

AGUA Y BEBIDAS SIN ALCOHOL

AGUA

El agua purificada o la mineral natural, pueden ser envasadas tal cual o como ingredientes de otras bebidas (aguas saborizadas y jugos diluídos, gasificados o no).

Después de la desinfección, el agua de suministro público suele tener un recuento de bacterias heterótroficas <10 a 100 ufc/mL. Luego entra en el sistema de distribución y almacenamiento donde ocurren cambios cuali y cuantitativos en la calidad microbiológica (1).

Las bacterias crecen cuando el cloro o el ozono se ha disipado y predominan los bacilos gram-negativos (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Moraxella-Acinetobacter*) (2). El porcentaje de bacterias pigmentadas es muy variable, pero en el agua embotellada puede llegar a ser la población dominante (*Flavobacterium* y *Pseudomonas* pigmentadas, a veces *Chromobacterium*, *Mycobacterium* y otros) (1). Ocasionalmente *Pseudomonas aeruginosa* coloniza las instalaciones de la planta embotelladora (3).

El agua mineral natural embotellada suele contener proteobacterias (97%), actinobacterias (2%) y otras (1%), predominando *Burkholderia*, acompañada de *Aquabacterium*, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Hydrogenophaga*, *Limnobacter*, *Polaromonas*, *Rhodoferax*, entre otras (4). *Legionella* puede sobrevivir en agua de bebida (5) así como *Aeromonas* (6) y *Asaia* es un miembro de las bacterias acéticas que ha sido a veces aislado de agua con sabor frutal (7).

Se ha observado la presencia de quistes de *Giardia* y ooquistes de *Cryptosporidium* en el 17 y 27% de las aguas de bebida, respectivamente, pero sólo un 10% eran viables (8).

ANALISIS MICROBIOLÓGICO

El desarrollo de coliformes no fecales que están naturalmente en el suelo, el agua dulce y la vegetación, significa que hubo contaminación con los organismos

transportados por el aire o las superficies en contacto con el producto no desinfectadas. Los coliformes fecales indican contaminación con aguas cloacales y la posibilidad de estar asociados a patógenos

Los organismos comunes que aparecen durante el análisis del agua embotellada no suelen tener significado sanitario. Un recuento bajo (menor que 100 ufc/mL) en el momento del envasado sirve como indicador de las buenas prácticas de manufactura, pero la presencia de coliformes demuestra la falta de las mismas y es índice de un problema potencial para la salud.

El criterio para agua embotellada, dado por la Comisión del Codex Alimentarius, expresa que en las regiones tropicales es muy probable observar una prueba de coliformes falsamente positiva, debido a otras bacterias nativas de esos lugares (2).

El Código Alimentario Argentino (CAA) establece en el capítulo XII, que el agua potable de suministro público no debe contener *E. coli* ni *P. aeruginosa* en 100 mL y el número más probable (NMP) de coliformes no mayor que 3 en igual volumen (art 982). Si el número de bacterias mesófilas en los tanques de almacenamiento es mayor que 500 ufc/mL se exige la higienización (9).

Los coliformes, fecales o no, pueden no ser índices efectivos de la presencia de quistes de protozoos (parásitos o de vida libre) y virus de mamíferos, porque algunos de éstos son más resistentes a la desinfección que los coliformes (2). *Clostridium perfringens* y los colifagos somáticos se suelen usar como indicadores de la eficiencia del tratamiento aplicado al agua de bebida durante el control de virus y quistes de protozoos (10).

El agua mineral natural debe estar libre de parásitos, estreptococos fecales, *E. coli* y *P. aeruginosa* en 250 mL, y de anaerobios esporulados sulfito-reductores en 50 mL (CAA art. 985). El agua saborizada o mineralizada artificialmente debe cumplir esos mismos requisitos.

El art. 983 del CAA expresa que las plantas embotelladoras deben llevar un registro de los controles analíticos físicos, químicos y microbiológicos realizados. El agua gasificada en sifones a la salida de la línea de llenado debe tener un residuo mínimo de 0,2 mg de cloro activo o de ozono /L (art. 1017) (9).

