

PESCADO Y PRODUCTOS PESQUEROS
 Detección y recuento de bacterias coliformes y
Escherichia coli

COGUANOR
 NGO 35 015 h4

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para la determinación de bacterias coliformes y Escherichia coli en el pescado y los productos pesqueros.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

Para la aplicación de la presente Norma Guatemalteca no es necesaria la consulta específica de ninguna otra.

3. TERMINOLOGIA

3.1 Bacterias coliformes. Microorganismos que fermentan la lactosa con producción de gas a 35°C cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en esta norma.

3.2 Escherichia coli. Bacterias coliformes que fermentan la lactosa con producción de gas a 45,5°C y que producen indol a partir de triptofano a 35°C, cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en esta norma.

3.3 Detección y recuento de bacterias coliformes y Escherichia coli. Es la determinación de la presencia y número de estos microorganismos en una muestra del producto cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en esta norma.

4. REACTIVOS O MATERIALES

Los medios y reactivos deben ser de calidad microbiológica reconocida; el agua debe ser destilada o de pureza equivalente. Para ajustar el pH de los medios y soluciones indicadas en la presente norma, pueden emplearse soluciones aproximadamente 6N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio, según corresponda.

4.1 Caldo al 2% de verde brillante lactosa bilis (caldo BGLB).

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Bilis de buey deshidratada	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven la peptona y la lactosa en aproximadamente 50 cm³ de agua destilada. Por aparte se disuelven 20 g de bilis de buey en 200 cm³ de agua; el pH de esta solución debe ser 7,0 a 7,5.

Se mezclan las dos soluciones, y se lleva la mezcla a un volumen aproximado de 750 cm³, se ajusta el pH a 7,4. Se agregan 13,3 cm³ de una solución acuosa al 0,1% de verde brillante y se lleva a un volumen final de 1 000 cm³; se distribuye el medio en tubos de fermentación, de manera que el nivel del caldo cubra los tubos internos invertidos, y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C. El pH final después de la esterilización debe ser 7,2.

Continúa

4.5 Caldo de triptofano.

Triptona o tripticasa	10 g
Agua destilada	1000 cm ³

Se disuelve en el agua la triptona, se distribuye en porciones de 5 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final después de la esterilización debe ser 6,9 ± 0,2.

4.6 Caldo de glucosa amortiguado (tamponado), (MR-VP).

Proteosa peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5 g
Agua destilada	1000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en aproximadamente 800 cm³ de agua con calentamiento suave, se filtra, se enfría a 20°C y se diluye a un litro; se distribuye el medio en porciones de 10 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 12 a 15 min a 121°C. El tiempo máximo de exposición al calor es de 30 min. El pH final después de la esterilización debe ser 6,9 ± 0,2.

4.7 Caldo Koser-citrato.

Fosfato ácido de sodio y amonio (NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O)	1,5 g
Fosfato ácido dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,2 g
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	3 g
Agua destilada	1000 cm ³

Se disuelven en el agua los ingredientes sólidos, se distribuye el medio en porciones de 10 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final después de la esterilización debe ser 6,7 ± 0,2.

4.8 Agar de recuento en placas (PCA).

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua llevada a ebullición, se distribuye en tubos o frascos y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final después de la esterilización debe ser 7,0 ± 0,1.

Nota. Se le designa también como agar-peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura.

4.9 Reactivo de Kovacs.

p-Dimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 cm ³
Acido clorhídrico concentrado	25 cm ³

Continúa

5. APARATOS

- 5.1 Máquina de moler o picar carne, tamaño de laboratorio, esterilizada, equipada con una placa cribada con orificios de diámetro no mayor de 4 mm.
- 5.2 Mezclador mecánico (licuadora), que opere a no menos de 840 rad/s (8 000 revoluciones por minuto) y a no más de 4 700 rad/s (45 000 revoluciones por minuto), con vasos mezcladores de metal o de vidrio de una capacidad apropiada y que sean resistentes a las condiciones de esterilización.
- 5.3 Autoclave, regulada a 121°C
- 5.4 Incubadora, regulada a $35 \pm 1^\circ\text{C}$
- 5.5 Pipetas graduadas, de 1 y 10 cm³, esterilizadas
- 5.6 Tubos de cultivo
- 5.7 Baño de agua cubierto, provisto de un sistema de circulación para mantener una temperatura de $45,5 \pm 0,05^\circ\text{C}$. El nivel del agua debe quedar sobre el nivel del medio contenido en los tubos invertidos.
- 5.8 Termómetro de inmersión, de aproximadamente 55 cm de longitud, graduado entre 1 y 55°C, con subdivisiones a cada 0,1°C, debidamente calibrado.
- 5.9 Asa en punta
- 5.10 Asa circular, de 3 mm de diámetro
- 5.11 Instrumental de laboratorio

6. MUESTREO

- 6.1 Se parte de una muestra representativa de por lo menos 200 g tomada en forma a séptica, envasada en un envase estéril y trasladada al laboratorio bajo condiciones adecuadas de manera de minimizar los cambios de la población microbiológica.

