

Especificación

Medio de cultivo sólido, selectivo y diferencial para la detección de coliformes totales y *E. coli* en muestras de aguas por el método de membrana filtrante.

Presentación

	Encajado	Caducidad	Almacenamiento
30 Placas Filtración Placas filtración 55 mm con: 9 ± 1 ml	1 caja que contiene: 6 bolsas de plástico con 5 placas de 55 mm ø /bolsa.	2 meses	2-25 °C

Composición

Composición (g/l):	
Peptona.....	3,000
Cloruro sódico.....	5,000
Dihidrógenofosfato de sodio x 2H ₂ O.....	2,200
Hidrógenofosfato disódico.....	2,700
Sodium pyruvate.....	1,000
L-Triptófano.....	1,000
Sorbitol.....	1,000
Tergitol® 7.....	0,150
Cefsulodina.....	0,005
Vancomicina.....	0,005
Cromogenico β GLU substrato.....	0,200
Cromogenico Salmon GAL subt.....	0,200
Agar.....	13,000

Descripción/Técnica

Descripción:

La acción combinada de la peptona, el piruvato y el sorbitol permiten una rápida formación de colonias en este medio tamponado con los fosfatos y ajustado osmóticamente con el cloruro sódico, facilitando el crecimiento incluso de bacterias coliformes muy estresadas. La selectividad se consigue, en parte, con el Tergitol® 7 que reprime el crecimiento de las bacterias Grampositivas y algunas Gramnegativas sin afectar apenas a las coliformes. Pero lo que realmente confiere selectividad al medio es la presencia de cefsulodina que inhibe el desarrollo de los pseudomonas y otras bacterias Gramnegativas oxidasa-positivas y la vancomicina que impide el crecimiento de los enterococos y otros Gram positivos. La diferenciación colonial se consigue con la mezcla cromogénica que esta constituida por dos sustancias. El 6-cloro-3-indoxil-b-D-galactopiranosido (Salmon®-GAL) y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-b-D-glucuronido (X-Glucuronido). La primera de ellas es selectivamente degradada por un enzima característico de los coliformes, la b-D-galactosidasa, provocando que la colonia de coliformes adquiera un color que va del salmón al rojo, en función de la intensidad de la actividad enzimática. La segunda sustancia cromogénica es atacada por la b-D-glucuronidasa, un enzima que presentan todas las cepas de *E. coli*, de forma casi exclusiva y que libera un pigmento azulado que tiñe la colonia de tonos azules. *E. coli* posee los dos enzimas y ataca los dos sustratos cromogénicos con lo cual la colonia se tiñe de un color azul oscuro a violáceo como resultado del acúmulo de los dos pigmentos liberados. Los coliformes totales se consideran la suma de colonias de *E. coli* (azul oscuro-violeta) más las de coliformes (salmón-rojo). Las otras colonias de bacterias Gram negativas aparecen incoloras, excepto algunas pocas capaces de producir glucuronidasa, que dan colonias de color azul claro a azul turquesa y que se diferencian bien de las de *E. coli* o de las coliformes. En cualquier caso, es recomendable verificar la identidad de *E. coli* por la producción de indol, ya que el triptófano se ha incluido en el medio con ese fin. Para ello se cubre la colonia azul oscuro-violeta con una gota del Reactivo de Kovacs para Indol. Si el reactivo vira a un color rojo cereza en pocos segundos se considera la producción de indol positiva y con ello la presencia de *E. coli* queda confirmada. Si el Agar Cromogénico para Coliformes se utiliza para la incubación de membranas filtrantes deberá tenerse en cuenta que el color y tamaño de las colonias puede modificarse por la composición y tipo de la membrana por lo cual se recomienda una validación previa del tipo de membrana filtrante utilizada. Este medio ha sido aceptado oficialmente por el Ministerio de Sanidad y Consumo de España como método alternativo para el análisis microbiológico del agua de consumo humano.

Limitaciones del procedimiento:

La producción de β-galactosidasa, aun siendo común a todas las coliformes, varía de una cepa a otra viéndose influida por la temperatura y tiempo de incubación. A temperaturas superiores a los 37°C su producción disminuye, provocando una pérdida de intensidad del color rojizo, al mismo tiempo que se acentúan los tonos azulados en las cepas de *Escherichia coli*.

