

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

ISO 4831: 2010  
(Publicada por la ISO en 2006)

---

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACION DE COLIFORMES — TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE  
(ISO 4831:2006, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique

---

ICS: 07.100.30

2. Edición    Diciembre 2010  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana. Cuba. Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

## NC-ISO 4831: 2010

### Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

#### Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología de los Alimentos, integrado por representantes de las siguientes entidades:
  - Ministerio de Salud Pública (DNSA)
  - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
  - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAG)
  - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
  - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
  - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
  - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
  - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
  - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA-MES)
  - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MINAL)
  - Laboratorio Central de Calidad (CID-CI. MINCIN)
  - ALIMPORT (MINCEX)
  - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
  - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
  - Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN-CITMA)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 4831: 2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique*.

Esta segunda edición de la NC ISO 4831 cancela y reemplaza a la NC ISO 4831:2002 *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes. Técnica del número más probable*. Los principales cambios realizados fueron los siguientes:

- se eliminó el procedimiento alternativo de incubación a 35 °C;
- se cubren la detección y enumeración de coliformes (Cláusulas 4 y 9);
- se omitió la descripción del NMP y el CCT (Cláusula 10) y se ofrece como referencia la ISO 7218.

Tomando en cuenta la naturaleza de los cambios con respecto a la edición anterior de esta Norma Cubana, se consideró que la validación de métodos alternativos basados en la NC ISO 4831:2002 no se afectó por esta revisión.

### © NC, 2010

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

**Oficina Nacional de Normalización (NC)**

**Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

## 0 Introducción

Dada la gran variedad existente de productos alimenticios destinados al consumo humano y animal, este método horizontal puede no ser apropiado en todos los detalles para determinados alimentos. En este caso, se pueden usar diferentes métodos, los cuales son específicos para estos productos, si está absolutamente justificado por razones técnicas. Sin embargo, se debería intentar aplicar este método horizontal siempre que sea posible.

Cuando se revise nuevamente esta norma cubana, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento, sobre la aplicación de este método y las razones que han originado desviaciones para productos concretos.

La armonización de los métodos de ensayo no puede ser inmediata y para ciertos grupos de productos pueden existir ya normas nacionales que no se ajusten a este método horizontal. Se espera que cuando estas normas sean revisadas, se cambien para que se ajusten a esta norma cubana y que solo se conserven las divergencias inevitables justificadas por razones técnicas.

La técnica descrita en esta norma cubana es menos precisa que la descrita en la ISO 4832 [1], pero permite que se lleve a cabo un examen microbiológico en una mayor porción de ensayo, esto permite que se detecte un menor número de coliformes por gramos o por mililitro. Además, ya que la definición de “coliformes” adoptada en ambos documentos es diferente, los microorganismos enumerados no son necesariamente los mismos.

Para cualquier producto en particular, el método a ser seleccionado especificará la norma cubana empleada con el producto.

Para los propósitos de un método de ensayo práctico, la definición de “coliformes” dada en la Cláusula 3 y usada como base para este procedimiento no es necesariamente idéntica a las correspondientes definiciones dadas en otros textos publicados. Una proporción de cepas de los microorganismos descritos en otros textos publicados como “coliformes” (incluyendo *Escherichia coli*) falla para producir bastante gas que sea detectable por el uso de un tubo Durham (como las “cepas anaerogénicas”). Por tanto, el método descrito en esta norma cubana no detectará todas las cepas de microorganismos referidos en otras publicaciones como “(presuntivos) coliformes” (ejemplo: ciertas cepas de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*) (ver Referencia [2]).

## MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA DETECCIÓN Y ENUMERACION DE COLIFORMES — TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

### 1 Objeto

Esta Norma Cubana ofrece las guías generales para la detección y enumeración de coliformes. Es aplicable a:

- productos destinados para el consumo humano y animal,
- muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

La enumeración se lleva a cabo por el cálculo del número más probable (NMP) después de incubar en un medio líquido a 30 °C ó a 37 °C.

**NOTA:** La temperatura a emplear está sujeta a acuerdo entre las partes implicadas. En el caso de la leche y los productos lácteos, la temperatura de incubación es 30 °C.

