

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
1104:1996**

**DETERMINACIÓN DEL  
NÚMERO MÁS PROBABLE  
DE COLIFORMES,  
COLIFORMES FECALES  
Y DE Escherichia coli**

**(2<sup>da</sup> Revisión)**



## 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 sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN 1104-84, fue elaborada bajo los lineamientos del Comité Técnico de Normalización CT101 Productos Alimenticios, por el Subcomité Técnico SC 3: Microbiología de los alimentos, y aprobada por la COVENIN en su reunión No. 141 de fecha 14/08/96.

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes entidades:

Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Instituto Nacional de Higiene, Universidad Central de Venezuela, Universidad Simón Bolívar, Fundación CIEPE, Aliver, S.A., FRICA, Laboratorios Brolab S.R.L., PARMALAT, EFE, S.A. y PROTINAL.

**NORMA VENEZOLANA**  
**ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO**  
**MÁS PROBABLE DE COLIFORMES,**  
**DE COLIFORMES FECALES**  
**Y DE *Escherichia coli***

**COVENIN**  
**1104:1996**  
**(2<sup>a</sup> Revisión)**

## 1 OBJETO

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para la determinación del Número más Probable (NMP) de bacterias coliformes, de coliformes fecales y de *Escherichia coli* en alimentos, mediante la utilización de medios líquidos.

## 2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Venezolana. Las ediciones indicadas 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 ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente:

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

## 3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método consiste en inocular volúmenes conocidos de muestras y/o sus diluciones, en cada uno de 3 ó 5 tubos de ensayo con tubos de fermentación incorporados y un medio de cultivo apropiado. Después del período de incubación a la temperatura correspondiente, se toma nota de los tubos que presentan formación de gas, se confirman en un medio de cultivo selectivo adecuado, y se obtiene el Número Más Probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*, utilizando las tablas definidas para tal fin.

## 4 APARATOS

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

4.2 Tubos de ensayo de 150 x 15 mm.

4.3 Tubos Durham o de fermentación de 10 x 75 mm.

4.4 Incubadora con regulador de agua.

4.5 Baño de agua con tapa, termoregulación y agitación constante.

4.6 Placas de petri de 10 x 100 mm.

4.7 Equipo de uso común en el Laboratorio.

## 5 REACTIVOS O MATERIALES

5.1 Medios de cultivo (véase anexo A)

5.1.1 Caldo lauril sulfato triptosa (CLST)

5.1.2 Caldo lactosa biliar verde brillante al 2% (L.B.V.B.)

5.1.3 Caldo Mac Conkey.

5.1.4 Caldo triptonado.

5.1.5 Caldo citrato de Koser.

5.1.6 Caldo para enriquecimiento de Coliformes (E.C.)

5.1.7 Agua peptonada

5.1.8 Agar Levine o rosina azul de metileno (E.M.B.).

5.1.9 Agar Endo.

5.1.10 Caldo glucosa tamponado (RM-VP)

5.1.11 Agar citrato de Simmons.

5.1.12 Agar nutritivo

5.2 Reactivos (véase anexo B)

5.2.1 Reactivo de Kovacs

5.2.2 Solución de alfa naftol al 5%

5.2.3 Solución de hidróxido de potasio al 40%

5.2.4 Solución indicadora de rojo de metilo.

## 6 PROCEDIMIENTO

6.1 La muestra se identifica y se prepara según lo indicado en la norma COVENIN 1126.

## 6.2 Determinación del NMP de coliformes

Para la realización de esta prueba, se puede utilizar uno de los métodos siguientes:

### 6.2.1 Primer método. Prueba presuntiva

6.2.1.1 Inocular volúmenes de 1 ml de la muestra y/o sus diluciones en cada uno de 3 ó 5 tubos con caldo lauril sulfato triptosa. Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ ; finalizado el período de incubación agitar suavemente cada tubo y observar la producción de gas y/o efervescencia; si ambas son negativas, reincubar por  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  adicionales.

