

### **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. PREPARACION DE LA  
MUESTRA DE ENSAYO, LA SUSPENSION  
INICIAL Y LAS DILUCIONES DECIMALES PARA  
PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS  
PARTE 1: REGLAS GENERALES PARA LA  
PREPARACION DE LA SUSPENSION INICIAL Y  
LAS DILUCIONES DECIMALES  
(ISO 6887-1:1999, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examinations.

Part1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

## 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.

La versión en inglés de la ISO 6887: 1999 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*", consta de las siguientes partes:

*Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*

*Part 2: Specific rules for the preparation of test samples and initial suspension.*

- Su parte 1 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 Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
  - 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 6887-1: 1999 *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.*

© 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**

## Introducción

Debido a la gran variedad de alimentos y productos alimenticios, este método puede no ser apropiado para ciertos productos en todos los detalles. En estos casos pueden usarse diferentes métodos, específicos para estos productos, si es absolutamente necesario por razones técnicas justificadas. Sin embargo debe intentarse aplicar este método siempre que sea posible.

Cuando esta parte sea revisada tomará en cuenta toda la información disponible aportada por los que han seguido este método horizontal y las razones para las desviaciones a partir de este método, en el caso de productos específicos.

La armonización de estos métodos de pruebas no puede ser inmediata, y para cierto grupo de productos pueden existir normas internacionales y/o nacionales que no cumplan con este método horizontal. Se espera que cuando estas normas sean revisadas estas sean modificadas para que cumplan con esta parte, de manera que las desviaciones que permanezcan en este método horizontal, serán aquellas necesarias por razones técnicas bien establecidas.

Esta parte define las reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de las diluciones decimales para las pruebas microbiológicas. La parte 2 (en preparación) especificará las reglas para la preparación de la muestra de ensayo y de la suspensión inicial, tomando en cuenta la variedad de alimentos y productos alimenticios para los cuales se aplica la ISO 6887.

Para un número de productos es necesario tomar determinadas precauciones, específicamente cuando se prepare la suspensión inicial, debido al estado físico del producto (tales como productos secos, o altamente viscosos), o a la presencia de sustancias inhibitorias (tales como especias, pescados salados) o a la acidez, etc.

Se recomienda que mientras se espera por la publicación de la parte 2, se usen en la preparación de la suspensión inicial diluentes especiales, o prácticas específicas para productos particulares de acuerdo a la norma específica. Esto puede incluir:

- ajuste del pH a la neutralidad de la suspensión del alimento;
- uso de agua peptonada bufferada, y no otro diluyente, para productos con alto efecto inhibitorio, o productos que contengan microorganismos que han sido estresados (por ejemplo pH ácido);
- procedimientos de rehidratación específica para alimentos de baja actividad de agua para minimizar el choque osmótico;
- el uso de temperaturas adecuadas para ayudar a la suspensión de la cocoa, gelatina, leche en polvo, etc;
- procedimientos de resucitación para el mejoramiento del recobrado de los microorganismos estresados resultantes del procesamiento y almacenamiento del alimento;
- procedimientos de homogeneización y de duración específica para ciertos productos (por ejemplo cereales) y para ciertas determinaciones (ejemplo, mohos y levaduras);
- uso de agentes activos de superficie para alimentos ricos en grasas.



**MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL.  
PREPARACION DE LA MUESTRA DE ENSAYO, LA SUSPENSION INICIAL Y  
LAS DILUCIONES DECIMALES PARA PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS  
PARTE 1: REGLAS GENERALES PARA LA PREPARACION DE LA SUSPENSION INICIAL  
Y LAS DILUCIONES DECIMALES**

## **1 Objeto**

Esta parte define las reglas generales para la preparación aeróbica de la suspensión inicial y las diluciones decimales para las pruebas microbiológicas de los productos de consumo humano y animal.

Esta parte es aplicable para casos generales, excepto para los productos mencionados en la parte 2.

## **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.

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

## **3 Definiciones**

Para el propósito de esta parte se aplican las siguientes definiciones:

**3.1 Suspensión inicial (dilución primaria):** suspensión, solución o emulsión obtenida después que una cantidad pesada o medida del producto en examen (o de una muestra de ensayo preparada a partir del producto) ha sido mezclada con nueve partes del diluyente, permitiendo la sedimentación de las partículas de mayor tamaño, si están presentes.

