

I. DISPOSICIONES GENERALES

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

5316 Orden SCO/778/2009, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano.

La Directiva 98/83/CE del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano y su transposición en 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, especifican la metodología que debe emplearse para su análisis bacteriológico. En el caso de las bacterias coliformes y *Escherichia coli*, la metodología especificada es la que está descrita en la norma UNE EN ISO 9308-1:2000: método de filtración de membrana utilizando el agar lactosa TTC Tergitol incubado a $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

No obstante, la directiva europea y la normativa nacional permiten el uso de otras metodologías siempre y cuando se disponga de datos que confirmen que el método alternativo es equivalente o tiene mejores prestaciones que el de referencia.

Dada la existencia de precedentes sobre la dificultad de utilización de dicho método por parte de los laboratorios de control de la calidad del agua de consumo, un grupo de laboratorios de los sectores afectados planteó la realización de un estudio de equivalencia basado en el procedimiento ISO 17994:2004 (Calidad del agua – Criterios para establecer la equivalencia de dos métodos microbiológicos), siguiendo las recomendaciones del Expert Group on Microbiology, órgano consultivo de la Comisión Europea.

Los métodos ensayados como alternativos para el análisis de bacterias coliformes y *Escherichia coli* fueron el método de NMP en medio líquido utilizando la tecnología de sustrato definido y el método del agar cromogénico para coliformes. Los resultados de este estudio utilizando los medios de cultivo y reactivos descritos en el anexo, demostraron que ambos métodos alternativos permitían obtener resultados como mínimo tan fiables como los obtenidos con el método de referencia.

Una vez que el Expert Group on Microbiology ratificó el ejercicio español en octubre de 2007, y tras haber sido examinada por la Ponencia de Sanidad Ambiental dependiente del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, se propone esta orden como desarrollo del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, con objeto de autorizar el uso de dichos métodos como alternativos al método de referencia de la normativa europea y nacional.

Por consiguiente y en adelante, además del método contemplado en la parte A del anexo IV del referido real decreto, se podrán utilizar los métodos que recoge esta orden para el análisis microbiológico de los parámetros: «bacterias coliformes» y «*Escherichia coli*».

Esta disposición ha sido sometida al procedimiento de información en materia de normas y reglamentaciones técnicas y de reglamentos relativos a los servicios de la sociedad de la información, previsto en la Directiva 98/34/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de junio de 1998, modificada por la Directiva 98/48/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de julio de 1998, así como en el Real Decreto 1337/1999, de 31 de julio, que incorpora estas directivas al ordenamiento jurídico español.

En su tramitación han sido oídos los sectores afectados y consultadas las Comunidades Autónomas.

Esta orden se dicta en uso de la facultad atribuida en la disposición final primera del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

En su virtud dispongo:

Artículo único. *Autorización de métodos alternativos.*

Sin perjuicio de lo dispuesto en 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, y como alternativos al método descrito en la parte A de su anexo IV, se podrán utilizar, asimismo, los métodos incluidos en el anexo de esta orden, para el análisis microbiológico de los parámetros: «bacterias coliformes» y «*Escherichia coli*».

Disposición final primera. *Título competencial.*

Esta orden, que tiene carácter de legislación básica, se dicta al amparo de lo dispuesto en el artículo 149.1.16.^a de la Constitución que atribuye al Estado la competencia exclusiva en materia de bases y coordinación general de la sanidad.

Disposición final segunda. *Entrada en vigor.*

Esta orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Madrid, 17 de marzo de 2009.—El Ministro de Sanidad y Consumo, Bernat Soria Escoms.

ANEXO

Métodos de análisis alternativos

Parte A.

Definiciones:

Bacteria coliforme: Miembro de la familia *Enterobacteriaceae* que expresa el enzima β -D-galactosidasa.

Escherichia coli: Miembro de la familia *Enterobacteriaceae* que expresa los enzimas β -D-galactosidasa y β -D-glucuronidasa.

Parte B.

Método de detección y recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en aguas de consumo por filtración de membrana utilizando agar cromogénico para coliformes (ACC).

Procedimiento:

– Filtrar la muestra a través de una membrana de ésteres de celulosa o equivalente, testadas con arreglo a la norma ISO 7704:1985, de 0,45 μ m de diámetro de poro, que retenga los microorganismos. Colocar la membrana sobre una placa conteniendo el ACC.

– Incubar la placa durante 21 ± 3 horas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Si a las 18 horas aparecen colonias rojas o incoloras, prolongar la incubación hasta las 24 horas para incluir posibles reacciones tardías de beta-galactosidasa o beta-glucuronidasa.