6.2.1.2 Considerar como tubos positivos en la prueba presuntiva, aquellos que presenten gas en el tubo Durham des pues de 48 h de incubación.

### 6.2.2 Prueba confirmatoria

6.2.2.1 Agitar suavemente cada uno de los tubos positivos de la prueba anterior, y transferir un asa del cultivo evitando tomar la película si está presente, a tubos que contengan caldo bilis verde brillante (2 %), o se repican por estrías a placas que contengan agar Levine (EMB) o agar Endó. Incubar durante  $24\text{ h} - 48\text{ h}$ .

6.2.2.2 Considerar como tubos positivos en la prueba confirmatoria, aquellos donde se observa la producción de gas. Cuando se utilicen medios selectivos sólidos, considerar como positivas aquellas donde se observen la formación de colonias características: Agar Levine (EMB): colonias negras o con el centro negro, colonias mucoides de color rosa naranja, o púrpura oscuro con o sin brillo verde metálico, y en el Agar Endó: colonias rojas rodeados de halos rojos.

6.2.2.3 Anotar el número de tubos confirmados como positivos y llevar el valor a las tablas de NMP que corresponda (véase anexo C).

### 6.3.2 Segundo método

6.3.2.1 Inocular volúmenes de 1 ml de la muestra y/o diluciones en cada uno de 3 ó 5 tubos con caldo Mac Conkey. Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Finalizado el período de incubación, agitar suavemente cada tubo y observar la producción de gas y/o efervescencia; si ambas son negativas, reincubar por  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$  adicionales.

6.3.2.2 La producción de gas después de 24 h a 48 h de incubación se considera suficiente evidencia de la presencia de coliformes.

6.3.2.3 Para determinar el número más probable de coliformes, contar los tubos positivos obtenidos y llevar el

valor a las tablas de Número Más Probable que corresponda (véase anexo C).

## 6.4 Determinación del NMP de coliformes fecales

### 6.4.1 Primer método

6.4.1.1 De cada tubo con gas en caldo lauril sulfato triptosa (5.1.1) inocular con un asa de 3 mm, a tubos que contengan caldo para enriquecimiento de coliformes (E.C) previamente temperados a  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

6.4.1.2 Incubar en baño de agua a  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

6.4.1.3 Anotar los tubos con gas y llevar los resultados a la Tabla de Número Más Probable que corresponda (véase anexo C).

### 6.4.2 Segundo método

6.4.2.1 A partir de los tubos con gas en caldo Mac Conkey (6.3.2), inocular con un asa de 3 mm en cada uno de los siguientes medios:

a) Caldo láctosa bilis verde brillante al 2 % (5.2.1),

b) Agua peptonada (5.1.7) o caldo triptonado (5.1.4).

6.4.2.2 Incubar en baño de agua a  $44,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} - 48\text{ h}$ .

6.4.2.3 Observar si hay formación de gas en los tubos de caldo LBVB (5.1.2). Investigar la formación de indol, añadiendo 0,2 ml a 0,3 ml de reactivo de Kovacs al cultivo en agua peptonada o caldo triptonado después de 24 h. La aparición de un color rojo oscuro en la superficie indica que el resultado es positivo.

6.4.2.4 Para determinar el NMP de coliformes fecales contar los tubos positivos obtenidos en ambas pruebas y llevar ese valor a la tabla de NMP (Véase anexo C).

## 6.5 Determinación del NMP de Escherichia coli

La determinación se efectúa en base a los tubos positivos obtenidos en los puntos 6.4.1.3 y 6.4.2.4.

6.5.1 Para aislar Escherichia coli a partir de los caldos EC o LBVB, sembrar por estrías en placas con agar Levine (EMB) o con agar Endó previamente secas (5.1.8 y 5.1.9).

6.5.1.1 Incubar las placas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h}$  a  $48\text{ h}$ .

**6.5.1.2** Seleccionar las colonias color violeta oscuro o negro, con o sin brillo verde metálico en el agar Levine (EMB) o colonias rojas en el agar Endó y repicar en tubos que contengan agar nutritivo para la obtención de un cultivo puro.

