

PESCADO Y PRODUCTOS PESQUEROS
Recuento total de microorganismos mesofílicos

COGUANOR
NGO
35 015 h2

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer los métodos para llevar a cabo el recuento de microorganismos mesofílicos en placa a 20 °C y a 35 °C en pescado y productos pesqueros.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010
1a. Revisión

Sistema Internacional de Unidades (SI)

3. TERMINOLOGIA

3.1 Recuento total de microorganismos mesofílicos, es la determinación del número de microorganismos por gramo de producto que se detecta cuando se realiza el ensayo a las temperaturas y las condiciones descritas en la presente norma.

4. PRINCIPIO DEL METODO

4.1 Se muele la muestra y se la macera con un diluyente estéril en un mezclador mecánico. Se preparan diluciones decimales del macerado.

4.2 Se colocan porciones de las diluciones sobre placas de agar de un medio no selectivo y se incuban bajo condiciones aeróbicas a 20 - 25 °C durante 4 días y a 35 °C durante 48 ± 2 h.

4.3 A partir del número de colonias por placa, se calcula el número de microorganismos mesofílicos por gramo de muestra.

5. REACTIVOS O MATERIALES

Los materiales básicos y los reactivos deben ser de calidad reconocida para uso microbiológico; el agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

5.1 Agar para recuento en placa. (Plate count Agar)

Triptona (digerido pancreático de caseína) o Tripticasa	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 cm ³

Continúa

Se disuelven en el agua hirviendo los componentes del medio de cultivo y se ajusta el pH a $7,1 \pm 0,1$. Se transfiere el medio de cultivo a tubos o frascos y se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min; el pH final debe ser $7,0 \pm 0,1$.

5.2 Diluyente al 0,1% de agua peptonada

Peptona	1,0 g
Agua destilada	1000 cm ³

Se disuelve la peptona en el agua destilada y se ajusta el pH a $6,8 \pm 0,2$; se distribuye el diluyente en frascos, colocando en cada uno un volumen tal que después de la esterilización cada frasco contenga 99 ± 2 cm³ y luego se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 min.

6. APARATOS

6.1 Balanza, con una sensibilidad de 0,1 g para una carga de 200g, preferiblemente de un solo plato y de 2 kg de capacidad.

6.2 Máquina de moler o picar carne, tamaño de laboratorio, esterilizada, provista de una placa cribada con orificios de diámetro no mayor de 4 mm.

6.3 Mezclador mecánico (licuadora), que opere a no menos de 840 rad/s (8000 revoluciones por minuto) y no más de 4700 rad/s (45000 revoluciones por minuto) con vasos mezcladores de vidrio o metal de una capacidad apropiada, provistos de tapas y resistentes a las condiciones de esterilización.

6.4 Autoclave, regulado a 121°C .

6.5 Esterilizador operado con aire caliente, regulado a 170°C

6.6 Incubadoras para mantener las placas inoculadas a $20-25^\circ\text{C}$ y $35 \pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente.

6.7 Baños de agua, para calentar y enfriar soluciones y medios de cultivo a las temperaturas apropiadas.

6.8 Contador de colonias, del tipo Quebec u otro similar con visibilidad y aumento equivalentes.

6.9 Frascos de dilución, de aproximadamente 150 cm³ de capacidad, de vidrio borosilicato con tapa hermética de rosca o tapón de hule tipo Escher, graduados con marca indeleble a los 99 ± 1 cm³.

Nota. Cuando las tapaderas plásticas para los frascos son nuevas, deben ser tratadas para remover residuos tóxicos; para tal fin puede emplearse uno de los siguientes procedimientos: (a) se colocan en agua las tapaderas y se calientan en el autoclave a 121°C dos veces sucesivas usando agua fresca cada vez; o (b) lavado de las tapaderas dos veces sucesivas con solución de un detergente adecuado a 82°C .

6.10 Pipetas graduadas, con una capacidad nominal de 1 cm³ con divisiones a cada 0,1 cm³ y con una abertura de descarga de 2 a 3 mm de diámetro.

6.11 Placas de Petri, de vidrio, con las siguientes dimensiones: diámetro interno de la placa 90 ± 2 mm, altura externa no menor de 18 mm y tapa con diámetro externo no mayor de 102 mm. El borde de la placa debe estar en un plano paralelo a la base; el fondo de la placa debe ser plano y paralelo a la base.

