



Universidad de León

GUÍA DE *“Prácticas de Higiene y
Control Microbiológico
en las Industrias Agroalimentarias”*

Titulación de “Ingeniero Agrónomo”

Profesor responsable:

Dr. Jose M^a Rodríguez Calleja

Profesores colaboradores:

Dra. M^a Luisa García López

Dr. Andrés Otero Carballeira

Dr. Jesús Santos Buelga

Área de Conocimiento *“Nutrición y Bromatología”*
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos
Universidad de León

Edición 2013.0



ÍNDICE DE PRÁCTICAS

- ✓ **1. El laboratorio de higiene y control microbiológico en las industrias alimentarias. Principios básicos y aspectos prácticos**  pág. 4
- ✓ **2. Evaluación de la calidad microbiológica de alimentos: Recuento de la microflora aerobia viable mesófila y psicrotrofa; mohos y levaduras**  pág. 9
- ✓ **3. Evaluación de la calidad microbiológica de alimentos, indicadores: recuento de enterobacterias, *E. coli* y *Staphylococcus aureus***  pág. 15
- ✓ **4. Evaluación de la calidad microbiológica de alimentos, microorganismos patógenos: *Salmonella***  pág. 20
- ✓ **5. Métodos rápidos y automatizados útiles para estimar e identificar microorganismos en la industria alimentaria**  pág. 26
- ✓ **6. Evaluación de la calidad microbiológica y química del agua**  pág. 28



ÍNDICE DE PRÁCTICAS (continuación)

- ✓ **7. Monitorización del estado higiénico de los locales y utensilios destinados a la preparación de alimentos**
 pág. 44

- ✓ **8. Pruebas de valoración de la actividad desinfectante**
 pág. 48

- ✓ **9. Acceso on-line a las disposiciones legislativas**
 pág. 51



1. EL LABORATORIO DE HIGIENE Y CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIAS. PRINCIPIOS BÁSICOS Y ASPECTOS PRÁCTICOS

Generalidades

Los laboratorios deben de estar separados de las áreas de fabricación e, idealmente, en un edificio independiente.

Es importante que a partir del laboratorio no se contaminen las áreas de fabricación. Por eso, hay que dedicar especial atención al aire y a los desechos.

Al laboratorio sólo deben de acceder las personas que trabajan en él y siempre vistiendo la ropa (bata) adecuada.

Hay que diseñarlos pensando que la mayoría de las muestras van a estar contaminadas con microorganismos de las categorías 1 y 2.

Deben de contar con agua caliente y fría y con una fuente adecuada de electricidad.

Aspectos específicos

El laboratorio deberá contar, como mínimo, con áreas específicas para:

- 1) Preparación y esterilización de medios y material para el análisis.
- 2) Esterilización de los medios y el material utilizado (contaminados).
- 3) Lavado de material de vidrio y otros.
- 4) Almacenamiento de medios, reactivos y material desechable.
- 5) Llevar a cabo el trabajo de rutina (tomar muestras, preparar diluciones, sembrar, etc.)
- 6) Trabajar con microorganismos patógenos.

Equipamiento Básico

- Homogeneizador. Sorvall, Stomacher.
- Estufas.- Para mesófilos y psicrotrofos.
- Baños de agua.
- Autoclaves.



- Hornos para secado de vidrio.
- Hornos de esterilización.
- Sistemas para esterilizar por filtración.
- Frigoríficos y congeladores.
- pHmetros.
- Centrífugas.
- Material desechable de plástico (placas de Petri y otros).
- Balanzas.
- Microscopio.
- Cabinas de flujo laminar.
- Agitadores para medios y para tubos.
- Horno microondas (opcional).
- Material de vidrio: pipetas, frascos, embudos, frascos Erlenmeyer, probetas, vasos de precipitados, matraces, tubos de ensayo.
- Otro material: pipetas automáticas, puntas de pipetas, gradillas, bolsas de Stomacher o vasos de homogeneizado, espátulas, tijeras, asas de platino, varillas de vidrio, contenedores para las pipetas usadas, portaobjetos y cubres, bolsas para esterilizar los medios utilizados, otros.
- Agua destilada o desmineralizada libre de sustancias que impidan el crecimiento de los microorganismos que estamos investigando
- Equipos para métodos rápidos
- Equipos para siembra en espiral, Equipos basados en la impedancia y en la luminiscencia, etc.

Diluyentes, Medios de cultivo y reactivos.

Los medios pueden ser:

Generales. o no selectivos; es decir que permiten el crecimiento de muchas bacterias. Por ejemplo, caldo y agar nutritivo, TSA y TSB, caldo y agar BHI, etc. A estos medios se les puede añadir sangre, suero, leche, extracto de levadura u otros ingredientes que necesitan determinados grupos de bacterias. Si se les añade determinados compuestos pueden ser selectivos.

Selectivos. Se utilizan para contar o detectar un microorganismo o un grupo de microorganismos concretos. Se trata de medios básicos que incluyen uno o más agentes que no inhiben al o a los microorganismos que nos interesan pero sí a los que no nos interesan y suelen acompañarlos.



Diferenciales. Son aquellos que incluyen ingredientes que permiten diferenciar las colonias fácilmente. Por ejemplo, que sean o no hemolíticas, que fermenten o no un azúcar, etc. Generalmente, los medios para grupos concretos de microorganismos son selectivos y diferenciales.

Electivos. Son especialmente útiles cuando el microorganismo en cuestión tiene unos requerimientos poco frecuentes. Un ejemplo es el agar lisina para el aislamiento de levaduras “salvajes” que utilizan este aminoácido como única fuente de nitrógeno.

Los diluyentes y medios se suelen comercializar deshidratados.

Para prepararlos, los medios y diluyentes o los ingredientes se disuelven en agua destilada o desmineralizada mediante agitación con calor (de acuerdo con las instrucciones del fabricante). En todos los medios sólidos hay que fundir el agar antes de esterilizar. Se comprueba el pH y, si es necesario, se ajusta con pequeños volúmenes de soluciones de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico. A continuación, se distribuyen en los volúmenes adecuados y se esterilizan en el autoclave. No se deben esterilizar volúmenes superiores a 1000 ml porque los tiempos prolongados de calentamiento y enfriamiento afectan a los componentes de los medios. Si el medio se va a usar inmediatamente, los volúmenes máximos serán de 250-1000 ml y si el medio preparado se va a almacenar, el volumen será de 250 ml o menos. Después de esterilizar no se puede bajar la presión rápidamente porque el medio hierve y se producen “accidentes” como la pérdida de tapones.

Los medios preparados se almacenarán a $4\pm 2^\circ\text{C}$. Si ya están repartidos en placas, habrá que meterlos en bolsas de plástico para que no se deshidraten.

Para fundir los medios sólidos en frascos hay que utilizar un baño con agua hirviendo o un horno microondas. Si vamos a emplear una técnica de siembra por mezcla en todo el medio, hay que mantener éste en el baño a $45-46^\circ\text{C}$ no más de 4 horas y, a veces, a lo sumo 1 hora porque se desnaturalizan los ingredientes.

Se debe añadir medio a las placas en cantidad suficiente para que la profundidad del mismo sea de unos 4 mm (15 ml para placas de Petri de 90 mm). Si las placas se van a incubar mucho tiempo o a temperaturas altas, hay que utilizar volúmenes mayores para que no se deshidrate el medio.

Para los recuentos en superficie hay que secar muy bien el medio colocando las placas en una cabina de flujo laminar durante 30 minutos o en una estufa a 50°C .



Buenas prácticas en el laboratorio

Precauciones básicas son:

1. Las áreas de trabajo tienen que estar bien limpias y sin corrientes de aire.
2. Las superficies deben limpiarse y desinfectarse antes y después de trabajar.
3. Los tubos de ensayo deben flamearse después de abrirlos y antes de taparlos. Idem con los frascos. Además, en éstos la boca no se puede tocar con las manos.
4. Hay que trabajar lo más rápido posible y no hablar, toser o estornudar mientras se trabaja.
5. Las cajas y bolsas generales que contienen material estéril desechable deben cerrarse rápidamente.
6. Hay que manipular con cuidado el material de vidrio estéril. P. ej., no tocar nunca la parte inferior de las pipetas.
7. Al flamear las asas de platino, éstas tienen que llegar a ponerse rojas y, para ello, hay que situarlas inclinadas adecuadamente sobre el mechero. Se deben flamear antes y después de usarlas aunque hay que dejar que se enfríen antes de utilizarlas. Idem para las asas de vidrio que se sumergen en alcohol. Se pueden emplear asas desechables estériles.
8. Después de utilizar cierto material no desechable (pipetas y portaobjetos, p. ej.) debe colocarse en un recipiente con desinfectante (hipoclorito sódico). Otro, como los frascos de dilución, tienen que esterilizarse antes de lavarse.
9. El material desechable tiene que colocarse en bolsas adecuadas para la esterilización.
10. Si se derraman diluciones, cultivos, etc. hay que limpiar, utilizando guantes, con papel humedecido con una solución de desinfectante (van bien yodóforos o fenol). Las superficies de trabajo tienen que limpiarse y desinfectarse antes de continuar.
11. Hay que procurar minimizar la formación de aerosoles. Estos se forman al abrir los tubos, frascos, placas, etc. También al flamear las asas y varillas de vidrio, al pipetear, en las centrífugas, homogeneizadores, etc.



Protección personal

1. Llevar siempre bata.
2. Cortarse bien las uñas, recogerse el cabello si se tiene largo o protegérselo con un gorro. No es recomendable dejarse barba.
3. Si hay que ir a la zona de procesado a tomar muestras, emplear una vestimenta adecuada y distinta de la del laboratorio para evitar la contaminación cruzada. Las empresas importantes tienen personal para tomar estas muestras.
4. Si se tienen lesiones cutáneas, especialmente en cara y manos, no trabajar en el laboratorio.
5. Esterilizar las batas y otra ropa usada en el trabajo antes de llevarla a la lavandería.
6. Si se sospecha que el material que se maneja es peligroso (patógenos, material muy caliente o muy frío o productos corrosivos) usar guantes y gafas.
7. Si se sospecha que el material que se maneja es peligroso, no pipetear directamente.
8. No comer, beber ni fumar en el laboratorio.
9. Muchos reactivos son tóxicos. Hay que tener cuidado al manejarlos y almacenarlos. Habilitar sistemas para evitar la contaminación del medio ambiente (recogida).
10. Cuidado con el alcohol que se emplea para flamear. Si empieza a arder, tapar el recipiente con papel de aluminio o utilizar otro sistema que impida el acceso del aire.
11. Utilizar etiquetas autoadhesivas. Evitar chupar los lápices, bolígrafos, rotuladores, etc. No tocarse la cara mientras se trabaja. No morderse las uñas.
12. Cubrir los cortes y abrasiones con tiritas (waterproof). Previamente se limpiarán y desinfectarán. Si se han producido en el laboratorio, anotarlos.
13. Lavarse las manos al terminar de trabajar, al ir al baño y siempre que sea necesario.

Cuestiones

- Señala las precauciones y protecciones a cumplir en el laboratorio que consideres que son de más difícil consecución o que estimes se incumplen habitualmente.



2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS: recuento de la microflora aerobia viable mesófila y psicrotrofa; mohos y levaduras

PLANES DE MUESTREO Y TOMA DE MUESTRAS

Los conceptos teóricos sobre “planes de muestreos” pueden ser consultados en el libro editado por la ICMSF titulado “Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications”. Para la “toma de muestras” se puede seguir la guía del Codex Alimentarius (www.codexalimentarius.net) titulada “GENERAL GUIDELINES ON SAMPLING” (CAC/GL 50-2004).

ALIMENTOS SELECCIONADOS

Los alimentos seleccionados son filetes de pescado fresco y harinas.

Pescado

Tradicionalmente, las normas microbiológicas para pescado fresco y congelado incluían los siguientes parámetros (referidos a la Orden –BOE de 15 de agosto de 1991- derogada por Real Decreto 135 de 2010):

- Flora aerobia mesófila viable: 10^6 ufc/g.
- Enterobacteriaceas: 10^3 ufc/g.
- *Salmonella*: ausencia en 25 g.

Además, fuera de la UE se recomiendan

- Flora psicrotrofa: $< 10^5$ /g. (Canadá y otros países).
- *Escherichia coli*: m=10, M=500 ufc/g, n=5, c=3. (ICMSF).
- *Staphylococcus aureus*: m= 10^3 , M= 10^4 ufc/g, n=5, c=2. (ICMSF).

Harinas

Tradicionalmente, las normas microbiológicas para harinas y sémolas incluían los siguientes parámetros (referidos a la Reglamentación Técnico Sanitaria –BOE de 6 de julio de 1984- derogada por el Real Decreto 135 de 2010):

- Flora aerobia mesófila viable: 10^6 ufc/g.
- *Escherichia coli*: 10^2 ufc/g.
- *Salmonella*: 0/25 g.
- Mohos y levaduras: 10^4 ufc/g.



PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE LOS HOMOGENEIZADOS

Material

- Homogeneizador (Stomacher Colworth) y bolsas
- Balanza
- Instrumentos esterilizados para preparar las muestras (cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, etc.).
- Pipetas
- Diluyente (agua de peptona al 0,1%). Un frasco con 90 ml y tubos con 9 ml.
- Un vaso de precipitados con alcohol.

