

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. GUIA GENERAL PARA LA ENUMERACION DE COLIFORMES. TECNICA DE PLACA VERTIDA (ISO 4832:1991, IDT)

Microbiology of food and animal feeding stuffs. General guidance
for enumeration of coliforms. Colony count technique

ICS: 07.100.30

1. Edición Diciembre 2002

REPRODUCCION PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.
Teléf.: 830-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: nc@ncnorma.cu

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el NC/CTN No. 61 de Microbiología, integrado por las siguientes Instituciones:
 - Ministerio de Salud Pública (UNSA)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio Cuba-Control S.A (MINCEX)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE-MINSAP)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP- MIP)
 - Ministerio de Comercio Interior
 - Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ-ONN)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la ISO 4832: 1991 *Microbiology. General guidance for enumeration of coliforms. Colony count technique.*

Con independencia de la existencia de normas ISO para productos específicos, la NC-ISO 4832 se aplicará para todos los alimentos para consumo humano y de animales.

- Sustituye a la NC 76-04-3: 82: Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayo microbiológicos. Determinación de microorganismos coliformes; y a la NC 74-39: 86: Ganadería. Alimentación animal. Determinación de microorganismos coliformes.

© NC, 2002

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:

Oficina Nacional de Normalización (NC).

Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.

Impreso en Cuba

MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. GUIA GENERAL PARA LA ENUMERACION DE COLIFORMES. TECNICA DE PLACA VERTIDA

1 Objeto

Esta norma cubana establece el método de análisis microbiológico para la determinación cuantitativa de coliformes presentes en productos destinados para el consumo humano y animal, por el principio de la técnica de conteo de colonias después de incubar a 30°C, 35°C ó 37°C. La temperatura a emplear se establece en acuerdo con las partes implicadas.

NOTA: La temperatura de incubación de 30°C se empleará cuando el objetivo de la enumeración esté relacionado con procesos tecnológicos; la temperatura de 35°C ó 37°C se utilizará cuando el objetivo de la enumeración guarde más relación con el campo de la salud pública.

2 Referencias normativas

Las siguientes normas contienen disposiciones que, al ser citadas en este texto, constituyen disposiciones de esta Norma Cubana. 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 sobre la base de ellas que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente. La Oficina Nacional de Normalización posee en todo momento la información sobre las normas internacionales, regionales y cubanas en vigencia.

NC ISO 6887-1: 2002 *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Preparación de la muestra de ensayo, la suspensión inicial y las diluciones decimales para pruebas microbiológicas. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.*

ISO 7218: 1996. *Microbiology – General instructions for microbiological examinations.*

3 Definición

Para el propósito de esta norma se aplica la siguiente definición:

Coliformes: Bacterias las cuales a la temperatura especificada (30°C, 35°C ó 37°C según lo acordado) forman colonias características en Agar rojo violeta bilis bajo las condiciones de prueba especificadas en esta norma.

4 Principio

4.1 Preparación de dos placas vertidas, usando un medio de cultivo sólido y empleando una cantidad específica de la muestra de prueba si el producto inicial es líquido, o usando una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

Preparación de otro par de placas vertidas, bajo las mismas condiciones usando diluciones decimales de la muestra de prueba o de la suspensión inicial.

4.2 Incubación de las placas a 30°C, 35°C ó 37°C (según lo acordado) por 24 h.

4.3 Cálculo del número de coliformes por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características en las placas seleccionadas (ver 10.1).

5 Medio de cultivo y dilución

5.1 General

Para la marcha práctica ver ISO 7218.

5.2 Dilución

Ver NC ISO 6887-1.

5.3 Medio sólido selectivo: Agar rojo violeta bilis (VRBL)

Composición:

Peptona	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Sales de bilis	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Violeta cristal	0.002 g
Agar	12 g a 18 g ¹⁾
Agua destilada	1000 mL

¹⁾ De acuerdo al tipo de agar con que se trabaja.

Preparación:

Proceda como sigue para conservar el poder selectivo y la especificidad del medio.

