

te por las Empresas del Sector que queden en activo y por aquellas cuya nueva instalación pudiera autorizarse en el futuro, y se liquidará conjuntamente con las demás cuotas de la Seguridad Social, utilizando el modelo de impresos que al efecto se establezca por la Dirección General de la Seguridad Social.

Tres. El complemento de las cotizaciones a que se refiere este artículo comenzará a devengarse, por la totalidad de las bases tarifadas y complementarias de cotización correspondientes al mes de la publicación de este Decreto, en el mes siguiente a dicha publicación. La obligación de pago estará en vigor por el tiempo necesario hasta que los anticipos realizados por el Instituto Nacional de Previsión sean amortizados en su totalidad.

Artículo veintinueve. *Procedimientos de recaudación* — Uno. Corresponde al Instituto Nacional de Previsión la recaudación del recargo complementario establecido en el artículo anterior.

Dos. El Instituto Nacional de Previsión anticipará con cargo, a la recaudación de dicho recargo, el pago de las indemnizaciones por despido a los trabajadores afectados, el cincuenta por ciento del coste de las jubilaciones anticipadas con cargo al Sector, y los gastos que ocasionen las funciones y cometidos encomendados a los Organos ejecutivos y a la Gerencia del Plan de Reestructuración.

Tres. El Instituto Nacional de Previsión descontará de las cuotas complementarias por él recaudadas, en concepto de gastos de administración, el mismo tanto por ciento que aplique en su gestión del Régimen de la Seguridad Social. El cincuenta por ciento de estos gastos de administración será transferido mensualmente por el Instituto Nacional de Previsión al Ministerio de Trabajo a la cuenta que al efecto se determine, para atender los gastos que ocasionen las funciones y cometidos encomendados a los Organos ejecutivos y de Gerencia del Plan.

Cuatro. Mensualmente las delegaciones del Instituto Nacional de Previsión en las provincias donde radiquen las Empresas obligadas al pago de las cuotas complementarias, comunicarán a la Comisión Ejecutiva los ingresos obtenidos, detallados por Empresas y trabajadores, con expresión del mes a que corresponden las bases de cotización sobre las que se ha satisfecho la cuota complementaria.

Artículo veintidós. Se faculta a los Ministerios de Trabajo y de Industria, dentro del ámbito de sus respectivas competencias, para dictar, previo informe de la Comisión Ejecutiva, las disposiciones necesarias para el cumplimiento de cuanto se dispone en el presente Decreto. En el plazo de dos meses, contados a partir de la publicación de este Decreto, el Ministerio de Industria dictará las normas que regulen las peticiones de acogimiento al Plan y por el Ministerio de Trabajo se adoptarán las medidas laborales que sean necesarias para su ejecución.

Así lo dispongo por el presente Decreto, dado en Madrid a doce de abril de mil novecientos setenta y tres.

FRANCISCO FRANCO

El Vicepresidente del Gobierno,  
LUIS CARRERO BLANCO

*ORDEN de 11 de abril de 1973 por la que se establecen las bases técnicas y métodos que deberán observar las estaciones depuradoras de moluscos.*

Excelentísimos señores:

El Decreto de la Presidencia del Gobierno para el Reconocimiento de la Calidad y Salubridad de los Moluscos, de fecha 23 de julio de 1964, establece, en su artículo 22, que «por la Presidencia del Gobierno se dictarán, a propuesta de los Ministerios de la Gobernación y de Comercio, las disposiciones necesarias para lo establecido en este Reglamento».

En su consecuencia, y a propuesta de los Ministros de la Gobernación y Comercio, esta Presidencia del Gobierno ha tenido a bien disponer:

Norma 1.ª El peso máximo de moluscos que se autoriza estabular por metro cuadrado de superficie de tanque de depuración será de 30 kilogramos.

Norma 2.ª Los moluscos estarán sometidos a una depuración continua de una duración de dos días (cuarenta y ocho horas), como mínimo.