**NOTA:** Ver cláusula 5 y notas 1 y 2 de 9.1

**3.2 Diluciones decimales adicionales:** suspensiones o soluciones obtenidas a partir de la mezcla de la suspensión inicial (3.1) con nueve partes del volumen del diluyente y repitiendo esta operación con diluciones adicionales hasta obtener una serie de diluciones decimales, requeridas para la inoculación del medio de cultivo.

**3.3 norma específica:** norma o documento guía que describe el examen de un producto específico (o grupo de productos) para la detección o enumeración de un microorganismo específico (o grupo de microorganismos)

## 4 Principio

Preparación de la suspensión inicial (3.1) en la cual se obtenga una distribución de microorganismos tan uniforme como la contenida en la muestra de ensayo.

Preparación, si es necesario, de diluciones decimales (3.2) de manera de reducir el número de microorganismos por unidad de volumen para permitir, después de la incubación, la observación o no de su crecimiento (en caso de tubos o frascos) o conteo de colonias (en caso de placas), como se establece en cada norma específica

**NOTA:** Con el objetivo de restringir el rango de enumeración en un intervalo dado, o si se prevén altos números de microorganismos, es posible inocular solo las diluciones decimales necesarias (al menos dos diluciones sucesivas) requeridas para lograr la enumeración de acuerdo a los cálculos descritos en la ISO 7218.

## 5 Diluentes

### 5.1 Materiales básicos

Para mejorar la reproducibilidad de los resultados, se recomienda que para la preparación del diluyente se usen los componentes básicos deshidratados o la preparación completa deshidratada. Deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Los productos químicos usados deberán ser de calidad analítica reconocida para análisis microbiológicos.

El agua utilizada deberá ser agua destilada o de calidad equivalente (ver ISO 7218).

### 5.2 Diluentes para uso general

#### 5.2.1 Solución salina peptonada

##### 5.2.1 Composición

Digerido enzimático de caseína (Tryptona C)	1.0 g
Cloruro de Sodio	8.5 g
Agua	1000 mL

##### 5.2.1.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Si es necesario, ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea  $7,0 \pm 0,2$  a 25 °C.

## 5.2.2 Agua peptonada bufferada

### 5.2.2.1 Composición

Digerido enzimático de tejido animal (Peptona bacteriológica)	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Hidrogeno fosfato disódico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Dihidrógeno fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Agua	1000 mL

### 5.2.2.2 Preparación

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario.

Si es necesario, ajustar el pH de modo que después de la esterilización sea  $7,0 \pm 0,2$  a 25 °C.

## 5.3 Diluentes para propósitos especiales

Ver la norma específica apropiada al producto concerniente.

**NOTA:** La parte 2 (en preparación) dará las reglas específicas.

## 5.4 Distribución y esterilización del diluyente

Distribuir el diluyente (5.2 ó 5.3) en volúmenes como se requiere para la preparación de las suspensiones iniciales en frascos (6.4) de capacidad apropiada.

Distribuir el diluyente (5.2 ó 5.3) en volúmenes como se requiere para la preparación de las diluciones decimales en tubos de ensayo (6.5) o frascos (6.4) en cantidades tales que, después de la esterilización, cada tubo o frasco contenga 9 mL. La incertidumbre de la medición del volumen final, después de la esterilización, no excederá de  $\pm 2\%$ .

**NOTA:** Si se desea contar varios grupos de microorganismos usando diferentes medios de cultivo, puede ser necesario distribuir todos los diluentes (o algunos de ellos) en cantidades mayores de 9 mL; siendo especificado consecuentemente el tamaño de los frascos (6.4) y de los tubo de ensayo (6.5).

Tapar los tubos o frascos.

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## 6 Aparatos y cristalería

Aparatos usuales en el laboratorio de microbiología (ver ISO 7218), y en particular los siguientes:

### 6.1 Aparato para esterilización seca (horno) y para esterilización húmeda (autoclave).

Ver ISO 7218.



## 6.2 Equipos homogeneizadores

Ver ISO 7218

## 6.3 Agitador mecánico

Ver ISO 7218

**6.4 Frascos o botellas con tapa de rosca**, de capacidades apropiadas.

**6.5 Tubos de ensayo**, de capacidades apropiadas.

**6.6 Pipetas graduadas** con capacidades nominales de 1 mL y 10 mL, graduadas en divisiones de 0,1 mL y 0,5 mL respectivamente.

