

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
3276:1997**

**ALIMENTOS. RECUENTO
DE COLIFORMES Y DE
Escherichia coli. MÉTODO
EN PLACA CON
PELÍCULAS SECAS
REHIDRATABLES
(Petrifilm)**



COVENIN
3276:1997

NORMA
VENECOLIANA

PROLOGO

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (**COVENIN**), creada en 1958, es el organismo encargado de programar y coordinar las actividades de Normalización y Calidad en el país. Para llevar a cabo el trabajo de elaboración de normas, la COVENIN constituye Comités y Comisiones Técnicas de Normalización, donde participan organizaciones gubernamentales y no gubernamentales relacionadas con un área específica.

La presente norma fue elaborada bajo los lineamientos del Comité Técnico de Normalización **CT10: Productos Alimenticios**, por el Subcomité Técnico **SC3: Microbiología de alimentos** y aprobada por la COVENIN en su reunión No. 145 de fecha **05-03-97**

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades:

Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Instituto Nacional de Higiene, Instituto Nacional de Nutrición, Univesidad Central de Venezuela, Universidad Simón Bolívar, Fundación CIEPE, Aliven, S.A., 3 M, Alimentos Heinz, C.A, Laboratorios Brolab S.R.L., Parmalat, Productos EFE, S.A.



NORMA VENEZOLANA
ALIMENTO. RECUENTO DE COLIFORMES
Y DE Escherichia coli. MÉTODO EN PLACA
CON PELÍCULAS SECAS REHIDRATABLES (Petrifilm)

COVENIN
3276:1997

1 OBJETO

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para el recuento de coliformes y de Escherichia coli en placas con películas secas rehidratables (Petrifilm).

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

La siguiente norma contienen disposiciones que al ser citada en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. La edición indicada estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos en base a ella, que analicen la conveniencia de usar la edición más reciente de la norma citada seguidamente:

COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método consiste en inocular 1 ml de la muestra y/o sus diluciones en placas Petrifilm de aproximadamente 20 cm² de superficie, la cuales contienen una película deshidratada de un medio de cultivo adecuado. Después del período de incubación, se determina el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes y de Escherichia coli mediante un contador de colonias.

4 APARATOS

4.1 Equipos para la preparación de muestras (Véase norma Venezolana 1126).

4.2 Placas Petrifilm:

4.2.1 Recuento de coliformes

Las placas Petrifilm para coliformes consisten en 2 películas rectangulares, unidas en la parte superior por uno de sus lados. La película inferior es un papel cuadrado (cuadros de 1 cm × 1 cm cada uno) revestido de polietileno, la cual tiene una superficie de aproximadamente 20 cm² cubierta con el medio de violeta rojo bilis y un agente gelificante soluble en agua fría. La película superior está hecha de polipropileno recubierta con agentes gelificantes y el indicador 2,3,5 cloruro de trifetil-tetrazolium.

4.2.2 Recuento de coliformes y Escherichia coli

Los placas Petrifilm para coliformes y Escherichia coli tienen características similares a las placas Petrifilm

para coliformes, solo que en la película inferior contienen además el indicador 5 bromo - 4 cloro 3 indol B-D-glucuronido.

Las placas Petrifilm para coliformes y Escherichia coli, elaboradas por 3M (Microbiology Division), llenan estas especificaciones. Las placas vienen listas para utilizar, en bolsas de papel metálico impermeables, las cuales tienen una vida útil de 1 año, en refrigeración. Una vez abiertas las bolsas, deben conservarse a temperatura ambiente, y su duración es de 1 mes.

4.3 Lámina plástica difusora, plana, suministrada por los fabricantes de las placas Petrifilm.

4.4 Incubadoras reguladas a 32° C ± 1° C y/o a 35° C ± 1° C

4.5 Contador de colonias.

4.6 Equipo de uso común en el laboratorio.

5 REACTIVOS O MATERIALES

5.1 Agua peptonada al 0,1 % o solución tampón fosfato (tampón de Butterfield)

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Identificar la muestra y preparar según lo indicado en la norma COVENIN 1126.