Método

- Pesar 10 g del alimento en una bolsa de Stomacher.
- Añadir los 90 ml del frasco.
- Colocar la bolsa en el Stomacher y hacer funcionar el aparato durante 1-2 minutos.
- Agitar enérgicamente la bolsa con las manos y filtrar (embudo con gasa) en el mismo frasco.

Tenemos la dilución 10^{-1} .

- Pasar 1 ml a un tubo conteniendo 9 ml de diluyente. Tenemos la dilución 10^{-2} .
- Seguir haciendo diluciones según la contaminación que sospechemos. En el caso del pescado (suele estar muy contaminado) hasta 10^{-6} . En el caso de la harina (poco contaminada – es un alimento con baja actividad de agua $-a_w-$) hasta 10^{-2} .

RECuento DE LA FLORA AEROBIA MESÓFILA VIABLE POR SIEMBRA EN TODO EL MEDIO.

Introducción

La mayoría de los alimentos (salvo excepciones, como los fermentados) deben ser considerados como inadecuados para el consumo cuando contienen niveles altos de microorganismos. El recuento de bacterias aerobias mesófilas se emplea como indicador y proporciona información sobre la higiene de la obtención y manipulación, temperatura de almacenamiento, etc.

Material

- El señalado para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.
- Placas de Petri de 90x15 mm.



- Pipetas (automáticas de 1 ml y puntas estériles o pipetas de vidrio – 1-2 ml).
- Baño de agua para mantener el medio a 44-46°C.
- Estufa de incubación a una temperatura de 29-31°C.
- Suficiente PCA (*Plate count agar* o agar para recuento en placa).
- Contador de colonias con registro automático o rotulador.

Método

- Preparar el homogeneizado y las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento señalado anteriormente.
 - Para el pescado, depositar, por duplicado, alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en placas petri vacías. Empezar por la más diluida. Esto supone la siembra por placa de 10^{-4} a 10^{-6} g de alimento. Para la harina, depositar, por duplicado, alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Esto supone la siembra por placa de 10^{-1} a 10^{-3} g de alimento.
 - Tener fundido el medio y mantenido en el baño de agua
 - Verter en las placas de Petri 10-15 ml del medio fundido. El período de tiempo entre la preparación de las diluciones y el vertido del medio no debe superar los 20 minutos y es preferible que sea inferior a 15 minutos.
 - Mezclar el inóculo con el medio fundido, girando las placas. La forma adecuada de llevar a cabo esta operación sería la siguiente: a) imprimir a la placa movimientos de vaivén 5 veces en una dirección, b) hacerla girar 5 veces en el sentido de las agujas del reloj, c) volver a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y d) hacerla girar 5 veces en sentido contrario a las agujas del reloj.
 - Una vez solidificado el medio, invertir las placas e incubarlas a 29-31°C durante 48 ± 3 horas.
 - Calcular el recuento estándar en placa.

Resultados

Cálculo del recuento estándar en placa

- Elegir las dos placas correspondientes a una dilución que presenten entre 30 y 300 colonias. Contar todas las colonias de cada placa. Hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicarla por el factor de dilución (la inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas). Dar el valor medio obtenido como el recuento estándar en placa.
- Si una de las placas de la dilución elegida presenta algo menos de 30 colonias o algo más de 300, deben de contarse también todas las colonias de ambas y, como en el caso anterior, hallar la media aritmética y multiplicarla por el factor de dilución. Dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.



- Cuando las dos placas de dos diluciones consecutivas presentan entre 30 y 300 colonias, deben calcularse los recuentos estándar en placa de cada dilución tal como se ha señalado anteriormente y se dará como resultado la media de los dos valores obtenidos, a no ser que uno de ellos sea superior al doble del otro, en cuyo caso se dará como recuento estándar en placa el valor más bajo.
- Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, el valor calculado se dará como el recuento estándar en placa estimado y el cálculo del número de microorganismos presentes en el alimento se lleva a cabo en la forma que se indica en los apartados que se recogen a continuación.
- Si en las placas hay más de 300 colonias, dividir las placas de la dilución más elevada en secciones radiales de 4 u 8 sectores y contar en dos secciones opuestas todas las colonias. Multiplicar el total de colonias por el factor adecuado. El valor obtenido se da como recuento estándar estimado.
- Cuando no se encuentran colonias en las placas correspondientes a la dilución más concentrada, expresar el recuento estándar como inferior a (<) 1 multiplicado por el factor de la dilución más concentrada.
- Cuando se dan los resultados, deben utilizarse únicamente dos cifras significativas (un entero y un decimal). Estas dos cifras corresponden a los dígitos primero y segundo (empezando por la izquierda) de la media de las colonias halladas o estimadas. Los dígitos restantes se redondean a la baja (si el tercer dígito es inferior a 5) o al alza (si es igual o superior). Por ejemplo, si el valor calculado fue de 523.000, éste ha de darse como $5,2 \times 10^5$; si fue de 83.600, debe darse como $8,4 \times 10^4$.

RECuento DE LA FLORA AEROBIA PSICROTROFA MEDIANTE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.

Introducción

Los recuentos de bacterias psicrotomas se emplean para predecir la vida útil de los alimentos conservados a refrigeración. Niveles altos indican que el alimento está alterado o lo estará en un tiempo mínimo.

Material

- El señalado para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.
- Placas de Petri de 90x15 mm conteniendo 15 ml de PCA solidificado. Deben de estar bien secas
- Pipetas que permitan depositar 0.1 ml (automáticas con puntas estériles o pipetas de vidrio).
- Varillas de vidrio en forma de bastón de hockey.
- Estufa de incubación a una temperatura de 7°C.
- Contador de colonias con registro automático o rotulador.



Método

- Preparar el homogeneizado y las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento señalado anteriormente.
- Depositar, por duplicado, alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en placas con medio PCA solidificado. Empezar por la más diluida. Esto supone la siembra por placa de 10^{-4} a 10^{-6} g de alimento.
- Extender las alícuotas sobre la superficie del medio tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio. Dejar secar durante 15 minutos.
- Incubar las placas invertidas durante 10 días a 7°C.
- Calcular el número de microorganismos por gramo o mililitro de muestra siguiendo las indicaciones anteriores. En este caso, como el inóculo es de 0.1 ml, habrá que multiplicar, además, por 10.

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS (HARINAS)

Introducción

Se emplean como indicadores en alimentos ácidos o con baja a_w . Además, existe el riesgo potencial de producción de micotoxinas por parte de los mohos.

Material

- El señalado para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.
- Placas de Petri de 90x15 mm conteniendo 15 ml de agar Oxitetraciclina Gentamicina Extracto de Levadura Glucosa (OGYEA). Deben de estar bien secas
- Pipetas que permitan depositar 0.1 ml (automáticas con puntas estériles o pipetas de vidrio).
- Varillas de vidrio en forma de bastón de hockey.
- Estufa de incubación a una temperatura de 20-25°C.
- Contador de colonias con registro automático o rotulador.

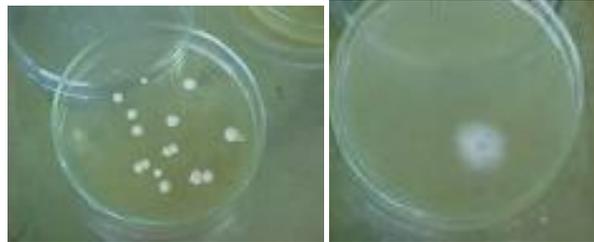
Método

- Preparar el homogeneizado y las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento señalado anteriormente.
- Depositar, por duplicado, alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Extender las alícuotas sobre la superficie del medio tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio. Dejar secar durante 15 minutos.
- Incubar las placas invertidas durante 3-5 días a 20-25°C.

- Calcular el número de mohos y levaduras por gramo o mililitro de muestra siguiendo las indicaciones anteriores. En este caso, como el inóculo es de 0.1 ml, habrá que multiplicar, además, por 10.

Resultados

Los recuentos de mohos y levaduras también pueden hacerse por siembra en todo el medio.



Cuestiones

- Una vez obtenidas las placas para los grupos microbianos realizados en la práctica se observa que, para una de estas determinaciones, sólo se disponen de placas petri en la mayor dilución con un recuento muy superior a 300 ufc. Piensa en una forma razonable de estimación del recuento.



3. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS, INDICADORES: recuento de enterobacterias, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*

RECuento DE ENTEROBACTERIAS

Introducción

La presencia de niveles elevados de enterobacterias en un alimento tratado térmicamente indica que éste ha sufrido un tratamiento inadecuado o que se ha recontaminado. En alimentos no tratados, sugiere que se ha contaminado durante su obtención, a partir del equipo sucio o por prácticas poco higiénicas o que ha estado en condiciones que pudieran permitir el crecimiento de bacterias patógenas.

Material

- El señalado para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.
- Placas de Petri de 90x15 mm.
- Pipetas (automáticas de 1 ml y puntas estériles o pipetas de vidrio – 1-2 ml).
- Baño de agua para mantener el medio a 44-46°C.
- Estufa de incubación a una temperatura de 35-37°C.
- Suficiente medio (Agar Bilis Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta; VRBGA) en frascos o matraces.
- Contador de colonias con registro automático o rotulador.

Método

- Preparar el homogeneizado y las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento señalado anteriormente.
- Para el pescado, depositar, por duplicado, alícuotas de 1 ml de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en placas petri vacías. Empezar por la más diluida. Esto supone la siembra por placa de 10^{-2} a 10^{-4} g de alimento.
- Tener fundido el medio y mantenido en el baño de agua
- Verter en las placas de Petri 10-15 ml del medio fundido. El período de tiempo entre la preparación de las diluciones y el vertido del medio no debe superar los 20 minutos y es preferible que sea inferior a 15 minutos.
- Mezclar el inóculo con el medio fundido, girando las placas. La forma adecuada de llevar a cabo esta operación sería la siguiente: a) imprimir a la placa movimientos de vaivén 5 veces en una dirección, b) hacerla girar 5 veces en el sentido de las agujas del reloj, c) volver a imprimir movimientos de vaivén en una



dirección que forme ángulo recto con la primera y d) hacerla girar 5 veces en sentido contrario a las agujas del reloj.

- Una vez solidificado el medio, se añaden a cada placa 10 ml del mismo medio. Invertir las placas e incubarlas a 35-37°C durante 24±3 horas.
- Calcular el número de presuntas enterobacterias por gramo de alimento.

RECuento DE *Escherichia coli*.

Introducción

E. coli es una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y los animales. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento indica, generalmente, una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en agua y alimentos.

Esta determinación se llevará a cabo utilizando Petrifilm (ver más adelante).

RECuento DE *Staphylococcus aureus*

Introducción

La presencia de un número significativo de *S. aureus* en un alimento se interpreta, por lo general, como indicativo de contaminación a partir de la piel, lesiones superadas, infecciones respiratorias, fosas nasales, etc. de los manipuladores. También el material y el equipo sucios y los alimentos de origen animal pueden ser fuente de contaminación. Cuando se encuentran niveles elevados de esta bacteria en alimentos hay que pensar no sólo en lo anterior sino también en que no han sido adecuadas las prácticas de limpieza y desinfección y que la temperatura de almacenamiento ha sido alta. Además, los alimentos que permiten la multiplicación de esta bacteria (nata, jamón cocido, queso fresco, etc.) pueden ser origen de una intoxicación ya que cuando los niveles de *S. aureus* son $>10^6$ ufc/g o ml de alimento, éste puede contener toxina(s) en cantidad suficiente (0.1-1 µg) para ocasionar los síntomas de la intoxicación estafilocócica.

Material

El señalado para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.

- Placas de Petri de 90x15 mm, conteniendo agar de Baird-Parker (peptona de caseína, extracto de carne, extracto de levadura, cloruro de litio, agar, glicina y piruvato de sodio) o este mismo medio base suplementado con reactivos (yema de huevo y solución de telurito) que permitan diferenciar las colonias de las cepas coagulasa-positivas.
- Pipetas que permitan depositar 0.1 ml.
- Varillas de vidrio acodadas.
- Estufa de incubación a una temperatura de 35-37°C.



- Contador de colonias con registro automático o rotulador.

Método y resultados

- Preparar el homogeneizado y las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento señalado anteriormente.
- Depositar, por duplicado, alícuotas de 0.1 ml de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en placas de medio de cultivo. Empezar por la más diluida.
- Extender los inóculos sobre la superficie del medio tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio. Dejar secar durante 15 minutos.
- Incubar las placas invertidas durante 48 horas a 35-37°C.
- Elegir las placas que tengan 20 y 200 colonias aisladas y contar todas las colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de áreas claras en el medio opaco.
- Calcular el número de *S. aureus* por gramo o mililitro de muestra siguiendo las indicaciones anteriores y teniendo en cuenta que el inóculo es de 0.1 ml. Si el medio no lleva incorporado fibrinógeno, llevar a cabo la prueba de la coagulasa en un número significativo de colonias (no menos de cinco) para dar el recuento de estafilococos coagulasa positivos.

