

técnico o docente relacionados con los Museos que se incorporen mediante convenio con el Ministerio de Cultura.

Art. 27. Cooperación.

El Ministerio de Cultura, a través de la Dirección General de Bellas Artes y Archivos, asesorada por la Junta Superior de Museos, promoverá la cooperación entre los Museos e Institutos que integran el Sistema Español de Museos, para la documentación, investigación, conservación y restauración de los fondos, así como para las actividades de difusión cultural y el perfeccionamiento de su personal.

DISPOSICIONES ADICIONALES

Primera.-La adscripción de Museos al Ministerio de Cultura se realiza a través de la Dirección General de Bellas Artes y Archivos, cualquiera que sea el régimen administrativo específico de cada uno de ellos.

Segunda.-Las inversiones que se realicen en los edificios de los Museos adscritos al Ministerio de Cultura y gestionados por la Comunidad Autónoma, que no supongan la simple conservación de aquéllos, podrán financiarse con cargo a los Presupuestos Generales del Estado o de la respectiva Comunidad Autónoma.

En todo caso estas inversiones serán programadas por el Ministerio de Cultura, por propia iniciativa o a propuesta de la Comunidad Autónoma, y previo acuerdo de ambas Administraciones en el que la Administración gestora del Museo asumirá los gastos de dotación, conservación y mantenimiento derivados de la inversión que se proyecte realizar.

Tercera.-Las competencias que este Reglamento atribuye a los respectivos Ministerios, serán ejercidas por el Consejo de Administración del Patrimonio Nacional respecto a los Museos de titularidad estatal integrados en el mismo, cuando así corresponda de acuerdo con lo dispuesto en la Ley 23/1982, de 16 de junio, del Patrimonio Nacional.

Cuarta.-Las competencias sobre restauraciones y reproducciones enunciadas en los artículos 14 y 24 de este Reglamento, serán ejercidas por los órganos rectores del Museo Nacional del Prado, respecto a los fondos custodiados en el mismo, de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 1432/1985, de 1 de agosto.

DISPOSICIONES TRANSITORIAS

Primera.-Lo dispuesto en este Reglamento es de aplicación a los depósitos de fondos museísticos que la Administración del Estado haya constituido antes de la entrada en vigor del mismo.

Segunda.-En el plazo de un año a partir de la entrada en vigor del presente Reglamento, todos los Museos adscritos al Ministerio de Cultura adaptarán las inscripciones de los fondos que conservan a lo establecido en los artículos 9 y 10 y remitirán a la Dirección General de Bellas Artes y Archivos fotocopia de los libros de Registro precedentes y de los actualizados.

En el orden de inscripción de estos fondos se respetará el de inscripción de los mismos en los Registros o en los Inventarios precedentes del Museo.

A los efectos de esta disposición se entenderá que quedan asignados a la colección estable de dichos Museos los bienes de propiedad estatal cuyo depósito no esté acreditado documentalmente.

La Dirección General de Bellas Artes y Archivos deberá comprobar el cumplimiento de lo establecido en esta disposición.

DISPOSICIONES FINALES

Primera.-Conforme a lo dispuesto en los artículos 16 y 19 de la Ley 30/1984, de 2 de agosto, de Medidas para la Reforma de la Función Pública, corresponde a las Comunidades Autónomas la provisión de todos los puestos de trabajo de los Museos de titularidad estatal que gestionen en virtud del correspondiente Convenio.

Segunda.-El Ministerio de Cultura y los demás Ministerios, respecto a los Museos que tienen adscritos, dictarán las disposiciones necesarias para el desarrollo de este Reglamento en el ámbito de sus competencias.

DISPOSICION DEROGATORIA

1. Quedan derogadas cuantas disposiciones se opongan a lo establecido en el presente Real Decreto y, expresamente, las siguientes:

- Real Decreto de 29 de noviembre de 1901 aprobando el Reglamento General de los Museos regidos por el Cuerpo Facultativo de Archiveros, Bibliotecarios y Arqueólogos.

- Decreto 730/1971, de 25 de marzo, por el que se regula la organización y funcionamiento de los Museos estatales de Bellas Artes.

- Orden de 28 de junio de 1972, por la que se dictan nuevas normas para la visita a Museos y monumentos dependientes de la Dirección General de Bellas Artes y Archivos.

- Real Decreto 3547/1981, de 29 de diciembre, sobre depósitos de obras de arte y otros fondos museísticos propiedad del Estado en Instituciones o Entidades públicas o privadas.

2. Se declara vigente y de aplicación a los Museos adscritos al Ministerio de Cultura:

- El Acuerdo del Consejo de Ministros de 7 de diciembre de 1982, por el que se establece la entrada libre y gratuita de los ciudadanos españoles en los Museos estatales dependientes de la Dirección General de Bellas Artes y Archivos.

- El Acuerdo del Consejo de Ministros del 21 de febrero de 1986, por el que se establece la entrada libre y gratuita de los extranjeros residentes en España y de los jóvenes menores de veintidós años pertenecientes a Estados miembros de la Comunidad Económica Europea en los Museos estatales dependientes de la Dirección General de Bellas Artes y Archivos.

MINISTERIO DE RELACIONES CON LAS CORTES Y DE LA SECRETARIA DEL GOBIERNO

11622 *CORRECCION de errores del Real Decreto 418/1987, de 20 de febrero, sobre las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales.*

Advertidos errores en el texto del citado Real Decreto, publicado en el «Boletín Oficial del Estado» número 75, de fecha 28 de marzo de 1987, a continuación se transcriben las oportunas rectificaciones:

En el primer párrafo del preámbulo, séptima línea, donde dice: «...directivas del Consejo 70/534/CEE, ...», debe decir: «... directivas del Consejo 70/524/CEE, ...».

En el artículo 1.º a), donde dice: «a) Aditivos.-Las sustancias o preparados que contengan sustancias distintas de las premezclas, contempladas en la letra h), ...», debe decir: «a) Aditivos.-Las sustancias o preparados que contengan sustancias, distintas de las premezclas contempladas en la letra h), ...».

En el artículo 1.º g), donde dice: «... garanticen la ración diaria, se asocian ...», debe decir: «... garanticen la ración diaria, si se asocian ...».

En el artículo 7.º 1), donde dice: «... o almacenamiento de aditivos, premezclas ...», debe decir: «... o almacenamiento de aditivos, premezclas ...».

En el artículo 9.º 2., donde dice: «... Directiva CEE 85/587 ...», debe decir: «... Directiva 84/587/CEE ...».

En el artículo 13, tercer párrafo, donde dice: «... expresados en unidades de sistema ...», debe decir: «... expresados en unidades del sistema ...».

11623 *ORDEN de 8 de mayo de 1987 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas.*

El Decreto de la Presidencia del Gobierno número 2484/1967, de 21 de septiembre («Boletín Oficial del Estado» del 17 al 23 de octubre), que aprueba el Código Alimentario Español, prevé que puedan ser objeto de Reglamentaciones Especiales las materias en él reguladas.

Publicado el Decreto de la Presidencia del Gobierno número 2519/1974, de 9 de agosto («Boletín Oficial del Estado» de 13 de septiembre), que regula la entrada en vigor, aplicación y desarrollo del Código Alimentario Español, así como el Real Decreto 2119/1981, de 24 de julio («Boletín Oficial del Estado» de 21 de septiembre), por la que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas, procede dictar, de acuerdo con la autorizació:

contenida en el mismo, los correspondientes métodos oficiales de análisis microbiológicos.

En su virtud, a propuesta de los Ministerios de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, y oídos los representantes de las organizaciones afectadas, este Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno dispone:

Primero.-Se aprueban como oficiales los métodos de análisis microbiológicos para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebidas envasadas que se citan en el anexo.

