



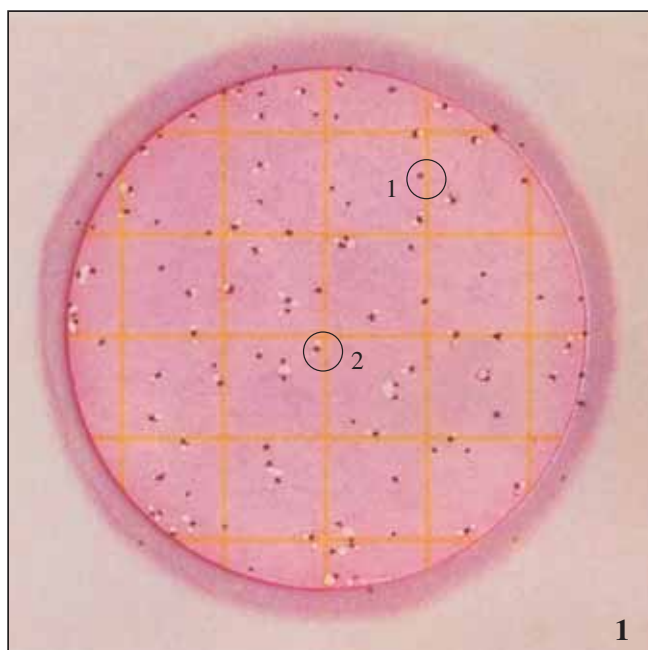
Petrifilm™

Placas para Recuento de Coliformes

Esta guía sirve para familiarizarse con los resultados obtenidos en las placas 3M™ Petrifilm™ para Recuento de Coliformes (CC). Para más información, contactar con el distribuidor oficial de Productos 3M Microbiology.

Las placas Petrifilm CC contienen los nutrientes del Violeta Rojo Bilis (VRB) modificado, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias. El film superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por los coliformes.

- La **ISO** define los coliformes por su capacidad de crecer en medios específicos y selectivos. El **método ISO 4832**, que enumera los coliformes por la técnica del recuento de colonias, define los coliformes por el tamaño de las colonias y la producción de ácido en el Agar VRB con lactosa (VRBL). En las placas Petrifilm CC, estos coliformes productores de ácido se muestran como colonias rojas con o sin gas (ver Círculo 1). El **método ISO 4831**, que enumera los coliformes por el método del Número Más Probable (NMP), define los coliformes por su capacidad de crecer y producir gas a partir de la lactosa en un caldo selectivo. En las placas Petrifilm CC, estos coliformes se muestran como colonias rojas asociadas a gas (ver Círculo 2).
- La **AOAC INTERNATIONAL** y la **FDA** (Food and Drug Administration) / **BAM** definen los coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica. Las colonias de coliformes que crecen en las placas Petrifilm CC producen ácido que provoca que el indicador de pH oscurezca el color del gel; el gas atrapado alrededor de las colonias indica coliformes (ver Círculo 2).

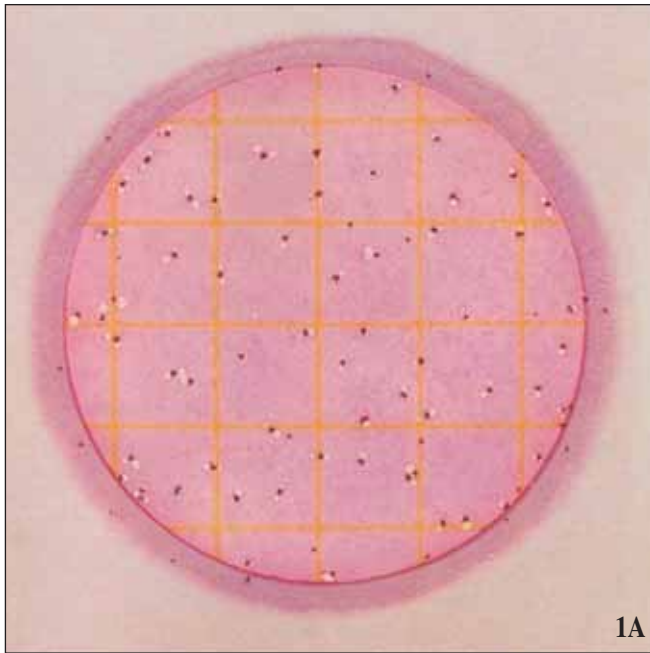


Recuento de colonias productoras de gas : 75
Recuento de colonias no productoras de gas : 24
Recuento total : 99

El tiempo y temperatura de incubación, así como la interpretación de las placas Petrifilm CC puede variar con el método.

