

BEBIDAS CARBONATADAS

Análisis microbiológico. Detección y recuento de bacterias coliformes y Escherichia coli

COGUANOR NGO
34 155 h3

COMISION GUATEMALTECA DE NORMAS (COGUANOR), MINISTERIO DE ECONOMIA, GUATEMALA, C.A.

1. OBJETO

Esta norma tiene por objeto establecer el método para la determinación de bacterias coliformes y Escherichia coli en las bebidas carbonatadas.

2. CAMPO DE APLICACION

El presente método se aplica principalmente a bebidas carbonatadas cuyo valor de pH se aproxima a neutro (aguas gaseosas sin sabor) ya que los valores bajos de pH (aguas gaseosas con sabor) inhiben el crecimiento de bacterias coliformes.

3. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

COGUANOR NGO 4 010 Sistema Internacional de Unidades (SI)
1a. Revisión

4. TERMINOLOGIA

4.1 Bebida carbonatada. Es una bebida no alcohólica, que contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto.

4.2 Agua gaseosa sin sabor. Es una bebida carbonatada, que se obtiene por disolución de dióxido de carbono (anhídrido carbónico) en agua potable, que contiene sólidos minerales disueltos (cloruros, bicarbonatos y sulfatos) y es sometida a un proceso tecnológico apropiado.

Nota. En Guatemala el agua gaseosa sin sabor se conoce también como: "agua mineral" o "soda".

4.3 Agua gaseosa con sabor. Es una bebida carbonatada que se obtiene por disolución de azúcar en agua potable y adición de dióxido de carbono (anhídrido carbónico), acidificantes, colorantes naturales o artificiales, conservadores y sabores naturales o artificiales permitidos, sometida a un proceso tecnológico apropiado.

4.4 Bacterias coliformes. Bacterias en forma de bastones, Gram negativo, aeróbicas y anaeróbicas facultativas, no esporuladas, que fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48h a 35°C.

4.5 Escherichia coli. Bacterias coliformes que fermentan la lactosa con producción de gas a 45.5°C y que producen indol a partir de triptofano a 35°C, cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en la presente norma.

4.6 Recuento de bacterias coliformes y Escherichia coli en las bebidas carbonatadas. Es el número de microorganismos por 100 cm³ determinados bajo las condiciones descritas en la presente norma.

5. REACTIVOS O MATERIALES

5.1 Medios de cultivo.

a) Para obtener resultados uniformes se recomienda emplear ya sea los componentes deshidratados de los medios de cultivo, de calidad uniforme y grado químico analítico, o bien, los medios deshidratados completos.

Continúa

- b) Las sustancias orgánicas y los medios deshidratados completos deben ser de grado bacteriológico, el agua debe ser destilada o de pureza equivalente. Para ajustar el pH de los medios y soluciones indicadas en la presente norma, pueden emplearse soluciones aproximadamente 6N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio, según corresponda.

5.1.1 Caldo al 2% de verde brillante lactosa bilis (caldo BGLB).

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Bilis de buey deshidratada	20 g
Verde brillante	0.0133 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven la peptona y la lactosa en aproximadamente 50 cm³ de agua. Por aparte se disuelven 20 g de bilis de buey en 200 cm³ de agua; el pH de esta solución debe ser 7.0 a 7.5.

Se mezclan las dos soluciones, y se lleva la mezcla a un volumen aproximado de 750 cm³, se ajusta el pH a 7.4. Se agregan 13.3 cm³ de una solución acuosa al 0.1% de verde brillante y se lleva a un volumen final de 1 000 cm³; se distribuye el medio en tubos de fermentación, de manera que el nivel del caldo cubra los tubos internos invertidos, y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C (para evitar que queden burbujas en el tubo invertido, el autoclave no debe abrirse hasta que la temperatura haya bajado a 75°C). El pH final después de la esterilización debe ser 7.2.

5.1.2 Caldo lauril sulfato triptona (LST), concentración simple.

Caldo lauril sulfato triptona (LST), de doble concentración.

