

00372
6-3-98
712

NORMA VENEZOLANA

COVENIN
3339:1997



PRODUCTOS LÁCTEOS. RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES. MÉTODO EN PLACAS CON PELÍCULAS SECAS REHIDRATABLES DE ALTA SENSIBILIDAD (Petrifilm[®])

PROLOGO



CFE 00
P.A.F. - B
27

COVENIN
3333:1997

NORMA
VENEZOLANA



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
PRODUCTOS LÁCTEOS. RECUENTO DE
COLIFORMES TOTALES. MÉTODO EN PLACAS
CON PELÍCULAS SECAS REHIDRATABLES DE
ALTA SENSIBILIDAD (Petrifilm[®])

COVENIN
3339:1997

1 OBJETO

Esta Norma Venezolana establece el método de ensayo para el recuento de coliformes totales en placas con películas secas rehidratables de alta sensibilidad (Petrifilm[®])¹.

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 5 ml. de la muestra y/o sus diluciones en placas Petrifilm[®] de 62 cm² de área 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 coliformes mediante un contador de colonias.

4 APARATOS

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

4.2 Placas Petrifilm de Alta Sensibilidad para Recuento de Coliformes.

4.2.1 Las placas Petrifilm[®] de Alta Sensibilidad para coliformes totales, consisten en dos películas rectangulares, unidas en la parte superior por uno de sus lados. La película inferior es un papel cuadrículado (cuadros de 1cm. x 1cm. cada uno) revestido de polietileno, la cual tiene una superficie aproximada de

62 cm² cubierta con el medio de violeta rojo bilis y un agente gelificante soluble en agua fría.

La película superior hecha de polipropileno recubierta con agentes gelificantes y el indicador 2,3,5, Cloruro de Trifenil-Tetrazolium

Las placas Petrifilm[®] de Alta Sensibilidad para coliformes totales, 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 Incubadora regulada a 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 y preparar la muestra según Norma COVENIN 1126.

6.1.1 En caso de productos lácteos 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 la placa que inhibe el crecimiento

¹ Petrifilm[™] 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."

bacteriano). Esto no se aprecia en el agar común debido a un efecto de dilución inherente al volumen del agar empleado).

6.1.3 Se recomiendan las siguientes diluciones específicas para una máxima sensibilidad.

6.1.3.1 Crema de leche, leche condensada, leche achocolatada, queso Cottage y productos relacionados: preparar dilución 1:5 (24.5 g/ 99 ml. diluyente).

6.1.3.2 Crema agria y Dips: proceder igual que en 6.1.3.1. Después de diluir, ajustar el pH.

6.1.3.3 Mantequilla, margarina, quesos : preparar dilución 1:10 (11 g/ 99 ml. de diluyente precalentado entre 40°C y 45°C).

6.1.3.4 Nata y yogurt : proceder igual que en 6.1.3.3. Después de diluir, ajustar el pH.

6.1.3.5 Helados, yogurt congelado y sus mezclas :Proceder como en 6.1.3.1 después de diluir, ajustar el pH.

6.1.3.6 Leche completa, leche al 2%, leche al 1% y leche descremada : inocular directamente sin diluir.

Nota 1: Para los productos lácteos diferentes a los mencionados se realizaran las diluciones convenientes.

6.2 Recuento de Coliformes Totales.

6.2.1 Colocar la placa Petrifilm[®] previamente identificada, sobre una superficie plana.

6.2.2 Levantar la película superior y con una pipeta colocada perpendicularmente a la placa, verter 5 ml. de la muestra o sus diluciones en el centro del círculo que contiene el medio deshidratado, ubicado en la película inferior.

Nota 2: En el caso de productos como mantequilla y margarina, tomar la muestra para la siembra de la fase acuosa.

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, realizando una suave presión sobre el soporte del aplicador 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 entre 2 y 5 minutos, para permitir la solidificación del agente gelificante.

6.2.6 Incubar las placas Petrifilm[®] de Alta Sensibilidad para coliformes totales durante 24 horas +/- 2 hr a 35°C +/- 1°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. Las colonias típicas de coliformes totales son de color rojo, asociadas a una o más burbujas de gas. Las colonias rojas no asociadas a gas no se cuentan como coliformes totales.

7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

7.1 El recuento de coliformes totales en la placa Petrifilm[®] de Alta Sensibilidad para coliformes totales, es la suma de las colonias rojas asociadas a gas.

7.2 El recuento de coliformes totales se expresa de la siguiente manera, según el tipo de producto, siempre que se hayan realizado las diluciones especificadas con anterioridad.

7.2.1 UFC/g. 6 ml para: crema de leche, leche condensada, queso Cottage, crema agria, dips, nata yogurt, helados, yogurt congelado, y leche achocolatada.

7.2.2 UFCx2 expresado por g 6 ml para: mantequilla, margarina y quesos.

7.2.3 UFCx0,2 expresado por g 6 ml para: leche completa, leche al 2%, leche al 1% y leche descremada.

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 siembra diluciones de la muestra.

7.4 Cuando el número de colonias es superior a 150 en todas las placas inoculadas, haga un estimado del recuento; para ello, cuente las colonias en 5 cuadros, promedie el valor obtenido, y multiplíquelo por 62 para obtener el recuento estimado de colonias por placa.

Nota 3: La sensibilidad de este método según la dilución utilizada es la siguiente:

Dilución 1:10 = 2 UFC/g. 6 ml.

Dilución 1:5 = 1 UFC/g. 6 ml.

Dilución 1:1 = 0,2 UFC/g. 6 ml.

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

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. Official Methods of Analysis. Method 996.02. 1996

Interstate Milk Shippers (IMS). USA. 1995

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
3339:1997**

**CATEGORÍA
B**

**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**

publicación de:



I.C.S: 07.100.30

ISBN: 980-06-1952-6

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

Descriptores: Microbiología de alimentos, producto lácteo, recuento de bacterias coliformes totales, Petrifilm, alta sensibilidad.