
NORMA CUBANA

NC

ISO 21527-1: 2013
(Publicada por la ISO en 2008)

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS — PARTE 1: TÉCNICA DE CONTEO DE COLONIAS EN PRODUCTOS CON ACTIVIDAD DE AGUA MAYOR DE 0,95
(ISO 21527-1: 2008, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95

ICS: 07.100.30

1. Edición Julio 2013
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC) es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN-61 de Microbiología, el cual está integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Ministerio de Salud Pública (DNSA-MINSAP)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA - MES)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MIP)
 - Laboratorio de Alimentación Social (CID-CI. MINCIN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 21527-1:2008 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95*.

© NC, 2013

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

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Introducción

Debido a la gran variedad de alimentos, la aplicación del método horizontal especificado en la NC-ISO 21527 (todas las partes) puede que no resulte adecuada para algunos productos. En tal caso se pueden utilizar otros métodos diferentes, específicos para estos productos si resulta absolutamente necesario por razones técnicas justificadas. No obstante, se debería intentar por todos los medios aplicar el método especificado en la NC-ISO 21527 (todas las partes) tanto como sea posible.

Cuando la NC-ISO 21527 (todas las partes) sea revisada próximamente, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento sobre el grado de seguimiento de este método horizontal y las razones para desviarse de este método en curso de productos concretos.

La armonización de métodos de análisis no puede ser inmediata y, para ciertos grupos de productos, puede haber normas internacionales o nacionales que no cumplen con el método horizontal descrito en NC-ISO 21527 (todas las partes). Es de esperar que cuando dichas normas se revisen, se modifiquen para cumplir con la NC-ISO 21527 (todas las partes) para que llegue un momento donde sólo existan desviaciones a este método, necesarias por razones técnicas bien justificadas.

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL — MÉTODO HORIZONTAL PARA LA ENUMERACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS — PARTE 1: TÉCNICA DE CONTEO DE COLONIAS EN PRODUCTOS CON ACTIVIDAD DE AGUA MAYOR DE 0,95

Advertencia- Es necesario que la enumeración de moho sea llevada a cabo con mucho cuidado para proteger al técnico y evitar la contaminación ambiental con esporas.

1. Alcance

En esta parte de NC-ISO 21527 se especifica un método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras viables en productos con actividad de agua mayor que 0,95, destinados para el consumo humano o la alimentación de animales [huevos, carnes, productos lácteos (excepto leche en polvo), frutas, vegetales, pastas frescas, etc.] por medio de un conteo de colonias a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Referencias [1], [2]).

Esta parte de NC-ISO 21527 no permite la enumeración de esporas fúngicas. Tampoco la identificación de flora fúngica, ni el examen de alimentos en busca de micotoxinas está en el alcance de esta parte de la NC-ISO 21527. El método especificado en esta parte de NC-ISO 21527 no es apropiado para la enumeración de moho resistentes al calor, como *Byssochlamys fulva* o *Byssochlamys nivea*, en frutas y vegetales enlatados o embotellados.

2. Referencias normativas

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias con fecha, solo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha, se aplica a la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de esta)

ISO 6887 (todas las partes), *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y las diluciones decimales para examen microbiológico*

NC-ISO 7218 - *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reglas generales para los exámenes microbiológicos.*

ISO 8261 - *Leche y productos lácteos. Directrices generales para la preparación de las muestras de análisis, suspensiones iniciales y diluciones decimales para el examen microbiológico.*

NC-ISO 11133 (todas las partes), *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo.*

3. Términos y definiciones

Para los propósitos de esta Norma Cubana se aplican los siguientes términos y definiciones:

NOTA Existen algunas formas intermedias y la distinción entre una levadura (3.1) y un moho (3.2) puede ser arbitrario.

3.1 levadura

microorganismo mesófilo aerobio, que a 25 °C en un agar micológico y bajo las condiciones descritas en esta parte de la NC-ISO 21527, da lugar a **colonias** (3.4) mate o redondeadas brillantes con bordes definidos y más o menos convexas en la superficie del medio.

NOTA Levaduras que crezcan dentro del medio aparecen como colonias redondas lenticulares.