6.1.1 En caso de alimentos con pH inferior a 6,0; ajustar el pH de la muestra líquida o la primera dilución de la muestra sólida a pH entre 6,6 y 7,2 con hidróxido de sodio 0,1 N ó 1 N.

6.1.2 No utilizar diluentes que contengan citrato (aumentan la fuerza iónica en la placa hasta un punto donde se inhibe el crecimiento bacteriano, y además limitan el crecimiento debido a la quelación de cationes metálicos divalentes) o Tiosulfato de sodio (crea un ambiente reducido en la placa que inhibe el crecimiento bacteriano). Esto no se aprecia en el agar común debido a un efecto de dilución inherente al volumen del agar empleado.

6.2 Recuento de coliformes y Escherichia coli

6.2.1 Colocar la placa de Petrifilm apropiada, previamente identificada, sobre una superficie plana.

6.2.2 Levantar la película superior y con una pipeta colocada perpendicularmente a la placa, verter 1 ml de la muestra o sus diluciones en el centro del círculo que contiene el medio deshidratado, ubicado en la película inferior.

6.2.3 Deslizar con cuidado la película superior sobre la inferior, tratando de no formar burbujas.

6.2.4 Inmediatamente después, distribuir el inóculo sobre el área del medio del cultivo deshidratado usando una lámina plástica difusora, con la cara plana hacia abajo, y realizando presión suave, solo hasta que la muestra alcance los bordes del círculo.

6.2.5 Retirar la lámina plástica difusora con un movimiento rápido hacia arriba, evitando giros o deslizamientos horizontales. Dejar la placa en reposo por aproximadamente 1 min, para permitir la solidificación del agente gelificante.

6.2.6 Incubar las placas Petrifilm para coliformes durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$, a $32^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para análisis de productos lácteos y/o a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ para otros alimentos, y las placas Petrifilm para coliformes y *Escherichia coli* durante 24 h o 48 h a 35°C ; en posición horizontal, con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas, una sobre otra, en columnas que no excedan de 20 unidades.

6.2.7 Lectura de las placas: Finalizado el período de incubación, con ayuda de un contador de colonias, contar las placas donde se hayan obtenido entre 15 y 150 colonias

6.2.7.1 Lectura de coliformes: Las colonias típicas de coliformes son de color rojo, asociadas a una ó más burbujas de gas (vease fig. 1).

6.2.7.2 Lectura de coliformes y *Escherichia coli*: Las colonias típicas de *Escherichia coli* son de color azul y las otras colonias típicas de coliformes son de color rojo asociadas a una ó más burbujas de gas (vease fig. 2).

NOTA: Las colonias rojas y azules no asociadas a gas no se cuentan como coliformes y *Escherichia coli* respectivamente.

7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

7.1 El recuento de coliformes en la placa Petrifilm para coliformes y *Escherichia coli* es la suma de las colonias rojas y azules asociadas a gas.

7.2 El recuento de coliformes y *Escherichia coli* se expresa como UFC/g o ml.

7.3 Si no hay desarrollo de colonias en ningunas de las placas, el resultado se expresa como "menos de 1" si se siembra la muestra directa, ó "menos de 1 por el recíproco de la primera dilución" si se siembran diluciones de la muestra.

7.4 Cuando el número de colonias es inferior a 15 en la placa de siembra directa o en la primera dilución, cuente las colonias y reporte como valor estimado de recuento.

7.5 Cuando el número de colonias es superior a 150 en todas las placas inoculadas, haga un estimado del recuento; para ello, cuente las colonias de 5 cuadrados, promedie el valor obtenido, y multiplíquelo por 20 para obtener el recuento estimado de colonias por placa.

