

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

MONOGRAFÍA Recuento en masa sin tener que perder el tiempo fundiendo agares

Esta es la historia del I+D más prolongado de MICROKIT contada por su protagonista, 23 años de lucha para conseguir lo que era imposible. El autor de esta monografía, biólogo por la Universidad Central de Barcelona, consiguió la máxima calificación en Ciencias Biológicas gracias a su tesis de licenciatura sobre algas marinas, de la que se extrajeron posteriormente dos publicaciones en la Universidad Complutense de Madrid. En efecto, el autor lleva 40 años trabajando en microbiología sólo porque sabía fabricar un derivado de las algas marinas.

1-Agar-agar microbiológico, ventajas e inconvenientes

El agar-agar microbiológico es un polímero procedente en su totalidad del alga marina *Gelidium sesquipedale*. Esta alga está limitada a las costas del Cantábrico español y, en menor medida, a las de Galicia, Portugal y Marruecos, siendo testimonial (y con talos de tamaño diminuto) en el Mediterráneo. Prácticamente todo el agar-agar microbiológico de los medios de cultivo de todo el mundo procede del Cantábrico español, salvo una producción muy limitada en México procedente de otra especie de *Gelidium* (*G.robustum*) que genera un agar-agar más blando. Hace una década se temía que no iba a haber suficiente producción y recolección



(arranque por buzos) de esta alga para satisfacer toda la demanda de medios de cultivo de todos los fabricantes del mundo. Y finalmente, hace ya unos años que hemos sobrepasado este límite. Se está intentando extraer un nuevo agar-agar microbiológico de otra especie de *Gelidium* de las costas de Asia, pero los resultados de momento no convencen. Los fabricantes de medios de cultivo se enfrentaron hace ya 5 años a dos opciones, por carencia de materia prima para todos (quizá recuerde el lector una época de carencia de agar-agar y subida de precio descomunal como la que hay ahora en muchos artículos por la pandemia):

- 1) La mayoría de fabricantes de medios de cultivo admitieron mezclas del agar-agar microbiológico con agar-agar alimentario (E-406) procedente de la también alga marina *Gracilaria confervoides*. El problema del agar-agar alimentario es que solidifica cuando baja del hervido hasta 55°C, no hasta los 45-47°C del agar-agar microbiológico. Eso va muy bien en la cocina para espesar cuanto antes, pero es fatal en microbiología: ya a 45°C se hacen inviables numerosos



microorganismos en la siembra por inclusión en masa, pero a 55°C los resultados son dramáticos:

recuentos muy por debajo de la realidad. Las mezclas de ambos agares reducen la exactitud en los recuentos, más cuanto mayor proporción de agar-agar alimentario haya en la mezcla y por tanto más barato sea el medio. Además generan grumos y una superficie de la placa con montañas y valles, igual que sucede con las placas preparadas en lugares ubicados a gran altitud sobre el mar (ej: 2.500 msnm, donde el medio hierve mucho antes de llegar a los 98°C, que es el punto de fusión del agar-agar). Lo que dificulta la siembra en estría o con asa Digralsky. También las marcas más baratas ofrecen medios con esporas procedentes de sucedáneos del agar-agar (generalmente son esporas de *Bacillus spp.pl.*) que provocan interferencias en los medios, falsos positivos y antagonismos en el crecimiento de los microorganismos diana.

- 2) Unos pocos, como MICROKIT, elegimos aceptar la imparable e inevitable subida de precios del agar-agar microbiológico puro y seguimos fabricando los medios como se llevaban haciendo toda la vida desde que cada autor los formuló, sin inventos aberrantes. Aunque eso significara seguir subiendo los precios igual que ha sucedido en la pandemia con las mascarillas, guantes, jeringas y otros muchos materiales. De ahí la diferencia de precios entre la mayoría de marcas y la nuestra. Si quiere seguir haciendo las cosas como los creadores de los medios los describieron, y no sucedáneos, debería plantearse usar sólo marcas como MICROKIT. Tenemos “tolerancia cero” con el uso de agar-agar alimentario en microbiología, lo mismo que las marcas muy baratas tienen “tolerancia cero” con el uso de agar-agar microbiológico en microbiología y emplean 100% agar-agar alimentario, con la consecuente nula calidad de sus medios. Somos el único fabricante de medios de cultivo que certifica la procedencia de su agar-agar con origen 100% de *Gelidium sesquipedale* del Cantábrico y Atlántico español. La diferencia en los resultados entre usar un buen agar-agar exento de inhibidores y uno barato es tan dramática que un recuento 10^4 ufc/mL puede llegar a caer a 10^2 ufc/mL e incluso a 0 ufc/mL.

Una de las propiedades del agar-agar microbiológico que siempre nos vendieron como una enorme ventaja los profesores de microbiología, es que había una gran distancia entre la temperatura de fusión (cerca de 100°C) y la temperatura de gelificación o solidificación (47°C), lo que permitía esterilizar al disolver y, a la vez, sembrar en masa al solidificar. Una visión del bosque desde lejos nos hizo comprender que eso no era su principal ventaja, sino precisamente su principal inconveniente. Y por este motivo, todos los laboratorios de microbiología del mundo llevan más de un siglo perdiendo cada día más de una hora en calentar y enfriar los medios de cultivo (1-2 horas de 8 horas de trabajo es hasta la cuarta parte del tiempo, algo absolutamente inaceptable).