3.2

moho

microorganismo mesófilo aerobio filamentoso, que a 25 °C en la superficie de un agar micológico y con las condiciones especificadas en esta parte de la NC-ISO 21527, da a lugar a propágulos/gérmenes (3.3) o colonias (3.4) planas o algodonosas a menudo con estructuras coloreadas o esporangios.

NOTA Moho que crezcan dentro del medio aparecen como colonias redondas lenticulares.

3.3.

propágulo

germen

entidad viable capaz de crecer en medio nutriente.

EJEMPLO Célula vegetativa, grupo de células, esporas, esporangios, micelio, etc.
[ISO 6107-6/2004, 65]

3.4.

colonias

Acumulación visible y localizada de masa microbiana desarrollada en un medio sólido nutriente a partir de una partícula viable. [ISO 6107-6/2004, 65]

4. Principio

4.1 Placas inoculadas en superficie se preparan utilizando un medio selectivo específico. Dependiendo del número de colonias esperado, se utiliza una cantidad determinada de la muestra para análisis si el producto es líquido o diluciones decimales del producto/suspensión inicial (en el caso de otros productos)

Se pueden preparar placas adicionales bajo las mismas condiciones, empleando diluciones decimales de la muestra o de la suspensión inicial.

4.2 Las placas son incubadas aeróbicamente a 25 °C ± 1 °C por 5 días. De ser necesario, las placas pueden dejarse bajo una luz difusa por 1 o 2 días.

4.3 Se cuentan los propágulos/colonias y si es requerido (para distinguir colonias de levaduras de las colonias bacterianas), la identidad de cualquier colonia dudosa se confirmará por examen en un estereoscopio o microscopio.

4.4 El número de mohos o levaduras por gramo o mililitro de muestra se calcula a partir del número de colonias/propágulos/gérmenes obtenidos de las placas escogidas a la dilución que las colonias sean contables. Moho y levaduras son contados por separados, de ser necesario.

5 Diluentes y medio de cultivos

Para la práctica en el laboratorio ver ISO 6887 (todas las partes) e ISO 8261.

5.1 Diluyente

5.1.1 General

Ver ISO 6887 (todas las partes), ISO 8261 y la norma específica para el producto con el que se trabaja

NOTA Es posible añadir agentes tensoactivos como por ejemplo: poli(oxyethylene)sorbitanmonooleato de sodio¹ [0,05 % (concentración másica)] al diluyente para reducir la pérdida de esporas y conidios (Referencia[2]).

Excepto para el uso de un diluyente en una preparación de la muestra específica, se recomienda el uso de agua peptonada 0,1% como diluyente.

5.1.2 Composición de Agua Peptonada 0,1% (concentración másica)

Digerido enzimático de tejidos animales o vegetales	1,0 g
Agua destilada	1000 mL

5.1.3 Preparación de Agua Peptonada 0,1%(concentración másica)

Disolver los componentes en el agua destilada, calentando si es necesario.

Ajustar pH de ser necesario para que después de la esterilización sea de $7,0 \pm 0,2$ a 25°C .

5.2 Medio de cultivo

5.2.1 Agar dicloran-rosa bengala cloranfenicol (DRBC) (Referencias [3], [4])

5.2.1.1 Composición

Digerido enzimático de tejidos animales o vegetales	5,0 g
D-Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	10,0 g
Dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4)	1,0 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina)	0,002 g
Rosa bengala	0,025 g
Agar	12 g to 15 g ^a
Cloranfenicol	0,1 g
Agua, destilada o deionizada	1000 mL
^a Dependiendo de la capacidad de gelificación del agar	

¹ Tween 80 es un ejemplo de un producto adecuado y disponible comercialmente. Esta información se da para la comodidad de los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una aprobación por la ISO de este producto.

5.2.1.2 Preparación

5.2.1.2.1 General

Suspender todos los ingredientes excepto el cloranfenicol en el agua y hervir hasta disolver completamente. Si es necesario, ajustar el pH (6.4) para que después de la esterilización sea $5,6 \pm 0,2$ a 25°C .

