



Petrifilm™ Serie 2000

Placas para Recuento Rápido de Coliformes

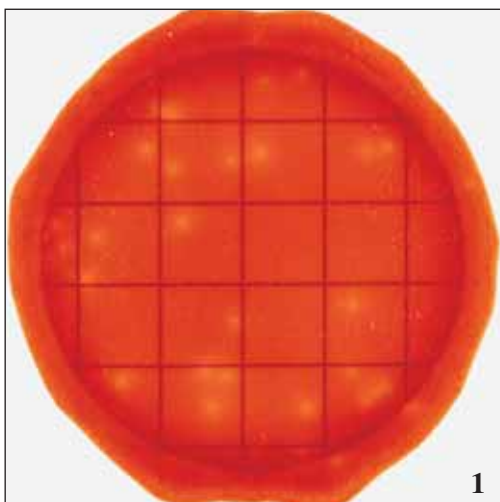
Esta guía sirve para familiarizarse con los resultados obtenidos en las placas Petrifilm™ Serie 2000 para Recuento Rápido de Coliformes (RCC) definidos por tres de los métodos más generalmente aceptados para el recuento de coliformes. Para más información, contactar con el distribuidor oficial de Productos 3M™ Microbiology.

La **AOAC INTERNATIONAL** y el **U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual (BAM)** definen los coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica. Las colonias crecen en las placas Petrifilm RCC y producen ácido, con lo que el indicador de pH presente en la placa vira de rojo-anaranjado a amarillo, lo que indica una presencia presuntiva de coliformes. El gas atrapado alrededor de las colonias de coliformes indica coliformes confirmados.

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 RCC, estos coliformes productores de ácido se muestran como zonas ácidas amarillas, o colonias rojas con o sin gas.

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 RCC, estos coliformes se muestran como colonias rojas asociadas a gas. La **AFNOR** ha validado las placas Petrifilm RCC en comparación con el método ISO 4831 y el método ISO 4832.



A las 6 horas de incubación.

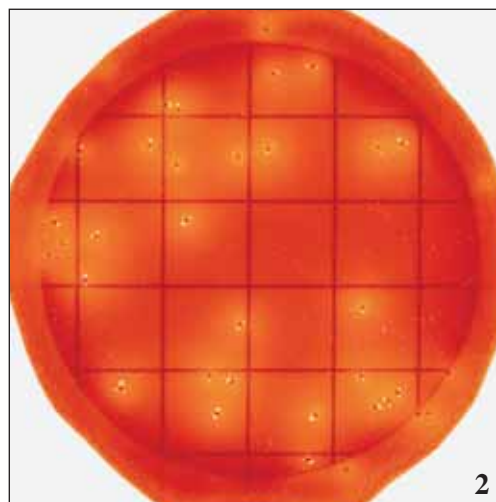
Recuento de colonias mediante zonas ácidas (6-14 h)

Pueden empezar a aparecer zonas ácidas amarillas ya a las 6 h. Si hay coliformes presentes, aparecerán zonas amarillas y difusas en el transcurso de la incubación.

• Interpretación al comparar con los métodos AOAC/BAM
Contar las zonas ácidas amarillas con o sin centros rojos como coliformes presuntivos.

• Interpretación al comparar con el ISO 4832 (VRBL)
Contar las zonas ácidas amarillas con o sin centros rojos como coliformes.

Resultados finales a las 14 h (validación AFNOR).



A las 14 horas de incubación

Recuento de colonias de coliformes (8-24 h)

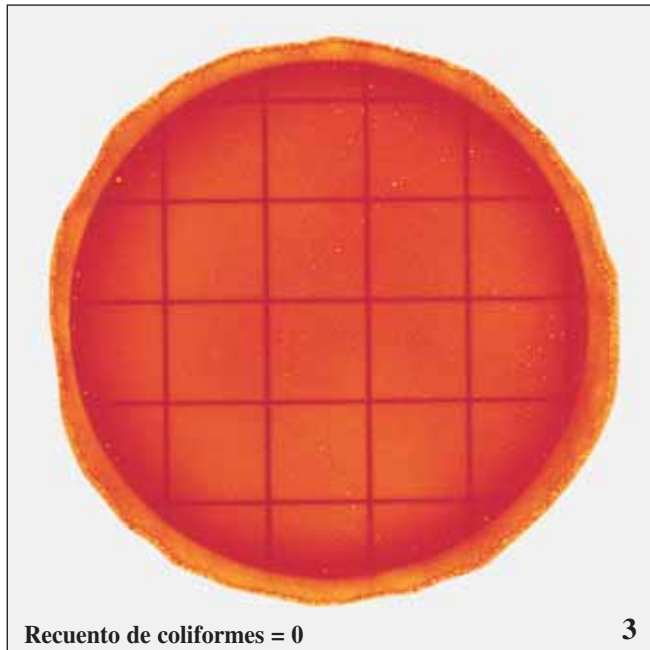
Pueden empezar a aparecer colonias rojas con o sin gas ya a las 8 h y continuar creciendo en el transcurso de la incubación

• Interpretación al comparar con los métodos AOAC/BAM
Contar las colonias rojas asociadas a gas como coliformes confirmados.

