

## **NOTA IMPORTANTE:**

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

**ININ/ Oficina Nacional de Normalización**

**MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO  
HUMANO Y ANIMAL. GUIA GENERAL PARA LA  
ENUMERACION DE LEVADURAS Y MOHOS.  
TECNICA DE PLACA VERTIDA A 25 °C  
(ISO 7954:1987, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs. General guidance  
for enumeration of yeast and moulds. Colony count technique at 25 °C

---

ICS: 07.100.30

1. Edición

Abril 2002

**REPRODUCCION PROHIBIDA**

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.  
Teléf.: 830-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: [nc@ncnorma.cu](mailto:nc@ncnorma.cu)

## Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

### Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el NC/CTN No. 61 de Microbiología, integrado por las siguientes Instituciones:
  - Ministerio de Salud Pública (UNSA)
  - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
  - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
  - Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia (IIIA-MINAL)
  - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
  - Laboratorio Cuba-Control S.A (MINCEX)
  - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
  - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE-MINSAP)
  - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
  - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP- MIP)
  - Ministerio de Comercio Interior
  - Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ-ONN)
  - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la ISO 7954: 1987 *Microbiology. General guidance for enumeration of yeast and moulds. Colony count technique at 25 °C.*

Con independencia de la existencia de normas ISO para productos específicos como el caso de la ISO 6611: 1992. *Milk and milk products. Enumeration of colony forming units of yeasts and/or moulds. Colony count technique at 25 °C.* La NC-ISO 7954 se aplicará para todos los alimentos para consumo humano y de animales.

- Sustituye a la NC 76-04-2: 82: Determinación de Hongos filamentosos y levaduras viables.

## © NC, 2002

**Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:**

**Oficina Nacional de Normalización (NC).**

**Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.**

**Impreso en Cuba**

**MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL.  
GUIA GENERAL PARA LA ENUMERACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS.  
TÉCNICA DE PLACA VERTIDA A 25 °C**

## 1 Objeto

Esta norma cubana establece el método de análisis microbiológico para la determinación cuantitativa de levaduras y mohos en alimentos destinados al consumo humano y animal, a 25 °C.

**NOTA:** Debido a la naturaleza de las levaduras y mohos la técnica de conteo está sujeta a ciertas imprecisiones.

## 2 Referencias normativas

Las siguientes normas contienen disposiciones que, al ser citadas en este texto, constituyen disposiciones de esta Norma Cubana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos sobre la base de ellas que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente. La Oficina Nacional de Normalización posee en todo momento la información sobre las normas internacionales, regionales y cubanas en vigencia.

ISO 7218: 1996 *Microbiology – General instructions for microbiological examinations.*

ISO 6887: 1999 *Microbiology –General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination.*

## 3 Definición

Para el propósito de esta norma se aplica la siguiente definición:

levaduras y mohos: Microorganismos que a 25 °C forman colonias en un medio selectivo acorde al método especificado en esta norma. Para el caso de los mohos se pueden denominar también como hongos filamentosos.

## 4 Principio

**4.1** Preparación de placas vertidas usando un medio de cultivo con pH neutro al cual se le ha añadido un antibiótico, y una cantidad especificada de la muestra si el producto inicial es líquido o de una suspensión inicial en el caso de otros productos.

Preparación de otras placas bajo las mismas condiciones, usando diluciones decimales de la muestra de ensayo o de la suspensión inicial.

**4.2** La incubación de las placas es a 25 °C en aerobiosis por 3,4, hasta 5 días.

**4.3** El cálculo del número de levaduras y mohos por gramo o por mililitro de la muestra, parte del número de colonias obtenidas sobre placas encontradas a cada nivel de dilución que brinda un resultado significativo.

## 5 Diluentes y medios de cultivo.

### 5.1 Materiales básicos

Para mejorar la reproducibilidad de los resultados, se recomienda que para la preparación del medio de cultivo se usen componentes deshidratados o que sea utilizado un medio completo deshidratado. Deben seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

Los productos químicos usados deberán ser de calidad analítica reconocida.

El agua utilizada deberá ser agua destilada o desionizada, libre de sustancias que tengan poder inhibitorio de crecimiento de levaduras y mohos bajo las condiciones de ensayo.

