

ESTUDIOS SOBRE LA CADUCIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS HERMÉTICOS

Laboratorios MICROKIT, S.L. Pto.Navacerrada, 30, 28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)

INTRODUCCIÓN:

La caducidad que se ha venido otorgando en bibliografía y en normativa a los medios de cultivo preparados, habitualmente de 3 semanas a 2 meses, procede de una deformación originada en microbiología clínica (del mismo modo que la deformación según la cual todos los medios de cultivo deben almacenarse a temperatura de refrigeración de 2-8°C, cuando la mayoría se conservan mejor a 15-25°C), donde el medio preparado es sinónimo de placa preparada; en otros campos (microbiología alimentaria, farmacéutica, cosmética y ambiental) es mucho más útil el medio preparado en tubo, en vial o en frasco, bien porque se necesitan más medios líquidos para enriquecer o tratar las muestras o seleccionar la flora acompañante, bien porque muchas siembras en agares deben hacerse en masa o en profundidad, donde la placa preparada resulta inútil. La placa preparada clásica no puede tener un periodo de caducidad más prolongado porque el formato de la placa Petri o de la placa de contacto convencionales acelera la **deseccación del medio**. Con la reciente salida al mercado de las placas herméticas de MICROKIT, donde el cierre entre las dos caras de la placa es hermético, este concepto vuelve a ser revisado (es probable que la caducidad de las placas herméticas alcance a la de tubos, frascos y viales; a la fecha de envío de esta publicación a prensa, Marzo de 2003, ¡ya se ha demostrado superior a 6 meses!). Sin embargo, los ya clásicos tubos, frascos, viales y ampollas preparados, con tapón a rosca hermético, aparecen ya en los catálogos de distintos proveedores con periodos de caducidad media de 1 año.

En MICROKIT nos propusimos, hacia el año 1998, a estudiar más a fondo, medio por medio, cuáles eran las variables que más afectaban a la pérdida de propiedades de los medios preparados herméticos. Para ello se fueron guardando muestras de nuestros fabricados conforme se elaboraban lotes normales de cada medio de cultivo, y se fueron controlando a los 6 meses, a los 9 meses, al año, a los 18 meses y a los 2 años, de modo que el estudio completo abarcó **desde Enero de 1999 hasta Diciembre de 2002**. Resaltamos desde el principio que, lógicamente, el estudio se ha realizado exclusivamente con los envases de tubos, viales y frascos de MICROKIT, que resultan ser las materias primas más caras del mercado por ser las más herméticas, con cierres muy perfeccionados, gracias a los elastómeros y a las juntas de silicona entre el tapón y la rosca de vidrio. Por ello, los resultados obtenidos no serán extrapolables a otras marcas de medios preparados, que utilizan tapones de otros materiales (plástico, baquelita, a veces incluso sin junta tórica) más económicos por ser menos herméticos.

RESULTADOS:

Los 5 parámetros que se han estudiado, por resultar los más críticos (una vez eliminada la posibilidad de desecación mediante la hermeticidad del cierre) son:

1-**Esterilidad** a largo plazo: La esterilidad a largo plazo ha sido siempre correcta, al depender, en nuestro caso exclusivamente, de la hermeticidad del tapón, por lo que no se incluye en la tabla de resultados. Hay que tener en cuenta los microorganismos de crecimiento extremadamente lento, porque han sido sometidos a un gran stress, al proceder del aire, en otros medios de cultivo que no sean perfectamente herméticos.

2-Variación con el tiempo del **pH** (por acción del O₂ y del CO₂ del aire contenido en el envase): Se observan variaciones aleatorias en los pHs, independientes a menudo del medio del cultivo y del tipo de envase, tanto al alza como a la baja. Al ser el vidrio utilizado en los medios preparados MICROKIT de calidad farmacéutica, debemos atribuir dichas variaciones a la diferente concentración del O₂ y del CO₂ del aire contenido en el envase. A raíz de estos resultados, dejamos de utilizar los ozonizadores de fábrica, para minimizar estas variaciones. En los medios no herméticos, sometidos a atmósferas más cambiantes, este factor debe ser mucho más importante, por ejemplo a causa de la nieve carbónica, extremadamente acidificante, de los congeladores,

y sobre todo a la necesidad de almacenamiento en nevera, donde el aire penetra mucho mejor en los medios de cultivo. Por ello los medios para anaerobios (Thioglicolato FTM, TSC, TSN, SPS, RCM, m-CP, Anaeroteca...) no deben guardarse en nevera, ya que su extremada oxigenación los puede llegar a convertir en inhibitorios. En este estudio no ha habido ningún medio donde la variación de pH haya sido tan elevada, que haya afectado a la capacidad de crecimiento/inhibición de las cepas. En la tabla de resultados, se especifica la máxima variación de pH, a veces enorme, de cada medio durante su periodo de caducidad máxima, en la columna denominada “) pH”.

