



**SECRETARIA DE COMERCIO**

**Y**

**FOMENTO INDUSTRIAL**

**NORMA MEXICANA**

**NMX-F-254-1977**

**CUENTA DE ORGANISMOS COLIFORMES**

**COLIFORM ORGANISMS COUNT**

**DIRECCION GENERAL DE NORMAS**

P R E F A C I O

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes organismos:

CENTRO DE CONTROL TOTAL DE CALIDADES, S.A.

CONTROL MICROBIOLOGICO SANITARIO.

CAMARA DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS ELABORADOS CON  
LECHE.

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

## 0 INTRODUCCION

La interpretación del hallazgo y abundancia de los organismos coliformes no tiene un carácter universal. En tanto que en el agua, en términos generales, se considera que su presencia revela una exposición reciente a la contaminación fecal, su significado no es el mismo en el caso de la leche, substrato en el cual son capaces de desarrollar muy activamente.

La demostración y el recuento de organismos coliformes pueden realizarse mediante el empleo de medios sólidos que los favorecen selectivamente y los diferencian de los microorganismos con los que suelen encontrarse asociados en los alimentos, o bien recurriendo a tubos de fermentación que contengan caldo lactosa y computando su número con base a las tablas de número más probable (NMP).

El medio presuntivo de lauril triptosa resulta muy ventajoso cuando se examinan alimentos con número exiguo de estas bacterias que por otra parte, pueden encontrarse en condiciones de vitalidad mermada debido al efecto subletal del calor y otros agentes durante la fabricación del producto alimenticio.

## 1 OBJETIVO

Esta Norma establece los procedimientos para obtener la cuenta de organismos coliformes, en alimentos.

## 2 CAMPO DE APLICACION

El criterio para seleccionar y aplicar uno u otro procedimiento depende primariamente de la densidad de gérmenes que se espera encontrar siendo en algunos casos necesario considerar además la composición y naturaleza del alimento que se va a examinar.

## 3 REFERENCIAS

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

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

NMX-F-253 Cuenta de Bacterias Mesofílicas Aerobias.

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

#### 4 DEFINICIONES

##### Organismos Coliformes

Para los efectos de esta norma en este grupo de microorganismos se incluyen bacilos Gram negativos, aerobios, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de 48 horas cuando se incuban a 32°-35°C. Una variedad de bacterias, muy abundantes y siempre presentes en la materia fecal del hombre y animales superiores satisface la definición anterior; también pertenecen a este grupo ciertas bacterias propias del suelo y vegetales.

#### 5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

##### 5.1 Recuento de colonias en medio sólido

###### a) Agar Rojo Violeta Bilis

Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	7.0 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	15.0 g
Agua destilada	1000 ml

Suspender los componentes antes de mencionados en un litro de agua destilada, dejar reposar por un minuto. Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7.4.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos. Envasar en recipientes estériles.

El pH final del medio debe ser  $7.4 \pm 0.1$ .

###### b) Solución reguladora diluyente prepararla como se indica en el punto 3.b de la norma NMX-F-286 (véase 3).

##### 5.2 Recuento por dilución en tubo

###### a) Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST)

Triptosa	20 g
Lactosa	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.75 g
NaCl	5 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes antes mencionados en un litro de agua destilada. Hervir y distribuirlo en tubos de 16 x 150 con campana de fermentación en volúmenes de 10 ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. El pH final del medio debe ser  $6.8 \pm 0.1$ .

b) Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB)

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Ox-gall	20 g
Verde brillante	0.0133g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes antes mencionados en un litro de agua destilada, hervir. Distribuirlo en volúmenes de 3 ml en tubos de 13 x 100 mm con campana de fermentación.

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

El pH final debe ser de 7.1 a 7.4.

c) Solución reguladora diluyente

Prepararla como se indica en el punto 3.b de la Norma Mexicana NMX-F-286 (véase3).

## 6 APARATOS E INSTRUMENTOS

### 6.1 Para recuento de colonias en medio sólido

- a) Horno para esterilizar
- b) Autoclave con termómetro o manómetro probado con termómetro de máximas.
- c) Baño maría de 45°C a 48°C con termostato o termómetro.
- d) Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato.
- e) Vasos esterilizables para licuadora.
- f) Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.
- g) Utensilios estériles para la reparación de las muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas.

- h) Frascos de vidrio para dilución para contener 99 ó 90 ml y tubos de vidrio de 16 x 150 mm con tapón de rosca para contener 9 ml de solución reguladora diluyente, en ambos casos  $\pm 1\%$  de volumen señalado después de la esterilización, cerrados herméticamente.
- i) Pipetas bacteriológicas estériles de 10 ml y 1 ml graduadas en 0.1 y 0.01 ml respectivamente.
- j) Gradillas adecuadas al tamaño de los tubos.
- k) Cajas Petri de 100 x 15 mm.
- l) Incubadora con reostato de 32 a 35°C que evite variaciones mayores de  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ .
- m) Contador de colonias Quebec o equivalente.
- n) Contador manual (tally).