Añadir 10 mL de una solución de cloranfenicol en etanol 1 % (concentración másica) y mezclar. Dispensar el medio en contenedores apropiados (6.5) de capacidad apropiada. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Inmediatamente, enfriar el medio en un baño de agua (6.3) mantenido a la temperatura de 44°C a 47°C . Dispensar 15 mL en placas Petri estériles (6.6).

Dejar solidificar el medio, y si es necesario secar la superficie de las placas como se describe en la NC-ISO 7218 e NC-ISO/TS 11133 (todas las partes).

Usar inmediatamente, o almacenar en la oscuridad, de acuerdo con la NC-ISO/TS 11133 (todas las partes) hasta que se utilice.

PELIGRO — Evite la exposición del medio a la luz, ya que se pueden producir citotóxicos que afecten la flora micológica en las muestras.

5.2.1.2.2 Adición opcional de clortetraciclina hidrocloreídrica

Cuando el sobrecrecimiento bacteriano sea un problema (ejemplo: carnes crudas), se recomienda utilizar cloranfenicol (50 mg/L) y clortetraciclina (50 mg/L). En este caso preparar el medio base como se describe arriba, con sólo 50 mg de cloranfenicol, dispénselo en cantidades de 100 mL y esterilice. Preparar además una solución al 0,1 % de clortetraciclina hidrocloreídrica en agua (debe ser preparada al momento pues es relativamente inestable) y esterilizarla por filtración. Justo antes de usar el medio, añadir asepticamente 5 mL de esta solución a 100 mL del medio y distribuir en placas. Gentamicina no es recomendada, ya que se ha reportado que causa inhibición en algunas especies de levaduras.

5.2.1.2.3 Adición opcional elementos traza

Para que los mohos puedan exhibir su morfología completa, particularmente algunos pigmentos que producen normalmente, necesitan elementos traza que pueden no estar presentes en el medio DRBC. Para identificar moho en este medio, adicionar los siguientes elementos traza a 1 mL/L, antes de auclavear: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; agua destilada o deionizada 100 ml (Referencia [1]).

5.2.1.2.4 Adición opcional de Tergitol ²

Para evitar sobrecrecimiento de Mucoraceae en las placas de agar, es recomendada la adición de Tergitol (1 ml/L) al medio de cultivo.

² Ejemplo de un producto adecuado disponible comercialmente. Esta información se da para la comodidad de los usuarios de esta norma internacional, pero no constituye una aprobación por la ISO de este producto.

5.2.1.3 Control de Calidad del medio de cultivo

5.2.1.3.1 General

DRBC es un medio sólido. La productividad y selectividad debe ser llevada a cabo de acuerdo a la NC-ISO/TS 11133 (todas las partes) siguiendo estas especificaciones:

5.2.1.3.2 Productividad

Incubación: 5 d a 25 °C ± 1 °C

Cepas: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Candida albicans ATCC 10231

Aspergillus niger ATCC 16404

Mucor racemosus ATCC 42647

U otras cepas que sean el equivalente en otras colecciones de mohos.

Medio de referencia: Agar Sabouraud Dextrosa validado

Método de control: Cuantitativo

Criterio: Rango de productividad, PR ≥ 0,5

Reacción característica: Colonias/propágulos/gérmenes característicos de acuerdo a cada especie.

5.2.1.3.3 Selectividad

Incubación: 5 d a 25 °C ± 1 °C

Cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6633

U otras cepas que sean el equivalente en otras colecciones de mohos.

Método de control: Cualitativo

Criterio: Inhibición total

6 Aparatos y cristalería

Los aparatos desechables son una alternativa aceptable para la cristalería reutilizable si estos tienen las especificaciones adecuadas.

Equipos usuales en el laboratorio de microbiología (ver NC-ISO 7218), y en particular los siguientes:

6.1 Incubadora, regulable a 25 °C ± 1 °C

6.2 Pipetas de flujo total, estériles de 1 mL de capacidad nominal y graduadas en divisiones de 0,1 mL.

6.3 Baño de agua, o equipo similar, regulable de 44°C a 47°C.

6.4 pH-metro, con precisión de ± 0,1 unidad de pH a 25°C.

