadoras, las primeras toman un color amarillo-anaranjado y las segundas, azul-verdoso. La presencia de sacarosa evita la selección de patógenos falsamente positivos. Con el tiosulfato de sodio y el amonio férrico se detectan los productores de sulfuro de hidrógeno (H_2S) por el precipitado negro en el centro de la colonia. Este es un medio ideal para el aislamiento selectivo de *Salmonella*, *Escherichia* y *Shigella*, a partir de heces y alimentos (16, 62).

Foto 11. Agar HE (De izquierda a derecha agar Hecktoen Entérico sin sembrar, fermentación de azúcares positivo y crecimiento sin fermentación de azúcares.



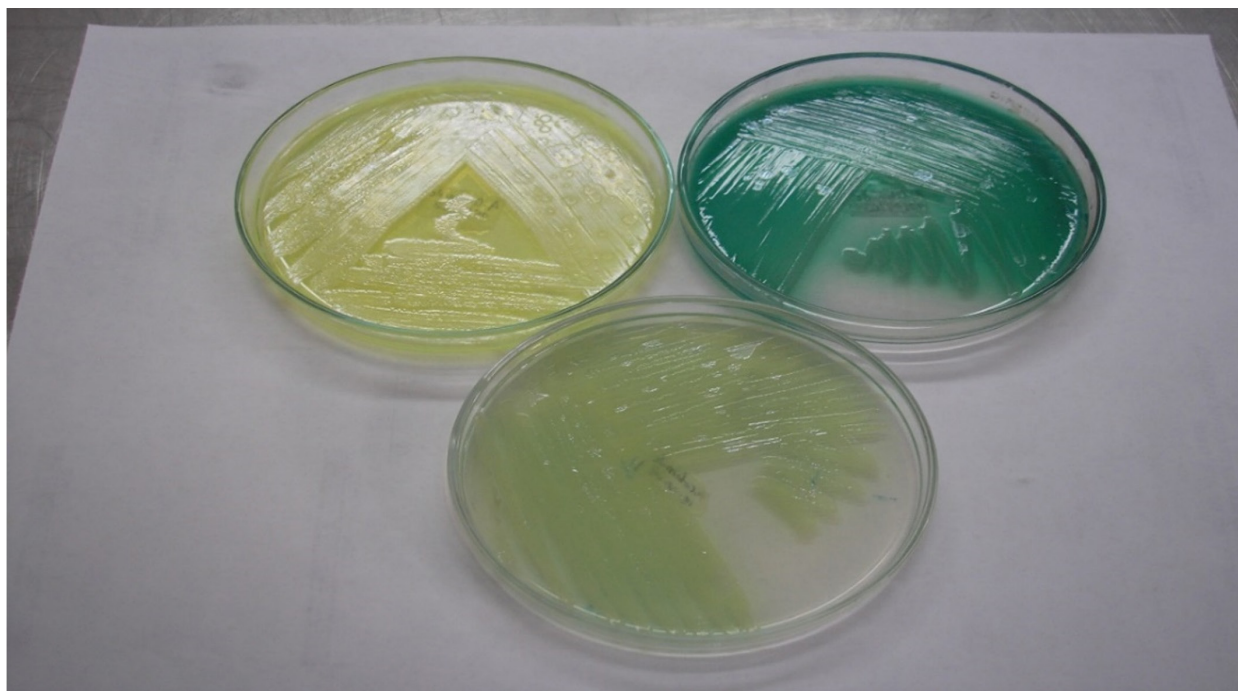
Agar Cetrimide

Este medio cuenta con tiosulfato citrato como inhibidor y azul de timol y de bromotimol como indicadores; es un medio selectivo y diferencial para aislamiento de *Pseudomonas* a partir de diversas muestras ya que permite evidenciar la formación de pigmentos. El cetrimide, reactivo está constituido por una mezcla de sales derivadas del Bromo (Br^{-1}), de las cuales la mayor

concentración corresponde a Bromuro de hexadeciltrimetilamonio ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) que constituye el componente que inhibe la flora acompañante (63,64).

Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* forman un pigmento de color verde-azulado llamado piocianina que es fluorescente a la luz UV, Esta reacción se observa gracias a su bioluminiscencia que requiere O_2 .

Foto 12. Producción de los pigmentos pioverdina y fluoresceína en el medio cetrimide.



Fuente: L. Corrales.