ANÁLISIS DE AGUA

a. Dejar que el agua caiga gota a gota del grifo. Flamear la boca del mismo hasta que las gotas se evaporen. Dejar que el agua corra libremente durante 2 minutos y luego recoger la muestra en un recipiente estéril.

b. Tomar un envase original sellado

c. Recoger la muestra desde los llenadores en una botella pre-esterilizada.

Mezclar 100 mL de muestra con 100 mL de caldo TGSB y dejar 1 hora a la temperatura ambiente. Agregar 20 mL del suplemento e incubar a 30°C durante 24 horas. Si no se observa desarrollo dejar otras 24 horas.

Sembrar 0,1 mL del cultivo en la superficie de cada placa de medio extendiendo con una varilla de vidrio en L. Incubar una placa de agar VRBL a 30°C y la otra, junto con las de agar KEA y agar NC, a 42°C durante 24-48 hs.

Si no hay crecimiento se considera que el agua es apropiada para el consumo.

CALDO TGSB. Triptona 17 g, peptona de soja 3 g, cloruro de sodio 10 g, fosfato de potasio 2,5 g, glucosa 10 g, agua 1 litro, pH 7,3. Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

SUPLEMENTO. Sales biliares 50 g, cloruro de sodio 10 g, púrpura de bromocresol 0,1 g, agua 1 litro, pH 7,4. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

AGAR VRBL (para coliformes). Peptona 20 g, lactosa 10 g, sales biliares 1,5 g, cloruro de sodio 5 g, rojo neutro (sol. hidroalcohólica al 1%) 3 mL, violeta cristal (sol. acuosa al 0,1%) 1 mL, agar 15 g, agua estéril 1 litro, pH 7,1. Calentar a ebullición hasta disolución completa, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri.

AGAR KEA (para *Enterococcus* spp). Triptona 20 g, extracto de levadura 5 g, cloruro de sodio 5 g, esculina 1 g, citrato de sodio 1 g, citrato férrico amónico 0,5 g, azida de sodio 0,15 g, sulfato de kanamicina 0,02 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,0. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri.

AGAR NC (para *P. aeruginosa*). Triptona 20 g, sulfato de potasio 10 g, cloruro de magnesio 1,4 g, cetrimida 0,2 g, ácido nalidíxico 15 mg, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,2. Calentar a ebullición hasta disolución completa, enfriar a 50°C y volcar en cajas de Petri (11).

La técnica de análisis mediante la filtración por membrana permite el examen de grandes volúmenes de agua y tiene una precisión mayor que la del NMP. Es conveniente para aguas

poco contaminadas y las fuertemente mineralizadas que pueden dar falsos resultados en medios líquidos.

NMP DE COLIFORMES

Sembrar 10 mL de muestra en 5 tubos con 10 mL de medio doble concentración, 1 mL en c/u de 5 tubos con medio simple y 0,1 mL en c/u de otros 5 tubos con medio simple. Incubar a 35°C durante 48 horas.

CALDO MAC CONKEY. Peptona 5 g, extracto de carne 3 g, lactosa 5 g, púrpura de bromocresol (al 0,5%) 4 mL, agua 1 litro (simple) ó 500 mL (doble concentración), pH 7,2 (12).

CONFIRMACIÓN. Confirmar al menos el 10% de los tubos positivos (2) en agar VRBL donde los coliformes dan colonias de color púrpura.

CUADRO 1. Número más probable por 100 mL de muestra (2).

