

1. OBJETO

La presente norma tiene por objeto establecer el método para la determinación de mohos y levaduras en las bebidas carbonatadas.

2. NORMAS COGUANOR A CONSULTAR

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

3. TERMINOLOGIA

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

3.2 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".

3.3 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.

3.4 Mohos. Son organismos eucarióticos que carecen de clorofila, presentan una estructura filamentososa y son capaces de crecer en medio ácido cuando se realiza el análisis de acuerdo al método descrito en la presente norma.

3.5 Levaduras. Son organismos eucarióticos que carecen de clorofila, presentan crecimiento unicelular sin formación de micelios típicos.

3.6 Recuento de mohos, es la determinación del número de mohos por centímetro cúbico de producto, que se detecta cuando se realiza el análisis a la temperatura y las condiciones descritas en la presente norma.

3.7 Recuento de levaduras, es la determinación del número de levaduras por centímetro cúbico de producto, que se detecta cuando se realiza el análisis a la temperatura y las condiciones descritas en la presente norma.

4. PRINCIPIO DEL METODO

4.1 Se colocan porciones de la muestra sobre placas con medio selectivo y se incuban bajo condiciones de temperatura entre 20 y 25°C durante 5 d.

4.2 A partir del número de colonias por placa, se calcula el número de mohos y levaduras por centímetro cúbico de muestra.

Continúa

## 5. REACTIVOS O MATERIALES

5.1 Medios de cultivo. Se prepara uno de los medios de cultivo que se indican en los numerales 5.1.1 al 5.1.3.

- 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.
- b) Las sustancias orgánicas y los medios deshidratados completos deben ser de grado bacteriológico, el agua debe ser destilada o de pureza equivalente. Si se usan medios deshidratados completos, deben ser preparados y usados como lo recomiendan los proveedores de dichos medios. 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 Agar de dextrosa-papa, acidificado.

Infusión de papas blancas	200 cm <sup>3</sup>
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se hace una suspensión de los ingredientes deshidratados en el agua, se lleva la suspensión a ebullición hasta disolución completa, se distribuye en tubos o frascos y se esteriliza en autoclave 15 min a 121°C. Se lleva el pH de la solución a  $3.5 \pm 0.1$  con una solución al 10% estéril de ácido tartárico.

Nota. Para conservar las propiedades solidificantes del agar, se debe evitar un calentamiento posterior a la adición de ácido tartárico.

5.1.2 Agar de malta, acidificado.

Extracto de malta	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 000 cm <sup>3</sup>

Se disuelven los ingredientes en el agua y se lleva a ebullición por un minuto, agitando ocasionalmente; se distribuye el medio en tubos o frascos y se esteriliza a 121°C por 15 min exactos. Se lleva el pH a  $3.5 \pm 0.1$  con una solución al 10% estéril de ácido tartárico.

Nota. Para conservar las propiedades solidificantes del agar, se debe evitar un calentamiento posterior a la adición de ácido tartárico.

## 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 cualquiera de los siguientes métodos:

- a) Esterilización húmeda a una temperatura no menor de 121°C durante no menos de 20 min.

Continúa

b) 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 entre 20 y 25°C.

6.4 Baño de agua, regulado entre 44 y 46°C para calentar el medio de cultivo y otro baño de agua en ebullición o de vapor para fundir los medios.

6.5 Contador de colonias, del tipo Quebec y otro similar con visibilidad y aumento equivalentes.

6.6 Frascos de dilución, de aproximadamente 170 cm<sup>3</sup> de capacidad, de vidrio al borosilicato con tapa hermética de rosca o tapón de hule, tipo Escher.

6.7 Pipetas graduadas, de 1 cm<sup>3</sup> de capacidad.

6.8 Cajas de Petri, de vidrio, con las siguientes dimensiones: diámetro interno de la caja 90 ± 2 mm, altura externa no menor de 18 mm y tapa con diámetro externo no mayor de 102 mm. El borde de la caja debe estar en un plano paralelo a la base; el fondo de la caja debe ser plano y paralelo a la base.

Nota. Se pueden usar también cajas de Petri desechables de plástico, preesterilizadas, aún teniendo pequeñas diferencias en sus dimensiones.

6.9 Instrumental de laboratorio.

## 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 jabón y agua, 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 intervenga 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 Preparación de las placas. Se deben marcar todas las cajas de Petri que se van a usar, con el número de identificación de la muestra, los volúmenes de muestra a usar, la fecha y cualquier otra información necesaria.

7.3 Inoculación de las placas. Se procede en la forma descrita a continuación.

- a) Asépticamente y en duplicado se transfieren a cajas de Petri debidamente marcadas y esterilizadas, volúmenes de 1 cm<sup>3</sup> y 0.1 cm<sup>3</sup> de la muestra, sin diluir, luego se transfieren 10 a 15 cm<sup>3</sup> del medio de cultivo seleccionado (véase el numeral 5.1), previamente fundido y luego enfriado a una temperatura de 44 a 46°C, levantando ligeramente la tapa de la placa justo hasta la altura suficiente que permita verter el medio y teniendo la precaución de no salpicar las orillas.