Triptona o digerido pancreático de caseína	20 g	40 g
Lactosa	5 g	10 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2.75 g	5.50 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	2.75 g	5.50 g
Cloruro de sodio	5 g	10 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g	0.2 g
Agua destilada	1 000 cm ³	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua los ingredientes sólidos y se distribuye en porciones de 10 cm³ en tubos de ensayo de 20 mm x 150 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 10 mm x 75 mm. Se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C (para evitar que queden burbujas en el tubo invertido, el autoclave no debe abrirse hasta que la temperatura haya bajado a 75°C). El pH final debe ser 6.8 ± 0.2.

5.1.3 Caldo EC.

Triptona o digerido pancreático de caseína	20 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Lactosa	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	4 g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.5 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agua destilada o purificada	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua los ingredientes sólidos y se distribuye en porciones de 8 cm³ en tubos de ensayo de 16 mm x 150 mm que contienen tubos de fermentación invertidos de 10 mm x 75 mm; este volumen asegurará que el caldo cubra el tubo de fermentación. Se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C (para evitar que queden burbujas en el tubo invertido, el autoclave no debe abrirse hasta que la temperatura haya bajado a 75°C). El pH final debe ser 6.9 ± 0.1.

5.1.4 Agar de eosina-azul de metileno según Levine (L-EMB)

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	2 g
Agar	15 g
Eosina Y	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g

Se disuelven por ebullición la peptona, el fosfato y el agar en 1 000 cm³ de agua, después de disueltos se lleva al volumen original con agua; se distribuye en porciones de 100 ó 200 cm³ y se esteriliza en autoclave durante 15 min a una temperatura no mayor de 121°C. El pH final debe ser 7.1 ± 0.2.

Antes de usar este medio, se funde y se adicionan a cada porción de 100 cm³: a) 5 cm³ de solución estéril al 20% de lactosa, b) 2 cm³ de solución acuosa al 2% de eosina Y, y c) 4.3 cm³ de solución acuosa al 0.15% de azul de metileno. Asépticamente se distribuye en cajas estériles.

Nota. Cuando se use el medio completo deshidratado, se disuelve éste mediante ebullición en 1 000 cm³ de agua, se distribuye en porciones de 100 ó 200 cm³ y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final debe ser 7.1 ± 0.1.

5.1.5 Caldo de triptofano.

Triptona o digerido pancreático de caseína	10 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelve en el agua la triptona, se distribuye en porciones de 5 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final debe ser 6.9 ± 0.2.

5.1.6 Caldo de glucosa amortiguado (tamponado), (MR-VP).

Proteosa peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en aproximadamente 800 cm³ de agua con calentamiento suave, se filtra, se enfría a 20°C y se diluye a un litro; se distribuye el medio en porciones de 10 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 12 a 15 min a 121°C. El tiempo máximo de exposición al calor es de 30 min. El pH final debe ser 6.9 ± 0.2.

5.1.7 Caldo Koser-citrato.

Fosfato ácido de sodio y amonio (NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O)	1.5 g
Fosfato ácido dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1 g

Continúa

Sulfato de magnesio (Mg SO ₄ .7 H ₂ O)	0.2 g
Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O)	3 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven en el agua los ingredientes sólidos, se distribuye el medio en porciones de 10 cm³ en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final debe ser 6.7 ± 0.2.

5.1.8 Agar de recuento en placas (PCA).

Triptona o digerido pancreático de caseína	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 cm ³

Se disuelven los ingredientes sólidos en el agua llevada a ebullición, se distribuye en tubos o frascos y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C; el pH final debe ser 7.0 ± 0.1.

5.2 Reactivos y soluciones. Los materiales básicos y los reactivos deben ser de calidad reconocida para uso microbiológico; el agua debe ser destilada o de pureza equivalente.

5.2.1 Reactivo de Kovacs.

p-Dimetilaminobenzaldehído	5 g
Alcohol amílico	75 cm ³
Acido clorhídrico concentrado	25 cm ³

Se disuelve el p-dimetilaminobenzaldehído en el alcohol amílico y lentamente se adiciona el ácido clorhídrico; se almacena el reactivo a 4°C.