RECuento DE COLIFORMES Y *Escherichia coli* EMPLEANDO EL SISTEMA PETRIFILM™

Introducción

Las placas 3M™ Petrifilm™ constituyen uno de los múltiples sistemas que han sido diseñados para facilitar la realización del análisis microbiológico de los alimentos. Constan de dos delgadas láminas con diversos componentes que reproducen (con gran proximidad) la situación de una placa convencional de medio de cultivo sólido. Al tratarse de placas ya preparadas (su utilización no requiere más que la inoculación de la muestra, la incubación y la lectura) y muy finas, se facilitan tanto el transporte como la realización de las determinaciones y se ahorra espacio en las estufas de incubación. Por otra parte, las placas incluyen un fondo cuadrículado que facilita la ubicación de las colonias.

Existen diversas placas Petrifilm™ en el mercado y se han validado diversos protocolos que emplean estas placas para la realización de diversas determinaciones de interés en el análisis microbiológico de los alimentos. En esta ocasión, se emplearán las placas para el recuento de coliformes y *Escherichia coli*.

Descripción de las placas y morfología de las colonias de *E. coli* y de coliformes: Las placas Petrifilm™ para el recuento de coliformes y *Escherichia coli* contienen los nutrientes y los compuestos inhibidores del medio Rojo Neutro Cristal Violeta con Sales Biliares (Violet Red Bile), un agente gelificante soluble en agua



fría, un indicador de la actividad glucuronidasa (BCIG) y un indicador de tetrazolio que facilita el recuento de las colonias.

Las cepas de *Escherichia coli* son capaces de multiplicarse en los medios con cristal violeta y sales biliares. La mayoría de dichas cepas (en torno al 97%) producen beta-glucuronidasa, que reacciona con un indicador (colorante, BCIG) presente en la placa Petrifilm™, lo que determina que la coloración de las colonias sea azulada a rojo-azulada. Por otra parte, la mayor parte (un 95%) de las cepas de *E. coli* producen gas a partir de la lactosa, lo que determina que se formen burbuja de gas que se asocian a las colonias de *E. coli*.

Los coliformes son definidos por la AOAC y por el U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual como "bacilos Gram negativos que producen ácido y gas a partir de la lactosa durante la fermentación metabólica". Las colonias de coliformes que crecen en estas placas de Petrifilm™ producen ácido que oscurece el color del gel (colonias rojas). Por otra parte, el gas atrapado alrededor de las colonias confirma que se trata de coliformes.

Material

El preciso para la preparación y dilución de los homogeneizados de alimentos.

Placas Petrifilm™ para el recuento de *E. coli* y coliformes (también denominadas placas Petrifilm EC).

Aplicador (diseño específico, se comercializa con las placas Petrifilm™) para repartir el inóculo por la zona de crecimiento de la placa Petrifilm™.

Pipetas de 1 ml.

Estufa de incubación a 35±1°C.

Método

Preparar el homogeneizado y realizar las diluciones de la muestra del alimento por el procedimiento ya conocido (práctica anterior).

Inocular, por duplicado, alícuotas de 1 ml de las diluciones 10⁻¹ y 10⁻² en placas de Petrifilm EC siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- ✓ Colocar la placa Petrifilm™ sobre una superficie plana y levantar la lámina superior.
- ✓ Con la pipeta en posición perpendicular a la placa, depositar 1 ml en el centro de la lámina inferior de la placa Petrifilm™.
- ✓ Bajar la lámina superior evitando introducir burbujas de aire. No dejar caer.
- ✓ Con la cara lisa hacia abajo, colocar el aplicador en la lámina superior sobre el inóculo.
- ✓ Con cuidado, ejercer una presión sobre el aplicador para repartir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar el aplicador.



- ✓ Levantar el aplicador. Esperar un minuto antes de su incubación.

Incubar las placas cara arriba en pilas de hasta 20 placas. Condiciones de incubación: $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

Resultados

Contabilizar como *E. coli* las colonias azules con gas. Contabilizar como coliformes confirmados todas las colonias (azules y rojas) con gas. Emplear para el recuento las placas con una gama de colonias situada entre 15 y 150.

Observación importante:- Las condiciones de incubación y la lectura de los resultados son ligeramente diferentes dependiendo del tipo de muestra que se esté analizando y del organismo de referencia que ha evaluado el método. Los datos proporcionados en este guión son los que se emplean para el análisis de carne, pescado y derivados, siguiendo las recomendaciones de la AOAC.

Cuestiones

- Reflexione sobre la importancia de no formar burbujas de gas al inocular el “petrifilm”. ¿Por qué?



4. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS, PATÓGENOS: *Salmonella*

Introducción

La detección de la presencia de *Salmonella* en muestras de alimentos se lleva a cabo con relativa frecuencia en los laboratorios de análisis, pues el criterio "Ausencia de *Salmonella* en 25 gramos" forma parte de diversas normas microbiológicas.

La metodología disponible para llevar a cabo tal determinación es muy numerosa. Al mismo tiempo que, sobre una misma metodología base, dependiendo del tipo de muestra, se pueden llevar a cabo diversas modificaciones para aumentar la eficacia del método.

Está fuera del ámbito del presente protocolo una revisión de la metodología disponible para la detección de *Salmonella* en los diversos tipos de productos alimenticios. Aquí únicamente se hará mención al procedimiento que, con carácter general, se suele considerar como "de referencia" en relación con la detección de *Salmonella*¹.

En este procedimiento de referencia, el aislamiento e identificación de salmonelas a partir de alimentos se lleva a cabo del siguiente modo:

1.- PRE-ENRIQUECIMIENTO: SIEMBRA EN MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO (sin sustancias inhibidoras).

Tanto para muestras de alimentos que han sido sometidos a tratamientos de congelación, desecación, irradiación, calentamiento, etc. en los que es de esperar que las salmonelas se encuentren en estado "latente" o de "escasa actividad fisiológica", como en el resto de muestras de alimentos la primera siembra conviene hacerla en un medio de enriquecimiento no selectivo, es decir, que no contenga sustancias inhibidoras. Así se consigue que las células bacterianas "debilitadas" o "lesionadas" puedan iniciar su multiplicación, sin el inconveniente que supone la presencia en el medio de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano. En alimentos en los que los tratamientos tecnológicos no permitan sospechar la presencia de células "lesionadas", este pre-enriquecimiento (o enriquecimiento no selectivo) también mejora las posibilidades de detección de las células de *Salmonella* que pudieran estar presentes. Como medio de pre-enriquecimiento suelen utilizarse caldo lactosado (ampliamente utilizado en Estados Unidos) ó agua de peptona tamponada (utilizada mayoritariamente en Europa e incluida en la norma ISO 6579:1993).

¹ El mismo aparece descrito en la norma "ISO 6579:1993. Microbiology. General guidance on methods for the detection of *Salmonella*", cuya versión europea y nacional actualizada es la norma "UNE-EN 12824:1998. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* (ISO 6579:1993., modificada)".



2.- SIEMBRA EN CALDO DE ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO (con sustancias inhibidoras).

La segunda etapa conlleva el empleo de un caldo de enriquecimiento selectivo, medio que contiene sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano. Estas sustancias frenan el crecimiento de una serie de bacterias competidoras que se encuentran generalmente en los alimentos en mucho mayor número que las salmonelas (otras enterobacteriáceas, principalmente) y que crecen mejor que ellas en los medios de cultivo corrientes, sin que tengan efecto o lo tengan escaso sobre las propias salmonelas. Frenada la microbiota acompañante, las salmonelas pueden iniciar su crecimiento y multiplicación más fácilmente.

Los caldos de enriquecimiento selectivo más utilizados son los siguientes:

- caldo tetrionato, caldo tetrionato verde brillante
- caldo selenito, caldo selenito cistina
- caldo Rappaport y sus modificaciones.
- Se aconseja, por lo general, utilizar dos caldos de enriquecimiento selectivo para cada aislamiento. El protocolo ISO 6579:1993 recomienda emplear caldo Rappaport-Vassiliadis (peptona de soja, cloruro sódico, fosfato potásico, cloruro de magnesio y verde malaquita) y caldo selenito cistina (peptona, lactosa, fosfato de sodio, selenito de sodio y L-cistina).

3.- SIEMBRA A PARTIR DE LOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO EN PLACA DE AGAR SELECTIVO.

Los cultivos en caldo de enriquecimiento selectivo se resiembran en placas de agar selectivo, con el fin de obtener colonias individuales. Estos medios sólidos llevan también sustancias inhibidoras del crecimiento bacteriano e indicador/es que colorea/n específicamente determinadas colonias, permitiendo así (con ayuda de su morfología) el reconocimiento de las colonias sospechosas de pertenecer a salmonelas.

Existen varios medios sólidos selectivos para salmonelas:

- agar verde brillante (BGA)
- agar verde brillante de MacConkey
- agar Hektoen
- agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)
- agar bismuto sulfito
- agar *Salmonella-Shigella* (SS),
- etc.

Se aconseja sembrar de cada caldo de enriquecimiento selectivo en dos medios sólidos distintos.



El protocolo ISO 6579:1993 sugiere emplear agar XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato Agar) y agar verde brillante (bilis, lactosa, peptona y verde brillante).

4.- COMPROBACIÓN DE QUE LAS COLONIAS SOSPECHOSAS DE SER SALMONELAS EFECTIVAMENTE LO SON: PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Dos colonias sospechosas de ser salmonelas, procedentes de cada uno de los medios sólidos, deben someterse a pruebas de identificación bioquímica. He aquí algunas propiedades bioquímicas de las salmonelas.

Fermentación de azúcares (con o sin producción de gas):	Otras pruebas
Glucosa +	Ureasa -
Manitol +	Movilidad +
Sacarosa -	Indol -
Salicina -	SH ₂ +/-
Lactosa -	
Sorbitol +	

5.- IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA.

Las cepas que dan reacciones bioquímicas propias de las salmonelas se someten a identificación serológica. En los laboratorios de microbiología de los alimentos suele hacerse únicamente una identificación serológica (prueba de aglutinación) con el antisuero polivalente O (somático). Puede emplearse también el antisuero polivalente H (flagelar). Las cepas que dan una aglutinación positiva con estos sueros deben enviarse a un Centro Nacional especializado para su identificación.

6.- TIPIFICACIÓN.

La tipificación por procedimientos serológicos, por fagos o por procedimientos genotípicos generalmente se lleva a cabo en Laboratorios de Referencia. En España, el Centro Nacional de Referencia para Salmonella está ubicado en el Centro Nacional de Microbiología, dependiente del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

Material

- Homogeneizador.
- Pinzas y tijeras.
- Pipetas de 1 y 0,1 ml.
- Matraces Erlenmeyer o recipientes con tapón de rosca de 250 ml.
- Placas de Petri.



- Medios de cultivo y reactivos:
 - ❖ agua de peptona tamponada (peptona, cloruro sódico y fosfato potásico).
 - ❖ caldo selenito cistina,
 - ❖ caldo Rappaport-Vassiliadis.
 - ❖ Agar Verde Brillante.
 - ❖ Agar XLD.
 - ❖ Agar nutritivo en tubos, también conocido como “agar inclinado” (peptona, extracto de carne, cloruro sódico y agar).
 - ❖ Colorantes para la tinción de Gram (las bacterias Gram positivas se visualizarán de color moradas y las bacterias Gram negativas se visualizarán de color rosa o rojo).
 - ❖ Agar TSI. Contiene lactosa, sacarosa y glucosa, así como una fuente de hierro y otra de azufre. Asimismo incluye rojo fenol como indicador. Se prepara en tubos de forma que la parte inicial presente una superficie inclinada.
 - ❖ Agar LIA. Contiene glucosa, L-lisina, una fuente de hierro (citrato férrico amónico) y una fuente de azufre (tiosulfato sódico), así como púrpura de bromocresol. Se prepara en tubos de forma que la parte inicial presente una superficie inclinada.
 - ❖ Antisuero polivalente O.

Método y Resultados

1) PREENRIQUECIMIENTO.

- a) Pesar en una bolsa de Stomacher estéril 25 g del alimento.
- b) Añadir a la bolsa 225 ml de agua de peptona tamponada estéril.
- c) Homogeneizar
- d) Incubar a 37°C durante 24 horas.

2) ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

e) Transcurrido el período de incubación, mezclar el contenido de la bolsa y filtrar. A continuación añadir 100 µl del filtrado a 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis. Al mismo tiempo añadir 10 ml del mismo filtrado a 100 ml de caldo selenito cistina.

f) Incubar los caldos de enriquecimiento selectivo a 42°C (el Rappaport-Vassiliadis) y a 37°C (el selenito cistina) durante 24-48 horas.

3) AISLAMIENTO.

g) A las 24 horas, inocular un asa de cultivo con cada caldo y sembrar en una placa de agar verde brillante y en otra de agar XLD, de forma que se obtengan colonias independientes.

h) Incubar las placas durante 24 h a 37°C. Si no aparecen colonias típicas, incubar otras 24 horas. Asimismo, si tras dichas 24 horas de incubación no se aprecian colonias típicas en los medios sólidos, se procede



a una nueva siembra en agar verde brillante y agar XLD (tal y como se describe en el apartado anterior), a partir de los caldos de enriquecimiento selectivo (que, por tanto, llevarán en incubación 48 horas).

✓ En agar verde brillante, la presencia de colonias de *Salmonella* otorga al medio un color rojo intenso, mientras que las colonias presentan asimismo un color rojo intenso.

✓ En agar XLD las colonias típicas de *Salmonella* son de color rosa con o sin una coloración negra en su parte central. En muchas ocasiones, las colonias de *Salmonella* presentan una amplia parte central de color negro brillante o pueden incluso aparecer completamente negras. Algunas cepas atípicas de *Salmonella* originan colonias amarillas con la parte central puede aparecer o no de color negro.

i) Elegir 2-3 colonias características de cada placa y proceder a su identificación bioquímica.

4) IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

j) Tomar las colonias seleccionadas en el punto i) del apartado 3) e inocular cada una en un tubo conteniendo agar TSI inclinado. La inoculación debe hacerse sembrando por estría en la superficie inclinada y por picadura en la parte inferior (no inclinada). Sin flamear el asa, proceder de modo idéntico en un tubo conteniendo agar LIA también inclinado.

k) Incubar a 35-37°C durante 24 horas.

Interpretación de los resultados de las pruebas de identificación bioquímica: Las cepas de *Salmonella* se caracterizan por mostrar las reacciones siguientes:

- Agar TSI.- Parte inclinada alcalina (roja), fondo amarillo (ácido), con o sin ennegrecimiento. La parte inclinada alcalina es indicativa de que el microorganismo inoculado no fermenta la sacarosa ni la lactosa, mientras que el fondo amarillo corresponde a la fermentación de la glucosa.

- Agar LIA.- El medio aparece púrpura en el fondo (reacción alcalina) con o sin ennegrecimiento (producción de SH₂). La reacción alcalina es indicativa de la descarboxilación de la lisina.

En este medio (agar LIA) pueden apreciarse otras combinaciones:

* Lisina (-) y glucosa (+).- Todo el tubo amarillo.

* Lisina (-) y glucosa (-).- Todo el tubo púrpura.....*Pseudomonas*.

Nota.- Excepcionalmente, pueden encontrarse cepas de salmonelas que fermentan la sacarosa o la lactosa. En este caso, la reacción en TSI no será característica (todo el medio amarillo), pero sí lo será en LIA, porque este medio no contiene sacarosa ni lactosa (sólo glucosa). También ocasionalmente pueden hallarse cepas de salmonelas que no descarboxilen la lisina, pero su reacción en TSI será característica.

5) IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA.

Llevar a cabo la identificación serológica con un suero polivalente O. Realizar la aglutinación en la forma indicada por la firma suministradora.



EJEMPLO DE UNA PÁGINA DE REGISTRO A UTILIZAR PARA ANOTAR LOS RESULTADOS EN EL LABORATORIO

FECHA	HORA	MUESTRA Y OBSERVACIONES	IDENTIFICACIÓN	CADUCIDAD	ANÁLISIS	VOLUMEN SEMBRADO	MEDIO	DATOS DE LAS PLACAS	RESULTADOS	COMENTARIOS
		PESCADO			Mesófilos					
					Psicrotrofos					
					Enterobacteriaceae					
					<i>Escherichia coli</i>					
					<i>S. aureus</i>					
					<i>Salmonella</i>					
		HARINAS			Mesófilos					
					Mohos y levaduras					
					<i>E. coli</i>					
					<i>Salmonella</i>					



5. MÉTODOS RÁPIDOS Y AUTOMATIZADOS ÚTILES PARA ESTIMAR E IDENTIFICAR MICROORGANISMOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

MEDIOS CROMOGÉNICOS

Introducción

Cuando los microorganismos crecen en presencia de determinados componentes orgánicos (sustratos cromogénicos) y tintes pueden producir color o fluorescencia bajo la luz UV. Mediante el uso de estos medios se emplean las particulares propiedades de los microorganismos para su diferenciación, tanto características bioquímicas conocidas desde hace tiempo como otras recientemente descubiertas y que dan origen a nuevos medios cromogénicos más eficaces para la detección e identificación de bacterias.

Material y Método

En esta práctica utilizaremos el agar RAMBACH (peptona, extracto de levadura y mezcla de agentes selectivos y cromogénicos) para *Salmonella*, observándose la apariencia de las colonias que se indica a continuación:

Color	Bacteria
Rojo	<i>Salmonella</i> spp.
Violeta azulado/azul	Coliformes
Incoloro/amarillento	Otras enterobacteriáceas

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE GALERÍAS:

Introducción

En la actualidad existen en el comercio numerosas galerías de identificación microbiana. La mayoría han sido diseñadas para la identificación de microorganismos de origen clínico. No obstante, desde hace ya varios años estos sistemas están siendo utilizados para microorganismos aislados de alimentos, lo que facilita enormemente la tarea de identificación. Existen múltiples galerías para bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras.

Material y Método

Utilizaremos una galería para la identificación de microorganismos gram negativos no entéricos, denominada API 20 NE, que se basa en 8 pruebas bioquímicas y 12 pruebas de asimilación de sustratos, en formato miniaturizado (20 microtubos en los que hay los reactivos adecuados deshidratados).

Resultados

Se obtendrá el perfil de identificación y el taxón asociado a ese perfil utilizando el programa informático APILAB (<https://apiweb.biomerieux.com>).

BACTOMETER:

Existen diferentes métodos electrométricos que permiten conocer, entre otras aplicaciones, la carga microbiana de un alimento (Bactometer, Bac-trac, Malthus). Se fundamentan en la capacidad de los microorganismos para crecer en un medio de cultivo produciendo cambios en su composición y, por tanto, alteraciones de sus propiedades eléctricas que serán detectadas por unos electrodos y registradas en un equipo informático.

El Bactometer permite elegir la señal eléctrica (capacitancia, conductancia, impedancia) más apropiada para nuestra finalidad. Algunas de sus aplicaciones son: estimar los niveles iniciales de carga microbiana en materias primas, predicción de la vida útil de alimentos, pruebas de verificación de esterilidad, estudios de crecimiento microbiano.

Se realizará una demostración del funcionamiento de este equipo, a partir de un homogeneizado simulado de un alimento y hasta la obtención del resultado final en la pantalla del ordenador.



Equipo *Bactometer* (bioMérieux España S.A.)



6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y QUÍMICA DEL AGUA

La legislación sanitaria exige que las aguas de consumo público tengan una buena calidad microbiológica que no ponga en peligro la salud del consumidor. Asimismo, el agua empleada para la preparación de alimentos tiene que cumplir estas características de potabilidad. Estos criterios se aplicarán a todas las aguas que, independientemente de su origen y del tratamiento de potabilización que reciban, se utilicen en la industria alimentaria o se suministren a través de redes de distribución públicas o privadas, depósitos o cisternas. La responsabilidad del control (**autocontrol**) recaerá en el propio gestor del agua.

DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS

En la tabla que se presenta a continuación se resumen los parámetros microbiológicos que marca la legislación española (Dir 98/83/CE, incorporada al derecho interno español por el REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, Anexo I):

<i>Parámetro</i>	<i>Muestra (ml)</i>	<i>Límite (ufc)</i>
Microorganismos totales a 22°C	1	100
Coliformes y <i>Escherichia coli</i>	100	0
Enterococos	100	0
<i>Clostridium perfringens</i>	100	0

La regulación del proceso de elaboración, circulación y comercio de aguas preparadas envasadas (RD 1799/2010), y de las aguas minerales naturales y de las aguas de manantial envasadas (RD 1798/2010), [C1]exigen el control de los siguientes parámetros microbiológicos (después del envasado; incorporan parcialmente la Directiva 98/83/CE):

<i>Parámetro</i>	<i>Muestra (ml)</i>	<i>Límite (ufc)</i>
Gérmenes totales a (20 - 22 °C / 72 h)	1	100
Gérmenes totales a (37 °C / 24 h)	1	20
Bacterias coliformes (44,5 °C)	250	Ausencia
<i>Escherichia coli</i> (37 °C)	250	Ausencia
Estreptococos fecales / Enterococos	250	Ausencia
Anaerobios sulfito-reductores esporulados / <i>Clostridium perfringens</i> (incluidas esporas)	50	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	Ausencia



DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES

Introducción

En todos los análisis de aguas es necesario determinar el recuento de microorganismos coliformes dado su interés como grupo de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Sin embargo, dado que no todos los microorganismos coliformes son de procedencia fecal, es necesario llevar a cabo diversas determinaciones en el laboratorio.

Los distintos tipos de microorganismos coliformes que nos podemos encontrar son los siguientes:

- Coliformes probables: Grupo de microorganismos que son capaces de fermentar la lactosa con producción cuando se incuban en un caldo lactosado a 37°C.
- Coliformes totales: Se refiere a los microorganismos descritos con anterioridad una vez que han sido confirmados por resiembra en caldo lactosado con verde brillante y bilis (y continúan fermentando lactosa) o en medio sólido eosina-azul de metileno (EMB). Se incluyen en este grupo los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*.
- Coliformes fecales: Se determinan resemebrando los coliformes totales en caldo EC (tripteína, lactosa, sales biliares, fosfato dipotásico, fosfato monopotásico y cloruro de sodio) y las condiciones se hacen más selectivas incubando a 44°C.

Material y Métodos

Para su determinación se puede emplear técnicas contrastadas, como el método de **filtración** a través de membrana (TTC/tergitol) y el método **del número más probable (NMP)**, que se basa en la siembra de varios tubos con distintos volúmenes del agua a estudiar, estimando el número de microorganismos en función de los tubos que dan resultado positivo. Existen métodos comerciales que simplifican en gran medida estas determinaciones. Por ejemplo, el kit **Colilert-18®** con el dispositivo **Quanti-Tray®** (IDEXX) que permite detectar y/o cuantificar el contenido de coliformes totales y *E. coli* a partir de un volumen de 100 ml del agua a analizar. Cuando los coliformes totales metabolizan el indicador ONPG (O-nitrofenil β,D-galactopiranosido) la muestra toma una coloración amarilla. Cuando *E. coli* metaboliza el indicador MUG (4-metil umbeliferil β,D-glucuronido) produce fluorescencia. Este sistema está aprobado por la Agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos (US EPA).

Procedimiento de enumeración Quanti-Tray®: (a) añadir el contenido de un vial de reactivo a una muestra de 100 ml de agua (b) agitar hasta disolución (c) verter la mezcla en un dispositivo Quanti-Tray® y sellar con la selladora (d) incubar la bandeja a 35 ±0.5 °C durante 18-22 horas (e) leer los resultados y calcular según la tabla del NMP.

Procedimiento de presencia / ausencia: incubar directamente la mezcla reactivo/muestra (precalentar previamente la muestra a 33-38 °C).



Interpretación de los resultados:

Aspecto	Resultado
amarillo	+ (coliformes totales)
Amarillo y fluorescencia	+ (<i>E. coli</i>)

Tabla de NMP para dispositivo Quanti-Tray de 51 celdas

Nº de celdas que producen una reacción positiva, por muestra de 100 ml	Número más probable	Límites de confianza del 95%	
		Inferior	Superior
0	<1	0.0	3.7
1	1.0	0.3	5.6
2	2.0	0.6	7.3
3	3.1	1.1	9.0
4	4.2	1.7	10.7
5	5.3	2.3	12.3
6	6.4	3.0	13.9
7	7.5	3.7	15.5
8	8.7	4.5	17.1
9	9.9	5.3	18.8
10	11.1	6.1	20.5
11	12.4	7.0	22.1
12	13.7	7.9	23.9
13	15.0	8.8	25.7
14	16.4	9.8	27.5
15	17.8	10.8	29.4
16	19.2	11.9	31.3
17	20.7	13.0	33.3
18	22.2	14.1	35.2
19	23.8	15.3	37.3
20	25.4	16.5	39.4
21	27.1	17.7	41.6
22	28.8	19.0	43.9
23	30.6	20.4	46.3
24	32.4	21.8	48.7
25	34.4	23.3	51.2



DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES / ENTEROCOCOS.

Introducción

Se consideran estreptococos fecales a los microorganismos Gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos, catalasa negativos que fermentan la glucosa con producción de ácido a 37°C en 48 horas. Se incluyen en este grupo las especies *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. faecalis* y *Streptococcus bovis* y *S. equinus*.

Material y Métodos

La determinación se realiza por una prueba del número más probable, utilizando como medio de cultivo el caldo Kanamicina-Esculina-Azida (KEA), que se incuba a 37°C 24+24 horas. La azida sódica presente en este medio inhibe a los microorganismos Gram negativos y los estreptococos presentes son capaces de crecer en presencia de kanamicina y utilizan la esculina, dando un característico color negro al reaccionar con el indicador de citrato férrico-amónico. Las siembras se realizan de igual forma que la descrita para los microorganismos coliformes.

Determinación de enterococos por la técnica del número más probable.

- Tubos con 10 ml de caldo KEA de doble fuerza (a doble concentración).
- Tubos con 10 ml de caldo KEA.
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Pipetas de vidrio: 10 ml, 1 ml, 0.1 ml.
- Estufa de incubación.

a) Colocar en una gradilla tres series de tubos de caldo KEA (la primera de las series compuesta de tubos con caldo de doble fuerza).

b) Inocular respectivamente 10 ml, 1 ml y 0.1 ml de la muestra de agua en cada una de las series (es decir, a los tres tubos de la primera serie les añadimos 10 ml, a los tres de la segunda 1 ml y a los tres de la tercera 0.1 ml).

c) Incubar los tubos a 37°C durante 24 horas (en caso de resultado negativo prolongar otras 24 horas). Estimar el número más probable de enterococos mediante lectura en las tablas del NMP (son tubos positivos los que presenten turbidez y color negro).

