

## **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 MICROORGANISMOS.  
TECNICA DE PLACA VERTIDA A 30°C  
(ISO 4833:1991, IDT)**

Microbiology. General guidance for enumeration  
of microorganisms. Colony count technique at 30°C

---

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 versión en inglés de la ISO 4833: 1991 *Microbiology. General guidance for enumeration of micro-organisms. Colony count technique at 30 °C.*

Con independencia de la existencia de normas ISO para productos específicos, la NC-ISO 4833 se aplicará para todos los alimentos para consumo humano y de animales.

- Sustituye a la NC 76-04-1: 82: Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayo microbiológicos. Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables y a la NC 74-38: 86 Ganadería. Alimentación animal. Determinación del total de microorganismos aerobios mesófilos viables.
- La temperatura del baño de agua que aparece en la ISO 4833: 1991 es  $45\text{ °C} \pm 0.5\text{ °C}$ , pero la ISO 7218: 1996 hace referencia a baños a  $47 \pm 2\text{ °C}$ . Hemos adoptado la temperatura de la ISO 7218 por estar más actualizada.

## © 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 ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS. TECNICA DE PLACA VERTIDA A 30°C

### 1 Objeto

Esta Norma Cubana proporciona las directivas generales para la enumeración de microorganismos en los productos para el consumo humano o para la alimentación animal, mediante el conteo de colonias obtenidas en medio sólido después de la incubación en aerobiosis a 30°C<sup>1)</sup>.

### 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.*

NC-ISO 6887-1: 2002 y todas sus partes.

### 3 Definición

Para los propósitos de esta norma se aplica la siguiente definición:

**microorganismos:** Bacterias, levaduras y mohos que se desarrollan en aerobiosis, cuando se realiza el ensayo conforme con el método especificado en la presente norma.

### 4 Principio

**4.1** Siembra profunda de un medio de cultivo definido, colocado en dos placas Petri, con una cantidad determinada de la muestra para ensayo si el producto a analizar es líquido, o con una cantidad determinada de suspensión inicial en el caso de otros productos.

En las mismas condiciones, siembra de diluciones decimales obtenidas a partir de la muestra para ensayo o de la suspensión inicial.

---

<sup>1)</sup> La temperatura de 30°C es la más utilizada para la enumeración de la flora total; también esta ha sido la temperatura seleccionada por el Subcomité 9 del ISO/TC 34. No obstante, si por razones particulares se utiliza otra temperatura, será conveniente indicarlo en el informe de ensayo.

**4.2** Incubación en aerobiosis de placas a 30 °C, durante 72 h.

**4.3** Calcular el número de microorganismos por gramo o por mililitro de muestra a partir de las colonias obtenidas en las placas seleccionadas (ver 10.1).

## 5 Medios de cultivo y diluyente

### 5.1 Generalidades

Para las prácticas corrientes de laboratorio, ver la ISO 7218.

### 5.2 Diluyente

Ver la NC ISO 6887-1 y la Norma específica que trata del producto a analizar.

### 5.3 Medio para conteo en placa

Composición

Triptona _____	5,0 g
Extracto de levadura deshidratada _____	2,5 g
Glucosa anhidra _____	1,0 g
Agar _____	12 g a 18 g <sup>2)</sup>
Agua _____	1000 mL.

Preparación

- Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en agua, si es necesario use calentamiento. Ajustar el pH, si es necesario, de manera que después de la esterilización sea de 7,0 a 25 °C.
- Repartir el medio en los tubos de ensayo (6.8), en cantidades de 15 mL por tubo, o en matraces (6.8) cuya capacidad no sea superior a 500 mL, en cantidades de aproximadamente la mitad del volumen del matraz.
- Esterilizar en autoclave regulada a 121°C durante 15 min.
- Antes de comenzar el análisis microbiológico y para evitar cualquier demora en el momento de utilizar el agar para el conteo, fundir completamente el medio en baño de agua hirviendo, después enfriarlo en baño de agua (6.5) regulado a 47° C ± 2 °C.

