

1. LEVINE EMB AGAR.

El Agar EMB Levine es un medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de “Enterobacterias”.

Es un medio adecuado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos, a partir de muestras clínicas, aguas servidas, y otros materiales.

Está recomendado por la American Public Health Association, para el análisis microbiológico de productos lácteos y alimentos, y por la USP para la realización de los ensayos límite microbiológicos.

La fórmula original de este medio de cultivo, fue modificada por Levine, eliminando la sacarosa e incrementando la concentración de lactosa, lo que permite una mejor diferenciación de *E. coli*.

Es un medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de enterobacterias.

La combinación utilizada de eosina y azul de metileno, inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y de bacterias Gram negativas fastidiosas, y también, permite diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

Los microorganismos fermentadores de lactosa, originan colonias de color azulado-negro, con brillo metálico. Las colonias producidas por microorganismos no fermentadores de lactosa son incoloras. Algunas bacterias Gram positivas (cepas de estafilococos, enterococos) y levaduras, pueden crecer, originando colonias incoloras y puntiformes.

Este medio de cultivo, es útil para la orientación y no confirmación de especies bacterianas (ya que numerosas cepas de *Citrobacter spp.* producen colonias con brillo metálico), por lo cual será necesario realizar pruebas bioquímicas, para la identificación de género y especie.

Medio preparado: color púrpura con tonos verdosos, ligeramente opalescente con un precipitado floculento disperso.



FOTO 6. Medios de cultivo Levine EMG Agar.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	10.0	Suspender 37,4 g de polvo por litro de agua destilada, dejar reposar 5 minutos. Calentar a ebullición hasta disolución total. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 121°C.
Lactosa	10.0	
Fosfato dipotásico	2.0	
Agar	15.0	
Eosina	0.4	
Azul de metileno	0.065	
pH final: 7.1 ± 0.2		

TABLA 1. Fórmulas.

1.1. Siembra.

Directa, estriando la superficie.

1.2. Incubación.

De 18-24 horas a 35-37 °C, en aerobiosis.

1.3. Resultados.

Microorganismos	Crecimiento	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bueno a excelente	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Bueno a excelente	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bueno a excelente	Incoloras
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Bueno a excelente	Incoloras
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Pobre	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Pobre	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Bueno a excelente	Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Bueno a excelente	Incoloras

TABLA 2. Microorganismos.

2. AGAR VRB (VIOLET RED BILE)

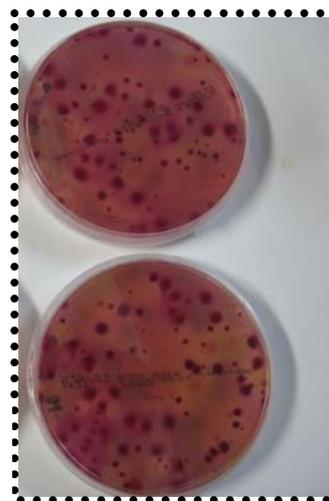
Agar selectivo para la demostración y enumeración de bacterias coliformes, especialmente *Escherichia coli* según Davis (1951) en agua, leche, helados, carnes y otros alimentos. Puede contener MUG optativamente.

El violeta cristal y las sales biliares inhiben el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva.

La degradación de la lactosa a ácido por la *E.coli* se pone de manifiesto por el viraje al rojo del indicador Rojo Neutro.

Las bacterias coliformes lactosa positivas incluyendo la *Escherichia coli* se manifiestan como colonias rojas rodeadas de un precipitado rojizo con un tamaño de 1 a 2 mm. En el medio con MUG las colonias de *E.Coli* se observan fluorescentes con una lámpara de UV de onda larga. Los *Enterococos* y *Klebsiellas* aparecen en este medio como colonias muy pequeñas (cabeza de alfiler) de color rosado. Las *enterobacteriáceas* lactosa negativas aparecen incoloras transparentes.

FOTO 7. Medios de cultivo VRB.



3. AGAR TCBS.

Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa fue propuesto por Nakanishi 1962 y modificado por Kobayashi 1963 para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros *Vibrios* enteropatógenos. Según Kampelmacher et al. 1969 este medio es recomendable para el aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en pescados.

La alta concentración de tiosulfato y citrato, más la alcalinidad del medio inhiben el crecimiento de las enterobacteriáceas. Las sales biliares inhiben la flora Gram positiva acompañante. Los indicadores Azul timol y Azul de bromotimol viran al amarillo en presencia de ácido.



FOTO 8. Medios de cultivo TCBS.

diámetro.

El *Vibrio parahaemolyticus* presenta colonias pequeñas con centro azul-verdoso. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, y otros se presentan con colonias azul-oscuro. Las enterobacteriáceas se visualizan como colonias muy pequeñas y traslúcidas.

La presencia de *Vibrio cholerae* y otros *Vibrios* enteropatógenos se visualizan en este medio por colonias planas, amarillas, de 2 a 3 mm de

4. MACCONKEY AGAR.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.



FOTO 9. Medios de cultivo MacConkey.

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

El medio preparado es de color rojo púrpura.

Fórmula (en gramos por litro)		Instrucciones
Peptona	17.0	Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Pluripeptona	3.0	
Lactosa	10.0	
Mezcla de sales biliares	1.5	
Cloruro de sodio	5.0	
Agar	13.5	
Rojo neutro	0.03	
Cristal violeta	0.001	
pH final: 7.1 ± 0.2		

4.1.
Sie
mbra.

Sembrar en superficie.

TABLA 3. Fórmulas.

Utilizando la técnica de Pour Plate: sembrar 1 ml de muestra y agregar aproximadamente 15 ml de medio de cultivo fundido y enfriado a 45-50°C.

4.2. Incubación.

Durante 18-48 horas, a 35-37 °C, en atmósfera aeróbica

4.3. Resultados.

Microorganismos	Colonias
Escherichia coli ATCC 25922	Rojas con halo turbio
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Rosadas mucosas
Salmonella typhimurium ATCC 14028	Incoloras, transparentes
Shigella flexneri ATCC 12022	Incoloras, transparentes
Proteus mirabilis ATCC 43071	Incoloras, transparentes
Proteus mirabilis ATCC 43071	Diminutas, incoloras, opacas

TABLA 4. Microorganismos.

4.4. Características del medio

Medio preparado: rojo púrpura

4.5. Almacenamiento.

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.