La AOAC®, la AFNOR y la NMKL han validado el uso de las placas Petrifilm CC bajo condiciones específicas. Ver páginas 2 y 3 de esta Guía de Interpretación.

Interpretación de las Placas 3M Petrifilm CC según los protocolos descritos por las siguientes organizaciones:
AOAC[®], NMKL y AFNOR



65 coliformes, AOAC[®] Official Methods

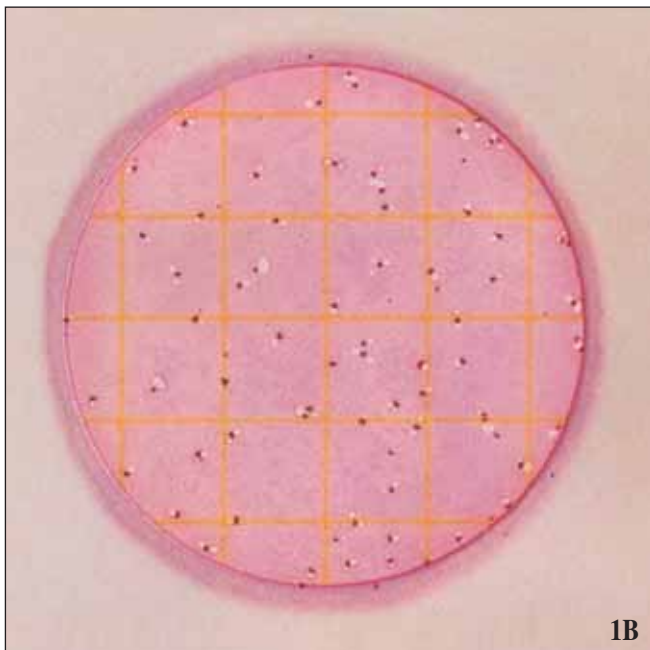
Lectura según los AOAC[®], Official MethodsSM
(986.33, 989.10 y 991.14)

Incubación :

- *Enumeración de coliformes en leche, leche cruda y productos lácteos (Métodos Oficiales 986.33 y 989.10) :* incubar 24h +/- 2h a 32°C +/- 1°C.
- *Enumeración de coliformes en todos los productos, excepto los arriba mencionados (Método Oficial 991.14) :* incubar 24h +/- 2h a 35°C +/- 1°C.

Interpretación :

- Coliformes : Contar todas las colonias rojas con gas.



67 coliformes, método validado NMKL.

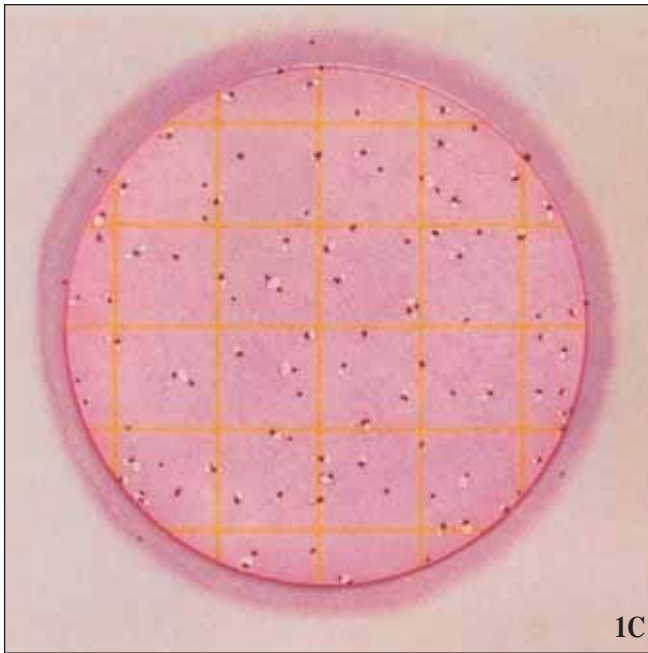
Lectura según el método validado por la NMKL
(147.1993)

Incubación :

24h +/- 2h a 37°C +/- 1°C

Interpretación :

- Coliformes : Contar todas las colonias rojas con gas.