Nota. Se debe evitar cualquier derramamiento del medio sobre la parte externa de la placa o sobre su borde interno.

- b) Se mezcla completamente el contenido de cada placa dándole a la misma un movimiento de rotación primero en una dirección y luego en dirección opuesta, inclinando y rotando la placa o bien, con un rotor mecánico.
- c) Una vez que la mezcla esté completamente distribuida sobre el fondo de la placa, se deja solidificar sobre una superficie horizontal, lo cual se logra en aproximadamente 10 min.
- d) En cuanto solidifique el medio, se colocan rápidamente las placas en la incubadora a 20-25°C durante 5 días (véase numeral 7.4); las placas deben incubarse en posición invertida para prevenir el desarrollo excesivo superficial ("spreaders").

7.3.1 Control de esterilidad del medio y del equipo. Cada lote del medio usado debe verificarse mediante placas controles y, si se desea, se verifica también cada lote de placas de Petri y de pipetas.

7.4 Recuento de colonias. Para evitar problemas de conteo, por crecimiento excesivo, deben efectuarse dos recuentos, uno al finalizar el tercer día y otro al finalizar el período de incubación.

- a) Se seleccionan las placas que contengan 30 a 300 colonias, exceptuando las que tengan desarrollo excesivo superficial ("spreaders"), ya que éste puede enmascarar el desarrollo de otras colonias, véase literal (i) del presente numeral.
- b) Si sólo se selecciona una placa, se hace el recuento de colonias utilizando el contador de colonias, considerando todas las colonias de la placa seleccionada que presenten características de moho y por separado todas las colonias que presenten características de levadura (véase incisos 3.4 y 3.5); se registra el recuento de la placa y el volumen de muestra usada.
- c) Si se seleccionan 2 placas que corresponden a duplicados de un mismo volumen de muestra; en cada placa se realiza el recuento como se indicó en (b), y se promedian los recuentos encontrados; se registra el recuento promedio y el volumen de muestra usado.
- d) Si se selecciona una placa de cada uno de los dos volúmenes de muestra usados, se hace el recuento en cada placa, se multiplica el número de colonias encontradas en cada placa por el valor recíproco del volumen usado, luego se promedian los resultados y se registra el valor encontrado.

Nota. Cuando se seleccionan placas en duplicado para cada uno de los dos volúmenes se obtiene primero el promedio de cada duplicado como se indica en (c), luego se multiplica cada promedio por el valor recíproco del volumen usado y finalmente se promedian ambos resultados.

- e) Si no hay placas que contengan 30 a 300 colonias y una o más placas tienen más de 300 colonias, se seleccionan las placas que tengan un número de colonias lo más cercano a 300 y se procede con el recuento como se indica en los literales (d) y (h).
- f) Si en las placas de los dos volúmenes usados se producen menos de 30 colonias por placa, se registra sólo el número de colonias del mayor volumen usado, sin considerar las placas que presentan desarrollo excesivo superficial ("spreaders"), véase el inciso (i) del presente numeral.
- g) Si no se desarrolla ni una colonia en ninguna de las placas de los dos volúmenes usados, y tampoco se detecta la presencia de sustancias inhibitoras, se registra el recuento como menor de 1 por centímetro cúbico.

- h) Si el número de colonias por placa excede las 300 colonias, se hace el recuento de colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias. Si hay menos de 10 colonias/cm<sup>2</sup>, se hace el recuento en 13 cuadrados, seleccionando, si son representativos, 7 cuadrados consecutivos que crucen horizontalmente la placa y 6 cuadrados consecutivos en ángulo recto, teniendo la precaución de hacer el recuento en un mismo cuadrado sólo una vez (la suma de las colonias en 13 cm<sup>2</sup> representativos multiplicada por 5 da el número estimado de colonias por placa cuando el área de la placa es de 65 cm<sup>2</sup>).

Nota. El diámetro interno promedio del fondo de una placa de Petri estándar es de 91 mm lo cual da un área del fondo de 65 cm<sup>2</sup>; por esta razón es que, normalmente, se multiplica por 65 el número promedio de colonias por centímetro cuadrado. Para placas de otras medidas se debe usar el factor apropiado.

Cuando hay más de 10 colonias/cm<sup>2</sup>, se hace el recuento en 4 de los cuadrados representativos y se multiplica el número promedio encontrado por centímetro cuadrado, por el factor apropiado para determinar las colonias estimadas por placa.

Cuando hay más de 100 colonias/cm<sup>2</sup>, el recuento se registra como "Demasiado numeroso para contar (DNPC)" y se informa como mayor de 6 500 veces el valor recíproco del volumen de muestra usado.