Agar Salado Manitol

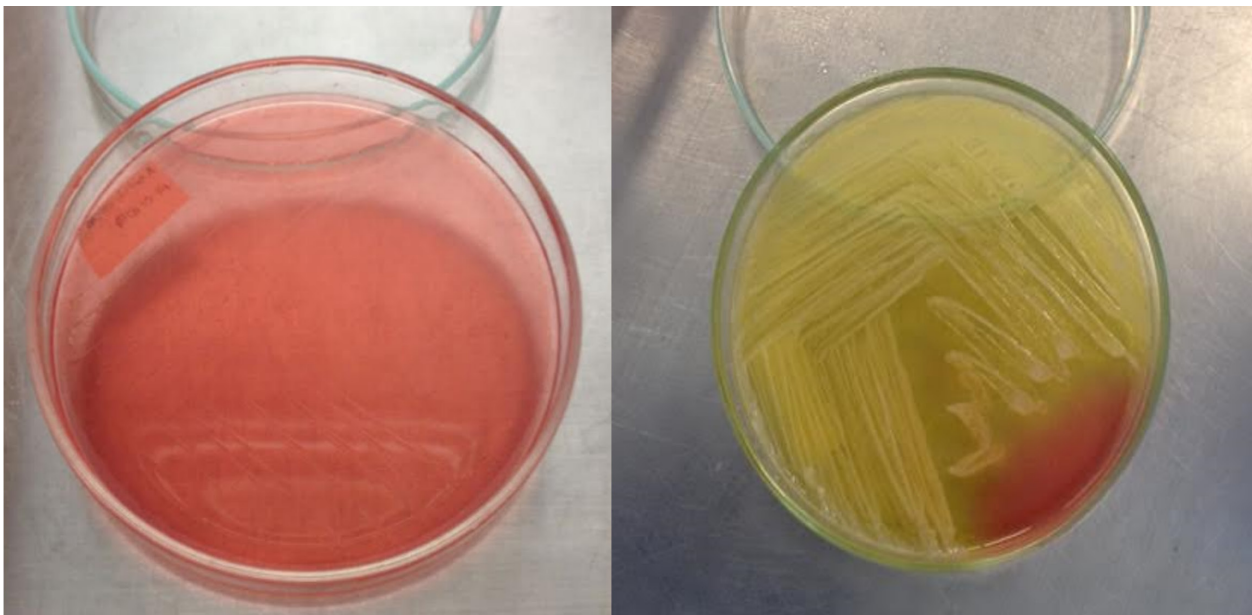
Se emplea para el aislamiento selectivo y recuento de *Staphylococcus aureus* en productos alimenticios, productos farmacéuticos y cosméticos; es un medio altamente selectivo por su alta concentración salina; los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol (edulcorante obtenido de la hidrogenación del azúcar manosa) acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante, los estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura.

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, constituyen la fuente de

carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales, el manitol es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH (65).

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y que además fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y por lo mismo vira el indicador de pH del color rojo a amarillo. Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Foto 13. Agar Salado Manitol. (Izquierda medio sin sembrar, Derecha: Fermentación positiva Manitol).

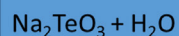
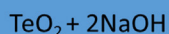


Fuente: L. Corrales.

Agar Baird-Parker

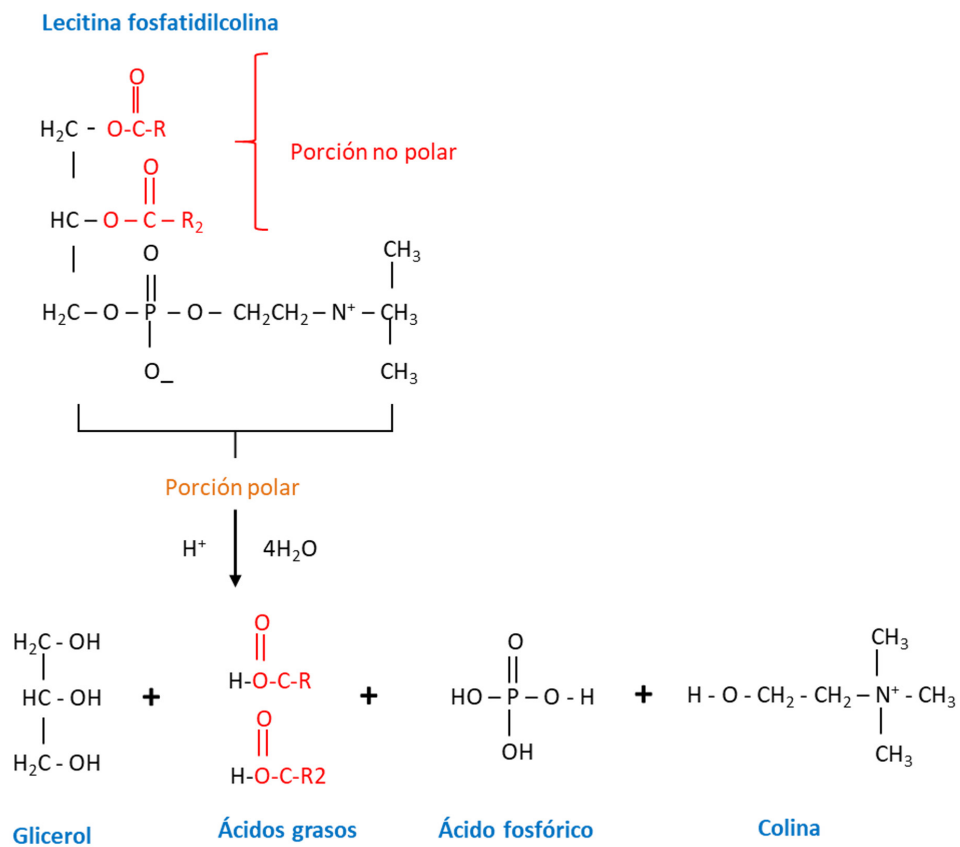
Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva. Es un medio altamente nutritivo que permite el crecimiento selectivo de *Staphylococcus* ya que el telurito de potasio (K_2TeO_3)