### 5.4 Medio agar agua (ver si es necesario 9.2.3)

Composición.

Agar _____	12 g a 18 g <sup>2)</sup>
Agua _____	1000 mL.

#### Preparación

- Disolver el agar en agua, caliente si es necesario. Ajuste el pH, en caso de ser necesario, de manera que después de la esterilización sea de 7,0 a 25°C.
- Repartir el medio en tubos de ensayo (6.8), en cantidades de 4 mL por tubo, o en matraces (6.8) de una capacidad adecuada en cantidades de 100 mL por matraz.
- Esterilizar en autoclave regulada a 121°C durante 15 min. en el momento de uso se debe fundir el medio por baño de agua por ebullición y enfriar en baño de agua a  $47 \pm 2$  °C.

#### 6 Aparatos y cristalería

**NOTA:** Los aparatos desechables son una alternativa aceptable para la cristalería reutilizable si estos tienen las especificaciones adecuadas.

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

##### 6.1 Aparatos para esterilización seca (horno) o para esterilización húmeda (autoclave)

Ver la ISO 7218.

**6.2 Incubadora**, regulable a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**6.3 Placas Petri**, de cristal o plástico, de 90 mm a 100 mm de diámetro.

**6.4 Pipetas de flujo total**, de 1 mL de capacidad nominal.

**6.5 Baño de agua**, o equipo similar, regulable a  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**6.6 Aparato para el conteo de colonias**, comprende un sistema de iluminación y un contador numérico mecánico o electrónico.

**6.7 pH-metro**, con precisión de  $\pm 0,1$  unidad de pH a 25°C.

**6.8 Tubos de ensayo**, de 20 mm x 200 mm o matraces con una capacidad de 150 mL y que no excedan de 500 mL.

---

<sup>2)</sup> Según el poder gelificador del agar-agar.

## 7 Muestreo

El muestreo debe realizarse conforme a la Norma específica del producto concerniente. Si no existe una Norma específica, se recomienda que las correspondientes partes se pongan de acuerdo con respecto a este tema.

## 8 Preparación de la muestra para ensayo

Prepare la muestra conforme a la Norma específica del producto concerniente. Si no existe una Norma específica, se recomienda que las correspondientes partes se pongan de acuerdo con respecto a este tema.

## 9 Procedimiento

### 9.1 Porción de ensayo, suspensión inicial y diluciones

Ver la NC ISO 6887-1 y la Norma específica del producto en cuestión.

### 9.2 Inoculación e incubación

**9.2.1** Tomar dos placas Petri estériles (6.3) usando una pipeta estéril (6.4), transferir a cada una de las placas 1 mL de la muestra de ensayo, si la muestra a estudiar es un producto líquido o 1 mL de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Tomar otras dos placas Petri estériles (6.3). Usando una pipeta estéril (6.4), transferir en cada una de las placas 1 mL de la primera dilución decimal ( $10^{-1}$ ) de la muestra para ensayo si el producto es líquido o 1 mL de la primera dilución decimal ( $10^{-2}$ ) de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Repetir el procedimiento con las diluciones restantes usando una nueva pipeta estéril para cada dilución decimal

**9.2.2** Añadir a cada placa Petri aproximadamente 15 mL de agar para conteo (5.3) a  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial (o de la dilución  $10^{-1}$  si el producto es líquido) y el momento en que el medio (5.3) es vertido a las placas, no excederá los 45 min.

Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo y dejar solidificar colocando las placas Petri en una superficie fría y horizontal.

**9.2.3** Después de la solidificación completa, únicamente en el caso donde sospechemos que el producto examinado contiene microorganismos cuyas colonias podrían tener un sobre crecimiento en la superficie del medio, añadimos 4 mL de medio agar acuoso (5.4) a  $47^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en la superficie del medio inoculado. Dejar que se solidifique tal como se describe anteriormente.

Si esta operación se lleva a cabo, debe mencionarse en el informe de ensayo.

**9.2.4** Invertir las placas preparadas e incubarlas en la incubadora (6.2) a  $30^{\circ}\text{C}$  durante  $72\text{ h} \pm 3\text{ h}$ .