3-Cómo afectan la **luz** y las radiaciones gamma (☉) esterilizantes: En cambio, el factor que más hemos notado que afecta a la caducidad del medio es la luz, por lo que a partir de ahora en todas las etiquetas de medios preparados MICROKIT, junto a la temperatura de conservación, se incluye el recordatorio de almacenar ¡EN OSCURIDAD!. Resulta suficiente guardar los medios en la caja original de MICROKIT, siempre que esté bien cerrada. Sin embargo, lo ideal es guardar dichas cajas en un armario bien cerrado, al abrigo de la luz. Los medios que más afectados se ven por la exposición a la luz son los que tienen colorantes o los que generan colonias coloreadas (cromogénicos). En la mayoría de casos el color del medio y/o de las colonias pierde intensidad y nitidez, y a veces incluso el medio se vuelve absolutamente inhibitorio (Rosa Bengala Caf. Agar). Por todo ello, la irradiación por rayos Gamma a 25 KGy, que se utiliza para esterilizar medios, resulta inviable en todos los medios coloreados. Sólo algunos resisten bien dosis más bajas, pero en tal caso la esterilidad queda mucho menos garantizada. En la tabla de resultados, se especifican los medios que han quedado afectados por la luz/irradiación con un “*” en la columna denominada “luz/☉”. Marcamos con 2 ó 3 * los medios donde la luz resulta un factor crucial.

4-Crecimiento y recuento de las **cepas** adecuadas (fertilidad) e inhibición de las inadecuadas al medio (selectividad): Este es, evidentemente, el parámetro que define, con la máxima categoría, la caducidad final. Se han utilizado todas las cepas que se especifican en el manual de medios de cultivo MICROKIT para cada medio de cultivo, y en el caso de falta de crecimiento o de merma en el recuento de alguna de ellas en el test de fertilidad, o en el caso de crecimiento de alguna de ellas en el test de selectividad, el medio se daba por estropeado en la fecha del análisis, atribuyéndole entonces la caducidad máxima anterior donde los test de fertilidad y de selectividad sí habían resultado satisfactorios, y siempre que no hubiera habido degeneración en los otros parámetros estudiados. Los caldos se agarizaron en el momento del análisis para detectar también en ellos si había mermas en los recuentos con respecto a los blancos (= medios MICROKIT recién preparados). La columna denominada “**CADUCIDAD MÁXIMA DETECTADA**” en la tabla de resultados es la que incluye este período máximo detectado durante el cual las cepas se comportan correctamente en el medio y no hay otros problemas.

5-**Aspecto** del medio (precipitados, grumos, decoloración, artefactos...): Se observó el aspecto visual del medio para detectar posibles degradaciones que no dependieran de los otros 4 parámetros estudiados. En general, la mayoría de los medios para enterobacterias, con bilis, forman al cabo de un año precipitados radiales que se pueden confundir con pequeñas colonias de mohos. La recuperación de estos medios precipitados es deficiente. Endo forma precipitados mucho antes, pero a pesar de ellos recupera correctamente. Por otra parte, los medios Presencia/Ausencia, al estar preparados a elevada concentración, forman precipitados o grumos cuando se almacenan o transportan por debajo de 10°C, pero la fertilidad y selectividad, en estos medios P/A visualmente alterados, resultaron correctas. Los otros medios que a veces contienen artefactos que no afectan al resultado, se indican también en la tabla de resultados, marcándolos todos con un “&” en la columna denominada “**Aspecto**”.

