

**NORMA  
VENEZOLANA**

---

**COVENIN  
1644-93**

**ALIMENTOS. AISLAMIENTO Y  
RECuento DE BACILLUS CEREUS.**

**(1<sup>ra</sup>. REVISION)**



#### PROLOGO

La presente norma sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN 1644-80 Alimentos. Detección de Bacillus cereus.

TRAMITE

COMITE TECNICO DE NORMALIZACION CT10: PRODUCTOS ALIMENTICIOS

PRESIDENTE: DRA. FANNY CARRILLO DE PADILLA

VICEPRESIDENTES: DR. JOSE FELIX CHAVEZ  
DR. DOUGLAS YANEZ

SECRETARIO: LIC. ORLANDO TORTOLERO

SUBCOMITE TECNICO CT10/SC3: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

COORDINADORA: LIC. YADIRA GUEVARA

PARTICIPANTES

ENTIDAD

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL

INDUSTRIAS LACTEAS

PRODUCTOS EFE

LABORATORIOS BROLAB

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
(FACULTAD DE FARMACIA)

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

INDUSTRIAS LACTEAS DE PERIJA

CERVECERIA POLAR, C.A.

FRICA

REPRESENTANTES

VICMAR PERNIA

MIROSLAVA MORLES

HELEN RIVERO

OLGAMAR FRANCESCHI

MARIA L. NOVOA  
MANUELA SELGRAD

PILAR HERNANDEZ  
NORMA DE CASTRO

SILVIA MENDOZA

ALICIA PERA

MATILDE DE GARCIA

CRISTINA CALDERON

DISCUSION PUBLICA

FECHA DE ENVIO: 30-09-92  
DURACION: 30 DIAS

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 10-03-93  
FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 14-04-93

NORMA VENEZOLANA  
ALIMENTOS. AISLAMIENTO Y RECuento  
DE BACILLUS CEREUS

COVENIN  
1644-93

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

- COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- COVENIN 902-87 Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri.
- COVENIN 1291-88 Alimentos. Aislamiento e identificación de Salmonella.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo para la determinación cuantitativa de Bacillus cereus mediante la utilización de un medio de cultivo sólido apropiado, en placas de Petri.

3 PRINCIPIO

3.1 El método consiste en sembrar un volumen dado de una muestra representativa y homogénea del alimento a analizar y/o diluciones de la misma, en la superficie de un medio de enriquecimiento sólido selectivo repartido en placas de Petri.

3.2 Después del período de incubación, se seleccionan las colonias, características y se confirman mediante una coloración de Gram, producción de nitritos, fermentación de manitol y producción de acetilmetilcarbinol.

4 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- 4.1 Equipo para la preparación de muestras (según Norma Venezolana COVENIN 1126).
- 4.2 Incubadora con regulador de temperatura
- 4.3 Contador de colonias
- 4.4 Pipetas graduadas de 1 ml y 10 ml, estériles

- 4.5 Frascos y tubos de dilución, estériles
- 4.6 Placas de Petri de 15 x 100 mm, estériles
- 4.7 Gradillas para tubos de ensayo
- 4.8 Espatulas de vidrio, estériles
- 4.9 Láminas portaobjeto
- 4.10 Tubos de ensayo estériles
- 4.11 Equipo de uso común en el laboratorio

## 5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 5.1 DILUENTES

- 5.1.1 Agua peptonada al 0,1% (Ver Norma Venezolana COVENIN 1126)
- 5.1.2 Solución tampón fosfato (solución de Butterfield) (Ver Norma Venezolana COVENIN 1126).

### 5.2 MEDIOS DE CULTIVO

- 5.2.1 Agar manitol yema de huevo polimixina rojo fenol (MYP)
- 5.2.2 Agar yema de huevo polimixina trifeniltetrazolio (YPTTC)
- 5.2.3 Agar polimixina piruvato yema de huevo manitol azul de bromotimol (PEMBA)
- 5.2.4 Agar KG (Kim and Geopfert)
- 5.2.5 Agar nutritivo
- 5.2.6 Caldo nitrato
- 5.2.7 Caldo VP modificado para Bacillus cereus
- 5.2.8 Caldo manitol rojo fenol

### 5.3 REACTIVOS

- 5.3.1 Solución de ácido sulfanílico
- 5.3.2 Solución de 5 amino 2 naftilen sulfónico
- 5.3.3 Reactivos para la coloración de Gram
- 5.3.4 Solución de  $\alpha$ -naftol 5% en alcohol isopropílico
- 5.3.5 Solución de hidróxido de potasio al 40% (KOH)
- 5.3.6 Cristales de creatina

## 6 MATERIALES A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del alimento, tomada según la Norma Venezolana COVENIN 1126.

