

NORDOM 248 (1ra Rev.)

CT: 67 - 1

Coordinadora: Modesta Acosta

Leche y productos lácteos — Enumeración de unidades formadoras de colonias de levaduras y/o mohos — Técnica de recuentos de colonias a 25 °C

ANTEPROYECTO

Contenido

Prefacio	iii
1 Objeto y campo de aplicación.....	1
1.1 Objeto.....	1
1.2 Campo de aplicación.....	1
2 Referencias normativas.....	1
3 Términos y definiciones.....	1
4 Principio.....	1
5 Aparatos.....	1
6 Reactivos.....	2
7 Preparación de la muestra	4
7.1 Leche concentrada azucarada (Leche condensada).....	4
7.2 Leche en polvo	4
7.3 Mantequilla.....	4
8 Procedimiento	5
8.1 Inoculación en placas de Petri	5
8.2 Incubación de los cultivos	5
8.3 Recuento de colonias.....	5
9 Expresión de los resultados.....	5
Bibliografía	6

Prefacio

El Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL) es el organismo oficial que tiene a su cargo el estudio y preparación de las Normas Dominicanas (NORDOM) a nivel nacional. Es miembro de la Organización Internacional de Normalización (ISO), de la Comisión Internacional de Electrotécnica (IEC), de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) y de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT), y representa a la República Dominicana ante estos organismos.

La norma **NORDOM 248 (1ra Rev.) Leche y productos lácteos—Enumeración de unidades formadoras de colonias de levaduras y / mohos – Técnica de recuentos de colonias a 25 °C**, ha sido preparada por la Dirección de Normalización del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL).

El estudio de la citada norma estuvo a cargo del Comité Técnico 67-1 Leche y productos lácteos, integrado por representantes de los sectores privado, consumidor, oficial y academia, quienes iniciaron su trabajo tomando como base la **NORDOM 248 Leche y productos lácteos—Determinación de hongos y levaduras** y la norma **ISO 6611 IDF 94 Leche y productos lácteos. Enumeración de unidades formadoras de colonias de levaduras y/o mohos. Técnica de recuentos de colonias a 25 °C**, de las cuales partió la propuesta a ser estudiada por el comité.

Dicha Propuesta de norma fue aprobada como anteproyecto de norma por el Comité Técnico de Trabajo, en la reunión No. xx de fecha xx y enviado a consulta pública, por un período de 60 días.

Formaron parte del comité técnico, las entidades y personas naturales siguientes:

PARTICIPANTES:	REPRESENTANTES DE:
Miguel Acosta	Ministerio de Industria, Comercio y MiPymes (MICM)
Leomilka Jiménez Roxanna De la Cruz	Instituto Nacional de Protección de los Derechos del Consumidor (Pro Consumidor)
Mariana Furakis Yuderky Pérez Leandro Vargas	Consejo Nacional de Reglamentación y Fomento de la Industria Lechera (CONALECHE)
Lauren Vargas	Pasteurizadora Rica
Svetlana Afanasieva Levis Medina Martina Jiménez	Programa de Nutrición del Viceministerio de Salud Colectiva, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MISPAS)
Sarah Burgos	Asociación de Industrias de la República Dominicana (AIRD)
Rosa Houllermont Glenny Almonte	Grupo SID
Rosanna Figuereo Nancy Cruz	Grupo Lácteo del Caribe (Dos Pinos)
Fernando Disla Pedro De Padua Ana María Martin	Dirección General de Medicamentos, Alimentos y Productos Sanitarios (DIGEMAPS)

Denise Candelario	Productos Químicos Industriales (PQI)
José Valenzuela	Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU)
Kareddy Cohen	Nestlé Dominicana, S. A.
Isael Ramón Valenzuela Eva Navarro Priscilla Germosén Betty Belén	Laboratorio de Evaluación de Productos de Consumo Humano (LEPCH)
Félix Aquino De la Cruz	Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD)
Julia Carrasco	Sigma Alimentos, S.A.
Águeda Placencia	Asociación Dominicana de Procesadores Lácteos y Derivados (ADOPROLAD)
Modesta Acosta	Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL)