y el cloruro de Litio ($LiCl$), inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. Los *Staphylococcus coagulasa* positiva reducen el telurito a telurio y así se originan colonias de color negro. Las bacterias que tienen actividad lecitinasa, actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia (16).

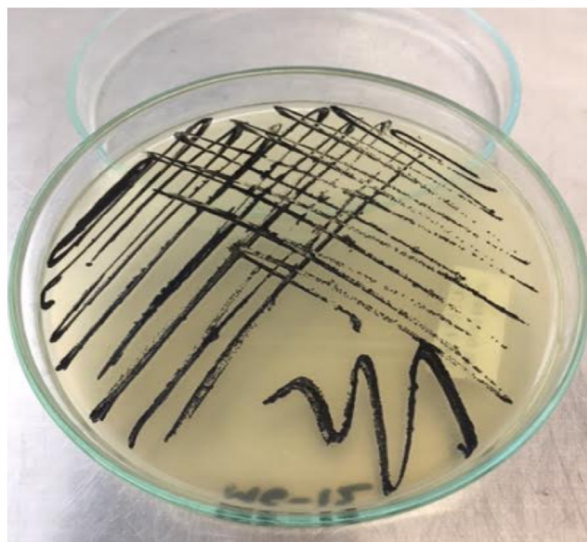


La fosfatidilcolina conocida como lecitina, es un fosfolípido que, junto con las sales biliares, ayuda a la solubilización de los ácidos biliares en la bilis (65). Es el componente más abundante de la fracción fosfatídica que puede extraerse de la yema de huevo. La fosfatidilcolina es uno de los

principales constituyentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares. La fosfolipasa D cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina a ácido fosfatídico, liberando la colina, soluble en el citosol, que puede usarse para sintetizar triacilgliceroles y otros lípidos de membrana (66).

Figura 9. Actividad de la Lecitinas.

Fuente: L. Corrales.

Foto 14. Agar Baird Parker con formación de Teluro de sodio y actividad lecitinas.

Fuente: L. Corrales.

Agar TCBS

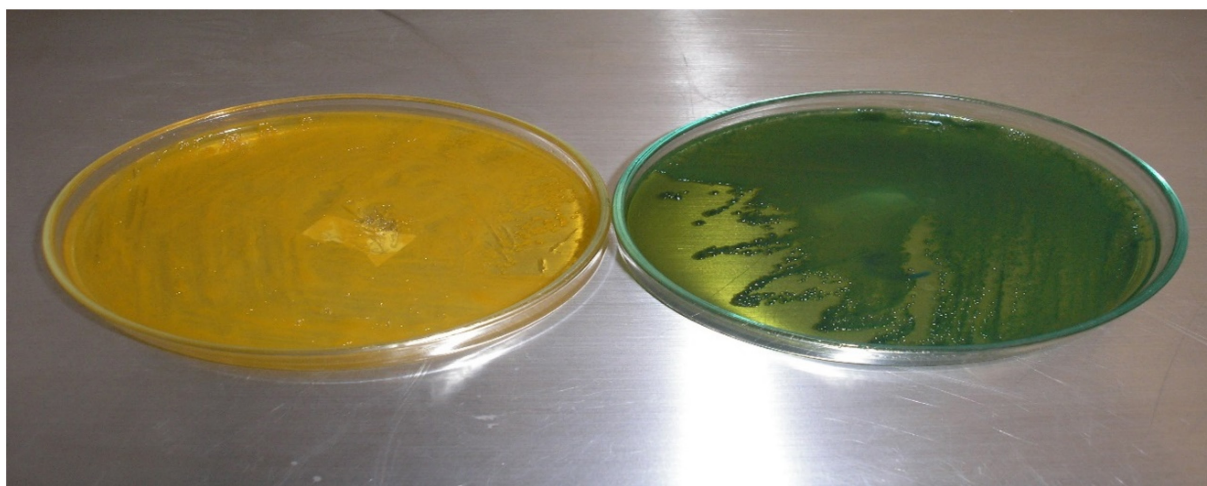
El extracto de levadura, la peptona de carne y la tripteína aportan nutrientes para el desarrollo de las bacterias, este es el medio selectivo más adecuado para el aislamiento de las especies de *Vibrio*, e inhibidor para la mayoría de las enterobacterias.

