

## IV. NORMAS ADMINISTRATIVAS

La Aduana no autorizará la exportación o importación de estos productos, si previamente no se presenta el certificado de calidad expedido por el SOIVRE.

En la licencia, en el documento unificado de exportación (DUE), o en el certificado de importación, deberá figurar claramente la denominación del producto de acuerdo con el apartado 5, presentación.

## V. NORMAS COMPLEMENTARIAS

Quedan facultadas la Dirección General de Exportación y la de Política Arancelaria e Importación, en el ámbito de sus competencias, para dictar las disposiciones complementarias para la aplicación de la presente Orden o, en su caso, para establecer las modificaciones que las circunstancias aconsejen, según las características de cada campaña y la situación de los mercados.

## VI. DISPOSICION FINAL

La norma aprobada por esta Orden entrará en vigor a partir del 1 de diciembre del año en curso.

Lo que comunico a VV. II.  
Dios guarde a VV. II.  
Madrid, 28 de junio de 1985.

BOYER SALVADOR

Ilmos. Sres. Directores generales de Exportación y de Política Arancelaria e Importación.

**13426** *CORRECCION de erratas de la Orden de 6 de marzo de 1985 sobre índices de precios de mano de obra y materiales de la construcción correspondientes al mes de noviembre de 1984, aplicables a la revisión de precios de contratos de obras del Estado.*

Padecido error en la inserción de la citada Orden publicada en el «Boletín Oficial del Estado» número 93, de fecha 18 de abril de 1985, a continuación se formula la oportuna rectificación:

En la página 10387, primera columna, párrafo primero, línea quinta, donde dice: «provinciales y de los contratos de obras del Estado correspondien-», debe decir: «provinciales y los de materiales de la construcción aplicables a la revisión de precios de contratos de obras del Estado correspondien-».

## MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION

**13427** *ORDEN de 27 de junio de 1985 por la que se establece el pago de la leche en función de su composición y su calidad higiénica.*

Ilustrísimos señores:

Las Ordenes de este Departamento de 14 de agosto de 1967, de 22 de marzo de 1971 y de 30 de septiembre de 1981, establecen, conforme al Reglamento de Centrales Lecheras y otras Industrias Lácteas, un sistema de pago de la leche por su calidad, si bien prescinden de las características higiénicas del producto y atienden a su composición.

El Real Decreto 491/1985, de 20 de marzo, sobre regulación de la Campaña Lechera 1985/1986, ordena, en su artículo quinto, que se establezca un nuevo sistema de pago de la leche por la calidad.

La experiencia adquirida con la aplicación del sistema de pago por calidad vigente y con motivo de las normas de regulación de las correspondientes campañas lecheras, aconseja modificar algunos de los parámetros utilizados con este fin e incluir la calidad higiénica del producto.

En consecuencia, este Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, establecidas las consultas con los sectores interesados, ha tenido a bien disponer lo siguiente:

Primero.—El pago de la leche a los ganaderos se hará en función de su composición y su calidad higiénica.

El sistema de pago por calidad, conforme a su composición, será obligatorio, y por calidad higiénica, tendrá carácter voluntario por los sectores ganadero e industrial.

Segundo.—Los parámetros para valorar la composición de la leche serán la materia grasa y la proteína y para la apreciación de la calidad higiénica el recuento de microorganismos mesófilos aerobios viables.

Tercero.—Los grupos de ganaderos, formalmente constituidos, y que lo soliciten, serán considerados, a efectos del pago de calidad, como proveedor único del conjunto de la leche aportada por sus asociados, sea cual fuere el lugar de entrega, siempre y cuando ésta no se efectúe independientemente por cada uno o parte de sus componentes y que aparezca ante la industria un solo responsable del grupo, quien será el único capacitado para percibir las liquidaciones por el total de la leche entregada.

Cuarto.—El número mínimo de análisis mensuales por ganadero o grupo de ganaderos será de dos, efectuándose los análisis en los días que se estimen oportunos.

En el supuesto de que los ganaderos efectuaran dos entregas diarias, el número mínimo de análisis a realizar sería de cuatro, correspondiendo dos a la entrega de la mañana, y otros dos a la de la tarde, obteniéndose en todo caso el porcentaje medio ponderado mensual de los resultados de los análisis.

Quinto.—A los efectos del pago de leche por calidad, se adoptan, como técnicas, las siguientes:

Las tomas de muestras de leche serán efectuadas en las condiciones definidas en el anejo 1 de la presente Orden (UNE 34-828-83, anexo A).

La determinación de la materia grasa se realizará por el método oficial [Gerber, anexo III, 1(e), de la Orden de 31 de enero de 1977] y la correspondiente a proteínas, por el procedimiento de negro-amido (UNE 34-835-85, anejo 2 adjunto).

La estimación de la calidad higiénica se verificará por el recuento de microorganismos a 30° C (UNE 34-805-83) (anejo 3 de esta disposición).

