

01741  
2-9-98  
7/2

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
3006-93**



**ALIMENTOS. RECUENTO DE  
LACTOBACILLUS BULGARICUS  
Y STREPTOCOCCUS  
THERMOPHILUS.**



TRAMITE

COMITE TECNICO DE NORMALIZACION CT10: PRODUCTOS ALIMENTICIOS

PRESIDENTE: DRA. FANNY CARRILLO DE PADILLA

VICEPRESIDENTES: DR. DOUGLAS YANEZ  
DR. JOSE FELIX CHAVEZ

SECRETARIO: LIC. ORLANDO TORTOLERO

SUBCOMITE TECNICO SC3: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

COORDINADORA: LIC. YADIRA GUEVARA

PARTICIPANTES

ENTIDAD

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL

INDUSTRIAS LACTEAS

PRODUCTOS EFE

LABORATORIOS BROLAB

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
(FACULTAD DE FARMACIA)

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

INDUSTRIAS LACTEAS DE PERIJA

CERVECERIA POLAR, C.A.

FRICA

REPRESENTANTES

VICMAR PERNIA

MIROSLAVA MORLES

HELEN RIVERO

OLGAMAR FRANCESCHI

MARIA L. NOVOA  
MANUELA SELGRAD

PILAR HERNANDEZ  
NORMA DE CASTRO

SILVIA MENDOZA

ALICIA PENA

MATILDE DE GARCIA

CRISTINA CALDERON

DISCUSION PUBLICA

FECHA: 26-01-93

DURACION: 30 DIAS

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 10-03-93

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 14-04-93

COVENIN  
3006-93

NORMA VENEZOLANA  
ALIMENTOS. RECUENTO DE  
Lactobacillus bulgaricus  
Y Streptococcus thermophilus

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

- COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- COVENIN 902-87 Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para recuento de Lactobacillus bulgaricus y Streptococcus thermophilus en yogurt, en otros alimentos en los cuales se requiera su investigación.

3 PRINCIPIO

- 3.1 El método consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar y/o diluciones de la misma en placas de Petri, utilizando medios de cultivo selectivos apropiados para cada microorganismo.
- 3.2 Después del período de incubación, se cuentan las colonias características y se confirma mediante examen microscópico.

4 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- 4.1 EQUIPO PARA LA PREPARACION DE MUESTRAS (Según Norma Venezolana COVENIN 1126)
- 4.2 CONTADOR DE COLONIAS
- 4.3 INCUBADORA CON REGULADOR DE TEMPERATURA
- 4.4 PLACAS DE PETRI DE 15 mm x 100 mm, ESTERILES
- 4.5 BANO DE AGUA CON REGULADOR DE TEMPERATURA
- 4.6 EQUIPO PARA INCUBACION EN ATMOSFERA DE CO<sub>2</sub>.
- 4.7 PIPETAS GRADUADAS DE 1 ml Y 10 ml, ESTERILES
- 4.8 FRASCOS Y TUBOS DE DILUCION, ESTERILES
- 4.9 LAMINAS PORTA OBJETO
- 4.10 EQUIPO DE USO COMUN EN EL LABORATORIO

5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 DILUENTE

- 5.1.1 Agua peptonada al 0,1% (ver Norma Venezolana COVENIN 1126)

## 5.2 MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1 Agar M 17 con B-glicerofosfato de sodio

5.2.2 Agar reforzado para clostridios (RCA) pH 5,5

5.2.3 Leche descremada reconstituida al 10%

## 5.3 REACTIVOS

5.3.1 Reactivos para coloración de Gram

Nota 1: Ver anexos I y II.

## 6 MATERIALES A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del alimento, tomada según la Norma Venezolana COVENIN 1126.

## 7 PROCEDIMIENTO

### 7.1 PREPARACION DE DILUCIONES

A partir de la primera dilución obtenida según se indica en la Norma Venezolana COVENIN 1126, se preparan las diluciones necesarias según el alimento a analizar utilizando agua peptonada al 0,1%.

### 7.2 SIEMBRA E INCUBACION

7.2.1 Se siembra por duplicado en placas de Petri 1 ml de cada una de las diluciones seleccionadas.

7.2.2 Se vierten 12 a 15 ml del medio de cultivo previamente fundido y temperado a 45°C (agar M 17 con B-glicerofosfato de sodio para *Streptococcus thermophilus* y agar reforzado para clostridios pH 5,5 para *Lactobacillus bulgaricus*) en cada placa de Petri, se mezcla por rotación, se deja solidificar sobre una superficie plana y se incuban en posición invertida bajo las siguientes condiciones:

7.2.2.1 Agar M 17 con B-glicerofosfato, a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 h en aerobiosis.

7.2.2.2 Agar RCA pH 5,5, a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 a 96 h en atmósfera de aproximadamente 10-20% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).

NOTA 2: Es recomendable verificar periódicamente la efectividad de los medios, utilizando las cepas patrones, mantenidas según lo descrito en el Anexo III.