Segundo.-Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis, y hasta tanto los mismos no sean propuestos por el Organismo competente y previamente informados por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos Nacionales o Internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION DEROGATORIA

Quedan derogadas las disposiciones de igual o inferior rango que se opongan a la presente Orden y, especialmente, el anexo I del Decreto 607/1975, de 13 de marzo («Boletín Oficial del Estado» de 29 de marzo), por el que se regulan las especificaciones microbiológicas a las que han de ajustarse las aguas minero medicinales envasadas, y los artículos 2.º, 3.º y 4.º del Real Decreto 1507/1976, de 21 de mayo («Boletín Oficial del Estado» de 2 de julio), por el que se introducen modificaciones en los Decretos 797/1975, de 21 de marzo («Boletín Oficial del Estado» de 18 de abril), y 607/1975, de 13 de marzo («Boletín Oficial del Estado» de 29 de marzo), de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15.7 del Real Decreto 2119/1981, de 24 de julio, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de aguas de bebida envasadas.

DISPOSICION FINAL

La presente disposición entrará en vigor a los treinta días de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 8 de mayo de 1987.

ZAPATERO GOMEZ

Excmos. Sres. Ministros de Sanidad y Consumo, de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, y de Agricultura, Pesca y Alimentación.

ANEXO

1. Preparación de la muestra para el análisis.
2. *Escherichia coli*.
3. *Salmonella*.
4. *Streptococcus fecales*.
5. *Clostridium sulfito-reductores*.
6. *Pseudomonas aeruginosa*.

1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, deberán mantenerse en sitio fresco y oscuro, procediendo a su análisis lo antes posible.

Agitar, con objeto de homogeneizar la muestra, un mínimo de 25 veces.

Antes de proceder a la abertura de los envases, desinfectar el cuello y tapón. Si el material es de vidrio se efectuará a la llama, en caso de ser el recipiente de otro material, la desinfección se realizará con algodón impregnado en alcohol de 70° o una solución de una sal de amonio cuaternario.

Una vez abierto el recipiente, esterilizar la boca o abertura a la llama. En caso de que el envase no tenga boca (tetrabrik, bolsa de material polimérico), flamear previamente las tijeras u otro instrumento que se utilice para abrir el envase.

El volumen tomado de la muestra será el necesario para los análisis a realizar. En el caso de que para efectuar los análisis se necesite más de un envase y una vez abiertos como se especifica anteriormente, se mezclará el contenido de los envases necesarios en un recipiente de vidrio con tapón de rosca o esmerilado de capacidad suficiente, previamente esterilizado.

Agitar nuevamente el recipiente para su homogeneización.

2. ESCHERICHIA COLI

2.1 Definiciones

2.1.1 Coliformes:

Se entiende por coliformes aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, oxidasa negativas, no esporógenas, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a 37° C en un tiempo máximo de cuarenta y ocho horas.

2.1.2 Escherichia coli:

Se entiende por *Escherichia coli* aquella bacteria coliforme, generalmente indol positiva, citrato negativa, rojo de metilo positiva, que no produce acetilmetilcarbinol y capaz de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas entre 37° C y 44° C en un tiempo máximo de veinticuatro horas.

2.2 Fundamento

El procedimiento comprende las pruebas previas y de confirmación de *Escherichia coli*.

2.3 Material

- 2.3.1 Material de uso corriente en el laboratorio.
- 2.3.2 Estufa regulable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 2.3.3 Estufa o baño termostáticos a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- 2.3.4 Membranas filtrantes de ésteres de celulosa, de 0,45 micras de porosidad, de 47 a 50 mm de diámetro, estériles.
- 2.3.5 Equipo de filtración por vacío.
- 2.3.6 Placas de Petri de diámetro superior al del filtro de membrana.

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Caldo lactosado simple:

| | |
|------------------------------|----------|
| Extracto de carne | 3 g |
| Peptona bacteriológica | 5 g |
| Lactosa | 5 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo. Los tubos irán provistos de campana de fermentación (tubo Durham).

Para los tubos de la serie que reciban volúmenes de agua de 10 ml deberá prepararse el medio a doble de concentración -duplicando las cantidades de los componentes en el mismo volumen de agua destilada- y distribuyéndolo a razón de 10 ml por tubo.

Para los tubos o frascos de la serie que tengan que recibir volúmenes de agua a 50 ml se utilizará el mismo medio concentrado, pero distribuyéndolo a razón de 50 ml por cada uno. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

El pH final del caldo deberá ser 6,8 - 7.

2.4.2 Medio de cultivo sólido agar, lactosa, eosina, azul de metileno (Teague Lévine o EMB):

| | |
|---|----------|
| Peptona bacteriológica | 10 g |
| Lactosa | 10 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 2 g |
| Agar | 15 g |
| Eosina amarillenta | 0,4 g |
| Azul de metileno | 0,065 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento suave y repartir a razón de 15 a 20 ml por tubo.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.

El pH final del medio deberá ser 7,1.

2.4.3 Agar común:

| | |
|------------------------------|----------|
| Extracto de carne | 3 g |
| Peptona bacteriológica | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Agua | 1.000 ml |

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7. Repartir el medio en tubos de 16 x 160 mm a razón de 5 a 6 mm por tubo. Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada, hasta la solidificación.

2.4.4 Agua de triptona:

| | |
|----------------------|----------|
| Triptona | 10 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes en el agua destilada, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo.
Esterilizar en el autoclave a 121° C durante quince minutos.
El pH final del medio deberá ser 7,2.

2.4.5 Medio de triptona, glucosa, fosfato (Clark y Lubs):

| | |
|---|----------|
| Triptona | 10 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 5 g |
| Glucosa | 5 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento ligero y repartir a razón de 10 ml por tubo.
Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.
El pH final del medio deberá ser 7,5.

2.4.6 Medio de citrato (Simmons):

| | |
|--|----------|
| Sulfato magnésico (SO ₄ Mg7H ₂ O) | 0,2 g |
| Fosfato monoamónico [PO ₄ HK ₂ (NH ₄)] | 1 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 1 g |
| Citrato sódico | 2 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Azul de bromotimol | 0,08 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento y distribuir en tubos.
Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos. El pH final del medio deberá ser 6,8. Dejar que el medio solidifique en posición inclinada.

2.4.7 Caldo lactosado, sales biliares, fosfatos (medio EC, de Hajna y Perry):

| | |
|---|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Lactosa | 5 g |
| Mezcla de sales biliares o sales biliares número 3 | 1,5 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 4 g |
| Fosfato monopotásico (PO ₄ H ₂ K) | 1,5 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento y repartir a razón de 10 ml por tubo.
Los tubos irán provistos de campana de fermentación (tubo Durham).
Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.
El pH final del medio deberá ser 6,9.

2.4.8 Medio de cultivo sólido agar-lactosa-trifenil-tergitol 7 (Chapman TTC modificado):

| | |
|--|----------|
| Extracto de carne | 5 g |
| Peptona bacteriológica | 10 g |
| Lactosa | 20 g |
| Extracto de levadura | 6 g |
| Azul de bromotimol (solución al 1 por 100) | 5 ml |
| Agar | 20 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento, ajustar el pH a 7,2 y repartir a razón de 100 ml en matraces o frascos de 150 ml con tapón de rosca.
Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.
En el momento de su empleo, fundir al baño María y añadir a cada frasco:

5 ml de una solución acuosa de cloruro o bromuro de 2,3,5 trifeníl-tetrazolio (TTC) al 0,05 por 100, esterilizada en autoclave a 121° C durante quince minutos.
5 ml de una solución acuosa de heptadecil sulfato sódico (tergitol 7) al 0,2 por 100. No es necesario esterilizar esta solución.