- Agite los componentes o el medio completo deshidratado con el agua destilada y deje reposar unos minutos.
- Ajuste el pH a 7.4 a 25°C.
- Posteriormente se mezcla bien calentando y agitando hasta su ebullición. Deje ebullicir por 2 min.
- A continuación coloque el medio en baño de agua (6.5) a 47 ± 2 °C.
- Evite el recalentamiento del medio, calentando por tiempo prolongado o recalentando.
- Este medio no puede ser esterilizado en autoclave, se debe preparar momentos antes de usarlo, chequee la esterilidad del medio en el momento del uso. (ver 9.2.2)
- Deseche cualquier sobrante del mismo.
- Utilice el medio no más de 3 horas después de su preparación.

6 Aparatos y utensilios

Aparatos usuales en el laboratorio de microbiología, y en particular los siguientes:

6.1 Aparato para esterilización seca (horno) o para esterilización húmeda (autoclave)

6.2 Incubadoras a temperatura de (30 ± 1) °C, (35 ± 1) °C ó (37 ± 1) °C.

6.3 Placas de Petri de 90 mm a 100 mm de diámetro y 15 mm de altura.

6.4 Pipetas graduadas con capacidad de 10 mL y 1 mL.

6.5 Baño de agua de temperatura regulable ajustado a 47 ± 2 °C

6.6 Contador de colonias

6.7 Medidor de pH

6.8 Homogenizador con vaso esterilizable u homogenizador peristáltico

6.9 Frascos para cultivo

NOTA: Pueden ser usados frascos, blancos o ámbar, de 200 mL para cultivo con tapa adecuada, que garantice la esterilidad.

7 Muestreo

Utilice un muestreo de acuerdo con una norma nacional o internacional establecida para el producto en cuestión.

Si no existe una norma nacional o internacional se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre partes.

8 Preparación de la muestra de ensayo

Prepare la muestra de ensayo de acuerdo con la norma específica para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica se recomienda que se realice la preparación de la muestra de acuerdo entre las partes.

9. Procedimiento.**9.1 Porción de ensayo. Suspensión inicial y diluciones**

Ver NC ISO 6887-1 y la Norma Internacional específica para el producto que se va a analizar.

9.2 Inoculación e Incubación.

9.2.1 Se cogen dos placas de Petri (6.3). Transfiera a cada placa con pipeta estéril (6.4) 1 mL de la muestra de ensayo si el producto es líquido, ó 1 mL de la suspensión 10^{-1} , en el caso de otros productos se cogen otras dos placas de Petri (6.3). Transfiera a cada placa con pipeta estéril (6.4) 1 mL de la dilución 10^{-1} si el producto es líquido ó 1 mL de la dilución 10^{-2} en el caso de otros productos.

Repetir el procedimiento descrito anteriormente usando otras diluciones si es necesario.

9.2.2 Se añade a cada una de estas placas aproximadamente 15 mL del VRBL (5.3) en cada placa de Petri inoculada a partir de un frasco de cultivo (6.9) en cada placa de Petri. Se mezcla suavemente con el inóculo mediante movimientos de la placa hacia arriba y hacia abajo y rotatorios en la dirección y en contra de las agujas del reloj. Se repite 5 veces el movimiento evitando que el medio toque la tapa de las placas o se derrame por los bordes.

El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y el final de la siembra no debe exceder los 45 min.

Prepare la placa control con 15 mL de medio para controlar la esterilidad del mismo.

Se deja solidificar el medio en las placas sobre una superficie nivelada, durante 5 min a 10 min.

9.2.3 Después de solidificado el medio, añada aproximadamente 4 mL del medio VRBL (5.3) mantenido a una temperatura de 47 ± 2 °C en la superficie del medio inoculado, deje solidificar

9.2.4 Invierta las placas e incube a 30 °C, 35 °C ó 37 °C (según lo acordado), durante un período de $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

9.3 Enumeración de colonias

Después del período de incubación (ver 9.2.4) cuente usando un contador de colonias (6.6), las colonias características de coliformes en cada placa que contenga no más de 150 colonias.

NOTA: Después de la incubación por 24 h, las colonias características son de color rojo púrpura, con diámetro de 0.5 mm ó más, rodeadas de una zona rojiza por el precipitado de bilis.

10 Expresión de los resultados

10.1 Método de cálculo

10.1.1 Caso general - placas conteniendo entre 15 y 150 colonias características

Seleccionar las placas que contengan no más de 150 colonias características en diluciones consecutivas y que al menos contengan 15 de estas colonias.