Para la determinación del extracto seco magro, se restará del extracto seco total, obtenido según el método oficial, descrito en el anexo III, 5(a), de la Orden de 31 de enero de 1977, la materia grasa determinada por el método de Gerber.

La acidez se valorará conforme al método oficial señalado en el anexo II, 8(a), de la última disposición mencionada.

Sexto.—Para la determinación de grasas, proteínas, extractos secos y recuentos microbianos en la leche, podrán utilizarse asimismo los equipos analizadores automáticos que figuran en el anejo 4, cuya contrastación realizará el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en los laboratorios de las industrias lácteas, adoptándose como métodos de referencia para tal contrastación los siguientes: Grasa, Rose-Gottlieb; proteínas, Kjeldahl; extracto seco, gravimetría [epigrafe 1(a), 2 y 5/a], respectivamente, del anexo III de la Orden de 31 de enero de 1977) y calidad higiénica, recuento de microorganismos (UNE 34-805-83).

La contrastación de equipos analizadores automáticos que no figuren en el anejo 4 deberá solicitarse del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La petición de contrastación, que será resuelta por el citado Ministerio de Agricultura, deberá hacer constar, respecto a cada equipo instrumental, sus especificaciones técnicas, y entre ellas: Clase de medida, capacidad por unidad de tiempo, margen de las mediciones, precisión (desviación típica respecto al correspondiente método de referencia), repetibilidad (desviación típica entre pruebas duplicadas) y referencias, en su caso, de instituciones, oficiales y privadas, que hayan aprobado el equipo analizador.

Séptimo.—Las leches se distribuirán, conforme a su calidad higiénica, en las clases siguientes:

- Clase <sup>a</sup>: Hasta 200.000 bacterias por mililitros.
- Clase <sup>b</sup>: De 200.001 a 700.000 bacterias por mililitros.
- Clase <sup>c</sup>: De 700.001 a 2.000.000 de bacterias por mililitros.
- Clase <sup>d</sup>: Más de 2.000.000 de bacterias por mililitros.

Octavo.—Los laboratorios interprofesionales serán los encargados de efectuar las tomas de muestras y los análisis químicos y microbiológicos y, donde no funcionen aquéllos, los laboratorios de las industrias lácteas.

Noveno.—Todos los laboratorios, excepto los interprofesionales, estarán obligados a elaborar un registro de los análisis realizados, a los fines del pago por calidad, que estará en todo momento a disposición de los servicios competentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y de las Comunidades Autónomas, a cuyos servicios oficiales podrán recurrir los ganaderos en los casos de disconformidad.

Décimo.—Los ganaderos podrán designar técnico o técnicos a su servicio, quienes deberán comprobar y dar su conformidad por escrito, a las tomas de muestras y resultados de los análisis que se realicen en los laboratorios de las industrias lácteas.

Undécimo.-Las primas tendrán carácter general para toda España y se aplicarán exclusivamente a la leche, como producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostro, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido, de las vacas sanas y bien alimentadas, que cumplan los requisitos siguientes:

Grasa, mínimo, 3,2 por 100 (mm).  
 Proteínas, mínimo, 3 por 100 (mm).  
 Extracto seco magro, mínimo, 8,2 por 100 (mm).  
 Acidez, máximo, 18° D.

Duodécimo.-Se deberán investigar por los laboratorios la posible adición de agua a la leche que entreguen los ganaderos, y será obligatoria tal investigación en todas las muestras, que tengan menos del 2,5 por 100 de proteínas.

El registro de los análisis que motiven tal investigación estará a disposición de los servicios competentes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Comunidades Autónomas.

Decimotercero.-Las primas y descuentos, en función de la composición y calidad higiénica de las leches entregadas por los ganaderos, se ajustará a la sistemática siguiente:

a) Por el contenido en grasa:

Primas: 0,50 pesetas/litro por cada décima de grasa que sobrepase el porcentaje mínimo señalado del 3,2 por 100.

Descuentos: 0,50 pesetas/litro por cada décima de grasa que descienda del porcentaje mínimo señalado del 3,2 por 100.

b) Por el contenido en proteínas:

Primas: 0,25 pesetas/litro por cada décima de proteínas que exceda del 3 por 100.

Descuentos: 0,25 pesetas/litro por cada décima de proteínas que descienda del porcentaje mínimo señalado del 3 por 100.

c) Por la calidad higiénica:

Las primas por calidad higiénica son independientes de las que voluntariamente tienen establecidas las industrias o los ganaderos, por aplicación del frío en producción, y tales primas y descuentos serán aplicables sólo a las leches refrigeradas, en la forma siguiente:

Primeras: 2 pesetas/litro en las leches de la clase 1.<sup>a</sup> y 1 peseta/litro en las leches de clase 2.<sup>a</sup>

Descuentos: 0,25 pesetas/litro por cada millón de bacterias que pase de 2.000.000 de bacterias por ml. La población de bacterias se redondeará a un número entero de millones, por exceso, cuando se trate de una fracción superior a medio millón, y por defecto, en caso contrario.