97 coliformes, método aprobado **AFNOR** comparado con el método ISO 4832

72 coliformes productores de gas, método aprobado **AFNOR** comparado con el método ISO 4831.

Lectura según la aprobación AFNOR para coliformes totales

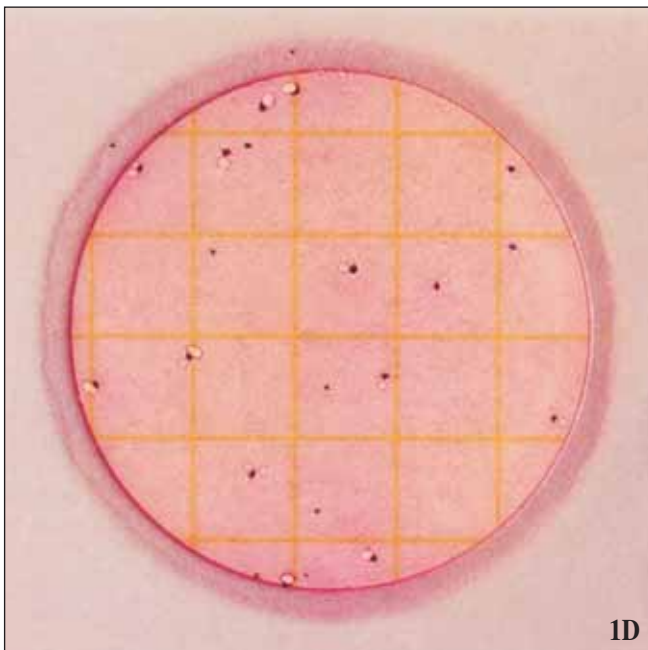
(certificados número 3M 01/2-09/89A y 3M 01/2-09/89B)

Incubación :

24h +/- 2h a 30°C +/- 1°C

Interpretación :

- *Comparación con el método ISO 4832 (certificado 3M 01/2-09/89A) :*
Contar todas las colonias rojas con o sin gas
- *Comparación con el método ISO 4831 (certificado 3M 01/2-09/89B) :*
Contar sólo las colonias rojas con gas.



21 coliformes, método aprobado **AFNOR** comparado con el método NF V08-017.

Lectura según la aprobación AFNOR para coliformes termotolerantes

(certificados número 3M 01/2-09/89C)

Incubación :

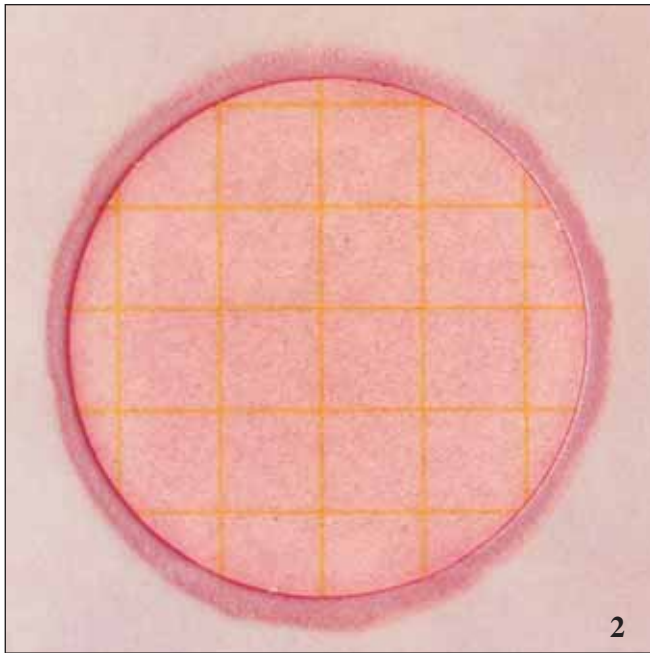
24h +/- 2 a 44°C +/- 1°C

Interpretación :

- *Comparación con el método NF V08-017 :*
Contar todas las colonias rojas con o sin gas.