Nota. Se pueden usar también placas de Petri desechables de plástico, preesterilizadas, aún teniendo pequeñas diferencias en sus dimensiones.

6.12 Esterilización del material de vidrio y otros materiales. Se debe esterilizar el material de vidrio y los otros materiales utilizando uno de los métodos siguientes:

- a) Esterilización húmeda a una temperatura no menor de 121°C durante no menos de 20 min.
- b) Esterilización seca a una temperatura no menor de 170°C durante no menos de 1 h.

7. MUESTREO

7.1 Se parte de una muestra representativa de por lo menos 200 g tomada en forma aséptica y envasada en un envase estéril; la muestra puede ser almacenada a una temperatura de 0 a 5°C pero durante un tiempo no mayor de 1 h.

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Recuento de microorganismos mesofílicos a 20°C

8.1.1 Pretratamiento de la muestra. En forma aséptica se muele y mezcla la muestra 2 veces en la máquina de moler o picar carne y se comienza el examen lo antes posible; si la muestra está congelada debe descongelarse en el mismo envase estéril colocanco éste en una refrigeradora a $0-4,4^{\circ}\text{C}$ durante no más de 18h y luego se muele como se indicó anteriormente.

8.1.2 Maceración y dilución de la muestra pretratada. Antes de preparar las diluciones de la muestra, se deben marcar todas las placas Petri que se van a usar, con el número de la muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información necesaria, y se procede en la forma siguiente:

- a) En un vaso mezclador estéril previamente tarado, se pesan $50 \pm 0,1$ g de la muestra pretratada, se agregan 450 cm^3 del diluyente estéril (véase 5.2), enfriado previamente en un baño de agua con hielo y se mezcla durante 1 a 2 min a una velocidad aproximada de 840 rad/s (8000 revoluciones por minuto); no se debe mezclar durante más de 3 min para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.
- b) Inmediatamente después de la maceración se preparan en duplicado diluciones decimales empleando 1 cm^3 de macerado más 9 cm^3 de diluyente enfriado; en cuanto al tiempo transcurrido durante las diluciones, véase lo indicado en 8.1.3.

Nota 1. Si se sospecha un recuento muy bajo, la dilución puede realizarse empleando 11 cm^3 del macerado más 99 cm^3 de diluyente enfriado.

Nota 2. No se deben exponer las diluciones ni las placas a la luz solar directa; las pipetas utilizadas durante la preparación de las diluciones no deben introducirse más de 2,5 cm por debajo de la superficie del macerado de la muestra o de las diluciones, y al terminar la descarga de las pipetas éstas no deben ser sopladas con la boca.

8.1.3 Inoculación de las placas. Se procede en la forma descrita a continuación, teniendo en consideración que el intervalo de tiempo entre la maceración de la primera muestra y la inoculación de la última placa no debe ser mayor de 20 min y preferiblemente 10 min.

a) Asepticamente se transfieren 10 a 12 cm³ del agar para recuento en placa (véase 5.1), previamente fundido y luego enfriado a una temperatura de 44 a 46 °C, a placas de Petri debidamente marcadas y esterilizadas, levantando ligeramente la tapa de la placa justo hasta la altura suficiente que permita verter el medio de cultivo.

Nota. Se debe evitar cualquier derramamiento del medio sobre la parte externa de la placa o sobre su borde interno.

b) Se agrega a cada placa con agar 0,1 cm³ de la dilución correspondiente y, evitando salpicar las orillas, se mezcla completamente el contenido de cada placa dándole a la misma un movimiento de rotación primero en una dirección y luego en dirección opuesta, inclinando y rotando la placa o bien, con un rotor mecánico.

c) Una vez que la mezcla esté completamente distribuida sobre el fondo de la placa, se deja solidificar sobre una superficie horizontal, lo cual se logra en aproximadamente 10 min.

d) En cuanto solidifique el medio, se invierten las placas para prevenir el desarrollo excesivo superficial ("spreaders"), y se colocan rápidamente en la incubadora a 20-25 °C durante 4 días.

8.1.4 Control de esterilidad del medio, del diluyente y del equipo. Cada lote del medio y del diluyente usado debe verificarse mediante placas controles y, si se desea, se verifica también cada lote de placas de Petri y de pipetas.