**6.5.1.3** Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

**6.5.1.4** Proceder a realizar una coloración de Gram, a partir del cultivo obtenido en 6.5.1.3, a fin de observar la morfología y pureza del mismo.

**6.5.1.5** Realizar las pruebas de producción de indol, rojo metilo, Voges Proskauer y utilización del citrato (IMViC), a partir de los cultivos puros y de morfología característica obtenidos en 6.5.1.3; para ello sembrar con un asa de platino en los medio de cultivo indicados en cada una de las pruebas que se mencionan a continuación:

**6.5.1.6** Producción de Indol

**6.5.1.6.1** Inocular los tubos con caldo triptono ó agua peptonada e incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{ h}$

**6.5.1.6.2** Añadir a cada cultivo 0,2 ml a 0,3 ml del reactivo de Kovacs, agitar y observar el tipo de reacción:

**Reacción positiva:** Aparición de un color rojo oscuro en la superficie del medio

**Reacción dudosa:** Aparición de un color anaranjado, indicando la posible presencia de escatol.

**Reacción negativa:** Aparición de color amarillo.

**6.5.1.7** Prueba de Voges Proskauer y rojo de metilo.

**6.5.1.7.1** Inocular los tubos con caldo glucosa tamponada, e incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

**6.5.1.7.2** Transferir 1 ml del cultivo anterior a un tubo vacío, y añadir 0,6 ml de solución de alfa naftol 5 % y 0,2 ml de solución del hidróxido de potasio 40 % y mezclar, dejarlos en reposo durante 2 h a 4 h y observar la reacción.

**Reacción positiva:** Aparición de un color rosado o rojo carmesí.

**Reacción negativa:** Aparición de color amarillo a marrón.

**6.5.1.7.3** Reincubar el cultivo obtenido en 6.5.1.7 a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$  adicionales. Añadir 5 gotas de solución rojo de metilo, agitar y observar la reacción.

**Reacción positiva:** Aparición de color rojo bien definido

**Reacción negativa:** Aparición de color amarillo

**6.5.1.8** Utilización del citrato

**6.5.1.8.1** Transferir un pequeño inoculo a tubos con caldo citrato de Koser, ó agar citrato de Simmons. Si utiliza éste último, sembrar una línea recta en el centro del bisel.

**6.5.1.8.2** Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 72 h a 96 h si utiliza el caldo citrato de Koser, ó durante  $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$  si utilizó el agar citrato de Simmons y observar la reacción:

**Reacción positiva:**

a) caldo citrato de Koser: aparición de turbidez.

b) agar citrato de Simmons: aparición de crecimiento y cambio del color verde claro del medio a azul.

**6.5.2** Considerar como *E. coli*, los cultivos que presenten las siguientes características:

- Fermentación de la lactosa con producción de gas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $44\text{ }^{\circ}\text{C}$  ó  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Aspecto de coccobacilos ó bacilos cortos Gram negativos, en la coloración de Gram.

- Obtiene uno de los siguientes resultados en las pruebas IMViC

Microorganismos	Indol	RM	VP	Citrato
<i>E. coli</i> (I)	+	+	-	-
<i>E. coli</i> (II)	-	+	-	-

**6.5.3** Los tubos que generan cultivos con las características mencionadas en 6.5.2 se motan como positivo y se llevan a la tabla de NMP que corresponda, a fin de determinar el NMP de *E. coli*.

## 7 Expresión de resultados:

**7.1** Los resultados de NMP de Coliformes, Coliformes fecales y *E. coli*, se expresan por ml ó g, según se trate de muestras líquidas ó sólidas.