Las medidas de pH deberán ser hechas usando un equipo medidor de pH (6.4) referido a una temperatura de 25 °C.

Si el diluyente y el medio de cultivo preparado no es usado inmediatamente deberá almacenarse en refrigeración, protegido de la luz, por un periodo de tiempo no mayor de un mes, en condiciones en las cuales no se produzca ningún cambio en su composición.

Los medios de cultivo con agar ya preparados, se fundirán en baño de agua y nunca sobre la llama. No se fundirán más de una vez. El medio una vez fundido no se utilizará pasadas las 6 horas.

### 5.2 Diluyente (ver NC-ISO 6887-1)

### 5.3 Medio Extracto de Levadura-Dextrosa-Cloranfenicol-Agar.

Extracto de levadura	5 g
Dextrosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20 g
Cloranfenicol ( C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0.1 g *
Agar	12 – 15 g **
Agua destilada	1000 mL

\* Para obtener una concentración final de 100 µg/mL de medio

\*\* Acorde a las instrucciones del fabricante.

Se disuelven los dos primeros ingredientes en el agua destilada, se ajusta el pH a 6.6, se disuelve el cloranfenicol en 3 mL de alcohol etílico, se añade el agar a los ingredientes disueltos en el agua destilada, se funde a la llama del mechero, se agrega la solución alcohólica de cloranfenicol, se distribuye el medio en recipientes adecuados (6.5) y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121°C

**NOTA:** El cloranfenicol puede ser reemplazado por la oxitetraciclina. En este caso se prepara el medio básico como se describió arriba, omitiendo el cloranfenicol, distribuir en cantidades de 100 mL y esterilizar. Prepare también una solución de hidrocloreto de oxitetraciclina al 0.1 % en agua y esterilizar por filtración. Justo previo a su uso, añada asépticamente 10 mL de esta solución a 100 mL del medio básico el cual ha sido previamente fundido y mantenido a 47±2 °C.

## 6 Aparatos y utensilios.

Aparatos usuales en el laboratorio de microbiología, y en particular los siguientes:

**6.1 Aparato para esterilización seca (horno) o para esterilización húmeda (autoclave).**

**6.2 Incubadoras;** a temperatura de  $(25\pm 1)$  °C.

**6.3 Baño de agua** de temperatura regulable ajustado de  $47\pm 2$  °C .

**6.4 Medidor de pH.**

**6.5 Frascos para cultivo.**

**6.6 Pipetas graduadas** con capacidad de 10 mL y 1 mL.

**6.7 Placas de Petri** de 90 mm a 100 mm de diámetro.

**6.8** Homogenizador con vaso esterilizable u homogenizador peristáltico.

## 7 Muestreo

Utilice un muestreo de acuerdo con una norma nacional o internacional establecida para el producto en cuestión.

Si no existe una norma nacional o internacional se recomienda que se realice el muestreo de acuerdo entre partes.

## 8 Preparación de la muestra de ensayo.

Prepare la muestra de ensayo de acuerdo con la norma específica para el producto en cuestión. Si no existe una norma específica se recomienda que se realice la preparación de la muestra de acuerdo entre las partes.

## 9 Procedimiento

**9.1** Preparación de la porción de ensayo, suspensión inicial y las diluciones (ver ISO 6887): A partir de la dilución  $10^{-1}$  se toma 1 mL de la misma y se lleva a un tubo para ensayo que contiene 9 mL de solución salina peptonada estéril. Se agita el tubo para homogeneizar el contenido del mismo obteniéndose así la dilución  $10^{-2}$ . Para obtener un número de diluciones se seguirá el mismo procedimiento y se utilizará una pipeta para cada dilución.

### 9.2 Inoculación e incubación

**9.2.1** Se cogen dos placas de Petri (6.7). Transfiera a cada placa con pipeta estéril (6.6) 1 mL de la muestra de ensayo, o 1 mL de la suspensión en el caso de otros productos.

**9.2.2** Se cogen otras dos placas de Petri (6.7). Transfiera a cada placa con pipeta estéril (6.6) 1 mL de la dilución  $10^{-1}$ , o 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  en el caso de otros productos.

Repetir el procedimiento descrito anteriormente usando otras diluciones si es necesario.