Una de las formas más típicas de calentar agares: la placa calefactora con imanes que agitan el fondo. La otra más empleado es el baño maría. Algunos se atreven con el microondas, pero es muy fácil que hierva repentinamente y se salga de su recipiente

2-Más allá del agar-agar: soluciones a sus inconvenientes; 23 años de camino hacia el hidragar

Nunca fue una zancadilla a “mis alguitas” buscar otro polímero que sustituyese al agar-agar, más bien al contrario, llegará el día en que acabaremos dejando en paz las poblaciones de *Gelidium sesquipedale* en el sitio al que les llevó la evolución de miles de millones de años, en vez de esquilmarlas hasta rozar su extinción (como ya evitó el País Vasco al prohibir su recolección). Máxime tras ser conscientes de la afirmación del último párrafo del capítulo anterior: que este polímero es mejorable. Necesitábamos algo que no produjese extinciones de especies y no hiciera perder 1-2 horas al día a todos los laboratorios de microbiología del mundo: que pudiera sembrarse en masa a temperatura ambiente sin tener antes que hervirlo. No fue tarea fácil. Probamos todos los gelificantes conocidos (goma guar, goma xantana, goma garrofín, alginatos, carragenatos, gelrite, celulosa carmelosa...) y desconocidos, pero todos ellos presentaban problemas importantes que no presenta el agar-agar microbiológico: formaban geles demasiado blandos, turbios, grumosos, o las tres cosas a la vez. En una carrera multidisciplinar en la que nos ayudó el punto de vista de dos amigos químicos y uno farmacéutico, comprendimos que el nuevo producto debía polimerizar tridimensionalmente como el agar-agar, no en una o dos dimensiones como hacen casi todos los demás. Y de ahí acabó surgiendo lo que hemos llamado “hidragar”, completamente sintético y que no pone en peligro la continuidad de ninguna de nuestras especies “vecinas de planeta”.

No sabemos como lo consiguieron los colegas de Petrifilm-3M o CompactDry-Nissui, pero la principal diferencia de nuestro hidragar (el que usamos en nuestras DryPlates y también en nuestros Quanti-P/A), con los suyos, es que en nuestro caso las colonias son de aspecto idéntico a las producidas en los medios fabricados con agar-agar. Además nuestros medios

en DryPlates y en Quanti-P/A, no sufren durante su fabricación, calentamientos, hidrataciones-desechados, ni mezclas con alcohol ni con pegamentos. Eso sí, como en el caso de ellos, nuestro hidragar necesita una matriz que ayude en la polimerización y que en nuestro caso es un tejido textil de malla fina en vez de un cartón con film de cierre o una gasa. De modo que lamentablemente no se puede usar hidragar en el formato tradicional de botes de polvo de 500 g ¡hubiera sido el colmo del éxito!

3-Placas deshidratadas DryPlates®

Aunque no fuesen las primeras placas deshidratadas en aparecer (les preceden Petrifilm-3M y CompatDry-Nissui), sí que cumplimos nuestro objetivo de crear “un petrifilm en placa”, es decir, una placa que absorbiese 1 mL de muestra sin tener que estar calentando y enfriando agares. Pero además, son las únicas del mundo que permiten tanto la siembra en masa como la siembra en superficie por estría. Como sabemos, la siembra en masa es la que se emplea para realizar recuentos y la siembra en estría, la que se usa en la búsqueda de patógenos para aislar colonias tras un enriquecimiento. De modo que ambos tipos de siembra son imprescindibles en microbiología.