Mezclar bien y repartir en placas de Petri, dejando solidificar. El espesor del medio en las placas debe ser, como mínimo, de 5 mm.
Las placas así preparadas pueden conservarse a 4 ± 2° C durante ocho días.

2.4.9 Reactivos.

2.4.9.1 Reactivo de Kovacs-indol:

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Paradimetilaminobenzaldehído | 5 g |
| Alcohol amílico | 75 ml |
| Acido clorhídrico concentrado | 25 ml |

Disolver el aldehído en el alcohol calentando a baño María a 60° C. Después de frío, añadir gota a gota el ácido.

Conservar a 4 ± 2° C en frasco topacio.

2.4.9.2 Rojo de metilo:

Disolver 0,5 g de rojo de metilo en 100 ml de etanol de 60° C.

2.4.9.3 Reactivo para el acetil-metil-carbinol (Voges-Proskauer, modificado):

- Disolver 5 g de alfa-naftol en 100 ml de etanol de 60° C.
- Disolver 40 g de hidróxido potásico en 100 ml de agua destilada.

Conservar a) y b) en frascos separados, el primero de ellos en nevera a 4 ± 2° C.

2.4.9.4 Reactivo Kovacs-citrocromo-oxidasa.

Solución acuosa al 1 por 100 de clorhidrato de tetrametil parafenilendiamina.
Este reactivo debe ser incoloro y debe conservarse en frasco de color topacio oscuro, cerrado con tapón de vidrio esmerilado y guardado en nevera. El tiempo de duración es de dos semanas a 4 ± 2° C.

2.5 Procedimiento

Se describen tres métodos de análisis de los cuales el método 1 será el procedimiento oficial obligatorio en casos de litigio.

2.5.1 Método 1:

2.5.1.1 Prueba previa.

Es un procedimiento de criba en el que una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme y una reacción positiva indica su posible presencia.

2.5.1.1.1 Técnica.

Disponer en gradilla una serie de tubos y, en su caso, frascos con caldo lactosado (2.4.1) simple y doble concentrado, según la tabla NMP que se haya elegido. Mediante pipetas estériles, sembrar los tubos de la serie tomando los volúmenes del agua, ya homogeneizada, que se indican en la tabla.

Los volúmenes de 10 ml y de 50 ml de agua deberán sembrarse en tubos o frascos conteniendo medio a doble concentración.

Homogeneizar los tubos sembrados. Incubar a 37 ± 1° C durante veinticuatro ± dos horas y en su caso, hasta cuarenta y ocho ± tres horas.

2.5.1.1.2 Lectura e interpretación.

Se consideran tubos positivos aquellos en los que se observa enturbiamiento y aparición de gas en la campana de fermentación, independientemente de su cantidad.

La producción de gas se pone también de manifiesto por el desprendimiento de pequeñas burbujas que atraviesan el medio al agitar suavemente el tubo. La ausencia de gas al cabo de cuarenta y ocho ± tres horas se considera como prueba negativa.

2.5.1.1.3 Prueba de confirmación de coliformes totales.

Es un procedimiento mediante el cual una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme mientras que

una reacción positiva indica su presencia inequívoca.

Deben someterse a esta prueba todos los tubos que hayan resultado positivos en la prueba presuntiva.

En los tubos en los que la positividad se manifiesta a las veinticuatro horas no es necesario continuar la incubación, pudiendo iniciarse entonces con ellos la prueba de confirmación.

2.5.1.1.4 Determinación.

Tomar tantos tubos de agar-eosina-azul de metileno (2.4.2) como tubos positivos presuntivos.

Fundir totalmente el medio colocando los tubos en baño María.

Verter el medio contenido en cada tubo en sendas placas de Petri de 10 cm de diámetro.

Dejar solidificar.

Homogeneizar cada uno de los tubos de caldo lactosado presuntivo positivo.

Resembrar con asa en superficie y por agotamiento sobre el medio solidificado en la placa de Petri.

Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ las placas invertidas durante veinticuatro \pm dos horas.

Sobre este medio las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias características opacas y pigmentadas en rosa, azul o violeta oscuro con o sin reflejo metálico.

Las colonias distintas de las descritas corresponden a bacterias no fermentadoras de la lactosa.

De cada placa seleccionar una colonia de cada uno de los diferentes aspectos descritos como característicos y resembrar mediante hilo o asa de platino sobre agar nutritivo inclinado (2.4.3). A continuación, y sin recargar, resembrar un tubo de caldo lactosado. Incubar ambos medio a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante veinticuatro \pm dos horas.

2.5.1.1.5 Prueba de la oxidasa.

Si la colonia aislada fermenta la lactosa, con producción de gas se toma una porción del cultivo crecido sobre el agar nutritivo para investigar la ausencia de oxidasa.

Para ello, mediante asa o hilo de platino o pipeta Pasteur (no utilizar material que contenga hierro), depositar aquélla sobre un trozo de papel de filtro poroso impregnado con dos o tres gotas de reactivo de Kovacs-oxidasa (2.4.9.4).

La presencia de oxidasa se manifiesta por la aparición inmediata (entre 5-10 segundos) de una coloración violeta o pardo violeta.

Al principio la coloración es rosa-roja oscura y luego, a los 60 segundos aproximadamente, se vuelve negra.

Toda reacción tardía debe tomarse como negativa. La ausencia de coloración indica reacción negativa (oxidasa negativa).

Confirmada la ausencia de oxidasa, proceder a realizar las pruebas IMViC, que confirman la identidad de *Escherichia coli*.

2.5.1.2 Identificación de *Escherichia coli*.

A partir del cultivo de 24 horas en agar nutritivo indicado, sembrar la batería para las pruebas IMViC.

2.5.1.2.1 Formación de indol (I).

Sembrar en agua de triptona (2.4.4), e incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas.

Sobre el cultivo depositar 1 ml del reactivo de Kovacs-indol (2.4.9.1). La

presencia de éste se manifiesta por la formación rápida de un color rosa a rojo púrpura, en la capa superior del alcohol amílico. Si la reacción es negativa, repetiría en los cultivos de 48 horas.

2.5.1.2.2. Prueba del rojo de metilo (M) y del acetil-metil-carbinol (V) en medio de Clark y Lubs.

Un asa de un cultivo de 24 horas con las características precedentes se siembra en el medio de Clark y Lubs (2.4.5), incubando a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Lectura e interpretación de la prueba rojo de metilo (M).

Tomar 2 ml del cultivo depositándolo en un tubo limpio, añadirle una o dos gotas del indicador rojo de metilo (2.4.9.2). Si el medio adquiere un color rojo, la prueba es positiva. Será negativa si el medio toma un color amarillento. Lectura e interpretación de la formación de acetil-metil-carbinol (V).

A 1 ml de cultivo agregarle 0,6 ml de reactivo alfa-naftol y 0,2 ml de hidróxido potásico al 40 por 100 (2.4.9.3). Agitar energicamente y dejar 10 minutos en estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

El acetil-metil-carbinol se manifiesta por el color rosa-rojo que adquiere todo el medio o la superficie del mismo.

2.5.1.2.3. Utilización del citrato (C) en el medio de Simons. (2.4.6).

Con el fin de evitar reacciones positivas falsas por el aporte de sustancias nutritivas con el inóculo, se procederá como sigue: Con asa de platino tomar de la superficie del cultivo en agar nutritivo de 24 horas, con las características ya señaladas, evitando un exceso de masa microbiana y muy especialmente restos del agar.

Inocular una estría en el centro de la superficie inclinada del medio, incubando a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 horas \pm 2 horas, observando los cultivos cada día. Si no cambia el color verde oscuro del medio, el citrato no es utilizado; si adquiere un color azul ultramar, el citrato es asimilado.

Para concluir que la reacción es negativa deberá esperarse hasta el final del período de incubación.