Decimocuarto.-A la entrada en vigor de esta disposición, quedarán derogadas las Ordenes del Ministerio de Agricultura de 14 de agosto de 1967, 22 de marzo de 1971 y 20 de septiembre de 1981.

Decimoquinto.-La presente Orden entrará en vigor el día 1 de septiembre de 1985, y

Decimosexto.-Se faculta a la dirección General de Política Alimentaria para que dicte las normas que desarrollen el contenido de esta disposición.

Lo que participo a VV. II, para su conocimiento y efectos.  
 Madrid, 27 de junio de 1985.

ROMERO HERRERA

Ilmos. Sres. Presidente del FORPPA y Director general de Política Alimentaria.

## ANEJO I

Métodos de rutina para el muestreo de leche para el pago en función de la calidad

### ANEXO A DE LA NORMA ESPAÑOLA UNE 34-828-83

#### A.1 AMBITO DE APLICACION

El presente anexo trata del muestreo de la leche cruda para el pago a los productores en función de su calidad: Calidad higiénica (por ejemplo, análisis sensorial, calidad microbiológica, recuento de células somáticas, sedimento) y composición (por ejemplo, materia grasa, proteínas, adición de agua).

#### A.2 GENERALIDADES

El muestreo debe efectuarse por un operario cualificado, que haya recibido un mínimo de formación antes de proceder al muestreo de partidas de leche. En caso de utilización de material de muestreo automático o semiautomático, este material deberá

sufrir, antes de ser utilizado en la práctica y a intervalos regulares, un periodo de ensayos adecuado, de acuerdo con las autoridades responsables.

Cuando se toman simultáneamente varias muestras para diferentes análisis, la destinada a análisis microbiológico se tomará en primer lugar. El código de identificación de los recipientes para muestras, el volumen y el tipo de recipientes, así como las condiciones de conservación y de almacenamiento de las muestras deberán estar conformes con las prescripciones reglamentarias o con las especificaciones impuestas por el laboratorio de análisis.

#### A.3 MATERIAL DE MUESTREO

*Características.*-La totalidad del material de muestreo será de acero inoxidable o de cualquier material apropiado, suficientemente sólido y resistente, y que no aporten a la muestra modificación susceptible de afectar posteriormente a los resultados del análisis. El material será suficientemente robusto para prevenir cualquier deformación con el uso. Será, sin embargo, suficientemente ligero para que el operario pueda desplazarlo con rapidez a través del producto. Las soldaduras que eventualmente entren en la fabricación del material deberán poder soportar una esterilización a 180° C. Todas las superficies estarán lisas y exentas de hendiduras y los ángulos estarán pulidos.

El material de muestreo estará de acuerdo con las prescripciones previstas para cada tipo de producto a muestrear.

*Muestras destinados a análisis microbiológico.*-El material de muestreo deberá estar perfectamente limpio y esterilizado. Si es posible, la esterilización deberá efectuarse según uno de los métodos siguientes:

a) Permanencia de dos horas en aire caliente a 160° C como mínimo.

b) Permanencia de quince a veinte minutos en vapor de agua a 120° C (autoclave). El material deberá estar seco antes de su empleo.

Después de la esterilización por cualquiera de los dos métodos, el material podrá utilizarse con posterioridad, si se conserva en condiciones estériles.

Cuando en una situación particular la esterilización por los métodos a) o b) resulte imposible, se podrá recurrir a otros métodos, que se citan a continuación, considerados como métodos secundarios, a condición de utilizar el material de muestreo inmediatamente después de la esterilización.

c) Permanencia de una hora en vapor saturado de 100° C. La condensación del vapor deberá estar a una temperatura de 98° C como mínimo.

d) Inmersión durante un minuto al menos en agua hirviendo.

e) Inmersión en alcohol etílico del 70 por 100 (v/v) y flameado para eliminar el alcohol por combustión.

f) Exposición a una llama apropiada, cuidando que todas las superficies útiles del material estén en contacto con la llama.

*Muestreo destinado a análisis químico y/o físico.*-Es deseable disponer de material estéril; en cualquier caso, el material estará limpio y seco y no podrá influir en las propiedades ni en la composición del producto.

*Muestreo destinado a análisis sensorial.*-Es deseable disponer de material estéril; en cualquier caso, el material estará limpio y seco y no podrá influir en el olor ni en el sabor del producto.

#### A.3.1 AGITADORES.

Los agitadores para la mezcla de líquidos a granel deben tener una superficie suficiente para remover debidamente el producto sin que aparezca un olor rancio. Dadas las diversas formas y dimensiones de los recipientes, no es posible recomendar un tipo particular de agitador utilizable en todas las circunstancias, pero deberá estar diseñado de manera que no arañe el interior de los recipientes durante la agitación.

Se puede recomendar un tipo de agitador que se adapte a la mezcla de líquidos en cubos o bidones, que tenga aproximadamente las dimensiones siguientes (ver figura 1): Un disco de 150 milímetros de diámetro, perforado por seis orificios de 12,5 milímetros de diámetro, dispuestos sobre una circunferencia de 100 milímetros de diámetro, y en su centro se fija una varilla metálica, en cuyo extremo opuesto posee una empuñadura. La longitud de la varilla, incluida la empuñadura, es de aproximadamente un metro.