Este método de enumeración se aplica cuando el número buscado se espera que esté en el rango de 1 a 100 por gramo o mililitro de la muestra de ensayo.

Una limitación en la aplicabilidad de esta Norma Cubana está dada por la susceptibilidad del método a tener un elevado grado de variabilidad. La información que se ofrece en la Cláusula 11 provee una guía en la aplicabilidad del método y en la interpretación de los resultados.

### 2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento referenciado (incluyendo cualquier enmienda).

NC ISO 6887-1: 1999, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Preparación de las muestras de ensayo, las suspensiones iniciales y las diluciones decimales para exámenes microbiológicos.. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

ISO 6887 (todas las demás partes), Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Preparación de las muestras de ensayo, las suspensiones iniciales y las diluciones decimales para exámenes microbiológicos..

ISO 7218, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Requerimientos generales y guía para exámenes microbiológicos.

ISO/TS 11133-1, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.

ISO/TS 11133-2:2009, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo - Parte 2: Guías prácticas en la comprobación del rendimiento de los medios de cultivo.

### 3 Términos y Definiciones

Para el propósito de esta norma se aplican los siguientes términos y definiciones:

#### 3.1 coliformes

Bacterias las cuales, a la temperatura especificada (esto es 30°C ó 37°C, según lo acordado) fermentan la lactosa con producción de gas bajo las condiciones de ensayo especificadas en esta Norma Cubana.

#### 3.2 detección de coliformes

Determinación de la presencia o ausencia de estas bacterias, en una cantidad particular de producto, cuando los ensayos se llevan a cabo de acuerdo con el método especificado en esta Norma Cubana.

#### 3.3 enumeración de coliformes

Número más probable de coliformes encontrados por mililitro o por gramo de la muestra de ensayo, cuando los ensayos se llevan a cabo de acuerdo con el método especificado en esta Norma Cubana.

### 4 Principio

#### 4.1 Detección de coliformes

**4.1.1** Un tubo de caldo de enriquecimiento selectivo se inocula con la porción de ensayo y se incuba a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h ó 48 h.

**4.1.2** Un tubo de medio de confirmación se inocula a partir del tubo obtenido en 4.1.1 cuando se observa opacidad y/o formación de gas, y se incuba a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h ó 48 h.

**4.1.3** La presencia de coliformes se confirma en el caso en que la opacidad y la formación de gas se observen después de examinar el tubo obtenido en 4.1.2.

#### 4.2 Enumeración por la técnica de NMP

**4.2.1** Inoculación de tres tubos de medio líquido de enriquecimiento selectivo de doble fuerza con una cantidad específica de la muestra de ensayo si el producto inicial es líquido, o con una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

**4.2.2** Inoculación de tres tubos de medio líquido de enriquecimiento selectivo de simple fuerza con una cantidad específica de la muestra de ensayo si el producto inicial es líquido, o con una cantidad específica de una suspensión inicial en el caso de otros productos. Entonces, bajo las mismas condiciones, se inoculan tres tubos más de medio simple fuerza con las diluciones decimales de la muestra de ensayo o de la suspensión inicial.

**4.2.3** Incubación de los tubos que contienen el medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24h, y los tubos que contienen el medio simple

fuerza se incuban por 24 h ó 48 h, después de este periodo los tubos se examinan para observar formación de gas u opacidad previa a la formación de gas.

**4.2.4** Incubación de una serie de tubos de medio de confirmación con los cultivos de los tubos del medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza en los cuales se ha notado formación de gas u opacidad previa a la formación de gas.

**4.2.5** Incubación de los tubos de 4.2.4 a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h ó 48 h y examen de los tubos para apreciar formación de gas.

**4.2.6** Cálculo del número más probable de coliformes por mililitro o por gramo de muestra (esto es el NMP) a partir del número de tubos en las nuevas series (4.2.5) que muestran formación de gas. Empleo de una tabla para la determinación de números más probables.

## 5 Medio de cultivo y diluentes

### 5.1 General

Ver ISO 7218, ISO/TS 11133-1 e ISO/TS 11133-2 para la preparación, producción y pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

### 5.2 Diluentes

Ver NC ISO 6887-1 o ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la Norma Cubana específica para el producto que se examina.