### 9.3 Conteo de las colonias

Después del período de incubación especificado (ver 9.2.4) proceder con la ayuda del contador (6.6) al conteo de las colonias en cada placa que contengan no más 300 colonias.

## 10 Expresión de los resultados

### 10.1 Método de cálculo

#### 10.1.1 Caso general - Placas que contienen entre 15 y 300 colonias

Escoger las placas de dos diluciones sucesivas que contengan no más de 300 colonias. Es necesario que una de estas placas contenga por lo menos 15 colonias.

Calcular la cantidad N de microorganismos por mililitro o por gramo de producto dependiendo del caso, usando la siguiente ecuación:

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

donde:

$\Sigma C$ : es la suma de las colonias contadas en todas las placas separadas.

$n_1$ : es la cantidad de placas separadas en la primera dilución.

$n_2$ : es la cantidad de placas separadas en la segunda dilución.

d: es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución.

Redondear los resultados calculados a dos números significativos.

Tomar como resultado el número de microorganismos por mililitro o por gramo de producto expresado como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por  $10^x$  donde x es la potencia apropiada de 10.

#### EJEMPLO:

Un conteo de microorganismos a 30°C da los resultados siguientes:

- En la primera dilución  $10^{-2}$  separada: 168 y 215 colonias.
- En la segunda dilución  $10^{-3}$  separada: 14 y 25 colonias.



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

$$= \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19181,5$$

Redondeando el resultado como se especifica arriba da 19000 o  $1,9 \times 10^4$  microorganismos por mililitro o por gramo de producto.

### 10.1.2 Estimación de las pequeñas cantidades

Si las dos placas, correspondientes a la muestra para ensayo (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos) contienen menos de 15 colonias, calcular la media aritmética  $m$  de colonias contadas en ambas placas.

Dar el resultado de la siguiente manera:

- Cantidad estimada de microorganismos por mililitros:

$$N_E = m \text{ (productos líquidos).}$$

- Cantidad estimada de microorganismos por gramo:

$$N_E = m \times d^{-1} \text{ (otros productos), } d \text{ es el promedio de dilución de la suspensión inicial.}$$

### 10.1.2 Ninguna colonia

Si las dos placas correspondientes a la muestra para ensayo (productos líquidos) o de la suspensión inicial (otros productos), no contienen ninguna colonia, dar el resultado de la siguiente manera:

- Menos de 1 microorganismo por mililitro (productos líquidos).
- Menos de  $1 \times d^{-1}$  microorganismo por gramo (otros productos), donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial.

## 10.2 Precisión

### 10.2.1 Placas que contienen entre 15 y 300 colonias (ver 10.1.1)

Por razones de orden exclusivamente estadístico, en el 95% de los casos, los límites de confianza de este método varían de  $\pm 12\%$  a  $\pm 37\%$  (Cowell y Moriseti, *J. Sci. Fd. Agric.*, 1969 Vol. 20, p. 573). En la práctica, podemos observar variaciones aún más notables, especialmente entre los resultados obtenidos por diferentes microbiólogos.

### **10.2.2 Estimación de pequeñas cantidades (ver 10.1.2)**

Los límites de confianza para las estimaciones de pequeñas cantidades de microorganismos aparecen en la tabla A.1.

### **11 Informe del ensayo**

El informe del ensayo deberá especificar el método utilizado y los resultados obtenidos. Además debe mencionar todos los detalles operatorios no previstos en la presente Norma, o los opcionales, así como los detalles o incidentes eventuales que hubiesen podido influir en los resultados.

El informe del ensayo deberá incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra.

**Anexo A**  
(normativo)

**Límites de confianza de las estimaciones de pequeñas cantidades de colonias.**

La tabla A.1 contiene los límites de confianza en el nivel 95% de las estimaciones de pequeñas cantidades, cuando la cantidad de colonias obtenidas en las placas es inferior a 15 microorganismos.

**Tabla A.1**

Cantidad de microorganismos	Límites de confianza en el nivel 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