Para la determinación de enterococos por filtración se emplea el medio de Slanetz y Bartley (triptosa, extracto de levadura, dextrosa, fosfato potásico, azida sódica, TTC y agar), en el que las colonias típicas de enterococos presentan un color rojo ladrillo.



DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES / *C. perfringens*

Introducción

Este grupo comprende bacterias de morfología bacilar, Gram positivas, anaerobias estrictas, que pueden formar esporas y con actividad sulfito reductora. El recuento se realiza en el medio agar m-CP (lleva D-cicloserina y polimixina B que inhiben otros crecimientos, púrpura de bromocresol que permite diferenciar las colonias que fermentan la sacarosa, difosfato de fenoltaleína, entre otros). Al tratarse de microorganismos anaerobios, el medio lleva agar y para inocularlo hay que fundirlo y hervirlo previamente para eliminar el oxígeno disuelto. Tras inocular y solidificar el medio, se incuba en condiciones anaerobias a 44 °C durante 24 horas (en jarra de anaerobios). Las colonias de *Clostridium perfringens* son de color amarillo opaco que cambian a color rosa o rojo al cabo de 20-30 segundos de exposición a vapores de hidróxido amónico (almohadillas).

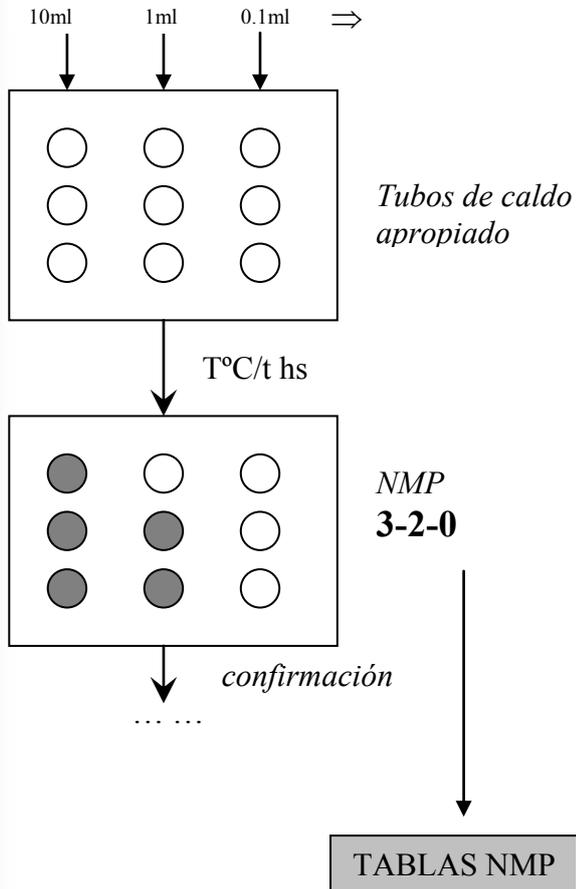
Material y Métodos

La legislación vigente recomienda su determinación mediante filtración a través de membrana utilizando el medio descrito anteriormente.

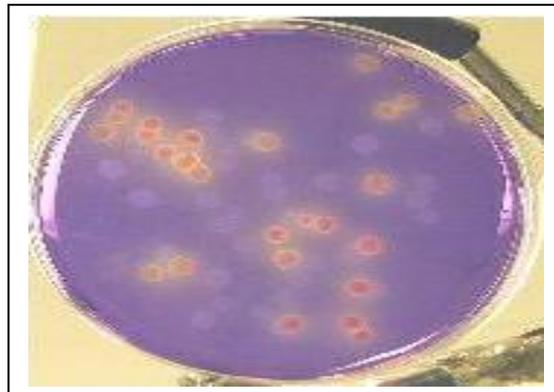
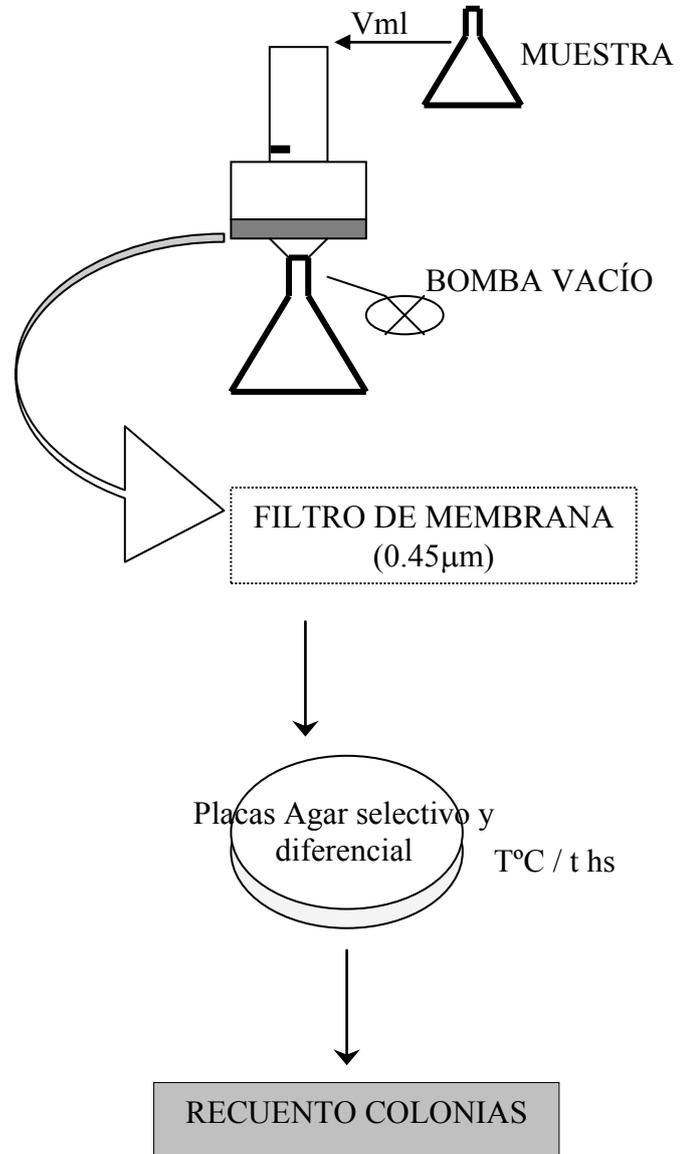
Recuento de *C. perfringens* mediante filtración

- Embudo de filtración con sistema de vacío.
 - Filtros estériles de 0.45 µm de diámetro de poro.
 - Placas de medio de cultivo adecuado (agar m-CP).
 - Diluyente general (peptona bacteriológica 0.1%) estéril.
 - Pinzas estériles.
- a) Colocar un filtro estéril en el embudo y filtrar 100 ml del agua problema.
 - b) Lavar con 30 ml de diluyente de peptona estéril.
 - c) Transferir el filtro a la superficie del agar m-CP.
 - d) Incubar a 44°C/24 horas en jarras de anaerobios.
 - e) Contar las colonias de color amarillo opaco que cambian a color rosa o rojo al cabo de 20-30 segundos de exposición a vapores de hidróxido amónico (almohadillas).

TÉCNICA DEL NMP



TÉCNICA DE FILTRACIÓN



Clostridium perfringens
en *m-CP* agar



Valores del Número Más Probable (NMP) en 100 ml de agua problema para tres tubos inoculados de cada una de tres diluciones decimales consecutivas (adaptado de W. F. Harrigan, *Laboratory Methods in Food Microbiology*, tercera edición, 1998, Academic Press).

Nº tubos positivos			NMP	Límites de Confianza 95%
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml		
0	0	0	0	
0	0	1	0.3	
0	1	0	0.3	<0.1-1.7
0	1	1	0.6	
0	2	0	0.6	
1	0	0	0.4	<0.1-2.1
1	0	1	0.7	
1	0	2	1.1	
1	1	0	0.7	0.2-2.8
1	1	1	1.1	
1	2	0	1.1	
1	2	1	1.5	
1	3	0	1.6	
2	0	0	0.9	0.2-3.8
2	0	1	1.4	
2	0	2	2.0	
2	1	0	1.5	0.5-5.0
2	1	1	2.0	
2	1	2	3.0	
2	2	0	2.0	
2	2	1	3.0	
2	2	2	3.5	
2	2	3	4.0	
2	3	0	3.0	
2	3	1	3.5	
2	3	2	4.0	
3	0	0	2.5	<1-13
3	0	1	4.0	1-18
3	0	2	6.5	
3	1	0	4.5	1-21
3	1	1	7.5	2-28
3	1	2	11.5	
3	1	3	16.0	
3	2	0	9.5	3-38
3	2	1	15.0	5-50
3	2	2	20.0	
3	2	3	30.0	
3	3	0	25.0	<10-140
3	3	1	45.0	10-240
3	3	2	110.0	30-480
3	3	3	140.0 +	



RD 140/2003

7238

Viernes 21 febrero 2003

BOE núm. 46

B.1 Parámetros químicos

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
4. Antimonio	5,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	10,0 µg/l	
5. Arsénico	10 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	
6. Benceno	1,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
7. Benzo(α)pireno	0,010 µg/l	
8. Boro	1,0 mg/l	
9. Bromato:		1
A partir de 01/01/2009	10 µg/l	
De 01/01/2004 a	25 µg/l	
31/12/2008	25 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
10. Cadmio	5,0 µg/l	
11. Cianuro	50 µg/l	
12. Cobre	2,0 mg/l	
13. Cromo	50 µg/l	
14. 1,2-Dicloroetano	3,0 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
15. Fluoruro	1,5 mg/l	
16. Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HPA) ...	0,10 µg/l	
Suma de:		
Benzo(b)fluoranteno	µg/l	
Benzo(ghi)perileno	µg/l	
Benzo(k)fluoranteno	µg/l	
Indeno(1,2,3-cd)pireno ..	µg/l	
17. Mercurio	1,0 µg/l	
18. Microcistina	1 µg/l	2
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
19. Níquel	20 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	
20. Nitrato	50 mg/l	3
21. Nitritos:		3 y 4
Red de distribución	0,5 mg/l	
En la salida de la ETAP/depósito	0,1 mg/l	
22. Total de plaguicidas	0,50 µg/l	5 y 6
23. Plaguicida individual	0,10 µg/l	6
Excepto para los casos de:		
Aldrín	0,03 µg/l	
Dieldrín	0,03 µg/l	
Heptacloro	0,03 µg/l	
Heptacloro epóxido	0,03 µg/l	
24. Plomo:		
A partir de 01/01/2014	10 µg/l	
De 01/01/2004 a	25 µg/l	
31/12/2013	25 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	50 µg/l	

ANEXO I

Parámetros y valores paramétricos

A. Parámetros microbiológicos

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
1. Escherichia coli	0 UFC en 100 ml	
2. Enterococo	0 UFC en 100 ml	
3. Clostridium perfringens (incluidas las esporas) ..	0 UFC en 100 ml	1 y 2

Notas:

(1) Cuando la determinación sea positiva y exista una turbidez mayor 5 UNF se determinarán, en la salida de ETAP o depósito, si la autoridad sanitaria lo considere oportuno, «Cryptosporidium» u otros microorganismos o parásitos.

(2) Hasta el 1 de enero de 2004 se podrá determinar «Clostridium» sulfito reductor en vez de «Clostridium perfringens». Las condiciones descritas en la nota 1 y el valor paramétrico serán los mismos para ambos.



R.D. 140/2003

BOE núm. 46

Viernes 21 febrero 2003

7239

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
25. Selenio	10 µg/l	7 y 8
26. Trihalometanos (THMs): Suma de:		
A partir de 01/01/2009	100 µg/l	
De 01/01/2004 a 31/12/2008	150 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
Bromodichlorometano ...	µg/l	
Bromofloroformo	µg/l	
Cloroformo	µg/l	
Dibromoclorometano ...	µg/l	
27. Tricloroetano + Tetracloroetano	10 µg/l	
Hasta el 31/12/2003 ...	— µg/l	
Tetracloroetano	µg/l	
Tricloroetano	µg/l	

Notas:

- (1) Se determinará cuando se utilice el ozono en el tratamiento de potabilización y se determinará al menos a la salida de la ETAP.
- (2) Sólo se determinará cuando exista sospecha de eutrofización en el agua de la captación, se realizará determinación de microcistina a la salida de la ETAP o depósito de cabecera.
- (3) Se cumplirá la condición de que $[\text{nitrito}]/60 + [\text{nitrito}]/3 < 1$. Donde los corchetes significan concentraciones en mg/l para el nitrato (NO_3) y para el nitrato (NO_2).
- (4) Se determinará cuando se utilice la cloraminación como método de desinfección.
- (5) Suma de todos los plaguicidas definidos en el apartado 10 del artículo 2 que se sospeche puedan estar presentes en el agua.
- (6) Las comunidades autónomas valorarán para que se adopten las medidas necesarias para poner a disposición de la autoridad sanitaria y de los gestores del abastecimiento el listado de plaguicidas fitosanitarios utilizados mayoritariamente en cada una de las campañas contra plagas del campo y que pueden estar presentes en los recursos hídricos susceptibles de ser utilizados para la producción de agua de consumo humano.
- (7) Se determinará cuando se utilice el cloro o sus derivados en el tratamiento de potabilización.
Si se utilice el dióxido de cloro, se determinarán cloritos a la salida de la ETAP o depósito de cabecera.
- (8) En los casos de que los niveles están por encima del valor paramétrico, se determinarán: 2,4,6-triclorofenol u otros subproductos de la desinfección a la salida de la ETAP o depósito de cabecera.