Norma 3.ª Como consecuencia de las normas 1.ª y 2.ª precedentes, la capacidad diaria de depuración de una estación depuradora quedará determinada por la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad en kilogramos de depuración diaria: } \frac{A \times 30}{2}$$

Siendo «A» la cifra en metros cuadrados de los tanques de depuración en funcionamiento.

Norma 4.ª El caudal mínimo de agua salubre que habrá de ser suministrado a los tanques durante un proceso de depuración de moluscos será de 10 metros cúbicos por hora y tonelada de moluscos estabulados, como indica la norma 1.ª

Norma 5.ª Toda persona, natural o jurídica, que sea concesionaria de una estación depuradora y considere que el sistema utilizado en las mismas permite superar los límites establecidos en las normas precedentes, podrá solicitar de la Junta Central Inspectorá el reconocimiento de su instalación.

A tal fin presentará en la Comandancia de Marina de la provincia marítima en que esté inscrita la correspondiente solicitud, acompañada de Memoria explicativa. A la vista de este documento, la Junta Central Inspectorá propondrá a las Direcciones Generales de Pesca Marítima y Sanidad el nombramiento de una Comisión que verifique el rendimiento del establecimiento en cuestión.

Basada en el informe de esta Comisión, y oída la Junta Central Inspectorá, podrán autorizar las Direcciones Generales de Pesca Marítima y Sanidad unas condiciones especiales de funcionamiento para la instalación depuradora solicitante.

Norma 6.ª Los Inspectores y Ayudantes a que se refiere la norma 12 podrán revisar en cualquier momento la superficie de piscinas de depuración que se encuentren en condiciones de funcionamiento. Estos Inspectores informarán a la autoridad de Marina de toda anomalía que observasen respecto a la Memoria y planos del proyecto autorizado.

Norma 7.ª Los modelos de libros de registro a que se refiere el artículo 18 del Decreto 2284/1964, de 23 de julio, y rectificado por Decreto 2899/1970, de 20 de agosto, aprobando el Reglamento para la calidad y salubridad de los moluscos, constan en los anexos 1 a 3 a la presente Orden.

Las entradas en los libros de registro de análisis de agua y de moluscos serán diarias durante el periodo de funcionamiento de cada depuradora.

Tanto estos libros como los de registro de etiquetas de control sanitario, en los que se harán las entradas oportunas, podrán ser revisados en cualquier momento por los Inspectores y Ayudantes a que se refiere la norma 12.

El libro de registro de etiquetas se encuadrará con dos copias desprendibles por hoja, para su remisión a las Direcciones Generales de Sanidad y de Pesca Marítima.

Norma 8.ª Los análisis se llevarán a cabo según método recomendado por la Dirección General de Sanidad, que se acompaña como anexo 4.

Norma 9.ª No se considerará depurado ningún molusco que presente más de 500 escherichiacoli por litro.

Norma 10.ª La validez de las etiquetas de control sanitario se limitará a cinco días, a partir de su fecha.

Norma 11.ª Los Inspectores y Ayudantes a que se refiere la norma 12 de la presente Orden ministerial podrán tomar muestras de partidas de moluscos, tanto en origen como en destino. Estas muestras, en envase sellado por los depositarios, serán entregadas en el Laboratorio de la Dirección General de Sanidad o del Instituto Oceanográfico más próximo, para su análisis, del que será informada la Junta Central Inspectorá.

Norma 12.ª Con el fin de poder vigilar el cumplimiento de la presente Orden ministerial, así como de la legislación y reglamentación vigente, se nombrarán Inspectores y Ayudantes conforme a lo establecido en el artículo 2.º del Decreto 2284/1964, de 23 de julio («Boletín Oficial del Estado» número 198), y disposiciones vigentes en materia de personal.

Estos Inspectores y Ayudantes recibirán un nombramiento en el que, además de los datos oportunos para su identificación, constarán las atribuciones que les son conferidas.

Durante el ejercicio de su función se verán obligados a presentar este documento a toda persona que justificadamente lo solicite.

