

Agar Bilis y Rojo Violeta

USO

Es un medio selectivo utilizado en la identificación y cuenta de coliformes presentes en el agua, leche y otros materiales de importancia sanitaria.

EXPLICACIÓN

Este medio es utilizado para la detección, enumeración e identificación presuntiva de microorganismos coliformes. En este medio las colonias de coliformes presentan una morfología típica que permite su identificación presuntiva y que debe ser confirmada mediante reacciones bioquímicas.

El grupo de bacterias coliformes incluye bacilos Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos no esporulados, que fermentan la lactosa y forman ácido y gas a 35°C de 24 a 48 horas.

Los coliformes resisten la presencia de bilis en el medio de cultivo; cuando se desarrollan en este medio, el ácido producido por la fermentación de lactosa, ocasiona el vire del indicador rojo neutro y la precipitación de las sales biliares, por lo que las colonias son color rojo oscuro y generalmente están rodeadas de un halo de sales biliares precipitadas de color rojo claro a rosa, y la posibilidad de contar las colonias se fundamenta en su dispersión y separación.

En este medio, la peptona provee la fuente de carbono y nitrógeno necesaria para el desarrollo de los microorganismos. El extracto de levadura provee vitaminas del complejo B para estimular el crecimiento bacteriano. Las sales biliares y el cristal violeta actúan como inhibidores de microorganismos Gram positivos. La lactosa es la fuente de carbohidratos y el rojo neutro actúa como indicador para evidenciar el cambio de pH como consecuencia de la fermentación de la lactosa. El agar actúa como agente solidificante.

FÓRMULA POR LITRO

Extracto de levadura	3.0 g	Peptona de gelatina	7.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g	Lactosa	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g	Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.002 g	Agar bacteriológico	15.0 g

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN

Método

Suspender 41.5 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. No sobrecalentar. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C, vaciar en placas de Petri estériles y usar inmediatamente. También se puede esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.

Procedimiento

1. Seguir las recomendaciones apropiadas para la toma y procesamiento de las muestras.
2. Colocar una alícuota de 1.0 mL de la muestra en una placa de Petri estéril.
3. Adicionar 15 mL del medio enfriado a una temperatura de 45-50°C y mezclar suavemente.
4. Permitir que el medio solidifique y adicionar 4 mL del medio enfriado a una temperatura de 45-50°C.
5. Permitir que el medio solidifique e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Se recomienda la incubación a 32°C para muestras de productos lácteos.
6. Examinar las colonias de color rojo a púrpura, de 0.5 mm de diámetro (o más grande) rodeadas por un halo con precipitado de ácidos biliares.

CARACTERÍSTICAS

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

MICROORGANISMOS	ATCC	CRECIMIENTO	COLOR DE LA COLONIA	INOCULO cfu/mL	% DE RECUPERACIÓN
<i>Escherichia coli</i>	25922	Bueno	Rojo intenso	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Bueno	Incoloras	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Bueno	Rojo	≤ 100	$\geq 80\%$
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	inhibido	Rosas, puntiformes	10^4 - 10^6	$\leq 25\%$
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	inhibido	-	10^4 - 10^6	-

Fermentadores de Lactosa	Colonias de color rojo con o sin zona de precipitado rojizo (<i>E. coli</i>)
No fermentadores de Lactosa	Colonias incoloras
Colonias rosas o incoloras puntiformes	Gram positivos

PRESENTACIÓN Y ALMACENAMIENTO

CAT. No	PRESENTACIÓN	ALMACENAMIENTO
7011	Medio deshidratado Frasco con 450 g	2-30°C
7012	Medio deshidratado Frasco con 500 g	2-30°C
7013	Medio deshidratado Sobres	2-30°C
7013C	Medio deshidratado Sobres (Caja/20 sobres)	2-30°C
7017	Medio deshidratado Cubeta con 5 Kg	2-30°C
7017A	Medio deshidratado Cubeta con 10 Kg	2-30°C
7017D	Medio deshidratado Cuñete con 25 Kg	2-30°C
7017B	Medio deshidratado Cuñete con 50 Kg	2-30°C
7014	Medio preparado en Placa (Pqte/10 placas)	2-8°C
7016	Medio Semipreparado en Frasco (Caja/12 frascos 140 mL)	2-8°C



BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall, R. T. (ed.). 1993. Standard methods for the examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser (eds.). 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
3. U.S. Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD.
4. Allaert, V.C. y Escolá, R.M. 2002 Métodos de análisis microbiológicos de alimentos. Ed. Díaz de Santos. Págs. 248.
5. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: Suplemento para Dispositivos Médicos. 3a. Ed. -- México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014.