5.2.2 Reactivos de Voges-Proskauer (VP).

5.2.2.1 Solución alcohólica al 5% de α-naftol. Se prepara disolviendo 5 g de α-naftol en 100 cm³ de alcohol absoluto.

5.2.2.2 Solución al 40% de KOH. Se prepara disolviendo 40 g de KOH en agua destilada y se completa el volumen a 100 cm³ con agua.

5.2.3 Colorantes para determinar el Gram.

5.2.3.1 Colorante cristal violeta de Hucker.

- Solución A. Se prepara disolviendo 2 g de cristal violeta que contenga 85% del colorante, en 20 cm³ de alcohol etílico al 95% (v/v).
- Solución B. Se prepara disolviendo 0.2 g de oxalato de amonio monohidratado en 20 cm³ de agua destilada.
- El reactivo completo se prepara mezclando volúmenes iguales de la solución A con la solución B, se deja en reposo la mezcla durante 24 h y se filtra a través de papel filtro grueso.

5.2.3.2 Solución de yodo según Lugol

Yodo	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 cm ³

Se coloca el yoduro de potasio en un mortero, se agrega el yodo, y se muele durante 5 a 10 s; se agrega 1 cm³ de agua, luego 5 cm³ y finalmente 10 cm³ de agua, moliendo apropiadamente después de agregar cada porción de agua, de manera de obtener al final la completa disolución de los reactivos. Se vierte la solución en un frasco, se enjuaga el mortero y la mano del mortero con una cantidad suficiente de agua para llevar la solución a un volumen total de 300 cm³.

5.2.3.3 Colorante de contraste de Hucker. Se prepara una solución concentrada disolviendo 2.5 g de safranina O certificada, en 100 cm³ de alcohol etílico al 95% (v/v); para usar el colorante se diluyen previamente 10 cm³ de la solución concentrada con 90 cm³ de agua destilada.

5.2.4 Solución indicadora de rojo de metilo. Se prepara disolviendo 0.10 g de rojo de metilo en 300 cm³ de alcohol etílico al 95% (v/v) y se lleva a un volumen final de 500 cm³ con agua destilada.

6. APARATOS

6.1 Autoclave, regulada a 121°C; véase el numeral 6.2.1

6.2 Esterilizador operado con aire caliente, regulado a 170°C

6.2.1 Esterilización del material de vidrio y otros materiales. Se debe esterilizar el material de vidrio y los otros materiales utilizados por cualesquiera de los siguientes métodos:

- Esterilización húmeda a una temperatura no menor de 121°C durante no menos de 20 min.
- Esterilización seca a una temperatura no menor de 170°C durante no menos de 1 h.

6.3 Incubadora, para mantener las placas inoculadas a una temperatura de 35 ± 1°C.

6.4 Baño de agua, cubierto, provisto de un sistema apropiado para mantener una temperatura de 45 ± 0.05°C. El nivel del agua debe quedar sobre el nivel del medio contenido en los tubos invertidos.

6.5 Termómetro de inmersión, de aproximadamente 55 cm de longitud, graduado entre 1 y 55°C, con subdivisiones a cada 0.1°C, debidamente calibrado.

6.6 Frascos de dilución, de aproximadamente 170 cm³ de capacidad, de vidrio al borosilicato con tapa hermética de rosca o tapón de hule, tipo Escher.

6.7 Pipetas graduadas, de 1 cm³ de capacidad.

6.8 Tubos de cultivo.

6.9 Asa en punta.

6.10 Asa circular, de 3 mm de diámetro.

6.11 Instrumental de laboratorio.

.Continúa

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Acciones preliminares.