Los cultivos con las características presuntivas señaladas en 2.5.1.1 y además IMiC ++ —, se consideran *Escherichia coli*.

Existen cepas indol negativas, por lo que un resultado IMViC - + — también se considera como *Escherichia coli*.

2.5.2 Método 2:

2.5.2.1 Prueba previa.

(Como en 2.5.1.1).

2.5.2.2 Prueba confirmativa.

A partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva previa agitación de los mismos, tomar de cada uno un asa llena y resembrarla en un tubo del medio EC de Hanjina y Perry (2.4.7); otra asa se resembrará en un tubo de agua de triptona para indol (2.4.4). Incubar ambos medios en baño termostático o estufa a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

La presencia de gas en la campana del medio EC y de indol en el agua de triptona (reactivo 2.4.9.1) confirman la presencia de *Escherichia coli*.

2.5.3 Método 3:

Membrana filtrante.

Los elementos del sistema de filtración que vayan a entrar en contacto con el agua a analizar deben estar estériles.

Colocar un filtro de membrana estéril sobre el soporte de filtración, utilizando pinzas estériles.

Adaptar el embudo. Filtrar 100 ml de la muestra de agua, previamente homogeneizada, efectuando el vacío necesario. Lavar con unos 30 ml de agua de dilución estéril. Retirar el embudo. Mediante las pinzas esterilizadas transferir la membrana filtrante sobre el medio de cultivo (2.4.8) contenido en una placa de Petri, de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba.

Cerrar e invertir la placa e incubar a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Las colonias amarillas o amarillentas con centro anaranjado y halo amarillo se consideran como *Escherichia coli*.

3. SALMONELLA

3.1 Definición

Se entiende por *Salmonella* aquellas bacterias de morfología bacilar, gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, oxidasa negativas, fermentadoras de la glucosa y no de la lactosa, indol, ureasa y triptofanodesaminasa negativas y lisinadescarboxilasa positivas. Diferentes características bioquímicas y serológicas permiten la diferenciación de diversas especies.

3.2 Fundamento

Determinación de la presencia o ausencia de estas bacterias en 100 ml de agua, en medios de cultivo específicos por diferentes métodos.

3.3 Material

3.3.1 Material de uso corriente en el laboratorio.

3.3.2 Estufa regulable a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.4 Medios de cultivo

3.4.1 Caldo nutritivo:

| | |
|-----------------------------|----------|
| Extracto de carne..... | 5 g |
| Peptona bacteriológica..... | 10 g |
| Cloruro sódico..... | 5 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Disolver los componentes con un ligero calentamiento. Ajustar el pH a 7,2 - 7,5. Repartir el medio en los recipientes adecuados.

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

La fórmula indicada corresponde a la concentración normal; se puede preparar el medio a doble concentración.

3.4.2 Caldo selenito:

| | |
|--|----------|
| Peptona bacteriológica..... | 5 g |
| Lactosa..... | 4 g |
| Fosfato disódico ($\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)..... | 10 g |
| Selenito monosódico (SeO_3HNa)..... | 4 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Disolver los tres primeros ingredientes en agua llevándola hasta el punto de ebullición. Dejar enfriar y añadir el selenito. Ajustar el pH a 7,0. Repartir en tubos de 20×200 mm a razón de 20 ml por tubo o 100 ml en matraces de 500 ml de capacidad. Esterilizar al baño maría a una temperatura de $80 \pm 5^\circ\text{C}$ durante una hora y media.

3.4.3 Caldo tetratonato (Müller-Kauffman).

Medio base:

| | |
|---|----------|
| Extracto de carne..... | 5 g |
| Peptona bacteriológica..... | 10 g |
| Cloruro sódico..... | 3 g |
| Carbonato cálcico (CO_3Ca)..... | 45 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Ajustar el pH de forma que después de la esterilización sea 7,0.

Esterilizar quince minutos a 121°C .

Solución de tiosulfato sódico:

| | |
|--|--------|
| Tiosulfato sódico ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$)..... | 50 g |
| Agua destilada..... | 100 ml |

Disolver el tiosulfato sódico en un poco de agua. Completar el volumen final. Esterilizar la solución quince minutos a 121°C .

Solución de iodo:

| | |
|---------------------------|--------|
| Iodo..... | 20 g |
| Ioduro potásico (IK)..... | 25 g |
| Agua destilada..... | 100 ml |

Disolver el ioduro potásico en un poco de agua y añadir el iodo. Completar el volumen final. Conservar la solución en un recipiente opaco y bien cerrado.

Solución de verde brillante:

| | |
|----------------------|--------|
| Verde brillante..... | 0,5 g |
| Agua destilada..... | 100 ml |

Añadir el verde brillante al agua. Mantener la solución un día en oscuridad para que se produzca la autoesterilización.

Solución de bilis de buey:

| | |
|-----------------------------|-------|
| Bilis de buey desecada..... | 10 g |
| Agua destilada..... | 100 g |

Disolver la bilis en agua por ebullición. Esterilizar quince minutos a 121°C .

Medio completo:

| | |
|--|--------|
| Medio base..... | 900 ml |
| Solución de tiosulfato sódico ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$)..... | 100 ml |
| Solución de iodo..... | 20 ml |
| Solución de verde brillante..... | 2 ml |
| Solución de bilis de buey..... | 50 ml |

Añadir al medio base, asepticamente, los demás ingredientes en el orden expuesto. El medio completo se distribuye a razón de 20 ml en tubos estériles de 20×200 mm o 100 ml en matraces estériles de 500 ml de capacidad. Conservado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad, puede utilizarse durante los siete días siguientes a su preparación.

3.4.4 Agar verde brillante rojo fenol:

| | |
|-----------------------------|-----------|
| Peptona bacteriológica..... | 10 g |
| Extracto de levadura..... | 3 g |
| Lactosa..... | 10 g |
| Sacarosa..... | 10 g |
| Cloruro sódico (CINa)..... | 5 g |
| Rojo fenol..... | 0,08 g |
| Verde brillante..... | 0,0125 g |
| Agar..... | 12 a 20 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7. No necesita autoclave. Dejar enfriar hasta 50°C y repartir en placas hasta solidificación.

3.4.5 Agar *Salmonella*-*Shigella*:

| | |
|--|-----------|
| Peptona bacteriológica..... | 10 g |
| Extracto de carne..... | 5 g |
| Lactosa..... | 10 g |
| Sales biliares..... | 6 g |
| Citrato sódico..... | 8,5 g |
| Citrato de hierro amoniacal..... | 1 g |
| Tiosulfato sódico ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$)..... | 8,5 g |
| Rojo neutro..... | 0,025 g |
| Verde brillante..... | 0,00033 g |
| Agar..... | 12 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Disolver por calor la peptona y el extracto de carne. Añadir los otros ingredientes. Llevar a ebullición agitando hasta su completa disolución. No esterilizar en autoclave. Repartir en placas.

3.4.6 Agar bismuto-sulfito:

| | |
|---|----------|
| Peptona bacteriológica..... | 5 g |
| Extracto de carne..... | 5 g |
| Glucosa..... | 5 g |
| Fosfato disódico (PO_4HNa_2)..... | 4 g |
| Sulfato ferroso (SO_4Fe)..... | 0,3 g |
| Sulfito de bismuto (SO_3Bi)..... | 8 g |
| Verde brillante..... | 0,016 g |
| Agar..... | 12,7 g |
| Agua destilada..... | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento y llevar a ebullición hasta disolución completa. Dejar enfriar a unos 50°C y repartir en placas.

