



Quito - Ecuador

---

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 1529-10:2013**  
**Primera revisión**

---

---

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

**Primera edición**

MICROBIOLOGICAL CONTROL FOODS. MOLDS AND YEASTS VIABLE. PLATE CONUNTS BY SEEDING DEPTH

First edition

---

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras  
AL 01.05-308  
CDU: 664.31:579.67:582.28  
CIU: 9320  
ICS: 07.100.30

<b>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</b>	<b>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS MOHOS Y LEVADURAS VIABLES RECUENTOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD</b>	<b>NTE INEN 1529-10:2013 Primera revisión 2013-09</b>
---	--	---

## 1. OBJETO

1.1 Esta norma establece las condiciones que se deben aplicar para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra.

## 2. ALCANCE

2.1 Los procedimientos establecidos en esta norma para la cuantificación del número de unidades propagadoras de mohos y levaduras es adecuado para las muestras que posean una alta carga microbiana.

## 3. DEFINICIONES

3.1 Para efectos de esta norma, se adoptan las siguientes definiciones:

3.1.1 *Mohos*. microorganismos aerobios mesó filos filamentosos que, crecen en la superficie del agar micológico, se desarrollan generalmente en forma plana o esponjosa.

3.1.2 *Levaduras*. microorganismos aerobios mesó filos que se desarrollan a 25°C usando un medio de agar micológico; desarrolla colonias redondas mate o brillante que crecen en la superficie del medio, que usualmente tienen un contorno regular y una superficie más o menos convexa. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovoidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada en forma de micelio verdadero 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.

3.1.3 *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.

3.1.4 *Colonia*: acumulación localizada visible de la masa microbiana desarrollada sobre o en un medio nutriente sólido a partir de un viable partícula

## 4. MÉTODO DE ENSAYO

### 4.1 Resumen

4.1.1 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.

### 4.2 Material y medios de cultivo

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

#### 4.2.1.1 Placas Petri

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

#### 4.2.1.3 Esparcidores

#### 4.2.2 Medios de cultivo

4.2.2.1 Agar sal-levaduras de Davis o similar. Ver NTE INEN 1529-1.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras.

**4.2.2.2** Se puede adicionar de manera opcional clorhidrato de clortetraciclina. Cuando existe sobre crecimiento bacteriano puede ser un problema (por ejemplo, las carnes crudas), se recomienda usar cloranfenicol (50 mg / l) y clortetraciclina (50 mg / l), preparar el medio de base, con sólo 50 mg de cloranfenicol, se dispense en cantidades de 100 ml y se esteriliza. Prepara también un 0,1% (en masa concentración) solución de clorhidrato de clortetraciclina en agua (relativamente inestables en solución, que debe ser recién preparada) y esterilizar por filtración. Justo antes de usar, añadir 5 ml de esta solución asépticamente a 100 ml del medio de base, y verter en placas. La gentamicina no es recomendable, ya que se ha informado que puede causar inhibición de algunas especies de levaduras (ver nota 1).

**4.2.2.3** Adición opcional de elementos traza. A fin de que los mohos exhiban su morfología completa, en particular los pigmentos que producen normalmente, necesitan rastrear los elementos que no pueden estar presentes en DRBC (Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar). Para identificar estos mohos en este medio, agregue la siguiente traza solución de elementos en 1 ml por litro del medio, antes de la esterilización en autoclave:  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1g;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,5 g; agua, destilada o des ionizada 100 ml.

**4.2.2.3** Adición opcional de Tergitol. Con el fin de evitar el crecimiento excesivo de Mucoraceae en placas de agar, la adición de Tergitol (1 ml/l) al medio de cultivo es recomendada.

**4.2.2.5** Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar (DRBC); usado en productos cuya Aw es mayor de 0,95.

**4.2.2.6** Dichloran glicerol 18% (concentración de masa) agar (DG18); utilizado para productos con actividad de agua inferior o igual a 0,95.

### **4.3 Preparación de la muestra**

**4.3.1** Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1529-2.

### **4.4 Procedimiento**

**4.4.1** Debido a la rápida sedimentación de las esporas en la pipeta, mantener la pipeta en una posición horizontal (no vertical) posicionarse cuando se llena con el volumen apropiado de la suspensión inicial y diluciones. Agitar la suspensión inicial y diluciones con el fin de evitar la sedimentación de microorganismo que contienen partículas.