La inhibición está dada por las altas concentraciones de tiosulfato y citrato, la presencia de bilis y el pH que es fuertemente alcalino. La degradación de la sacarosa es variable entre las especies de *Vibrio*; las colonias son verdes para las cepas que no la utilizan y amarillas para aquellas que producen ácido a partir de este azúcar. Los indicadores de

pH son azul de timol y azul de bromotimol, que pasan de color azul al amarillo en medio ácido (50).

Es importante tener en cuenta, que en el medio la proporción de sacarosa está equilibrada de forma tal que no se inhiba el crecimiento bacteriano por exceso de ácido; el NaCl favorece el crecimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes e inhibe el desarrollo de los no tolerantes (67). El tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) aporta azufre y junto con el citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}$) permiten la formación de iones sulfato (SO_4^{-2}), iones sulfuro (S^{-2}) y la reducción a iones ferroso (Fe^{+2}).

Foto 15. Agar TCBS (Derecha fermentación de sacarosa positiva, izquierda fermentación de sacarosa negativa).



Fuente: L. Corrales.

Medio Löwenstein-Jensen

Löwenstein-Jensen es una base para la preparación de varios medios destinados al aislamiento, cultivo y diferenciación de micobacterias. La mezcla de huevos, constitui-

dos en su clara por la proteína ovoalbúmina y en la yema por vitaminas A, E, D, ácido fólico, B12, B6, B2, B1 y minerales como hierro (Fe), fósforo (P), potasio (K) y magnesio (Mg), que constituyen soporte para el crecimiento de una gran variedad de mi-

cobacterias. El verde de malaquita inhibe a gran parte de la flora acompañante (68). Por su parte, el agregado de glicerina estimula el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, pero inhibe el desarrollo de gran parte de *M. bovis*., si se agrega un 5% de NaCl, se pueden seleccionar micobacterias tolerantes a la sal, como es el caso de *M. smegmatis*.

Para la siembra se recomienda, en procedimientos de rutina, inocular la muestra previamente descontaminada, sobre la superficie del medio de cultivo. Incubación 35-37°C; a los 7 días de incubación, se observa por primera vez si hubo crecimiento. Luego, se debe observar cada semana, hasta un total de 8 semanas, para establecer las características morfológicas y la presencia o ausencia de pigmento en las colonias (50).

Foto 16. Cultivo de *M. tuberculosis* en LJ con verde de malaquita



Fuente: L. Corrales.

Schaedler Kanamicina-Vancomicina Agar Con 5% Sangre De Cordero

Se utiliza para el aislamiento selectivo de *Bacteroides*, *Prevotella* y diversos anaerobios Gram negativos a partir de muestras clínicas. El medio base es el agar Schaedler,

un medio altamente nutritivo, desarrollado específicamente para el crecimiento de anaerobios obligados. Cuando se le agrega vitamina K1 y hemina, se constituye en la base para varios medios selectivos, incluidos Schaedler-KV Agar con 5% de sangre de cordero.

La combinación de kanamicina y vancomicina se usa en el aislamiento selectivo de anaerobios Gram negativos; la adición de tres peptonas le proporcionan los nutrientes para el desarrollo bacteriano, y la glucosa es fuente de energía, contiene además un tampón Tris (hidroximetil-aminometano), de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, para evitar la reducción excesiva del pH durante la fermentación de la glucosa. El extracto de levadura es una rica fuente de vitaminas; la hemina y la sangre de carnero suministran hemo o factor X, necesario para el metabolismo respiratorio de una variedad de anaerobios estrictos. Se considera que la vitamina K favorece el crecimiento de una variedad de anaerobios Gram negativos. El cloruro de sodio, proporciona los electrolitos esenciales; la kanamicina inhibe los bacilos anaerobios Gram negativos facultativos y muchas otras bacterias facultativas, mientras que, la vancomicina inhibe las bacterias Gram positivas. La adición de estos agentes antimicrobianos convierte al medio en selectivo para anaerobios Gram negativos estrictos, tales como *Bacteroides* y *Prevotella* (69, 70).

Agar Feniletanol (Agar Alcohol Fenil Etílico)

Es un medio selectivo para el aislamiento de *Estafilococos* y *Streptococos* a partir de diversas muestras con flora mixta. La peptona, el extracto de levadura y el extracto de carne, proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos Gram positivos. La presencia del alcohol fenil etílico (feniletanol) inhibe el desarrollo de los microorganismos Gram negativos, ya que evita la síntesis de DNA. La adición de sangre de carnero al 5% no se recomienda para la determinación de reacciones hemolíticas, ya que se pueden presentar reacciones atípicas. También evita el crecimiento en velo de algunas especies de *Clostridium* como *Clostridium septicum*, facilitando de este modo su aislamiento. Se aconseja sembrar en este medio las muestras purulentas o cuando sea previsible una infección mixta (71).