• Interpretación al comparar con el ISO 4831(NMP)
Contar las colonias rojas asociadas a gas como coliformes. Resultados finales a las 24 ± 2 h (validación AFNOR), excepto para carne de cerdo procesada.

• Interpretación al comparar con el ISO 4832(VRBL)
Contar las colonias rojas con o sin gas como coliformes. Resultados finales a las 24 ± 2 h (validación AFNOR).

La lectura temprana del crecimiento Petrifilm Serie 2000 para Recuento (medida por la producción de ácido de bacterias, su estado metabólico)



Recuento de Zonas Ácidas (6-14 h)

Observar el cambio del gel en las figuras 3 a 10.

Como los coliformes producen ácido, el color del gel cambia de rojo-anaranjado a naranja-amarillento.

Altas concentraciones de coliformes (>1000 colonias / placa) pueden causar que toda el área de crecimiento se vuelva amarilla tras 4 horas de incubación.

Ver Figura 4. Cuando ésto ocurra, se debe diluir más la muestra para obtener un recuento más exacto.

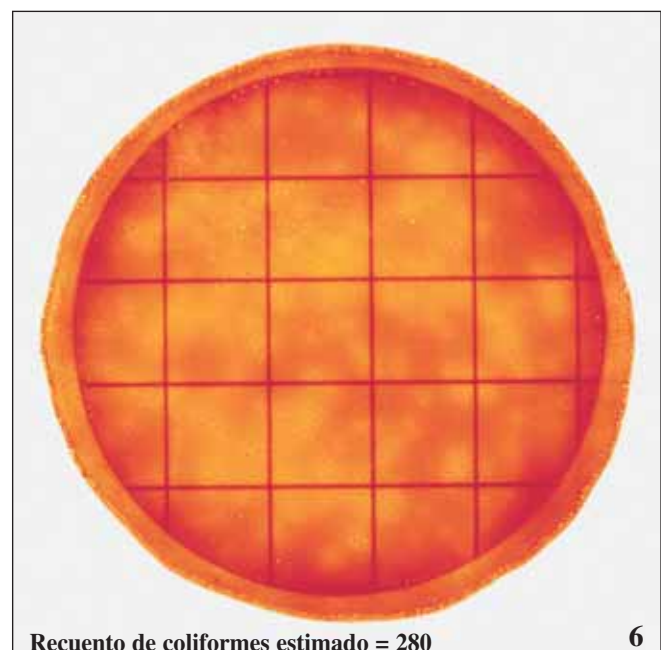
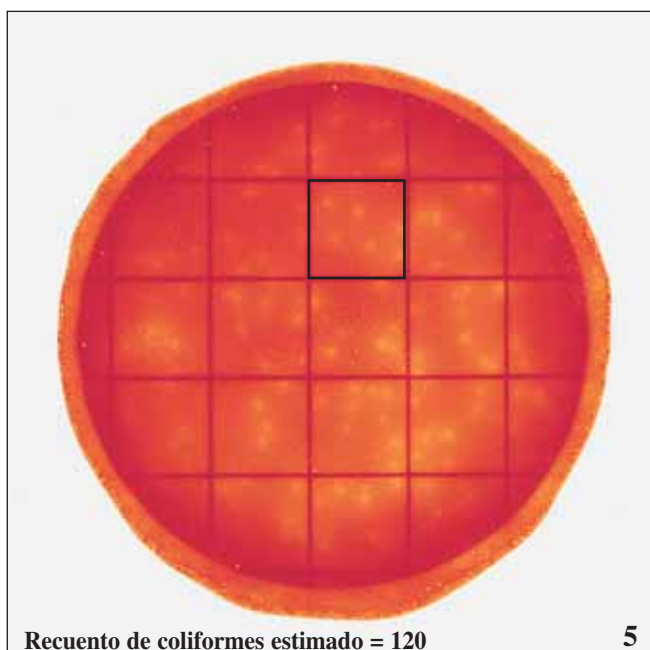
Algunos coliformes producen gran cantidad de ácido. En este caso, se podría dar una fusión de las zonas ácidas sólo con 20 colonias por placa. Se pueden hacer estimaciones en placas que contengan más de 50 zonas ácidas claras.



El área circular de crecimiento en una placa Petrifilm RCC es de aproximadamente 20cm². Se pueden hacer estimaciones contando el número de zonas ácidas en uno o más cuadrados representativos, determinando el promedio por cuadrado y multiplicando por 20.

Hay 6 zonas ácidas en el cuadrado marcado en la Figura 5.

Empezarán a aparecer colonias rojas en las zonas ácidas al continuar creciendo los coliformes. Ver Figura 6.



*bacteriano en las placas
Rápido de Coliformes
y gas) depende del tipo
y su concentración.*

Recuento de colonias y gas (8-24 h)

Las Figuras 7 y 8 muestran los resultados para la misma concentración de diferentes organismos incubados durante el mismo tiempo. Aparecen claramente visibles colonias rojas con zonas ácidas en ambas placas. Los organismos de la Figura 8 parece que fermentan la lactosa para producir gas más fácilmente que los de la Figura 7.