Tubos positivos			NMP /100mL	Tubos positivos			NMP /100mL
10 mL	1 mL	0,1 mL		10 mL	1 mL	0,1 mL	
0	0	0	<2	4	3	0	27
0	0	0	2*	4	3	1	33*
0	1	0	2	4	4	0	34*
1	0	1	2	5	0	0	23
1	0	2	4*	5	0	1	31
1	1	0	4	5	1	0	33
1	2	1	6*	5	1	1	46
2	0	2	4	5	1	2	63*
2	0	0	7*	5	2	0	49
2	1	1	7	5	2	1	70
2	1	0	9*	5	2	2	94*
2	2	0	9	5	3	0	79
3	0	1	8	5	3	1	110
3	0	2	11	5	3	2	140
3	1	3	11	5	4	0	130
3	1	0	14*	5	4	1	170
3	2	1	14	5	4	2	220
3	2	2	17*	5	4	3	280*
3	3	3	17*	5	4	4	350*
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	350
4	1	0	17	5	5	2	540
4	1	1	21	5	5	3	920
4	2	0	22	5	5	4	1600
4	2	1	26*	5	5	5	>1600

* resultados obtenidos en el 4% de las pruebas, los otros en el 95%

Se debe poner especial cuidado al montar la unidad de filtración. Las membranas, comúnmente con poros de 0,45 μm , se colocan humedecidas en agua estéril para evitar roturas y el vacío de succión no debe ser mayor que 40 cm de Hg. El soporte de la membrana puede ser de acero inoxidable, vidrio o plástico esterilizable en autoclave, y está conectado al sistema de vacío a través de un kitasato. El equipo debe estar estéril en el momento de la filtración.

Los medios de cultivo para membranas suelen ser algo más concentrados que los normales y se vuelcan sobre los discos absorbentes, de unos 48 mm de diámetro, que retienen 1,8-2,2 mL de líquido (12).

RECuento DE BACTERIAS POR FILTRACION CON MEMBRANA

Filtrar 100 mL de muestra por la membrana estéril de 45 mm de diámetro. En condiciones de asepsia, colocar la membrana sobre un disco absorbente estéril embebido en el medio TST (o en su defecto sobre agar para recuento) evitando dejar englobadas burbujas de aire.

Incubar a 35°C durante 72 horas, porque algunas bacterias presentes en el agua suelen tener una prolongada fase de adaptación al medio de cultivo. Las colonias tendrán varios grados de verde.

TST. Triptona 15 g, peptona de soja 5 g, cloruro de sodio 5 g, verde intenso (CI n°42053) 0,25 g, agua 1 litro, pH 7,3. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (13).

BEBIDAS SIN ALCOHOL

La mayoría están gasificadas con 1,5 a 5 volúmenes de dióxido de carbono y el rango de pH oscila de 2,5 a 4,0. El acidulante más usado es ácido cítrico, pero las colas (pH 2,5-2,8) comúnmente contienen ácido fosfórico.

La mayoría de las bacterias, incluyendo las especies patógenas, mueren rápidamente en el ambiente ácido de estas bebidas, aunque algunos organismos lácticos suelen crecer cuando hay suficientes nutrientes. Los endosporos bacterianos pueden sobrevivir, pero no son capaces de germinar en la mayoría de los casos. Aunque los mohos son acidúricos, crecen solamente si hay oxígeno disuelto, y ésta puede ser la situación en algunas bebidas carbonatadas (2).

DETERIORO

Las levaduras constituyen el grupo más importante en el deterioro de la bebidas sin alcohol, pues toleran la acidez y pueden multiplicarse bajo condiciones anaeróbicas, llegando a producir suficiente dióxido de carbono para reventar la botella o lata. La estabilidad de las bebidas a base de jugo, o concentrado, de frutas también depende del tipo de fruta usado en su formulación.

Las bebidas con jugos de frutas son, además, susceptibles al deterioro por bacterias lácticas, principalmente especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, las que en general son resistentes a los ácidos benzoico y sórbico.

Los jugos de fruta, debido a sus propiedades intrínsecas, en particular el pH ácido y los bajos contenidos de nitrógeno y oxígeno, imponen un ambiente adverso para muchos microorganismos, pero son excelentes sustratos para las levaduras y en menor medida para los hongos y las bacterias lácticas (14).

La mayoría de las especies de levaduras pueden fermentar los azúcares a etanol pero solamente unas pocas crecen en completa ausencia de oxígeno. A pH 3,0 *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii* muestran fermentación alcohólica aeróbica, pero en condiciones anaeróbicas *Z. bailii* crece muy lento (15).

