

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
939-76**

**LECHE Y PRODUCTOS  
DERIVADOS.  
METODO DE ENSAYO.  
REDUCCION DEL AZUL DE  
METILENO**



TRAMITE

COMITE: CT10 Alimentos  
PRESIDENTE: Dr. Demetrio Castillo  
SECRETARIO: Lic. Rafael Rivas Febres  
  
SUBCOMITE: SC3 Microbiologia de Alimentos  
COORDINADORES: Lic. Efrén Córdova  
Ing. Milagros Diaz

PARTICIPANTES

ENTIDAD

REPRESENTANTES

FACULTAD DE FARMACIA UCV

Dra. Josefina G. Ruiz

FACULTAD DE AGRONOMIA UCV

Dr. Rafael Oyón

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

Dra. María Luisa Novoa

MINISTERIO DE SANIDAD Y  
ASISTENCIA SOCIAL

Dr. Gustavo Toro Alayón

CIEPE

Dr. Ute Morris  
Lic. Aura Baublys

PRODUCTOS ALIMENTICIOS  
VENEZOLANOS C.A.-PRALVEN

Dra. María J. de López

INDUSTRIA LACTEA VENEZOLANA C.A.  
INDULAC

Dra. Mercedes de Marín  
Dra. María C. de Burgos

DISCUSION PUBLICA:

Fecha de Envió: 9-9-75

Duración: 90 días

FECHA DE APROBACION POR COVENIN: 10-8-76

NORMA VENEZOLANA  
LECHE Y PRODUCTOS DERIVADOS.  
METODO DE ENSAYO: REDUCCION  
DEL AZUL DE METILENO

COVENIN  
939-76

1.- ALCANCE

Esta norma contempla el método a emplear para medir indiscretamente la densidad microbiana de una muestra de leche cruda mediante la determinación del tiempo de reducción del azul de metileno.

2.- NORMAS COVENIN A CONSULTAR

2.1 COVENIN 938 Leche y sus Derivados. Métodos para la toma de muestras de leche y productos lácteos.

2.2 COVENIN 1126 Microbiología de Alimentos. Preparación y codificación de las muestras para el Análisis Microbiológico. (\*)

(\*) En elaboración.

3.- PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método consiste en medir el tiempo que tarda una mezcla de leche y azul de metileno en ser decolorada (de azul a blanco); y se basa en la capacidad que tienen algunos microorganismos, de utilizar el oxígeno disuelto en la mezcla, provocando un descenso de potencial de óxido reducción y en consecuencia la decoloración del indicador (azul de metileno).

4.- EQUIPO DE ENSAYO

4.1 APARATOS

4.1.1 Cucharón o pipeta de 10 mililitros de capacidad (10 cm<sup>3</sup>).

- 4.1.2 Bureta o pipeta con graduación de un mililitro (1 cm<sup>3</sup>).
- 4.1.3 Tubos de ensayo de 150 mm de longitud por 15 a 18 mm de diámetro interno, graduados para 10 ml.
- 4.1.4 Tapones de goma u otro material apropiado, que puedan ser esterilizados.
- 4.1.5 Gradilla de metal o de alambre para tubos de ensayo.
- 4.1.6 Baño de María Control automático de temperatura, graduado a 36°C ± 1°C.
- 4.1.7 Baño de agua helada o refrigerador, regulado a una temperatura entre 0°C y 4,4°C.
- 4.1.8 Frasco color ámbar con tapón de goma o tapa de rosca, de 250 ml de capacidad.
- 4.1.9 Reloj de laboratorio.
- 4.1.10 Termómetro con escala graduada de -5°C a 50°C con una apreciación de 0,1°C.
- 4.2 REACTIVOS
- 4.2.1 Solución de azul de metileno, preparada de la siguiente manera:
- 4.2.1.1 Se miden 200 + 2 ml de agua caliente previamente esterilizada en autoclave, o hervida.
- 4.2.1.2 Se disuelven en el agua 8,8 mg de tiocianato de azul de metileno.
- 4.2.1.3 Se conserva esta solución en envase estéril al resguardo de la luz y en lugar fresco, por un período no mayor de una semana.  
Esta solución debe prepararse y manipularse con las mayores precauciones para evitar su contaminación.
- 4.2.1.4 Se transvasa a un envase estéril mas pequeño, únicamente el volumen necesario para realizar la prueba del día; si de éste volumen sobra alguna porción, se descarta.