7.1.1 Los envases seleccionados como muestra de un lote dado deben someterse a las siguientes operaciones:

- a) Las tapaderas de los envases deben lavarse con agua y jabón, desinfectarse con alcohol y flamearse.
- b) Los envases se deben abrir asépticamente, utilizando aparatos limpios y esterilizados.
- c) La boca de la botella o la apertura por donde se obtiene la muestra, se debe flamear rápidamente.

7.1.2 Si la bebida carbonatada contiene una cantidad de gas tal que interviene desfavorablemente en la medición del volumen que se tome para el ensayo, se coloca parte de la misma en un recipiente estéril, en el cual pueda agitarse el líquido para disipar el gas y así facilitar dicha medición.

7.2 Ensayo para bacterias coliformes presuntivas.

7.2.1 De la muestra sin diluir se transfiere por triplicado, 10 cm³ a sendos tubos de ensayo que contienen el caldo lauril sulfato triptona (LST) de doble concentración y volúmenes de 1 cm³ y 0.1 cm³ a sendos tubos de ensayo que contienen el caldo lauril sulfato triptona pero de concentración simple, inclinando la pipeta de manera tal que su extremo inferior se apoye en el tubo y se deja drenar durante 2 a 3 s. Se incuban los tubos a 35°C y se examinan después de transcurridas 24 ± 2 h para detectar la posible formación de gas, la cual se evidencia por un desplazamiento del medio en el tubo de fermentación o por efervescencia cuando los tubos son agitados suavemente; se incuban los tubos negativos por un período adicional de 24 h y se examinan nuevamente para detectar la formación de gas.

7.2.2 Se someten al análisis confirmatorio todos los tubos presuntivamente positivos, es decir, aquellos que presentaron formación de gas.

7.3 Análisis confirmatorio para bacterias coliformes.

7.3.1 Se agita suavemente cada uno de los tubos LST que mostraron formación de gas y, con el asa circular, se transfiere una porción de la suspensión a un tubo que contenga caldo al 2% de verde brillante lactosa bilis (BGLB); cada tubo LST debe colocarse en un ángulo apropiado para que al insertar el asa se evite la transferencia de la película que pudiera haberse formado.

7.3.2 Se incuban los tubos BGLB a 35°C durante 48 ± 2 h, pero examinándolos a las 24 h y a las 48 h, y se registran los tubos que evidenciaron formación de gas, los cuales servirán para calcular el número más probable (NMP) de bacterias coliformes en la muestra.

7.4 Análisis confirmatorio para Escherichia coli.

7.4.1 Se agita suavemente cada uno de los tubos LST que mostró formación de gas y, con el asa circular, se transfiere una porción de la suspensión a un tubo que contenga caldo EC; se incuban los tubos en el baño de agua a 45.5 ± 0.05°C, examinándolos después de transcurridas 24 ± 2 h para detectar la formación de gas y, si el análisis es negativo, se continúa el período de incubación hasta las 48 ± 2 h.

7.4.2 De cada tubo EC con formación de gas se extrae una porción con el asa circular y se siembra en estrías sobre la superficie de placas de agar L-EMB; es esencial que una porción de la placa muestre colonias bien separadas.

Continúa

7.4.3 Se incuban las placas a 35°C durante 18 a 24 h y luego se examinan para detectar las colonias sospechosas de Escherichia coli, caracterizadas por un centro oscuro con o sin brillo metálico.

7.4.4 Se pican 2 colonias típicas de cada placa L-EMB y se las transfiere a planos inclinados de agar de recuento en placa (PCA) para análisis morfológicos y bioquímicos; se incuban los planos inclinados de PCA a 35°C durante 18 a 24 h. Si no hay colonias típicas presentes, se pican 2 ó más colonias que se sospeche que son Escherichia coli y se las transfiere a planos inclinados de agar PCA.