## 7 PROCEDIMIENTO

### 7.1 PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra se identifica y prepara según la Norma Venezolana COVENIN 1126.

### 7.2 AISLAMIENTO Y RECuento DE BACILLUS CEREUS

7.2.1 Se preparan las diluciones requeridas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  o más si se estima conveniente).

7.2.2 Se inocula 0,1 ml de cada dilución por duplicado, en la superficie de placas de Petri que contengan alguno de los siguientes medios de cultivo: agar MYP, agar yema de huevo polimixina trifeniltetrazolio, agar Pemba, agar KG. La superficie de las placas debe estar bien seca antes de la inoculación.

7.2.3 Si se sospecha la presencia de *Proteus* (que desarrolla colonias invasoras) en la muestra, se agrega 1 ml de alcohol etílico de 96% sobre el agar y se deja evaporar en la estufa. También se puede aumentar el contenido de cloruro de sodio en el agar hasta 1,5% con la misma finalidad.

7.2.4 Se incuban las placas invertidas en la estufa a 30-35° C durante 20-24 horas.

7.2.5 Al final del período de incubación se eligen las placas que tengan entre 3 y 30 colonias que presenten las características que se indican a continuación:

7.2.5.1 Agar MYP y Agar KG. Colonias rosadas, grandes, secas, rugosas, de bordes irregulares, rodeadas o no de una zona de precipitación (actividad de lecitinasa) sobre un fondo nítido de color rosado (debido a una ligera alcalinización del medio producida por el microorganismo).

7.2.5.2 Agar YPTTC. Colonias rojo púrpura brillante, rodeadas de una zona de precipitación.

7.2.5.3 Agar PEMBA. Colonias azul-verdoso, secas, rugosas, de bordes irregulares, rodeadas de una zona de precipitación (actividad lecitinasa) sobre un fondo nítido de color azul (debido a una ligera alcalinización del medio producida por el microorganismo ya que no fermenta el manitol).

7.2.6 Esto representa un recuento presuntivo de *Bacillus cereus*.

### 7.3 CONFIRMACION DE LAS COLONIAS PRESUNTIVAS DE BACILLUS CEREUS

7.3.1 Es preciso confirmar las colonias presuntivas ya que algunas especies que no son *B. cereus* producen una reacción débilmente positiva para la yema de huevo (lecitinasa). Por otra parte, el ácido formado a partir del manitol puede difundir en el medio, o las enzimas que reducen el cloruro de trifeniltetrazolio pueden difundir a las colonias negativas.

7.3.2 De cada una de las placas se seleccionan al menos 2 colonias de cada tipo para realizar las pruebas confirmatorias. Las colonias seleccionadas se transfieren a tubos con agar nutritivo inclinado y se incuban por 24 horas a 30-35°C.

#### 7.3.3 Características morfológicas

7.3.3.1 Se preparan frotis a partir del cultivo en agar nutritivo y se hace la coloración de Gram. *Bacillus cereus* es un bacilo corto de extremos poco redondeados, Gram positivo, con espora elipsoidal, central o subterminal, no deformante y de paredes delgadas, forma cadenas cortas o largas.

#### 7.3.4 Pruebas bioquímicas

##### 7.3.4.1 Reducción de nitratos a nitritos.

7.3.4.1.1 Se transfiere cultivo del agar nutritivo a un tubo con caldo nitrato y se incuba por 24 horas a 30-35°C.

7.3.4.1.2 Al final del período de incubación, se agregan los reactivos para revelar la presencia de nitritos, se agitan los tubos y se observa el color. La aparición de un color rosado o rojo indica la presencia de nitritos. *B. cereus* reduce los nitratos a nitritos.

##### 7.3.4.2 Producción de acetilmetilcarbinol

7.3.4.2.1 Se transfiere cultivo del agar nutritivo a tubos con caldo VP modificado y se incuban por 48 horas a 30-35°C.

7.3.4.2.2 Al final del período de incubación se revela la presencia de acetilmetilcarbinol colocando 1 ml del cultivo en un tubo vacío y agregando los reactivos señalados en el anexo, se agitan los tubos y se añaden unos cuantos cristales de creatina para intensificar y acelerar la reacción.

