
NORMA CUBANA

NC

(ISO 4832: 2010
Publicada por la ISO en 2006)

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y
ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN
DE COLIFORMES — TÉCNICA DE CONTEO DE COLONIAS
MÉTODO DE REFERENCIA
(ISO 4832:2006, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the
enumeration of coliforms — Colony-count technique
Reference method

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 4832:2010

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 (UNSA)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - 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 4832: 2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique. Reference method*

Esta segunda edición de la NC-ISO 4832 cancela y reemplaza a la NC-ISO 4832:2002 *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes- Técnica de placa invertida*. Los principales cambios realizados fueron los siguientes:

- se eliminó el procedimiento alternativo de incubar a 35 °C (ver 4.2);
- se introdujo una prueba de confirmación en caldo bilis verde brillante lactosa (ver 5.4 y 9.4).

Considerando 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 4832:2002 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 microfilmes, 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 productos. 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 más precisa que la descrita en la ISO 4831[1], pero no permite que el examen microbiológico se lleve a cabo en una porción de ensayo grande. Este método es preferido cuando están presentes grandes números de coliformes. 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. El método descrito en esta norma cubana, como promedio, detectará solamente cerca del 90% de 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 ENUMERACIÓN DE COLIFORMES — TÉCNICA DE CONTEO DE
COLONIAS
MÉTODO DE REFERENCIA**

1 Objeto

Esta Norma Cubana ofrece las guías generales para la 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,

Por medio de la técnica de conteo de colonias después de incubar en un medio sólido a 30 °C ó a 37 °C.

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

Esta técnica se recomienda cuando el número de colonias sospechosas, es esperado que sea superior a 100 por mililitro o por gramo de la muestra de ensayo.

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 11133-2:2003, 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 aplica el siguiente término:

3.1 Coliformes

Bacterias las cuales, a la temperatura especificada (esto es 30°C ó 37°C, según lo acordado) forman colonias características en Agar rojo violeta bilis lactosa, y las cuales en la prueba de confirmación fermentan la lactosa con producción de gas bajo las condiciones de ensayo especificadas en esta norma.

4 Principio

4.1 Preparación de dos placas vertidas, usando un medio de cultivo sólido, 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.

Preparación de otros pares de placas vertidas, bajo las mismas condiciones usando diluciones decimales de la muestra de ensayo o de la suspensión inicial.

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

4.3 Conteo de las colonias características y, de ser necesario, un número de colonias se confirman por la fermentación de la lactosa.

4.4 Cálculo del número de coliformes por mililitro o por gramo de muestra a partir del número de colonias características obtenido en las placas seleccionadas, (ver ISO 7218).

5 Medios 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 e ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la norma cubana específica del producto en examen.

5.3 Medio sólido selectivo: Agar rojo violeta bilis lactosa (ARVBL)

5.3.1 Composición

Digerido enzimático de tejido animal	7 g
Extracto de levadura	3 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · H ₂ O)	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Sales biliares	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Violeta cristal	0.002 g
Agar ^{a)}	12 g a 18 g
Agua	1000 ml

^a En dependencia de la fortaleza del gel del agar.

Preparación:

Proceda como sigue para conservar el poder selectivo y la especificidad del medio. Agite los componentes o el medio completo deshidratado en el agua y deje reposar unos minutos. Ajuste el pH tal que, después de la ebullición, sea a 7.4 ± 0.2 a 25°C . Caliente hasta ebullición, agitando de vez en vez.

Deje ebullicir por 2 min. Inmediatamente enfríe el medio en baño de agua (6.5) de 44°C a 47°C . Evite el sobrecalentamiento del medio, no caliente el medio para recalentarlo. Consecuentemente, no esterilice en autoclave y controle la esterilidad del medio en el momento del uso (ver 9.2.2). Utilice el medio dentro de las 4 horas después de su preparación.

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. La comprobación del rendimiento del agar rojo violeta bilis lactosa (ARVBL) se da en la ISO/TS 11133-2:2003, Tabla B.1.

5.4 Medio de confirmación: Caldo bilis verde brillante lactosa**5.4.1 Composición**

Digerido enzimático de caseína	10 g
Lactosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	10g
Bilis de buey deshidratada	20 g
Verde brillante	0.133 g
Agua	1000 ml

5.4.2 Preparación

Disuelva los componentes del medio completo deshidratado en el agua, si es necesario, caliente suavemente en un baño de agua (6.5). Si es necesario, ajuste el pH tal que, después de la esterilización, sea a 7.2 ± 0.2 a 25°C .

Dispense el medio, en cantidades de 10 ml, en tubos de ensayo (6.7) que contengan tubos Durham (6.8). Esterilice en autoclave (6.1) a 121°C por 15 min. Los tubos de Durham no contendrán burbujas de aire después de la esterilización.