3.4.7 Medio de Kligler:

| | |
|-----------------------------|------|
| Peptona bacteriológica..... | 20 g |
| Extracto de carne..... | 3 g |
| Extracto de levadura..... | 3 g |
| Cloruro sódico..... | 5 g |
| Lactosa..... | 10 g |
| Glucosa..... | 1 g |

| | |
|---|----------|
| Sulfato ferroso amoniacal (SO ₄) ₂ Fe(NH ₄) ₂ 6H ₂ O | 0,5 g |
| Tiofulfato sódico (S ₂ O ₃ Na ₂) | 0,5 g |
| Rojo fenol | 0,025 g |
| Agar | 14 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes en agua por ebullición. Ajustar el pH a 7,4. Repartir el medio en tubos de 16 x 160 mm a razón de 5 a 6 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada hasta la solidificación.

3.4.8 Agar común:

| | |
|------------------------|----------|
| Extracto de carne | 3 g |
| Peptona bacteriológica | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento. Ajustar el pH a 7.

Repartir el medio en tubos de 16 x 160 mm a razón de 5 a 6 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada, hasta la solidificación.

3.4.9 Medio de Ferguson-Stuar:

| | |
|---|---------|
| L-Triptófano | 0,4 g |
| Fosfato monopotásico (PO ₄ H ₂ K) | 0,1 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 0,1 g |
| Cloruro sódico | 0,5 g |
| Urea | 2 g |
| Etanol de 95 ^o | 2 ml |
| Rojo fenol al 1 por 100 | 0,25 ml |
| Agua destilada | 100 ml |

Después de disolución se esteriliza por filtración. Se conserva en tubos indefinidamente cuando se mantiene congelado. En el momento de utilizar, descongelar, agitar y distribuir en tubos estériles de hemolisis a razón de 1 ml por tubo.

3.4.10 Medio para la descarboxilación de la lisina (Taylor):

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Extracto de levadura | 3 g |
| Glucosa | 1 g |
| Solución de bromocresol púrpura: | |
| 1,6 g por 100 ml de etanol de 96° | 1 ml |
| Agua destilada | 1.000 ml |
| L-lisina (monoclorhidrato) | 5 g |

Disolver los componentes por calentamiento. Ajustar el pH a 6,8

Distribuir a razón de 2 ml por tubo.

Esterilizar a vapor fluente en autoclave durante veinte minutos.

3.4.11 Medio de Lowe:

- Solución tampón:

| | |
|--|---------|
| Fosfato disódico (PO ₄ HNa ₂ 12H ₂ O) | 2,012 g |
| Fosfato monopotásico (PO ₄ H ₂ K) | 0,143 g |
| Agua destilada | 100 ml |

- Solución de ONPG:

| | |
|---------------------------------------|--------|
| O-nitrofenil beta D-galactopiranosido | 0,6 g |
| Solución tampón | 100 ml |

Esterilizar por filtración:

| | |
|---|--------|
| - Preparar agua de peptona al 1 por 100 | 300 ml |
|---|--------|

Medio completo:

Una parte de solución de ONPG.

Tres partes de agua de peptona al 1 por 100.

Repartir en tubos de 16 x 160 mm y congelar. En el momento de utilizar, descongelar, agitar y distribuir en tubos estériles de hemolisis a razón de 1 ml por tubo.

3.4.12 Otros:

3.4.12.1 Reactivo de Kovacs-indol (como en 2.4.9.1) (para el ensayo de indol).

3.4.12.2 Reactivo de triptófano-desaminasa. Solución acuosa de percloruro de hierro al 10 por 100.

3.4.12.3 Reactivo de Kovacs-oxidasa. (Como en 2.4.9.4).

3.4.12.4 Antiserosos específicos:

- Sueros Anti O, monovalentes y polivalentes.
- Sueros Anti VI.

3.5 Procedimiento

3.5.1 Preenriquecimiento.

Sembrar 100 ml de la muestra de agua en 1.000 ml de caldo nutritivo (3.4.1) o en 100 ml de caldo a doble concentración. Incubar a 37 ± 2° C durante dieciséis a veinte horas como máximo.

3.5.2 Enriquecimiento.

Utilizar simultáneamente caldo selenito (3.4.2) y caldo tetratonato (3.4.3).

Sembrar 2 ml a partir del caldo de preenriquecimiento en dos tubos con 20 ml de los medios de enriquecimiento, o bien, 10 ml del caldo de preenriquecimiento en matraces conteniendo 100 ml de medio de enriquecimiento.

Incubar a 37 ± 1° C, durante cuarenta y ocho ± dos horas.

3.5.3 Aislamiento.

A las veinticuatro y cuarenta y ocho horas de incubación de los medios de enriquecimiento, efectuar siembras con asa de platino sobre la superficie de placas de «Agar verde brillante rojo fenol» (3.4.4), «Agar Salmonella Shigella» (3.4.5) y Agar bismuto-sulfito (3.4.6).

Incubar a 37 ± 1° C durante veinticuatro-cuarenta y ocho horas.

Efectuar la lectura de placas a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas. Se consideran como colonias sospechosas:

Agar verde brillante rojo fenol: Colonias rojas con halo rojo. Agar Salmonella Shigella: Colonias incoloras y transparentes con centro negro.

Agar bismuto-sulfito: Colonias negras con reflejo metálico, negras, marrón o verdes.

De caldo selenito no se deberá sembrar en el medio de agar bismuto-sulfito.

3.5.4 Identificación.

Elegir 5 ó 6 colonias sospechosas de cada uno de los medios de aislamiento y sembrar sobre sendos tubos con medio de Kligler (3.4.7) en picadura y por superficie.

Incubar 24 ± 2 horas a 37 ± 1° C y efectuar la lectura.

A partir de los medios de Kligler que den lactosa negativa (bisel rojo) y glucosa positiva (fondo amarillo), con o sin producción de gas, con o sin producción de sulfhídrico (color negro), sembrar con asa de platino para realizar las siguientes pruebas:

3.5.4.1 Siembra en agar común (3.4.8).

Para la investigación de la citocromo-oxidasa y reacciones serológicas.

3.5.4.2 Investigación de la β-galactosidasa:

Por medio de discos impregnados de ortonitrofenil beta-D-galacto piranosido (O.N.P.G.) o por siembra en el medio de Lowe (3.4.11).

La reacción positiva se traduce por una coloración amarilla y la negativa por ausencia de color.

3.5.4.3 Investigación de la ureasa, triptófano desaminasa e indol.

Siembra en el medio de Ferguson-Stuar (3.4.9).

La presencia de ureasa se manifiesta por la aparición de un color púrpura. A continuación el cultivo se distribuye en dos tubos. En uno de ellos, la producción de indol se manifiesta añadiendo unas gotas de reactivo de Kovacs-Indol (2.4.9.1); en caso positivo aparece un anillo rojo cereza.

En el otro, la triptófano desaminasa se manifiesta añadiendo unas gotas de reactivo de T.D.A. (3.4.12.2). La aparición de un color marrón rojizo indica la positividad de esta prueba.

3.5.4.4 Investigación de la descarboxilación de la lisina.

Siembra en medio de Taylor (3.4.10).

Añadir, una vez efectuada la siembra, 1 ml de aceite de parafina estéril para obtener una anaerobiosis relativa.

La reacción es positiva cuando el medio vira al amarillo por acidificación y se produce una posterior alcalinización con cambio o reviraje del indicador a color violeta púrpura. La lectura de estas pruebas bioquímicas se realiza después de un período de incubación de 24 ± 2 horas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

3.6 Interpretación de resultados

Reacciones bioquímicas de *Salmonella*:

Fermentación de la glucosa: positiva, con gas, salvo algunas excepciones.

Utilización de la lactosa: negativa.

Producción de sulfuro de hidrógeno: positiva, salvo alguna excepción.

Reacción de ureasa: negativa.

Reacción de indol: negativa.

Reacción de triptófano desaminasa: negativa.

