



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-403-S-1981

**“ALIMENTOS PARA HUMANOS - MICROBIOLÓGICOS -
CUENTA DE BACILLUS MESENTERICUS O BACILLUS
SUBTILIS (ESPORAS FORMADORAS DE HEBRA)”**

*“FOOD FOR HUMANS - MICROBIOLOGICAL - COUNT OF BACILLUS
MESENTERICUS OR BACILLUS SUBTILIS (SPORE THREAD
FORMERS)”*

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

PREFACIO

En la elaboración de esta norma, participaron los siguientes Organismos:

- SUBSECRETARIA DE SALUBRIDAD. DIRECCION GENERAL DE LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA.
- PANIFICACION BIMBO, S. A.
- LANCE, S. A.

ALIMENTOS PARA HUMANOS MICROBIOLÓGICOS CUENTA DE BACILLUS
MESENTERICUS O BACILLUS SUBTILIS (ESPORAS FORMADORAS DE
HIERBA)

FOOD FOR HUMANS MICROBIOLOGICAL COUNT OF BACILLUS
MESENTERICUS OR BACILLUS SUBTILIS
(SPORE THREAD FORMERS)

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma establece un método de prueba para estimar la cantidad de *Bacillus mesentericus* o *Bacillus subtilis* (esporas formadoras de hebra) en un alimento.

2 REFERENCIAS

Esta norma se complementa con las siguientes Normas Mexicanas vigentes:

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

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

3 REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico, cuando se indique agua se debe entender que es destilada.

3.1 Medio Eugonagar

Tripticasa	15.0 g
Ritona	5.0 g
Cloruro de sodio	4.0 g
Sulfato de sodio	0.2 g
L - cistina	0.7 g
Dextrosa	5.5 g
Agar	15.0 g

Suspender los ingredientes antes mencionados en un litro de agua, mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7.0. Calentar con agitación ocasional y hervir durante 10 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 391 K (118 °C). Enfriar a 315 - 318 K (42 - 45 °C) antes de vaciar las cajas Petri estériles.

3.2 Dilución de los blancos con arena

Usar frascos de dilución de material de vidrio resistente de 170 g medir exactamente el agua en las botellas de manera que cada una contenga 99 cm³ después de la esterilización. A cada botella agregar 10 g de arena de mar purificada y esterilizarlas en autoclave durante 20 minutos a 394 K (121 °C) (103.41 kPa de presión de vapor).

4 APARATOS Y EQUIPO

4.1 Utensilios estériles para la preparación de las muestras: Cuchillos, Pinzas, Tijeras, Cucharas, Espátulas.

4.2 Contador de colonias

4.3 Incubadora con reóstato de 305 K (32 °C) que evite variaciones mayores de ± 0.5 K (0.5 °C).

4.4 Autoclave con termómetro o manómetro probado con termómetro de máximas.

4.5 Balanza analítica con una precisión de 0.001 g.

4.6 Frascos de vidrio para dilución con capacidad de 99 cm³ cerrados con tapón de rosca o con tapones de caucho.

4.7 Pipetas bacteriológicas estériles de 10 cm³ y 1 cm³ graduadas en 0.1 y 0.01 cm³ respectivamente.

4.8 Gradillas adecuadas al tamaño de los tubos.

4.9 Cajas Petri de 100 x 15 mm.

4.10 Baño María.

5 PROCEDIMIENTO

5.1 Tomar la muestra de acuerdo como se indica en la norma NMX-F-286 (véase 2).

5.2 Pesar 11 g de muestra sobre un papel estéril y transferirlos a un frasco de dilución que contenga 99 cm³ de la solución diluyente. Agitar hasta lograr una perfecta dispersión de la muestra. Preparar diluciones decimales a partir de la dilución 1:10, para obtener la correcta distribución de los microorganismos. Preparar diluciones de la muestra de modo que haya menos de 300 colonias por caja de Petri.

5.3 De cada dilución de 1:100 o mayor, pipetear, 10 cm³ en los tubos estériles de prueba y colocarlos en un baño de agua en ebullición. Calentar durante 10 minutos, después agitar los tubos perfectamente en el baño durante 5 minutos. Al terminar el período de calentamiento, quitar los tubos y enfriarlos.

5.4 Preparar cajas Petri por duplicado de la dilución que se calentó, pipetear 1 cm³ o 0.1 cm en las cajas. Introducir asépticamente 15 cm³ de medio Eugonagar fundido a 316 - 318 K (43 - 45 ° C) en cada caja. Mezclar perfectamente el agar con las muestras mediante movimientos rotatorios sin proyectar la mezcla. Dejar solidificar el agar e invertir las cajas. Evitar la excesiva acumulación de la humedad en las tapas de la caja. Incubar durante 48 horas a 305 K (32 °C).

5.5 Para muestras que contengan menos de 200 esporas formadoras de hebra por gramo, es necesario poner 100 cm³ de Eugonagar en un matraz de 500 cm³, esterilizar durante 15 minutos a 391 K (118 ° C). Enfriar el medio a 318 - 323 K (45- 50 ° C), pesar 11 g de muestra perfectamente mezclada en un papel estéril y transferirlo al matraz que contiene los 100 cm³ de Eugonagar fundido. Mezclar el medio con la muestra y colocarlos en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos agitando a intervalos de 3 a 4 minutos. Después del período de calentamiento enfriar a 315 - 318 K (42 - 45 °C) y colocar el medio fundido y la muestra en 5 cajas. Petri estériles. Dividir el medio equitativamente entre las 5 cajas. Permitir que solidifique el agar e invertir las cajas, incubarlos durante 48 horas a 305 K (32 °C).

6 INTERPRETACION DE RESULTADOS

Las colonias características son aquellas que tienen un color blanco grisáceo, aspecto de ámpula húmeda que al secarse tiene un aspecto final arrugado. Al introducir una aguja de inoculación en las colonias se debe observar una consistencia filamentosa al quitar la aguja. Contar las colonias características y reportar el número de esporas por gramo de producto. Para la muestra que se le agregó 100 cm³ de medio y a continuación se vertió a las 5 cajas Petri dividir el resultado entre 0.10 para obtener la cuenta por gramo.

7 BIBLIOGRAFIA

NMX-R-050-1977 Guía para la redacción, estructuración y presentación de las Normas Mexicanas.

-AACC Methods 42-20 págs. 1-2 First approval 5-5-60.

México, D.F., a 19 junio 1981

EL DIRECTOR GENERAL DE
LABORATORIOS DE SALUD
PUBLICA DE LA SUBSECRETARIA
DE SALUBRIDAD.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned centrally below the text of the Director General of Laboratories of Public Health.

Q.F. ERNESTO FAVELA ALVAREZ.

EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS.

A handwritten signature in black ink, featuring a large, sweeping 'S' shape with a vertical stroke intersecting it, positioned centrally below the text of the Director General of Norms.

DR. ROMAN SERRA CASTAÑOS.

Fecha de aprobación y publicación: Julio 16, 1981