**6.7 Medidor de pH**, capaz de ser leído lo más cercano a 0,01 unidad de pH a 25 °C, permitiendo hacer mediciones con precisión de  $\pm 0,1$  unidad de pH

**6.8 Balanza**, capaz de pesar con precisión de 0,01 g.

## 7 Muestreo

Llevar a cabo el muestreo de acuerdo con la norma específica apropiada para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre las partes interesadas.

## 8 Preparación de la muestra de ensayo

Ver la norma específica apropiada para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre las partes interesadas.

## 9 Procedimiento

### 9.1 Porción de ensayo y suspensión inicial (dilución primaria)

Pesar, en un recipiente estéril o en un bolso plástico estéril, con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  de masa ( $m$ ) en g, o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen ( $V$ ) en mL (mínimo 10 g ó 10 mL, a menos que sea indicado de otra manera) representativo de la muestra de ensayo (ver cláusula 8)

Adicionar una cantidad del diluyente igual a  $9 \times m$  (g) o  $9 \times V$  (mL). Esta cantidad debe ser medida preferiblemente por masa con una incertidumbre de  $\pm 5\%$  o por un volumen con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ .

**NOTA 1:** En ciertos casos, particularmente para productos dados donde la suspensión inicial 1+9 es demasiado viscosa o espesa, añadir más diluyente. Esto debe ser tomado en cuenta para operaciones subsecuentes y/o en la expresión de los resultados.

**NOTA 2:** Esta dilución primaria condiciona parcialmente los valores del límite menor de enumeración, lo cual también depende de la técnica usada (por ejemplo para la técnica de placa vertida con 1 mL de inóculo de la suspensión 1/10, el límite es 10 microorganismos por gramo). Si es necesario, para algunas enumeraciones en ciertos productos, que caigan

por debajo de este límite, es posible usar un volumen menor de diluyente <sup>1)</sup>. Debe notarse que la inoculación de esta suspensión inicial puede resultar en dificultades debido al desbalance en la relación inóculo/medio (inhibición del crecimiento microbiano por incremento de las concentraciones de los componentes alimenticios).

Para evitar el daño de los microorganismos por cambios frecuentes de temperatura, la temperatura del diluyente durante las operaciones dadas debajo, deberá ser aproximadamente la misma que la temperatura ambiente, excepto para productos particulares (ver norma específica).

Homogeneizar la mezcla de acuerdo a las recomendaciones de la ISO 7218.

Si es necesario, dejar sedimentar las partículas de gran tamaño por más de 15 minutos. Deben usarse sistemas de filtración que den resultados similares.

En el caso de enumeración de esporas, deberá llevarse a cabo el calentamiento de la suspensión inicial inmediatamente después de su preparación, por ejemplo 10 min a 80 °C, seguido por un rápido enfriamiento.

## 9.2 Diluciones decimales adicionales

Transferir, por medio de una pipeta, 1 mL de la suspensión inicial con una incertidumbre de medición <sup>2)</sup> de  $\pm 5\%$ , en un tubo que contenga 9 mL del diluyente estéril a la temperatura apropiada.

**NOTA:** Si se necesita un gran volumen, es posible adicionar a determinado volumen (más de 1 mL) de la suspensión inicial, con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ , en un tubo que contenga nueve partes del volumen del diluyente estéril.

Para una precisión óptima, no introduzca la pipeta más de 1 cm dentro de la suspensión inicial.

Evite cualquier contacto entre la pipeta que contenga el inóculo y el diluyente estéril.

Mezcle completamente, con un agitador mecánico (6.3) durante 5 s o 10 s para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario, repita estas operaciones usando la dilución  $10^{-2}$  y diluciones adicionales usando en cada dilución una nueva pipeta estéril para obtener diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc, hasta que se obtenga el número de microorganismos apropiados (ver cláusula 4).

## 9.3 Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo se pone en contacto con el medio de cultivo no excederá los 45 min, mientras que el tiempo límite transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial (9.1) y el comienzo de la preparación de la siguiente dilución decimal es 30 min, a menos que sea indicado en la norma específica.

**NOTA:** Si la temperatura ambiente del laboratorio es demasiado alta, estas dos duraciones máximas deben ser reducidas.

---

<sup>1)</sup> En este caso, el volumen del diluyente usado debe ser reportado en el informe de ensayo.

<sup>2)</sup> La medida de la incertidumbre de retención de  $\pm 5\%$  toma en cuenta los límites presentes de las pipetas usadas corrientemente.