– Contar las colonias β -galactosidasa positivas y β -glucuronidasa negativas (color rosa asalmonado a rojo) como bacterias coliformes distintas a *Escherichia coli*. Contar las colonias β -galactosidasa positivas y β -glucuronidasa positivas (color azul oscuro a violeta) como *Escherichia coli*. El recuento de bacterias coliformes totales corresponderá a la suma de las colonias de color rosa asalmonado a rojo y las colonias de color azul oscuro a violeta.

Cálculo de resultados: A partir del volumen de agua filtrado y del número de colonias características contadas sobre la membrana, calcular la concentración de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en 100 ml de muestra.

Expresión de resultados: Los resultados se expresarán como UFC/100 ml.

Composición del método de cultivo:

Medio base (1 litro):

Peptona: 3,0 g.

Cloruro sódico (NaCl): 5,0 g.

Dihidrogenofosfato sódico (NaH_2PO_4): 2,2 g.

Hidrogenofosfato disódico (Na_2HPO_4): 2,7 g.

Triptófano: 1,0 g.

Piruvato sódico: 1,0 g.

Tergitol® 7: 0,15 g.

Sorbita: 1,0 g.

Mezcla comógena: Salmon-GAL (0,2 g/L) y X-Glucuronido (0,2 g/L): 0,4 g.

Agar: 10 g.

Agua destilada: 1.000 ml.

Suspender los ingredientes en agua calentando al baño maría o en vapor fluente con agitación frecuente hasta completa disolución. El pH final debe ser de $6,8 \pm 0,2$ a 25°C . No autoclavar ni sobrecalentar.

Solución de vancomicina (5 ml)*:

Vancomicina HCl: 5 mg.

Agua destilada: 5 ml.

Disolver la vancomicina en agua y esterilizar por filtración de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro.

Solución de cefsulodina (5 ml)*:

Sal sódica de cefsulodina: 5 mg.

Agua destilada: 5 ml.

Disolver la sal sódica de cefsulodina en agua y esterilizar por filtración de membrana de $0,2 \mu\text{m}$ de diámetro de poro.

Para el estudio de equivalencia se reemplazo ambas soluciones (solución vancomicina y solución cefsulodina) por el suplemento comercial.

Medio completo:

Medio base: 1000 ml.

Solución de vancomicina: 5 ml.

Solución de cefsulodina: 5 ml.

Fundir el medio base y atemperar hasta $45-50^\circ\text{C}$. Añadir de modo aséptico las soluciones de vancomicina y de cefsulodina. Homogeneizar evitando la formación de burbujas.

Repartir en placas de Petri. Almacenar a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ en la oscuridad hasta un plazo máximo de un mes.

En el estudio de equivalencia se empleó el medio Chromocult Coliform Agar, fabricado por la casa comercial Merck.

Parte C.

Método de detección y recuento de bacterias coliformes y de *Escherichia coli* en aguas de consumo por el NMP (número más probable) en medio líquido utilizando la tecnología del sustrato definido® (DST).

Materiales específicos del método:

Frascos estériles con enrase a 100 ml.

Placa: Para recuentos hasta 200,5/100 ml.

Dosis de sustrato definido: Reactivo dosificado para un ensayo.

Selladora.

Lámpara de luz UV de 365 nm.

Tablas del NMP para placa de 51 pocillos.

Procedimiento:

– Introducir 100 ml de muestra en un envase estéril de 100 ml de capacidad. Añadir una dosis de sustrato definido y agitar hasta completa disolución. Introducir en una placa. Colocar la placa en una selladora para repartir la muestra entre los distintos pocillos, que quedarán aislados entre sí.

– Incubar la placa durante 18 ± 4 horas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$.

– Contar los pocillos de color amarillo como positivos para bacterias coliformes. Utilizando una lámpara de luz UV de 365 nm, marcar los pocillos que presenten fluorescencia azulada. Contar como positivos para *Escherichia coli* los pocillos a la vez amarillos y fluorescentes.

Cálculo de resultados:

– A partir del número de pocillos amarillos contados en la placa, buscar en la tabla del NMP correspondiente el de bacterias coliformes en 100 ml de muestra.

– A partir del número de pocillos a la vez amarillos y fluorescentes contados en la placa, buscar en la tabla del NMP el de *Escherichia coli* en 100 ml de muestra.

Expresión de resultados:

Los resultados se expresarán como NMP/100 ml.

En caso de obtenerse Ausencia, estas unidades equivalen a UFC/100 ml.

En el estudio de equivalencia se empleó la placa Quanti-Tray® de 51 pocillos y el sustrato definido Colilert 18®.