B.2 Parámetros químicos que se controlan según las especificaciones del producto

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
28. Acrilamida	0,10 µg/l	1
28. Epiclorhidrina	0,10 µg/l	1
30. Cloruro de vinilo	0,50 µg/l	1

Nota:

- (1) Estos valores paramétricos corresponden a la concentración monomérica residual en el agua, asociada con arreglo a las características de la migración máxima del polímero correspondiente en contacto con el agua.
La empresa que comercialice estos productos presentará a los gestores del abastecimiento y a los instaladores de las instalaciones interiores la documentación que acredite la migración máxima del producto comercial en contacto con el agua de consumo utilizado según las especificaciones de uso del fabricante.

C. Parámetros indicadores

Parámetro	Valor paramétrico	Notas
31. Bacterias coliformas	0 UFC	En 100 ml
32. Recuento de colonias a 22 °C		
A la salida de ETAP	100 UFC	En 1 ml
En red de distribución	Sin cambios anómalos	
33. Aluminio	200 µg/l	1
34. Amonio	0,50 mg/l	
35. Carbono orgánico total	Sin cambios anómalos	
36. Cloro combinado residual	2,0 mg/l	
37. Cloro libre residual	1,0 mg/l	
38. Cloruro	250 mg/l	
39. Color	15 mg/l Pt/Co	
40. Conductividad	2.500 µS/cm ⁻¹ a 20 °C	
41. Hierro	200 µg/l	
42. Manganeso	50 µg/l	
43. Olor	3 a 25 °C	Índice de dilución
44. Oxidabilidad	5,0 mg O ₂ /l	
45. pH		5 y 6
Valor paramétrico mínimo	6,5	
Valor paramétrico máximo	9,5	
46. Sabor	3 - 25 °C	Índice de dilución
Parámetro	Valor paramétrico	Notas
48. Sulfato	250 mg/l	
49. Turbidez:		
A la salida de ETAP y/o depósito	1 UNF	
En red de distribución	5 UNF	

Notas:

- (1) En abastecimientos mayores de 10.000 m³ de agua distribuida por día se determinará carbono orgánico total, en el resto de los casos, oxidabilidad.
- (2) Los valores paramétricos se refieren a niveles en red de distribución. La determinación de estos parámetros se podrá realizar también «in situ».
En el caso de la industria alimentaria, este parámetro no se contemplará en el agua de proceso.

- (3) Se determinará cuando se utilice el cloro o sus derivados en el tratamiento de potabilización.
Si se utiliza el dióxido de cloro se determinarán cloritos a la salida de la ETAP.
- (4) Se determinará cuando se utilice la cloraminación como método de desinfección.
- (5) El agua en ningún momento podrá ser ni agresiva ni incrustante. El resultado de calcular el Índice de Langelier debería estar comprendido entre +/- 0,5.
- (6) Para la industria alimentaria, el valor mínimo podrá reducirse a 4,5 unidades de pH.



DETERMINACIONES QUÍMICAS

DETERMINACIÓN DE NITRATOS / NITRITOS / AMONIO EN AGUAS

Introducción

Los nitritos y nitratos, junto con el amoníaco, son típicos indicadores de contaminación del agua. Se forman por degradación de proteínas vegetales y animales (heces y orinas). Según sean las condiciones del agua, el amoníaco puede acumularse o bien puede ser transformado en nitrato por las bacterias, con ayuda del oxígeno (nitrificación). Los nitratos evolucionan (reducción) a nitritos.

Es frecuente que exista un exceso de nitratos en las aguas procedentes de explotaciones agrícolas y de vertidos de industrias. El origen de la mayoría de estas contaminaciones está en la actividad intensiva de la agricultura y a algunos vertidos incontrolados. Las malas prácticas agrícolas, como un elevado uso de fertilizante, es la causa principal de contaminación. En España el valor máximo permitido de nitratos en el agua potable según la legislación es de 50 mg/l.

Material y Métodos

Su determinación se realizará mediante un kit comercial (Merck) según el protocolo descrito en las hojas anexas.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CLORO. MEDICIÓN DEL pH

a) Demanda de cloro de un agua

Introducción

El cloro se utiliza fundamentalmente como desinfectante de las aguas. En ellas, el cloro produce una serie de reacciones:



El ácido hipocloroso (HOCl) ejerce la principal acción desinfectante. El cloro existente en el agua en forma de ácido hipocloroso o iones hipoclorito (OCl^-) se conoce como cloro disponible libre. De otro lado, el cloro existente en el agua combinado químicamente con el amoníaco o con compuestos orgánicos nitrogenados (proteínas o aminoácidos) se conoce como cloro disponible combinado. Así pues, se entiende por demanda de cloro a la diferencia existente entre la cantidad de cloro añadida al agua y la de cloro disponible en la misma, es decir, la cantidad de cloro que el agua ha "gastado" para su depuración.

Se basa en la capacidad oxidante del cloro residual para convertir el yoduro potásico (KI) en yodo libre. El cloro añadido al agua se va a utilizar en la oxidación de la materia orgánica (depuración) y el resto oxidará al yoduro potásico dando lugar a la aparición de yodo libre. Éste se detectará por la aparición de mayor o menor intensidad de color al reaccionar con el almidón. Una mayor intensidad de color indicará mayor cantidad de



yodo libre que ha reaccionado con el almidón y, por tanto, indica una gran cantidad de cloro residual (que no ha reaccionado con ninguna sustancia del agua) traduciéndose en una demanda de cloro menor (cantidad necesaria para la depuración).

Debe considerarse que pueden formarse en el agua cloraminas, reacción del cloro con el amoníaco, constituyéndose el cloro residual combinado, con menor poder oxidante y desinfectante que el cloro residual libre.

Material

- Lejía de hipoclorito comercial diluida (25 ppm)
- Solución yodurada-almidonada: 0,2g de almidón soluble+0,005g de cloruro de mercurio en agua; verter sobre 100ml de agua hirviendo, mantener ebullición 30-40 minutos. Enfriar, completar volumen a 100ml. Reposar 24 horas, filtrar y añadir 1g de yoduro potásico.

Método

- a) Tomar 5 tubos conteniendo cada uno 10ml del agua problema
- b) Se añaden 4, 6, 10, 14, 16 gotas de la solución de lejía a cada tubo respectivamente. Otro tubo con agua destilada se utilizará como control
- c) Agitar los tubos y dejar reposar 30 minutos, agitándose a los 15 minutos
- d) Añadir 5 gotas de la solución yodurada-almidonada. Agitar y anotar el primer tubo de la serie en el que aparece la reacción positiva (coloración azul más menos intensa).

Resultados

La demanda de cloro del agua analizada será:

$$V = \frac{G}{V'} \times Cx \frac{1ml}{30 \text{ gotas}} \times K$$

G= número de gotas añadidas

C= concentración de Cl₂ en la lejía utilizada (ppm)

V'= volumen de agua problema (ml)

V= demanda de cloro (ppm Cl₂)

K= coeficiente uniformizador de unidades

Es posible utilizar diferentes kits comerciales para la determinación de algunos parámetros físicos y químicos relacionados con el control del agua. En las hojas anexas se presentan los protocolos comerciales para la determinación fotométrica del pH y del cloro (Spectroquant®, Merck)



DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO DE UNA MUESTRA DE AGUA (OXIBILIDAD AL PERMANGANATO)

Introducción

Esta determinación es usada para medir el equivalente en oxígeno de la materia orgánica (biodegradable o no) contenida en nuestra muestra de agua y que es susceptible de oxidación. Ello se consigue mediante la oxidación con permanganato potásico (KMnO_4) en caliente y en medio ácido de la materia orgánica presente en el agua problema.

Material

- Solución de KMnO_4 0.01N
- Solución de H_2SO_4 1:3
- Ácido oxálico 0.01N

Método

En un matraz de 250 ml se ponen 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido sulfúrico y 5 ml de solución de permanganato y se hierve durante 10 minutos con el fin de destruir la materia orgánica que pueda estar presente en el matraz

Se vierte el líquido y, sin lavar, se añaden 100 ml de agua problema, 5 ml de ácido sulfúrico y aproximadamente 5-7 ml de permanganato. Mantener en ebullición durante 10 minutos (si es necesario, añadir más permanganato. La mezcla tiene que mantener la coloración violeta)

Añadir suficiente ácido oxálico (aprox. 7-10 ml) para decolorar la muestra

Valorar el exceso de ácido oxálico con permanganato hasta conseguir un color rosa débil (V)

Resultados

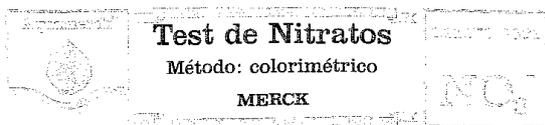
$$\text{mg O}_2/\text{l} = (V \cdot N \cdot 8 / 100) \cdot 1000$$

V = volúmen de permanganato gastado

N = normalidad del permanganato utilizado

Cuestiones

- *C. perfringens* es una bacteria esporulada: ¿qué podrías decir sobre la antigüedad de la contaminación de un agua que presente este microorganismo?



1. Método

Los nitratos, por acción de una mezcla reductora, se reducen a nitritos, los cuales, en solución ácida, forman una sal de diazonio con el ácido sulfanílico. Esta copula con un derivado del ácido benzoico dando un azocolorante amarillo anaranjado. La concentración de nitratos se determina **semicuantitativamente** por comparación visual del color de la solución de medición con los campos cromáticos de una escala de colores.

2. Intervalo de medida y número de determinaciones

Intervalo de medida/graduación de la escala de colores ¹⁾	Número de determinaciones
10-25-50-75-100-125-150 mg/l de NO ₃ ⁻	200

¹⁾ Factores de conversión, véase apartado 8
Determinación de concentraciones mayores que 150 mg/l de NO₃⁻, véase apartado 6 y 7

3. Campo de aplicaciones

Material de las muestras:

Aguas subterráneas, potables y superficiales
Aguas industriales
Aguas residuales
Alimentos y piensos
Suelos y fertilizantes

4. Influencia de sustancias extrañas

Ésta se comprobó – para iones hasta 1.000 mg/l – en soluciones con 100 mg/l de NO₃⁻. La determinación todavía no es interferida por las concentraciones de sustancias extrañas indicadas en la tabla.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l					
Al ³⁺	10	Fe ²⁺	1	Si ⁴⁺	1
Ca ²⁺	100	Mg ²⁺	100	SiO ₃ ²⁻	100
Cl ⁻	1.000	Mn ²⁺	100	SO ₄ ²⁻	100
Cr ⁶⁺	1	Na ⁺	100	SO ₃ ²⁻	1.000
Cr ₂ O ₇ ²⁻	1	NH ₄ ⁺	100	Zn ²⁺	100
Cu ²⁺	10	NO ₂ ⁻	0,5 ¹⁾		
F ⁻	100	PO ₄ ³⁻	100	aniónicos ²⁾	100
Fe ³⁺	10	Polifosfatos	100	Oxidantes (H ₂ O ₂)	10

¹⁾ En caso de mayores concentraciones eliminar los iones nitrito según el apartado 6.

²⁾ Ensayado con cloruro de N-cetilpiridino

³⁾ Ensayado con dodecilhidrogenosulfato sódico

Aguas marinas y aguas salobres: no adecuadas como material de las muestras

Agua con sustancias húmicas: adecuada como material de las muestras
Se preparó agua marina y agua salobre a partir de sal marina natural para las siguientes densidades:

Agua marina 1,024 g/ml
Agua salobre 1,015 g/ml

El agua con sustancias húmicas fue preparada con extracto de turba.

5. Reactivos y auxiliares

Tener en cuenta la señalización de peligro que se encuentra en las etiquetas!
Los reactivos del test son utilizables hasta la fecha indicada en el envase si se conservan cerrados a +15 hasta +25 °C.

Contenido del envase:

2 frascos de reactivo
1 jeringa de plástico graduada de 5 ml
2 recipientes de ensayo con tapa roscada
1 escala de colores
1 comparador desplazable

Otros reactivos y accesorios:

Aquamerck® Test de Nitritos, art. núm. 1.14658.
Ácido amidosulfúrico p. anal., art. núm. 1.00103.
Indicador universal en varillas pH 0-14, art. núm. 1.09535.
Ácido sulfúrico 25% p. anal., art. núm. 1.00716.
Merckoquant® Test de Nitratos, art. núm. 1.10020. o 1.10050.
Nitratos – solución patrón lista para el uso. 1.000 mg/l de NO₃⁻, art. núm. 1.19811.

6. Preparación

- Disgregar o extraer los materiales de muestra sólidos según un procedimiento adecuado.
- Decolorar las muestras coloreadas según un procedimiento adecuado.
- Comprobar el contenido en nitritos con Aquamerck® Test de Nitritos, intervalo de medida 0,05-1,0 mg/l de NO₂⁻. En caso que sea necesario, eliminar los iones nitrito interferentes (las cantidades indicadas son válidas para contenidos en nitritos de hasta 5 mg/l):
Añadir aprox. de 30 a 50 mg de ácido amidosulfúrico a 10 ml de la muestra y disolver. **El pH de esta solución debe encontrarse en el intervalo 2-3.** En caso que sea necesario, ajustar el pH con ácido sulfúrico. A continuación hervir **brevemente** y dejar enfriar.
- Comprobar si el contenido en nitratos se encuentra dentro del intervalo de medida.
Orientación previa con Merckoquant® Test de Nitratos, intervalo de medida 10-500 mg/l de NO₃⁻. Diluir con agua destilada las muestras que tengan más de 150 mg/l de NO₃⁻.
- Filtrar las muestras turbias.
- Enjuagar varias veces los recipientes de ensayo con la muestra de agua.

