



Referencia : 01-695

Scharlau Microbiology - Ficha de Datos Técnicos

Producto :

AGAR BASE CROMOGENICO PARA COLIFORMES

Sinonimia

CCA; ACC

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.

Fórmula * en g/L

Peptona.....	3,00	Sorbitol.....	1,00
Cloruro sódico.....	5,00	Salmon [®] -Gal.....	0,20
Fosfato monosódico.....	2,20	X-Glucurónido.....	0,20
Fosfato disódico.....	2,70	Agar.....	13,00
Triptófano.....	1,00		
Piruvato sódico.....	1,00	pH final a 25°C, 6,8 ±0,2	
Tergitol [®] 7.....	0,15		

*Fórmula ajustada y/o suplementada según necesidades para cumplir los criterios de recuperación

Reconstitución

Suspender 29,45 g del polvo en un litro de agua destilada y llevar a ebullición para disolver el agar. **No autoclavar ni sobrecalentar.** Enfriar hasta 45-50°C y añadir el contenido de un vial del Suplemento Selectivo CV para Coliformes Ref. 06-140-LYO. Homogeneizar evitando la formación de burbujas y repartir en placas de Petri. Las placas así preparadas se mantienen activas hasta un mes si se conservan en la oscuridad y refrigeradas entre 2-8°C.



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 Gram positivas y algunas Gram negativas sin afectar apenas a las coliformes. Pero lo que realmente confiere selectividad al medio es la presencia de cefsuloidina que inhibe el desarrollo de los pseudomonas y otras bacterias Gram negativas 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- β -D-galactopiranosido (Salmon[®]-GAL) y el 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronido (X-Glucuronido). La primera de ellas es selectivamente degradada por un enzima característico de los coliformes, la β -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 β -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 (Ref. RE0007). 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.

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 β-galactosidasa o de β-glucuronidasa.

Contar las colonias β-galactosidasa positivas (β-Gal+) y β-glucuronidasa negativas (β-Glucuro-), es decir las que tienen colores desde rosa asalmonado a rojo, como bacterias Coliformes distintas a *E. coli*. Contar las colonias β-galactosidasa positivas (β-Gal+) y β-glucuronidasa positivas (β-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.

Suplemento necesario

Suplemento Selectivo CV para Coliformes (Ref. 06-140-LYO)

Composición por vial:

Cantidad necesaria para 500 mL de medio completo.

Cefsulodina..... 2,50 mg

Vancomicina..... 2,50 mg

Agua destilada (Disolvente)

Control de calidad

Temperatura de incubación: 36°C ±2,0

Tiempo de incubación : 18-24 h

Inóculo: 10-100 UFC (Productividad) // 1.000-10.000 UFC (Selectividad). Método de membrana filtrante.

Microorganismo

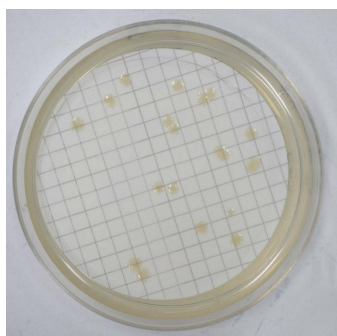
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Escherichia coli* ATCC 25922
- Escherichia coli* ATCC 11775
- Salmonella enterica* ATCC 13076
- Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- C. freundii* ATCC 8090
- Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Crecimiento

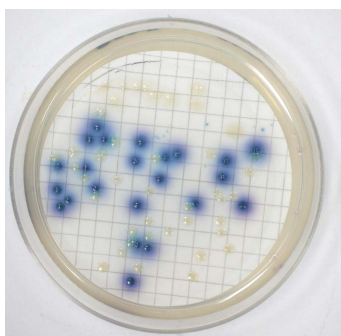
- Inhibido
- Productividad > 0.70
- Productividad > 0.70
- Productividad > 0.70
- Productividad > 0.70
- Productividad > 0.70
- Inhibido

Observaciones

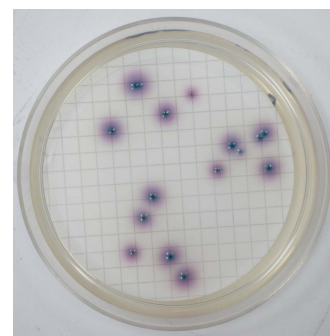
-
- Colonias azul oscuro-violeta. Indol (+)
- Colonias azul oscuro-violeta. Indol (+)
- Colonias incoloras. Indol (-)
- Colonias incoloras. Indol (-)
- Colonias salmon a rojizas. Indol (-)
-



Salmonella typhimurium ATCC 14028



Salmonella typhimurium ATCC 14028
Escherichia coli ATCC 11775



Escherichia coli ATCC 25922



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 7704 Standard (1985) Water Quality - Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.
- 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.

Almacenamiento

Solo para uso de laboratorio. Mantener bien cerrado, al resguardo de la luz, en lugar fresco (entre 4°C y 30°C, con humedad relativa menor del 60%).