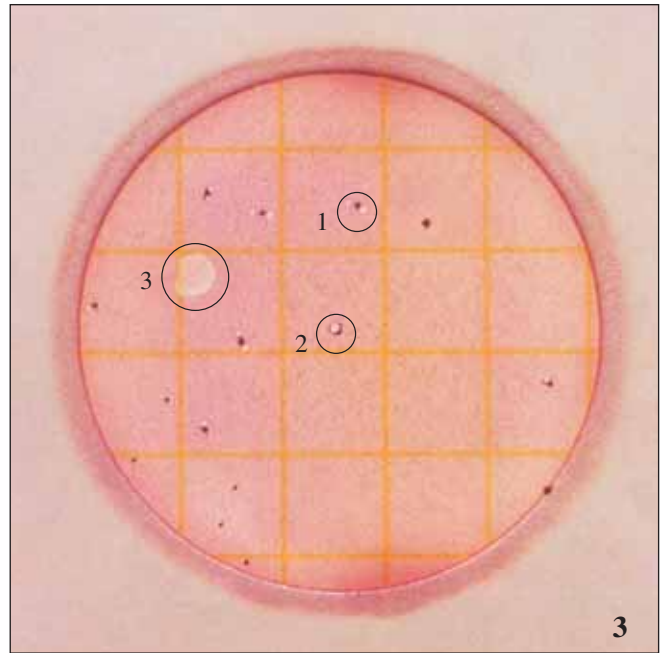
Placas 3M™ Petrifilm™ Recuento de Coliformes

Al incrementar el recuento de coliformes, el color del gel se oscurece, como se muestra en las figuras 2 a 6.



Recuento de colonias = 0

Las burbujas de fondo son una característica del gel y no resultado del crecimiento de coliformes. Las burbujas de fondo son pequeñas o puntiformes y no tienen una colonia asociada.



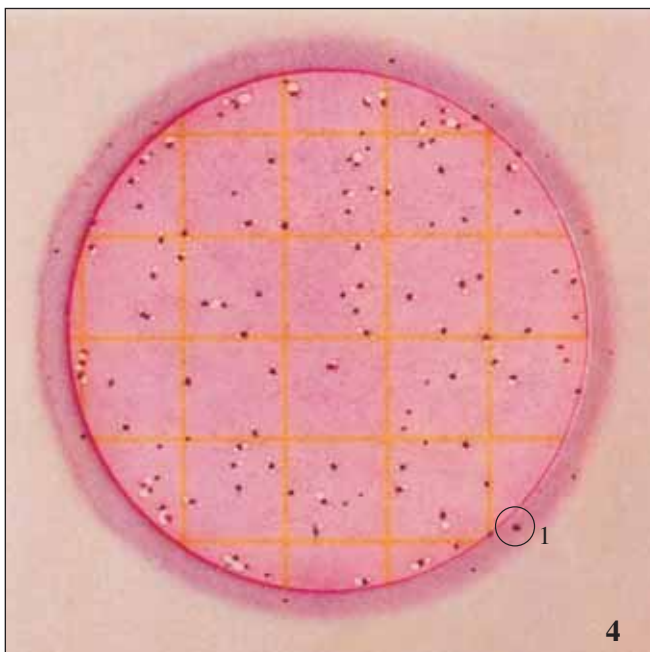
Recuento de colonias no productoras de gas : 7

Recuento de colonias productoras de gas : 8

Recuento total : 15

La Figura 3 muestra como la forma de las burbujas puede variar. Algunas veces el gas deforma la colonia y hace que la colonia "perfile" la burbuja (ver Círculos 1 y 2). Estas burbujas de gas tienen aproximadamente el diámetro de una colonia.

Pueden aparecer burbujas como artefactos debidas a una inoculación inadecuada de la placa Petrifilm CC o de aire atrapado en la muestra. Las burbujas tienen forma irregular y no están asociadas a una



colonia. (ver Círculo 3).