### 5.3 Medio de enriquecimiento selectivo: Caldo triptosa lauril sulfato

#### 5.3.1 Composición

	a) Medio de doble fuerza	b) Medio simple fuerza
Digerido enzimático de la leche y de proteínas animales	40 g	20 g
Lactosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> H <sub>2</sub> O)	10 g	5 g
Hidrógeno fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5.5 g	2.75 g
Dihidrógeno fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5.5 g	2.75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g	5 g
Lauril sulfato de sodio	0.2 g	0.1 g
Agua	1000 ml	1000 ml

#### 5.3.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, caliente si es necesario.

Ajuste el pH, si es necesario, tal que después de la esterilización sea 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

Dispense el medio simple fuerza en cantidades de 10 ml en tubos de dimensiones de aproximadamente 16 mm x 160 mm (6.4) que contengan tubos Durham (6.5), y en el caso del

medio de doble fuerza utilice tubos de ensayo de aproximadamente 20 mm x 200 mm (6.4) [tubos que no contengan tubos Durham (6.5)]

Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

### 5.3.3 Pruebas de rendimiento para el aseguramiento de calidad de los medios de cultivo

Para las definiciones de selectividad y productividad, referirse a la ISO/TS 11133-1. Las pruebas de rendimiento correspondientes al caldo triptosa lauril sulfato se ofrecen en la ISO/TS 11133-2:2003, Tabla B.1.

## 5.4 Medio de confirmación: Caldo bilis lactosa verde brillante

### 5.4.1 Composición

Digerido enzimático de la caseína	10 g
Lactosa (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> H <sub>2</sub> O)	10 g
Bilis de Buey deshidratada	20 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua	1000 ml

### 5.4.2 Preparación

Disuelva los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, caliente si es necesario.

Ajuste el pH, si es necesario, tal que después de la esterilización sea  $7.2 \pm 0.2$  a 25 °C.

Dispense el medio en cantidades de 10 ml en tubos de ensayo de aproximadamente 16 mm x 160 mm (6.4) que contengan tubos Durham (6.5).

Esterilice en autoclave a 121°C por 15 min. Los tubos Durham no deben contener burbujas de aire después de la esterilización.

### 5.4.3 Pruebas de rendimiento para el aseguramiento de calidad de los medios de cultivo

Para las definiciones de selectividad y productividad, referirse a la ISO/TS 11133-1. Las pruebas de rendimiento correspondientes al caldo triptosa lauril sulfato se ofrecen en la ISO/TS 11133-2:2003, Tabla B.1.

## 6 Aparatos y cristalería

Equipamiento usual del laboratorio de microbiología (ver ISO 7218), y en particular los siguientes:

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

Ver ISO 7218

**6.2 Incubadoras**, capaces de operar a 30 °C  $\pm$ 1 °C ó 37 °C  $\pm$ 1 °C.

**6.3 Asas**, hechas de platino-iridio, o de níquel-cromo, aproximadamente de 3 mm de diámetro o asas desechables.

**6.4 Tubos de ensayo**, de aproximadamente 16 mm x 160 mm y 20 mm x 200 mm.

**6.5 Tubos Durham**, de tamaño adecuado para el uso en tubos de ensayo de dimensiones de 16 mm x 160 mm (6.4).

**6.6 Pipetas de descarga total**, con capacidades nominales de 1 ml y 10 ml.

**6.7 pHmetro**, con precisión para  $\pm 0.1$  unidades de pH a 25 °C.

## **7 Muestreo**

El muestreo debe llevarse a cabo de acuerdo con la 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 NC ISO 6887-1, ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la norma cubana o internacional específica apropiada para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica, se recomienda que las partes lleguen a un acuerdo en este aspecto.

## **9 Procedimiento (ver Anexo A)**

### **9.1 Método de detección (ver Figura A.1)**

#### **9.1.1 Porción de ensayo y suspensión inicial**

Ver NC ISO 6887-1, ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la norma específica para el producto en cuestión.