6.5 Frascos, pomos y tubos de ensayo, para hervir y almacenar el medio de cultivo y hacer diluciones.

6.6 Placas Petri, de cristal o plástico, de 90 mm a 100 mm de diámetro.

6.7 Microscopio, para diferenciar levaduras de células bacterianas (campo claro, aumento de 250 a 1000 veces)

6.8 Espátulas de Drigalski, hechas de vidrio o plástico (con largo menor de 80 mm y diámetro menor de 2 mm). El diámetro no debe exceder los 2 mm para minimizar la cantidad de muestra que se adhiera a la espátula en el procedimiento de inoculación.

6.9 Estereomicroscopio, para discriminar y diferenciar colonias/células de levaduras y moho (aumento de 6.5 a 50 veces)

7 Toma de muestra

Una muestra representativa debe ser enviada al laboratorio. No debe haber sido dañada ni cambiada durante la transportación y el almacenamiento. La muestra de laboratorio no se puede congelar.

La toma de muestra no constituye una parte del método especificado en esta parte de la NC-ISO 21527. El muestreo debe realizarse de acuerdo con la norma para el producto en cuestión. Si no existe una norma para la toma de muestras del producto de que se trata, se recomienda que las partes interesadas adopten un acuerdo sobre este punto.

8 Preparación de la muestra

La muestra para análisis se preparará de acuerdo con las Normas ISO 6887 (todas las partes), NC-ISO 7218, ISO 8261 y la norma específica para el producto que se trata. Si no existe una norma, se recomienda que las partes interesadas adopten un acuerdo sobre este punto.

9 Procedimiento

9.1 Porción de ensayo, suspensión inicial y diluciones

Prepare la porción de ensayo, suspensión inicial (dilución primaria) y demás diluciones de acuerdo a la ISO 6887 (todas las partes), NC-ISO 7218, ISO 8261 y la Norma específica del producto en cuestión.

Excepto para la preparación específica de la porción de ensayo, es recomendable utilizar agua de peptona 0,1 % (5.1.3) como diluyente. Utilice un homogenizador peristáltico en vez de un agitador o una batidora).

Debido a la rápida sedimentación de las esporas, la pipeta (6.2) no debe permanecer en posición horizontal (no vertical) cuando se llene con el volumen apropiado de suspensión inicial o diluciones.

Agite la suspensión inicial y las diluciones para evitar la sedimentación de partículas que contengan microorganismos.

9.2 Siembra e incubación

9.2.1 A una placa con medio DRBC (5.2.1), usando una pipeta estéril (6.2) transferir 0,1 mL de la muestra de ensayo, si la muestra a estudiar es un producto líquido o 0,1 mL de la suspensión inicial en el caso de otros productos (Cláusula 8).

En otra placa con medio DRBC, usando una pipeta estéril (6.2), transferir 0,1 mL de la primera dilución decimal (10^{-1}) (productos líquidos) o 0,1 mL de la dilución 10^{-2} (otros productos). Para facilitar la enumeración de bajas poblaciones de moho y levaduras, se pueden inocular 0,3 mL de la dilución 10^{-1} repartido entre 3 placas.

Repetir el procedimiento con las diluciones subsiguientes, usando una nueva pipeta estéril para cada dilución decimal.

NOTA Si se sospecha de la presencia de moho de crecimiento rápido usar NC-ISO 21527-2 [6].

9.2.2 Extender el líquido sobre la superficie del agar con la espátula de Drigalski (6.8) hasta que esté completamente absorbido en el medio.

La inoculación de placas por el método de placa vertida también puede utilizarse, pero en este caso la equivalencia entre estos resultados y los obtenidos por la técnica de inoculación en la superficie del agar debe estar validada y no será admisible la discriminación y diferenciación de moho y levaduras. El método de extensión del inóculo por la superficie del agar puede dar conteos mas elevados de microorganismos, ya que facilita la exposición de las células al oxígeno atmosférico y evita el riesgo de inactivación por calor de los propágulos fúngicos. Los resultados pueden depender del tipo de hongo.