Conclusiones

1. La nutrición bacteriana corresponde a un conjunto de reacciones químicas en las que intervienen la energía y diferentes sustancias en forma de elementos, iones y compuestos; bien sea, en procesos anabólicos o catabólicos.
2. Los cultivos bacterianos, constituyen uno de los aportes más importantes desde la microbiología en la comprensión y el

diagnóstico de los procesos infecciosos; en su composición, se encuentran sustancias orgánicas e inorgánicas que determinan diferentes mecanismos de reacción.

3. La temperatura, el pH, la actividad del agua y el potencial Redox son propiedades fisicoquímicas que inciden directamente en el crecimiento bacteriano.
4. La selectividad y la especificidad de los medios de cultivo se explican por las sustancias utilizadas en la preparación de los mismos y por las propiedades fisicoquímicas de los azúcares, las proteínas, y los indicadores que revelan el comportamiento bacteriano.
5. La comprensión de la nutrición y el crecimiento bacteriano implican el conocimiento de reacciones tales como fermentación, oxido-reducción y descarboxilación entre otras.
6. Los aportes de la metagenómica en la identificación de especies bacterianas se enriquecen con la culturómica y el uso de medios de cultivo específicos en el aislamiento de estas especies.

Referencias

1. Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. Cultivo bacteriano a través de condiciones selectivas y no selectivas: la evolución de los medios de cultivo en microbiología clínica. *Nuevos microbios Nueva infección*. 2019; 34: 100622. Publicado el 30 de noviembre de 2019 doi: 10.1016 / j.nmni.2019.100622.

2. Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S., Fournier PE, La Scola B., Raoult D. El renacimiento de la cultura en microbiología a través del ejemplo de la culturómica para estudiar la microbiota intestinal humana. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28: 237–264. - PMC - PubMed
3. Power DA, Johnson JA 2ª ed. Becton, Dickinson and Company; Chispas: 2009. Manual de Difco™ y BBL™.
4. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):208-236. doi:10.1128/CMR.00110-14
5. Corrales LC, Antolinez DM, Bohórquez JA, Corredor AM. 2015. Anaerobic bacteria: processes they perform and their contribution to life sustainability on the planet. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.
6. Kumar S. JP Medical Ltd; Nueva Delhi: 2012. Libro de texto de microbiología.
7. Atlas RM 3ª ed. CRC Press; Boca Raton, FL: 2010. Manual de medios microbiológicos. [Google Scholar]
8. Petrucci, R. Herring, F. Madura, J. Bissonnette, C. Química General. Principios y aplicaciones modernas. 11ª edición. Editorial Pearson. 2017.
9. Karp, Gerald. (2009). Biología Celular y Molecular. Editorial McGrawHill, 5.ª edición. México.
10. Atlas RM 3ª ed. CRC Press; Boca Raton, FL: 2010. Manual de medios microbiológicos. [Google Scholar]
11. Kumar S. JP Medical Ltd; Nueva Delhi: 2012. Libro de texto de microbiología. [Google Scholar]
12. Bernal, G.; Illanes, A. y Ciampi, L. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, On line. [Consultado 18-06-2020]. Disponible en: <http://www/ejbiotechnology.info/content/vol5/1550c1/index.html>
13. Angulo-Cortés Jimena P, García-Díaz Anamaría, Pedroza Aura Marina, María Mercedes Martínez-Salgado, Viviana Gutiérrez-Romero. Diseño de un medio para la producción de un co-cultivo de bacterias fosfato solubilizadoras con actividad fosfatasa. *SICI: 2012, Vol. 17 N° 1: 43-52*
14. Corrales Ramirez, Lucía Constanza; Arevalo Galvez, Zuly Yurieth And Moreno Burbano, Vanessa Estefanía. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova.* 2014, vol.12, n.21, pp.68-79. ISSN 1794-2470.
15. Corrales Ramírez Lucía Constanza, Liliana Caycedo Lozano, María Angélica Gómez Méndez, Sonia Julieth Ramos Rojas, Jessica Natalia Rodríguez Torres. *Bacillus* spp: una alternativa para la promoción vegetal por dos caminos enzimáticos. *NOVA.* 2017; 15 (27): 45-65.
16. Corrales L., Ávila. S., Estupiñán. M., *Bacteriología Teoría y Práctica.* Bogotá- Colombia: Editorial Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca; 2013.
17. Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJ, Stewart CS, Flint HJ Requisitos de crecimiento y productos de fermentación de *Fusobacterium prausnitzii*, y una propuesta para reclasificarlo como *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., peine. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52: 2141–2146.
18. Dunn MS, Shankman S., Camien MN, Block H. Los requisitos de aminoácidos de veintitrés bacterias de ácido láctico. *J Biol Chem.* 1947; 168: 1–22.
19. Magdoub MN, Hassan ZM, Effat BA, Sadek ZI, Tawfik NF, Mabrouk AM Propiedades probióticas de algunas bacterias de ácido láctico aisladas de productos lácteos egipcios. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2015; 4: 758–766. [Google Scholar]
20. Wozniak RA, Fouts DE, Spagnoletti M, et al. Genómica comparativa de ICE: información sobre la evolución de la familia de ICE SXT / R391. *PLoS Genet.* 2009; 5 (12): e1000786. doi: 10.1371 / journal.pgen.1000786