Otras especies de levaduras, como *Pichia anomala*, también son capaces de tolerar altas concentraciones de conservantes, así como una carbonatación alta, y suelen a desarrollarse en bebidas a base de frutas (16).

Las soluciones concentradas de saborizantes, endulzantes y otros ingredientes de las bebidas sin alcohol no suelen ser la fuente de levaduras y bacterias lácticas que causan alteración, pues son procesadas para que sean comercialmente estériles(2).

Las especies predominantes en jugos de naranjas contaminados después de la pasterización son *Candida intermedia* y *Candida parapsilosis*. En los jugos no pasterizados la mayoría corresponde a especies de *Hanseniaspora*, aunque suelen observarse otras levaduras como *Geotrichum citri-aurantii* y *Pichia fermentans* (17).

Paecylomyces fulvus y *Penicillium glabrum* han sido aislados de agua mineralizada (18) y bebidas carbonatadas (19).

CONTROL

La conservación depende del control de la contaminación y la aplicación de varios factores sinérgicos que previenen el crecimiento microbiano. Las fuentes específicas de contaminación incluyen las materias primas, los contenedores y el equipamiento de procesamiento o transporte, así como los operarios, particularmente cuando no son seguidas las buenas prácticas de manufactura.

La limpieza cuidadosa durante las horas de cierre evita la contaminación excesiva. Todas las áreas corrientes debajo de las de operaciones de mezclado son especialmente vulnerables a la acumulación microbiana.

El método tradicional es usar cloro para desinfectar después de la limpieza, pero resulta más efectiva la circulación de agua caliente (alrededor de 85°C) a través de las líneas durante al menos 20 minutos. Este procedimiento debe ser hecho dentro de las 24 horas previas al inicio de las operaciones.

El pH bajo y los altos niveles de carbonatación de las colas las hace resistentes al crecimiento de microorganismos del deterioro. Las otras bebidas carbonatadas con frecuencia contienen ácido benzoico, ácido sórbico o una combinación de ambos, para evitar las levaduras (2).

Debido al pH bajo, una pasteurización a 66°C durante 10 segundos, suele ser suficiente para inactivar muchos microorganismos en el jugo de naranja.

El enfriamiento es el procedimiento comúnmente usado para extender la durabilidad de algunos jugos de frutas pero también pueden ser congelados, concentrados y/o irradiados para prevenir el deterioro. La conservación del jugo de naranjas concentrado puede ser realizado con la adición de dióxido de sulfuro (230 mg/L) o con ácido sórbico (800 mg/L) (8).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El muestreo debe ser diseñado para identificar los lugares específicos de contaminación en una planta embotelladora. Cuando se analiza el llenador, el tamaño de la muestra debería ser una vuelta completa a causa de que, con frecuencia, sólo una de las válvulas contribuye a la contaminación.

El agua de enjuague (con o sin cloro) que pasó a través de las válvulas del llenador, o la bebida terminada, puede ser recogida por el procedimiento normal de llenado usando envases corrientes.

Cuando el producto es muestreado en el depósito o comercio, es necesario un tamaño de muestra igual a 3 veces el número de válvulas del llenador, para garantizar que la vuelta completa del llenador sea analizada. Debido a que los equipos de alta velocidad suelen llenar un gran número de envases por minuto, es importante recoger un tamaño de muestra estadísticamente válido para detectar las válvulas contaminadas.

Las muestras también pueden ser recogidas a lo largo de la línea, desde el cuarto de jarabe al llenador. Para esto deben ser insertadas llaves de muestreo en el sistema, en ubicaciones claves para tomar las muestras adecuadas.

Se debe evitar la contaminación durante el muestreo, así como también la muerte de los posibles contaminantes, por ejemplo debido al flameado. Los hisopos deben ser pasados por las ubicaciones clave con el fin de detectar la concentración de los organismos del deterioro.