8.1.5 Recuento de colonias. Concluido el período de incubación se procede rápidamente al recuento de colonias en la forma descrita a continuación:

a) Se seleccionan las placas que contengan 30 a 300 colonias, exceptuando las que tengan desarrollo excesivo superficial ("spreaders"), ya que éste puede enmascarar el desarrollo de otras colonias, véase literal (i).

b) Si sólo se selecciona una placa, se hace el recuento de colonias utilizando el contador de colonias, considerando todas las colonias de la placa seleccionada e incluyendo aquellas del tamaño de la punta de un alfiler; se registra el recuento de la placa y la dilución usada.

c) Si se seleccionan 2 placas que corresponden a duplicados de una misma dilución, en cada placa se realiza el recuento como se indicó en (b), y se promedian los recuentos encontrados; se registra el recuento promedio y la dilución usada.

Nota. Si se preparan más de una placa para una misma dilución y sólo una tiene un recuento comprendido entre 30 y 300 colonias, se realiza el recuento en cada placa de acuerdo al procedimiento que corresponda según la presente norma, luego se promedian los recuentos encontrados y se registra el recuento promedio.

- d) Si se selecciona una placa de cada una de dos diluciones decimales consecutivas, se hace el recuento en cada placa, se multiplica el número de colonias encontradas en cada placa por el valor recíproco de la dilución correspondiente, luego se promedian los resultados y se registra el valor encontrado.

Nota. Cuando se seleccionan placas en duplicado para cada uno de dos diluciones consecutivas, se obtiene primero el promedio de cada duplicado como se indica en (c), luego se multiplica cada promedio por el valor recíproco de su correspondiente dilución y finalmente se promedian ambos resultados.

- e) Si no hay placas que contengan 30 a 300 colonias y una o más placas tienen más de 300 colonias, se seleccionan las placas que tengan un número de colonias lo más cercano a 300 y se procede con el recuento como se indica en los literales (d) y (h).

- f) Si en las placas de todas las diluciones se producen menos de 30 colonias por placa, se registra solamente el número de colonias de la menos dilución usada, sin considerar las placas que presentan desarrollo excesivo superficial ("spreaders"), véase 8.1.5 (i).

- g) Si no se desarrolla ni una colonia en ninguna de las placas de todas las diluciones usadas, y tampoco se detecta la presencia de sustancias inhibitoras, se registra el recuento como menor de una vez la dilución más baja correspondiente; ejemplo: si no se observan colonias sobre las placas de la dilución 1:100, se registra el recuento como " 100" (menor de 100).

- h) Si el número de colonias por placa excede las 300 colonias, se hace el recuento de colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Si hay menos de 10 colonias/cm², se hace el recuento en 13 cuadrados, seleccionando, si son representativos, 7 cuadrados consecutivos que crucen horizontalmente la placa y 6 cuadrados consecutivos en ángulo recto, teniendo la precaución de hacer el recuento en un mismo cuadrado sólo una vez (la suma de las colonias en 13 cm² representativos multiplicada por 5 da el número estimado de colonias por placa cuando el área de la placa es de 65 cm²).

Nota. El diámetro interno promedio del fondo de una placa de Petri estándar es de 9,1 cm lo cual da un área del fondo de 65 cm²; por esta razón es que, normalmente, se multiplica por 65 el número promedio de colonias por centímetro cuadrado. Para placas de otras medidas se debe usar el factor apropiado.

Quando hay más de 10 colonias/cm², se hace el recuento en 4 de los cuadrados representativos y se multiplica el número promedio encontrado por centímetro cuadrado, por el factor apropiado para determinar las colonias estimadas por placa.

Cuando hay más de 100 colonias/cm², el recuento se registra como "Demasiado numeroso para contar (DNPC)" sólo en el caso de la dilución más baja; en el caso de la dilución más alta se registra como mayor de 6 500 veces la dilución más alta inoculada.

i) En el caso de placas que presentan desarrollo superficial excesivo ("spreaders") y es imposible evitar el recuento en estas placas, se procede en la forma siguiente:

- Se identifican como sectores con desarrollo excesivo superficial cualquiera de las situaciones descritas a continuación: 1) cadena de colonias, las cuales no están distintivamente separadas, aparentemente causadas por desintegración de un grupo de bacterias cuando a la placa de Petri se le imprime un movimiento de rotación para mezclar el agar con la muestra; si sólo existe una cadena de este tipo, se cuenta como una colonia simple, y si una o más cadenas se presentan como originadas de fuentes separadas, se cuenta cada fuente como colonia separada, no debiéndose contar como colonia separada cada desarrollo individual de la cadena; 2) Colonias extendidas superficialmente, las cuales se desarrollan en una película de agua entre el agar y el fondo de la placa; y 3) Colonias que se forman en una película de agua en la orilla o sobre la superficie del agar.

