

---

**NORMA CUBANA**

**NC**

1096: 2015

---

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES — CONTEO DE LAS COLONIAS OBTENIDAS A 44 °C- TÉCNICA DE PLACA VERTIDA**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of thermotolerants coliforms — Colony count technique to 44 °C. Pour plate technique

---

ICS: 07.100.30

1. Edición      Junio 2015  
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261, El Vedado, La Habana. Cuba.  
Teléfono: 7830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: [nc@ncnorma.cu](mailto:nc@ncnorma.cu); Sitio  
Web: [www.nc.cubaindustria.cu](http://www.nc.cubaindustria.cu)



Cuban National Bureau of Standards

**NC 1096: 2015**

## **Prefacio**

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Órgano 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-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)
- Se basa en el documento internacional: *NF V 08060/2009 Microbiologie des aliments. Dénombrement des coliformes termotolerantes par comptage des colonies obtenues à 44 °C.*
- Sustituye a la NC 38-02-14: 1989. Sistema de normas sanitarias de alimentos. Determinaciones cuantitativas de coliformes fecales. Métodos de ensayos microbiológicos.

**© NC, 2015**

**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, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.**

**Impreso en Cuba.**

## MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES — CONTEO DE LAS COLONIAS OBTENIDAS A 44 °C — TÉCNICA DE PLACA VERTIDA

### 1 Alcance

Este documento describe un método para la enumeración de coliformes termotolerantes en todos los productos destinados al consumo humano o la alimentación animal, por el conteo de las colonias en un medio sólido después de la incubación a 44 °C.

Es necesario señalar que el grupo de coliformes termotolerantes contiene una gran diversidad de especies de *Enterobacterias* que se encuentran en numerosos ecosistemas. Es por eso que su presencia en los alimentos no puede ser en ningún caso imputable únicamente a la contaminación fecal.

### 2 Referencias normativas

Los siguientes documentos de referencia son indispensables para la aplicación de esta Norma Cubana. Para las referencias fechadas, sólo es aplicable la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento de referencia 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.*

-NC-ISO 7218: 2013, *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Requerimientos generales y guía para exámenes microbiológicos.*

-ISO 8261, *Leche y productos lácteos - Orientaciones generales para la preparación de las muestras para pruebas, de la suspensión inicial y de las diluciones decimales para un examen microbiológico.*

-NC-ISO 11133-1: 2012, *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.*

-NC-ISO 11133-2: 2013, *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

Por necesidades del presente documento se aplican los términos y las definiciones siguientes:

**3.1****coliformes termotolerantes**

bacterias que a la temperatura especificada ( $44,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ) forman colonias características en Agar Lactosa, Violeta cristal, Rojo neutro y Bilis (VRBL) bajo las condiciones de ensayo especificadas

**3.2****enumeración de los coliformes termotolerantes**

número de coliformes termotolerantes encontrado por mililitro o por gramo de muestra cuando el ensayo se lleva a cabo de acuerdo con el método especificado

**4 Principio**

**4.1** Siembra a profundidad del medio lactosa bilis con cristal violeta y con rojo neutro vertiendo en una placa de Petri con una cantidad predeterminada de la muestra, si el producto que se va a examinar es líquido o con una cantidad determinada de la dilución inicial, en el caso de otros productos. Recubriendo con una capa del mismo medio.

En las mismas condiciones, se siembran las otras placas con las diluciones decimales obtenidas a partir de la muestra para ensayo o de la dilución inicial.

**4.2** Incubación de las placas Petri a  $44,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  durante 24 horas.

**4.3** A partir del número de colonias características enumeradas por placa de Petri, calcular el número de coliformes termotolerantes por mililitro o por gramo de muestra para el ensayo.

**5. Diluentes y medios de cultivo****5.1 Generalidades**

Ver NC-ISO 7218, NC-ISO 11133-1 y NC-ISO 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 Agar lactosa, violeta cristal, rojo neutro y bilis (VRBL)****5.3.1 Composición**

Digerido enzimático de tejido animal	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Sales biliares	1,5 g
Lactosa	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar bacteriológico	12 g a 18 g <sup>a)</sup>
Agua	1000 mL
<sup>a)</sup> Según el poder de gelificación del agar.	

### 5.3.2 Preparación

Disolver los componentes o el medio completo deshidratado en el agua, llevar a ebullición.