Un agitador conveniente para los camiones-cisterna, vagones-cisterna y cisternas instaladas en granja, tendrá el aspecto y las dimensiones aproximadas que se indican a continuación (ver figura 2): Una varilla de dos metros, como mínimo, provista de un disco de 300 milímetros de diámetro, perforado por 12 agujeros de 30 milímetros de diámetro, dispuestos sobre una circunferencia de 230 milímetros de diámetro.

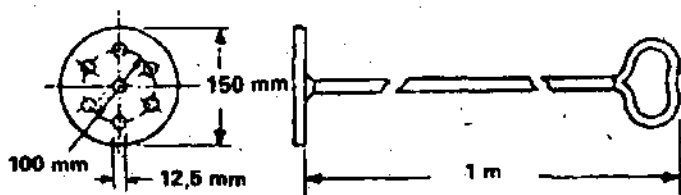


Fig. 1. Agitador recomendado para los bidones y cubos

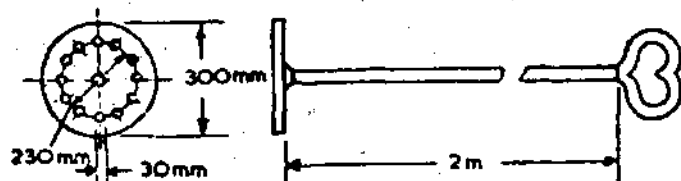


Fig. 2. Agitador para camiones-cisterna, vagones-cisterna y cisternas instaladas en granja

Para mezclar el contenido de grandes recipientes se recurrirá a una agitación mecánica mediante aire comprimido limpio. Se utilizará una presión atmosférica y un volumen de aire mínimos para evitar el desarrollo de olor rancio.

Nota: Cuando en la presente guía se prevea la utilización de aire comprimido limpio, se tratará obligatoriamente de aire comprimido en los que todos los contaminantes (comprendido el aceite, agua y polvo) han sido eliminados. No deberá excluirse la posibilidad de una contaminación microbiológica.

A.3.2 MEZCLADORES POR INMERSIÓN O EXTRACTORES.

**Cacillos**-En la figura 3 se reproduce un cacillo de forma y dimensiones convenientes para la toma de muestras. Está provisto de mango resistente de una longitud de 150 milímetros como mínimo. La capacidad del cacillo no podrá ser inferior a 50

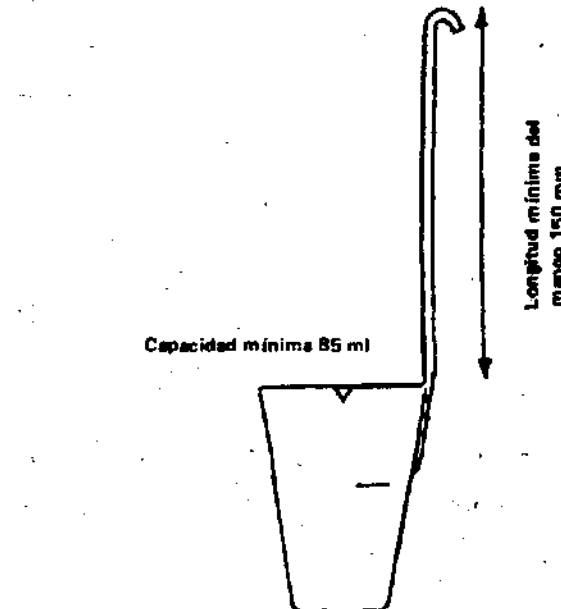


Fig. 3. Mezclador por inmersión para líquidos

mililitros. El mango curvado facilitará su utilización. La forma cónica de los cacillos permite encajarlos unos dentro de otros.

Para el muestreo proporcional de muestras contenidas en más de un recipiente se puede utilizar un cacillo de la misma capacidad, pero cuyas paredes sean paralelas y estén divididas en cinco partes iguales.

**Cilindros de extracción de muestras**-El extractor de muestras (figura 4) se compone de dos tubos concéntricos perfectamente ajustados, de los que uno gira dentro del otro y se acciona mediante un mando alojado en la cabeza del cilindro, que tiene un giro de