Lo que comunico a VV. EE. para su conocimiento y efectos. Dios guarde a VV. EE.  
Madrid, 11 de abril de 1973.

CARRERO

Excmos. Sres. Ministros de la Gobernación y de Comercio.

MINISTERIO DE LA GOBERNACION  
 DIRECCION GENERAL DE SANIDAD  
 Subdirección General de Sanidad Veterinaria

MOVIMIENTO DE ETIQUETAS CONTROL SANITARIO

AÑO .....  
 MES .....  
 DEPURADORA } NUMERO .....  
 NOMBRE .....

CLASE .....  
 SERIE .....

Día	Cliente	Albarán	Etiquetas empleadas	Kilos unidad	Numeración		Valor kilos	Total kilos	Etiquetas recibidas	Existencias etiquetas
					Del	Al				

7610

16 abril 1973

B. O. del E.—Núm. 91

CONTROL DE SALUBRIDAD DE AGUA DE MAR

DEPURADORA } NUMERO .....  
 NOMBRE .....

PROVINCIA MARITIMA DE .....

AÑO .....

MES .....

Número de análisis	Día	Lugar de toma de muestra	Hora y fecha	Profundidad	Temperatura	Coefficiente de marea	Lluvia (0 a 3)	Sol (0 a 3)	Viento N. S. E. O. (0 a 3)	Turbidez (0 a 3)	Salinidad gr/l.	pH	E. coli por litro	Coliformes por litro	Escherichia coli fecales	Observaciones



ANEXO NUM. 4

MÉTODOS DE ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUAS DE MAR Y MOLUSCOS

- + Coliformes.
- Escherichia Coli.
- Esirep. fecales.

CONTAJE DE COLIFORMES

Salvo casos particulares, la investigación y numeración de estos germenés se hace en medios líquidos.

Se utilizan dos series de cinco tubos (o sea, diez tubos); la segunda serie recibe un volumen de líquido a analizar igual a 1/10 de la primera.

Según el grado de polución que se presume, se utiliza una de las principales combinaciones siguientes:

Serie A		Serie B
25 c. c.	y	2,5 c. c.
10 c. c.	y	1 c. c.
5 c. c.	y	0,5 c. c.

Estas tres combinaciones permiten obtener una escala de numeración que se adapta bien a la mayoría de los casos.

Contaje

Combinación elegida	Aguas	Moluscos
25 c. c. y 2,5 c. c.	De 40 a 2.000 +	De 120 a 6.000 +
10 c. c. y 1 c. c.	De 100 a 5.000 +	De 300 a 15.000 +
5 c. c. y 0,5 c. c.	De 200 a 10.000 +	De 600 a 30.000 +

Para las aguas y moluscos de origen salubre se utiliza frecuentemente la fórmula: 25 c. c. y 2,5 c. c.

El número de germenés resultante de los tubos positivos en las dos series se halla aplicando una fórmula matemática (Boury, 1957, v. tablas).

En los moluscos se aplica el coeficiente 3, teniendo en cuenta la dilución.

TÉCNICA DE LAS SIEMBRAS

**Aguas.**—No ofrece dificultades especiales. Después de agitar el frasco se toman los volúmenes necesarios para las siembras.

**Moluscos.**—El análisis puede hacerse: a) de la carne solamente, y b) de la carne + líquido intervalvar.

a) Carne sola:

Lavar, cepillar, escurrir y abrir seis-ocho ostras.

Tirar el líquido intervalvar.

Sacar los cuerpos y colocarlos en una probeta que contenga 10 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100 estéril. Anotar el volumen de los cuerpos por desplazamiento.

Verter en un vaso y cortar con tijera.

Añadir un tubo de arena estéril y triturar con pistilo mortero.

Añadir un volumen de solución salina al 1 por 100 estéril igual a dos veces el volumen de los cuerpos (descontando los 10 centímetros cúbicos ya presentes).

Agitar y dejar reposar un minuto.

Tomar del líquido sobrante los volúmenes necesarios para las siembras.

b) Carne + líquido intervalvar:

Lavar, cepillar, escurrir y abrir seis-ocho ostras.