Las llaves de muestreo suelen estar ubicadas a los lados de los proporcionadores de agua y jarabe, la bomba de mezclado, las mirillas de vidrio de los distintos tanques, y las líneas de jarabe, agua y azúcar.

Las muestras son recogidas con hisopo de las mirillas de vidrio, las juntas, las llaves, los colectores de jarabe, las mangueras y acoples, el coloreador del jarabe, y las bombas portátiles.

Entre el muestreo y el análisis no debe pasar más de 24 horas en el caso de las agua. Se registra el tiempo y la temperatura durante la espera. No puede hacerse sobre muestras viejas de bebidas pues a veces los microbios crecen durante la espera.

El CAA establece en el art 996 que las bebidas sin alcohol en base a jugos de frutas u hortalizas, infusiones o macerados de sustancias vegetales, deben ser preparadas con agua que cumple el art 982 ó 985. Pueden ser adicionados de ácido sórbico (0,3-0,8 g/L, según contengan o no gas carbónico) o

ácido benzoico (0,5 g/L) o bien el equivalente en las sales de estos ácidos.

Los jugos vegetales, así como las bebidas no gasificadas con 20% de jugo o con extractos, infusiones, maceraciones o percolaciones de ciertos vegetales, pueden contener hasta 1 g/kg de dichos ácidos o su equivalente en las respectivas sales (art 1006, 1007 y 1040) (9).

RECUENTOS DE COLIFORMES POR FILTRACION

Coliformes

Filtrar 100 mL de muestra por la membrana y transferir el filtro al medio de cultivo. Incubar a 35°C durante 48 horas.

M-ENDO. Triptosa 10 g, tiopeptona 5 g, tripticasa 5 g, extracto de levadura 1,5 g, lactosa 12,5 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 4,375 g, fosfato monopotásico 1,375 g, laurilsulfato de sodio 0,05 g, desoxicolato de sodio 0,1 g, sulfito de sodio 2,1 g, fucsina básica 1,05 g, agua 1 litro, pH 7,2. Hidratar en 1 litro de agua que tiene 20 mL de etanol 95%. Calentar a ebullición, enfriar rápido y distribuir en envases estériles. Se coloca 1,8-2,2 mL en cada disco absorbente.

Coliformes fecales

Colocar la membrana sobre el medio TSM e incubar 4-5 hs a 35°C a 35°C, transferir al medio TB e incubar 24 horas a 44,5°C en un recipiente cerrado.

Mezclar volúmenes iguales de las soluciones a y b del reactivo de indol. Con 1 mL mojar un papel de filtro en una caja. Depositar la membrana sobre el papel sin dejar atrapado aire y dejar 10-15 minutos.

Regresar la membrana al medio TB. Contar las colonias rosadas o sea que las dan una prueba de indol positiva.

TSM. Triptona 15 g, peptona de soja 5 g, cloruro de sodio 5 g, sulfato de magnesio 1,5 g, agua 1 litro, pH final 7,3. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Colocar la membrana e incubar 4-5 horas a 35°C y luego transferir a m-FC e incubar 24 hs a 44,5 ± 0,5°C en recipiente cerrado.

TB. Triptona 20 g, sales biliares nº 3 1,5 g, agua 1 litro, pH 7,2. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

REACTIVO DE INDOL PARA MEMBRANAS. **a.** 4-dimetilamino-benzaldehído 2,5 g, etanol (95%) 90 mL, ácido clorhídrico concentrado 10 mL. **b.** Persulfato de potasio 1 g, agua destilada 100 mL. Ambas se mantienen a 4°C durante unas pocas semanas (13).

Los jugos cítricos y los triturados o cremogenados de frutas u hortalizas, pueden contener un máximo de 100 ufc de mohos y/o levaduras /g (art. 1050 y 1061). Los jugos de tomate (pH < 4,5) y de ananá (pH < 4,1) no deben contener más de 20 campos positivos en el recuento microscópico de mohos según Howard-Stepheson (art 1061 y 1064) (9).