**7.2** Para la expresión de los resultados, se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

**7.2.1** Llevar a la tabla los valores obtenidos en tres diluciones consecutivas.

**7.2.2** Si no se emplean porciones correspondientes a aquellas expresadas en la tabla (0,1 , 0,01 y 0,001), se debe obtener el resultado aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{NMP/g ó ml} = \frac{\text{NMP Obtenido en la Tabla} \times \text{Dilución Invertida}}{100}$$

**7.2.3** Si todos los tubos inoculados son positivos, reportar el valor de la tabla para el máximo de tubos positivos (3-3-3 ó 5-5-5) anteponiendo la expresión "más de" y considerando las porciones de muestra utilizadas (véase anexo D, ejemplos 3, 4 y 5).

**7.2.4** Si no se obtiene tubos positivos reportar el valor de la tabla para la combinación 0-0-0, anteponiendo la expresión "menos de", y considerando las porciones de muestras inoculadas. (véase anexo D, ejemplos 6, 7 y 8)

**7.2.5** Si aún después de repetir el ensayo, se obtienen combinaciones de tubos positivos que no se encuentran en la tabla, se puede obtener el resultado por extrapolación a otra combinación, donde se tengan igual número de tubos positivos. (véase anexo D, ejemplo 9)

**7.2.6** Cuando se han inoculado más de tres series consecutivas de muestras y sus diluciones, los valores que se llevan a la tabla son los correspondientes a tres series consecutivas, tomando en cuenta las siguientes reglas:

**7.2.6.1** Llevar a la tabla la dilución más alta (ó la menor porción de muestra) donde se obtengan todos los tubos positivos y las dos diluciones superiores siguientes. (véase anexo D, ejemplos 10, 11 y 12).

**7.2.6.2** Si ninguna de las diluciones presenta los tres tubos positivos, seleccionar las 3 diluciones más altas, con algún tubo positivo. (véase anexo D, ejemplo 13).

**7.2.6.3** Si se obtiene una dilución con todos los tubos positivos, seguida de algunos tubos positivos en las tres diluciones siguientes, añadir el número de tubos positivos de la mayor dilución, a la más alta de las tres diluciones consecutivas seleccionados. (véase anexo D, ejemplo 14)

**7.2.6.4** Cuando se obtenga tubos positivos sólo en alguna de las diluciones medias, selecciona las tres primeras diluciones consecutivas para las cuales la dilución media tenga el resultado positivo. (véase anexo D, ejemplo 15).

**7.2.6.5** Si todas las diluciones muestran todos los tubos positivos, seleccionar las 3 diluciones más altas inoculadas. (véase anexo D, ejemplo 16)

**7.2.6.6** Cuando se emplean series de 5 tubos, se toman en cuenta las mismas consideraciones anteriores, pero utilizando la Tabla NMP correspondiente.

## 8. INFORME

El informe del ensayo debe indicar como mínimo la siguiente información:

**8.1** Fecha 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 utilizada

**8.5** Nombre del analista

**8.6** Observaciones

## BIBLIOGRAFÍA

APHA 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3<sup>rd</sup> Ed. American Public Health Association. Editor M. Speck. Washington D.C.

Bacteriological Analytical Manual. 1992. Food and Drug Administration. 7<sup>th</sup> Edición. U.S. International.

ICMSF 1974. "Microorganisms in Foods, 1. Their significance and Methods of enumeration" 2<sup>nd</sup> Edit. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. University of Toronto Press. Canadá.

## ANEXO A

### FÓRMULA Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS REQUERIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES, DE COLIFORMES FECALES Y DE *Escherichia coli* \*

#### I.- MEDIOS DE CULTIVO

##### 1.1 Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST) (5.1.1)

###### 1.1.1 Fórmula

Triptosa, triptona o Tripticum	20,0	g
Lactosa	5,0	g
Fosfato Dipotásico	2,75	g
Fosfato Monopotásico	2,75	g
Cloruro de Sodio	5,0	g
Lauril Sulfato de Sodio	0,1	g
Agua destilada	1.000	ml

###### 1.1.2 Preparación

1.1.2.1 Disolver completamente los ingredientes en el agua destilada y repartir en porciones de 10 ml en tubos de 150 mm x 15 mm con tubos de Durham incorporados.