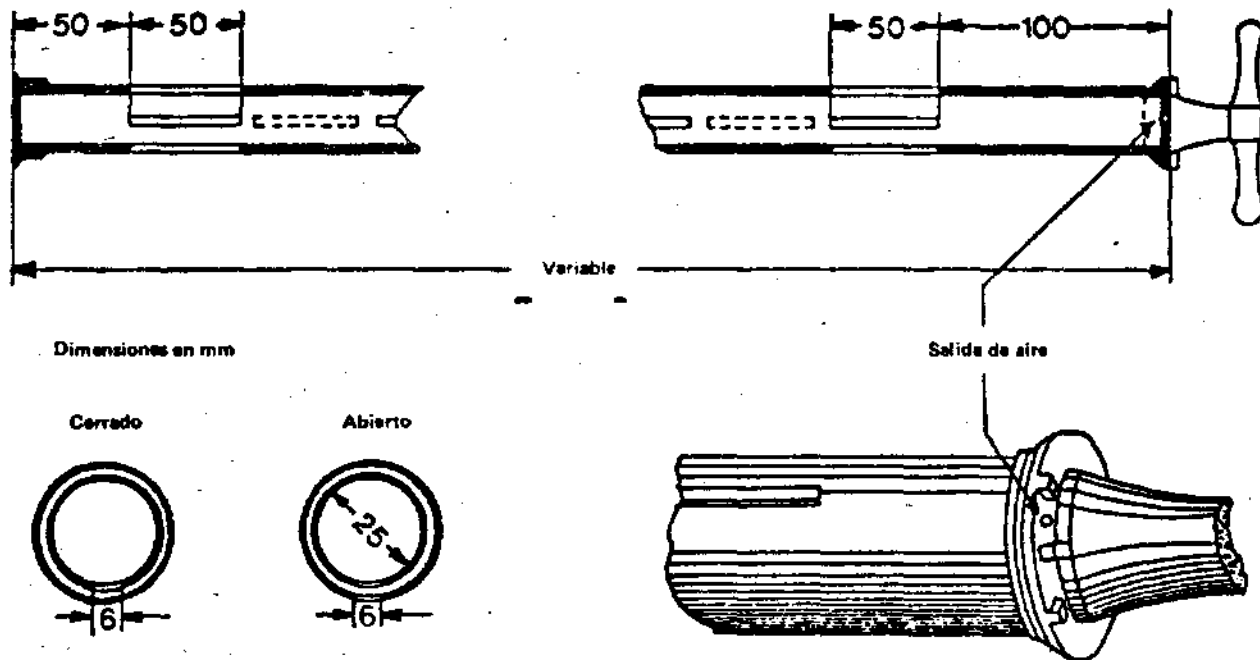


Fig. 4. Cilindro para extracción de muestras

90°. A lo largo de los dos tubos concéntricos, colocados en oposición, se practican aberturas de 50 milímetros de largo y 6 milímetros de ancho, separadas por un espacio de 20 milímetros.

Cuando el tubo interior se gira hacia una de las extremidades, las aberturas de los dos tubos coinciden, colocándose en posición abierta, permitiendo al líquido entrar en el cilindro. Cuando la cabeza se gira hacia el lado opuesto, las aberturas dejan de coincidir y el cilindro queda cerrado. Las extremidades, superior e inferior, del cilindro están provistas de cápsulas roscadas para facilitar la limpieza. La longitud del aparato varía con la profundidad de los recipientes en los que se utilizará el cilindro, pero generalmente es suficiente con una longitud de un metro.

A.4 RECIPIENTES DE MUESTRAS

**Características**-Los recipientes para muestras, así como los dispositivos de cierre, deben estar fabricados con materiales adecuados y concebidos para proteger la muestra sin causar modificación de ésta, que sea susceptible de influir en los resultados de los análisis o exámenes posteriores. Los materiales apropiados son el vidrio, ciertos metales y algunas materias plásticas. Es preferible que el recipiente elegido sea opaco. Si es transparente, el recipiente y su contenido serán conservados al abrigo de la luz.

Los recipientes y dispositivos de cierre estarán limpios y secos, serán estériles y susceptibles de ser esterilizados, según uno de los

métodos descritos en el apartado A.3. La forma y la capacidad del recipiente deberán responder a las prescripciones previstas para el producto a muestrear.

Podrán utilizarse recipientes no reutilizables, en materia plástica, así como hojas de aluminio (estériles o no) y sacos o bolsas adecuados de materia plástica, provistos de sistema apropiado de cierre.

Los recipientes distintos de los sacos o bolsas de materia plástica se cerrarán herméticamente mediante un tapón apropiado, una cápsula roscada, metálica o de plástico, provista interiormente, si es necesario, de una junta de estanquidad de plástico insoluble, no absorbente, impermeable a las grasas y que no altere el olor, sabor, las propiedades o la composición de la muestra. Los tapones estarán fabricados o recubiertos de una materia inodora y no absorbente. Los recipientes para productos sólidos, pastosos o viscosos serán de boca ancha.

Los pequeños recipientes para la venta al detall se utilizarán igualmente como recipientes de muestreo; la muestra constituirá el contenido de uno o varios de estos recipientes intactos y no abiertos.

Deberán responder a las especificaciones impuestas por el laboratorio de análisis. Los recipientes para muestras tendrán una capacidad suficiente para que la muestra los llene prácticamente y permitan una buena mezcla del contenido antes del análisis, evitando el batido durante el transporte.