Recuento tras siembra en masa en Dry-Plates-TC

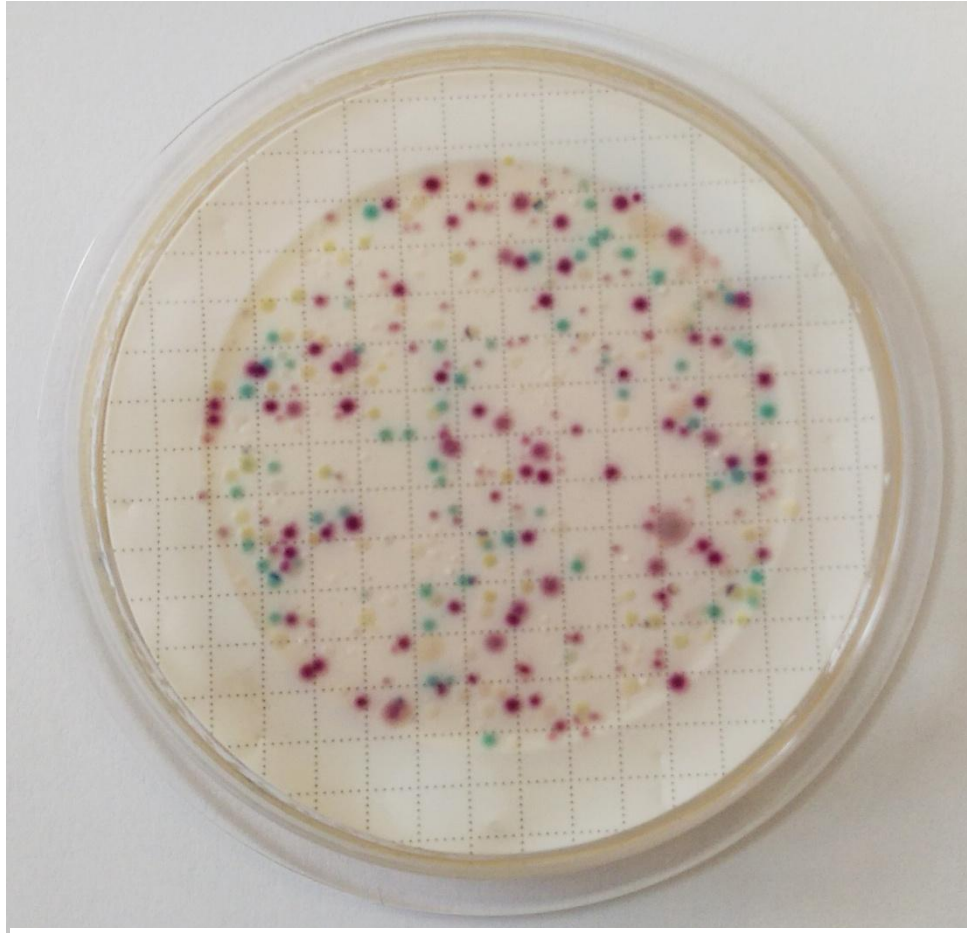


Aislamiento de colonias por estría tras enriquecimiento en Dry-Plates-BCPT

Otra ventaja de las DryPlates es la completísima gama de medios de cultivo que hemos desarrollado con hidragar y ofrecemos: 26 de los medios más frecuentemente usados por cualquier laboratorio de microbiología de alimentos, aguas, cosméticos y medicamentos, además de algunos medios de uso en microbiología clínica.

Ventajas comunes a las placas deshidratadas de otras marcas: larga caducidad de un medio listo para su uso inmediato, garantía de esterilidad, ahorro de espacio en almacén, incubación y desechos, uso de los medios más modernos, cromogénicos (enzimáticos en vez de bioquímicos), de la muestra a la estufa en 10 segundos...

Las ventajas adicionales de las DryPlates sobre las demás placas deshidratadas ya las hemos comentado: colonias idénticas a las de los medios agarizados y posibilidad de realizar ambos tipos de siembra: en masa con la solución madre y diluciones; y en superficie en estría con el caldo enriquecido, tras hidratarlas con 1 mL de agua estéril.



Colonias idénticas a las crecidas en medios clásicamente agarizados: arriba CCA-MugPlus en formato Dry-Plates®; abajo, Biggy Agar con Candida albicans, colonias visibles en las tres dimensiones



¿En qué sector tiene más éxito las DryPlates? En el cosmético, por el simple pero contundente hecho de ser las únicas que ofrecen todos los medios necesarios para este campo (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *E.coli*-Coliformes) aparte de los medios para otros emergentes del campo cosmético, como los enterococos fecales.

4-Quanti-P/A (QPA)

Los anaerobios necesitaban que les hiciéramos caso de una vez en su reclamación “el aire nos mata no sólo al incubar, también mientras se realiza el análisis” e ideamos, gracias al hidragar, el unico sistema del mundo capaz de enumerarlos sin las enormes mermas de recuento de los sistemas clásicos, y encima sin necesidad de atmósfera anaerobia durante su incubación, sin reversión del color de las colonias, en muestras de 100 mL de agua (extrapolables también a 1 g de muestra sólida diluida en 99 mL de agua estéril). Las bolsas QPA contienen medio de cultivo en polvo con hidragar para solidificar a temperatura ambiente y hay dos referencias principales: la de TSC para *Clostridium perfringens* y la de SPS para clostridios sulfito-reductores. Se puede abrir el tapón tras la incubación para “pescar colonias” e identificarlas, con otra ventaja sobre las placas de TSC: el ennegrecimiento no revierte.



Linealidad en los recuentos de Clostridium perfringens en QPA, único método que demuestra detectar el número correcto de ufc's de anaerobios estrictos, porque tiene en cuenta la letalidad del aire para ellos desde el primer instante del análisis

5-¿Cómo vemos el futuro de las DryPlates® y los QPA?

Si estos dos inventos cayeran en manos de una multinacional del sector, nuestra frase “algún día, todos los laboratorios usarán hidragar” sería ya una realidad. Pero no es fácil dar con las personas adecuadas de una multinacional para que conozcan inventos ajenos a sus propias compañías. De modo que siendo una micropime, seguiremos poco a poco, como hormigas, ganando terreno día a día, laboratorio tras laboratorio.