### 7.3 LECTURA DE RESULTADOS

7.3.1 Finalizado el periodo de incubación, se seleccionan las placas según lo establecido en la Norma Venezolana COVENIN 902. Se cuentan las colonias características presentes en cada medio de cultivo:

Agar M 17: Colonias blanquecinas de 1 - 2 mm de diámetro, de bordes lisos, redondas o lenticulares.

Agar RCA pH 5,5: Colonias blanquecinas de 2 - 3 mm de diámetro, de bordes lisos o rugosos, redondas, lenticulares o en forma de estrella.

7.3.2 Si es necesario confirmar las características morfológicas de los microorganismos investigados, realizar la coloración de Gram descrita a continuación:

7.3.2.1 Se prepara un frotis y se fija por calor

7.3.2.2 Se cubre con la solución de cristal violeta durante 1 min.

7.3.2.3 Se elimina el colorante con agua

7.3.2.4 Se cubre con la solución de lugol durante 1 min.

7.2.3.5 Se enjuaga con agua y alcohol alternativamente hasta que el alcohol de enjuague quede sin colorante (3 o 4 veces).

7.3.2.6 Se lava con agua y se cubre con solución de safranina por 10 seg. Se lava con agua nuevamente.

7.3.2.7 Se seca la lámina al aire y se examina al microscopio con lente de inmersión.

Nota: Los microorganismos gram-positivos se tiñen de violeta y los gram-negativos de rojo.

### 7.3.3 Apariencia microscópica

Lactobacillus bulgaricus: Son bacilos Gram positivo, no formadores de esporas, generalmente largos, solos o en cadenas.

Streptococcus thermophilus: Son células esféricas u ovoides Gram positivo, pueden aparecer en pares o en cadenas largas.

## B EXPRESION DE RESULTADOS

B.1 Los resultados para cada microorganismo presente en la muestra se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (ufc/g o ufc/ml) según el caso.

B.2 El número de unidades formadoras de colonias, obtenido en las placas correspondientes a la dilución seleccionada, se multiplica por el factor de dilución correspondiente, se promedian los resultados y el valor final se expresa en unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (ufc/g o ufc/ml) según el caso.

## 9 INFORME

9.1 El informe del ensayo deberá indicar como mínimo lo siguiente:

9.1.1 Ensayo realizado según la Norma Venezolana COVENIN correspondiente.

9.1.2 Fecha en la cual se realizó el ensayo y nombre de quién lo realizó.

9.1.3 Identificación de la muestra.

9.1.4 Resultados del ensayo.

9.1.5 Observaciones.

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. JOHNS, F.E., GORDON, J.F. and SHAPTON, N. (1978). "The Separation from Yogurt cultures of Lactobacilli and Streptococci using Reinforced Clostridial Agar at pH 5.5 and plate count agar incorporating milk". J. Society of Dairy Technology, 31 (4): 209-212.

2. SHANKAR, P.A. and DAVIES, F.L. (1977). A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing B-glycerol phosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yogurt. "J. Society of Dairy Technology, 30(1): 28-30.

3. ISO/DIS 7889. Yoghurt-Enumeration of characteristic microorganisms-Colony count technique at 37°C. International Organization for Standardization. 1985.

## EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

Los resultados para cada microorganismo presente en la muestra se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (unidad o U.F.C.) según el caso.

El número de unidades formadoras de colonias obtenido en las placas correspondientes a la dilución seleccionada, se multiplica por el factor de dilución correspondiente, se promedian los resultados y el valor final se expresa en unidades formadoras de colonias por gramo o por mililitro (unidad o U.F.C.) según el caso.

## ANEXO I

FORMULA Y PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS REQUERIDOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE Lactobacillus bulgaricus Y Streptococcus thermophilus

### 1 MEDIOS DE CULTIVO

#### 1.1 Agar M 17 con $\beta$ -glicerofosfato de sodio

##### 1.1.1 Fórmula (g/l).

Fitona-peptona.....	5,0 g
Polipeptona.....	5,0 g
Extracto de levadura.....	2,5 g
Extracto de carne .....	5,0 g
Lactosa.....	5,0 g
Acido ascórbico.....	0,5 g
B -glicerofosfato (sal disódica, Grado II).....	19,0 g
Sulfato de Magnesio hepta-hidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,25 g
Agar.....	10,0 g
Agua destilada.....	c.s.p 1000 ml

##### Preparación:

Se disuelven los ingredientes en agua destilada, se mezcla bien y se ajusta el pH a 6,8. Se esteriliza a 121°C durante 15 min

Nota: Si se dispone de un medio base que no contiene lactosa, prepare una solución al 10%, esterilice a 121°C por 15 min e incorpore al medio fundido y temperado a 45°C, en proporción de 5 ml por cada 95 ml de medio.

#### 1.2 Agar reforzado para clostridios (RCA) a pH 5,5

##### Fórmula (g/l):

Extracto de levadura.....	3,0 g
Extracto de carne .....	10,0 g
Tripticasa - peptona.....	10,0 g
Dextrosa.....	5,0 g

Cloruro de sodio.....5,0 g

Acetato de sodio.....3,0 g

Almidón soluble.....1,0 g

Cisteína.....0,5 g

Agar.....13,5 g

Agua destilada.....c.s.p. 1000 ml

Preparación:

Se disuelven los ingredientes en agua destilada, se mezcla bien y se ajusta el pH a 5,5, utilizando solución de ácido clorhídrico 1N. Se esteriliza a 115°C durante 15 min.