En los resultados obtenidos encontramos unos pocos medios que no resisten la caducidad que previamente se les atribuyó, en alguno de los 5 parámetros estudiados; pero también encontramos varios medios que no sólo resisten perfectamente la caducidad máxima estudiada de 2 años, sino que además se comportan como el buen vino, cuanto más viejos mejores resultados proporcionan, con crecimientos más exuberantes y rápidos, colores más intensos y brillantes... Gracias a estudios previos de comportamiento del medio hermético, se atribuía a los medios generales, una caducidad máxima de 2 años y a los medios con agentes inhibidores y/o con colorantes, una caducidad máxima de 1 año. En la tabla final de caducidades

máximas recomendadas (que son las que se aplican ya desde el catálogo y el etiquetado MICROKIT 2003, a raíz de este estudio) marcamos **en negrita** los medios que gozan de variaciones al alza con respecto a la caducidad previamente aceptada como máxima; y hemos marcado *en cursiva* los medios que sufren variaciones a la baja con respecto a la caducidad previamente aceptada como máxima. No ha habido diferencias entre las 3 presentaciones estudiadas (tubos, frascos y viales). La tabla final de resultados de caducidad máxima de cada medio, queda como sigue:

MEDIO DE CULTIVO y su UTILIDAD	pH	Luz/(CADUCIDAD MAXIMA DETECTADA (MESES)	Aspecto
Alkaline Vibrio Broth	-0,03		24	
Bacillus cereus MOSSEL P.R.E.P. Agar (base)	+0,10	**	12	&
BAIRD PARKER Agar (base) (Estafilococos)	-0,61		12	
<i>Brain Heart Infusion Broth</i>	-0,65		12	
Brilliant Green Agar (Salmonella)	-0,40	*	12	&
Brilliant Green Bile 2% Broth (Coliformes)	-0,50	*	12	
Bryant Burkey Broth paraf. (Clostr.tyrobotiricum)	-0,20	*	12	&
Buffered Peptone Water (Diluciones, Salmonella)	+0,53		24	
Campylobacter Preston Selective Agar	-0,20		12	
Candida-Nickerson-BIGGY Agar	+0,20	***	24 (Nota 1)	&
Carbonato Ca-G.L. Agar (Acéticas)	-0,50	*	12	&
Cetrimida Glicerol Agar (Pseudomonas)	+0,14		12	
Cetrimide Pseudomonas Broth	+0,12		12	&
Chapman TTC Agar Tergitol 7 (E.coli+Coliformes)	-1,20	*	12	&
Chapman TTC Broth Tergitol 7 (E.coli+Coliformes)	-0,21	**	12	&
CHROMOSALM MICROKIT Agar (Salmonella)	+0,12	*	12	
Cooked Meat Medium parafinado	+0,15		12	
Dermatophyte TAPLIN Medium	-0,30	*	12	
DTA Polymixin Agar (Bacillus)	-0,43	*	12	&
Dextrose Tryptone Broth	-0,56	**	12	&
DNA-asa Azul de Toluidina Estafilococos	+0,12	*	12	&
E.coli +/- COLICULT MCC	-0,07	*	12	
E.coli O157 Novobiocin Broth	+0,07		12	
EE Broth MOSSEL (Enterobacterias)	-0,25	*	12	
ENDO Broth (Coliformes totales+E.coli)	-0,23	***	12	&
Hektoen Enteric Agar (Enterobacterias)	-0,45	*	12	&
O/F HUGH-Leifson Glucosa, Semisólido	-0,26	*	12	
KAA Agar (Estreptococos/Enterococos Fecales)	+0,26	*	24 (Nota 2)	
KAA Broth (Estreptococos/Enterococos Fecales)	-0,10	*	24	&
KIA-Kligler Iron Agar inclinado pico corto	-0,14	*	9	&
Lactose Broth (Coliformes)	+0,44		24	
Lactose Sulfite Citr.Broth (Cl.perfringens)	+0,23		12	
Lauryl Sulfate Broth (Coliformes)	-0,20		12	
Legionella BCYE Agar Base	-0,36		24	
Levine EMB Agar (Coliformes)	+0,32	*	24 (Nota 3)	&
Lethen LPT Broth Neutralizing Incol.(Dil.Cosmético)	-1,10		24	&
Lethen T.L.Histidin Broth (Diluciones Cosmética)	-0,87		24	&
LIA-Lysine Iron Agar inclinado pico corto	-0,15		9	&
Listeria Enrichment LOVETT Broth LEB	-0,13	*	12	
Listeria Fraser Broth p/enriq.secundario	-0,23	*	12	
Listeria PALCAM Agar Base	-0,31	*	12	
Listeria MICROBLUE Agar Base	-0,24	*	12	
<i>LPT Agar Neutralizing Purple (Rto. En ambiente)</i>	-0,78	***	9	&
Mac Conkey Agar (Coliformes)	+0,22	**	24	&
Mac Conkey Agar MUG (E. coli)	-0,62	**	24	&
Mac Conkey Broth Purple (Coliformes)	-0,33	***	12	&
Mannitol Salt Agar s/Chapman (Estafilococos)	-0,40	*	12	
Mannitol Salt Broth (Estafilococos)	-0,32	*	12	&
MRS Agar (Lactobacilos)	-0,09		24	
MRS Broth (Lactobacilos)	-0,12		24	
MUELLER HINTON Agar (Antibiograma)	+0,11		24	
MUG PLUS Cefs.Cromogen Agar (Colif.+E.coli)	+0,60	*	12	&

