



SECRETARIA DE COMERCIO

Y

FOMENTO INDUSTRIAL

NORMA MEXICANA

NMX-F-248-1975

**DETERMINACION DE MICROORGANISMOS EN ESPECIAS Y
CONDIMENTOS DE CANELA EN POLVO**

DETERMINATION OF MICROORGANISMS IN SPICES AND

DIRECCION GENERAL DE NORMAS

DETERMINACION DE MICROORGANISMOS EN ESPECIAS Y CONDIMENTOS DE
CANELA EN POLVO

DETERMINATION OF MICROORGANISMS IN SPICES AND

1 ALCANCE

La presente Norma establece el procedimiento para la determinación de microorganismos en especias y condimentos.

2 DEFINICIONES

Para efectos de esta Norma se entiende por microorganismos: hongos, levaduras, esporas y bacterias, tales como Staphylococcus, grupo coliforme, Salmonella, etc.

3 FUNDAMENTO

Este método se basa en la dilución de la muestra hasta que se considere necesario para la siembra y para permitir la cuenta de microorganismos.

4 APARATOS Y EQUIPO

Autoclave con termómetro.

Estufa de temperatura regulada con variación de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 g

Horno para esterilizar a 180°C .

Baño María con termostato y termómetro

Microscopio

Contador de colonias Quebec ó equivalente

Contador manual (Tally)

Cajas de petri de 100 x 15 mm

Pipetas graduadas

Frascos de vidrio de boca angosta para dilución

Material común de laboratorio

Incubadora con Termostato.

5. MATERIALES Y REACTIVOS

Solución diluyente

Agar Triptona Extracto fundido

Drange Serum Agar

Agar Papa Glucosa

Caldo Soya Triptica

Acido Tartárico

Agar Dextrosa Triptona

Agar Púrpura Bromocresol

Agar Vogel - Johnson

Plasma de mamífero (conejo)

Caldo Lactosado

Medio fluido de Selenito - Cistina

Medio fluido de Tetracionato

Medio de Agar Verde Brillante

Medio de Agar-Xilosa- Lisina - Desoxicolato

Medio de Agar- Sulfito Bismuto

Medio de Agar - Azúcar triple de Fierro

Medio Agar SPS

Medio fluido de Lactosa Agar

Solución de Cloruro de Sodio

Medio fluido digerido de Caseina Soya

6 PREPARACION DE LA MUESTRA

Se pesan de 1 a 10 g de la especia (dependiendo de la contaminación que se espera encontrar). Se transfiere a un frasco de dilución, se completa a 100 ml con solución isotónica de Cloruro de sodio (1:100 1:10 respectivamente). Se agita durante 5 minutos, se preparan diluciones decimales si se cree conveniente, se agita durante un minuto, se dejan asentar las partículas gruesas antes de medir la cantidad para la siguiente dilución o para sembrar en las cajas Petri.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 CUENTA TOTAL

Se transfiere 1 ml de la muestra o diluciones según se estima necesario a cajas Petri estériles. Se agregan de 12 a 20 ml del medio de cultivo Triptona Agar extracto fundido y se mantiene a temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un baño de agua. Se mezcla la muestra cuidando de que el medio no moje la cubierta de las cajas. Se deja solidificar y se incuban las cajas en posición invertida durante 48 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Contar el número de colonias que aparezcan en las placas y seleccionar para el reporte aquellas donde aparezcan entre 30 a 300 colonias ya que en ellas es menor el error en el recuento. Y éste se hace con un contador tipo Quebec.

Hacer uso del microscopio para casos en los que no se puedan distinguir las colonias.

7.2 CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS

Se procede como se indicó anteriormente, (en el inciso 7.1.) Substituyendo el medio por Agar - Papa - Glucosa acidificado a un pH de 3.5 con ácido Tartárico. Se incuban dos cajas a 22°C por 5 días, se cuentan las colonias de hongos y levaduras que aparezcan en las placas.