8 INFORME

El informe del ensayo debe contener lo siguiente:

8.1 Fecha de realización del ensayo.

8.2 Identificación completa de la muestra

8.3 Resultado del análisis realizado.

8.4 Número y título de la Norma Venezolana COVENIN consultada

8.5 Nombre del analista

8.6 Observaciones

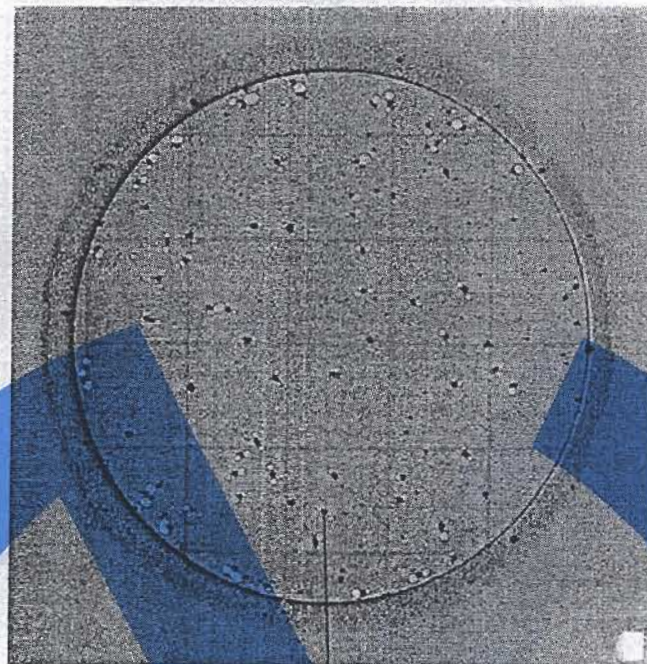
BIBLIOGRAFÍA

AOAC. Official Methods of Analysis. 16th Edition, Vol. I, 1995.

APHA 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Third Edition. American Public Health Association. Editor M. Speck. Washington D.C.

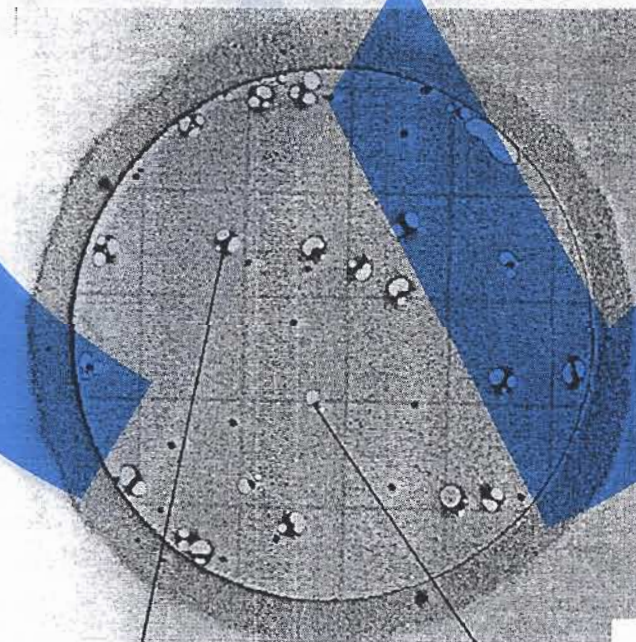
Cuariale M., et al. J. Assoc. Off. Anal. Chem, Vol. 74, N° 4. 1991

Matner R. et al. Journal of Food Protection, Vol. 53, N° 2: pp. 145-150. 1990.



Colonia
roja con gas
(Coliformes)

Figura 1. Recuento de coliformes en "Petrifilm coliformes"



Colonia
azul con gas
(*E. coli*)

Colonia roja
con gas
(Coliformes)

Figura 2. Recuento de coliformes y *E. coli* en "Petrifilm coliformes y *E. coli*."

COVENIN
3276:1997

CATEGORÍA
B

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12

Tel. 575.41.11 Fax: 574.13.12

CARACAS

publicación de:



ICS: 07.100.30

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

ISBN: 980-6019-28-8

Descriptores: Microbiología de alimentos, coliformes, Escherichia coli, recuentos de bacterias, Petrifilm