Si se utiliza el método de filtración a través de membrana, hay que tener en cuenta que la naturaleza y características de la membrana filtrante utilizada también influye sobre el tamaño y coloración de las colonias crecidas sobre este medio de cultivo.

Técnica:

La muestra de agua se filtra a través de una membrana de 0,45 µm de diámetro de poro, validada de acuerdo a la norma ISO 7704:1985, y la membrana se deposita boca arriba sobre una placa conteniendo ACC, procurando que no se formen burbujas ni arrugas. Se incuba la placa con la membrana durante 18-24 horas a 36 ± 2°C. Si a las 18 h aparecen colonias rojas o incoloras, prolongar la incubación hasta 24 h para incluir posibles reacciones tardías de b-galactosidasa o de b-glucuronidasa. Contar las colonias b-galactosidasa positivas (b-Gal+) y b-glucuronidasa negativas (b-Glucuro-), es decir las que tienen colores desde rosa asalmonado a rojo, como bacterias Coliformes distintas a *E. coli*. Contar las colonias b-galactosidasa positivas (b-Gal+) y b-glucuronidasa positivas (b-Glucuro+), es decir las que tienen colores desde azul oscuro a violeta, como *E. coli*. El recuento de bacterias Coliformes totales corresponde a la suma de las colonias de color rosa asalmonado a rojo y las colonias azul oscuro a violeta. La concentración de bacterias Coliformes y de *E. coli* en 100 mL de muestra se calcula a partir del volumen de agua filtrado y del número de colonias características contadas sobre la membrana. Los resultados se expresan como UFC/100 mL.

Control de Calidad

Control Físico/Químico

Color : amarillo pálido pH: 6,8 ± 0,2 a 25°C

Control de Fertilidad

Inocular: rango práctico 100 ± 20 UFC; Min. 50 UFC (Productividad) /10⁴-10⁶ (Selectividad)

Control microbiológico según normativa ISO 11133:2014/ A1:2018.

Metodología analítica acorde con ISO 11133:2014/A1:2018; A2:2020.

Aerobiosis. Incubación a 36 ± 2 °C, lectura a las 21-24 h

Microorganismo

Escherichia coli ATCC® 25922, WDCM 00013

Escherichia coli ATCC® 8739, WDCM 00012

Citrobacter freundii ATCC® 43864, WDCM 00006

Enterococcus faecalis ATCC® 19433, WDCM 00009

Ps. aeruginosa ATCC® 10145, WDCM 00024

Desarrollo

Bueno - Púrpura Violáceo

Bueno - Púrpura Violáceo

Bueno - Magenta

Inhibición (Parcial a completa)

Colonias incoloras

Control de Esterilidad

Incubación 48 h a 30-35°C y 48 h a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

Bibliografía

- ADAMS, M., R.GRUBB, S.M. HAMER & A. CLIFFORD (1990) Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β-glucuronidase activity. Appl. Environ. Microbiol. 56:2021.
- ISO 9308-1 Standard (2014). Adm 1: 2016. Water Quality. Detection and enumeration of *E. coli* and coliform bacteria.
- ISO 7704:2023. Water Quality - Requirements for the performance testing of membrane filters used for direct enumeration of microorganisms by culture methods.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- KILIAN, M. & P. BÜLOW (1976) Rapid Diagnostic of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84:245-251.
- MANAFI, M & W. KNEIFEL (1989) A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliform and *E. coli* in water. Zentralbl. Hyg. 189:225-234.
- MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO (2009) Orden SCO/778/2009 de 17 de marzo sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano. BOE. n.º 78 de 31-04-2009. Sección I, Págs. 30417-30420. Madrid.
- UNE-EN ISO 11133 (2014). Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua.-Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- TURNER, K.M., L. RESTAINO & E.W. FRAMPTON (2000) Efficacy of Chromocult Coliform Agar for coliform and *Escherichia coli* detection in Foods. J.Food Protect. 63(4):539-541