7. Técnica

	Muestra de medición	Muestra en blanco	
Muestra preparada	5 ml	5 ml	Introducir con la jeringa de plástico en el recipiente de ensayo.
Reactivo	1 microcucharada azul rasa (en la tapa del frasco de reactivo)	-	Cerrar el recipiente de ensayo y agitar intensamente durante 1 minuto. Esperar 5 minutos.

- Colocar el comparador desplazable con la muestra de medición y la muestra en blanco de tal manera sobre la escala de colores, que el extremo puntiagudo señale los valores numéricos.
- Abrir los recipientes de ensayo e ir desplazando el comparador desplazable hasta que, observando desde arriba, en ambos recipientes coincidan los colores de la mejor manera posible.
- Leer el valor de medición en mg/l de NO₃⁻ en el extremo puntiagudo del comparador desplazable.

Notas sobre la medición:

- Si se obtiene una coloración que corresponde a la tonalidad de color más oscura de la escala de colores o que es más intensa, debe repetirse la medición con una **nueva** muestra diluida.
- Los residuos negros que puedan aparecer están condicionados por el mecanismo de reacción y no causan una falsificación de los resultados.

8. Conversiones

Contenido buscado	=	Contenido dado	x	Factor de conversión
mmol/m ³ NO ₃ ⁻ o de NO ₃ -N		mg/l de NO ₃ ⁻		16,1
mg/l de NO ₃ -N				0,226
mg/l de NO ₃ ⁻		mmol/m ³ de NO ₃ ⁻ o de NO ₃ -N		0,0620
		mg/l de NO ₃ -N		4,43

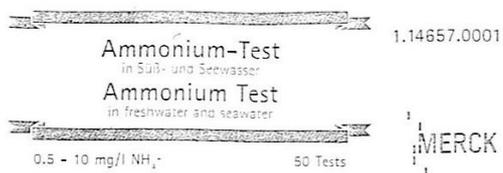
9. Control del procedimiento

Comprobación de los reactivos, del dispositivo de medición y de la manipulación:
Diluir la solución patrón de nitratos a 100 mg/l de NO₃⁻ y analizar esta solución tal como se indica en el apartado 7.

10. Notas

- Cerrar de nuevo inmediatamente los frascos tras haber sacado reactivo.
- No poner las microcucharas de los frascos de reactivo en contacto con otros reactivos o con material de las muestras!

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, R.F.A.
tel. (061 51) 720, télefax (061 51) 722000



5 ml

10 x NH₄-1

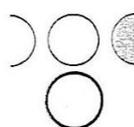
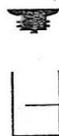
1 x NH₄-2

5'



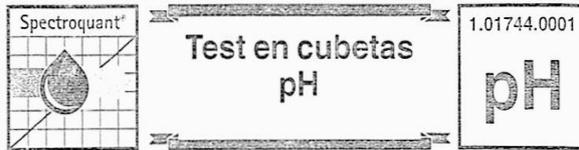
6 x NH₄-3

5'



146.57/02/01 4000305550

07/03



1. Definición

El valor del pH de soluciones acuosas diluidas se define como logaritmo decimal negativo del valor numérico de la concentración de iones hidrógeno en mol/l:

$$\text{pH} = -\lg(\text{concentración de H}^+)$$

Según su valor de pH las soluciones se denominan ácidas, neutras o alcalinas:

Solución	pH	Concentración de H ⁺ en mol/l
ácida	< 7	> 10 ⁻⁷
neutra	7	10 ⁻⁷
alcalina, básica	> 7	< 10 ⁻⁷

2. Método

Una solución indicadora de rojo de fenol no sensible al cloro cambia su color de amarillo a violeta rojizo en función del valor del pH. Esta modificación del color se valora fotométricamente.

3. Intervalo de medida y número de determinaciones

Longitud de onda ¹⁾	Intervalo de medida	Número de determinaciones
558 nm	pH 6,4 - 8,8	280

¹⁾ Máximo de absorción; la longitud de onda memorizada en los fotómetros del sistema puede diferir de este valor.

4. Campo de aplicaciones

La determinación del pH con soluciones indicadoras es apta también para aguas débilmente amortiguadas.

Material de las muestras:

Aguas subterráneas, potables y superficiales
Agua de piscinas

5. Reactivos y auxiliares

Los reactivos del test son utilizables hasta la fecha indicada en el envase si se conservan cerrados entre +15 y +25 °C.

Contenido del envase:

2 frascos de reactivo pH-1K
3 cubetas redondas vacías con código de barras

Otros reactivos y accesorios:

Solución tampón pH 7,00 CertiPUR®, art. 1.09407.1000
Pipeta para un volumen de pipeteo de 10 ml

6. Preparación

Filtrar las muestras turbias.

7. Técnica

Muestra preparada	10 ml	Pipetear en una cubeta redonda limpia.
Reactivo pH-1K	4 gotas	Añadir y mezclar. ¡Atención! Es absolutamente necesario mantener verticalmente el frasco de reactivo.
Medir la muestra de medición en el fotómetro.		

Notas sobre la medición:

- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias. Si es necesario, limpiarlas con un paño seco y limpio.
- Las turbideces después de acabada la reacción dan como resultado valores falsamente elevados.

8. Aseguramiento analítico de la calidad

El reconocimiento de los resultados de medición presupone la comprobación de que tiene lugar el aseguramiento analítico de la calidad (ATV M 704). Para comprobar el sistema fotométrico de medición (reactivos del test, dispositivo de medición, manipulación) y el modo de trabajo puede usarse una solución tampón de pH 7,00.

Datos característicos del procedimiento:

En el control de producción se determinaron los siguientes datos según ISO 8466-1 y DIN 38402 A51:

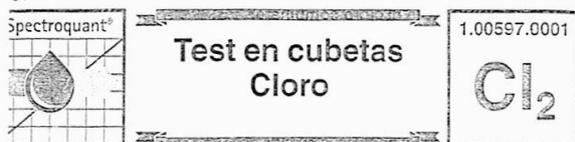
Desviación estándar del procedimiento	± 0,05 unidades de pH
Coefficiente de variación del procedimiento	± 2,0 %
Intervalo de confianza	± 0,2 unidades de pH
Número de lotes	1

Exactitud de un valor de medición: máx. ± 0,1 unidades de pH

9. Nota

Cerrar de nuevo inmediatamente el frasco tras la toma del reactivo.

704



Para la determinación de cloro libre y cloro total
probado por la USEPA para aguas potables y residuales

Método

Una solución débilmente ácida del cloro libre reacciona con dipropil-p-fenilendiamina (DPD) dando un colorante violeta rojizo que se determina fotométricamente.

La presencia de yoduro potásico en esta reacción se determina también cloro combinado.

El procedimiento es análogo a EPA 330.5, US Standard Methods 1800-Cl₂ G y EN ISO 7393.

Intervalo de medida y número de determinaciones

Intervalo de medida	Número de determinaciones
0,03 - 6,00 mg/l de Cl ₂	200

Los datos de programación para determinados fotómetros / espectrofotómetros, ver el sitio web.

Campo de aplicaciones

Material de las muestras:
Agua de piscinas
Agua potable
Aguas residuales
Diluciones desinfectantes

Influencia de sustancias extrañas

Esta se comprobó en soluciones con 3,5 y con 0 mg/l de Cl₂. La determinación de cloro no es interferida por las concentraciones de sustancias extrañas indicadas en la tabla.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l o en %					
Al ³⁺	250	Mn ²⁺	100	Br ₂	0,2
Ca ²⁺	1000	NO ₂ ⁻	0,1	ClO ₂	0,2
Cl ⁻	0,1	S ²⁻	0,1	I ₂	0,4
CO ₃ ²⁻	1000			H ₂ O ₂	0,05
Cr ³⁺	250			O ₃	0,05
Fe ₂ O ₃ ²⁻	0,1			NaCl	10 %
Li ⁺	100			NaNO ₃	10 %
Se ²⁻	100			Na ₂ SO ₄	10 %

Reactivos y auxiliares

Los reactivos del test son utilizables hasta la fecha indicada en el envase si se conservan cerrados entre +15 y +25 °C.

Contenido del envase:

1 frasco de reactivo Cl₂-1
1 frasco de reactivo Cl₂-2
1 cubetas redondas vacías con código de barras

Reactivos reactivos y accesorios:

Merck® varillas indicadoras pH 5 - 10, art. 1.09533.0001
Merck® varillas indicadoras pH 0 - 6, art. 1.09531.0001
Sodio hidróxido en solución 1 mol/l, art. 1.09137.
Ácido sulfúrico 0,5 mol/l, art. 1.09072.
Ácido sulfúrico 25 % para análisis, art. 1.00716.
Pipeta para un volumen de pipeteo de 5,0 ml

Preparación

¡Analizar las muestras inmediatamente después de la toma de muestras!

El valor del pH debe encontrarse en el intervalo 4 - 8.

Si es necesario, ajustar con solución de hidróxido sódico o con ácido sulfúrico.

Filtrar las muestras turbias.

7. Técnica

Muestra preparada (5 - 40 °C)	5,0 ml	Pipetear en una cubeta redonda limpia.
Reactivo Cl ₂ -1	1 microcuchara azul rasa (en la tapa del frasco Cl ₂ -1)	Añadir y agitar vigorosamente la cubeta cerrada hasta que el reactivo se haya disuelto completamente.
Dejar en reposo 3 minutos (tiempo de reacción), luego medir la muestra de medición en el fotómetro: cloro libre		
Reactivo Cl ₂ -2	2 gotas	Abrir la cubeta. Añadir, cerrar la cubeta y mezclar.
Medir la muestra de medición en el fotómetro: cloro total		

Cálculo del contenido de cloro combinado:

$$\text{mg/l de cloro combinado} = \text{mg/l de cloro total} - \text{mg/l de cloro libre}$$

Notas sobre la medición:

- Ciertos fotómetros exigen una muestra en blanco (agua destilada sin reactivos).
- Para la medición fotométrica las cubetas deben estar limpias. Si es necesario, limpiarlas con un paño seco y limpio.
- Las turbideces después de acabada la reacción dan como resultado valores falsamente elevados.
- El valor del pH de la solución de medición debe encontrarse en el intervalo 4,5 - 5,5.
- El color de la solución de medición permanece estable 30 minutos después de transcurrido el tiempo de reacción antes indicado.
- En caso de concentraciones de cloro superiores a 25 mg/l se forman otros productos de reacción y se obtienen valores falsamente bajos. En estos casos es adecuado un control de plausibilidad de los resultados de medición mediante dilución de la muestra (1:10, 1:100).

8. Aseguramiento analítico de la calidad

El reconocimiento de los resultados de medición presupone la comprobación de que tiene lugar el aseguramiento analítico de la calidad (ATV A 704). Para comprobar el sistema fotométrico de medición (reactivos del test, dispositivo de medición, manipulación) y el modo de trabajo puede usarse una solución patrón de cloro recién preparada con 2,50 mg/l de Cl₂ (solicitar las instrucciones).

Mediante adición de patrón se pueden determinar las interferencias dependientes de la muestra (efectos de la matriz).

Datos característicos de la calidad:

En el control de producción se determinaron los siguientes datos según ISO 8466-1 y DIN 38402 A51:

Desviación estándar del procedimiento (mg/l de Cl ₂)	± 0,055
Coefficiente de variación del procedimiento (%)	± 1,4
Intervalo de confianza (mg/l de Cl ₂)	± 0,14
Número de lotes	2

Datos característicos del procedimiento:

Sensibilidad: Absorbancia 0,010 A corresponde a (mg/l de Cl ₂)	0,03
Exactitud de un valor de medición (mg/l de Cl ₂) *	máx. ± 0,23

Certificados de calidad y de lote para los tests Spectroquant®, ver sitio web.

9. Notas

- Cerrar de nuevo inmediatamente los frascos tras la toma de los reactivos.
- Después de cada determinación de cloro total, lavar la cubeta una vez con ácido sulfúrico al 25 % y seguidamente varias veces con agua destilada.



7. MONITORIZACIÓN DEL ESTADO HIGIÉNICO DE LOS LOCALES Y UTENSILIOS DESTINADOS A LA PREPARACIÓN DE ALIMENTOS

Introducción

El objetivo es evaluar la calidad higiénica de los locales y del equipamiento utilizado en la preparación de los alimentos y comprobar si los sistemas de limpieza y desinfección empleados cumplen su función adecuadamente.

Material y Métodos

Análisis de recipientes: Enjuagados

- Se añaden al recipiente 20 ml de diluyente tamponado estéril (solución salina de fosfato, PBS). Si el agua que se utiliza es agua potable de traída es conveniente añadir tiosulfato sódico al 0.05% para neutralizar el cloro.
- Agitar adecuadamente
- Distribuir 10 ml en tres placas de Petri y sembrar también otras dos placas con un inóculo de 1 ml

Análisis de conductos y tuberías.