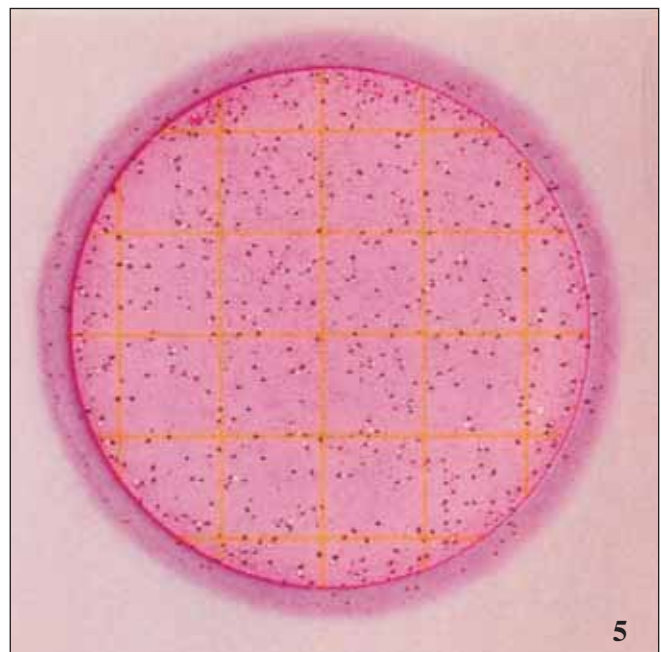
Recuento de colonias productoras de gas : 29

Recuento de colonias no productoras de gas : 83

Recuento total : 112

El intervalo óptimo de recuento (colonias totales) en las placas Petrifilm CC es 15 - 150 colonias.

No contar las colonias que aparecen sobre la zona blanca ya que no están bajo la influencia selectiva del medio (ver Círculo 1).



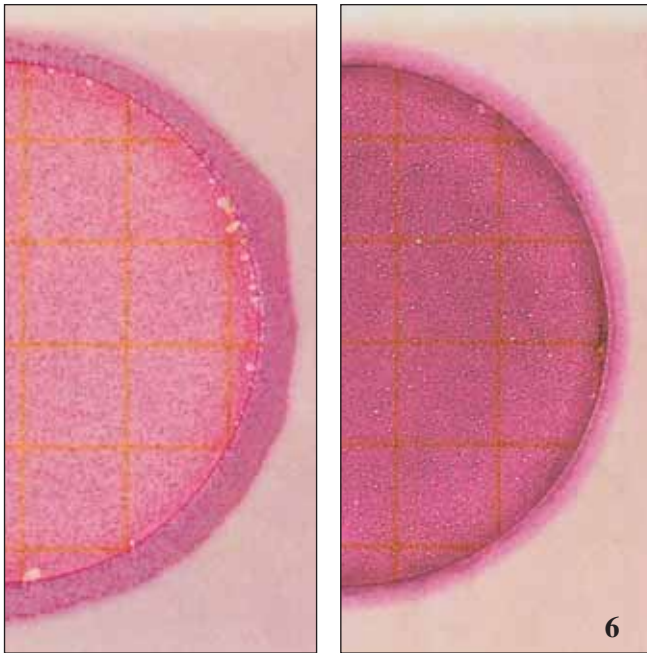
Recuento total estimado : 310

El área de crecimiento circular de la placa Petrifilm CC es de aproximadamente 20 cm². Se pueden hacer estimaciones en placas con más de 150 colonias contando el número de colonias en uno o varios cuadrados representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento estimado por placa Petrifilm CC.

Para obtener un recuento más preciso, diluir más la muestra.