#### **9.1.2 Inoculación e incubación**

**9.1.2.1** En dependencia del límite de detección que se requiera, transfiera  $x$  ml de la muestra de ensayo si es líquida, o  $x$  ml de la suspensión inicial en el caso de productos sólidos, a un tubo que contenga 10 ml de medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza [5.3.1 a)] cuando  $1 \text{ ml} < x < 10 \text{ ml}$ , o a un tubo que contenga 10 ml de medio de enriquecimiento selectivo de simple fuerza [5.3.1 b)] cuando  $x \leq 1 \text{ ml}$ .

**9.1.2.2** Coloque el tubo con medio doble fuerza (9.1.2.1) en la incubadora (6.2) regulada a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h.

**9.1.2.3** Coloque el tubo con medio simple fuerza (9.1.2.1) en la incubadora (6.2) a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h o, continúe la incubación por 24 h  $\pm$  2 h si no se observa formación de gas ni opacidad previa a la formación de gas.

#### **9.1.3 Confirmación (ver Figura A.3)**

**9.1.3.1** A partir de los tubos incubados en 9.1.2.2, inocule con un asa (6.3) un tubo de medio de confirmación (5.4). Incube en la incubadora (6.2) regulada a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h o, si la formación de gas no se observa en esta etapa, incube por 48 h  $\pm$  2 h.

**9.1.3.2** Siga el mismo procedimiento como se describe en 9.1.3.1 para los tubos incubados a partir de 9.1.2.3 que muestren formación de gas, u opacidad previa a la detección de la formación de gas, cuando cualquiera de estas características se observe primero (esto es después de 24 h  $\pm$  2 h o después de 48 h  $\pm$  2 h).

**9.1.4 Interpretación** (ver Figura A.1)

Un tubo a partir de 9.1.3.1 ó 9.1.3.2 en el cual se observó formación de gas después de 24 h  $\pm$  2 h ó 48 h  $\pm$  2 h se considera como un tubo positivo.

**9.2 Método de enumeración (NMP)** (ver Figura A.2)**9.2.1 Porción de ensayo, suspensión inicial y diluciones**

Ver NC ISO 6887-1, ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la norma específica para el producto en cuestión.

Prepare un número de diluciones suficientes para garantizar que todos los tubos correspondientes a la dilución final ofrezcan un resultado negativo.

**9.2.2 Inoculación e incubación**

**9.2.2.1** Es usual que exista una combinación de tres tubos para cada serie de dilución. Sin embargo, para algunos productos y/o cada vez que los resultados requieran mayor exactitud, puede ser necesario inocular series que consistan de más de tres tubos (ejemplo cinco tubos). Para estos casos, para el cálculo del NMP vea las tablas correspondientes incluidas en la ISO 7218.

**9.2.2.2** Tome tres tubos del medio de enriquecimiento selectivo de doble fuerza [5.3.1 a)]. Usando una pipeta estéril (6.6) transfiera a cada uno de esos tubos 10 ml de la muestra de ensayo si es líquida, ó 10 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

**9.2.2.3** Entonces tome tres tubos del medio de enriquecimiento selectivo de simple fuerza [5.3.1 b)]. Usando una pipeta estéril (6.6), transfiera a cada uno de esos tubos 1 ml de la muestra de ensayo si es líquida, ó 1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

**9.2.2.4** Para cada una de las diluciones posteriores, continúe como se describe en 9.2.2.3. Utilice una pipeta estéril para cada dilución. Mezcle cuidadosamente el inóculo y el medio.

**9.2.2.5** Coloque los tubos con el medio de doble fuerza (9.2.2.2) en la incubadora (6.2) a 30 °C, ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h.

**9.2.2.6** Coloque los tubos con el medio simple fuerza (9.2.2.3 y 9.2.2.4) en la incubadora (6.2) regulada a 30 °C ó 37°C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h o, si no se observa formación de gas u opacidad previa a la formación de gas en esta etapa, continúe la incubación por otras 24 h  $\pm$  2 h.

**9.2.3 Confirmación** (ver Figura A.3)

**9.2.3.1** A partir de cada uno de los tubos incubados desde 9.2.2.5 inocule con un asa (6.3) un tubo con el medio de confirmación (5.4). Incube en una incubadora a 30 °C ó 37°C (según lo acordado) por 24 h  $\pm$  2 h o, si no se observa formación de gas u opacidad previa a la formación de gas en esta etapa, continúe la incubación por otras 24 h  $\pm$  2 h.