## 6.2 Recuento por dilución en tubo

- a) Los señalados en 5.1 a) - 5.1. j) del párrafo anterior y
- b) Tubos de cultivo de 22 x 175 mm.
- c) Tubos de cultivo de 16 x 150 mm.
- d) Tubos de cultivo de 13 x 100 mm.
- e) Campanas de fermentación.
- f) Asa de platino o nicromel de 3 mm de diámetro

## 7 PROCEDIMIENTO

### 7.1 Para el recuento de colonias en medio sólido

7.1.1 Consultar las indicaciones señaladas en la Norma Mexicana NMX-F-253 (véase 3).

7.1.2 Preparar la muestra y sus diluciones de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-286 (véase 3).

7.1.3 Transferir un mililitro o un volumen decimal de la muestra o de sus diluciones a cajas de Petri.

7.1.4 Agregar de 12 a 15 ml del medio Agar Rojo Violeta Bilis fundido y mantenido de  $44^\circ$  a  $46^\circ\text{C}$ .

7.1.5 Si fuera necesario inocular las cajas con un volumen mayor de 1.0 ml (pueden usarse hasta 3.3 ml de muestra para 15-20 ml de medio) o alternativamente, incluir más de una caja inoculada cada una con 1 ml, a fin de poner en evidencia colonias de coliformes cuando su número fuera muy reducido en la muestra: 3 placas conteniendo cada una 3.3 ml de la dilución 1:10 permitirán examinar 1 g ó 1 ml de la muestra.

7.1.6 Mezclar correctamente el medio con la muestra. Dejar solidificar sobre una superficie plana y horizontal y agregar 4 ml del mismo medio de cultivo extendiéndolo para cubrir completamente la superficie.

7.1.7 Dejar solidificar e incubar las cajas en posición invertida durante  $24 \pm 2$  horas, de 32°C a 35°C.

7.1.8 Contar las colonias de coliformes desarrolladas de acuerdo a los puntos 5.8 y 5.9 de la Norma NMX-F-253 (véase 3). Las colonias de color rojo oscuro, con halo de precipitación y diámetro de 0.5 mm o mayor, se consideran típicas de los organismos coliformes en los productos lácteos. En otros alimentos no suelen mostrar el halo.

Las colonias de ciertas formas de cocos a veces producen colonias semejantes en color y tamaño a los coliformes, aunque sin halo.

TABLA No.1

Consultar el original.

7.1.9 Computar el número de colonias de acuerdo al punto 6.1 de la Norma NMX-F-253 (véase 3), de organismos coliformes y reportar "Cuenta de organismos coliformes en placas de Agar Rojo Violeta Bilis incubadas 24 horas a 35°C.

## 7.2 Recuento por dilución en tubo

7.2.1 Consultar las indicaciones generales señaladas en la Norma NMX-F-187 (véase 3).

7.2.2 Preparar la muestra y sus diluciones decimales de acuerdo a la Norma NMX-F-286 (véase 3).

7.2.3 Inocular 1 mililitro por dilución a cada uno de los tres tubos con 10 ml de Caldo Lauril Sulfato Triptosa.

7.2.4 Incubar los tubos por  $48 \pm 2$  horas de 35°C. Examinar los tubos a las  $24 \pm 2$  horas y observar si hay acumulación de gas en la campana de fermentación. La presencia de gas, en cualquier cantidad dentro de 48 horas hace positiva la prueba.

## 7.3 Prueba confirmatoria

7.3.1 Agitar suavemente los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa que resultaron positivos en la prueba presuntiva. Transferir una o dos asadas de cada tubo al Caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB) al 2%. Al efectuar la reinoculación sostener el tubo primario (LST) en un ángulo tal que pueda tomar la asada evitando la película que existiera en el medio. Sacar el asa del líquido en sentido perpendicular a su superficie de manera que se forme un mecanismo bien definido.

7.3.2 Incubar el caldo LBVB (2%) por  $48 \pm 2$  horas a 35°C y hacer la lectura correspondiente sobre la formación de gas. Determinar el número de organismos de acuerdo con la tabla correspondiente (tabla 1), tomando como base el número de tubos de LBVB que demuestren producción de gas en  $48 \pm 2$  horas a 35°C.

7.3.3 Reportar NMP de coliformes por gramo o mililitro.

BIBLIOGRAFIA

Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico de alimentos, Dirección General de Investigación en Salud Pública de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Microbiología Moderna de los Alimentos. James N. Jay; José Tormo Iguacel.  
Edit. Acribia (España) 1973.

México, D.F. Noviembre 18, 1977

EL DIRECTOR GENERAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'R' and 'S' followed by a horizontal line and a vertical stroke.

DR. ROMAN SERRA CASTAÑOS

Fecha de aprobación y publicación: Diciembre 2, 1977