7.3 CUENTA DE STAPHYLOCOCCUS

A la muestra (inciso 6) se le agrega suficiente medio fluido digerido de Caseína Soya hasta completar 100 ml. Se siembra 1 ml de cada una de las diluciones hechas en el inciso 6 sobre 10 ml de caldo Soya Triptica (adicionada del 10% de Na Cl), se mezcla y se incuba a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas.

Se examina y si hay desarrollo, se transfiere una porción por medio de un asa de platino, a la superficie de las cajas Petri que contienen medio de Agar - Vogel- Johnson. Las cajas se tapan, se invierten y se incuban a 35°C durante 24-48 horas. Se examinan incluyendo la tinción de laminas por el método Gram. Ninguna de las placas debe contener colonias con las características señaladas en la Tabla I.

TABLA I

MICROORGANISMO	STAPHYLOCOCCUS
Medio seleccionado	Medio de Agar Vogel- Johnson.
Características Morfológicas de la Colonia.	Colonia negra rodeada de zona amarilla
Tinción Gram	Cocos positivos (en racimos)

Prueba de coagulasa para Staphylococcus.

Con la ayuda de un asa de platino para inoculaciones, se pasan varias colonias sospechosas del medio de Agar-Vogel-Johnson a tubos individuales que contienen 0.5 ml de plasma de mamífero (conejo), cada uno mantenido a 37°C en baño maría, se incuban examinándolas cada 3 horas y después a intervalos mayores, hasta las 24 horas. Registrar la dilución máxima en la que la prueba de coagulasa fué positiva.

7.4 PRESENCIA DE ESCHERICHIA COLI

Se inocula 1 ml de la dilución 1:10 en 3 tubos de fermentación con caldo lactosado, se incuba a 45.5°C ± 1°C de 24 a 48 horas.

Escherichia Coli positivo cuando hay formación de gas.

7.5 PRESENCIA DE SALMONELLA

Procedimiento previo de enriquecimiento de la muestra

Se toma una muestra de 50 g, se le agregan 500 ml de caldo lactosado y se incuba a 35°C durante 24 horas. Se examina y si hay desarrollo se mezcla agitando suavemente, se toman porciones de 1 ml y se pasan a recipientes que contienen respectivamente 10 ml del medio fluído de Selenito-Cistina y 10 ml del medio fluído de Tetrionato, se mezclan y se incuban a 35°C durante 24 horas. Empleando un asa de platino para inoculación se toman porciones de los dos medios Selenito-Cistina y del medio de Tetrionato y se pasan a la superficie de 3 cajas de Petri que contienen separadamente, medio de Agar Verde Brillante, Medio de Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato y Medio de Agar- Sulfito- Bismuto. Las cajas

se tapan, se invierten y se incuban a 35°C durante 24 horas. Si al examinarlas ninguna de las colonias encontradas corresponde a la descripción dada en la Tabla I, se prolonga la incubación por 24 horas más. La ausencia de colonias, con las características referidas en la Tabla II, indica que el producto no tiene Salmonella.

TABLA II

Características Morfológicas de las especies Salmonella en el medio de Agar seleccionado

Medio seleccionado	Descripción de la colonia
Medio de agar verde Brillante	Pequeña, transparente, incolora o de color rosa a blanco opaco, (frecuentemente rodeada de una zona de color rosa a roja).
Medio de Agar Xilosa lisina - Desoxicolato.	Roja con o sin centros negros .
Medio de Agar Sulfito Bismuto	Negra o Verde

Si al examinar las colonias corresponden a la descripción dada en la Tabla II se procede a su identificación, tomando individualmente dos o tres colonias sospechosas, por medio de una asa de platino para inoculación y pasándolas a un tubo inclinado con "Medio de Agar-Azúcar triple de hierro. La siembra se hace por estrías en la superficie y por picadura hasta el fondo del Agar. Se incuba a 35 °C durante 24 horas. Se considera cultivo sospechoso cuando presenta las estrías rojas, fondo amarillo con o sin coloración negra (producción de gas H₂S).