1.1.2.2 Esterilizar en el autoclave a 121 °C por 15 minutos (15 libras de presión). El pH final debe ser aproximadamente de 6,8.

##### 1.2 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante al 2 % (LBVB) (5.1.2)

###### 1.2.1 Fórmula

Peptona	10,0	g
Lactosa	10,0	g
Bilis de buey deshidratada	20,0	g
Verde brillante (Sol. Acumosa 0,5 % p/v)	2,66	ml
Agua destilada	1000	ml

###### 1.2.2 Preparación

1.2.2.1 Disolver la peptona y la lactosa en 500 ml de agua aproximadamente.

1.2.2.2 Disolver bilis de buey deshidratada en 200 ml de agua destilada y mezclar con la solución de peptona y lactosa (el pH de la solución debe ser de 7,0 a 7,5)

1.2.2.3 Ajustar el pH a 7,4

1.2.2.4 Añadir 2,66 ml de solución acuosa de Verde Brillante al 0,5 % y llevar el volumen final hasta un litro con agua destilada.

1.2.2.5 Repartir cantidades de 10 ml por tubo de ensayo (con tubo de Durham incorporado)

1.2.2.6 Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. El pH final debe estar entre 7,1 y 7,4.

##### 1.3 Caldo Mac Conkey (5.1.3)

###### 1.3.1 Fórmula

Peptona	20,0	g
Lactosa	10,0	g
Sales Biliares	5,0	g
Cloruro de Sodio	5,0	g
Púrpura de Bromocresol 1% *	1,0	ml
Rojo neutro 0,1 % **	7,5	ml
Agua destilada	1000	ml

\* Púrpura de Bromocresol 1 %. Pesar 1 g. del colorante y añadir 19 ml. hidróxido de sodio 0,1 N y 81 ml de agua destilada.

\*\* Rojo Neutro 0,1 %. Disolver 1 g. del colorante en 100 ml. de un disolvente compuesto por 90 % alcohol etílico 10 % de agua.

###### 1.3.2 Preparación

1.3.2.1 Disolver completamente los ingredientes en el agua, ajustar el pH a 7,6 y repartir en cantidades de 10 ml por tubo, (con tubo de Durham incorporado).

1.3.2.2 Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

##### 1.4 Caldo triptonado (5.1.4)

###### 1.4.1 Fórmula

Triptona	10	g
Agua	1000	ml

###### 1.4.2 Preparación

1.4.2.1 Disolver los ingredientes en el agua destilada y ajustar el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de 7,2 ± 0,1

1.4.2.2 Distribuir en porciones de 5 ml en los tubos de ensayo (4.1.1) y se esteriliza a 121°C por 15 min.

## 1.5 Caldo citrato de Koser

### 1.5.1 Fórmula

Fosfato de amonio y sodio	1,5	g
Fosfato monopotásico	1,0	g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,2	g
Citrato de sodio dihidratado	2,5	g
Azul de bromotimol (solución al 0,2 %)*	5,0	ml
Agua destilada	990	ml

\* Opcional

### 1.5.2 Preparación

1.5.2.1 Disolver los ingredientes en el agua, distribuir en tubos en volúmenes de 5 ml y esterilizar a 121°C por 15 min. El pH final debe ser aproximadamente 6,8.

## 1.6 Caldo para enriquecimiento de coliformes (E.C.) (S.1.6)

### 1.6.1 Fórmula

Triptosa	20,0	g
Lactosa	5,0	g
Mezcla de Sales Biliares	1,5	g
Fosfato Dipotásico	4,0	g
Fosfato Monopotásico	1,5	g
Cloruro de Sodio	5,0	g
Agua destilada	1000	ml

### 1.6.2 Preparación

1.6.2.1 Disolver los ingredientes completamente por agitación en agua destilada, calentar suavemente si fuese necesario.

1.6.2.2 Repartir 10 ml. de la solución en tubos 150 mm x 15 mm (4.1.1) (con tubos Durham incorporados) y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos. El pH final debe ser de 6,8.