Leche y productos lácteos – Enumeración de unidades formadoras de colonias de levaduras y/o mohos – Técnica de recuentos de colonias a 25 °C

ADVERTENCIA — El uso de esta norma puede implicar materiales, operaciones y equipos peligrosos. No pretende abordar todos los problemas de seguridad asociados con su uso. Es responsabilidad del usuario, establecer prácticas de seguridad y salud y determinar la aplicabilidad de las limitaciones reglamentarias antes de su uso.

1 Objeto y campo de aplicación

1.1 Objeto

Esta norma especifica un método para la detección y enumeración de unidades formadoras de colonias (UFC) de levaduras y/o mohos viables en leche y productos lácteos mediante la técnica de recuento de colonias en 25 °C.

1.2 Campo de aplicación

Esta norma aplica a la leche y a los productos lácteos: leche en polvo, leche condensada, mantequilla, yogur y queso, destinados al consumo directo y a la elaboración ulterior.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos se mencionan en el texto de tal manera que parte o todo su contenido constituye requisitos de este documento. Para las referencias con fecha, aplica la edición citada. Para referencias sin fecha, aplica la última edición del documento de referencia (incluidas las enmiendas).

NORDOM 30, Toma de muestra de la leche y los productos lácteos

3 Términos y definiciones

A los efectos de este documento, se aplican los siguientes términos y definiciones.

3.1

Levaduras y mohos

Microorganismos que a 25 °C forman colonias en un medio selectivo en las condiciones especificadas en esta norma.

4 Principio

Este método consiste en mezclar un volumen dado de dilución de la muestra con un medio de cultivo en placas de Petri o similares. Después del período de incubación se determina el número de colonias formadas por los microorganismos mediante contador de colonias.

5 Aparatos y cristalería

PRECAUCIÓN: Esterilice todos los aparatos que entren en contacto con la muestra de prueba, los diluyentes, las diluciones o el medio de cultivo.

5.1 Los aparatos desechables son una alternativa aceptable al material de vidrio reutilizable si tienen especificaciones adecuadas.

5.2 El equipo habitual de laboratorio microbiológico, los aparatos necesarios para la preparación de las muestras de ensayo y diluciones y, en particular, los siguientes:

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

5.2.2 **Incubadora**, capaz de operar a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.2.3 **Termómetro**, con escala graduada de 0 °C a 100 °C .

5.2.4 **Refrigerador**, para enfriar y mantener la temperatura de las muestras entre 0 °C a 5 °C antes de ser analizadas y para almacenar los medios de cultivo preparados.

5.2.5 **Pipetas graduadas**, calibradas y estériles de $1.0\text{ ml} \pm 0.02\text{ ml}$, $10 \pm 0.2\text{ ml}$ y $11\text{ ml} \pm 0.2\text{ ml}$.

5.2.6 **Equipo de conteo de colonias**, compuesto por una base iluminada con fondo oscuro, provista de un lente de aumento que se utilizará con un aumento de $\times 1.5$ y un contador digital mecánico o electrónico.

5.2.7 **Frascos y tubos de dilución**.

5.2.8 **Placas de Petri**, de 90 mm a 100 mm de diámetro y 15 mm de profundidad, con fondo plano.

5.2.9 **Baño María**, capaz de operar a $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.2.10 **Balanza analítica**, de precisión 0.1 g.

5.2.11 **Gradilla**, para los tubos.

6 Reactivos

Use solamente reactivos de grado analítico reconocido y sólo agua destilada o agua de pureza equivalente.

6.1 **Agar glucosa de papa** (u otro medio apropiado preferiblemente deshidratado).

