08-25-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

CONSIDERANDO

Que con fecha 28 de abril de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 15 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicados en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y

Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA Y DESARROLLO RURAL

Comisión Nacional del Agua

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMECQ, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LABORATORIO FERMI, S.A.

LABORATORIO ICCABI, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C. NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. FUNDAMENTO

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES

5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

6. REACTIVOS Y MATERIALES

7. APARATOS E INSTRUMENTOS

8. PREPARACION DE LA MUESTRA

9. PROCEDIMIENTO

10. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

11. INFORME DE LA PRUEBA

12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

13. BIBLIOGRAFIA

14. OBSERVANCIA DE LA NORMA

15. VIGENCIA

0. Introducción

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.

La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.

Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.

La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.

La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método microbiológico para determinar el número de microorganismos coliformes totales presentes en productos alimenticios por medio de la técnica de cuenta en placa.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35°C en

aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994	Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
NOM-110-SSA1-1994	Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
NOM-092-SSA1-1994	Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.
NOM-112-SSA1-1994	Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número más Probable.

4. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

Coliformes, bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35 ºC fermentan la lactosa con formación de ácido, ocasionando en las colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

h	hora
g	gramo
ml	mililitro
l	litro
mm	milímetro
ºC	grado Celsius
%	por ciento
pH	potencial de hidrógeno
N	normal
RVBA	agar-rojo-violeta-bilis-lactosa
1/d	inversa de la dilución
UFC	unidades formadoras de colonias
/	por

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

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

6.1.1 Soluciones diluyentes

6.1.1.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Fosfato monopotásico	34,0 g
Agua	1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con solución de hidróxido de sodio 1,0 N.

Llevar con agua a un litro.

Esterilizar a 121± 1,0°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a un litro con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a 121± 1,0°C.

Después de la esterilización, el pH y los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

6.1.1.2 Agua peptonada

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	1,0 g
NaCl	8,5 g
Agua	1,0 l

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua.

Ajustar el pH a 7,0 con hidróxido de sodio 1,0 N.

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml o en cualquier volumen múltiplo de nueve según se requiera.

Esterilizar durante 15 minutos a 121 ± 1,0°C.

Después de la esterilización, los volúmenes finales de la solución de trabajo deben ser iguales a los iniciales.

Si este diluyente no es usado inmediatamente, almacenar en lugar obscuro a una temperatura entre 0 a 5°C por un tiempo no mayor de un mes, en condiciones tales que no alteren su volumen o composición.

6.1.2 Medio de cultivo

Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

FORMULA

INGREDIENTES	CANTIDADES
Peptona	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,002 g
Agar	15,0 g
Agua	1,0 l

Preparación:

Mezclar los componentes en el agua y dejar reposar durante algunos minutos.

Mezclar perfectamente y ajustar el pH a 7,4 con ácido clorhídrico 0,1N o con hidróxido de sodio 0,1N a 25°C, de forma que después del calentamiento se mantenga en este valor.

Calentar con agitación constante y hervir durante 2 minutos.

Enfriar inmediatamente el medio en un baño de agua hasta que llegue a 45°C.

Evitar el sobrecalentamiento del medio.

No debe esterilizarse en autoclave.

Usar el medio dentro de las tres primeras horas después de su preparación.

En el caso de utilizar medio de cultivo deshidratado, seguir las instrucciones del fabricante.

6.2 Materiales

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 11 y 2 ml), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 X 150 mm con tapón de rosca.

Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

Cajas Petri.

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h a 170 - 175°C, o 1 h a 180°C; o en autoclave, durante 15 minutos como mínimo a 121 ± 1,0°C.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y éste debe ser químicamente inerte.

7. Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

Autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1° C y que mantenga la temperatura a 45 ± 1,0°C.

Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).

Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de ± 1,0° C, provista con termómetro calibrado.

Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadriculada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico".

9. Procedimiento

9.1 Colocar en cajas Petri por duplicado 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

9.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

9.3 Vertir de 15 a 20 ml del medio RVBA fundido y mantenido a 45 ± 1,0°C en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 ml del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

9.4 Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.

9.5 Preparar una caja control con 15 ml de medio para verificar la esterilidad.

9.6 Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 ml del medio RVBA a 45 ± 1,0°C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

9.7 Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35°C, durante 24 ± 2 horas.

9.8 Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.

9.9 Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

10. Expresión de los resultados

10.1 Cálculo del método

10.1.1 Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características.

Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas. Contar las colonias presentes. Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

10.1.2 Placas que contienen menos de 15 colonias características.

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

10.1.3 Placas con colonias no características.

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde d es el factor de dilución.

11. Informe de la prueba

Informar: UFC/g o ml en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35°C durante 24 ± 2 h.

En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo dilución 10^{-1}.

En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por ml".

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

13.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**. México, D.F.

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana. Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.

13.5 International Organization for Standarization. 1991: "Norma ISO 4832-1991. Microbiology-General Guidance for the Enumeration of Coliforms- Colony Count Technique".

13.6 Food and Drugs Administration. 1984: "Bacteriological Analitycal Manual". Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6ª Ed. Washington D.C.

13.7 Secretaría de Salud. Laboratorio Nacional de Salud Pública: "Manuales para la determinación de organismos coliformes totales". México, D.F.

13.8 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. NORMA-Z-013/02: "Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas". México, D.F.

14. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter de obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.