Contar las colonias con o sin gas, según el método seguido. Una colonia está asociada a una(s) burbuja(s) si ésta está separada como máximo un diámetro de una colonia o en forma

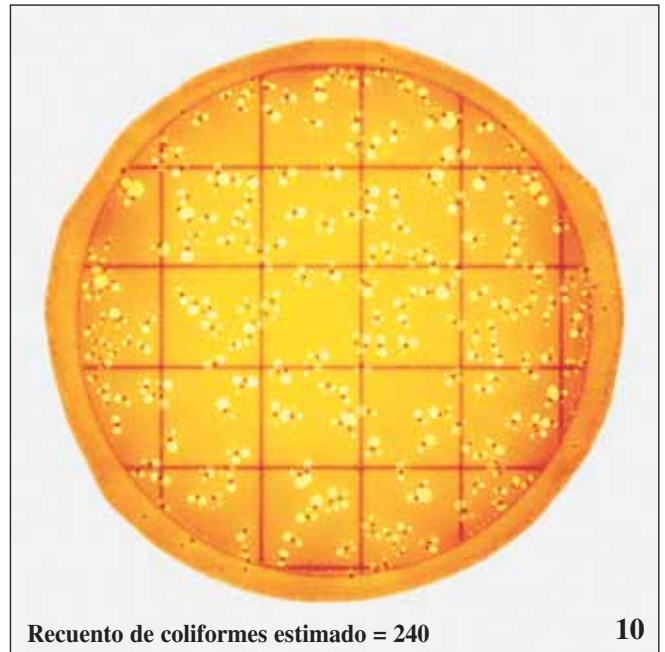
de un anillo alrededor de la misma.

Ver Círculos 1 y 2 respectivamente de la Figura 7.

*La Figura 9 es otro ejemplo de recuento de colonias con o sin burbujas de gas. El recuento depende del método seguido.

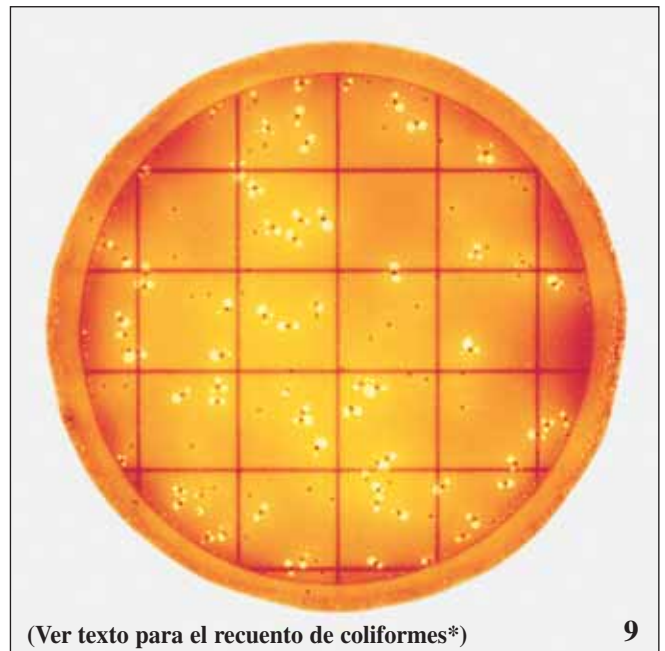
- Comparado con los métodos AOAC/BAM, las colonias confirmadas de coliformes con gas = 72.
- Comparado con la ISO 4831, los coliformes son colonias con gas = 72.
- Comparado con la ISO 4832, los coliformes son colonias con y sin gas = 128.

Cuando el número de colonias es más de 150 por placa, se debe estimar el recuento. No contar colonias que aparecen en el límite del círculo, ya que se hallan fuera de la influencia selectiva del medio. Ver Figuras 7 - 10.