6.1.1 Prepare el medio Agar glucosa de papa siguiendo las instrucciones del fabricante y las buenas prácticas de laboratorio.

6.1.2 Ajuste el pH del medio (si es necesario) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.2 Solución patrón

Prepare la solución patrón siguiendo las instrucciones siguientes:

6.2.1 Disuelva 34 g de fosfato ácido de potasio (KH_2PO_4) en 500 cm^3 de agua destilada.

6.2.2 Ajuste la solución a un pH de 7.2 ± 0.1 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 1.0 N.

6.2.3 lleve a un volumen de $1\ 000\text{ cm}^3$ con agua destilada, se esteriliza en autoclave a 121 °C y 15 libras - fuerza /pulg² por 15 minutos y se conserva en el refrigerador.

6.3 Sulfato de magnesio heptahidratado

Disuelva 50g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 cm^3 de agua destilada.

NOTA La cantidad de cada componente y el agua a utilizar puede variar según el fabricante.

6.4 Diluyentes

6.4.1 De uso general:

- a) Solución peptona
- b) Solución de Ringer
- c) Solución peptona simple
- d) Solución tampón fosfato

6.4.2 De uso especial

- a) Agua peptona tamponada
- b) Solución de citrato de sodio (Quesos y leche en polvo).
- c) Solución de fosfato dipotásico (para productos fermentados, sueros ácidos).

Elija el diluyente de acuerdo con el tipo de muestra y según lo indicado en el procedimiento técnico de referencia o según el fabricante de los diluyentes.

7 Muestreo

7.1 Deberá enviarse una muestra representativa al laboratorio por duplicado (500 g o 500 ml, según corresponda). La muestra deberá protegerse contra el deterioro durante el transporte o almacenamiento.

7.2 El muestreo no forma parte del método especificado en esta norma. Un método de muestreo recomendado se puede encontrar en la NORDOM 30.

7.3 En quesos madurados con una capa de levadura o moho, puede ser conveniente excluir la capa de muestra para análisis. En estos casos, la capa se puede quitar con un bisturí o un cuchillo esterilizado antes de iniciar el muestreo.

8 Generalidades

Para mejorar la precisión del método, la preparación de las diluciones deberá estandarizarse cuidadosamente. Los factores que afectan la precisión son los siguientes:

- a) tipo de equipo de mezcla;
- b) tipo de mezcla;
- c) diluyente;
- d) tiempo permitido para que se sedimenten las partículas grandes;
- e) tiempo de mezclado permitido en la preparación de diluciones decimales.

PRECAUCIÓN: Deberán tomarse las precauciones asépticas habituales. Las operaciones descritas a continuación no deberán realizarse a la luz del sol.

9 Preparación de la muestra

9.1 Leche fluida

9.1.1 La muestra de leche deberá ser homogénea.

9.1.2 Cuando no esté homogénea, lleve a 20 °C y agite evitando la formación de espuma o el batido de grasa.

9.2 Leche concentrada azucarada (Leche condensada)

9.2.1 Caliente el envase conteniendo la leche condensada en baño María a 45 °C durante varios minutos, luego abra y mezcle el contenido con una cuchara o espátula.

9.2.2 Para preparar la primera dilución pese 10g de la muestra directamente en un tubo de dilución que contiene 90 cm³ del diluyente.

9.3 Leche en polvo

9.3.1 Antes de abrir el recipiente agite el contenido invirtiendo el recipiente varias veces, luego se abre y se mezcla el contenido cuidadosamente con una cuchara o espátula estéril.

9.3.2 Para preparar la primera dilución disuelva 10 g de la muestra de dilución en 90 cm³ del diluyente previamente calentado a una temperatura de 45 °C.

9.4 Mantequilla

Derrita la mantequilla en un envase, inmerso en un Baño María el cual es mantenido a una temperatura de 45 °C + 1 °C por 10 minutos. Se agita varias veces para homogenizar la muestra. Para preparar la primera dilución transfiera con una pipeta 10 cm³ de la muestra bien agitada a 90 cm³ de diluyente previamente calentado a una temperatura de 45 + 1 °C durante 15 minutos.