7.5 Identificación del Gram de las colonias.

- a) De cada cultivo de los planos inclinados de agar PCA se efectúa un frote y se seca al aire; luego se fija el frote con calor suave pasándolo 3 ó 4 veces rápidamente sobre la llama de un mechero Bunsen.
- b) Se tiñe el frote durante un minuto con la solución cristal violeta-oxalato de amonio, se lava brevemente con agua del chorro y se drena el agua.
- c) Se aplica durante un minuto la solución de yodo según Lugol, se lava con agua del chorro y se drena el agua.
- d) Se decolora el frote con alcohol etílico al 95% (v/v) hasta que los enjuagues no tengan color azul, aproximadamente durante 30 s; alternativamente se puede sumergir el portaobjeto en el alcohol, se retira inmediatamente y luego se vuelve a sumergir en alcohol durante 10 s.
- e) Se lava rápidamente el frote con agua, se drena y se aplica el colorante de contraste de safranina durante 10 a 30 s.
- f) De nuevo se lava rápidamente con agua, se drena, se seca al aire y se examina; los organismos Gram-positivos se tiñen de color azul y los organismos Gram-negativos se tiñen de color rojo.

Nota 1. Algunos de los organismos Gram-negativos no se decoloran fácilmente después de la tinción con la solución cristal violeta de Hucker; para evitar esta dificultad, la solución de cristal violeta puede ser diluida hasta 10 veces antes de mezclarla con un volumen igual de la solución de oxalato de amonio.

Nota 2. Para una mejor identificación se deben usar controles positivos y negativos.

7.6 Análisis bioquímicos de las colonias Gram-negativas. Se deben realizar los siguientes análisis bioquímicos con todos los cultivos que se identifican como bastones cortos o cocos Gram-negativos.

7.6.1 Producción de Indol. Se inocula un tubo que contenga caldo de triptofano y se incuba a 35°C durante 24 ± 2 h; se detecta la presencia de indol agregando 0.2 cm³ del reactivo de Kovacs. El análisis positivo se evidencia por la aparición de un color rojo claro en la capa superior.

7.6.2 Análisis de Voges-Proskauer. Se inocula un tubo que contenga caldo MR-VP y se incuba a 35°C durante 48 ± 2 h; luego, a temperatura ambiente, se transfiere a un tubo de ensayo 1 cm³ del cultivo incubado y se agregan 0.6 cm³ de la solución de α -naftol y 0.2 cm³ de la solución al 40% de KOH, agitando luego de la adición de cada solución. Para intensificar y acelerar la reacción, se añaden algunos cristales de creatina a la mezcla; se lee el resultado a las 4 h de haber agregado los reactivos. El análisis VP es positivo cuando se desarrolla un color rosado debido a la producción de acetilmetilcarbino].

7.6.3 Análisis con rojo de metilo. Luego de realizar el análisis de Voges-Proskauer se incuban los tubos de caldo MR-VP (véase numeral 7.6.2) durante un

período adicional de 48 ± 2 h a 35°C ; se agrega a cada tubo 0.3 cm^3 de la solución indicadora de rojo de metilo y se observa si aparece un color rojo lo cual indica que el análisis es positivo.

7.6.4 Utilización de citrato. Con una porción mínima del cultivo se inocula un tubo que contenga caldo citrato de Koser; se debe evitar un enturbiamiento detectable. Se incuban los tubos a 35°C durante 96 ± 2 h y luego se observa si se desarrolla un enturbiamiento lo cual indica que el análisis es positivo.

7.6.5 Producción de gas a partir de lactosa. Se inocula un tubo que contenga caldo LST y se incuba a 35°C durante 48 ± 2 h; la reacción positiva se evidencia por desplazamiento del medio contenido en el tubo interior o una efervescencia cuando se agita el tubo suavemente.

7.7 Identificación de Escherichia coli. Se consideran como Escherichia coli todos los cultivos que presentan las siguientes características:

- Fermentan la lactosa con producción de gas dentro de las 48 h de incubación a 35°C ;
- Se identifican como bastones o cocos Gram-negativos y no formadores de esporas; y
- Los resultados de los análisis bioquímicos de acuerdo al cuadro 1, corresponden a "+ + - - " ó "- + - -":

Cuadro 1. Resultado de los análisis bioquímicos

Especie	Indol	Rojo de Metilo	Voges Proskauer	Citrato
<u>Escherichia coli</u>				
Típico	+	+	-	-
Atípico	-	+	-	-
<u>Intermediarios</u>				
Típico	+	+	-	+
Atípicos	-	+	-	+
<u>Enterobacter aerogenes</u>				
Típico	-	-	+	+
Atípico	+	-	+	+

7.8 Se calcula el número más probable (NMP) de Escherichia coli, en base a la proporción de tubos EC de los volúmenes de muestra, en triplicado, en que se haya detectado Escherichia coli.

8. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 Recuento de bacterias coliformes. El resultado se expresa como el número más probable (NMP) de bacterias coliformes por 100 cm^3 de muestra y se cal-

Continúa

cula a partir del número de tubos BGLB positivos de cada uno de los volúmenes de muestra en triplicado, y empleando el cuadro 2.

8.2 Recuento de Escherichia coli. El resultado se expresa como el número más probable (NMP) de Escherichia coli por 100 cm³ de muestra y se calcula a partir del número de tubos EC positivos de cada uno de los volúmenes en triplicado, y empleando el cuadro 2.

Cuadro 2. Número más probable de microorganismos por 100 cm³ de bebida carbonatada para volúmenes sucesivos de 10, 1 y 0.1 cm³ de muestra sin diluir, utilizando 3 tubos para cada volumen.

Combinación de tubos positivos 10 1 0.1	NMP Por 100 cm ³	Combinación de tubos positivos 10 1 0.1	NMP Por 100 cm ³	Combinación de tubos positivos 10 1 0.1	NMP Por 100 cm ³
0 0 0	< 3	1 1 1	11	2 2 2	35
0 0 1	3	1 1 2	15	2 2 3	42
0 0 2	6	1 1 3	19	2 3 0	29
0 0 3	9	1 2 0	11	2 3 1	36
0 1 0	3	1 2 1	15	2 3 2	44
0 1 1	6	1 2 2	20	2 3 3	53
0 1 2	9	1 2 3	24	3 0 0	23
0 1 3	12	1 3 0	16	3 0 1	39
0 2 0	6	1 3 1	20	3 0 2	64
0 2 1	9	1 3 2	24	3 0 3	95
0 2 2	12	1 3 3	29	3 1 0	43
0 2 3	16	2 0 0	9	3 1 1	75
0 3 0	9	2 0 1	14	3 1 2	120
0 3 1	13	2 0 2	20	3 1 3	160
0 3 2	16	2 0 3	26	3 2 0	93
0 3 3	19	2 1 0	15	3 2 1	150
1 0 0	4	2 1 1	20	3 2 2	210
1 0 1	7	2 1 2	27	3 2 3	290
1 0 2	11	2 1 3	34	3 3 0	240
1 0 3	15	2 2 0	21	3 3 1	460
1 1 0	7	2 2 1	28	3 3 2	1100
				3 3 3	≥ 2400

9. INFORME DEL ENSAYO O ANÁLISIS

En el informe del análisis debe indicarse lo siguiente:

9.1 El método usado, el número de tubos empleados para cada volumen de muestra y el resultado obtenido en la determinación.

Continúa

9.2 Cualquier condición no especificada en la norma, o señalada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado.

9.3 Todos los detalles que permitan la completa identificación de la muestra.

10. CORRESPONDENCIA

Para la elaboración de la presente norma se tomaron en cuenta los siguientes documentos:

- a) Propuesta de norma de la Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR NGO 34 155 h3 Bebidas carbonatadas. Análisis microbiológico. Detección y recuento de bacterias coliformes y Escherichia coli, de fecha marzo 1985;
- b) Norma de la India, IS 5401-1969, "Indian Standard, Methods for detection and Estimation of Coliform Bacteria in Foodstuffs";
- c) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods of the American Public Health Association, 1976";
- d) "Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration, Bureau of Foods Division of Microbiology, 1978"; y
- e) Método 46.016 descrito en "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 14a. Edición, 1984.

- ULTIMA LINEA -