MEDIO DE CULTIVO y su UTILIDAD	pH	Luz/(CADUCIDAD MAXIMA DETECTADA (MESES)	Aspecto
MUG PLUS Cefs.Cromogen Broth (Colif.+E.coli)	+0,10	*	12	&
m-CP Agar (Cl.perfringens)	+0,05	**	12	
m-CP Broth (Cl.perfringens)	+0,11	**	12	&
m-FC Broth (Coliformes fecales)	-0,20	**	12	&
m-Green Yeast & Moulds Broth (Hongos acidóf.)	+0,04	*	12	
m-TGE Broth (Recuento total)	-0,28		24	
Nitrate Broth BASE (Test de reducción de nitratos)	-0,21		12	
Nutrient Agar (Rto.total)	-0,20		24	
Nutrient Agar con TTC y con Inactivadores del Cloro	-0,45		24	
Nutrient Broth (Caldo Común)	+0,12		24	
Orange Serum Agar (Alterativos zumos-mermeladas)	-0,17	*	12	&
Orange Serum Broth (Alterativos zumos-mermelada)	-0,21	*	12	&
O/F Hugh Leifson Glucosado, semisólido	-0,48	*	12	
PCA-Plate Count Agar (Recuento Total)	+1,18		24	
Peptone Water (Agua de TRIPTONA)	0,00		24	
Potato Dextrose Agar PDA	+2,13		24	
<i>Rappaport Vassiliadis Soja Broth (Salmonella)</i>	-0,04	***	9	&
RINGER Solución 1/4 (Diluciones)	-0,39		24	
Rosa Bengala Cloranf.Agar (Hongos ambiente)	-0,62	***	24	
Rosa Bengala Cloranf.Broth (Hongos ambiente)	-1,82	***	24	
R2 Oligotrophic Agar (Rto.optimizado aguas puras)	+0,34		24	
R2 Oligotrophic Broth (Rto.optimizado aguas puras)	-0,18		24	
Saboraud Dextrose Cloranfenicol Agar (Hongos)	-0,23		12	
Saboraud Dextrose Cloranfenicol Broth (Hongos)	-0,34		12	
Saboraud Dextrose Agar (Hongos)	-0,25		12	
Saboraud Dextrose Broth (Hongos)	-0,53		12	
Schaedler Agar parafinado (Anaerobios)	+0,19		12	
Schaedler Broth (Anaerobios)	+0,24		12	
<i>Selenite Cystine Broth Salmonella y Shigella</i>	-0,21	*	9	&
SIM Movilidad Agar Semisólido	-0,34	*	12	
Slanetz Bartley TTC Agar (Enterococos)	-0,04	*	12	&
Slanetz Bartley TTC Broth (Enterococos)	-0,12	*	12	&
Sorbitol MacConkey Telur.-Cefix. E.coli O157 Agar	-0,17	*	12	
SPS Agar (Clostridios Sulfito-Reductores)	-0,16		12	
SPS Agar parafinado	-0,65		12	
SPS Broth	-0,23		12	
Sulfate API Desulfovibrio Agar (Reductores Sulfato)	-0,93	*	12	
SS-Salmonella Shigella Agar	-0,13	*	12	&
SS-Salmonella Shigella Broth	-0,20	*	12	&
TCBS Vibrio cholerae Agar	-0,14	*	12	
TCBS Vibrio cholerae Broth	-0,28	*	12	
Tetrionato Mueller Kauffmann Broth (Salmonella)	0,00		12	
Thioglicolato FTM Resazurin (Esterilidad)	-0,20	*	12	&
Thioglicolato FTM Resazurin Penasa (Esterilidad)	-0,26	*	12	&