Recoger los líquidos intervalvares en una probeta y anotar volumen.

Cortar los cuerpos y colocarlos en una segunda probeta.

Añadir las aguas intervalvares a los cuerpos y anotar volumen por desplazamiento.

Verter en un vaso y cortar con tijera.

Añadir un tubo de arena estéril y triturar con pistilo mortero.

Añadir un volumen de agua salada estéril al 1 por 100 igual a dos veces el volumen de los cuerpos (restando el volumen de agua intervalvar ya presente). El volumen total de líquido sea a dos veces el volumen de los cuerpos.

Agitar y dejar reposar un minuto.

Tomar del líquido sobrenadante los volúmenes necesarios para las siembras.

**Nota:** Para los moluscos de pequeña talla se abre un número de ejemplares de modo que el volumen de los cuerpos sea al menos de 15 centímetros cúbicos.

(Todas estas operaciones se hacen asépticamente. Los recipientes y material serán estériles o esterilizados en el momento de su uso.)

INVESTIGACIÓN Y CONTAJE DE COLIFORMES TOTALES Y ESCHERICHIA COLI EN CALDO LACTOSADO BILIJADO

**Fórmula**—(v. Brilliant Green bile 2.3 (87) Difco, que se utiliza como medio simple en la proporción de 10 gramos del medio deshidratado para 1000 centímetros cúbicos de agua).

Repartir en tubos con campana a razón de 10 centímetros cúbicos por tubo. Esterilizar 15' a 120° C.

El medio concentrado se prepara con —60 gramos de medio deshidratado para 1000 centímetros cúbicos de agua.

Para las siembras habituales (volúmenes importantes) se utiliza un medio concentrado, de forma que, después de la inoculación, la concentración sea la del medio simple. La concentración por 1,5 es adecuada.

Repartir exactamente 10 centímetros cúbicos en tubos de 16 milímetros de diámetro con campana y esterilizar 15' a 120° C

**Siembra.**—Sea cualquiera la combinación elegida (25 y 2,5 centímetros cúbicos, 10 y 1 centímetros cúbicos, 5 y 0,5 centímetros cúbicos) se siembra cada tubo con un volumen uniforme de 5 centímetros cúbicos de líquido a analizar o de una mezcla líquido a analizar + solución salina al 1 por 100 estéril.

Combinación elegida	Serie A	Serie B
25 y 2,5 c. c.	Repartir directamente 5 c. c. por tubo.	Diluir 2,5 c. c. de líquido a analizar + 22,5 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir 5 c. c. por tubo.
10 y 1,5 c. c.	Diluir 10 c. c. de líquido a analizar + 10 c. c. de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir 5 c. c. por tubo.	Diluir 1 c. c. de líquido a analizar + 24 c. c. de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir 5 c. c. por tubo.
5 y 0,5 c. c.	Diluir 5 c. c. de líquido a analizar + 20 c. c. de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir 5 c. c. por tubo.	Diluir 0,5 c. c. de líquido a analizar + 24,5 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir 5 c. c. por tubo.

**Incubación.**—Estufa a 30° durante veinticuatro horas. Anotar los tubos con gas, que corresponden a los Coliformes totales (numeración según tablas de Boury).

Para la investigación de Escherichia Coli se practica la prueba de Mackenzie. De cada tubo con gas se resiembrar:

- a) Sobre el mismo medio en concentración normal.
- b) Sobre agua de peptona ordinaria.

Se lleva al baño maría a 44° durante veinticuatro horas. Anótense los tubos con gas en el medio lactosado e investigar indol en el medio con peptona.

Todo tubo de cultivo primario con gas a 30° que dé gas + indol en subcultivo a 44° contiene *Escherichia Coli* (numeración con tablas de Boury).

INVESTIGACIÓN Y CONTAJE DE *ESCHERICHIA COLI* EN CALDO LACTOSADO BILIADO

Medio utilizado.—Véase fórmula página 2. Se utiliza un medio concentrado (X 1,5).