9.5 Yogur

a) Vierta la muestra en un vaso y homogeneizar el producto por batido, y si es fluido por transvasamientos sucesivos o de acuerdo con la técnica utilizada. Llevar a temperatura próxima a 20 °C.

b) En el caso particular de los yogures de frutas, vierta la muestra sobre un colador metálico (abertura de mallas alrededor de 0.5 mm) con el fin de retener las frutas y proseguir las operaciones como se acaba de explicar.

c) Para la realización del análisis, prepare una disolución de 50 g de yogur en 100 ml de agua. Agite y transvase sucesivamente para obtener la disolución lo más homogénea posible.

9.5.1 Tome las precauciones siguientes antes de abrir la muestra de yogur:

a) Limpie la superficie externa alrededor del área de donde será tomada la muestra, para eliminar cualquier material que pueda contaminarla.

b) El área puede ser higienizada con etanol 70 % (5.5) para prevenir la contaminación adicional. Abrir el recipiente asépticamente.

9.6 Queso

9.6.1 Triture la muestra de prueba por medio de un dispositivo apropiado. Mezcle rápidamente toda la masa y preferiblemente vuelva a moler la masa rápidamente.

9.6.2 Si la muestra de prueba (por ejemplo, queso blando) no se puede moler, mezcle bien toda la muestra agitando y homogenizando intensamente.

9.6.3 Transfiera la muestra pretratada, o una parte representativa de ella, inmediatamente a un recipiente estéril con cierre hermético.

9.6.4 Analice la muestra de prueba sin demora, tan pronto como sea posible después de molerla o mezclarla. Si el retraso es inevitable, tome todas las precauciones para garantizar la conservación adecuada de la muestra y para evitar la condensación de humedad en la superficie interior del recipiente.

NOTA No deberá examinarse el queso molido o mezclado que muestre un crecimiento de moho no deseado o signos iniciales de deterioro. Limpiar el dispositivo después de moler cada muestra.

10 Procedimiento

10.1 Inoculación en placas de Petri

10.1.1 Después de mezclar las diluciones con una pipeta se toma 1 ml de cada muestra y se transfiere a las placas de Petri sembrando en duplicado. Luego se agregan de 15 ml a 20 ml del medio de cultivo. Durante esta operación deberá mantenerse condiciones asépticas, y flamear la pipeta, boca del frasco de dilución y medio de cultivo.

10.1.2 Mezcle cuidadosamente el medio con la muestra haciendo movimientos circulares: 5 veces en dirección de las manecillas del reloj, 5 veces contrario a las manecillas del reloj, 5 veces arriba y abajo y 5 veces de izquierda a derecha y se deja solidificar.

10.2 Incubación de los cultivos

Después de la solidificación se invierten las placas y se incuban a una temperatura de 25 °C durante 3 a 5 días.

10.3 Recuento de colonias

Después del período de incubación se cuentan las placas que contengan de 10 a 150 colonias de hongos o supuestas levaduras con un contador de colonias. Si las colonias de hongos son numerosas se cuentan al tercer día y nuevamente al quinto día.

NOTA Confirmar la levadura realizando una tinción de Gram y observar en el microscopio.

11 Expresión de los resultados

Se reporta el resultado como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) de levaduras y/o mohos por gramo o por mililitro de producto según corresponda.

Bibliografía

- [1] NORDON 248 *Leche y productos lácteos. Determinación de hongos y levaduras*
- [2] ISO 6611 IDF 94 *Leche y productos lácteos. Enumeración de unidades formadoras de colonias de levaduras y/o mohos. Técnica de recuentos de colonias a 25 ° C*
- [3] NORDOM 56 *Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de grasa por el método de Gerber*