**9.2.3.2** Siga el mismo procedimiento descrito en 9.2.3.1 para los tubos incubados a partir de 9.2.2.6, que muestren formación de gas, u opacidad previa a la detección de la formación de gas, cuando cualquiera de estas características se observe primero (esto es después de 24 h  $\pm$  2 h o después de 48 h  $\pm$  2 h).

**9.2.4 Interpretación** (ver Figura A.2)

Para cada dilución, cuente el número total de tubos en los cuales se observó formación de gas en 9.2.3 (tubos positivos) después de 24 h  $\pm$  2 h y (si se usó) 48 h  $\pm$  2 h.

**10 Cálculo y expresión de los resultados**

De acuerdo con los resultados de la interpretación (ver 9.1.4), indique la presencia o ausencia de coliformes en una porción de ensayo de x g o x ml de producto (ver ISO 7218).

Calcule el número más probable a partir del número de tubos positivos en cada dilución. Ver ISO 7218.

**11 Precisión**

Está reconocido que pueden ocurrir amplias variaciones en los resultados con la técnica de NMP. Los resultados obtenidos usando este método deberán entonces ser usados con cuidado.

Los límites de confianza se ofrecen en la ISO 7218.

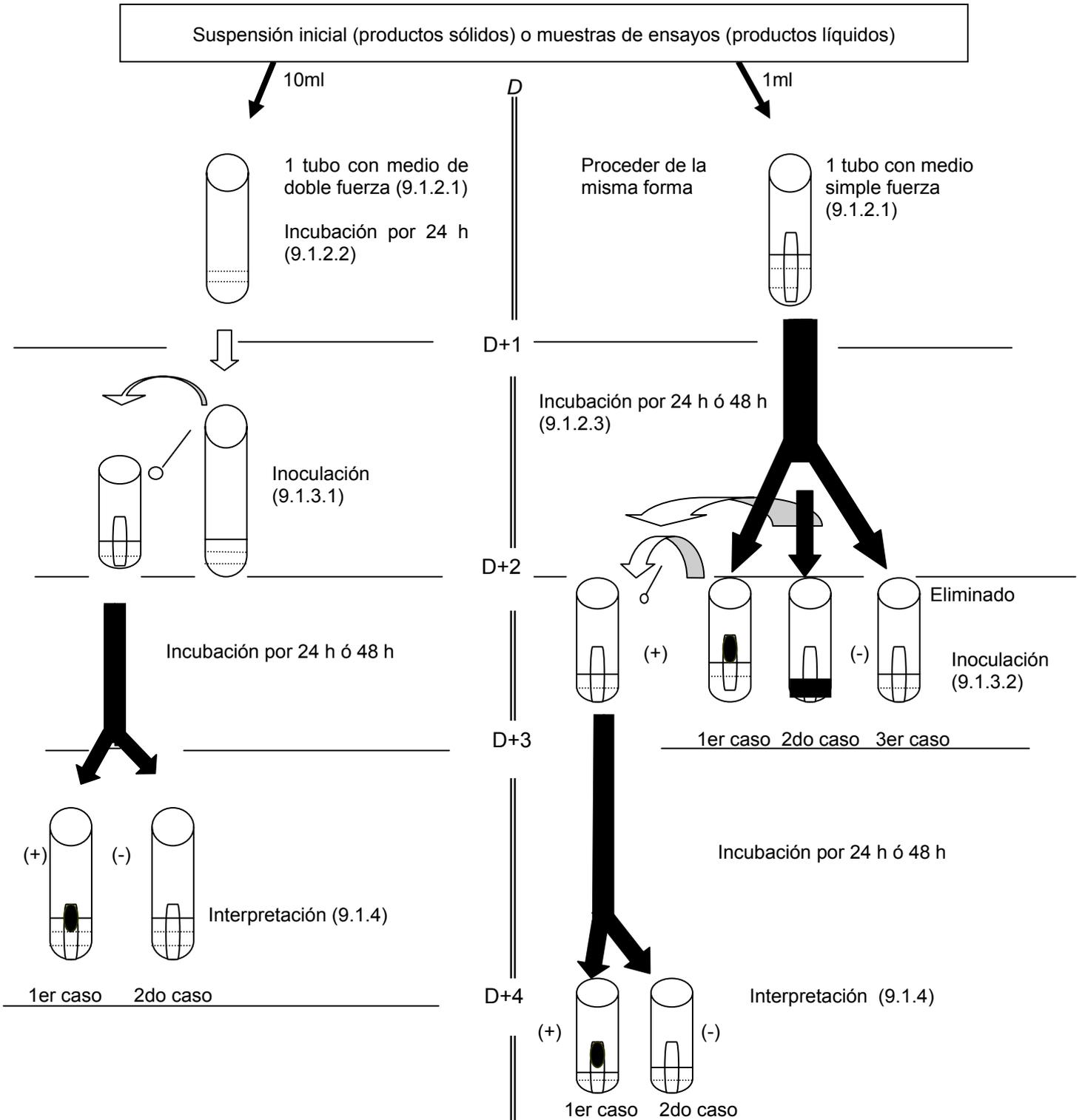
**12 Informe de ensayo**

El informe del ensayo deberá especificar:

- toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra;
- el método de muestreo usado, si se conoce;
- el método de ensayo usado, con referencia a esta Norma Cubana;
- el objetivo del ensayo y la temperatura de incubación usada;
- todos los detalles de la operación no especificados en esta Norma Cubana, o estimados como opcionales, junto con los detalles de cualquier incidente el cual pudiera tener influencia en el (los) resultado(s)
- el (los) resultado(s) del ensayo obtenidos.