<i>Todd Hewitt Select. Broth (Streptococcus agalactiae)</i>	-0,60	*	9	
Tomato Juice Agar TJA (Acidolácticas)	+0,20	*	24	&
Tomato Juice Broth (Acidolácticas)	-0,05	*	24	&
TJA-Cisteína (Leuconostoc)	+0,12	*	24	&
Tributyryn Agar (Lipolíticos)	-0,81		24 (Nota 4)	
TSA-Tryptic Soy Agar	+0,22		24	
TSB-Tryptic Soy Broth (Esterilidad)	-0,32		24	
TSB-Tryptic Soy Broth Penasa (Esterilidad)	-0,29		24	
MEDIO DE CULTIVO y su UTILIDAD) pH	Luz/(CADUCIDAD MAXIMA DETECTADA (MESES)	Aspecto
TSI Triple Sugar Iron Agar	-0,12	*	12	&
TSN+C (Clostridium perfringens y sus esporas)	-0,28		12	&
Vibrio Teepol Broth	-2,43	**	12	&
VRBG Agar (Enterobacterias)	+0,74	**	12	&
VRBL Agar (Coliformes)	+0,64	**	12	&
WL Nutrient Broth	+0,02	*	12	
XLD Agar (Salmonella-Shigella)	-0,58	*	12	&
Yersinia CIN Agar	-0,34	*	12	&
Yeast Extract Agar (Rto. Aguas)	+0,75		24	

- (1) *Candida albicans* pigmenta con colonias de un pardo más intenso
- (2) Enterococcus ennegrece más rápido en el medio más viejo y aumenta su recuento en un 50%
- (3) *E. coli* brilla con más intensidad
- (4) *St. aureus* realmente dorado y con el mayor halo de lipólisis detectado jamás

En general, los medios de color crema oscurecen, sin afectar esto a los resultados. Los medios agarizados mantienen mejor sus colores que los correspondientes caldos, de modo que se concluye que el agar actúa como conservante.

CONCLUSIONES:

La tabla de resultados muestra la caducidad máxima detectada para cada medio de cultivo preparado, 100% hermético, teniendo en cuenta que no se ha podido ampliar el estudio por encima de 2 años, por agotamiento de las muestras, al no haberse considerado desde un principio que la caducidad de algunos medios pudiera ser mayor de este límite, aunque a la vista de los resultados es probable que algunos medios generales puedan gozar de caducidades aún mayores. Aparte de dichos medios generales, hay otros 16 medios que amplían su caducidad a 2 años en los envases herméticos de MICROKIT: Biggy Candida, KAA Agar, Lactose Broth, Legionella BCYE Agar Base, Levine EMB, MacConkey Agar, MacConkey Agar MUG, MRS Agar, MRS Broth, Potato Dextrose Agar, Rosa Bengala Caf. Agar, Rosa Bengala Caf. Broth, Tomato Juice Agar, Tomato Juice Broth, Tomato Juice Cistein Agar, Tributyrin Agar. En cambio otros 5 medios reducen su caducidad a 9 meses incluso en los envases herméticos de MICROKIT: BHI Broth, LPT Neutralizing Agar Purple, Rappaport VS Broth, Selenite Cystine Broth y Todd Hewith Selective Broth.

Los envases herméticos utilizados por MICROKIT (tubos, frascos, frascotes y viales) mantienen la esterilidad en el 100% de los medios estudiados y para el periodo completo de 2 años de estudio.