## A.5 TÉCNICA DE MUESTREO

### A.5.1 GENERALIDADES.

Cualquiera que sea el análisis efectuado (principalmente en lo concerniente a análisis microbiológico, determinación de materia grasa y extracto seco y recuento de células somáticas), la leche se mezclará cuidadosamente, antes del muestreo, manual o mecánicamente, con el fin de garantizar una muestra representativa del conjunto del lote. El grado de agitación estará en función:

- Del volumen de la leche.
- De la forma y dimensiones del recipiente.
- De la temperatura de la leche.
- Del tiempo durante el que se ha dejado reposar la leche.
- Del método del muestreo (manual, automático o semiautomático).

La mezcla de la leche cruda en un recipiente se considera como eficaz si la diferencia de los contenidos de materia grasa entre dos muestras elementales tomadas en lugares diferentes del recipiente o a la salida, a diferentes intervalos durante el vaciado, es inferior a 0,1 por 100.

La muestra se tomará inmediatamente después de la mezcla, mientras que la leche esté todavía en movimiento y el volumen de la muestra estará conforme con las instrucciones prescritas por el laboratorio de análisis.

### A.5.2 MUESTREO PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

La dimensión de la muestra estará conforme a las instrucciones del laboratorio de análisis.

A.5.2.1 Las muestras destinadas al análisis microbiológico se tomarán en primer lugar.

A.5.2.2 El material de muestreo y los recipientes para muestras se esterilizarán según los métodos descritos en el apartado A.3. Igualmente, se podrá recurrir a los métodos de esterilización siguientes:

- Inmersión en una solución recientemente preparada de hipoclorito sódico (200 mg de cloro activo/litro) o de yodóforo (40 ó 50 mg de yodo activo/litro), durante cinco minutos como mínimo, a la temperatura ambiente, seguido de un escurrido o de un lavado con agua de origen apropiado y eliminación del agua superficial, por ejemplo, sacudiendo. Después de la inmersión en la solución de hipoclorito y escurrido el material, podrá lavarse cuidadosamente en la leche sometida a muestreo.
- Inmersión, durante treinta segundos como mínimo, en agua, a una temperatura de al menos 85° C, y eliminación del agua superficial, por ejemplo, sacudiendo.

Igualmente se puede autorizar, principalmente en el caso de equipos automáticos o semiautomáticos, el simple lavado del material con agua corriente entre dos muestreos sucesivos o el lavado del material con la leche sometida al muestreo.

A.5.2.3 Proceder como describe el apartado A.5.3 referente a las reglas de asepsia.

A.5.3 MUESTREO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA (DISTINTA DE LA MICROBIOLÓGICA) Y DE LA COMPOSICIÓN.

La dimensión de la muestra estará de acuerdo con las instrucciones del laboratorio de análisis.

### A.5.3.1 Muestreo manual.

A.5.3.1.1 Cántara.—Introducir cuidadosamente un agitador en la leche evitando que se derrame fuera del recipiente, dejarlo caer hasta el fondo del recipiente y rápidamente hacerlo volver a la superficie para crear un movimiento de rotación del líquido de abajo a arriba. Este movimiento ascendente y descendente debe ser suficiente para garantizar que la leche está convenientemente mezclada y que la nata no está adherida en el cuello de la cántara.

A.5.3.1.2 Recipiente de medida.—Es indispensable mezclar cuidadosamente la leche en el recipiente si se quiere obtener una muestra representativa. Una mezcla se produce cuando se vierte la leche en el recipiente de medida; la importancia de esta mezcla estará en función de la concepción del recipiente y de la técnica del vertido de la leche. Es indispensable completar esta acción por una agitación manual o mecánica suficiente para asegurar un reparto uniforme de la materia grasa. La experiencia determinará la importancia de esta agitación suplementaria. Las muestras se tomarán, normalmente, en el recipiente de medida. Cuando el volumen de la partida a muestrear sobrepasa la capacidad del recipiente de medida, se tomará una muestra representativa del conjunto de la partida procediendo según el método descrito en el apartado A.5.3.1.4.

A.5.3.1.3. Cisternas para la leche refrigeradas.—La leche se agitará mecánicamente hasta que se obtenga una homogeneidad suficiente (durante cinco minutos como mínimo). Si la cisterna está provista de un sistema programado de agitación periódica, el muestreo no exige más que una corta agitación (uno a dos minutos).

Si el volumen de la leche representa menos del 15 por 100 de la capacidad de la cisterna, el agitado se efectuará a mano.

A.5.3.1.4 Leche a granel repartida en varios lotes.—Cuando la leche a examinar se encuentra en más de un recipiente, se tomará una cantidad representativa de cada recipiente, después de haber mezclado su contenido, y se anotará la cantidad de leche a la que corresponde cada muestra.

Salvo que las muestras de cada recipiente se sometan a ensayos separadamente, se mezclarán fracciones de estas cantidades representativas proporcionalmente a la cantidad contenida en el recipiente del que se ha tomado cada muestra. Se tomarán, una o más, muestras de estas cantidades proporcionales después de la mezcla.

A.5.3.2 Muestreo automático o semiautomático.—Cuando la recogida de leche se efectúa mediante camión cisterna, se utilizan frecuentemente muestreadores automáticos o semiautomáticos.