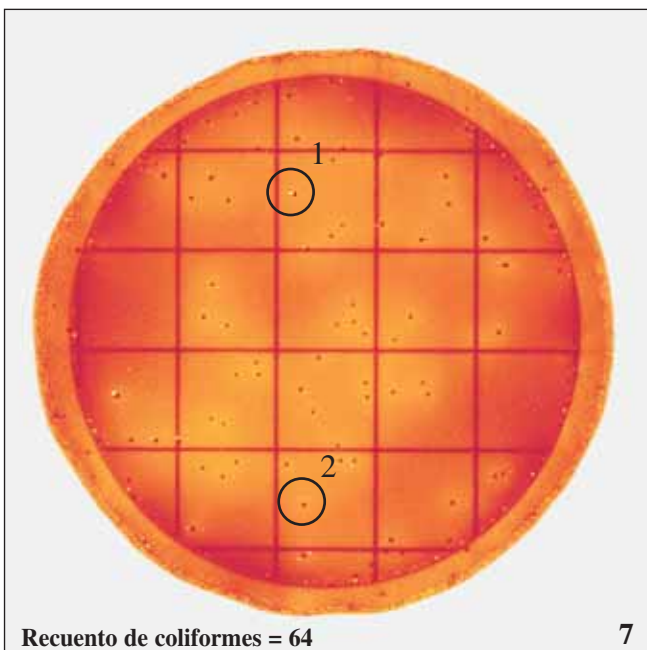
Recuento de coliformes estimado = 240

10



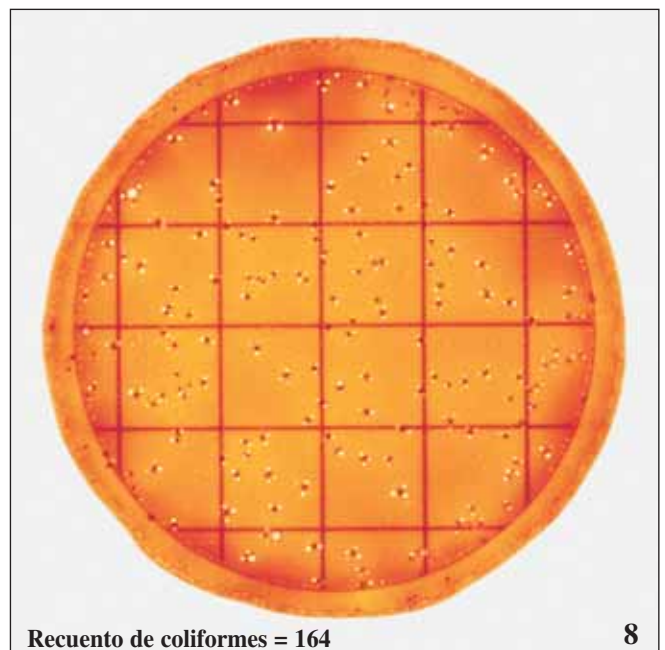
(Ver texto para el recuento de coliformes*)