Reacción de beta galactosidasa: negativa.

Descarboxilación de la lisina: positiva.

Reacción de la citocromo-oxidasa: negativa.

3.7 Identificación serológica

Desechar aquellas cepas autoglutinables por no ser posible su serotipado.

Realizar a partir del cultivo en agar común y sobre portas desengrasadas, emulsiones hasta obtener suspensiones turbias y homogéneas.

Determinar la aglutinación frente al antisuero O y Vi y en caso de positividad enviar la cepa aislada a un Centro de Referencia para su confirmación.

4. ESTREPTOCOCOS FECALES

4.1 Definición

Son aquellas bacterias cocáceas Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas, catalasa negativas, que fermentan la glucosa con producción de ácido a 37°C en un tiempo máximo de 48 horas.

El conjunto comprende las especies *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. bobis* y *S. equinus*, todas ellas comprendidas en el grupo serológico D de Lancefield.

4.2 Método de los tubos múltiples (N.M.P. número más probable)

Este método podrá utilizarse para cualquier tipo de agua y será el procedimiento oficial obligatorio en casos de litigio.

4.2.1 Fundamento.

Determinación del número de estreptococos mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido glucosado con agentes inhibidores selectivos e incubación a temperatura adecuada. El procedimiento comprende las pruebas: presuntiva y de confirmación de estreptococos fecales.

4.2.2 Material.

Pipetas graduadas en ml y divididas en 1/10, estériles. Estufa regulada a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.3 Medios de cultivo.

4.2.3.1 Preparación del medio glucosa-fosfatos-azida (Rothe), simple:

| | |
|--|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Glucosa | 5 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Fosfato dipotásico (PO_4HK_2) | 2,7 g |
| Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) | 2,7 g |
| Azida sódica | 0,2 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo. Para los tubos de la serie que reciban volúmenes de agua de 10 ml deberá prepararse el medio a doble concentración duplicando las cantidades de los componentes en el mismo volumen de agua destilada y distribuyendo a razón de 10 ml por tubo.

Para los tubos o frascos de la serie que tengan que recibir volúmenes de agua de 50 ml se utilizará el

mismo medio concentrado, pero distribuyéndolo a razón de 50 ml por cada uno.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El pH final del medio deberá ser 6,8-7.

4.2.3.2 Preparación del medio de cultivo glucosa-fosfatos-azida-etilvioleta (Litsky):

| | |
|--|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Glucosa | 5 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Fosfato dipotásico (PO_4HK_2) | 2,7 g |
| Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) | 2,7 g |
| Azida sódica | 0,2 g |
| Solución acuosa de etil-violeta al 0,01 por 100 (P/V) | 5 ml |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes, menos el etil-violeta, por calor suave, ajustar el pH, añadir el etil-violeta y distribuir a razón de 10 ml por tubo.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El pH final del medio deberá ser 6,8-7.

Para ambos medios se recomienda utilizar tubos con tapón de rosca para su cierre hermético. No se utilizará algodón ya que debe evitarse la evaporación del medio durante el almacenamiento.

4.2.4 Procedimiento.

4.2.4.1 Prueba previa.

Disponer en una gradilla, una serie de tubos con medio de Rothe, según la tabla de N.M.P. que se haya elegido.

Mediante pipetas estériles, sembrar los tubos de la serie tomando los volúmenes del agua, ya homogeneizada, que se indican en la tabla.

Homogeneizar los tubos sembrados.

Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

Se consideran tubos positivos aquellos que presentan enturbiamiento y/o sedimento.

4.2.4.2 Prueba de confirmación.

Todos los tubos positivos de la prueba presuntiva se someterán a la prueba de confirmación.

De cada tubo positivo presuntivo homogeneizar su contenido y transferir tres asas al tubo con medio de Litsky. Si el sedimento es escaso o insuficiente, es imprescindible eliminar previamente a la homogeneización el líquido sobrenadante.

También puede tomarse directamente el sedimento por capilaridad, mediante pipeta Pasteur.

Incubar los tubos sembrados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Si a las 24 horas no se observa ni enturbiamiento ni sedimento violeta, prolongar la incubación hasta 48 ± 3 horas.

4.2.4.3 Lectura y expresión de resultados.

Se considerarán tubos positivos aquellos que presenten enturbiamiento y/o sedimento de color violeta.

Se calculará por tabulación el número más probable (N.M.P.) de estreptococos fecales referidos a 100 ml de agua.

4.3 Método del filtro de membrana (método alternativo)

4.3.1 Fundamento.

Determinación del número de estreptococos fecales mediante filtración de volúmenes determinados del agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medio de cultivo selectivo a temperatura adecuada.

4.3.2 Material.

Membranas filtrantes de ésteres de celulosa, de 0,45 micras de porosidad, de 47 a 50 mm de diámetro, estériles.

Pinzas flameables de extremos planos.

Equipos de filtración por vacío.

Placas de Petri de diámetro superior al del filtro de membrana.

Estufa regulada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.3.3 Medio de cultivo.

Preparación del medio de cultivo agar-glucosa-fosfato-azida-trifeniltetrazolio (Slanetz):

| | |
|---|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| Glucosa | 2 g |
| Fosfato dipotásico (PO ₄ HK ₂) | 4 g |
| Azida sódica (N ₃ Na) | 0,4 g |
| 2, 3, 5, trifeniltetrazolio cloruro (TTC) | 0,1 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento hasta punto de ebullición, dejar enfriar a 50° C aproximadamente y ajustar el pH a 7,2.

Homogeneizar y repartir en placas de Petri dejando solidificar.

El espesor del medio en las placas debe ser como mínimo de 5 mm.

Las placas así preparadas pueden conservarse a 4 ± 2° C durante 3 a 4 semanas.

4.3.4 Procedimiento.

Seguir la misma técnica descrita en (3.3.4.1.1) para coliformes totales e incubar a 37 ± 1° C durante 48 ± 3 horas.

4.3.5 Lectura e interpretación.

Contar las colonias desarrolladas que tengan color rojo ladrillo, violeta o rosa.

Las colonias que no presenten esta coloración no se tienen en cuenta por no corresponder a estreptococos fecales.

Puede estimarse que el número de estreptococos fecales presentes en 100 ml corresponde al número de colonias desarrolladas con las características descritas.

5. CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES

5.1 Definición

Son aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram positivas, anaerobias estrictas, capaces de formar esporas y con actividad sulfito reductora.

5.2 Fundamento

Se base en contar el número de colonias de bacterias esporuladas y con capacidad sulfito reductora, desarrolladas en medio de cultivo sólido glucosado conteniendo sulfito sódico y una sal de hierro.

5.3 Material

5.3.1 Material de uso corriente en el laboratorio.

5.3.2 Estufa regulada a 37° C ± 1° C.

5.3.3 Baño termoregurable a 80° C ± 1° C.

5.3.4 Medio de cultivo.

a) Preparación del medio agar-glucosa-sulfito-hierro (Wilson Blair):

| | |
|------------------------|----------|
| Peptona bacteriológica | 10 g |
| Extracto de carne | 3 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Glucosa | 20 g |
| Agar | 30 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento hasta el punto de ebullición y disolución total del agar, evitando la formación de espuma.

Ajustar el pH a 7,6.

Repartir a razón de 20 ml por tubo de capacidad mínima de 50 ml.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

b) Solución acuosa de sulfito de sodio (SO₃Na₂·10H₂O) al 10 por 100.

Esterilizar al baño maría durante 10 minutos.

Esta solución debe utilizarse recientemente preparada.

c) Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 5 por 100. Preparar asepticamente, sin esterilizar por el calor.

5.4 Procedimiento

Colocar cinco tubos del medio de cultivo base, en baño maría hasta fusión total del agar.