Debe asegurarse, por un laboratorio competente, que estas muestras son convenientes mediante un método apropiado que pueda determinar:

- El volumen mínimo de leche recogida que pueda ser válidamente muestreado.
- La ausencia de todo efecto de arrastre (que está ligado al volumen mínimo recogido).
- La capacidad del muestreador de suministrar una muestra representativa de la masa del producto, después de una agitación adecuada.
- Además, como este tipo de material está frecuentemente considerado como apropiado, aun cuando la leche no está bien mezclada, esta afirmación debe comprobarse por el laboratorio de ensayos.

## A.6 CONSERVACION, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Las condiciones de conservación, de almacenamiento y transporte de las muestras de leche serán establecidas por el laboratorio de análisis, en función del método de análisis a aplicar.

### A.6.1 CONSERVACIÓN.

El empleo de conservadores respetará la reglamentación en vigor de cada país.

### A.6.2 ALMACENAMIENTO.

A.6.2.1 Muestras simples.—Salvo instrucciones contrarias (por ejemplo, para el ensayo de reductasa), se almacenarán las muestras con o sin conservadores inmediatamente después del muestreo, para asegurar un enfriamiento rápido. Normalmente, no se deben añadir conservadores a las muestras destinadas para análisis microbiológico o sensorial. A ciertos productos lácteos puede añadirse un conservador apropiado a condición de que:

- El laboratorio de ensayos haya dado instrucciones en este sentido.
- El conservador no influya en los resultados del análisis.
- La naturaleza y la cantidad del producto añadido se indiquen en la etiqueta y en el informe o acta.

La tabla I indica si se pueden añadir conservadores y proporción a las temperaturas de almacenamiento recomendadas, antes del transporte, para las muestras de diversos productos lácteos. La temperatura de almacenamiento debe alcanzarse lo más rápidamente posible después del muestreo.

El tiempo de almacenamiento que precede al transporte será lo más breve posible. Preferentemente, las muestras se enviarán al laboratorio de análisis, dentro de las veinticuatro horas siguientes al muestreo.

Podrán utilizarse temperaturas de almacenamiento distintas de las recomendadas en la tabla I, cuando el laboratorio de análisis así lo solicite.

Nota: El tiempo y la temperatura no deben ser considerados aisladamente, sino globalmente.

**A.6.2.2 Muestras compuestas.**—En algunos casos, la composición de la leche de los suministradores se determina sobre la base de muestra compuesta tomada en un período de diez a quince días, algunas veces hasta un mes, y preparada añadiendo cada día (más o menos frecuentemente) cierta cantidad de muestras de leche fresca, proporcionalmente a la masa o al volumen de las partidas de leche. Tal método puede ser una fuente de dificultades en razón del dilatado período de almacenamiento, así como el calentamiento y mezcla periódica de la muestra en el momento en que se añade una nueva muestra de leche a la muestra compuesta. Sin embargo, si se recurre a las muestras compuestas, se las almacena a 4° C (preferentemente de 0 a 2° C), después de la adición de un conservador adecuado, en un recipiente herméticamente cerrado. Cuando se añade una nueva muestra de leche, se mezclará convenientemente la muestra compuesta y se enfriará inmediatamente después. Se aconseja, insistentemente, que el laboratorio de análisis compruebe regularmente, recurriendo a un método adecuado, que la muestra compuesta no ha sido origen de batido ni de exudación de la materia grasa de la leche, con el fin de descubrir la lipólisis o una proteólisis susceptible de afectar los resultados del análisis.

#### A.6.3 TRANSPORTE.

Las muestras deben expedirse al laboratorio de análisis lo más rápidamente posible después del muestreo (preferentemente dentro de las veinticuatro horas). Durante el transporte se tomarán precauciones para que no estén expuestas a olores contaminantes, luz solar directa o a temperaturas inferiores o superiores a las que figuran en la tabla I, o a las solicitadas, llegado el caso, por el laboratorio de análisis.

TABLA I

Conservación de las muestras, temperatura de almacenamiento y cantidad mínima de muestras

Capítulo	Producto	Conservadores autorizados para las muestras destinadas a análisis químicos y físicos	Temperatura de almacenamiento antes del transporte	Cantidad mínima
4	Leche y productos lácteos líquidos no esterilizados	Sí	De 0 a 4°C	200 ml o g

## ANEJO 2

Método de rutina para la determinación del contenido en proteínas en leche por el método de negro amido

### NORMA ESPAÑOLA UNE 34-835/1985

#### 1. OBJETO Y ÁMBITO DE APLICACION

La presente norma especifica un método de rutina que utiliza el negro amido para la determinación del contenido en proteínas de la leche.

Como la composición del colorante negro amido puede variar, el método descrito es empírico y depende de una referencia constante al contenido en proteínas, deducido de la determinación del contenido en nitrógeno de la leche por un método de referencia (UNE 34-823). El método es aplicable a la leche cruda o a la tratada (pasteurizada, homogeneizada, esterilizada, reconstituida), entera, desnatada, parcialmente desnatada, siempre que las muestras estén en perfecto estado de conservación. También es aplicable, bajo

ciertas condiciones, a las muestras que lleven incorporadas conservadores (ver 10.1).