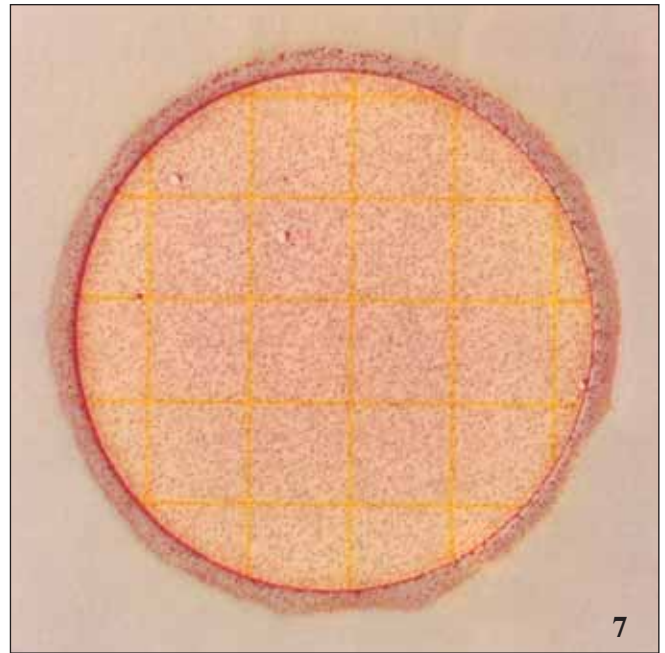
Placas TNTC Demasiado Numerosas Para Contar

Para obtener un recuento más preciso, diluir más la muestra.



Placas TNTC (Demasiado Numerosas Para Contar)

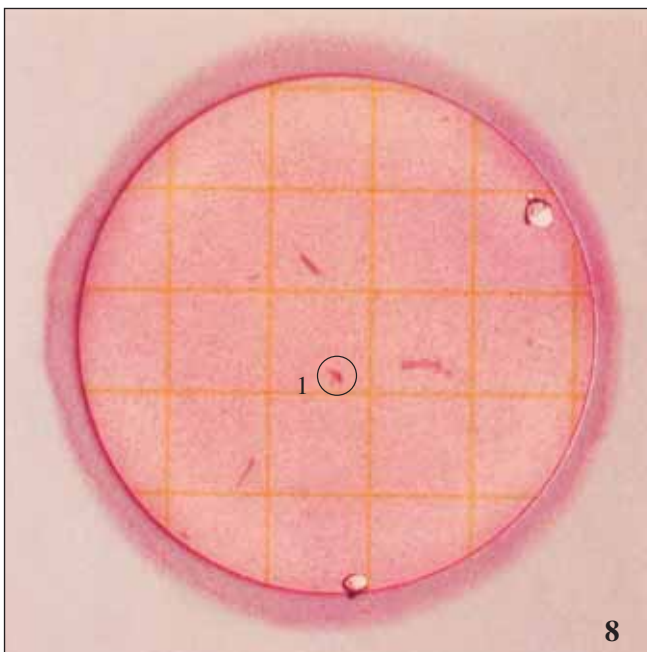
Las placas Petrifilm CC con colonias TNTC tienen una o más de las características siguientes: muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas, y un oscurecimiento del color del gel



Colonias productoras de gas : 4

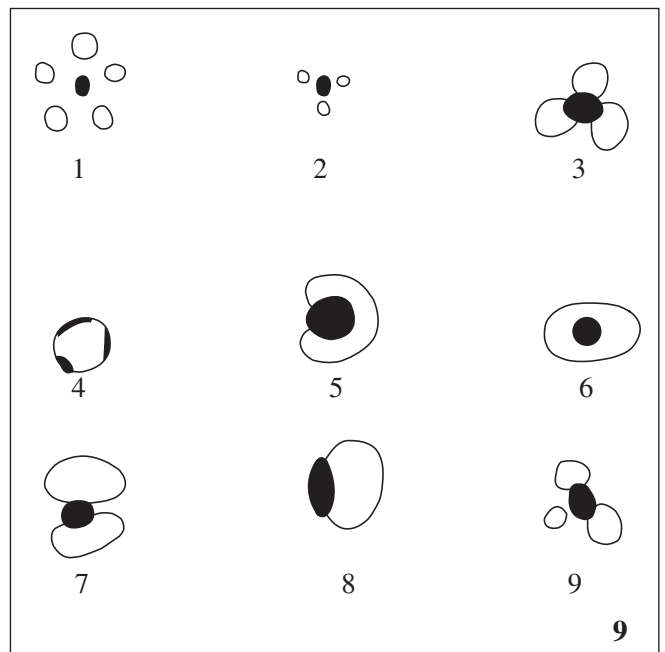
Cuando un alto número de microorganismos no-coliformes, tales como *Pseudomonas*, están presentes en las placas Petrifilm CC, el gel puede virar a amarillo.