Atemperar hasta unos 70° C y añadir:

| | |
|---|--------|
| Solución de citrato de hierro amoniacal | 0,5 ml |
| Solución de sulfito sódico | 1 ml |

Después de la adición de los reactivos, mezclar suavemente para evitar la incorporación de aire en el medio.

Con el objeto de destruir las formas vegetativas, calentar la muestra de agua en baño termoregulado a 80° C, durante 5 minutos dejando enfriar a continuación hasta 60° C aproximadamente.

Sembrar cada tubo de medio preparado como se ha indicado con 20 ml de agua a 60° C.

Mezclar y enfriar rápidamente.

Incubar a 37 ± 1° C durante 48 ± 3 horas.

5.5 Lectura y expresión de resultados

Las colonias de Clostridium sulfito reductores aparecerán de color negro debido a la formación de sulfuro ferroso por reducción de sulfito.

Transcurridas cuarenta y ocho horas, contar el número de colonias negras desarrolladas en la totalidad de la columna de agar, sin tener en cuenta las puntiformes.

El resultado se expresará como número de esporos de clostridios sulfito reductores en 100 ml.

Con objeto de evitar la dificultad de recuento que puede producirse al confluir las colonias desarrolladas, se efectuará una primera lectura a las veinticuatro horas y si por este motivo no es posible el recuento a las cuarenta y ocho horas, se dará la lectura de las veinticuatro horas como resultado aproximado.

6. PSEUDOMONAS AERUGINOSA

6.1 Definición

Son aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias estrictas, oxidasa positivas, móviles por un flagelo polar. Producen un pigmento fluorescente, soluble en agua, la pioverdina, y la piocianina soluble en agua y cloroformo. No forman esporos ni cápsulas. Son capaces de crecer a 42° C pero no a 4° C.

6.2 Método de preenriquecimiento en caldo lactosado

6.2.1 Fundamento.

Determinación de la presencia o ausencia de Pseudomonas aeruginosa en 100 ml de agua problema, utilizando un medio de enriquecimiento previo a los de aislamiento e identificación.

6.2.2 Material.

Estufas de cultivo reguladas a 37 y 42 ± 1° C.

Material de uso corriente en el laboratorio.

Lámpara de luz ultravioleta de longitud de onda corta (aproximadamente 254 nm).

6.2.3 Medios de cultivo.

6.2.3.1 Medio caldo lactosado con magnesio.

| | |
|---|----------|
| Extracto de carne | 6 g |
| Peptona bacteriológica | 10 g |
| Lactosa | 10 g |
| Sulfato magnésico (SO ₄ Mg7H ₂ O) | 1 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento.

Ajustar el pH a 6,8-7 y repartir en frascos a razón de 100 ml cada uno.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.

6.2.3.2 Medio agar centrímid.

| | |
|--|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Cloruro magnésico (Cl ₂ Mg) | 1,4 g |
| Sulfato potásico (SO ₄ K ₂) | 10 g |
| Bromuro N-acetil N.N.N. trimetilamonio | 0,5 g |
| Agar | 14 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento.

Añadir 10 ml de glicerol, llevar a ebullición.

Ajustar el pH a 7 y repartir en tubos de ensayo a razón de 15-20 ml.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.

6.2.3.3 Medio agar nutritivo.

| | |
|------------------------|----------|
| Peptona bacteriológica | 5 g |
| Extracto de carne | 3 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento hasta punto de ebullición y disolución total del agar, evitando la formación de espuma.

Ajustar el pH y repartir a razón de 15 a 20 ml en tubos de ensayo.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

El pH final del medio debe ser 6,9-7,1.

6.2.3.4 Medio sólido King A.

| | |
|--|----------|
| Peptona bacteriológica | 20 g |
| Glicerol | 10 g |
| Sulfato potásico anhidro (SO ₄ K ₂) | 10 g |
| Cloruro magnésico anhidro (Cl ₂ Mg) | 1,4 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los componentes por calentamiento.

Ajustar el pH a 7,2 y repartir a razón de 10 ml en tubos de ensayo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

Inclinar los tubos.

6.2.3.5 Agua de triptona.

| | |
|----------------|----------|
| Triptona | 10 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver.

Ajustar el pH a 7,5.

Distribuir a razón de 6 ml en tubos de ensayo.

Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

6.2.4 Reactivo.

6.2.4.1 Reactivo de citocromo-oxidasa (Kovacs).

Solución acuosa al 1% de clorhidrato de tetrametilparafenilendiamina.

El reactivo Kovacs-oxidasa es incoloro y debe conservarse en frasco de color topacio oscuro, cerrado con tapón de vidrio esmerilado y guardado en nevera.

A pesar de tomar estas precauciones el tiempo máximo de duración es de dos semanas.

6.2.5 Procedimiento.

Sembrar 100 ml del agua problema en un frasco que contenga 100 ml del caldo lactoso con magnesio. Incubar a 37 ± 1° C durante 48 ± 3 horas.

A continuación sembrar simultáneamente los dos medios sólidos siguientes.

6.2.5.1 Siembra en agar cetrimida.

Depositar 0,1 ml del cultivo en caldo lactosado en placa de Petri conteniendo agar cetrimida y sembrar en superficie utilizando asa de Drigalski previamente esterilizada. Si el cultivo en caldo lactosado presenta un gran crecimiento bacteriano, preparar una serie de diluciones procediendo a la siembra como se ha indicado.

Incubar a 42 ± 1° C durante 24 ± 2 horas.

Con las colonias aparecidas en este medio proceder a una identificación final llevando a cabo las siguientes pruebas:

6.2.5.1.1 Reacción de la oxidasa.

Mediante asa o hilo de platino o pipeta Pasteur (no utilizar material que contenga hierro), depositar una parte de una colonia sobre un trozo de papel de filtro poroso impregnado con 2 ó 3 gotas de reactivo de Kovacs-oxidasa (6.2.4.1).

La presencia de oxidasa se manifiesta por la aparición inmediata (entre 5-10 segundos) de una coloración violeta o pardo violeta.

Al principio la coloración es rosa-rojo oscura y luego, a los 60 segundos, aproximadamente, se vuelve negra.

Toda reacción tardía debe tomarse como negativa. La ausencia de coloración indica reacción negativa (oxidasa negativa).

6.2.5.1.2 Comprobación del pigmento piocianina.

Sembrar en estrías sobre el medio King A. Incubar a 42 ± 1° C durante 48-72 horas.

En dicho medio se exalta la producción de piocianina.

6.2.5.2 Siembra en agar nutritivo.

Depositar 0,1 ml del cultivo en caldo lactosado en placa de Petri conteniendo agar nutritivo y sembrar en superficie utilizando asa de Drigalski previamente esterilizada.

Si el cultivo en caldo lactosado presenta un gran crecimiento bacteriano, preparar una serie de diluciones procediendo a la siembra como se ha indicado.

Incubar a 42 ± 1° C durante 24 ± 2 horas.

Proceder a la identificación de las colonias llevando a cabo las siguientes pruebas:

6.2.5.2.1 Morfología y tinción.

A partir de una colonia hacer un frotis sobre portaobjetos, teñir por el método de Gram y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

6.2.5.2.2 Reacción de la oxidasa.

Como en 6.2.5.1.1.

6.2.5.2.3 Comprobación del pigmento piocianina.

Como en 6.2.5.1.2.

6.2.5.2.4 Comprobación del pigmento pioverdina.

Colocar las placas con las colonias aparecidas sobre agar nutritivo bajo la luz ultravioleta para observar la fluorescencia de la pioverdina.

6.2.6 Lectura e identificación.

6.2.6.1 Siembra en agar cetrimida.

6.2.6.1.1 Reacción de la oxidasa.

Pseudomonas aeruginosa es citocromo-oxidasa positiva.

