



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-253-1977

CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS

METHOD FOR AEROBIC MESOPHYLIC BACTERIA COUNT

DIRECCION GENRAL DE NORMAS

“CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS”

“METHOD FOR AEROBIC MESOPHYLIC BACTERIA COUNT”

P R E F A C I O

En la elaboración de esta Norma participaron los siguientes organismos:

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION EN SALUD PUBLICA
DE LA SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA.

DIRECCION GENERAL DE CONTROL DE ALIMENTOS, BEBIDAS
Y MEDICAMENTOS DE LA SECRETARIA DE SALUBRIDAD Y
ASISTENCIA.

MICROBIOLOGIA ESPECIALIZADA.

CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES.

ASOCIACION DE TECNICOS EN ALIMENTOS DE MEXICO.

“CUENTA DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS”
“METHOD FOR AEROBIC MESOPHYLIC BACTERIA COUNT”

0 *INTRODUCCION*

Cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica más comúnmente utilizada es el recuento en placa. Esta técnica se aplica para una gran variedad de microorganismos y su fundamento consiste en contar las colonias que desarrollan en el medio de elección después de cierto tiempo y temperatura de incubación presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciales por sus distintas necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente. No obstante, la ejecución de la técnica cuando se siguen fielmente las condiciones que se señalan para su desarrollo puede llegar a proporcionar resultados lo bastante reproducibles para darle significado a la prueba.

1 **OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN.**

Esta Norma establece un método para estimar la cantidad de bacterias mesofílicas aeróbicas en un alimento.

2 **REFERENCIAS**

Para la correcta aplicación de esta norma, se deben consultar las siguientes Normas Mexicanas en vigor:

NMX-F-285	Muestreo y transporte de muestras de alimentos para su análisis y microbiológico.
NMX-F-286	Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos.

3 MATERIAL Y EQUIPO

- a) Horno para esterilizar.
- b) Autoclave con termómetro, o manómetro probado con termómetro de máximas.
- c) Baño maría con termostato y termómetro.
- d) Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato con vasos esterilizables.
- e) Vasos esterilizables para licuadora.
- f) Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- g) Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de $\pm 0.5^\circ$
- h) Utensilios estériles para la preparación de las muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas.
- i) Pipetas bacteriológicas estériles de 10 y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente.
- j) Frascos de dilución de vidrio para contener 99 ó 90 ml, ó tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca para contener 9 ml de solución reguladora diluyente, en ambos casos $\pm 1\%$ del volumen señalado después de la esterilización cerrados herméticamente.

4 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- a) Solución reguladora diluyente

Solución concentrada

KH₂ PO₄ 34 gramos

Agua destilada 500 mililitros

Disolver el fosfato en agua destilada y ajustar el pH a 7.2 con Hidróxido de Sodio IN. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar durante 20 minutos a 121°. Conservar en refrigeración. Tomar 1.25 ml de solución concentrada y llevar a un litro con agua destilada, ésta es la solución de trabajo. Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera. Esterilizar a 121° durante 20 minutos.

El pH final debe ser 7.2

- b) Agar – Triptona - Extracto de Levadura (agar cuenta estándar)

Extracto de levadura 2.5 gramos

Triptona 5 gramos

Dextrosa (d - glucosa) 1 gramos

Agar 15 gramos

Agua destilada 1,000 mililitros

Suspender 24 gramos del medio deshidratado en un litro de agua. Hervir hasta total disolución. Distribuir en volúmenes de 100 y 200 ml. Esterilizar a 1.1 kg/cm² (121°) durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser 7.0 ± 0.1.

El medio de cultivo anterior es el de uso más generalizado para algunos alimentos en particular y requerirá de un medio de cultivo especial que se debe indicar al describir la técnica para ese alimento.

5 PROCEDIMIENTO

5.1 Distribuir las cajas estériles en la mesa de trabajo de manera que su inoculación, la adición de los medios de cultivo y su rotación se pueda realizar cómoda y libremente. Marcar las cajas en sus tapas con los datos pertinentes previamente a su inoculación.

5.2 Para la preparación y dilución de la muestra seguir las indicaciones señaladas en la Norma Mexicana NMX-F-286 Preparación y dilución de muestras de alimentos para análisis microbiológicos.

5.3 Practicar las diluciones decimales que se estimen convenientes.

5.4 Transferir 1 ml ó 0.1 ml de la muestra y de cada una de las diluciones a cajas Petri estériles evitando todo tipo de contaminación durante la maniobra y aplicando la punta de la pipeta al fondo de la caja mientras escurre el líquido.

5.5 Agregar 12 a 15 ml. del medio de cultivo fundido y mantenido a una temperatura de 45° - 48° en un baño de agua. Mezclarlo con la muestra (6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a delante) sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr una completa incorporación del inoculó en el medio, cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar.

5.6 El tiempo transcurrido desde el momento que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos.

5.7 Incubar las cajas en posición invertida (la tapa hacia abajo) durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según el tipo de alimento de que se trate.

5.8 Seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 30 a 300 colonias, pues es en ellas donde será menor el error en el recuento.

5.9 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de hongos), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de pequeñas partículas de alimento.

6 INTERPRETACION DE RESULTADOS

6.1 Con el auxilio de la lente de aumento y de la cuadrícula del contador, contar todas las colonias de las placas seleccionadas. Si el número se estima mayor de 300, y no se dispone de placas preparadas con las diluciones subsecuentes, contar en la mitad o en un cuarto representativo de ella, multiplicando por 2 o por 4 el número obtenido. El fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador.

6.2 Multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por mililitro o gramo de la muestra.

6.3 Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, utilizar la placa cuyo recuento se aproxime más a esta cifra. Si la placa correspondiente a la primera dilución es la única que presenta colonias y éstas son menos de 10, informar el número de colonias seguidas de la frase "en la dilución 1:10".

6.4 Debe apreciarse una razonable proporcionalidad en el número de colonias que aparezcan en las placas de acuerdo con las diluciones utilizadas. En tanto no exista esta relación el personal del laboratorio debe adquirir la destreza necesaria hasta conseguirlo antes de efectuar estudios que sean válidos. Al iniciarse en el trabajo de laboratorio es recomendable inocular las cajas correspondientes de cada dilución por duplicado y computar las medias aritméticas.

6.5 Si todas las placas: 1) no muestran colonias, 2) muestran excesiva difusión de las mismas, 3) están contaminadas o no son satisfactorias por cualquier motivo, anotar respectivamente: 1) sin colonias, 2) colonias difusas, 3) incluyendo por accidente de laboratorio.

6.6 Redondear la cifra obtenida en el recuento de manera que sólo aparezcan 2 dígitos significativos al inicio de esa cifra: 128 se informa como 130; 2,417 como 2,400; 49 como 49, etc.

6.7 Informar : "Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias en placas de Agar Triptona Extracto de levadura incubadas X* horas a X*

* anotar las que correspondan a cada caso particular.

7 BIBLIOGRAFIA

Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico de alimentos, Dirección General de Investigación en Salud Pública, S.S.A. 1975.

8 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta Norma coincide totalmente con las recomendaciones hechas por el Comité Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos.

México, D.F., Marzo 3, 1977

EL DIRECTOR GENERAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'R' followed by a 'S' and a horizontal line extending to the right.

DR. ROMAN SERRA CASTAÑOS.

Fecha de aprobación y publicación: Marzo 8, 1977