Si es necesario, ajustar el pH de manera que, después de la ebullición y el enfriamiento, sea de  $7,4 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Evitar un calentamiento prolongado o repetido. No esterilizar en autoclave.

Utilizar este medio rápidamente después de su preparación (que no exceda 4 h).

No esterilizar el medio.

Preparar el medio al momento de su uso.

### 5.3.3 Control del desempeño del medio

El medio VRBL es de tipo sólido. La productividad y la selectividad pueden ser probados según la norma NC ISO 11133-2 con las siguientes indicaciones:

#### a) Productividad

Incubación: 24 horas a  $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 o ATCC 8739<sup>1</sup> o las mismas cepas registradas en otras colecciones con un número diferente.

Medio de referencia: Agar triptona soja.

Método de control: cuantitativo.

Criterio: PR  $\geq 0,5$  (Reporte de Productividad - ver NC-ISO 11133-2).

Reacción característica: colonias de color rosa a rojas con o sin halo de precipitación.

#### b) Selectividad

Incubación: 24 horas a  $44,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cepa: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 19433 o las mismas cepas registradas en otras colecciones con un número diferente.

Método de control: cualitativo.

Criterio: inhibición total.

---

<sup>1</sup> Como mínimo, cepas a utilizar por el laboratorio.

### c) Especificidad

Incubación: 24 horas a  $44,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .

Cepa: *Pseudomonas aeruginosa* cepa ATCC 27853 o la misma cepa registrada en otras colecciones con un número diferente.

Método de control: cualitativo.

Colonias no inhibidas, de incoloras a beige.

### 6 Aparatos y cristalería

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

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

Ver NC-ISO 7218

**6.2 Incubadora**, capaz de operar a  $44,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .

**6.3 Placas de Petri**, estériles de vidrio o de material plástico, de un diámetro de 90 mm a 100 mm.

**6.4 Baño de agua** o equipo similar con termostato entre  $44\text{ °C}$  y  $47\text{ °C}$ .

**6.5 Frascos o erlenmeyers** de capacidad apropiada.

**6.6 Pipetas graduadas de descarga total** con capacidad nominal de 1 mL y 2 mL, graduada en 0,1 mL.

**6.7 Medidor de pH**, con precisión para  $\pm 0.1$  unidades de pH a  $25\text{ °C}$ .

### 7 Muestreo

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea realmente representativa y que no haya sido dañada o modificada durante la transportación y el almacenamiento. El muestreo no forma parte del método especificado en el presente documento.

Llevar a cabo el muestreo conforme con la norma del producto en cuestión. Si no existe una norma específica, se recomienda que las partes interesadas se pongan de acuerdo con respecto al tema.

### 8 Preparación de la muestra de ensayo

Preparar la muestra de ensayo de acuerdo con la norma específica para el producto en cuestión. Si no hay norma específica, se recomienda que las partes interesadas se pongan de acuerdo con respecto al tema.

## 9 Procedimiento

### 9.1 Toma de la muestra, de la suspensión inicial y de las diluciones

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

### 9.2 Siembra e Incubación

#### 9.2.1 Tomar dos placa de Petri estéril (6.3)

Con la ayuda de una pipeta estéril (6.6), transferir a cada placa 1 ml de la muestra de ensayo si el producto es líquido o 1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Tomar otras dos placas de Petri estériles. Con la ayuda de una nueva pipeta estéril, transferir a cada placa Petri, 1 ml de la primera dilución decimal de la muestra de ensayo si el producto es líquido o 1 ml de la primera dilución decimal de la suspensión inicial en el caso de otros productos.

Repetir este proceso con las diluciones siguientes, utilizando una nueva pipeta estéril para cada nueva dilución decimal.

**9.2.2** Verter en cada placa de Petri aproximadamente 15 ml del medio de Agar lactosa, violeta cristal, rojo neutro y bilis VRBL (5.3) mantenido en un baño de agua a una temperatura de 44 ° C - 47 ° C (6.4).

Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo y dejar solidificar la mezcla colocando las placas Petri sobre una superficie fresca y horizontal.

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

**9.2.3** Después de la solidificación de la mezcla, añadir una capa de aproximadamente 5 ml de medio de VRBL (5.3) como se describe anteriormente, para evitar la propagación de las colonias.

**9.2.4** Dejar solidificar la segunda capa. Voltar las placas preparadas (cubierta boca abajo) e incubarlas en una incubadora regulada a  $44,5\text{ °C} \pm 0,5$  (6.2) durante  $24 \pm 2$  h.