**4.4.2** Inoculación e incubación. Sobre una placa de agar previamente fundido, utilizando una pipeta estéril, transferir 0,1 ml de la muestra si es líquido, o 0,1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Sobre una segunda placa de agar, utilizando una pipeta estéril fresco, transferir 0,1 ml de la dilución decimal primera ( $10^{-1}$ ) dilución (producto líquido), o 0,1 ml de la dilución  $10^{-2}$  (otros productos). Para facilitar el recuento de bajas poblaciones de levaduras y mohos, los volúmenes pueden llegar hasta 0,3 ml de una dilución  $10^{-1}$  de muestra, o de la muestra de prueba, si es líquido, puede ser extendido en tres placas. Repetir estas operaciones con diluciones posteriores, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal. Si se sospecha un rápido crecimiento de mohos se sospecha, extender el líquido sobre la superficie de la placa de agar con un esparcidor estéril hasta que el líquido se encuentre completamente absorbido en el medio.

**4.2.3** También se inoculan las placas por el método de vertido, pero en este caso la equivalencia de los resultados serán validados en comparación con la inoculación en superficie, además la discriminación y la diferenciación de los mohos y levaduras no son admisibles. El método de difusión en la superficie puede dar mayor enumeración. La técnica de propagación de placa facilita la máxima exposición de las células al oxígeno atmosférico y evita cualquier riesgo de inactivación térmica de los propágulos fúngicos. Los resultados pueden depender del tipo de hongos.

**4.2.4** Incubar las placas preparadas aeróbicamente, con las tapas superiores en posición vertical en la incubadora a  $25^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$  durante 5 días. Si es necesario, deje las placas de agar de pie con luz natural difusa durante 1 día a 2 días. Se recomienda incubar las placas en una bolsa de plástico abierta con el fin de no contaminar la incubadora en el caso de la difusión de los mohos de los platos.

NOTA 1. Evite la exposición del medio a la luz, ya que los productos cito tóxicos pueden degradarse y dar lugar a la subestimación del mico Flora en las muestras.

(Continúa)

**4.4.5** Recuento y selección de colonias para la confirmación. Leer las placas entre 2 días y 5 días de incubación. Seleccionar los platos que contienen menos de 150 colonias y contarlas. Si estos mohos son de rápido crecimiento puede ser un problema, al momento del conteo, por ello se recomienda realizar un recuento a los 2 días y otra vez después de 5 días de incubación (Ver nota 2 y 3).

**4.4.6** Contar las colonias de levaduras y las colonias de mohos por separado, si es necesario. Para la identificación de levaduras y mohos, seleccionar áreas de crecimiento de hongos y examinar con el microscopio o inocular en el medio adecuado para su aislamiento.

## 4.5 Cálculos

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

$$N = \frac{\text{numero total de colonias contada o calculadas}}{\text{Cantidad total de muestra sembrada}} \quad (1)$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1m_2)} \quad (2)$$

En donde:

$\sum C$  = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegida;  
 $n_1$  = 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  $10^{-2}$  = 83 y 97 colonias  
 Dilución  $10^{-3}$  = 30 y 28 colonias

$$\begin{aligned} \text{Número} &= \frac{83+97+33+28}{1(2+0,1 \times 2)} \\ &= \frac{241}{0,022} \\ &= 10\,954 \text{ expresado como } 1,1 \times 10^4 \end{aligned}$$

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

**4.5.2.1** Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y remplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 533 000, 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  $1,1 \times 10^4$ .

**4.5.2.2** Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es segundo de, por lo menos. Un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y remplazar 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 cantidad 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  $2,4 \times 10^4$ .

NOTA 2. Los métodos de enumeración para levaduras y mohos en especial son imprecisos debido a que consisten de una mezcla de micelio y esporas asexuales y sexuales. El número de unidades formadoras de colonias dependerá del grado de fragmentación de los micelios y la proporción de esporas capaces de crecer en el medio de recubrimiento

NOTA 3 PRECAUCIÓN - Las esporas de mohos se dispersan en el aire con gran facilidad, manejar las placas Petri con cuidado para evitar el desarrollo de colonias satélites que darían lugar a una sobrestimación de la población en la muestra. Si es necesario, llevar a cabo un examen con una lupa binocular o con un microscopio con el fin de distinguir entre las células de levaduras o mohos y bacterias de colonias.

