



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-308-1992

**ALIMENTOS - CUENTA DE ORGANISMOS COLIFORMES
FECALES**

FOODS - FECALS COLIFORM ORGANISMS COUNT

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

PREFACIO

En la elaboración de esta Norma participaron las siguientes Dependencias, Instituciones y Organismos:

- SECRETARIA DE SALUD
Laboratorio Nacional de Salud Pública.
- SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL
Laboratorios Nacionales de Fomento Industrial.
- SECRETARIA DE HACIENDA Y CREDITO PUBLICO
Laboratorio Central de la Dirección General de Aduanas.
- INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Química.
- LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO S.A.
- INSTITUTO NACIONAL DEL CONSUMIDOR.
- CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE
TRANSFORMACION.
- CAMARA DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS CON
LECHE.
- SIGMA ALIMENTOS S.A DE C.V.

ALIMENTOS - CUENTA DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES

FOODS - FECALS COLIFORM ORGANISMS COUNT

0 INTRODUCCION

Los coliformes fecales son un grupo de microorganismos en que *Escherichia coli* organismo de origen fecal, representa una elevada proporción. Su identificación se basa en la fermentación de la lactosa con formación de gas en medios selectivos incubados a una temperatura estrictamente controlada.

Su empleo como indicador de contaminación fecal tiene muchas limitaciones, ya que su presencia no puede interpretarse de la misma manera en todos los alimentos. Su cuantificación está supeditada a diversas condiciones, entre las que destacan su reproducción o destrucción en los diferentes tipos de alimentos. En todos los casos, su hallazgo indica un cierto grado de riesgo, pero no existe correlación absoluta entre presencia y la de microorganismos patógenos entéricos.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Mexicana establece el procedimiento para obtener la cuenta de los organismos fecales en aguas, moluscos, verduras y otros alimentos de origen vegetal.

2 REFERENCIAS

Esta norma se completa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

NMX-F-187 Determinación del número más probable de gérmenes.

NMX-F-285 Muestreo y Transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NMX-F-286 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NMX-F-253 Cuenta de bacterias Mesofílicas Aeróbicas.

3 REACTIVOS Y MATERIALES

3.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan, deben ser grado analítico. Cuando se indique agua, debe entenderse agua destilada.

- Agua peptonada
- Solución Reguladora Diluyente
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa
- Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante
- Caldo EC
- Reactivo de Kovac.

3.1.1 Preparación de reactivos

3.1.1.1 Agua peptonada

FORMULA

Peptonada	10 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agua	1 l

- Disolver los componentes en un litro de agua, ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 .
- Distribuir en volúmenes de 3 - 5ml en tubos de 13 x 100mm.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

3.1.1.2 Solución reguladora de fosfatos (ver NMX-F-286)

3.1.1.3 Caldo Lauril Sulfato triptosa

FORMULA

Triptosa	20.00 g
Lactosa	5.00 g
Fosfato dibásico de potasio	(K ₂ HPO ₄) 2.75 g
Fosfato ácido de potasio	(KH ₂ PO ₄) 2.75 g
Cloruro de sodio	5.00 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Agua	1.0 l

- Disolver los ingredientes antes mencionados en un litro de agua.
- Hervir y distribuir volúmenes de 10ml en tubos de 16 x 150mm con campana de fermentación.
- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos el pH final del medio debe ser de 6.8 ± 0.1.

3.1.1.4 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB)

FORMULA

Peptona	10.0 g
Lactosa	10.0 g
Ox-gall (sales biliares)	20.0 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua	1.0 l

Disolver los componentes en un litro de agua y hervir.

Ajustar el pH de 7.1 a 7.4 con ácido clorhídrico 0.1 N o hidróxido de sodio 0.1 N.

Distribuirlo en volúmenes de 3-5ml en tubos de 13 x 100mm con campana de fermentación.

Esterilizar a 121°C por 15 minutos. El tiempo total de calentamiento no debe exceder de 30 minutos, lo que puede lograrse con el precalentamiento del autoclave.

3.1.1.5 Caldo EC

FORMULA

Triptosa o tripticasa	20.0 g
Lactosa	5.0 g
Sales biliares	1.5 g
Fosfato dibásico de potasio	(KH ₂ PO ₄) 4.0 g
Fosfato ácido de potasio	(KH ₂ PO ₄) 1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g

Agua

1.0 l

Disolver los ingredientes en un litro de agua y distribuir volúmenes de 3-5ml de tubos de 13 x 100mm con campana de fermentación.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. El pH final debe ser 6.9 después de esterilizarse.

3.1.1.6 Reactivos de Kovac

FORMULA

p-dimetil-benzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 ml

Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehído en el alcohol amílico. Agregar lentamente el ácido clorhídrico. Conservar en frasco ámbar.

3.2 MATERIALES

Todo el material que tenga contacto con las muestras o los microorganismos debe estar estéril.