**Anexo A**  
(Normativo)

**DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCEDIMIENTO**



**Figura A.1 Método de detección**

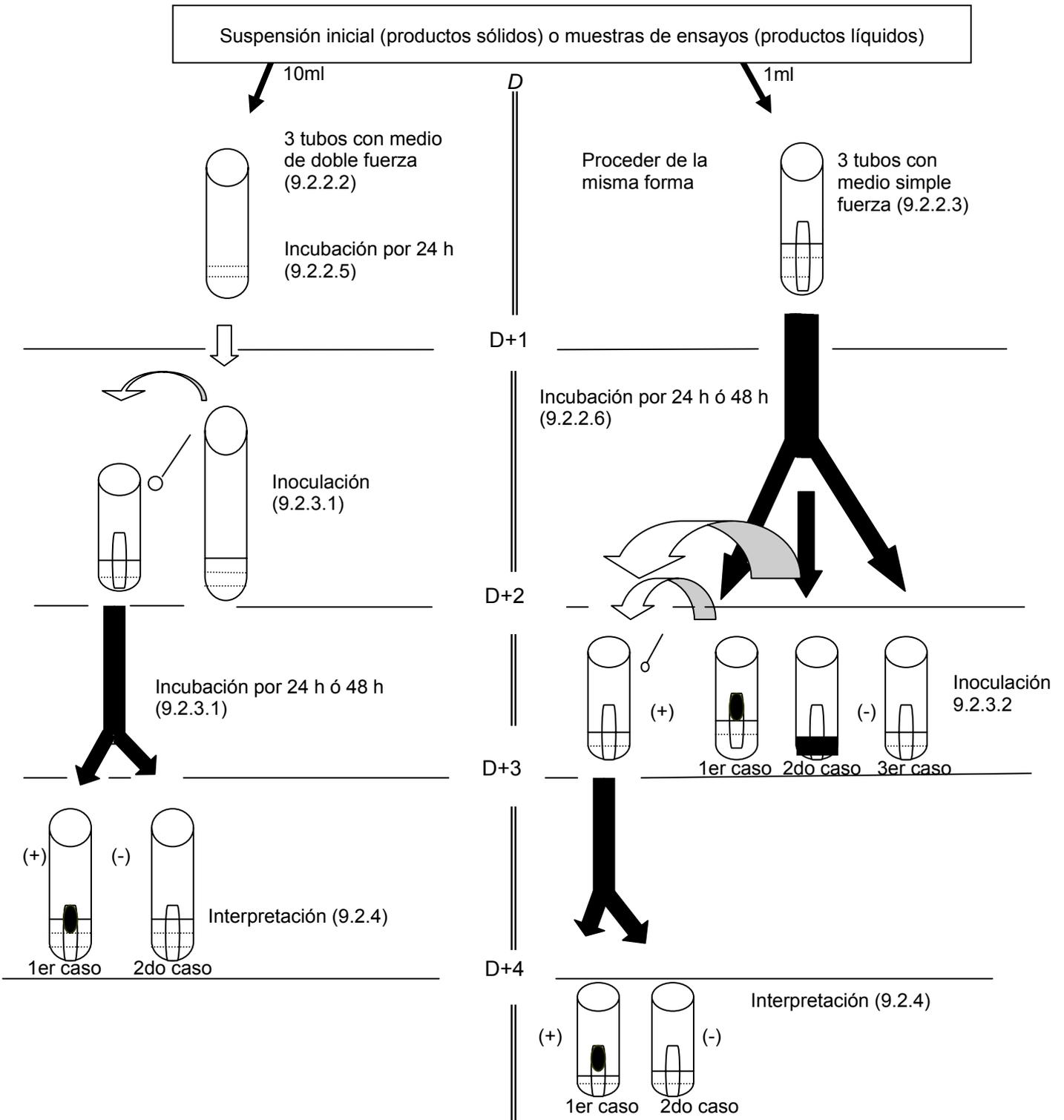


Figura A.2 Método de enumeración

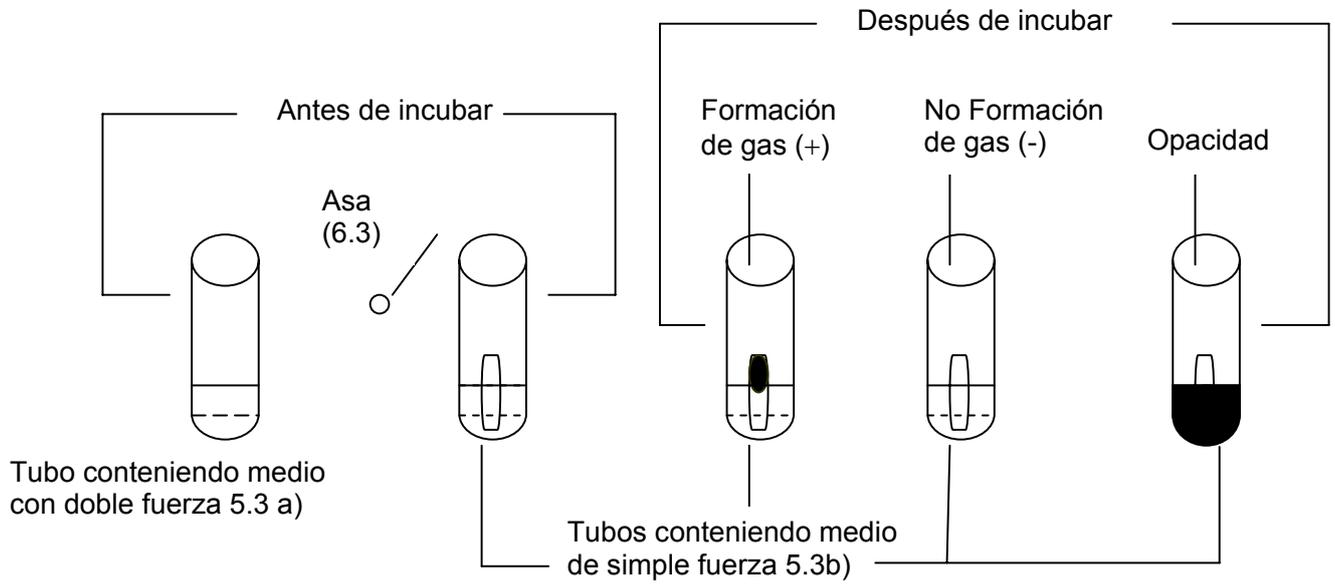


Figura A.3- Detalles de la etapa de confirmación

### Bibliografía

[1] ISO 4832, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique*

[2] EDWARD, P.R. and EWING, W.H., *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd edn., Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA, 1972.