## 1.7 Agua peptonada (S.1.7)

### 1.7.1 Fórmula

Peptona	10,0	g
Cloruro de sodio	5,0	g
Agua destilada	1000	ml

### 1.7.2 Preparación

1.7.2.1 Disolver los ingredientes en el agua destilada y ajustar el medio de manera que el pH después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,1$ .

1.7.2.2 Distribuir en porciones de 10 ml en los tubos de ensayo (4.1.1) y esterilizar a 121 °C por 15 min.

## 1.8 Agar Levine o Eosina Azul de Metileno (EMB) (S.1.8)

### 1.8.1 Fórmula

Peptona	10,0	g
Lactosa	10,0	g
Fosfato Dipotásico	2,0	g
Agar	15,0	g
Eosina Y (Solución acuosa 2 % p/v)	20,0	ml
Azul de Metileno (Sol. acuosa 0,25 % p/v)	25,0	ml
Agua destilada	1.000	ml

### 1.8.2 Preparación

1.8.2.1 Preparar una solución acuosa de Eosina Y al 2 % y una solución acuosa de azul de metileno al 0,25 %.

1.8.2.2 Agregar todos los ingredientes a 955 ml de agua destilada y añadir 20 ml de la solución de Eosina Y y 25 ml de la solución de azul e metileno.

1.8.2.3 Calentar en ebullición hasta disolver completamente, enfriar hasta 50 °C - 60 °C, mezclar bien y reparar según se requiera (generalmente en porciones de 100 ml a 200 ml.)

1.8.2.4 Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## 1.9 Agar Endo (S.1.9)

### 1.9.1 Fórmula

Peptona	10	g
Lactosa	10	g
Fosfato de Dipotásico	3,5	g
Sulfito de sodio 10 %	2,5	ml
Fucsina básica (solución al 4 % en alcohol de 95 %)	10	ml
Agar	15	g
Agua destilada	1000	ml

### 1.9.2 Preparación

1.9.2.1 El medio debe usarse el mismo día de su preparación. Agregar los ingredientes al agua destilada exceptuando el sulfito de sodio y la fucsina. Calentar a ebullición hasta disolución completa. Repartir volúmenes de 100 ml en matraces y esterilizar a 121 °C por 15 min.

1.9.2.2 Inmediatamente antes de su uso, fundir el agar y añadir a cada 100 ml., 1ml de la solución de fucsina básica y 0,25 ml de una solución acuosa de sulfito de sodio al 10 % (el sulfito de sodio debe prepararse inmediatamente antes del uso). Mezclar convenientemente y verter en

porciones de 15 ml a 20 ml en placas de Petri. El pH final debe ser 7,5.

### 1.10 Caldo glucosa tamponado (S.1.10)

#### 1.10.1 Fórmula

Yeastosa peptona	5,0 g
Glucosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Agua destilada	1000 ml

#### 1.10.2 Preparación

1.10.2.1 Suspender los ingredientes en el agua, calentar suavemente con agitación hasta obtener disolución completa.

1.10.2.2 Repartir la solución en porciones de 5 ml en tubos de ensayo y esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 minutos. El pH final debe ser de 6,9.

### 1.11 Agar citrato de Simmons (S.1.11)

#### 1.11.1 Fórmula

Sulfato de magnesio	0,2 g
Fosfato monoamónico	1,0 g
Fosfato Dipotásico	1,0 g
Citrato de sodio	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Azul de Bromotimol (Solución acuosa 0,2 % p/v)	40,0 ml
Agua destilada	1000 ml

### 1.11.2 Preparación

1.11.2.1 Suspender los ingredientes en el agua y se calienta hasta ebullición para disolver el medio completamente.

1.11.2.2 Distribuir 10 ml. del medio en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Dejar solidificar en posición inclinada de manera de obtener 2,5 cm. de columna. El pH final debe ser de 6,8 a 7,0.