7.6 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (WELCHII)

De las diluciones el inciso 6, transferir 1 ml de cada uno a cajas Petri estériles con medio de Agar SPS, se incuban anaerobicamente a 35°C ± 2° C durante 24 horas. Se cuentan las colonias negras, se confirma la presencia de bacilos anaerobios esporulados gran positivos, inmóviles y reductores de nitratos.

7.7 PRESENCIA DE ESPORAS

Unas vez ejecutadas las diluciones de las siembras arriba indicadas (incisos 7.1, 7.2, 7.3, y 7.4,), se hierve la suspensión inicial (inciso 6) durante 5 minutos.

Se restaura la cantidad de agua que se haya perdido por evaporación. Se preparan dos series de tres cajas de Petri. Se distribuyen 10 ml de la suspensión hervida en las tres cajas Petri. Se agrega medio de agar dextrosa triptona o agar púrpura bromocresol, si se desea diferenciar las bacterias productoras de ácido se incuba a 32°C por 72 horas una de las series en condiciones de anaerobiosis y la otra en aerobiosis.

8 CALCULO O INTERPRETACION DE RESULTADOS

8.1 CUENTA TOTAL

Se multiplica por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias por mililitro o gramo de la muestra.

8.2 CUENTA DE HONGOS

Se cuentan las colonias de hongos que aparezcan en las placas. Multiplicar por la inversa de la dilución.

8.3 STAPHYLOCOCCUS

Se reporta 1 número de Staphylococcus Aureus por g, como la inversa de la máxima dilución donde la prueba de coagulasa haya sido positiva.

8.4 ESCHERICHIA COLI Y SALMONELLA

Se reporta presencia o ausencia de Escherichia Coli y Salmonella.

8.5 CUENTA DE ESPORAS

Se cuenta el número de esporas de gérmenes aerobios y anaerobios por gramo en cada de las series.

8.6 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Se reporta el número de Clostridium Perfringens considerando la proporción de colonias negras que resultaron positivas.

9 APENDICE

9.1 OBSERVACIONES

La Triptona Glucosa Agar no da muy buenos resultados en la determinación en ajo y cebolla deshidratada por lo que se recomienda utilizar Orange Serum ya que da un resultado óptimo en la cuenta total.

9.2 NORMAS A CONSULTAR

NMX-F-088-1964 Norma Mexicana. “Determinación de Microorganismos”.

9.3 BIBLIOGRAFIA

Tesis Profesional del Químico Victor M. Navarro. Estudios sobre Ajo Deshidratado. Facultad Ciencias Químicas. México 1961.

Método de Análisis microbiológico proporcionados por el Laboratorio Nacional de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 4a. Edición Secretaría de Salubridad y Asistencia. México 1974.

Normas de la ADOGA (American Dehydrated Onion and Gerlic Association) 1959.

Análisis Microbiológico de los Alimentos. Editorial Acribia F.S. THATCHER D.S CLARK.

9.4 PARTICIPANTES

Dirección General de Alimentos, Bebidas y Medicamentos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Laboratorio Central de la Secretaría de Hacienda y Crédito Público.

Florasynth de México, S. A.

Herdez, S.A.

Química Interamericana.

International Flavors & Fragancies.

Naarden de México.

Givaundan, S.A.

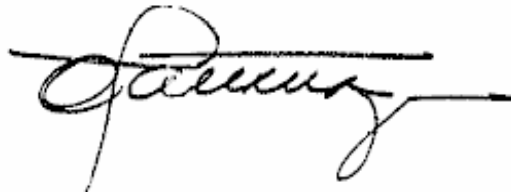
Felton Química de México, S.A.

Alimentos Interamericanos.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

Dirección de Salud Pública de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

EL C. DIRECTOR GENERAL DE NORMAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cesar Larranaga Elizondo', written over a horizontal line.

ING. CESAR LARRAÑAGA ELIZONDO.

Fecha de aprobación y publicación: Febrero 2, 1976