21. Werkman CH, Wilson PW Academic Press Inc. ; Nueva York: 1951. Fisiología bacteriana. [Google Scholar]
22. Organización Panamericana de la Salud, Peligros Biológicos. Consultado junio 18 de 2020. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=en
23. Chodavarapu S, Kaguni JM. Iniciación de replicación en bacterias. *Las enzimas*. 2016; 39: 1-30. doi: 10.1016 / bs.enz.2016.03.001.
24. Surovtsev IV, Jacobs-Wagner C. Organización subcelular: una característica crítica de la replicación de células bacterianas. *Celular*. 2018; 172 (6): 1271-1293. doi: 10.1016 / j.cell.2018.01.014.
25. Peitz I, van Leeuwen R. Single-cell bacteria growth monitoring by automated DEP-facilitated image analysis. *Lab Chip*. 2010;10(21):2944-2951. doi:10.1039/c004691d.
26. Willis L, Huang KC. Dimensionar el ciclo celular bacteriano. *Nat Rev Microbiol* . 2017; 15 (10): 606-620. doi: 10.1038 / nrmicro.2017.79.
27. Kim K, Kim S, Jeon JS. Visual Estimation of Bacterial Growth Level in Microfluidic Culture Systems. *Sensors (Basel)*. 2018;18(2):447. Published 2018 Feb 3. doi:10.3390/s18020447
28. Georgiou PC, Mouton JW, Pournaras S, Meletiadis J. Cuantificación bacteriana en homogeneizados de tejidos de estudios farmacodinámicos in vivo utilizando curvas de crecimiento. *J Med Microbiol*. 2020; 69 (5): 676-684. doi: 10.1099 / jmm.0.001183.
29. Corrales L., González A., Ávila S., Conceptos Básicos de Microbiología. Bogotá- Colombia: Editorial Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2008.
30. Kim K, Choi D, Lim H, Kim H, Jeon JS. Examen in situ basado en marcadores de visión del crecimiento bacteriano en medios de cultivo líquidos. *Sensores (Basilea)*. 2016; 16 (12): 2179. Publicado el 18 de diciembre de 2016 doi: 10.3390 / s16122179
31. Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol Res*. 2019; 221:36-49. doi: 10.1016/j.micres.2019.02.001
32. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ 5ème edition. De Boeck Supérieur; Louvain-la-Neuve: 2018. Microbiología.
33. Madigan, m.t., Martinko j. M., Parker, J. Brock Biología de los microorganismos. 8va edición. Editorial Prentice Hall. Madrid 2002.
34. Marín B. Manual de química del agua. Editorial Universidad del Magdalena. Santa Martha. Colombia. 2009; 17.
35. Wijtzes T, McClure PJ, Zwietering MH, Roberts TA. Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int J Food Microbiol*. 1993;18(2):139-149. doi:10.1016/0168-1605(93)90218-6
36. Levar CE, Hoffman CL, Dunshee AJ, Toner BM, Bond DR. Redox potential as a master variable controlling pathways of metal reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *ISME J*. 2017;11(3):741-752. doi:10.1038/ismej.2016.146
37. Levar CE, Chan CH, Mehta-Kolte MG, Bond DR. An inner membrane cytochrome required only for reduction of high redox potential extracellular electron acceptors. *mBio*. 2014;5(6): e02034. Published 2014 Nov 25. doi:10.1128/mBio.02034-14
38. Singh S, Eldin C, Kowalczywska M, Raoult D. Axenic culture of fastidious and intracellular bacteria. *Trends Microbiol*. 2013;21(2):92-99. doi:10.1016/j.tim.2012.10.007
39. Volker Gurtier, Jack Trevors. *Methods in Microbiology*. Vol 45. Microbiology of Atypical Environments. Academic press – Elsevier . 2018. ISBN: 978-0-12-8181460-0