NOTA Es importante que las placas se incuben inmediatamente después de la solidificación.

### 9.3 Conteo de las colonias

Después del período de incubación especificado (ver 9.2.4), proceder al conteo de las colonias características de coliformes termotolerantes para cada placa Petri siempre que no excedan 150 colonias en total. Más allá de esta cifra las colonias de coliformes termotolerantes pueden tomar un aspecto no característico.

Después de 24 h de incubación, las colonias son de color púrpura, con un diámetro superior o igual a 0,5 mm, a veces rodeado por un área rojiza debido a la precipitación de la bilis.

## 10 Expresión de los resultados

### 10.1 Caso general

Retener las placas de que contienen menos de 150 colonias características y / o no características a nivel de dos diluciones sucesivas. Es necesario que una placa contenga al menos 10 colonias características.

Calcular el número  $N$  de coliformes termotolerantes por mililitro o por gramo de producto, como un promedio ponderado, usando la siguiente ecuación:

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

Donde:

- $\Sigma C$  es la suma de las colonias contadas en las dos placas retenidas de las dos diluciones sucesivas, al menos una de las cuales contiene 10 colonias;
- $n_1$  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 retenida  $\square d \square 1$  cuando es retenido el producto líquido no diluido (muestra de ensayo)  $\square$ .

Redondear los resultados calculados a dos cifras significativas.

Anotar como resultado la cantidad de coliformes termotolerantes por mililitro o por gramo de producto, expresada por un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por  $10^x$  veces, donde  $x$  es la potencia de 10 apropiada.

Ejemplo: Una enumeración de coliformes termotolerantes a 44 ° C en un producto líquido dio los siguientes resultados:

- En la primera dilución retenida  $10^{-2}$ : 83 y 75 colonias;
- En la segunda dilución retenida  $10^{-3}$ : 13 y 8 colonias.

$$N = \frac{83+75+13+8}{[2+(0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{179}{0,022} = 8136 = 8,1 \times 10^3$$

Redondeado a dos cifras significativas, ya sea 8100, ó  $8,1 \times 10^3$  coliformes termotolerantes por mililitro de producto.

### 10.2 Cálculo de pequeñas cantidades

**10.2.1** Si las dos placas retenidas al nivel de la muestra de ensayo (productos líquidos) o de la suspensión inicial (para otros productos) contienen menos de 10 colonias características, hacer la media  $m$  de las colonias contadas y expresar el resultado de la siguiente forma:



- Para los líquidos, número estimado ( $N_e$ ) de coliformes termotolerantes por mililitro:

$$N_e = m$$

- Para los otros productos, cantidad estimada ( $N_e$ ) de coliformes termotolerantes por gramo:

$$N_e = m / d$$

Donde:

a es la cantidad de colonias características contadas;

d es el factor de dilución de la suspensión inicial

**10.2.2** Si el total está entre 3 y 1, la fiabilidad de los resultados es tan baja que hay que expresar el resultado como sigue:

Los coliformes termotolerantes están presentes, pero con menos de ( $4 \times 1/d$ ) de coliformes termotolerantes por gramo o por mililitro.

**10.2.3** Si las dos placas a nivel de muestra de ensayo (producto líquido) o la suspensión inicial (otros productos) no contienen ninguna colonia característica, expresar el resultado de la siguiente forma:

- menos de 1 coliformes termotolerantes por mililitro (líquido);

- menos de  $1 \times 1/d$  coliformes termotolerantes por gramo (otro producto);

donde:

d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

### **10.3 Casos especiales**

Ver NC-ISO 7218.

### **11 Informe de ensayo**

El informe del ensayo debe indicar el método utilizado y los resultados obtenidos. Asimismo, mencionar todos los detalles operativos no previstos en este documento así como los incidentes eventuales susceptibles que pudieron haber influido en los resultados.

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

### Bibliografía

[1] NC 38-02-14: 1989. Sistema de Normas Sanitarias de Alimentos. Determinaciones cuantitativas de coliformes fecales. Métodos de ensayos microbiológicos.

[2] Norma Marroquí: NM 08.0.12: 2009. **Micribiologie des aliments. Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C.**

[3] NC-ISO 4832: 2009, *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)

[4] NC-ISO 4833: 2010, *Microbiología de Alimentos de consumo humano y animal – Método horizontal para la enumeración de microorganismos. Técnica de conteo de colonias a 30 °C.* (ISO 4833:2003, IDT).