

## **A.7 Determinación de Bacterias Coliformes**

Esta técnica fue basada en la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, llamada Determinación de bacterias coliformes. Técnica del numero mas probable. De la cual se hicieron algunas modificaciones.

### **Equipo**

- Autoclave con termómetro y manómetro ( Marca All America, Modelo NO25X)
- Balanza analítica ( Marca Sartorius Basic, modelo BA210S)
- Incubadora ( Marca Precision)

### **Material**

- Frascos de vidrios de 250ml con tapón de rosca
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras como: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.
- Tubos de ensaye con tapón de rosca
- Campanas de fermentación (Tubos de Durham)
- Pipetas bacteriológicas graduadas de 10 y 1 ml
- Gradillas
- Asa de platino o nicromel de aproximadamente 3 mm de diámetro
- Mechero

Todo el material que tenga contacto con la muestra bajo estudio debe esterilizarse mediante autoclave, durante 15 minutos como mínimo a  $121 \pm 1^\circ \text{C}$ .

## **Reactivos**

- **Agua destilada**
- **Caldo Lactosado**
  - Pesar 5.2 gr. de medio, añadir 400ml de agua, mezclar
  - Distribuir en 40 tubos con rosca
  - A cada uno se le coloca una campana de Durham
  - Se esteriliza a 121°C por 20 minutos
- **Caldo Bilis Verde Brillante**
  - Pesar 16 gr. de medio, añadir 400ml de agua, mezclar
  - Distribuir en 40 tubos con rosca
  - A cada uno se le coloca una campana de Durham
  - Se esteriliza a 121°C por 20 minutos
- **Medio EC**
  - Pesar 14.8 gr. de medio, añadir 400ml de agua, mezclar
  - Distribuir en 40 tubos con rosca
  - A cada uno se le coloca una campana de Durham
  - Se esteriliza a 121°C por 20 minutos
- **Solución Salina ( Diluciones)**
  - Pesar 3.4 g de NaCl en la balanza analítica
  - Medir 400 ml de agua, mezclar
  - Distribuir en 40 tubos con rosca
  - Se esteriliza a 121°C por 20 minutos

## **Procedimiento**

- 1) De las diluciones seleccionadas se coloca 1 ml a cada tubo con caldo lactosado en condiciones estériles. Se siembra por triplicado. Posteriormente los tubos se incuban a 37° C y se revisan a las 24 y 48 horas.
- 2) Como medio de confirmación se ocupa medio bilis verde brillante, así pues de cada tubo que presente gas, se toma una azada y se siembra un número igual de tubos en el medio de confirmación, y se incuban a 37 ° C por dos días.
- 3) Además para comprobar la existencia de coniformes fecales. Se toma una azada de los tubos positivos de caldo lactosado y se siembra un número igual pero en medio EC. Se incuban a 45° por dos días y se revisa la formación de gas.
- 4) Para la expresión de resultados, se toma la serie de tubos de las pruebas confirmativas que de formación de gas después del periodo de incubación requerido, y se busca el MNP en los cuadros correspondientes.