7.3.4.2.3 Los resultados se leen en el transcurso de 1 hora a temperatura ambiente. El desarrollo de una coloración rosada o rojo intenso (carmesí) indica la presencia de acetilmetilcarbinol. *B. cereus* da esta reacción positiva.

NOTA 1: En caso de que para el aislamiento y recuento de *B. cereus* se utilice agar KB es necesario confirmar con las pruebas del manitol lecitinasa y manitol.

##### 7.3.4.3 Prueba del manitol y lecitinasa

7.3.4.3.1 Se inocula cultivo del agar nutritivo en un área premarcada del agar MYP (sin adición de polimixina) en una placa de Petri y se incuba por 24 horas a 30-35°C.

7.3.4.3.2 La aparición de una zona de precipitación alrededor de la colonia y un color rosado debido a una ligera alcalinización del medio es indicativo de que B. cereus posee la enzima lecitinasa y no fermenta el manitol.

#### 7.3.4.4 Prueba del manitol

7.3.4.4.1 Se transfiere cultivo del agar nutritivo a un tubo con caldo manitol rojo fenol y se incuba por 24 horas a 30-35°C.

7.3.4.4.2 La aparición de un color rosado debido a una ligera alcalinización del medio, es indicativo que B. cereus no fermenta el manitol.

### B EXPRESION DE LOS RESULTADOS

B.1 Si todas las pruebas resultan características se considerará el recuento presuntivo como confirmativo de B. cereus.

Recuento confirmativo = No. de colonias confirmadas x No. recíproco de la dilución empleada x 10.

B.2 Si todas las pruebas confirmativas no resultan características, se calcula la relación entre las colonias confirmadas y el número total de colonias probadas mediante la siguiente expresión:

Relación entre el No.  
de colonias confirmadas  
y el No. total de colo-  
nias probadas. = 
$$\frac{\text{Recuento presuntivo} \times \text{No. de colonias confirmadas}}{\text{No. de colonias presuntivas ensayadas}} \times 10$$
  
B. cereus.

B.3 El valor obtenido corresponde al recuento confirmativo de B. cereus.

B.4 Si no hay desarrollo de las colonias indicadas en 7.2.5 o ninguna colonia de las pruebas confirmativas, los resultados se expresan como menos de "el número recíproco de la primera dilución sembrada", multiplicado por 10 (ufc/g o ml) o "menos de 10 ufc/g o ml cuando se siembra la muestra sin diluir".

B.5 En caso de placas que contengan menos de tres o más de 30 colonias deben seguirse las normas generales para recuento de colonias en placas de Petri y efectuarse los cálculos correspondientes, reportando el valor obtenido como "estimado".

9 BIBLIOGRAFIA

- 1) ICMSF 1978 "Microorganisms in Foods 1. Their significance and methods of enumeration". The international Commission of Microbiological Specification of Foods. Editorial University of Toronto Press. Toronto. Canada.
- 2) FDA. 1984 Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration Bureau of Food Division of microbiology. 6th. Edition A.O.A.C. Box 50. Benjamin Franklin Station. Washington D.C. 20044 U.S.A.
- 3) APHA, 1984 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd. Edition. M. Speck Editor. Washington D.C.
- 4) R. Holbrook: Judith M. Anderson, 1980. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in foods. Can. Journal Vol 26.

## ANEXO

### FORMULA Y PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS REQUERIDOS PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE BACILLUS CEREUS EN ALIMENTOS

#### 1 MEDIO DE CULTIVO

##### 1.1 Agar manitol yema de huevo polimixina rojo fenol (MYP).

###### 1.1.1 Fórmula:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Extracto de carne .....             | 1,0 g   |
| Peptona .....                       | 10,0 g  |
| D-manitol .....                     | 10,0 g  |
| Cloruro de sodio .....              | 10,0 g  |
| Rojo fenol (solución al 0,2%) ..... | 12,5 mL |
| Agar .....                          | 15,0 g  |
| Agua destilada .....                | 890 ml  |

###### 1.1.2 Preparación:

1.1.2.1 Se agregan los ingredientes al agua, se mezcla bien, se calienta a ebullición hasta disolución completa. Se tempera a 50-60°C y se ajusta el pH de manera que después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,1$ .