(Continúa)

### 4.5.3 Presentación de resultados

**4.5.3.1** 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>n</sup> (n 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 (4.5.1).

**4.5.3.2** Si no hay desarrollo de colonias en las placas de las suspensión 10<sup>-1</sup>, presentar como número estimado ( $N_E$ ), de las siguientes formas;

$$N_E \frac{\text{de UP de mohos o levaduras}}{\text{g o cm}^3} = < 1,0 * 10 \quad (3)$$

**4.5.3.3** si no hay desarrollo de las 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:

$$N_E \frac{\text{de UP de mohos o levaduras}}{\text{g o cm}^3} = < 1,0 * 10 \quad (4)$$

**4.5.3.4** 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

$$N_E \frac{\text{de UP de mohos y/o levaduras}}{\text{cm}^3 \text{ o g}} = > \text{al valor obtenido} * f \quad (5)$$

$$f = \text{factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra)} \quad (6)$$

**4.5.3.5** 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.

### 4.6 Precisión del método

**4.6.1** Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.

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

**4.6.1.2** 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.

## 5. INFORME DE RESULTADOS

**5.1** 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.

(Continúa)

## APÉNDICE Z

### Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 52	<i>Reglas para redondear números.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-1	<i>Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2	<i>Control microbiológico de los alimentos. Preparación de muestras.</i>

### Z.2 BASES DE ESTUDIO

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. Ginebra, 2008.

Norma Internacional. ISO 21527-2:2008. *Microbiology of food and animal feeding 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. Ginebra, 2008.

## INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

---

**Documento:** TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS Código:  
NTE INEN ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. AL 01.05-308  
1529-10 RECUENTOS EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD  
**Primera revisión**

---

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha anterior de aprobación por Consejo Directivo 1995-01-10 Oficialización con el Carácter de Voluntaria por Acuerdo No. 0429 de 1997-12-29 publicado en el Registro Oficial No. 229 de 1998-01-06  Fecha de iniciación del estudio: 2012-07-30
---	---

---

Fechas de consulta pública: 2012-12-03 a 2013-01-02

---

Subcomité Técnico de:

Fecha de iniciación:

Fecha de aprobación:

Integrantes del Subcomité:

**NOMBRES:**

**INSTITUCIÓN REPRESENTADA:**

Mediante compromiso presidencial N° 16364, el Instituto Ecuatoriano de Normalización – INEN, en vista de la necesidad urgente, resuelve actualizar el acervo normativo en base al estado del arte y con el objetivo de atender a los sectores priorizados así como a todos los sectores productivos del país.

Para la revisión de esta Norma Técnica se ha considerado el nivel jerárquico de la normalización, habiendo el INEN realizado un análisis que ha determinado su conveniente aplicación en el país.

La Norma en referencia ha sido sometida a consulta pública por un período de 30 días y por ser considerada EMERGENTE no ha ingresado a Subcomité Técnico.

---

Otros trámites: Esta NTE INEN 1529-10:2013 (Primera revisión), anula a la NTE INEN 172:1975 y reemplaza a la NTE INEN 1529-10:1998

---

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

---

Oficializada como: Voluntaria  
Registro Oficial No. 83 de 2013-09-18

Por Resolución No. 13285 de 2013-08-13

---

**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: [direccion@inen.gob.ec](mailto:direccion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Normalización: E-Mail: [normalizacion@inen.gob.ec](mailto:normalizacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Certificación: E-Mail: [certificacion@inen.gob.ec](mailto:certificacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Verificación: E-Mail: [verificacion@inen.gob.ec](mailto:verificacion@inen.gob.ec)  
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: [inenlaboratorios@inen.gob.ec](mailto:inenlaboratorios@inen.gob.ec)  
Regional Guayas: E-Mail: [inenguayas@inen.gob.ec](mailto:inenguayas@inen.gob.ec)  
Regional Azuay: E-Mail: [inencuenca@inen.gob.ec](mailto:inencuenca@inen.gob.ec)  
Regional Chimborazo: E-Mail: [inenriobamba@inen.gob.ec](mailto:inenriobamba@inen.gob.ec)  
URL: [www.inen.gob.ec](http://www.inen.gob.ec)**