Burbujas



Colonias productoras de gas : 2

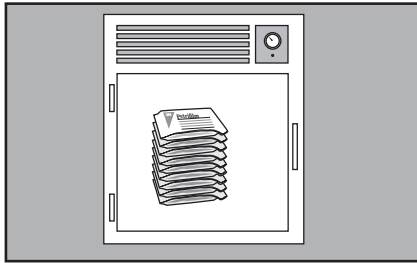
Las partículas alimenticias tienen forma irregular y no están asociadas a burbujas de gas (ver Círculo 1).



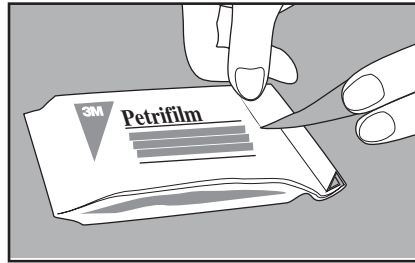
Arriba se muestran varios ejemplos de burbujas asociadas a una colonia. Todos ellos se deben contar.



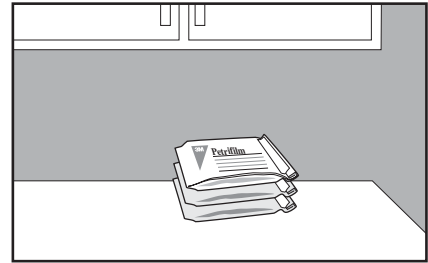
Almacenamiento



1 **Conservar** las bolsas cerradas a $\leq 8^{\circ}\text{C}$. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa. En zonas con alta humedad donde puede haber condensación, es mejor dejar que las bolsas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas.

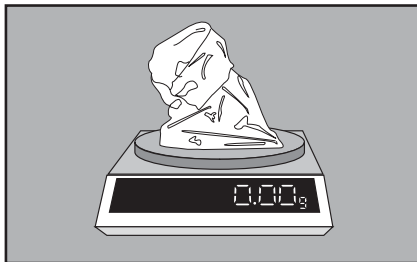


2 Para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos con celo.

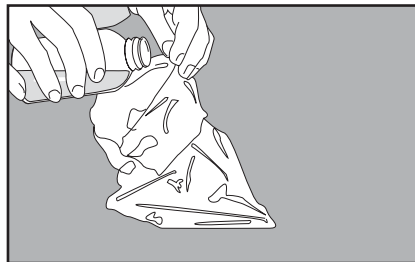


3 Mantener las bolsas una vez cerradas a $\leq 25^{\circ}\text{C}$, a HR $< 50\%$. **No refrigerar las bolsas abiertas.** Usar las placas Petrifilm en un mes desde su apertura.

Preparación de la muestra

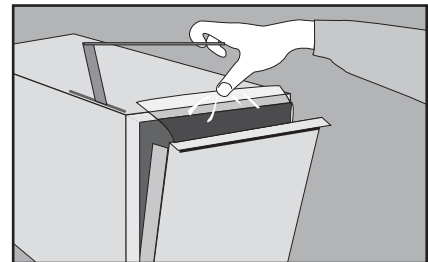


4 Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril.



5 Si es necesario, utilizar diluyentes **estériles** apropiados : agua peptona sal (método ISO 6887) (Diluyente de Máxima Recuperación), tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF, KH_2PO_4 a 0.0425g/l , ajustar pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, agua peptonada tamponada (método ISO 6579), solución salina (0.85 - 0.90%), caldo letheen sin bisulfito, o agua destilada.

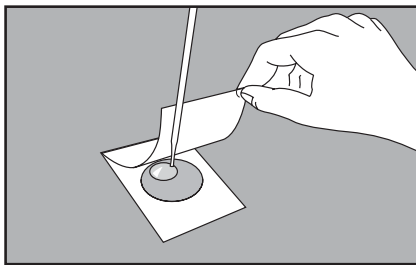
No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato, ya que pueden inhibir el crecimiento.