Repartir en tubos y hacer la siembra tal como se describe en la página 3, serie B; poner 5 centímetros cúbicos de líquido a analizar y completar hasta 50 centímetros cúbicos. La dilución es la misma y así se evita tener que apurar los últimos 5 centímetros cúbicos.

Incubación.—Baño maría a 44° durante veinticuatro horas.

Si no hay crecimiento a las veinticuatro horas, es inútil prolongar la incubación. Si hay crecimiento sin gas, prolongar veinticuatro horas.

Los tubos con gas (1/10 de la campana, como mínimo) se resembran en agua peptonada ordinaria, incubando al baño maría a 44° durante veinticuatro horas.

Investigar indol. Puede obtenerse un resultado positivo a las doce horas, especialmente si se utiliza agua con triptona.

Todo tubo que dé gas + indol contiene *Escherichia Coli* (numeración con las tablas de Boury).

INVESTIGACIÓN Y CONTAJE DE *ESCHERICHIA COLI* EN CALDO PEPTONADO FENICADO (MÉTODO DE VINCENT)

Medio utilizado.—Caldo peptonado fenicado al 0.85 por 1.000.

Fórmula (medio simple):

Peptona .....	20 g.	pH = 7
CiNa .....	5 g.	
Fenol .....	0,85 g.	
Agua .....	1.000 c. c.	

Repartir 10 centímetros cúbicos aproximadamente por tubo y esterilizar 20' a 120°.

Fórmula (medio doble):

Para las siembras habituales (volúmenes importantes) se utiliza un medio doble de forma que, después de la inoculación, la concentración corresponde a la del medio simple.

(Doble cantidad de peptona y fenol con la misma cantidad de agua). No CiNa, porque es para añadir agua salada. El simple lleva CiNa porque es para resembrar.

Repartir en frascos de tapón roscado a razón de 50-100 centímetros cúbicos. Esterilizar 20' a 120°.

Siembra.—Sea cualquiera la combinación elegida (25 y 2,5 centímetros cúbicos, etc.) se siembra cada serie con un volumen uniforme de 25 centímetros cúbicos, constituido bien por el líquido a analizar o por una mezcla «líquido a analizar + solución salina al 1 por 100 estéril».

Poner 25 centímetros cúbicos de medio doble en dos probetas estériles, que corresponden a las series A y B; cada probeta contiene:

Combinación elegida	Serie A	Serie B
25 y 2,5 c. c. ....	25 c. c. medio doble + 25 c. c. de líquido a analizar. Mezclar. Repartir en cinco tubos.	25 c. c. medio doble, 2,5 c. c. de líquido a analizar, 22,5 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir en cinco tubos.
10 y 1 c. c. ....	25 c. c. medio doble + 10 c. c. de líquido a analizar + 15 c. c. de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir en cinco tubos.	25 c. c. medio doble + 1 c. c. de líquido a analizar + 24 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir en cinco tubos.

Combinación elegida	Serie A	Serie B
5 y 0,5 c. c. ....	25 c. c. medio doble + 5 c. c. de líquido a analizar + 20 centímetros cúbicos de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir en cinco tubos.	25 c. c. medio doble de líquido a analizar. 24,5 c. c. de solución salina al 1 por 100. Mezclar. Repartir en cinco tubos.

Incubación.—Estufa a 41,5° durante cuarenta y ocho horas. Para las aguas, investigar indol al fin de las cuarenta y ocho horas (reacción de Salkowski).

Para los moluscos, resembrar en el mismo medio simple. Volver a la estufa a 41,5° durante veinticuatro horas e investigar indol.

Número de gérmenes, según las tablas de Boury.

INVESTIGACIÓN Y CONTAJE DE ENTEROCOCOS (*STREPTOCOCCUS FECALIS*)

Medios utilizados.—Prueba presuntiva: Medio de Rothe.

Prueba confirmatoria: Medio de Litsky.