1.1.2.2 Se dispensan volúmenes de 90 ml en frascos y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

1.1.2.3 Se dejan temperar a 45°C y a los 90 ml de medio base se agregan 10 ml de emulsión de yema de huevo (partes iguales de yema de huevo y solución salina al 0,85%) y una solución de sulfato de polimixina B a una concentración final de 100 unidades/ml (aprox. 10 µg/ml) esterilizada por filtración. Se mezcla bien y se vierte el medio en placas de Petri.

##### 1.2 Agar yema de huevo polimixina trifeniltetrazolio (YPTTC)

###### 1.2.1 Fórmula:

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Agar nutritivo .....          | 1000 ml |
| Cloruro de sodio (NaCl) ..... | 60 g    |

Cloruro de trifeniltetrazolio ..... 0,1 - 0,2 g  
 Polimixina M ..... 20.000 UI  
 Emulsión de yema de huevo ..... 100 ml

### 1.2.2 Preparación:

1.2.2.1 Se disuelve el cloruro de sodio en el agar nutritivo fundido y se ajusta el pH de tal manera que después de la esterilización sea de  $7,2 \pm 0,1$ .

1.2.2.2 Se esteriliza a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, se tempera a  $45^{\circ}\text{C}$  y se agrega el cloruro de trifeniltetrazolio y la polimixina M, en soluciones preparadas previamente y esterilizadas por filtración. Finalmente se agrega la emulsión de yema de huevo, se mezcla bien y se vierte el medio en placas de Petri. Si no se usa inmediatamente se puede almacenar refrigerado por no más de 10 días.

## 1.3 Agar PEMBA

### 1.3.1 Fórmula

Peptona ..... 1,0 g  
 D-manitol ..... 10,0 g  
 $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 0,1 g  
 NaCl ..... 2,0 g  
 Fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ..... 0,25 g  
 Fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ..... 0,25 g  
 Azul de bromotimol (soluble en agua) ..... 0,12 g  
 Agar ..... 18,0 g  
 Agua destilada ..... 1000 ml

### 1.3.2 Preparación:

1.3.2.1 Se agregan los ingredientes al agua, se mezcla bien y se calienta hasta completa disolución, se lleva  $50-60^{\circ}\text{C}$  y se ajusta el pH a 7,4. Se dispensan volúmenes de 90 ml en frascos y se esteriliza a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos (pH final = 7,2).

1.3.2.2 Se lleva a  $48-50^{\circ}\text{C}$  y se agregan las siguientes soluciones previamente esterilizadas por filtración:

- a) Solución al 20% de piruvato de sodio ..... 50 ml
- b) Emulsión de yema de huevo (partes iguales de yema de huevo y solución salina al 0,85%) ..... 5,0 ml

c) Polimixina B (Aerosporina) a una concentración final de 100 unidades/ml (aprox. 10  $\mu$ g/ml).

#### 1.4 Agar KG

##### 1.1.4 Fórmula:

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Peptona .....              | 1,0 g   |
| Extracto de levadura ..... | 0,5 g   |
| R rojo fenol .....         | 0,025 g |
| Agar .....                 | 18,0 g  |
| Agua destilada .....       | 900 ml  |

##### 1.4.2 Preparación:

Se disuelven los ingredientes en agua destilada y se ajusta el pH a 6,8. Se esteriliza a 121°C por 20 minutos, se tempera a 50°C y se adicionan 10 ml de emulsión de yema de huevo (partes iguales de yema de huevo y solución salina al 0,85%) y una solución de sulfato de polimixina B a una concentración final de 100 unidades/ml (aprox. 10  $\mu$ g/ml) esterilizada por filtración. Se mezcla bien y se vierte el medio en placas de Petri. Las placas pueden ser almacenadas a 4°C por no más de 7 días.

#### 1.5 Agar nutritivo (ver su preparación en la Norma Venezolana COVENIN 1291).

#### 1.6 Caldo nitrato

##### 1.6.1 Fórmula:

|                                            |         |
|--------------------------------------------|---------|
| Peptona .....                              | 5,0 g   |
| Extracto de carne .....                    | 3,0 g   |
| KNO <sub>3</sub> (Libre de nitritos) ..... | 1,0 g   |
| Agua destilada .....                       | 1000 ml |

##### 1.6.2 Preparación:

Se disuelven los ingredientes, se ajusta el pH a 7,2. Se reparte en tubos en volúmenes de 5 ml, se esteriliza a 121°C por 20 minutos. pH final = 7,0  $\pm$  0,2.