1.3 Leche descremada reconstituida al 10%

Se reconstituye leche descremada en polvo en proporción del 10%, se distribuye en tubos de ensayo a razón de 10 ml y se esteriliza a 100°C por 10 min.

Agua destilada.....c.s.p. 1000 ml  
Agar.....10,0 g  
Bisulfito de magnesio hepta-hidratado MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.....0,25 g  
B-glicerofosfato (sal disódica, grado III).....10,0 g  
Ácido ascórbico.....0,2 g

Preparación:

Se disuelven los ingredientes en agua destilada, se mezcla bien y se ajusta el pH a 5,8. Se esteriliza a 121°C durante 15 min.

Nota: Si se dispone de un medio base que no contiene lactosa, prepare una solución al 10%, esterilice a 121°C por 15 min e incorpore al medio fundido y reponga a 12°C, en proporción de 2 ml por cada 98 ml de medio.

1.1 Agar reconstituido para distribuirlo a pH 5,5

Fórmula (g/l):

Extracto de levadura.....3,0

Extracto de carne.....10,0

Tripticas - digestión

Dextrosas.....



1.3.2 Preparación:

Se disuelve la safranina en el alcohol etílico y se lleva hasta 100 ml con agua destilada.

1.4 Solución decolorante (alcohol-acetona)

Se prepara mezclando alcohol etílico y acetona en partes iguales.

1.5 Reactivo de Kovacs

1.5.1 Fórmula:

p- dimetilaminobenzaldehído ..... 5,0 g  
Alcohol amílico (98%) ..... 75,0 ml  
Acido clorhídrico concentrado ..... c.s.p. 25,0 ml

1.5.2 Preparación:

Se disuelve el p- dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico. Se añade lentamente el ácido clorhídrico. Para la reacción del indol se añade 0,2 - 0,3 ml del reactivo a 5 ml del cultivo de 48 h de la bacteria en caldo triptonado.

1.6 Solución salina al 0,85%

1.6.1 Fórmula:

Cloruro de sodio ..... 8,5 g  
Agua destilada ..... c.s.p. 1000 ml

1.6.2 Preparación:

Se disuelve el cloruro de sodio en 1000 ml de agua destilada y se esteriliza en autoclave a 121°C x 15 min.

## ANEXO II

### 1 REACTIVOS PARA LA COLDRACION DE GRAM

#### 1.1 Solución de cristal violeta

##### 1.1.1 Fórmula:

Cristal violeta (contenido de colorante de 85-90%) .....	2,0 g
Alcohol etílico (95%) .....	20 ml
Oxalato de amonio .....	0,8 g
Agua destilada .....	c.s.p. 80 ml

##### 1.1.2 Preparación:

Se disuelve el cristal violeta en el alcohol y el oxalato de amonio en el agua destilada. Se mezclan las dos soluciones. La solución de cristal violeta sólo puede usarse después de 24 horas de su preparación.

#### 1.2 Solución de lugol:

##### 1.2.1 Fórmula:

Yodo .....	1,0 g
Yoduro de potasio .....	2,0 g
Agua destilada .....	c.s.p. 100 ml

##### 1.2.2 Preparación:

Se trituran juntos el yoduro de potasio y el yodo en un mortero, agregando pequeñas cantidades de agua mientras se tritura. Se vierte la solución resultante en un matraz aforado de 100 ml, se enjuaga el mortero y se recoge la solución en el matraz y se lleva a volumen con agua.

#### 1.3 Solución de safranina

##### 1.3.1 Fórmula:

Safranina O .....	0,25 g
Alcohol etílico (99,8%) .....	10 ml
Agua destilada .....	c.s.p. 100 ml

## ANEXO III

### 1 CEPAS PATRON

1.1 Lactobacillus bulgaricus ATCC 11842.

1.2 Streptococcus thermophilus ATCC 19987.

#### 1.3 Mantenimiento de cepas patrón

El mantenimiento de c/u de las cepas puede hacerse por inoculación en leche descremada al 10% y aplicando cualquiera de los siguientes procedimientos:

- a) Incubar a 37° C, solo el tiempo suficiente para que la leche coagule (aproximadamente 24 h) y luego refrigerar.
- b) Incubar a 42° C por 3 ó 4 horas y luego refrigerar.

Nota: Repicar cada 4 ó 5 días (la sobreproducción de ácido puede destruir las cepas!).

- c) Congelar inmediatamente después de la inoculación. Al momento de usar descongelar e incubar a cualquiera de las condiciones anteriormente señaladas.

**COVENIN**  
3006-93

**CATEGORIA**  
**C**

---

**COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES**  
**MINISTERIO DE FOMENTO**  
**Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12**  
**Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12**  
**CARACAS**

publicación de:



CDU: 644.576.8.08

ISBN 980 - 06 - 1081 - 2

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS  
Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

---

**Descriptor:** Bacterias lácticas, recuento de bacterias, microbiología de alimentos.