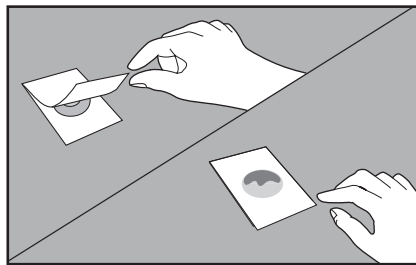
6 Mezclar u homogeneizar la muestra según el procedimiento habitual.

Ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:
• para productos ácidos, usar NaOH 1N,
• para productos alcalinos, usar HCl 1N.

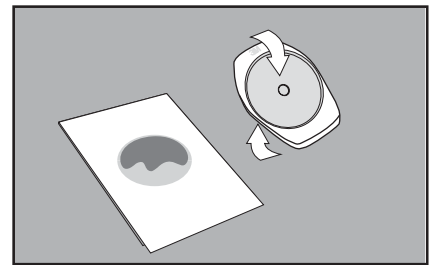
Inoculación



- 7 Colocar la placa Petrifilm en una superficie **plana**. Levantar el film superior.
Con una pipeta colocada de forma **perpendicular** a la placa Petrifilm, colocar 1 ml. de la muestra en el centro del film inferior.

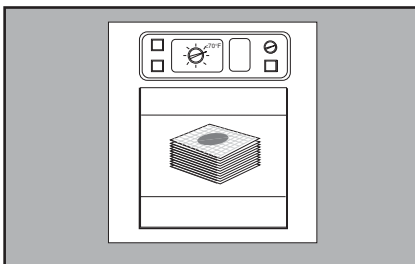


- 8 Bajar el film superior **con cuidado** evitando introducir burbujas de aire.
No dejarlo caer.



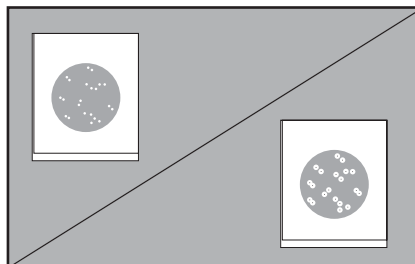
- 9 Con la cara **lisa** hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo.
Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular antes de que se forme el gel.
No girar ni deslizar el aplicador.
Levantar el aplicador. Esperar al menos un minuto a que solidifique el gel.

Incubación

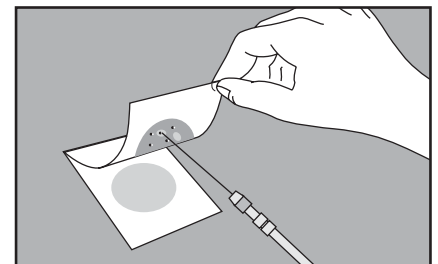


- 10 Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas.
El tiempo e incubación varía según el método.

Interpretación



- 11 Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento iluminada. Para leer los resultados, consultar la Guía de Interpretación.



- 12 Las colonias pueden aislarse para una posterior identificación.
Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel.

Métodos aprobados más usuales :

Coliformes totales

• Métodos Oficiales 986.33 y 989.10 (leche, leche cruda, otros productos lácteos) :

Incubar $24h \pm 2h$ a $32^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

• Método Oficial AOAC 991.14 (todos los alimentos) : Incubar $24h \pm 2h$ a $35^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

• Método NMKL 147.1993 :

Incubar $24h \pm 2h$ a $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

• Métodos validados AFNOR 3M

01/2-09/89A y B :

Incubar $24h \pm 2h$ a $30^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

Coliformes termotolerantes (fecales)

• Método validado AFNOR

3M 01/2-09/89C :

Incubar $24h \pm 2h$ a $44^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$.

Para esta alta temperatura, es necesario una humidificación del incubador.

For Europe, please contact :
Laboratoires 3M Santé
Tel. : (33) 1 30 31 85 71
Fax : (33) 1 30 31 85 78



Microbiology Products
Laboratoires 3M Santé

Boulevard de l'Oise
95029 Cergy-Pontoise Cedex – France
Tel. : + 33 (0) 1 30 31 85 71
Fax : + 33 (0) 1 30 31 85 78

3M y Petrifilm son marcas registradas de 3M

FP 109901297