Calcular el número N de coliformes por mililitro o por gramo de producto utilizando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

donde:

ΣC : Sumatoria de las colonias contadas en todas las placas.

n_1 : Número de placas contadas en la dilución más baja.

n_2 : Número de placas contadas en la dilución más alta.

d: Factor de la dilución para la dilución más baja (donde existe la más alta concentración de la muestra).

Redondear el resultado obtenido a dos cifras significativas. Cuando el número a redondear es 5, redondee el número para obtener un número par a la izquierda, por ejemplo 28 500 se redondea a 28 000, 11 500 se redondea a 12 000.

El resultado se expresará como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por 10^x , donde x es la potencia apropiada de 10.

Ejemplo:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{83 + 97 + 13 + 8}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{201}{0,022} = 9136$$

- ◆ En la primera dilución retenida (10^{-2}) 83 y 97 colonias características
- ◆ En la segunda dilución retenida (10^{-3}) 13 y 8 colonias características

Redondeando el resultado según lo especificado anteriormente da 9100 ó 9.1×10^3 coliformes/mL ó 9.1×10^3 coliformes/g de producto.

10.1.2 Caso donde cada placa contiene menos de 15 colonias características

Calcular el número estimado N_E de coliformes utilizando la siguiente ecuación que aparece en 10.1.1.

Ejemplo:

Una enumeración de coliformes a 30°C dio los siguientes resultados:

- ◆ En la primera dilución 10^{-4} 140 y 145 colonias, de las cuales 5 y 3 colonias respectivamente fueron características.
- ◆ En la dilución 10^{-5} : 11 y 8 colonias, de las cuales 0 y 1 colonias respectivamente fueron características.

$$N = \frac{5 + 3 + 0 + 1}{(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-4}} = \frac{9}{2,2 \times 10^{-4}} = 4000$$

Redondeando el resultado según lo especificado anteriormente da 4000 ó 4.0×10^4 coliformes/mL ó 4.0×10^4 coliformes/g de producto.

10.1.3 Estimación de números pequeños

Si las dos placas, correspondientes a la muestra de prueba (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos), contienen menos de 15 colonias características, reporte los resultados de la siguiente forma:

- menos de 15 coliformes/mL (productos líquidos);
- menos de $(15 \times 1/d)$ coliformes/g (otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

10.1.4 Colonias no características

Si las dos placas correspondientes a la muestra (productos líquidos) o la suspensión inicial (otros productos), no contienen colonias características, reporte los resultados como sigue:

- menos de 1 coliforme/ mL (productos líquidos);
- menos de $(1 \times 1/d)$ coliforme/ g (otros productos), donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

10.2 Precisión

10.2.1 Placas conteniendo entre 15 y 150 colonias características. (Ver 10.1.1)

Por razones estadísticas solamente, en el 95% de los casos los límites de confiabilidad de este método varían desde $\pm 16\%$ hasta $\pm 52\%$ (Cowell y Morisetti, J. Sci. Fd.Agric., 1969, Vol 20 P. 573). En la práctica puede encontrarse gran variación especialmente cuando los resultados son obtenidos por diferentes microbiólogos.

10.2.2 Cada placa conteniendo menos de 15 colonias características (Ver 10.1.2)

Referirse a la tabla A.1. Para obtener los límites de confiabilidad, multiplicar el límite inferior y superior dado por $1/d$ donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

10.2.3 Estimación de números pequeños (Ver 10.1.3)

Los límites de confiabilidad para la estimación de números pequeños de coliformes se ofrecen en la tabla A.1.

11 Informe de ensayo

Debe especificar el método usado, el objetivo de la prueba (tecnológica o salud pública) y la temperatura seleccionada y los resultados obtenidos. Debe también hacer mención en detalles de las operaciones que no están especificada en este Normas Internacional o que se ofrecen como opción. Además debe incorporarse los detalles de cualquier incidente que puede tener influencia en los resultados.

Este informe debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

Anexo A
(normativa)

Límites de confianza para la estimación de pequeños números de colonias

Los límites de confianza para el nivel de 95% para la estimación de pequeños números, cuando el número de colonias características es menor que 15, están dada en la tabla A.1.

Tabla A.1

Número de coliformes	Límites de confianza para el nivel de 95%	
	Inferior	Superior
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

Bibliografia

[1] COWELL and MORISETI. *J. Sci. Food Agric.*, 1969 (Vol. 20), p. 573.