Habría que ampliar enormemente las tolerancias de pH de los medios preparados, porque incluso en medios tan tamponados como un Agua Peptonada Tamponada, variaciones tan importantes como 0,53 puntos de alcalinización no han afectado a ninguna de las cepas de control. Las variaciones más importantes, de más de 1 punto de pH, se han observado en el caldo hipersalino para Vibrio Teepol, con una acidificación de 2,43 puntos, Potato Dextrose Agar, con alcalinización de 2,13 puntos, Caldo Rosa Bengala Caf, con acidificación de 1,82 puntos, Chapman TTC Agar con acidificación de 1,20 puntos, PCA con alcalinización de 1,18 puntos, y Lethen Broth con acidificación de 1,10 puntos, y ni siquiera en estos casos tan extremos las cepas de control se vieron afectadas. A la vista de estos

resultados, queda patente una vez más la definición clásica de medio de cultivo, que habla de una “mezcla caótica de componentes donde, por ejemplo, el simple hecho de agregar los componentes en distinto orden según los diferentes lotes, puede producir resultados diferentes, incluso antagónicos”. Esta afirmación es muy tenida en cuenta en los procedimientos de fabricación de MICROKIT desde sus comienzos hace ya casi 15 años.

Todos los medios se ven afectados por la luz/irradiación gamma-25 KGy, de forma importante, sobre todo los coloreados o con sustratos cromogénicos. Los más afectados son: Bacillus cereus Agar Mossel, Biggy Candida Agar, Chapman TTC Broth, Dextrose Tryptone Broth, Endo Broth, LPT Neutralizing Agar Purple, MacConkey Agar, MacConkey Agar MUG, MacConkey Broth Purple, m-CP Agar, m-CP Broth, m-FC Broth, Rappaport VS Broth, Rosa Bengala Caf.Agar, Rosa Bengala Caf.Broth, Vibrio Teepol Broth, VRBL Agar y VRBG Agar. Los medios sin colores (blanco, crema, paja, ámbar...) y sin sustratos cromogénicos, se oscurecen al cabo del tiempo cuando se guardan en la oscuridad, sin que esta eventualidad afecte los resultados de crecimiento de las cepas adecuadas. Todas las etiquetas de medios preparados MICROKIT incluyen el recordatorio de que deben mantenerse en la oscuridad.

Los medios cuyo aspecto se degrada con el tiempo, con precipitados o grumos, pero sin llegar a afectar los resultados de crecimiento/inhibición de las cepas adecuadas dentro del periodo de caducidad marcado, siempre que se hayan mantenido en la oscuridad, son: Bacillus cereus Mossel Agar, Brilliant Green Agar, Bryant Burkey Broth, Candida Agar, Carbonato Agar, Ceftriaxone Broth, Chapman TTC Agar, Chapman TTC Broth, DTA, Dextrose Tryptone Broth, DNA-Asa Agar, Endo Broth, Hektoen Agar, KAA Broth, KIA, Levine EMB, LIA, LPT Agar Neutralizing, Mac Conkey Agar, MacConkey Agar MUG, MacConkey Broth Purple, Mannitol Salt Broth, MUGPLUS Cfs.Agar, MUGPLUS Cfs.Broth, m-CP Broth, m-FC Broth, Orange Serum Agar, Orange Serum Broth, Rappaport VS Broth, Selenite Cystine Broth, Slanetz Bartley Agar, Slanetz Bartley Broth, SS Agar, SS Broth, Thioglicolato FTM, Tomato Juice Agar, Tomato Juice Broth, Tomato-Cisteina Agar, TSI Agar, TSN+C Agar, Vibrio Teepol Broth, VRBG Agar, VRBL Agar, XLD Agar y Yersinia CIN Agar.

Por fin, resaltamos que las temperaturas idóneas de conservación de los medios preparados herméticos de MICROKIT son 10-21°C, sin cambios bruscos, excepto para algunos medios con componentes muy termolábiles, para los que la conservación óptima será de 4-8°C. Todas las etiquetas de medios preparados MICROKIT incluyen el recordatorio de la temperatura a la que deben mantenerse: 4-25°C (indiferente, a conveniencia del usuario), 15-21°C (mejor a la temperatura ambiente de una sala, con aire acondicionado en verano, pero no en nevera), o bien 4-8°C (refrigerado en nevera).

Confiamos que este estudio sea de la máxima utilidad para los laboratorios acreditados que utilizan los medios de cultivo preparados y herméticos de MICROKIT, así como para todos los demás clientes y potenciales de esta empresa, a los que va dedicado.

Añadimos dos gráficos para mejor visualización de la incidencia relativa de cada uno de los factores estudiados en la caducidad general de los medios preparados, sean herméticos (gráfico 2) o no (gráfico 1).