Se requiere el material mencionado en la NMX-F-187, NMX-F-253, NMX-F-285 y en la NMX-F-286.

4 APARATOS E INSTRUMENTOS

Se requieren los mencionados en la NMX-F-187, NMX-F-253, NMX-F-285 y NMX-F-286.

5 PREPARACION DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra debe efectuarse siguiendo la NMX-F-286, Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Prueba Presuntiva

Inocular 1ml de cada dilución a cada uno de los 3 tubos con 10ml de caldo Lauril sulfato triptosa.

Incubar los tubos durante 48 ± 2 horas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Examinar los tubos a las 24 ± 2 horas y observar si hay acumulación de gas en la campaña de fermentación.

Reincubar 24 horas más. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 horas positiva la prueba.

6.2 Prueba confirmatoria

Agitar suavemente los tubos de caldo Lauril sulfato triptosa que resultaron positivos. Transferir de 2 - 3 asadas de cada tubo de caldo EC

Incubar los tubos de $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar si hay producción de gas a las 24 y 48 horas.

La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de 48 horas hace positiva la prueba.

Alternativamente transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo en la prueba presuntiva, a tubos con caldo lactosa bilis verde brillante y agua peptonada.

Incubar los tubos a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar si hay producción de gas a las 24 y 48 horas.

Adicionar al tubo de agua peptonada de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovac (prueba de Indol)

TABLA No. 1
 NUMERO DE PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos Inoculados 3 con 1 ml dilución 1:10 = 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 = 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1000 = 0.001 g muestra

TUBOS POSITIVOS NME/G			TUBOS POSITIVOS NME/G			TUBOS POSITIVOS NME/G			TUBOS POSITIVOS NME/G		
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)	(0.1)	(0.01)	(0.001)
0	0	0-3.0	1	0	0-3.6	2	0	0-9.1	3	0	0-23.0
0	0	1-3.0	1	0	1-7.2	2	0	1-14.0	3	0	1-39.0
0	0	2-6.0	1	0	2-11.0	2	0	2-20.0	3	0	2-64.0
0	0	3-9.0	1	0	3-15.0	2	0	3-26.0	3	0	3-95.0
0	1	0-3.0	1	1	0-7.3	2	1	0-15.0	3	1	0-43.0
0	1	1-6.1	1	1	1-11.0	2	1	1-20.0	3	1	1-75.0
0	1	2-9.2	1	1	2-15.0	2	1	2-26.0	3	1	2-120.0
0	1	3-12.0	1	1	3-19.0	2	1	3-34.0	3	1	3-120.0
0	2	0-6.2	1	2	0-11.0	2	2	0-21.0	3	2	0-93.0
0	2	1-9.3	1	2	1-15.0	2	2	1-22.0	3	2	1-150.0
0	2	2-12.0	1	2	2-20.0	2	2	2-35.0	3	2	2-210.0
0	2	3-16.0	1	2	3-24.0	2	2	3-42.0	3	2	3-290.0
0	3	0-9.4	1	3	0-16.0	2	3	0-29.0	3	3	0-240.0
0	3	1-13.0	1	3	1-20.0	2	3	1-35.0	3	3	1-460.0
0	3	2-16.0	1	3	2-24.0	2	3	2-44.0	3	3	2-1,100
0	3	3-19.0	1	3	3-29.0	2	3	3-53.0	3	3	3-2,400

Fuente F.D.A. Bacteriological Manual 5th Ed. 1978.

Una coloración roja hace positiva la prueba

7 CALCULOS Y EXPRESION DE RESULTADOS

7.1 Caldo EC

Determinar el número de organismos de acuerdo con la tabla correspondiente, tomando como base el número de tubos en que se observe producción de gas (Tabla 1).

Informar número más probable (NMP) de coliformes fecales por gramo o mililitro de muestra.

7.2 Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante y Agua Peptonada

Se considera positiva la prueba alternativa, determinando el número de organismos de acuerdo con tabla correspondiente, tomando como base el número de tubos positivos en ambas pruebas (tabla No. 1) cuando se observe producción de indol en agua peptonada y de gas en caldo lactosa verde brillante.

Informar número más probable (NMP) de coliformes fecales por gramo o milímetro de muestra.

8 BIBLIOGRAFIA

NMX-Z-013 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas.

Laboratorio Nacional de Salud Pública. Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológicos de Derivados Lácteos. Dirección de Epidemiología, S.S.A. México, D.F., 1987.

Food and Drugs Administration. Bacteriological Analytical Manual. FDA of Foods. Division of Microbiology. Washington, D.C. 1978.

American Public Health Association. Standar Methods of the examination of water and waste, 13th Ed. APHA, 1971.

9 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., Mayo 4, 1992
EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS.



LIC. AGUSTIN PORTAL ARIOSAS.