40. Dione N, Khelaifia S, La Scola B, Lagier JC, Raoult D. A quasi-universal medium to break the aerobic/ anaerobic bacterial culture dichotomy in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(1):53-58. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.032
41. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, Mediannikov O, Drancourt M, Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):208-236. doi:10.1128/CMR.00110-14
42. Atiaja Espin Diana Maribel Ramirez Guano Silvia Elizabeth. Trabajo de investigación Resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas presentes en el agua del río Chanchán. Riobamba – Ecuador 2019.
43. Jennifer T. Lau, Fiona J. Whelan, Isiri Herath, Christine H. Lee, Stephen M. Collins, Premysl Bercik, Michael G. Surette. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Medicine* (2016) 8:72. DOI 10.1186/s13073-016-0327-7
44. Vilaseca Méndez Juan C., Tamargo Martínez Isis, Pérez Monrrás Miriam. Producción y purificación parcial de la hemolisina principal (Neumolisina) de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 1999 Dic [citado 2020 Jun 25]; 51(3):160-165. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07601999000300004&lng=es.
45. Bakás L, Maté S, Vazquez R, Herlax V. E. coli alpha-hemolysin and properties. Chapter 4. En: Ekinici D, editor. *Biochemistry*. Rijeka (Croacia): InTech; 2012. p. 107-40.
46. Rodwell Victor W., David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, P. Anthony Weil. Harper. *Bioquímica ilustrada*, 30 ed. P
47. Xiaodong Wang, Tony Saba, Humphrey HP Yiu, Russell F. Howe, James A. Anderson, Jiafu Shi. Cofactor NAD (P) H Regeneración inspirada en vías heterogéneas. *Chem*, Volume 2, Issue 5, 11 de mayo de 2017 , páginas 621-654. [citado junio 25 de 2020]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451929417301754>
48. Chun-Hsing Liao, Chih-Cheng Lai, Meng-Shuiian Hsu, Fang-Yeh Chu, Mei-Yu Wu, Yu-Tsung Huang, Po-Ren Hsueh. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* determinados por la dilución de agar, difusión de disco y métodos Etest: comparación de resultados usando agar GC y agar chocolate. *Revista internacional de agentes antimicrobianos*. Volumen 35, Número 5 , mayo de 2010 , páginas 457-460.
49. Yen-Hung Liu, Yu-Tsung Huang, Chun-Hsing Liao, Po-Ren Hsueh. Antimicrobial susceptibilities and molecular typing of *neisseria gonorrhoeae* isolates at a medical centre in Taiwan, 2001–2013 with an emphasis on high rate of azithromycin resistance among the isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 51, Issue 5, May 2018, Pages 768-774 May 2018, Pages 768-774
50. Koneman, E. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª edición. Editorial medica panamericana. España. 2008.
51. Atiaja Espin Diana Maribel Ramirez Guano Silvia Elizabeth. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas presentes en el agua del río Chanchán. Riobamba – Ecuador 2019.
52. Shaw Carol E., Michele E. Forsyth, William R. Bowie, William A. Black. Identificación presunta rápida de *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) de medios de agar sangre humana. *Journal of Clinical Microbiology* Jul 1981, 14 (1) 108-110.
53. Alexander Swidsinski, Werner Mendling, Vera Loening-Baucke Sonja Swidsinski Yvonne Dörffel Jürgen Scholze bHerbert Lochs . Una biopelícula adherente de *Gardnerella vaginalis* persiste en el epitelio vaginal después de la terapia estándar con metronidazol oral. *Revista estadounidense de obstetricia y ginecología*. Volumen 198, Número 1 , enero de 2008, páginas 97.e1-97.e6 Enero de 2008 , páginas 97.e1-97.e6