RECUEENTOS DE MOHOS Y LEVADURAS POR FILTRACION

Filtrar 100 mL de muestra por la membrana y transferir el filtro al medio YM-11. Incubar a 25°C durante 3-5 días.

Contar las colonias con tonos de azul.

YM-11. Peptona de soja 20 g, triptona 20 g, glucosa 5 g, cloruro de sodio 5 g, fosfato dipotásico 2,4 g, azul tripan 0,03 g, cloranfenicol 0,1 g, agua 1 litro, pH 7. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (13).

ANALISIS DE ENVASES

Volcar 100 mL de diluyente estéril y mover el envase para que tome contacto con toda la superficie interna.

Colocar 1 mL en una caja de Petri, volcar 15 mL de agar para recuento fundido y a 50°C, mezclar por rotación sobre la mesada.

Repetir la operación usando agar McConkey.

Incubar a 35°C durante 24-48 horas. Multiplicar por 100 los números de colonias para obtener las ufc de bacterias heterótrofas y de coliformes /envase (2).

ANALISIS DE TAPAS

Humedecer un hisopo con diluyente estéril y pasar dos veces por la superficie interna del cierre. Insertar el hisopo en un tubo con 10 mL de diluyente. Mezclar bien.

Colocar 1 mL en una caja de Petri, volcar 15 mL de agar para recuento fundido y a 50°C, mezclar por rotación sobre la mesada.

Repetir la operación usando agar McConkey.

Incubar a 35°C durante 24-48 horas. Multiplicar por 10 los números de colonias, para obtener las ufc de bacterias heterótrofas y de coliformes /tapa

Los envases plásticos retornables a la salida del proceso de higienización, según el art 196 bis del CAA, no deben contener coliformes y el recuento de bacterias mesófilas aerobias tiene un límite de 1 ufc por mL del volumen interno del envase (9).

Los niveles de levaduras totales en el agua de enjuague de la válvula llenadora no deben superar las 15 ufc/100 mL, salvo las colas donde se suele admitir no más de 100 ufc/100 mL. Cuando se trata de más de cien válvulas, se aplica el siguiente programa: $n=30$ $c=3$ $m=15$ ufc/100 mL y $M= 50$ ufc/100 mL (2).

REFERENCIAS

1. Reasoner DJ et al. 1989. *Appl Environ Microbiol* 55: 912.
2. Downes FP, Ito K, eds. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4º ed, APHA, Washington, p 53, 569 y 573.
3. Morais PV et al. *Appl Environ Microbiol* 63: 851.
4. Loy A et al. 2005. *Appl Environ Microbiol* 71: 3624.
5. Moore JE et al. 2002. *Appl Environ Microbiol* 68: 4130.
6. States SJ et al. 1987. *Appl Environ Microbiol* 53: 979.
7. Kuhn I et al. 1997. *Appl Environ Microbiol* 63: 2708.
8. Le Chevalier MW et al. 1991. *Appl Environ Microbiol* 57: 2617.
9. Código Alimentario Argentino. Cap 4 y 12. <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
10. Payment P, Franco E. 1993. *Appl Environ Microbiol* 59: 2418.
11. Mossel DAA et al. 2003. *Microbiología de los Alimentos*. 2ª ed, Acribia, Zaragoza, p 650.
12. Guinea J et al. 1979. *Análisis Microbiológico de Aguas*. Omega, Barcelona, p 21.
13. Andrews WH, ed. 1996. *Microbiological Methods*. Subcap 17.2 en: *Official Methods of Analysis*. AOAC, Washington.
14. ICMSF. 1998. *Microorganisms in Foods*. Vol 6. Blackie Academics & Professional, London, p 440.
15. Rodrigues F et al. 2001. *Appl Environ Microbiol* 67: 2123.
16. Déak T, Beuchat LR. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Ratón, p 65.
17. Arias CR et al. 2002. *Appl Environ Microbiol* 68: 1955.
18. Ancasi EG et al. 2006. *Rev Arg Microbiol* 38: 93.
19. Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, p 205, 242.