9



Recuento de coliformes = 64

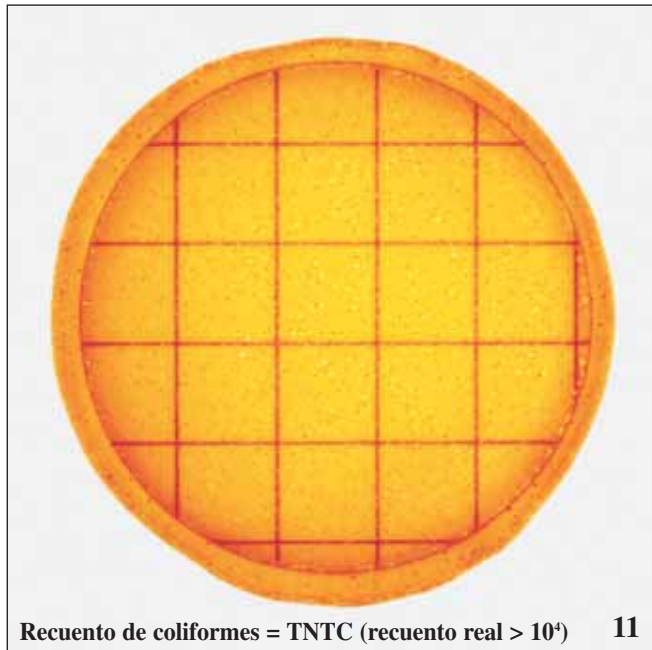
7



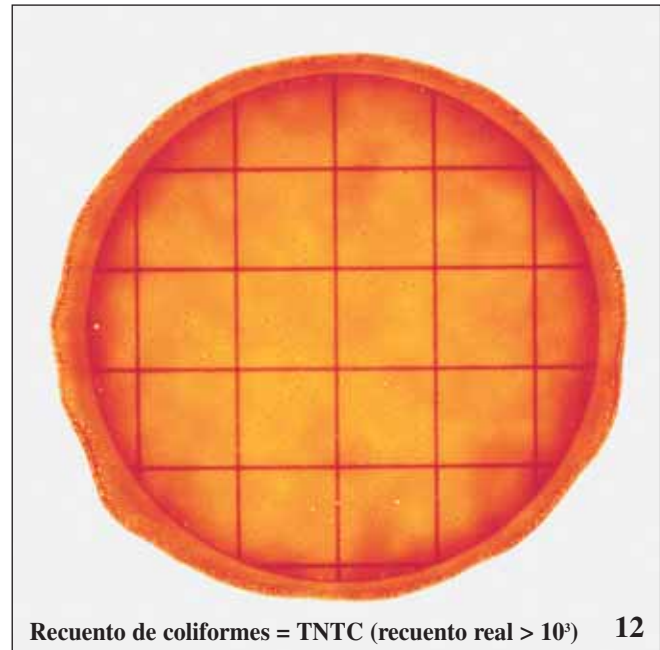
Recuento de coliformes = 164

8

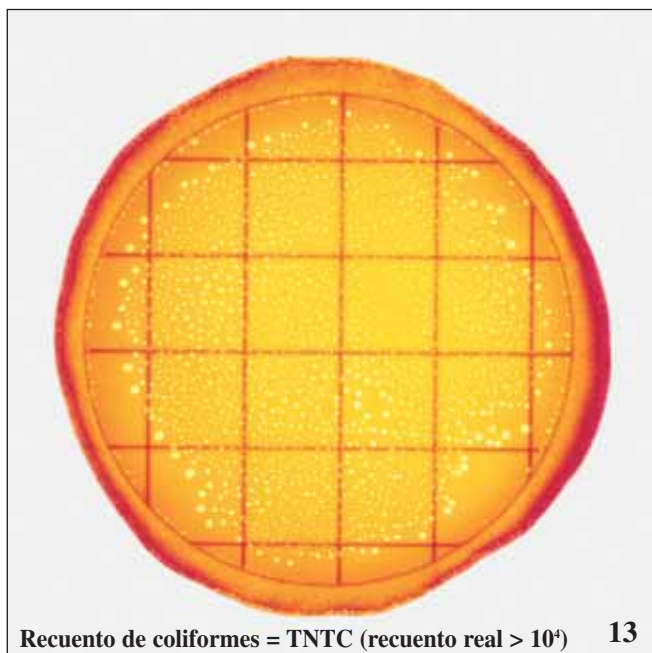
TNTC Número de Colonias Incontable (> 1000 colonias/placa)



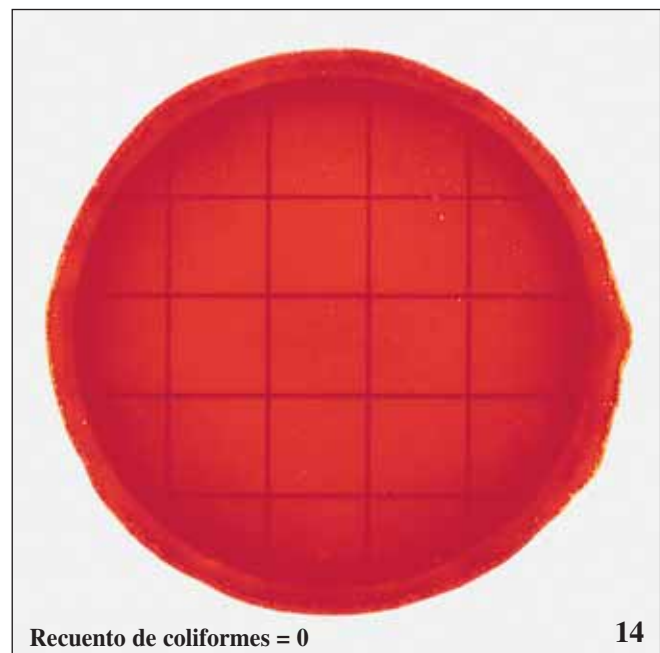
Las placas Petrifilm RCC con un número de colonias Demasiado Numeroso Para contar (TNTC) tienen una o más de las siguientes características: cambio del color del gel de rojo-anaranjado a naranja-amarillento, muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas.



La placa Petrifilm RCC de la Figura 12 tiene dos características que indican colonias TNTC: cambio del color del gel y muchas colonias pequeñas.



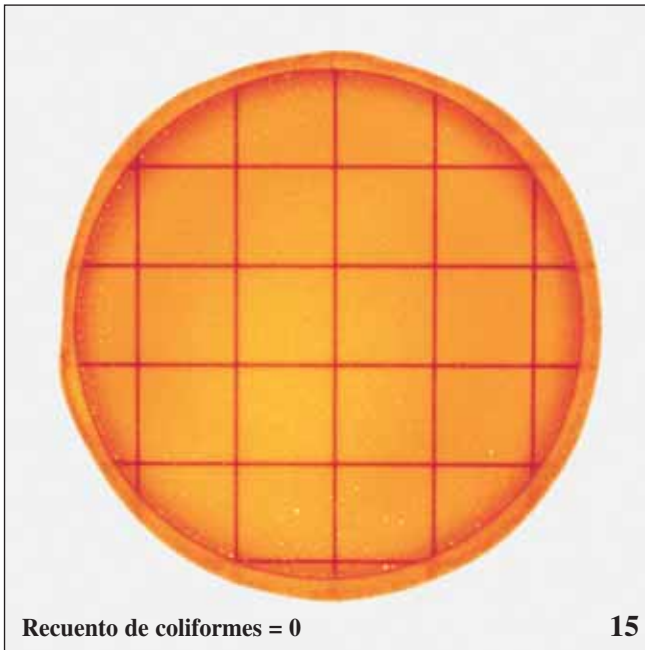
En la Figura 13, el recuento es tan alto que no aparecen colonias individuales. Un cambio del color del gel a amarillo y muchas burbujas de gas indican colonias TNTC.