Prueba presuntiva (medio de Rothe):

	Simple	Doble	
Bacto triptosa Difco .....	20 g.	40 g.	) Ajustar a pH = 6,8
Glucosa .....	5 g.	10 g.	
Cloruro sodico .....	5 g.	10 g.	
Fosfato monopotásico .....	2,700 g.	5,400 g.	
Fosfato bipotásico .....	2,700 g.	5,400 g.	
Azotidrato de sodio .....	0,200 g.	0,400 g.	
Agua destilada .....	1.000 c. c.	1.000 c. c.	

Calentar a fuego lento (40°) agua tibia.

Para las siembras habituales (volúmenes importantes) se utiliza el medio doble. Se reparte en frascos con tapón de rosca a razón de 50-100 centímetros cúbicos por frasco. Esterilizar 20' a 120°.

Siembra.—Sea cualquiera la combinación elegida, se siembra cada serie con un volumen uniforme de 25 centímetros cúbicos constituido por el líquido a analizar o por una mezcla de este + solución salina al 1 por 100 estéril, de modo que después de la inoculación la concentración corresponda a la del medio simple.

Poner 25 centímetros cúbicos de medio doble en dos probetas que corresponden a las series A y B y proceder como se indica en la página 5.

Incubación.—Estufa a 37° durante cuarenta y ocho horas.

Todo tubo que presente enturbiamiento puede contener un estreptococo fecal y ha de ser necesariamente resembrado en el medio confirmatorio de Litsky.

PRUEBA CONFIRMATORIA DE LITSKY

Fórmula del medio de Litsky

Bacto triptosa Difco .....	20 g.
Glucosa .....	5 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Fosfato monopotásico .....	2,700 g.
Fosfato bipotásico .....	2,700 g.
Azotidrato de sodio .....	0,300 g.
Etíl violeta .....	0,0005 g.
Agua destilada .....	1.000 c. c.

Repartir 10 centímetros cúbicos aproximadamente por tubo y esterilizar 20' a 120°.

Incubación.—Después de resembrar con tres asas de Rothe los tubos Litsky se colocan en estufa a 37° durante cuarenta y ocho horas.

Todo tubo que presente enturbiamiento claro o ligero acompañado de un pequeño sedimento violáceo en forma de pastilla (aglomerado microbiano) se considera como positivo.

(Numeración según tablas de Boury.)

## TABLAS DE BOURY

Siembras en cinco tubos de 10 c. c. y 1 c. c.

10 c. c. 1 c. c.	0	1	2	3	4	5
0	0	100	200	300	400	500
1	90	200	310	440	600	1.000
2	180	310	460	650	950	2.000
3	270	420	600	850	1.300	3.000
4	360	550	750	1.000	1.600	4.000
5	450	650	900	1.200	1.900	5.000 +

Aguas: Lectura directa.  
Moluscos: Multiplicar por 3.

Siembras en cinco tubos de 5 c. c. y 0,5 c. c.

5 c. c. 0,5 c. c.	0	1	2	3	4	5
0	0	200	400	600	800	1.000
1	180	400	650	900	1.200	2.000
2	360	600	900	1.300	1.900	4.000
3	550	850	1.200	1.700	2.500	6.000
4	750	1.100	1.500	2.100	3.200	8.000
5	900	1.300	1.800	2.500	3.900	10.000 +

## TABLAS DE BOURY

## Moluscos

Siembras en cinco tubos de 25 c. c. y 2,5 c. c.

25 ml. 2,5 ml.	0	1	2	3	4	5
0	0	120	240	360	480	600
1	110	240	390	550	700	1.200
2	210	380	550	800	1.300	2.400
3	330	560	700	1.000	1.500	3.800
4	450	850	900	1.300	2.000	4.800
5	550	800	1.100	1.500	2.300	6.000

## Aguas

25 ml. 2,5 ml.	0	1	2	3	4	5
0	0	40	80	120	160	200
1	38	80	130	180	240	400
2	70	120	190	260	370	800
3	110	170	240	340	500	1.200
4	150	210	300	420	650	1.600
5	180	280	350	500	750	2.000