### 1.7 Caldo V-P modificado para B. cereus.

#### 1.7.1 Fórmula:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Proteosa peptona ..... | 7,0 g   |
| Glucosa .....          | 5,0 g   |
| Cloruro de sodio ..... | 5,0 g   |
| Agua destilada .....   | 1000 ml |

#### 1.7.2 Preparación:

Se disuelven los ingredientes en el agua destilada. Se distribuyen volúmenes de 5 ml en tubos de ensayo y se esterilizan a 121°C por 15 minutos.

### 1.8 Caldo manitol rojo fenol

NOTA:2: Este medio de cultivo es una modificación del medio clásico y debe ser preparado en el laboratorio.

## 2 REACTIVOS

### 2.1 Reactivos para la prueba de reducción de nitritos

#### 2.1.1 Solución de ácido sulfanílico

##### 2.1.1.1 Fórmula:

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| Acido sulfanílico .....            | 1,0 g  |
| Solución de ácido acético 5N ..... | 125 ml |

##### 2.1.1.2 Preparación:

2.1.1.2.1 Para preparar la solución de ácido acético 5N se mezclan 28,75 ml de ácido acético glacial y 71,25 ml de agua destilada.

2.1.1.2.2 Para preparar la solución de ácido sulfanílico se mezclan los dos componentes y se conservan en frasco ambar.

#### 2.1.2 Solución de ácido 5 amino-2 naftileno sulfónico (5 ANSA).

##### 2.1.2.1 Fórmula:

|                                                       |        |
|-------------------------------------------------------|--------|
| Acido 5 amino 2 naftileno sulfónico .....             | 0,25 g |
| Solución acuosa al 15% de ácido acético glacial ..... | 100 ml |

#### 2.1.2.2 Preparación:

Se disuelve el 5 ANSA en el ácido acético y se conserva en frasco ámbar.

2.1.3 Para la prueba de reducción de nitritos se utilizarán partes iguales de cada solución (0,5 ml de cada una).

NOTA 3: Como alternativa puede utilizarse una solución de  $\alpha$ -naftilamina, la cual se recomienda sea preparada debajo de una campana de extracción de gases, por ser un reactivo carcinogénico.

#### 2.2 Reactivos para la coloración de Gram

Ver su preparación en la Norma Venezolana COVENIN 1291.

##### 2.2.1 Técnica de la coloración

2.2.1.1 Se prepara un frotis y se fija por calor.

2.2.1.2 Se cubre con la solución de cristal violeta durante 1 min.

2.2.1.3 Se elimina el colorante con agua.

2.2.1.4 Se cubre con la solución de lugol durante 1 min.

2.2.1.5 Se enjuaga con agua y alcohol alternativamente hasta que el alcohol de enjuague quede sin colorante (3 o 4 veces).

2.2.1.6 Se lava con agua y se cubre con solución de safranina por 10 seg.. Se lava con agua nuevamente.

2.2.1.7 Se seca la lámina al aire y se examina al microscopio con lente de inmersión.

2.2.2 Los microorganismos gram-positivos se tiñen de violeta y los gram-negativos de rojo.

#### 2.3 Reactivos para la prueba de producción de acetilmetilcarbinol

##### 2.3.1 Solución de $\alpha$ -naftol

###### 2.3.1.1 Fórmula:

$\alpha$ -naftol (punto de fusión de 92,5°C o mayor) ..... 5 g

Alcohol etílico absoluto ..... 100 ml

#### 2.3.1.2 Preparación:

Se disuelve el  $\alpha$ -naftol en el alcohol, y la solución se conserva en frascos de color ámbar

#### 2.3.2 Solución de KOH al 40%

##### 2.3.2.1 Fórmula:

Hidroxido de potasio ..... 40 g

Agua destilada ..... 100 ml

##### 2.3.2.2 Preparación:

Se disuelve el hidróxido de potasio en el agua destilada.

NOTA: Para el revelado de esta prueba añada 0,6 ml  $\alpha$ -naftol al 5% y 0,2 ml KOH al 40%.

**COVENIN**  
**1644-93**

**CATEGORIA**  
**C**

---

**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:641:614.31:576.8**

**ISBN: 980-06-1074-X**

RESERVADOS TODOS LOS DERECHOS

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio.

---

**Descriptores: Recuento de bacterias, Bacillus cereus, microbiología de alimentos.**