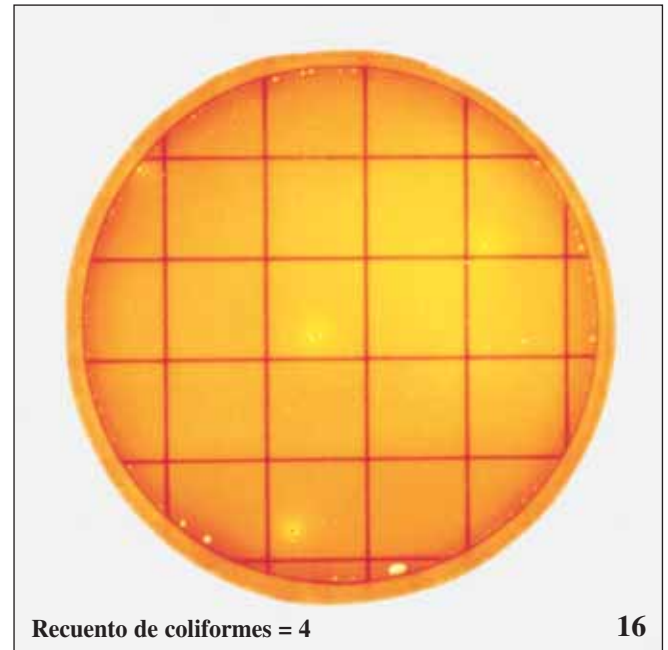
La Figura 14 muestra una placa Petrifilm RCC con un alto número de colonias Gram-negativas no-coliformes. Cuando un alto número de organismos que no fermentan la lactosa están presentes, el gel puede aparecer de color rojo oscuro.

pH : La mayoría de bacterias muestran un crecimiento óptimo a pH cercano a 7.0. Las diluciones de productos de pH bajo requieren un reajuste del pH a 6.5 - 7.5 antes de inocular las placas Petrifilm.

Las Figuras 15 y 16 muestran ejemplos de yogurt fresco sembrado tras el reajuste de pH. Los inhibidores del medio evitan que crezca el cultivo starter Gram positivo, pero el ácido producido por el cultivo starter puede cambiar el color base del gel de rojo-anaranjado a naranja-amarillento, simulando un resultado TNTC temprano. Realizar placas control con un cultivo de yogurt fresco durante la incubación para comprobar que continúa el crecimiento de coliformes TNTC.

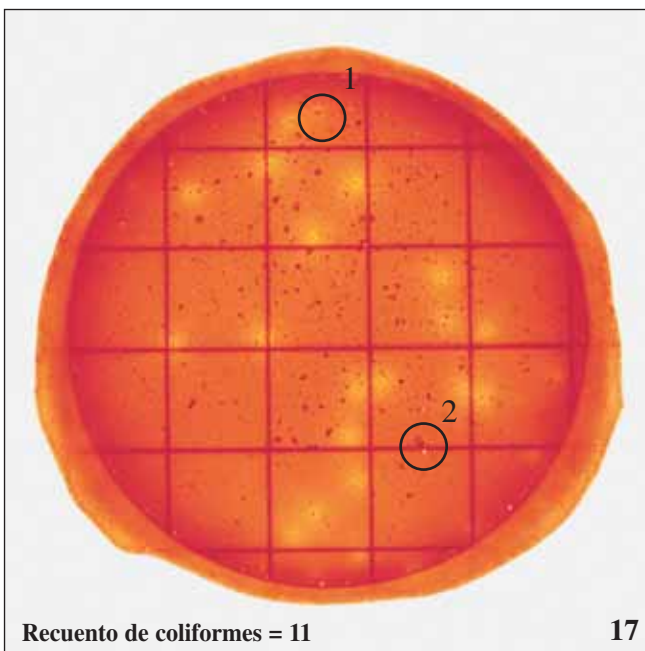


Comparar la placa negativa de arriba con las placas TNTC de la página anterior. Notar que no hay colonias ni burbujas de gas presentes en la Figura 15 que indiquen un resultado TNTC.

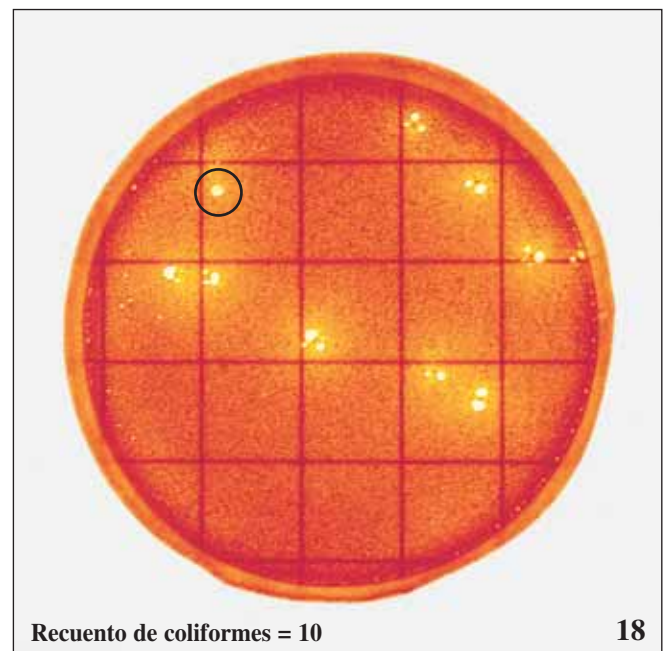


A pesar del cambio en el color del gel, el ácido producido por los coliformes se continúa viendo fácilmente, como se muestra en la Figura 16.