Nota 1. Los dos últimos tipos de desarrollo excesivo superficial ("spreaders") son debidos en gran parte a una acumulación de humedad en el punto en que se origina el desarrollo excesivo superficial. Cuando el diluyente acuoso se distribuye uniformemente a través del medio, las bacterias raramente se desarrollan como colonias con "desarrollo excesivo superficial".

Nota 2. Cuando se tenga un 5% o más, de las placas con "desarrollo excesivo superficial" superior a un cuarto del área de la placa, se deberán tomar medidas inmediatas para eliminar este problema.

- Si un 50% o más, del área de las placas seleccionadas presenta "desarrollo excesivo superficial", no se realiza el recuento y se registra como "Accidente de Laboratorio (AL)"
- Si una placa presenta una parte del área con colonias bien distribuidas, otra parte con "desarrollo excesivo superficial" y una parte de crecimiento reprimido, y la suma de éstas dos últimas partes no excede el 50% del área total de la placa, se realiza el recuento en el área con colonias bien distribuidas siguiendo el procedimiento descrito en el literal (h); en caso contrario se registra como "Desarrollo excesivo superficial ("spreaders") (DES (Spr)).
- Si el área de crecimiento reprimido excede un cuarto del área total, no se realiza el recuento y se registra como "Accidente de Laboratorio".

Nota. La falta de formación de colonias puede ser debido a la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra; el analista puede sospechar la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra analizada, cuando las placas no muestran desarrollo o muestran desarrollo proporcionalmente menor en las diluciones más bajas; sin embargo, tal fenómeno no puede ser siempre interpretado como evidencia de inhibición.

j) En cualquier recuento de colonias se debe evitar confundir erróneamente partículas de medio no disuelto, partículas de muestra o materia precipitada en las placas, con colonias del tamaño de la punta de un alfiler; se debe examinar cuidadosamente todo el material dudoso bajo un mayor aumento para diferenciar claramente las colonias de cualquier materia extraña.

k) Junto con los recuentos de las placas inoculadas con las diluciones de la muestra, se debe registrar el recuento de las placas controlas.

Nota. Si no es posible realizar el recuento inmediatamente después de concluido el período de incubación, se puede almacenar las placas a una temperatura entre 0 y 4,4°C durante un período no mayor de 24 h; obviamente, tal situación debe evitarse como práctica rutinaria.

8.2 Recuento de microorganismos mesofílicos a 35°C

8.2.1 Se procede en la forma descrita en 8.1 utilizando $35 \pm 1^\circ\text{C}$ como temperatura de incubación durante un período de 48 ± 2 h.

9. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

9.1 El recuento total de microorganismos mesofílicos se expresa como número de microorganismos por gramo de muestra y se calcula en la forma siguiente:

9.1.1 En todos los casos se redondean los resultados considerando sólo los dos primeros dígitos de la izquierda; sólo en los casos que el tercer dígito sea 5 ó mayor de 5 se eleva el segundo dígito al número más alto siguiente. Se deben usar ceros para todos los dígitos que van después del segundo dígito de la izquierda; véase ejemplos en la tabla 1 del anexo.

9.1.2 Si se selecciona una sola placa (véase 8.1.5(b)), se multiplica el recuento total de la placa por el valor recíproco de la dilución usada; véase muestra 1001 y 1004 de la tabla 1 del anexo.

9.1.3 Si se seleccionaron placas en duplicado o triplicado, se multiplica el valor promedio del recuento obtenido en 8.1.5(c), por el valor recíproco de la dilución usada; véase muestra 1011 de la tabla 1 del anexo.