### 1.12 Agar nutritivo (S.1.12)

#### 1.12.1 Fórmula

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

#### 1.12.2 Preparación

1.12.2.1 Suspender los ingredientes en el agua, calentar a ebullición hasta disolver completamente y enfriar a 50 °C - 60 °C, ajustando el pH de manera que después de la esterilización sea de 6,8 a 7,0.

1.12.2.2 Distribuir en tubos o en balones según se requiera y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

\* Estos medios de cultivo pueden conseguirse ya preparados en las diferentes casas comerciales.

## ANEXO B

### 2 REACTIVOS

#### 2.1 Reactivo de Kovacs (5.2.1)

##### 2.1.1 Fórmula

Paradimetilaminobenzaldehído	5,0	g
Alcohol Amílico	75,0	ml
Acido Clorhídrico (Concentrado)	25,0	ml

##### 2.1.2 Preparación

2.1.2.1 Disolver el paradimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y calentar a temperatura inferior de 60 °C, dejar enfriar colocando un recipiente con hielo y añadir el ácido clorhídrico poco a poco.

#### 2.2 Solución de alfa-naftol al 5 % (5.2.2)

Disolver 5 g de alfa-naftol (punto de fusión 92,5 °C o más) en 100 ml de alcohol etílico absoluto.

#### 2.3 Solución de hidróxido de potasio de 40 % (5.2.3)

Disolver 40 g hidróxido de potasio en agua destilada y llevar a volumen en un matraz aforado de 100 ml.

#### 2.4 Solución indicadora de rojo de metilo (5.2.4)

Disolver 0,1 g de rojo de metilo en 300 ml de alcohol etílico (95 %), y diluir con 200 ml de agua destilada.

ANEXO C

Tabla 1. Número Más Probable (NMP) y Límite de Confianza 95 %, en pruebas con tubos de fermentación cuando son utilizados tres tubos con volúmenes de 0,1; 0,01; y 0,001 g<sup>a</sup>.

No. de tubos positivos /3 tubos			NMP/g <sup>b</sup>	Límite de Confianza 95 %	
0.1 g	0.01 g	0.001 g		Inferior	Superior
0	0	0	< 3	-	-
0	1	0	3+	<1	17
1	0	0	4	<1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14 +	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1.400
3	3	1	460	100	2.400
3	3	2	1.100	300	4.800
3	3	3	>1100	-	-

a = Los resultados normales obtenidos en el 95 % de las pruebas, no se les coloca el signo más, 14% resultados menos probables obtenidos en el 4 %, de las pruebas son seguidos por el signo más. Las combinaciones de tubos positivas que no se muestran, ocurren en menos del 1 % de los ensayos, y la frecuencia indica que la técnica es defectuosa o la presunción fundamental en el cálculo de NMP no se está cumpliendo. El cálculo de NMP, para combinaciones que no se muestran se pueden obtener por extrapolación (o por la fórmula de Thomas) o la combinación cercana más alta que este representado en la tabla. Por ejemplo, un resultado de 2,0,2 tendría un NMP de aproximadamente 30, el cual es el NMP parecido al resultado de 2,1,1.

b = Todas las cifras bajo el título "NMP/g", pueden ser multiplicado por 100 para obtener "NMP/100g".

ANEXO C

Tabla 2. Número Más Probable (NMP) y límite de confianza 95 %, en pruebas con tubos de fermentación cuando se utilizan cinco tubos con volúmenes de 0,1; 0,01; y 0,001 g<sup>3</sup>.