Producto : Las partículas alimenticias a menudo son de forma irregular y no se hallan asociadas a burbujas de gas



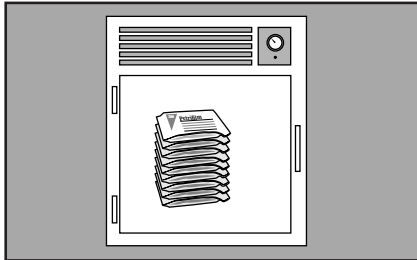
La Figura 17 es una lectura temprana de una dilución de pimienta negra. El Círculo 1 muestra una zona ácida alrededor de una partícula alimenticia roja y de forma irregular. Algunos alimentos pueden contener partículas ácidas que reaccionen con el indicador de pH. El Círculo 2 muestra una burbuja próxima a una partícula alimenticia roja, de forma irregular, pero no una zona ácida. Tampoco este caso debe ser contado como una colonia.



En la Figura 18 se muestra una dilución de chocolate. Durante la incubación, las zonas de ácido asociadas con colonias continuarán su extensión. Las burbujas de gas asociadas a colonias son otros criterios que ayudarán en la identificación de los coliformes. Las burbujas de gas pueden perfilar la colonia, como se muestra en el Círculo. El recuento con o sin gas depende del método seguido.



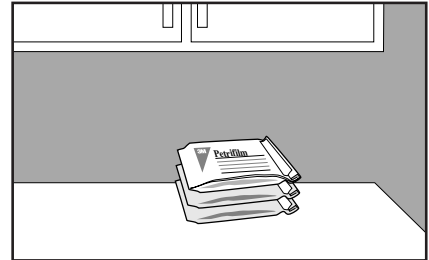
Almacenamiento



1 Conservar las bolsas cerradas a $\leq 8^{\circ}\text{C}$. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa.

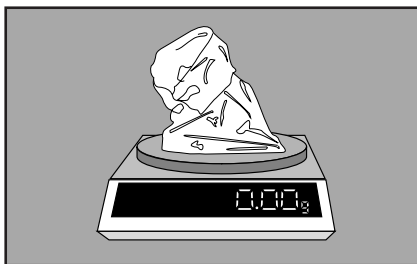


2 Para cerrar las bolsas que se están utilizando, doblar los extremos y cerrarlos con celo.

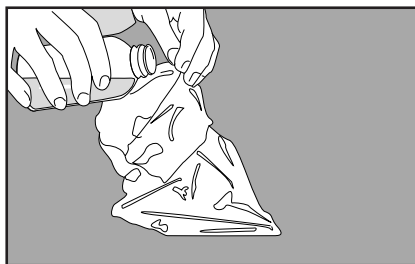


3 Mantener las bolsas una vez cerradas a $\leq 25^{\circ}\text{C}$, a HR $< 50\%$. **No refrigerar las bolsas abiertas.** Usar las placas Petrifilm en un mes desde su apertura.

Preparación

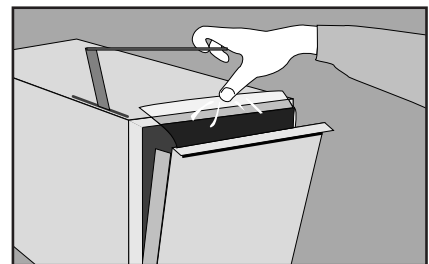


4 La leche con alto y bajo contenido de grasa puede inocularse directamente. Para otros productos alimenticios o lácteos, diluir la muestra al menos al 1:10. Pesar o pipetear el producto alimenticio en un contenedor estéril adecuado, como una bolsa tipo Stomacher, frasco de dilución, bolsa Whirl-Pak®, o cualquier otro contenedor estéril.



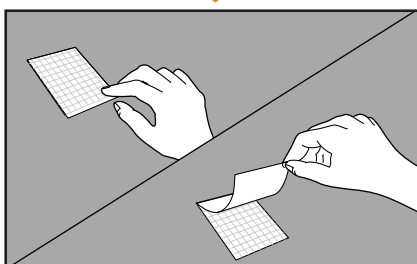
5 Usar diluyentes **estériles** apropiados: peptona sal (método ISO 6887) (o Diluyente de Máxima Recuperación), tampón fosfato de Butterfield (tampón fosfato IDF, KH_2PO_4 a 0.0425g/l, ajustar pH a 7.2), agua peptonada al 0.1%, solución salina (0.85 - 0.90%) o agua destilada.

No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato.
Ajustar el pH de la muestra diluida entre 6.5 y 7.5 : para productos ácidos, usar NaOH 1N, para productos alcalinos, usar HCl 1N.

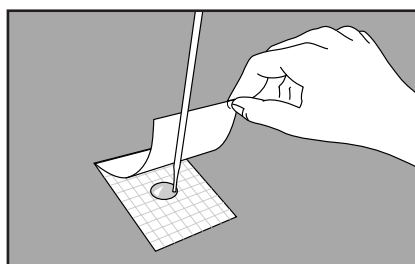


6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos habituales.