9.1.4 Si se seleccionaron placas de dos diluciones decimales consecutivas, el recuento total mesofílico corresponde al valor promedio obtenido en 8.1.5(d), a menos que el recuento más alto computado sea mayor de 2 veces el recuento más bajo, en cuyo caso se considera sólo el recuento más bajo y se multiplica por el valor recíproco de la dilución correspondiente; véase muestras 1002, 1003 y 1012 de la tabla 1 del anexo.

9.1.5 Si se seleccionaron placas con menos de 30 colonias, se multiplica el recuento encontrado para la dilución más baja (véase 8.1.5(f)) por el valor recíproco de esta dilución y se expresa como "número estimado (Est)", de microorganismos por gramos de muestra; véase muestra 1007 de la tabla 1 del anexo.

9.1.6 En el caso de placas sin colonias (véase 8.1.5(g)) el resultado corresponde a menos de una vez el valor recíproco de la dilución más baja usada y se expresa como "número estimado (Est)", de microorganismos por gramo de muestra; véase muestra 1005 de la tabla 1 del anexo.

9.1.7 Si se seleccionaron placas con más de 300 colonias y estas colonias pueden ser contadas en forma exacta, se multiplica el recuento por el valor recíproco de la dilución usada y se expresa como "número estimado (Est)" de microorganismos por gramo de muestra; en caso contrario, es decir, que sea difícil su recuento, el resultado corresponde a la información anotada en el numeral 8.1.5(h); véase muestras 1 006 y 1 009 de la tabla 1 del anexo.

9.1.8 En el caso de placas con desarrollo excesivo superficial ("Spreaders"), cuando sea posible realizar el recuento, se multiplica el recuento por el valor recíproco de la dilución usada y se expresa como "número estimado (Est)" de microorganismos por gramo de muestra; en caso contrario, el resultado corresponde a la información anotada en el numeral 8.1.5(i) véase muestras 1 008 y 1 010 de la tabla 1 del anexo.

9.2 Repetibilidad. La falta de exactitud en el recuento de las placas debido a algún descuido, a cansancio visual o a falla para reconocer las colonias, puede conducir a resultados erróneos. Los analistas que no puedan duplicar sus propios recuentos sobre la misma placa con un error no mayor del 5%, y los recuentos de otros analistas con un error no mayor del 10%, deberán investigar las causas y corregir las diferencias encontradas.

10. INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe indicarse lo siguiente:

- 10.1 Los resultados obtenidos en cada determinación.
- 10.2 Las temperaturas y períodos de incubación correspondientes.
- 10.3 Los resultados obtenidos en los ensayos controles.
- 10.4 Cualquier condición no especificada en esta norma o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.
- 10.5 Todos los detalles que permitan la completa identificación de la muestra.

11. CORRESPONDENCIA

Para la redacción de la presente norma se tuvo en cuenta el método "Aerobic Plate Count" descrito en el "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" publicado por la "American Public Health Association", 1976.

12. ANEXO

12.1 En la tabla 1 siguiente se pueden apreciar algunos ejemplos sobre el cálculo del recuento total de microorganismos mesófilos por gramo de muestra.

Tabla 1. Ejemplos para el cálculo del recuento total de microorganismos

mesofílicos por gramo de muestra

Muestra No.	Colonias/dilución		Relación del recuento (1)	Recuento Total Mesofílico
	1:100	1:1000		

Aplicación común cuando son analizadas dos placas, una de cada dos diluciones decimales

1001	234	28(2)	-	23 000
1002	293	41	1,4	35 000
1003	140	32	2,3	14 000
1004	DES (Spr) (3)	31	-	31 000
1005	0	0	-	100 Est
1006	DNPC (4)	7 150	-	6 500 000 Est
1007	18	2	-	1 800 Est
1008	DES (Spr) (3)	DES (Spr) (3)	-	DES (Spr) (3)
1009	325	25(2)	-	33 000 Est
1010	332	265	-	AL

Procedimiento cuando son analizadas dos o más placas por dilución

1011	281	40	-	33 000
	378	24	-	
1012	138	42	2,4	15 000
	162	30	-	

- (1) Relación del recuento es la relación entre el recuento mayor y el recuento menor de placas que corresponden a diluciones consecutivas y que tienen de 30 a 300 colonias cada una.
- (2) No se considera ya que está por debajo del límite de 30 colonias.
- (3) DES (Spr) significa desarrollo excesivo superficial ("Spreaders").
- (4) DNPC significa demasiado numeroso para contar.

ULTIMA LINEA