

# *Republic of Ecuador*

## EDICT OF GOVERNMENT

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1529-10 (1998) (Spanish): Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad

BLANK PAGE





# INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

---

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 1 529-10:98**

---

---

## **CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECuentOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD.**

**Primera Edición**

FOODS MICROBIOLOGICAL CONTROL. MOLDS AND YASTS. PPLATE ACCOUNT BY DEEP SOWING.

First Edition

---

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras.  
AL 01.05-308  
CDU: 614.31:579.67:582.28  
CIU: 9320  
ICS: 07.100.30

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Opcional</b>	<b>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECuento EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD</b>	<b>NTE INEN 1 529-10:98 1998-01</b>
---	---	---

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno E8-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

## 1. OBJETO

1.1 Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra.

## 2. ALCANCE

2.1 Esta norma especifica el método de recuento, en placa, por siembra en profundidad, para el recuento de mohos y levaduras.

## 3. DEFINICIONES

**3.1 Mohos.** Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.

**3.2 Levaduras.** Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

**3.3 Recuento de mohos y levaduras viables.** Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.

## 4. RESUMEN

4.1 Este método se basa en el cultivo entre 22°C y 25°C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.

## 5. MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO

**5.1 Materiales.** La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.

*(Continúa)*

DESCRIPTORES: Productos alimenticios. Análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras

### 5.1.1 Placas Petri

5.1.2 Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm<sup>3</sup> graduadas en 1/10 de unidad.

### 5.2 Medio de cultivo

5.2.1 Agar sal-levadura de Davis o similar. Ver NTE INEN 1 529-1.

## 6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

## 7. PROCEDIMIENTO

7.1 Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm<sup>3</sup> de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

7.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm<sup>3</sup> de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ . La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

7.3 Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a Imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

7.4 Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite es mantenido mediante prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

7.5 Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm<sup>3</sup> del agar.

7.6 Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

7.7 Invertir las placas e incubarlas entre  $22^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$ , por cinco días.

7.8 Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

7.9 Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

(Continua)

**7.10** A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias pequeñas, éstas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico

**7.11** Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

### 7.12 Cálculos

**7.12.1** *Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra.* Calcular según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1m_2)d}$$

Donde:

$\sum C$  = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

$n_1$  = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

$n_2$  = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

$d$  = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo  $10^{-2}$ ;

$V$  = volumen del inóculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

Volumen sembrado	= 1 cm <sup>3</sup>
Dilución 10 <sup>-2</sup>	= 83 y 97 colonias
Dilución 10 <sup>-3</sup>	= 33 y 28 colonias
Número	= $\frac{83 + 97 + 33 + 28}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$

$$= \frac{241}{0,022}$$

$$= 10\ 954 \text{ expresado como } 1,1 \times 10^4$$

**7.12.2 Redondeo.** El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

**7.12.2.1** Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como  $5,5 \times 10^5$ . Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar  $1,1 \times 10^4$ .

(Continua)

**7.12.2.2** Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como  $3,2 \times 10^4$ . Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como  $2,4 \times 10^2$ , 24 500 redondear a 24 000 y expresar como  $2,4 \times 10^4$ .

### **7.12.3 Presentación de resultados**

**7.12.3.1** Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras /cm<sup>3</sup> ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10<sup>x</sup> (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas (7.12.1).

**7.12.3.2** Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10<sup>-1</sup>, presentar como número estimado (N<sub>E</sub>), de la siguiente forma:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = < 1,0 \times 10^1$$

**7.12.3.3** Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm<sup>3</sup> de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 = < 1,0 \times 10^0$$

**7.12.3.4** Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ o g} = > \text{al valor obtenido } x^{''f''}$$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N.

## **8. PRECISIÓN DEL MÉTODO**

### **8.1 Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.**

**8.1.1** Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

**8.1.2** Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde ± 16% a ± 52%. En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas.

(Continua)

## 9. INFORME DEL ENSAYO

**9.1** En el Informe del ensayo indicar la norma de referencia, la temperatura de incubación, los resultados obtenidos, todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma o aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra

*(Continua)*



## APÉNDICE Z

### Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 52:73	<i>Reglas para redondear números.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:94	<i>Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:94	<i>Control microbiológico de los alimentos. Toma y preparación de muestras.</i>

### Z. 2 BASES DE ESTUDIO

Norma International ISO 7954: 1987 *Microbiology - General guidance for enumeration of yeasts and moulds. Colony count technique at 25°C*. International Organization for Standardization. Switzerland, 1987.

Norma Internacional FIL - IDF 31: 1964. *Count of yeasts and moulds in butter*. International Dairy Federation Belgium - Brussels, 1964.

Mossel, D.A.A., Moreno García, B. "*Microbiología de los alimentos*" 1ra. edición española. Acribia. Zaragoza - España, 1982.

Harrigan, W.F., McCance, M.E. "*Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos*". Academia. León España, 1979.

Manual Food and Drug Administration Bureau of Foods Division of Microbiology, "*Bacteriológica analítica manual*" 5ta. Ed AOAC. Washington, DC, 1978.

Manual Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. "*Métodos de examen microbiológico para alimentos y bebidas*", Normas recomendadas. Manual práctico. Madrid, 1976.

Frazier, WIC. "*Microbiología de los alimentos*". Acribia. Zaragoza España, 1976.

I.C.M.S.F. "*Microorganismos de los alimentos 1*". Técnicas del análisis microbiológico. Acribia. Zaragoza España.



---

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre  
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815**

**Dirección General: E-Mail: [furresta@inen.gov.ec](mailto:furresta@inen.gov.ec)**

**Área Técnica de Normalización: E-Mail: [normalizacion@inen.gov.ec](mailto:normalizacion@inen.gov.ec)**

**Área Técnica de Certificación: E-Mail: [certificacion@inen.gov.ec](mailto:certificacion@inen.gov.ec)**

**Área Técnica de Verificación: E-Mail: [verificacion@inen.gov.ec](mailto:verificacion@inen.gov.ec)**

**Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: [inencati@inen.gov.ec](mailto:inencati@inen.gov.ec)**

**Regional Guayas: E-Mail: [inenguayas@inen.gov.ec](mailto:inenguayas@inen.gov.ec)**

**Regional Azuay: E-Mail: [inencuenca@inen.gov.ec](mailto:inencuenca@inen.gov.ec)**

**Regional Chimborazo: E-Mail: [inenriobamba@inen.gov.ec](mailto:inenriobamba@inen.gov.ec)**

**[URL:www.inen.gov.ec](http://www.inen.gov.ec)**