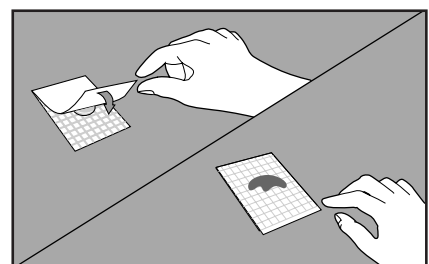
Inoculación



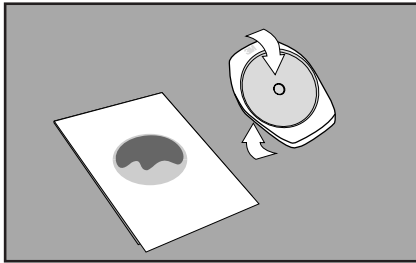
7 Colocar la placa Petrifilm en una superficie **plana**. Levantar el film superior.



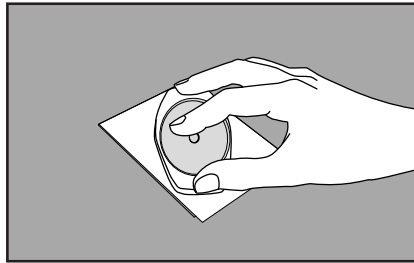
8 Con una pipeta colocada de forma **perpendicular** a la placa Petrifilm, colocar 1 ml. de la muestra en el centro del film inferior.



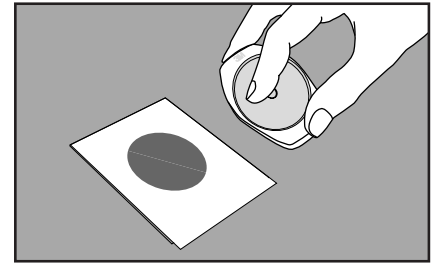
9 Bajar el film superior **con cuidado** evitando introducir burbujas de aire. **No dejarlo caer.**



10 Con la cara **lisa** hacia abajo, colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo.

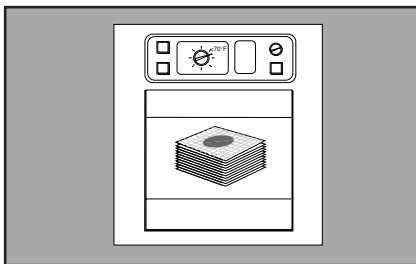


11 **Con cuidado**, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.



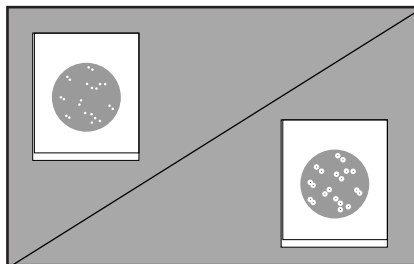
12 Levantar el aplicador. Esperar un minuto a que solidifique el gel.

Incubación

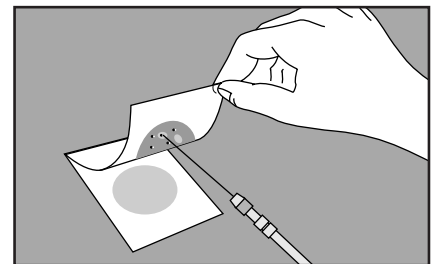


13 Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas a temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}^*$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$, examinando las placas a intervalos determinados, según la información que se desee obtener (ver el folleto del producto).
*Ver el folleto del producto para la excepción que hace la AFNOR en la temperatura de incubación para la carne de cerdo procesada.

Interpretación



14 Leer las placas Petrifilm usando una luz indirecta para una detección temprana. Las placas Petrifilm pueden leerse con un contador de colonias standard u otra lente de aumento. Para leer los resultados, consultar la Guía de Interpretación.



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

Comentarios adicionales

La interpretación de las colonias de coliformes en el Petrifilm Serie 2000 para Recuento Rápido de Coliformes varía según el método utilizado; ver el folleto del producto.

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de Aerobios

- Réf. : 06400 / 100 unidades
- Réf. : 06406 / 1000 unidades

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de *Enterobacteriaceae*

- Réf. : 06420 / 50 unidades
- Réf. : 06421 / 1000 unidades

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de Coliformes

- Réf. : 06410 / 50 unidades
- Réf. : 06416 / 1000 unidades

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de Coliformes Alta Sensibilidad

- Réf. : 06405 / 50 unidades
- Réf. : 06415 / 500 unidades

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de *E.coli* y Coliformes

- Réf. : 06404 / 50 unidades
- Réf. : 06414 / 500 unidades

- **3M™ Petrifilm™**

Recuento de Levaduras y Mohos

- Réf . : 06407 / 100 unidades
- Réf . : 06417 / 1000 unidades

- **3M™ Petrifilm™ Serie 2000**

Recuento Rápido de Coliformes

- Réf . : 06402 / 50 unidades
- Réf . : 06412 / 500 unidades

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



BIOSER, S.A.

c/ Tarragona, 106
08015 - Barcelona (España)
Tel. : 93-226.44.77
Fax : 93-226.79.79
e-mail : bioser@bioser.com