

Agar Cromogénico E.coli – Coliformes (CCA) ISO 9308-1

USO

Es un medio selectivo y diferencial utilizado para la identificación de *Escherichia coli* y otros coliformes a partir de muestras de agua y alimentos.

EXPLICACIÓN

En este medio la peptona y el extracto de levadura proporcionan nitrógeno, vitaminas y minerales, el sorbitol es la fuente de carbohidratos, el Tergitol-7 inhibe las bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas sin afectar a las coliformes, el cloruro de sodio mantiene su función en el balance osmótico y las sales de fosfato actúa como regulador de pH lo que permite el crecimiento de bacterias incluso las estresadas, el agar es incorporado como agente solidificante. La diferenciación de las colonias se debe a la mezcla cromogénica que contiene dos sustratos cromogénicos el Salmon- β -D-galactosido y el X- β -G glucuronido sal CHX. Los coliformes producen enzimas como la galactosidasa y glucuronidasa que actúan sobre dichos sustratos generando colonias de diferente color.

La β D-galactosidasa actúa sobre el Salmon- β -D-galactosido produciendo en las colonias de coliformes un color de rosa a rojo. *E. coli* tiene dos enzimas -D-galactosidasa y β -D-glucuronidasa y actúa sobre ambos sustratos formándose colonias de azul oscuro a violeta fácilmente distinguibles de otras colonias de coliformes. El IPTG estimula el metabolismo de los cromogénicos. Las otras colonias de bacterias Gram negativas aparecen incoloras, excepto algunas 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 coliformes. El triptófano se adiciona al medio para la realización de la prueba de indol para una confirmación adicional de *E. coli*.

FÓRMULA POR LITRO

Cloruro de sodio	5.0 g	Sorbitol	1.0 g
Fosfato disódico de hidrogeno	2.7 g	Salmon- β -D-galactosido	0.20 g
Fosfato de sodio dihidrogeno x 2H ₂ O	2.2 g	X- β -G glucuronido sal CHX	0.10 g
Extracto de levadura	2.0 g	IPTG	0.10 g
Piruvato de sodio	1.0 g	Tergitol- 15-S-7	0.15 g
Digerido enzimático de caseína	1.0 g	Agar bacteriológico	10.0 g
Triptófano	1.0 g		

pH 6.8 \pm 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN

Método

Suspender 26.45 gramos del medio en un litro de agua purificada. Mezclar bien y calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. No sobrecalentar ni esterilizar en autoclave. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50°C y vaciar en placas de Petri estériles.

Procedimiento

1. Colectar y preparar las muestras y volúmenes a filtrar de acuerdo a procedimientos internos.
 2. Colocar la membrana sobre la superficie del agar.
 3. Incubar en condiciones aeróbicas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ de 18 a 24h y contar las colonias.
- El recuento total de bacterias coliformes es la suma de las colonias oxidasa-negativas, colonias β -D-galactosidasa-positivo (color rosa a rojo) y todas las colonias azul oscuro a violeta.
 - Las colonias de *E. coli* β -glucuronidasa negativas son color rosa, por ejemplo, *E. coli* O157: H7.


Nota: Algunas cepas de *Shigella* contienen la enzima β -D-glucuronidasa y pueden crecer colonias de color azul claro.

CARACTERÍSTICAS

El crecimiento, color de la colonia y recuperación se describe en la siguiente tabla:

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	COLOR DE LA COLONIA	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
Escherichia coli	25922	Bueno	Azul oscuro a violeta	≤ 100	$\geq 70\%$
Escherichia coli	8739	Bueno	Azul oscuro a violeta	≤ 100	$\geq 70\%$
Enterobacter aerogenes	13048	Bueno	Rosa a rojo	≤ 100	$\geq 70\%$
Pseudomonas aeruginosa	10145	Bueno	Incoloras	≤ 100	$\geq 70\%$
Enterococcus faecalis	19433	Inhibido	-	≤ 100	-

PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO

CAT. No	PRESENTACIÓN	ALMACENAMIENTO
5254	Medio preparado en Placa (Caja/50 Placas de 60 mm)	8-20°C
	Evite exponer a la luz	

BIBLIOGRAFÍA

1. ISO 9308-1/2014 Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria —Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
2. ISO 7218:2007, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.
3. 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.
4. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
5. A lonso J.L. Quantitative determination of total coliforms and Escherichia coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. J. Appl. Microbiol. 2000, 88 pp. 280–285 [4] Ossmer R .

OAXACA

ESTADO DE MÉXICO