9.2.3 Invertir las placas preparadas (9.2.2) e incubar aeróbicamente en incubadora (6.1) a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días. De ser necesario, deje las placas por 1 o 2 días bajo luz difusa. Se recomienda incubar las placas (6.6) en una bolsa plástica abierta para no contaminar la incubadora en caso que los mohos crezcan tanto que salgan de las placas.

9.3 Conteo y selección de las colonias para confirmación

Lea las placas entre el segundo y el quinto día de incubación. Seleccione las placas (9.2.3) que contengan menos de 150 colonias/propágulos/gérmes y cuente estos colonias/propágulos/gérmes. Si los mohos de rápido crecimiento interfieren pues, cuente las colonias/propágulos/gérmes después del segundo día y vuelva a contar después del quinto día de incubación.

NOTA 1 La enumeración de levaduras y especialmente de moho es muy imprecisa porque consiste en una mezcla de micelios y esporas sexuales y asexuales. Los números de unidades de formación de colonia dependen del grado de fragmentación del micelio y la proporción de esporas capaces de germinar en la placa con medio de cultivo.

NOTA 2 Usualmente hay conteos no lineales entre las placas de las diluciones, ejemplo diluciones en base 10 de la muestra no siempre resultan reducciones en base 10 del número de colonias leídas en las placas de medio. Esto se ha atribuido a la fragmentación del micelio y a la ruptura de los esporangios durante la dilución en adición a la inhibición competitiva cuando hay grandes números de colonias en las placas.

ADVERTENCIA — Las esporas de los mohos se dispersan en el aire fácilmente, se deben manipular las placas Petri con mucho cuidado para evitar el desarrollo de colonias satélites que puedan dar una sobreestimación de la población de la muestra.

De ser necesario, lleve a cabo la lectura con un estereomicroscopio (6.9) o con un microscopio (6.7) para distinguir entre células de levaduras, moho y bacterias.

Cuente las colonias de levaduras y las colonias/propágulos/gérmenes de moho separadamente de ser necesario.

Para la identificación de levaduras y moho, seleccione áreas de crecimiento fúngico y tómela para una exhaustiva examinación al microscopio o inocule para aislamiento o en un medio de identificación.

10 Expresión de los resultados y límites de confianza

Ver NC-ISO 7218.

Guarde los datos de las colonias de levaduras y las colonias/propágulos/gérmenes de moho separadamente de ser necesario.

11 Reporte del análisis

El informe del análisis deberá especificar:

- a) Toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra;
- b) El método de toma de muestras empleado, si se conoce;
- c) El método de análisis empleado, con referencia a esta parte de la NC-ISO 21527;
- d) Todos los detalles operativos no especificados en esta norma, o considerados opcionales, junto con los detalles de todo tipo de incidencias que pudieran haber afectado a el/los resultado(s) del análisis;
- e) Los resultados del análisis obtenido.

Bibliografía

- [1] BELL, C., NEAVES, P., WILLIAMS, A.P. Food microbiology and laboratory practice. Blackwell, Oxford, 2005. 324 p.
- [2] BEUCHAT, L.R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. In: CORRY, J.E.L., CURTIS, G.D.W., BAIRD, R.M., editors. Handbook of culture media for food microbiology, pp. 369-386. Elsevier, Amsterdam, 2003. (Progress in industrial microbiology, Vol 37)
- [3] BEUCHAT, L.R., FRÄNDBERG, E., DEAK, T., ALZAMORA, S.M., CHEN, J., GUERRERO, A.S., LÓPEZMALO, A., OHLSSON, I., OLSEN, M., PEINADO, J.M., SCHNURER, J., DE SILONIZ, M.I., TORNAI-LEHOCZKI, J. (2001) Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: An interlaboratory study. Int. J. Food Microbiol. 2001, 70, pp. 89-96
- [4] KING JR, A.D., HOCKING, A.D., PITT, J.I. (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl. Environ. Microbiol. 1979, 37, pp. 959-964
- [5] ISO 6107-6:2004, Water quality — Vocabulary — Part 6
- [6] ISO 21527-2, Microbiology of food and animal feedings stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95