

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
3338:1997**

**ALIMENTOS. RECUENTO  
DE AEROBIOS. MÉTODO DE  
PLACAS CON PELÍCULAS  
SECAS REHIDRATABLES  
(Petrifilm<sup>R</sup>)**

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 la dirección del Comité Técnico de Normalización CTN 1001, dependiente del Comité Técnico SC3 Microbiología de Alimentos, creado el 14 de febrero de 1971.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: Instituto Nacional de Higiene, Asistencia Social (Instituto de Higiene de los Alimentos, Instituto Lacerda, Universidad Simón Bolívar, USB), PROMOCIONES E.F.E. S.A.; BRISA S.A.; PROMOCIONES E.F.E. S.A.; 3M Microfilms Venezuela S.A.; Alimentos Petrol S.A.; Saramita S.A.



## 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. 149 de fecha 1997/11/12.

En la elaboración de esta norma participaron las siguientes entidades: Instituto nacional de Higiene Rafael Rangel; Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (Dirección de Higiene de los Alimentos); Industria Láctea Venezolana, C.A. INDULAC; CIEPE; Universidad Simón Bolívar USB; Productos EFE, S.A.; BROLAB, SRL; Bristol Myers Squibb de Venezuela, S.A.; 3M Manufacturera Venezuela, S.A.; Alimentos Heinz, C.A.; Semitech, C.A.



**NORMA VENEZOLANA**  
**ALIMENTOS. RECUENTO DE AEROBIOS.**  
**MÉTODO EN PLACAS CON PELÍCULAS**  
**SECAS REHIDRATABLES (Petrifilm<sup>R</sup>)**

**COVENIN**  
**3338:1997**

## 1 OBJETO

Esta Norma Venezolana establece el método de ensayo para el recuento de aerobios en placas con películas secas rehidrables (Petrifilm<sup>R</sup>)<sup>1</sup>.

## 2 REFERENCIAS NORMATIVAS

La siguiente Norma contiene disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. La edición indicada estaba 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<sup>R</sup> de aproximadamente 20 cm<sup>2</sup> de superficie de crecimiento, las 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 bacterias aerobias mediante un contador de colonias.

## 4 APARATOS

**4.1** Equipos para la preparación de muestras (véase Norma Venezolana 1126)

**4.2** Placas Petrifilm para recuento de Aerobios:

Las placas Petrifilm<sup>R</sup> para aerobios, consisten en dos películas rectangulares, unidas en la parte superior por uno de sus lados. La película inferior es un papel cuadriculado (cuadros de 1cm. x 1cm. cada uno) revestido de polietileno, la cual tiene una superficie aproximada de 20 cm<sup>2</sup>, cubierta con el Agar estándar

para recuento en placa (Plate Count Agar) 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 Trifenil-Tetrazolium.

Las placas Petrifilm<sup>R</sup> para aerobios, llenan estas especificaciones. Las placas vienen listas para utilizar, en bolsas de papel metálico impermeables; las cuales tienen una vida útil de un año en refrigeración. Una vez abiertas las bolsas, deben conservarse a temperatura ambiente, y su duración es de un 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 35°C +/- 1°C.

**4.5** Contador de Colonias.

**4.6** Equipo de uso común en el laboratorio.

## 5 REACTIVOS

**5.1** Agua Peptonada al 0,1 % ó 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 citratos (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 placa que inhibe el crecimiento bacteriano). Esto no se aprecia en el agar común debido

<sup>1</sup> Petifilm<sup>TM</sup> Es el nombre comercial de un producto suministrado por 3M Manufacturera Venezuela, S.A (Microbiology Division). Se da esta información para facilitar a los usuarios la utilización de esta Norma Venezolana y no significa una recomendación del producto por parte de COVENIN. Se puede emplear productos equivalentes si se muestra que conducen a iguales resultados."

a un efecto de dilución inherente al volumen del agar empleado.

## 6.2 Recuento de Aerobios

6.2.1 Colocar la placa Petrifilm<sup>R</sup> 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 de cultivo deshidratado usando una lámina plástica difusora, con la cara plana hacia arriba, 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 minuto, para permitir la solidificación del agente gelificante.

6.2.6 Incubar las placas Petrifilm<sup>R</sup> para aerobios durante 48 horas +/- 3 hr. a 32°C +/- 1°C para análisis de productos lácteos y/o 48 horas +/- 3 hr. a 35°C +/- 1°C para otros alimentos, 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 25 y 250 colonias para productos lácteos y entre 30 y 300 colonias para otros alimentos. Las colonias típicas de aerobios son de color rojo, sin importar la intensidad del color o el tamaño.

## 7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

7.1 El recuento de aerobios en la placa Petrifilm<sup>R</sup> es la suma de las colonias rojas.

7.2 El recuento de Aerobios se expresa como UFC/g ó ml.

7.3 Si no hay desarrollo de colonias en ninguna 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 25 para productos lácteos ó inferior a 30 para otros alimentos 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 250 para productos lácteos ó a 300 para otros alimentos en todas las placas inoculadas, haga un estimado del recuento; para ello, cuente las colonias de 5 cuadros, promedie el valor obtenido, y multiplíquelo por 20 para obtener el recuento estimado de colonias por placa.

## 8 INFORME

El informe 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

## BIBLIOGRAFIA

AOAC. Official Methods of Analysis. 16th Edition. Vol. 1. (# 17.2.07 y # 17.3.03 ). 1995

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

Curiale, M.S.; et al. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 72 ,No. 2 p.312-318. 1989

Suhren , G. Milchwissenschaft. 45 ( 3 ), p.139-144. 1990

Curiale, M.S.; et al. J. Assoc. Off. Chem. 73 ( 2 ):242-248. 1990

Piton, C. J. Assoc. of Anal. Chem. 14 ( 1 ) : 92-103. 1991

Participaron en la elaboración de esta norma: Calderón, Cristina; Forgione, Maite; Franceschi, Olgamar; García, Margarita; Herrera, Josefina; Lara, Yolanda; Mendoza, Silvia; Novoa María Luisa; Ríos, Manuela.

**COVENIN  
3338:1997**

**CATEGORÍA  
A**

---

**COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES  
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12  
Telf. 575.41.11 Fax: 574.13.12  
CARACAS**

**I.C.S: 07.100.30**

**ISBN: 980-06-1955-0**

**publicación de:**



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

---

**Descriptor:** Microbiología de alimentos, recuento, bacteria aerobio, Petrifilm.