6 Aparatos y utensilios

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 Incubadora, capaz de operar a temperatura de $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ó $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Placas de Petri, hechas de cristal o plásticas, de 90 mm a 100 mm de diámetro

6.4 Pipetas graduadas, con capacidades nominales de 1 ml

6.5 Baño de agua, o aparatos similares, capaces de operar de 44 °C a 47 °C ó a 100 °C

6.6 Contador de colonias, consistente en una base iluminada y un contador mecánico o digital electrónico.

6.7 Tubos de ensayo, de dimensiones de 16mm x 160mm.

6.8 Tubos Durham, de dimensiones apropiadas para el uso en los tubos de ensayo (6.7)

6.9 Botellas o frascos, para ebullición y almacenamiento de medios de cultivo

6.10 pHmetro, con precisión de $\pm 0,1$ unidades de pH a 25 °C

6.11 Asa, de platino-iridio o de níquel-cromo, de aproximadamente 3 mm de diámetro, o asa desechable

7 Muestreo

El muestreo se debe llevar a cabo de acuerdo con una norma nacional o internacional específica apropiada para el producto en cuestión. Si no existe una norma nacional o internacional específica, se recomienda que se llegue a un acuerdo entre las partes.

8 Preparación de la muestra de ensayo

Prepare la muestra de ensayo de acuerdo con la NC ISO 6887-1 ó con la ISO 6887 (parte relevante), ISO 8261 o la norma específica apropiada para el producto en cuestión. Si no existe una norma nacional o internacional 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

Prepare la porción de ensayo, la suspensión inicial (dilución primaria) y las diluciones sucesivas de acuerdo con la NC ISO 6887-1, la parte relevante de la ISO 6887 o la norma nacional o internacional específica para el producto que se va a analizar.

9.2 Inoculación e Incubación

9.2.1 Prepare dos placas para el producto líquido y/o para cada dilución seleccionada. Transfiera al centro de cada placa, con una pipeta estéril (6.4), 1 ml del producto líquido o de las diluciones apropiadas. Utilice otra pipeta estéril para inocular cada dilución dentro de las placas.

9.2.2 Vierta cerca de 15 ml de ARVBL (5.3), mantenido a una temperatura de 44 °C a 47 °C, en cada placa de Petri. 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 es vertido en las placas no excederá los 15 min.

Mezcle cuidadosamente con el inóculo y permita que la mezcla se solidifique, manteniendo la placa de Petri en una superficie horizontal fría

También prepare una placa control con 15 ml del medio para controlar la esterilidad del mismo.

9.2.3 Después que el medio solidifique completamente, vierta aproximadamente 4 ml del medio ARVBL (5.3), mantenido a una temperatura de 44 °C a 47 °C, en la superficie del medio inoculado. Deje solidificar como se describió anteriormente.

9.2.4 Invierta las placas e incube entonces en la incubadora (6.2) a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado), durante un período de 24 h \pm 2 h.

9.3 Enumeración

Después del período de incubación (ver 9.2.4), seleccione, si es posible, las placas de Petri con 10 ó más colonias y menos de 150 colonias. Cuente, usando un contador de colonias (6.6), las colonias de color rojo púrpura, con un diámetro de al menos 0.5 mm (rodeadas a veces por una zona rojiza de bilis precipitada). Estas son consideradas como colonias típicas de coliformes y no requieren confirmación posterior.

Vea los detalles del contador de colonias en la ISO 7218.

También cuente y confirme las colonias atípicas (ejemplo de talla pequeña), y todas las colonias derivadas de productos lácteos que contienen azúcares diferentes de la lactosa, inmediatamente después del periodo de incubación acorde a 9.4. La conversión de otros azúcares, diferentes a la lactosa, podría dar lugar a colonias con una apariencia similar a la de los coliformes típicos.

NOTA: La apariencia de una zona rojiza de bilis precipitada alrededor de las colonias depende del tipo de coliforme y de la calidad del medio.

9.4 Confirmación

Inocule cinco colonias de cada tipo atípico, si se encontraran, en tubos de caldo bilis verde brillante lactosa (5.4). Incube los tubos en la incubadora (6.2) a 30 °C ó 37 °C (según lo acordado) por 24 h \pm 2 h. Considere como colonias de coliformes las que muestran la formación de gas en el tubo Durham. Tome en cuenta los resultados para el cálculo (Cláusula 10).

10 Expresión de los resultados

Ver ISO 7218

11 Precisión

Dado la distribución de Poisson de los microorganismos en el sustrato, los límites de confianza de este método varían de acuerdo al conteo de colonias examinadas desde \pm 16 % hasta \pm 52 % (ver referencia [3]). En la práctica siempre pueden encontrarse variaciones mayores. En varios estudios colaborativos, la desviación estándar de la repetibilidad (S_r) fue de 0.20 unidades log, la desviación estándar de la reproducibilidad (S_R) fue de 0.35 unidades log (ver referencias [4] y [5]).

Más información sobre los límites de confianza se ofrece en la ISO 7218.

12 Informe de ensayo

El informe de ensayo especificará

- 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 la referencia de esta norma cubana;
- todos los detalles de las operaciones que no están especificadas en esta norma o que se ofrecen como opción, junto con los detalles de cualquier incidente el cual podría haber influido en los resultados;
- Los resultados obtenidos;
- Si la repetibilidad ha sido chequeada, acotar al final los resultados obtenidos.

Bibliografía

[1] ISO 4831, Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of coliforms — Most probable number technique

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

[3] COWELL and MORISETTI. J. Sci. Food Agric. 20, 1969, pp. 573

[4] PITON and GRAPPIN. J. Assoc. Anal. Chem. 74, 1991, pp. 92-103

[5] ALDRIDGE et al. Report of the Ministry of Agriculture, Fish and Food, Norwich, NR47UQ, 1993