No. de tubos positivos /5 tubos			NMP/g <sup>3</sup>	Límite de Confianza 95 %	
0.1 g	0.01 g	0.001 g		Inferior	Superior
0	0	0	<2	-	-
0	0	1	2+	<1	10
0	1	0	2	<1	10
1	0	0	2	<1	11
1	0	1	4+	1	15
1	1	0	4	1	15
1	2	0	6+	2	18
2	0	0	4	1	17
2	0	1	7+	2	20
2	1	0	7	3	21
2	1	1	9+	3	25
2	2	0	9	3	25
3	0	0	8	3	24
3	0	1	11	4	29
3	1	0	11	4	30
3	1	1	14+	6	35
3	2	0	14	6	35
3	2	1	17+	7	40
3	3	0	17+	7	41
4	0	0	13	5	38
4	0	1	17	7	45
4	1	0	17	7	46
4	1	1	21	9	55
4	2	0	22	9	56
4	2	1	26+	12	65

## ANEXO C

Continuación de la Tabla 2  
Número Más Probable (NMP) y límite de confianza 95 %, en pruebas con tubos de fermentación cuando se utilizan cinco tubos con volúmenes de 0,1; 0,01; y 0,001 g<sup>a</sup>.

No. de tubos positivos /5 tubos			NMP/g <sup>b</sup>	Límite de Confianza 95 %	
0.1 g	0.01 g	0.001 g		Inferior	Superior
4	3	0	27	12	67
4	3	1	33+	15	77
4	4	0	34+	16	80
5	0	0	23	9	68
5	0	1	31	13	110
5	1	0	33	14	120
5	1	1	46	20	150
5	1	2	63+	22	180
5	2	0	49	21	170
5	2	1	70	30	210
5	2	2	94+	40	250
5	3	0	79	30	250
5	3	1	110	40	300
5	3	2	140	60	360
5	4	0	130	50	390
5	4	1	170	70	480
5	4	2	220	100	580
5	4	3	280+	120	690
5	4	4	350+	160	820
5	5	0	240	100	940
5	5	1	350	100	1.300
5	5	2	540	220	2.000
5	5	3	920	300	2.900
5	5	4	1.600	600	5.300
5	5	5	>1600		

a = Los resultados normales obtenidos en el 95 % de las pruebas, no se les coloca el signo mas. Los resultados menos probables obtenidos en el 4 %, de las pruebas son seguidos por el signo mas. Las combinaciones de tubos positivos que no se muestran, ocurren en menos del 1 % de los ensayos, y la frecuencia indica que la técnica es defectuosa o la presunción fundamental en el cálculo de NMP no se está cumpliendo. El cálculo de NMP, para combinaciones que no se muestran se pueden obtener por extrapolación (o por la fórmula de Thomas) o la combinación cercana más alta que este representado en la tabla. Por ejemplo, un resultado de 2,0,2 tendría un NMP de aproximadamente 20, el cual es el NMP parecido al resultado de 2,1,1.

b = Todas las cifras bajo el título "NMP/g", pueden ser multiplicado por 100 para obtener "NMP/100g"

## ANEXO D

## EJEMPLOS DE UTILIZACIÓN DE LAS TABLAS DE NÚMERO MÁS PROBABLE

Ejemplos N°	N° DE TUBOS POSITIVOS OBTENIDOS EN CADA UNA DE LAS PORCIONES DE MUESTRAS UTILIZADAS										COMBINACIÓN SELECCIONADA	NMP
	1	0,1	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001					
1	3	2	1								3-2-1	15
2			3	2		1					3-2-1	1.500
3	3	3	3								3-3-3	más de 110
4		3	3	3							3-3-3	más de 1100
5			3	3	3						3-3-3	más de 11000
6	0	0	0								0-0-0	menos de 0,3
7		0	0	0							0-0-0	menos de 3,0
8			0	0	0		0				0-0-0	menos de 30
9		2	0	2							2-1-1	20
10			3	3	1			0			3-1-0	4.300
11	3	3	1	0							3-1-0	43
12			3	3	0			0			3-0-0	2.300
13		2	2	1	1			0			2-1-1	200
14		3	3	2	1			1			3-2-2	2.100
15	0	0	1	0	0			0			0-1-0	3
16			3	3	3			3			3-3-3	más de 110000

COVENIN  
1104:1996  
(2<sup>a</sup> Revisión)

CATEGORIA  
C

---

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

ISBN: 980-06-1693-3

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

---

Descriptores: Microbiología de alimentos, coliforme fecal, Escherichia coli, recuento de bacterias.