Cuando sea necesario evaluar la carga microbiana de estos equipamientos, se pasa agua estéril u otro diluyente estéril adecuado por la conducción.

Análisis de superficies.

1. Hisopado

- Se determina la zona a examinar (50-100 cm²) y se frota con una torunda estéril previamente humedecida en diluyente. Si se trata de un utensilio, se frota todo él.
- Liberar la torunda en el tubo con diluyente

2. Bioluminiscencia

Los bioluminómetros son aparatos que permiten medir la cantidad de ATP presente en una muestra, acoplándolo a la reacción de la enzima luciferasa, que, en presencia de ATP produce la descarboxilación oxidativa del sustrato luciferina, dando lugar a la producción de luz. El resultado se obtiene en forma de RLU (unidades relativas de luz).



La aplicación fundamental de este sistema es comprobar la eficacia de los sistemas de limpieza y desinfección, pero también se puede utilizar para comprobar la calidad microbiológica de las materias primas o para estudios de esterilidad de productos procesados.

3. Otros sistemas

Otros métodos utilizados para el análisis de superficies utilizan esponjas de celulosa, placas de contacto (RODAC), salchichas de agar...

Análisis del ambiente.

1. Muestreo con placas

La técnica más simple es la apertura de placas petri provistas de un medio de cultivo de uso general (por ejemplo, agar nutritivo) en diversos puntos del local y mantenerlas abiertas por un tiempo determinado antes de llevarlas a incubación.

2. Uso de un muestreador

El muestreador de aire hace pasar un volumen determinado de aire a través de una rejilla y sobre un medio sólido que posteriormente se incuba a la temperatura adecuada.

Resultados

Análisis de recipientes: Enjuagados

Hacer un recuento de microorganismos mesófilos viables y de otros grupos microbianos de interés particular.

Análisis de conductos y tuberías.

Hacer un recuento de microorganismos mediante una técnica de filtración.

Análisis de superficies.

1. Hisopado

Hacer un recuento de microorganismos mesófilos viables y de otros grupos microbianos de interés particular.

La interpretación de los recuentos se hace en función de las exigencias higiénicas que marquemos. Por ejemplo, el servicio de salud pública de EE.UU. considera que no debe haber más de 100 ufc por área o utensilio muestreado.



La Decisión 2001/471 de la UE, que establece normas para el control higiénico de la carne fresca, indica los siguientes valores de referencia para el control de las zonas del matadero o de la sala de despiece que tengan repercusión en la higiene del producto:

	Valores aceptables	Valores inaceptables
Microorganismos aerobios totales	0-10 UFC/cm ²	>10 UFC/cm ²
Enterobacterias	0-1 UFC/cm ²	>1 UFC/cm ²

El análisis se lleva a cabo sobre una superficie recomendada de 20 cm² y se puede realizar por esta técnica del hisopado o mediante placas de contacto.

Otras interpretaciones se ofrecen a continuación:

UFC/cm ²	Interpretación	UFC/cm ²	Interpretación
<5	Satisfactorio	2-10	Limpio
5-25	Mejorable	10-10 ²	Aceptable
>25	Insatisfactorio	>10 ²	Sucio

2. Bioluminiscencia

El resultado se obtiene en forma de RLU (unidades relativas de luz).

Análisis del ambiente.

1. Muestreo con placas

Como guías de interpretación se pueden considerar los siguientes valores:

Recuento en las placas	Recuento ambiental estimado
25 UFC/1 h	>10 ⁴ UFC/m ³
10 UFC/1 h	100 UFC/m ³

Si se usan tiempos de exposición menores, se puede tomar como referencia el valor de 5 UCF/15 minutos como aceptable.



2. Uso de un muestreador

Algunos autores indican los siguiente valores de referencia:

$<3 \times 10^2$ UFC/m ³	Aceptable
$>10^4$ UFC/m ³ de recuento total	Inaceptable
$>5 \times 10^2$ UFC/m ³ de mohos y actinomicetos	Inaceptable

En cualquier caso, el grado de exigencia depende de las características del local, alimento que se prepara etc...

Cuestiones

¿Cómo transformarías el resultado de RLU del análisis de bioluminiscencia en ufc/cm²)



8. PRUEBAS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE DESINFECTANTES

Introducción

Los desinfectantes son agentes químicos capaces de eliminar muchos microorganismos distintos.

Existen diversos tipos de desinfectantes que se utilizan en la industria alimentaria. El uso de un tipo determinado depende de las necesidades concretas de nuestra industria.

Para la valoración de desinfectantes existen diversos protocolos que se pueden emplear; en esta práctica llevaremos a cabo un método de suspensión (método 3) empleando una suspensión de microorganismos obtenida a partir de placas de una práctica anterior.

Material y Métodos

1- Prueba de Rideal-Walker

- Se compara la actividad del desinfectante que nos interesa con un desinfectante de referencia (fenol) lo que permite establecer coeficientes relativos de actividad.
- Se añaden 0.2 ml de un cultivo del microorganismo testigo (inicialmente se empleaba *Salmonella typhi*, pero se puede utilizar cualquier microorganismo que nos interese) a un tubo con 5 ml de solución de desinfectante y a otro con 5 ml de solución de referencia de fenol.
- Los tubos se dejan a temperatura ambiente (18-20 °C) y a intervalos de 2.5, 5, 7.5 y 10 min se pasa una cantidad establecida (un asa de cultivo) a tubos de caldo estéril, que se incuban a 37°C/24-48 horas

2.- Prueba de Kelsey-Sykes

- En primer lugar se hace un estudio con 4 microorganismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus vulgaris*) para determinar el más resistente al desinfectante que vamos a estudiar
- Se prepara la solución de trabajo del desinfectante y soluciones 50% mayores y menores (por ejemplo, 1% y 0.5 y 1.5%). Las soluciones se hacen en agua dura estéril normalizada (3.3 l de agua destilada más 17.5 ml de una solución de cloruro cálcico hexahidrato al 10% más 5 ml de una solución de sulfato magnésico heptahidrato al 10%).
- Por otro lado se hace una suspensión del microorganismo testigo (10^8 ufc/ml) en un diluyente inorgánico (por ejemplo, PBS).



- Finalmente se preparan tubos de caldo de recogida, caldo nutritivo estéril con un inactivador adecuado al desinfectante que estamos probando (Tiosulfato sódico al 0.5% para desinfectantes clorógenos y Tween 80 al 2% para compuestos de amonio cuaternario).
- Se añaden 1 ml de suspensión de microorganismos a los tubos con 6 ml de desinfectante y se mantienen a temperatura ambiente (22°C) durante 8 min. Tras este tiempo se pasan alicuotas de 20 µl a 5 tubos de caldo de recogida (Primera tanda)
- Dos minutos más tarde (10 minutos desde el principio) se añade nuevamente 1 ml de suspensión de microorganismo y se incuba por 8 minutos más (18 minutos desde el inicio) antes de pasar alicuotas de 20 µl a 5 tubos de caldo de recogida (Segunda tanda)
- El proceso se repite de nuevo (adición de microorganismos a los 20 minutos y siembra en la tercera tanda de caldo de recogida a los 28 min)
- Se considera que una concentración de desinfectante es adecuada cuando al menos en dos tubos de la primera y la segunda tanda no se observa crecimiento.

3.- Método de la suspensión

La actividad de un desinfectante se mide a la concentración más baja recomendada por el fabricante utilizando 5 microorganismos testigo (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Saccharomyces cerevisiae*). Alternativamente, se puede emplear otros microorganismos que sean contaminantes habituales en nuestra industria y que nos interese inactivar.

- Se prepara una suspensión del microorganismo de 10^8 ufc/ml en albúmina bovina al 0.03% o en tampón fosfato salino. Se hacen dos tubos por cada microorganismo que se vaya a utilizar.
- A uno de los tubos se le añade un volumen determinado (1 ml) de desinfectante y al otro se le añade el mismo volumen de agua esterilizada (control).
- Tras 5 min se pasan alicuotas de 1 ml a tubos con 9 ml de agua estéril con inactivador, que evita la actividad residual del desinfectante.
- Pasados otros 5 min se determina el recuento de microorganismos viables haciendo diluciones decimales y siembra en placa (se puede usar la técnica de gotas en superficie, sembrando 2 o 3 gotas de 20 µl por cada dilución, lo que permite sembrar varias diluciones en la misma placa; tras la incubación, el recuento se realiza en las gotas que presenten entre 5 y 20 colonias)



Resultados

1- Prueba de Rideal-Walker

Ejemplo de resultados:

Desinfectante	Dilución	Tiempo de espera (minutos)			
		2.5	5	7.5	10
X	1:1000	-	-	-	-
	1:1100	+	-	-	-
	1:1200	+	+	-	-
	1:1300	+	+	+	-
Fenol	1:100	+	+	-	-

El coeficiente de fenol se obtiene estimando el factor de dilución del desinfectante que da el mismo resultado que el de referencia y dividiendo este factor entre el factor de dilución del fenol (en el ejemplo 1200 entre 100, es decir, coeficiente 12).

2.- Prueba de Kelsey-Sykes

Ejemplo:

Concentración de desinfectante	1	2	3	Resultado
0.6%	-- +++	+++++	+++++	Inadecuado
1.2%	-----	--- +++	+++++	Adecuado
1.8%	-----	-----	----- +	Adecuado

3.- Método de la suspensión

Se considera que el desinfectante es adecuado cuando hay una reducción de entre 4 y 5 unidades logarítmicas en comparación con el control para todos los microorganismos utilizados.

Cuestiones

La lejía disponible en una industria alimentaria tiene 42,5 g/l de cloro activo y se recomienda su empleo para la desinfección de las superficies de trabajo en una dilución de 10 ml de lejía en 10 l de agua. ¿Cuántas ppm tiene la solución resultante?



9. Acceso on-line a las disposiciones legislativas

El acceso a las leyes, disposiciones y actos obligatorios mediante ordenador a través de conexión a internet es una potente herramienta para estar informado sobre toda la normativa publicada en los boletines oficiales, así como de otras normas o estándares de rango inferior.

BOLETINES OFICIALES DEL ESTADO ESPAÑOL

Boletín Oficial del Estado (BOE). <http://www.boe.es>

Acceso al contenido de todas las secciones (desde enero de 1961 en adelante, formato PDF).

Acceso a la base de datos a través del apartado legislación: Disposiciones de carácter general de ámbito estatal, autonómico y europeo desde 1960, y análisis jurídico de cada disposición.

Servidor del Centro de Documentación Europea de la Universidad de Alicante

<http://www.cde.ua.es>

Enlaces al BOE, DOCE, así como a diversos Boletines Autonómicos y Provinciales

Boletín Oficial de Castilla y León.

<http://bocyl.jcyl.es/>

DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA

Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). <http://eur-lex.europa.eu/JOIndex.do?ihmlang=es>

Base de datos de la legislación europea "eur-lex": <http://eur-lex.europa.eu>

La base de datos comprende textos publicados en el *Diario Oficial de la Unión Europea* en la serie L (legislación) y en la C (comunicaciones), incluyendo legislación, acuerdos internacionales, actos jurídicos preparatorios y preguntas parlamentarias.

La base de datos comprende documentos emitidos desde el inicio mismo de la cooperación europea, desde el establecimiento de la Comunidad Europea del Carbón y del Acero (CECA) en 1951 y la Comunidad Europea de la Energía Atómica (EURATOM) en 1957 en adelante.

Propuestas legislativas de la Unión Europea (Legislación en preparación, Trabajos preparatorios).

<http://eur-lex.europa.eu/es/prep/index.htm>

Documentos COM (de la Comisión) y documentos SEC (de la Secretaría General)

Texto completo (formatos HTML, Word y/o PDF)

LEGISLACIÓN DE ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA DEL NORTE.

Leyes Federales. <http://uscode.house.gov/lawrevisioncounsel.shtml>

Leyes aprobadas por el Congreso. Clasificadas por títulos.

Posibilidad de búsqueda.



Code of Federal Regulations (CFR). <http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html>

Reglamentos (federales). Posibilidad de búsqueda.

Federal Register (FR). <http://www.gpo.gov/fdsys/browse/collection.action?collectionCode=FR>

Diario Oficial.

Desde 1994 al momento actual.

Posibilidad de búsqueda. Propuestas y Reglamentos.

OTROS ENLACES DE INTERÉS.

Comisión Mixta FAO/OMS del *Codex Alimentarius*. <http://www.codexalimentarius.net/>

Normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales armonizadas elaboradas por esta organización mixta FAO/OMS.

Servidor del Parlamento Europeo. <http://www.europarl.europa.eu/portal/es>

Servidor Europa. http://europa.eu/index_es.htm

Acceso a diversas bases de datos clasificadas por temas.

http://europa.eu/documentation/order-publications/databases-subject/index_es.htm#17

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. <http://www.efsa.europa.eu>

Legislación alimentaria británica.

<http://www.opsi.gov.uk/>

Legislación alimentaria canadiense y fuentes legislativas.

<http://laws-lois.justice.gc.ca/eng/>

Otros servidores:

<http://noticias.juridicas.com/>

Centro Europeo para el Derecho del Consumo, CEUDECO:

<http://socdercon.blogspot.com.es/>

Recopilación de normas microbiológicas de productos alimenticios:

lista de distribución "MICROALI":

<http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311175/Normicro/Recopila/normical.htm>