**9.2.3** Se añade a cada una de estas placas aproximadamente 15 mL del medio Extracto de levadura-dextrosa-cloranfenicol-agar (5.3) previamente fundido en baño de agua y mantenido a una temperatura de  $47 \pm 2$  °C (6.3), a partir de un frasco de cultivo (6.5) en cada placa de Petri. Se mezcla suavemente con el inóculo mediante movimientos de la placa hacia arriba y hacia abajo y rotatorios en la dirección y en contra de las agujas del reloj. Se repite 5 veces el movimiento evitando que el medio toque la tapa de las placas o se derrame por los bordes.

El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y el final de la siembra no debe exceder los 45 min.

Prepare la placa control con 15 mL de medio para controlar la esterilidad.

**9.2.4** Se deja solidificar el medio en las placas sobre una superficie nivelada, durante 5 min a 10 min. Después de solidificado el medio, se invierten las placas y se incuban a  $(25 \pm 1)$  °C durante un período de 5 días en una incubadora refrigerada.

### 9.3 Interpretación

Se revisarán las placas al tercer día de incubadas con el fin de detectar la presencia de mohos con micelio aéreo profuso y poder contarlos cuando aún sus colonias son pequeñas y evitar que puedan enmascarar el crecimiento de levaduras, de lo contrario a los 5 días será imposible dicho conteo. En este caso se anotará el resultado de la lectura de las placas, tanto de levaduras como de mohos, la fecha en que se realizó y se sacan de la incubación y se informará el tiempo de incubación.

Si es necesario proceda a un examen microscópico para distinguir las colonias de levaduras y de mohos de las colonias de bacterias, las cuales son mayormente de pequeño tamaño.

## 10 Expresión de los resultados

### 10.1 Cálculos

**10.1.1** Use cantidades a partir de placas que contengan menos de 150 colonias.

**10.1.2** El número de unidades formadoras de colonia de levaduras y mohos, por gramo o por mililitro, se calcula por la fórmula siguiente:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

donde:

$\Sigma$ : Sumatoria de las colonias contadas en todas las placas.

$n_1$ : Número de placas en la dilución más baja.

$n_2$ : Número de placas contadas en la dilución más alta.

d: Factor de la dilución para la dilución más baja (donde existe la más alta concentración de la muestra).

**10.1.3** Redondear el resultado obtenido en 10.1.2 a dos cifras significativas. Cuando el número a redondear es 5, redondee el número para obtener un número par a la izquierda, por ejemplo 28 500 se redondea a 28 000, 11 500 se redondea a 12 000.

**10.1.4** El resultado se expresará como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por  $10^x$ , donde x es la potencia apropiada de 10.

Si no existen colonias en las placas de la suspensión inicial (9.1), o si el producto inicial era sólido, el número de levaduras y mohos por gramo de producto se debe reportar como menor que 10.

Si no existen colonias en las placas de la muestra de ensayo, o si el producto inicial era líquido (9.1), el número de levaduras y mohos por mililitro de producto se debe reportar como menor que 1.

## 10.2 Ejemplo de cálculo

El conteo de levaduras y mohos da los siguientes resultados (dos placas de Petri por dilución fueron incubadas):

Dilución  $10^{-2}$ : 83 y 97 colonias.

Dilución  $10^{-3}$ : 33 y 28 colonias.

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)] 10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10\ 154$$

Redondeando el resultado de como se especifica en 10.1.3 da 11 000.

El número estimado de levaduras y mohos por gramo o por mililitro es por tanto  $1,1 \times 10^4$ .

## 10.3 Precisión

Por razones estadísticas en el 95 % de los casos los niveles de confianza para este método varían de  $\pm 16\%$  a  $\pm 52\%$  [1]. En la práctica se pueden observar grandes variaciones, particularmente entre los resultados obtenidos por diferentes microbiólogos.

## 11 Informe de ensayo



El informe de ensayo mostrará el método usado, el tiempo de incubación y los resultados obtenidos, indicando claramente el método de expresión empleado. Mencionará también cualquier detalle operativo no especificado en esta norma o considerado como opcional, junto con los detalles de cualquier incidente que haya influenciado los resultados.

El informe de ensayo incluirá toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.

**Bibliografia**

[1] COWELL and MORISETI. *J. Sci. Food Agric.*, 1969 (Vol. 20), p. 573.