7. PROCEDIMIENTO

- 7.1 Pretratamiento de la muestra. El análisis de la muestra debe iniciarse tan pronto como sea posible luego de haberse recibido la misma; si el análisis no puede realizarse prontamente se deben almacenar las muestras no congeladas a 0-4°C pero por un período no mayor de 24 h y si las muestras están congeladas se deben almacenar a -20°C hasta el momento de iniciar el análisis.

7.1.1 Si la muestra está congelada, antes de iniciar el análisis se debe descongelar sin retirarla del envase estéril colocándola en una refrigeradora a 2-5°C durante no más de 18h; alternativamente puede descongelarse la muestra empleando temperaturas más altas durante un período corto de tiempo ($<45^\circ\text{C}$ durante ≤ 15 min).

Nota 1. La temperatura para descongelar la muestra debe seleccionarse de manera de minimizar la destrucción o proliferación de los microorganismos presentes.

Nota 2. El uso de un baño de agua con regulador de temperatura y mecanismo agitador facilita la descongelación rápida de las muestras.

Continúa

7.5.3 Se incuban las placas a 35°C durante 18 a 24h y luego se examinan para detectar las colonias sospechosas de Escherichia coli, caracterizadas por un centro oscuro con o sin brillo metálico.

7.5.4 Se pican 2 colonias típicas de cada placa L-EMB y se las transfiere a planos inclinados de agar de recuento en placa (PCA) para análisis morfológicos y bioquímicos; se incuban los planos inclinados de PCA a 35°C durante 18 a 24h. Si no hay colonias típicas presentes, se pican 2 o más colonias que se sospeche que son Escherichia coli, de cada placa L-EMB, y se las transfiere a planos inclinados de agar PCA.

7.5.5 Identificación del Gram de las colonias.

- a) De cada cultivo de los planos inclinados de agar PCA se efectúa un frote y se seca al aire; luego se fija el frote con calor suave pasándolo 3 ó 4 veces rápidamente sobre la llama de un mechero Bunsen.
- b) Se tiñe el frote durante un minuto con la solución cristal violeta-oxalato de amonio, se lava brevemente con agua del chorro y se drena el agua.
- c) Se aplica durante un minuto el colorante yodó de Gram, se lava con agua del chorro y se drena el agua.
- d) Se decolora el frote con alcohol etílico al 95% (v/v) hasta que los enjuagues no tengan color azul, aproximadamente durante 30 s; alternativamente se puede sumergir el portaobjeto en el alcohol, se retira inmediatamente y luego se vuelve a sumergir en alcohol durante 10 s.
- e) Se lava rápidamente el frote con agua, se drena y se aplica el colorante de contraste de safranina durante 10 a 30 s.
- f) De nuevo se lava rápidamente con agua, se drena, se seca al aire y se examina; los organismos Gram-positivos se tiñen de color azul y los organismos Gram-negativos se tiñen de color rojo.

Nota 1. Algunos de los organismos Gram-negativos no se decoloran fácilmente después de la tinción con la solución cristal violeta de Hucker; para evitar esta dificultad, la solución de cristal violeta puede ser diluida hasta 10 veces antes de mezclarla con un volumen igual de la solución de oxalato de amonio.

Nota 2. Para una mejor identificación se deben usar controles positivos y negativos.

7.5.6 Análisis bioquímicos de las colonias Gram-negativas. Se deben realizar los siguientes análisis bioquímicos con todos los cultivos que se identifican como bastones cortos o cocos Gram-negativos.

7.5.6.1 Producción de Indol. Se inocula un tubo que contenga caldo de triptofano y se incuban a 35°C durante 24 ± 2h; se detecta la presencia de indol agregando 0,2 cm³ del reactivo de Kovacs. El análisis positivo se evidencia por la aparición de un color rojo claro en la capa superior.

7.5.6.2 Análisis de Voges-Proskauer. Si inocula un tubo que contenga caldo MR-VP y se incuban a 35°C durante 48 ± 2h; luego, a temperatura ambiente, se transfiere a un tubo de ensayo 1 cm³ del cultivo incubado y se agregan 0,6 cm³ de la solución de α-naftol y 0,2 cm³ de la solución al 40% de KOH, agitando luego de la adición de cada solución. Para intensificar y acelerar la reacción, se adicionan algunos cristales de creatina a la mezcla; se lee el resultado a las 4h de haber agregado los reactivos. El análisis VP es positivo cuando se desarrolla un color rosado de eosina.