- i) En el caso de placas que presentan desarrollo superficial excesivo ("spreaders") y es imposible evitar el recuento en estas placas, se procede en la forma siguiente:
- Se identifican como sectores con desarrollo excesivo superficial cualesquiera de las situaciones descritas a continuación: 1) cadena de colonias, las cuales no están distintivamente separadas, aparentemente causadas por desintegración de un grupo de bacterias cuando a la placa de Petri se le imprime un movimiento de rotación para mezclar el agar con la muestra; si sólo existe una cadena de este tipo, se cuenta como una colonia simple, y si una o más cadenas se presentan como originadas de fuentes separadas, se cuenta cada fuente como colonia separada, no debiéndose contar como colonia separada cada desarrollo individual de la cadena; 2) colonias extendidas superficialmente, las cuales se desarrollan en una película de agua entre el agar y el fondo de la placa; y 3) colonias que se forman en una película de agua en la orilla o sobre la superficie del agar.

Nota 1. Los dos últimos tipos de desarrollo excesivo superficial ("spreaders") son debidos en gran parte a una acumulación de humedad en el punto en que se origina el desarrollo excesivo superficial. Cuando la muestra se distribuye uniformemente a través del medio, los microorganismos raramente se desarrollan como colonias con "desarrollo excesivo superficial".

Nota 2. Cuando se tenga un 5% o más, de las placas con "desarrollo excesivo superficial" superior a un cuarto del área de la placa, se deberán tomar medidas inmediatas para eliminar este problema (por ejemplo: reducir la humedad del aire dentro de la incubadora o mezclar la muestra con el medio en forma más completa).

- Si un 50% o más, del área de las placas seleccionadas presenta "desarrollo excesivo superficial", no se realiza el recuento y se registra como "Accidente de Laboratorio (AL)".
- Si una placa presenta una parte del área con colonias bien distribuidas, otra parte con "desarrollo excesivo superficial" y una parte del crecimiento reprimido, y la suma de éstas dos últimas partes no excede el 50%

del área total de la placa, se realiza el recuento en el área con colonias bien distribuidas siguiendo el procedimiento descrito en el literal (h); en caso contrario se registra como "Desarrollo excesivo superficial ("spreaders") (DES (Spr))".

- Si el área de crecimiento reprimido excede un cuarto del área total, no se realiza el recuento y se registra como "Accidente de Laboratorio (AL)".

Nota. La falta de formación de colonias puede ser debido a la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra; el analista puede sospechar la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra analizada, cuando las placas no muestran desarrollo o muestran desarrollo proporcionalmente menor en los volúmenes mayores de muestra; sin embargo, tal fenómeno no puede ser siempre interpretado como evidencia de inhibición.

- j) En cualquier recuento de colonias se debe evitar confundir erróneamente partículas de medio no disuelto, partículas de muestra o materia precipitada en las placas, con colonias del tamaño de la punta de un alfiler; se debe examinar cuidadosamente todo el material dudoso bajo un mayor aumento para diferenciar claramente las colonias de cualquier materia extraña.
- k) Junto con los recuentos de las placas inoculadas con los dos volúmenes de la muestra, se debe registrar el recuento de las placas controles.

Nota. Si no es posible realizar el recuento inmediatamente después de concluido el período de incubación, se puede almacenar las placas a una temperatura entre 0 y 4.4°C durante un período no mayor de 24 h; obviamente, tal situación debe evitarse como práctica rutinaria.

- l) Se deben observar periódicamente las placas para asegurarse de que no haya crecimiento de bacterias. Para esto se pican por lo menos 10 colonias de una placa y se les hace una identificación del Gram; las levaduras y las esporas asexuales de los mohos se identifican por ser Gram-positivos y el crecimiento vegetativo de mohos por ser Gram-negativo.

## 8. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 El recuento de mohos se expresa como número de mohos por centímetro cúbico de muestra y el recuento de levaduras se expresa como número de levaduras por centímetro cúbico de muestra y se obtienen directamente de los valores registrados de acuerdo al numeral 7.4 de la presente norma, multiplicados por el valor recíproco del volumen de muestra usado, en los casos en que tal operación no haya sido efectuada.

8.2 Repetibilidad. La falta de exactitud en el recuento de las placas debido a algún descuido, a cansancio visual o a falla para reconocer las colonias, puede conducir a resultados erróneos. Los analistas que no puedan duplicar sus propios recuentos sobre la misma placa con un error no mayor del 5%, y los recuentos de otros analistas con un error no mayor del 10%, deberán investigar las causas y corregir las diferencias encontradas.

## 9. INFORME DEL ENSAYO O ANALISIS

En el informe del análisis debe indicarse lo siguiente:

- 9.1 Los resultados obtenidos en cada determinación.
- 9.2 Las temperaturas y períodos de incubación correspondientes.
- 9.3 Los resultados obtenidos en los ensayos controles.

Continúa

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

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

#### 10. CORRESPONDENCIA

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

- a) Propuesta de norma de la Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR NGO 34 155 h4 Bebidas carbonatadas. Análisis microbiológico. Recuento de mohos y levaduras, de fecha marzo 1985; con la cual coincide;
- b) Norma de la India, IS 5403-1969, "Indian Standard, Method for Yeast and Mould Count of Foodstuffs";
- c) Método "Yeast and Molds Count" descrito en el "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" publicado por la "American Public Heath Association Inc.", 1976.

- ULTIMA LINEA -