54. Culture for urethral gonorrhea from asymptomatic men positive for neisseria gonorrhoeae by urine aptima combo 2 testing (Poster) Melanie Bisessor*. Melbourne Sexual Health Centre, Sexual Health, Carlton, Australia 10.1136/sextrans-2019-sti.692. https://sti.bmj.com/content/95/Suppl_1/A275.3?utm_content=americas&utm_campaign=usage&utm_medium=cpc&utm_source=trendmd
55. Amanda Beverly, Jill R. Bailey-Griffin, Jane R. Schwebke. Placas de agar InTray GC medio frente a agar Thayer-Martin modificado para el diagnóstico de gonorrea a partir de muestras endocervicales. JCM. Vol 38.10.3825-3826.2000
56. Corrales Ramírez LC, Sánchez Leal LC, Escucha Rodríguez FA. Determinación de la presencia de bacterias patógenas para el humano en aguas de riego en la cuenca alta de la sabana de Bogotá; D.C. Colombia. NOVA [Internet]. 31dic.2014 [citado 25jun.2020];12(22). Available from: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/277>
57. WO Grabow, M du Preez, Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol Media for Membrane Filtration Counting of Total Coliform Bacteria in Water. Applied and environmental microbiology, Vol. 38, No. 3. Sept. 1979, p. 351-358
58. Atiaja Espin Diana Maribel Ramirez Guano Silvia Elizabeth. TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Resistencia antimicrobiana de bacterias patógenas presentes en el agua del río Chanchán. Riobamba – Ecuador 2019.
59. Perçin D, Colakoğlu S, Durmaz S, Ekinçioğlu P. Rektal Sürüntü Örneklerinde Karbapenem Dirençli Klebsiella pneumoniae Taranmasında Klasik Yöntemlerle Ertapenemli EMB Besiyerinin Karşılaştırılması [Comparison of ertapenem-EMB Agar with traditional methods for screening carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae from rectal swabs]. Mikrobiyol Bul. 2012;46(4):546-552.
60. Cuamatzi Tapia Óscar, Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverte, 2004, p 50.
61. Guodong Zhang, Keith A. Lampel. Comparison of Chromogenic Biolog Rainbow Agar Shigella/Aeromonas with Xylose Lysine Desoxycholate Agar for Isolation and Detection of Shigella spp. from Foods. Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 8, 2010, Pages 1458–1465
62. J. M. Perez, P. Cavalli, C. Roure, R. Renac, Y. Gille, A. M. Freydiere. Comparison of Four Chromogenic Media and Hektoen Agar for Detection and Presumptive Identification of Salmonella Strains in Human Stools. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 41, No. 3. Mar. 2003, p. 1130–1134
63. Oliva-Menacho José Enrique, García-Hjarles Marco Antonio, Oliva-Candela José Arturo, De la Cruz-Roca Hugo Saturnino. Contamination of medical stethoscopes with pathogenic bacteria in a level III hospital in Lima, Peru. Rev Med Hered [Internet]. 2016 Abr [citado 2020 Jun 25]; 27(2): 83-88. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2016000200003&lng=es. <http://dx.doi.org/10.20453/rmh.v27i2.2842>.
64. Adrián J. Acuña, Cecilia F. Torres, Graciela N. Pucci, Oscar H. Pucci. Evaluación del tiempo de vida de bacterias potencialmente patógenas en sedimentos marinos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2011; 31:124-129.
65. Sejas Claros Alfredo, Zurita Céspedes Brian Iván, Rodríguez Álvarez María Ximena, Espinoza Amurrio Jhasmany Brian, Sejas Revollo Magaly. PREVALENCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN PORTADORES NASALES DEL PERSONAL DE ENFERMERIA - HOSPITAL VIEDMA. Rev Cient Cienc Méd [Internet]. 2016 [citado 2020 Jun 25]; 19(1): 29-33. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332016000100006&lng=es.

66. Gabriela Nogueira Viçosa Paula Mendonça Moraes Anderson Keizo Yamazi Luís Augusto Nero. Enumeración de *Staphylococcus* spp. Coagulasa y termonucleasas positivas. en leche cruda y queso blando fresco: una evaluación de agar Baird-Parker, agar de fibrinógeno de plasma de conejo y el sistema de conteo Petrifilm™ Staph Express. *Microbiología de Alimentos*, Volumen 27, Número 4, junio de 2010, páginas 447-452. Junio de 2010, páginas 447-452. [citado junio 25 de 2020], disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002009002846>
67. Angela Di Pinto, Valentina Terio, Lucia Novello, Giuseppina Tantillo. Comparación entre el agar tiosulfato-citrato-sal biliar sacarosa (TCBS) y CHROMagar Vibrio para aislar *Vibrio parahaemolyticus*. *Control de alimentos*. Volumen 22, Número 1, enero de 2011, páginas 124-127. [Citado 25 de junio 2020]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713510001957>
68. S Rishi , P Sinha , B Malhotra , N Pal. Un estudio comparativo para la detección de micobacterias por bactec MGIT 960, lowenstein jensen media y examen directo de frotis AFB. *Revista India de Microbiología Médica*, Año: 2007 | Volumen: 25 | Problema: 4 | Página: 383-386. [citado junio 20 de 2020]. Disponible: <http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2007;volume=25;issue=4;spage=383;epage=386;aulast=rishi>
69. Corrales LC, Antolinez Romero DM, Bohórquez Macías JA, Corredor Vargas AM. Identificación de microbiota bucal en caninos en estado de abandono. *nova* [Internet]. 15 de noviembre de 2019 [citado 25 de junio de 2020];17(32):39 -64. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/3632>
70. José Manuel Ruiz- Giardin, Mercedes Alonso, Jerónimo Jaquetti, Susana Sánchez, Teresa Saldaña, Antonio Zapatero. Diagnostic reliability of anaerobic blood cultures in bacteremias from a critical care unit. *Medicina Clínica*. Volume 132, Issue 19, 23 May 2009, Pages 729-734. [citado junio 20 de 2020]. Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775309005260>
71. M. R. Litterio Bürki, H. Lopardo. La anaerobiosis más allá de las bacterias anaerobias. Su importancia en la recuperación de microorganismos aerobios a partir de materiales purulentos. *Revista Argentina de Microbiología* (2010) 42: 102-107 ISSN 0325-7541 [citado 12 de junio de 2020]. Disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213014892007.pdf>