5.- MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra de leche cruda (10 ml) tomada según la norma COVENIN 938 y codificada y preparada según la norma COVENIN 1126.

6.- CONDICIONES DE ENSAYO

6.1 La muestra debe ser analizada dentro de un período no mayor de 36 h desde el momento del ordeño.

6.2 La muestra a analizar debe mantenerse a una temperatura entre 0°C y 4,4°C hasta el momento de realizarse la prueba.

7.- PROCEDIMIENTO

7.1 Se identifican todos los tubos que se vayan a utilizar.

7.2 Se coloca 1 ml de la solución de azul de metileno (4.2.1) en cada tubo de ensayo, y a continuación se añaden 10 ml de leche. Se coloca a cada tubo un tapón de goma o tapa de rosca.

7.3 Se invierte el tubo suavemente por tres veces, y se incuba la muestra en Baño María a una temperatura de 36 °C  $\pm$  1 C. La muestra debe alcanzar esta temperatura en un lapso no mayor de 10 min.

7.4 Cuando se vaya a analizar un mayor número de muestras, una vez preparada la mezcla según el punto 7.2, debe evitarse una exposición prolongada de las mismas a la acción de la luz (especialmente la luz solar directa). Se colocan los tubos en un baño de agua helada, para mantenerlos a una temperatura entre 0°C y 4,4°C, hasta completar un lote o gradilla. A continuación, se sigue el procedimiento como se indica en el punto 7.3.

7.5 Para verificar la temperatura de la muestra, en cada gradilla debe colocarse un termómetro dentro de un tubo de ensayo control, que contenga solamente 10 ml de leche.

7.6 Para controlar el inicio y la culminación de la decoloración, deben incluirse dos tubos control preparados de la manera siguiente:

7.6.1 Tubo 1: Se coloca 1 ml de agua y 10 ml de leche del mismo tipo que se usa como muestra y se mezclan.

7.6.2 Tubo 2: Se coloca 1 ml de solución de azul de metileno y 10 ml de leche del mismo tipo que se usa como muestra y se mezclan.  
Una vez preparados dichos tubos, se sumergen en agua hirviendo durante un período no menor de 3 min.

7.6.3 Se colocan los tubos en el Baño María junto con las muestras a examinar.

#### 8.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan de acuerdo al tiempo que tarda la muestra en decolorarse.

En adelante se designará abreviadamente al "Tiempo de Reducción del Azul de Metileno" con las siglas "TRAM".

8.1 Se considerará que un tubo está decolorado cuando por lo menos las 4/5 partes de su contenido cambie a color blanco.

8.2 La primera lectura se hace al cabo de 30 min. Si durante este período se decolora la muestra, se anota la lectura como TRAM 30 min, procediendo a retirar dicha muestra del baño María.

8.3 Las lecturas subsecuentes deben realizarse a intervalos sucesivos de una hora.

8.4 Cada vez que se efectúa una lectura, si no ha comenzado la decoloración, el tubo debe invertirse una vez y colocarse de nuevo en el baño. Si ha comenzado la decoloración se deja el tubo en el baño María, sin invertirlo.

8.5 Los resultados se anotan como tiempo de reducción en intervalos de horas completas, desde la triple inversión inicial de los tubos hasta el momento cuando se nota la decoloración en más de las 4/5 partes del contenido.

Ejemplo: Si el color desaparece entre las lecturas 1,5 y 2,5 horas, se reporta el resultado como TRAM 2 h. Si el color desaparece entre las lecturas 2,5 y 3,5 h, reportar el resultado como TRAM 3 h.

9.-

APENDICE

9.1

BIBLIOGRAFIA

9.1.1

APHA 1972 - American Public Health Association. Standard Methods For the Examination of Dairy Products. 13 th edition. Washington D.C.

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES  
MINISTERIO DE FOMENTO  
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Comin. Pinar 11 913  
1051-24411 Caracas 1033  
VENEZUELA



publicación de:

COVENIN

939-76

CATEGORIA

B

**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:



FONDONORMA

CDU 543:637.127.6

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.