6.2.6.1.2 Comprobación del pigmento piocianina.

La piocianina es soluble en agua y cloroformo. Para comprobar esta característica se siembra la cepa en un tubo conteniendo agua de triptona y se incuba a 42 ± 1° C durante 24-48 horas, hasta la aparición de una coloración azul-verdosa. Añadir 2 ml de cloroformo y agitar para extraer la piocianina.

La capa cloroformica subyacente a la capa acuosa, se tiñe de azul.

La producción de piocianina confirma la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

6.2.6.2 Siembra en agar nutritivo.

6.2.6.2.1 Morfología y tinción.

Se deben observar unos bacilos finos Gram negativos de unos 0,3 × 3 micrómetros, sin cápsulas ni esporos.

6.2.6.2.2 Reacción de la oxidasa.

Como en 6.2.6.1.1.

6.2.6.2.3 Comprobación del pigmento piocianina.

Como en 6.2.6.1.2.

6.3 Método del filtro de membrana (método alternativo)

6.3.1 Fundamento.

Investigación de la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* mediante filtración de volúmenes determinados de agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medios de cultivo selectivos a temperaturas selectivas.

6.3.2 Material.

Membranas filtrantes de ésteres de celulosa de 0,45 micrómetros de porosidad, de 47 a 50 mm de diámetro, estériles. Pinzas flameables de extremos planos. Equipo de filtración por vacío.

Placas de Petri de diámetro superior al del filtro de membrana.
Estufa de cultivo regulada a $42 \pm 1^\circ\text{C}$.
Material de uso corriente en el laboratorio.

6.3.3 Medios de cultivo.

6.3.3.1 Medio agar cetrimida.
Como en 6.2.3.2.

6.3.3.2 Medio de cultivo: m P A-C de Brodsky y Ciebin.

| | |
|--|----------|
| L-lisina | 5 g |
| Cloruro sódico | 5 g |
| Extracto de levadura | 2 g |
| Tiosulfato sódico ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | 5 g |
| Xilosa | 1,2 g |
| Sacarosa | 1,2 g |
| Lactosa | 1,2 g |
| Rojo de fenol | 0,08 g |
| Sulfato magnésico ($\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 1,5 g |
| Citrato férrico amónico | 0,8 g |
| Agar | 15 g |
| Agua destilada | 1.000 ml |

Disolver los productos por calentamiento hasta ebullición, ajustar el pH a 7,4 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 10 minutos o por ebullición.

Enfriar el medio a 55°C e incorporarle Kanamicina, 8 mg; ácido nalidíxico, 37 mg. Distribuir en placas de Petri.

Los antibióticos en solución pueden conservarse congelados hasta su empleo. El medio estéril, distribuido en las placas, se puede conservar en frigorífico a $6-8^\circ\text{C}$ de cuatro a ocho semanas, si se evita su desecación.

6.3.3.3 Medio sólido King A.
Como en 6.2.3.4.

6.3.3.4 Agua de triptona.
Como en 6.2.3.5.

6.3.4 Reactivo.

6.3.4.1 Reactivo de citocromo-oxidasa (Kovacs).
Como en 6.2.4.1.

6.3.5 Procedimiento.

Los elementos del sistema de filtración que vayan a entrar en contacto con el agua a analizar deben estar estériles. Colocar un filtro de membrana estéril sobre el soporte de filtración, utilizando pinzas estériles. Adaptar el embudo.

Filtrar 100 ml de la muestra de agua previamente homogeneizada, efectuando el vacío necesario.

Lavar con unos 30 ml de agua de dilución estéril.

Retirar el embudo.

Mediante las pinzas esterilizadas transferir la membrana filtrante sobre el medio de cultivo agar cetrimida o M PA-C contenido en una placa de Petri de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba.

Cerrar e invertir la placa e incubar a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

6.3.6 Lectura.

La lectura de los resultados requiere el examen de las colonias aparecidas sobre la membrana.

En el medio agar-cetrimida las colonias son de 1-2 mm, redondas, superficie lisa, brillante, color blanco cremoso y aspecto mucoso. Por incubación prolongada las colonias toman una coloración oscura con bordes claros. Debido a la difusión de pigmento, el medio o la membrana, adquieren un tono verdoso.

Las colonias aparecidas sobre la membrana utilizando como soporte el medio mPA-C son de 0,8 - 2,2 mm de diámetro, planas con bordes transparentes y los centros parduzco a verde oscuro. Es característico el viraje a púrpura del medio en contacto con la colonia.

6.3.6.1 Morfología y tinción.
Como en 6.2.5.2.1.

6.3.6.2 Reacción de la oxidasa.
Como en 6.2.5.1.1.

6.3.6.3 Movilidad.

Sembrar parte de la colonia a estudiar, en un tubo que contenga agua de triptona e incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

Comprobar la movilidad mediante observación al microscopio utilizando la técnica de la gota pendiente.

6.3.6.4 Comprobación de pigmentos.

Sembrar en estrias sobre el medio King A.

Incubar a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48-72 horas.

En este medio se exalta la síntesis de la piocianina.

6.3.7 Interpretación.

6.3.7.1 Morfología y tinción.

Se deben observar unos bacilos Gram negativos finos de unos $0,3 \times 3$ micrómetros, sin cápsulas ni esporos.

6.3.7.2 Reacción de la oxidasa.

Pseudomonas aeruginosa es citocromo-oxidasa positiva.

6.3.7.3 Movilidad.

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo móvil.

6.3.7.4 Comprobación de pigmentos.

Como en 6.2.6.1.2.

11624 ORDEN de 8 de mayo de 1987 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de anís.

Entre las previsiones de la Ley 25/1970, de 2 de diciembre, que aprobó el Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes, establecida en su artículo 34,2, que los aguardientes compuestos y los licores y, entre ellos el anís, serían objeto de Reglamentaciones especiales.

Como consecuencia de la anterior previsión fue publicado el Real Decreto 644/1982, de 5 de marzo («Boletín Oficial del Estado» de 2 de abril), que aprobaba la Reglamentación especial para la elaboración, circulación y comercio de anís, procediendo ahora regular sus correspondientes métodos analíticos.

En la redacción de métodos oficiales de análisis se ha procurado, en la medida de lo posible y siguiendo las directrices establecidas en el artículo 9.º del Real Decreto 1908/1984, de 26 de septiembre («Boletín Oficial del Estado» de 29 de octubre), por el que se modifican algunos de los artículos y epígrafes de determinadas Reglamentaciones para la elaboración, circulación y comercio de bebidas derivadas de alcoholes naturales, su adaptación a los métodos aprobados por los Organismos internacionales especializados en la materia, con el fin de aprovechar las experiencias obtenidas de su aplicación.

En su virtud, a propuesta de los Ministerios de Economía y Hacienda, de Industria y Energía, de Agricultura, Pesca y Alimentación y de Sanidad y Consumo, oídos los representantes de los sectores afectados, y previo informe preceptivo de la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria,

Este Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría de Gobierno dispone:

Primero.-Se aprueban como oficiales los métodos de análisis para el anís que se citan en el anexo 1.

Segundo.-Las determinaciones analíticas se realizarán de acuerdo con los métodos oficiales vigentes. Cuando no existan métodos oficiales para determinados análisis y hasta tanto los mismos no sean propuestos por el Organismo competente y previamente informados por la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria, podrán ser utilizados los aprobados por los Organismos nacionales e internacionales de reconocida solvencia.

DISPOSICION DEROGATORIA

Quedan derogadas cuantas disposiciones de igual o inferior rango se opongan a lo dispuesto en la presente Orden.

DISPOSICION FINAL

La presente Orden entrará en vigor a los seis meses de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado», salvo los métodos