Continúa

Cuadro 2. Número más probable de microorganismos por gramo de pescado o producto pesquero, para diluciones sucesivas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , utilizando 5 tubos para cada dilución.

Combinación de tubos positivos			NMP por gramo	Combinación de tubos positivos			NMP por gramo	Combinación de tubos positivos			NMP por gramo
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
0	0	0	<2	1	1	1	6	2	2	2	14
0	0	1	2	1	1	2	8	2	2	3	17
0	0	2	4	1	1	3	10	2	2	4	19
0	0	3	5	1	1	4	12	2	2	5	22
0	0	4	7	1	1	5	14	2	3	0	12
0	0	5	9	1	2	0	6	2	3	1	14
0	1	0	2	1	2	1	8	2	3	2	17
0	1	1	4	1	2	2	10	2	3	3	20
0	1	2	6	1	2	3	12	2	3	4	22
0	1	3	7	1	2	4	15	2	3	5	25
0	1	4	9	1	2	5	17	2	4	0	15
0	1	5	11	1	3	0	8	2	4	1	17
0	2	0	4	1	3	1	10	2	4	2	20
0	2	1	6	1	3	2	13	2	4	3	23
0	2	2	7	1	3	3	15	2	4	4	25
0	2	3	9	1	3	4	17	2	4	5	28
0	2	4	11	1	3	5	19	2	5	0	17
0	2	5	13	1	4	0	11	2	5	1	20
0	3	0	6	1	4	1	13	2	5	2	23
0	3	1	7	1	4	2	15	2	5	3	26
0	3	2	9	1	4	3	17	2	5	4	29
0	3	3	11	1	4	4	19	2	5	5	32
0	3	4	13	1	4	5	22	3	0	0	8
0	3	5	15	1	5	0	13	3	0	1	11
0	4	0	8	1	5	1	15	3	0	2	13
0	4	1	9	1	5	2	17	3	0	3	16
0	4	2	11	1	5	3	19	3	0	4	20
0	4	3	13	1	5	4	22	3	0	5	23
0	4	4	15	1	5	5	24	3	1	0	11
0	4	5	17	2	0	0	5	3	1	1	14
0	5	0	9	2	0	1	7	3	1	2	17
0	5	1	11	2	0	2	9	3	1	3	20
0	5	2	13	2	0	3	12	3	1	4	23
0	5	3	15	2	0	4	14	3	1	5	27
0	5	4	17	2	0	5	16	3	2	0	14
0	5	5	19	2	1	0	7	3	2	1	17
1	0	0	2	2	1	1	9	3	2	2	20
1	0	1	4	2	1	2	12	3	2	3	24
1	0	2	6	2	1	3	14	3	2	4	27
1	0	3	8	2	1	4	17	3	2	5	31
1	0	4	10	2	1	5	19	3	3	0	17
1	0	5	12	2	2	0	9	3	3	1	21
1	1	0	4	2	2	1	12	3	3	2	24

Continúa

En la que:

NMP_c = Número más probable calculado para diluciones sucesivas diferentes de las diluciones sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

NMP_j = Número más probable leído en el cuadro 2 para la combinación específica de tubos positivos

F = Valor recíproco de la concentración intermedia de la serie cuyo NMP se desea calcular

Ejemplo: Si al analizar una muestra se emplearon las diluciones sucesivas correspondientes a 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , y la combinación de tubos positivos correspondió a la combinación 3 2 1, se calcula el NMP_c en la forma siguiente:

- Se busca en el cuadro 2 el NMP_j para la combinación 3 2 1 de tubos positivos, el cual corresponde al valor 17;
- Se obtiene el valor recíproco de la concentración intermedia de las diluciones sucesivas analizadas y que corresponde a 1 000, ya que la concentración intermedia de nuestro ejemplo es 10^{-3} ;
- Se aplica la fórmula:

$$NMP_c = \frac{17 \times 1\,000}{100} = 170$$

9. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis debe indicarse lo siguiente:

- El método usado, el número de tubos empleados para cada dilución y el resultado obtenido en la determinación.
- Cualquier condición no especificada en la norma, o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.
- Todos los detalles que permitan la completa identificación de la muestra.

10. CORRESPONDENCIA

Para la elaboración de la presente norma se tomaron en cuenta:

- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods of the American Public Health Association, 1976; y
- Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration, Bureau of Foods Division of Microbiology, 1978.

- ULTIMA LINEA -