Pueden realizarse determinaciones en serie. En este caso, siempre se debe tener cuidado con ciertos factores especiales que se describen en el anexo B.

Nota: Según el origen de la muestra y el método de referencia utilizado, el método al negro amido descrito en la presente norma puede utilizarse no solamente para la determinación habitual del contenido en proteínas de la leche ( $N_{total} \times 6,38$ ), sino también para la determinación del contenido en «proteínas verdaderas», e, incluso, en una versión modificada, para la determinación de las proteínas de la caseína o del suero, tanto en leche de vaca como en leche de otras especies animales (cabra, oveja, etcétera).

## 2. REFERENCIAS

UNE 34-823. «Leche. Determinación del contenido en nitrógeno total por el método Kjeldhal».

UNE 34-828. «Leche y productos lácteos. Guía de las técnicas de muestreo».

## 3. DEFINICION

**Contenido en proteínas:** Valor convencional obtenido multiplicando por un factor apropiado el contenido en nitrógeno total, expresado en porcentaje de masa y determinado según el método de referencia (UNE 34-823).

Nota: En ausencia de un acuerdo internacional sobre la definición de términos, «contenido en proteínas» y «contenido en proteínas verdaderas», utilizados en la presente norma, se corresponde con las expresiones «porcentaje de sustancias nitrogenadas totales» ( $N_{total} \times 6,38$ ) y «porcentaje y proteínas» ( $N_{total} - N_{NNP} \times 6,38$ , siendo NNP la sustancia nitrogenada no proteica).

## 4. PRINCIPIO

Formación de un complejo insoluble colorante —proteínas por adición en exceso de una solución de negro amido, tamponado a pH 2,4 a una toma para ensayo de leche. Después de la eliminación del complejo insoluble por centrifugación (o por filtración), se determina el contenido en proteínas midiendo la absorción de la solución.

## 5. REACTIVOS

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica (salvo si se indica lo contrario). El agua será destilada o de pureza equivalente.

Nota: Los iones calcio producen interferencias.

**5.1 COLORANTE NEGRO AMIDO 10 B (NEGRO ÁCIDO I, CI 20.470) PARA ANÁLISIS DE LECHE. CONTENIDO EN AGUA INFERIOR A 5 POR 100 (M/M).**

Nota: Este colorante es higroscópico y debe protegerse contra una recuperación eventual de la humedad.

### 5.2 SOLUCIÓN DE NEGRO AMIDO.

En un matraz aforado de 1.000 mililitros (6.10), añadir unos 600 mililitros de agua, 0,900 gramos como mínimo de negro amido 10 B (5.1) (ver anexo A1), 2,08 gramos de hidrogenofosfato disódico dihidratado ( $Na_2 H PO_4 \cdot 2 H_2 O$ ) y 15,8 gramos de ácido cítrico  $C_6 H_8 O_7 H_2 O$ .

Mezclar cuidadosamente agitando durante dos horas hasta una disolución completa. Mediante el pH-metro (6.9) controlar el pH que debe situarse en los límites de  $2,40 \pm 0,10$ , ajustándolo, si es necesario, por adición de ácido sulfúrico o de hidróxido sódico. Completar a 1.000 mililitros y agitar durante quince minutos. Antes de su utilización, dejar reposar la solución durante una noche.

Si la solución no se va a utilizar en varios días, conservarla añadiendo 0,1 mililitro de una solución de timol al 5 por 100 en alcohol etílico del 94-97 por 100 (v/v).

### 5.3 SOLUCIONES DE REFERENCIA DE NEGRO AMIDO.

Preparar como se indica a continuación diluciones (m/m) a partir de la solución 5.2.

**5.3.1** Añadir a 10 partes de la solución 5.2, 90 partes de agua.

Esta solución se utiliza en lugar de agua, para regular el colorímetro (6.6) al cero de la escala, de esta manera puede utilizarse la parte de la escala logarítmica donde las divisiones son más amplias.

- 5.3.2 Añadir a 50 partes de la solución 5.2, 50 partes de agua.  
5.3.3 Añadir a 20 partes de la solución 5.2, 80 partes de agua.

Nota: Las soluciones 5.3.2 y 5.3.3 corresponden a contenidos en proteínas bajos y altos y proporcionarán los valores correspondientes a los instrumentos.

#### 5.4 SOLUCIONES TAMPÓN NORMALES PARA PH-METRO.

### 6. INSTRUMENTAL

Todos los instrumentos destinados a estar en contacto con los reactivos o con la solución colorante, deben estar construidos con materiales no atacables en las condiciones del análisis y que no absorban colorante en cantidad tal que se afecten los resultados.

- 6.1 *Tubos de ensayo o de centrifuga* con tapones de goma.  
6.2 *Gradilla o soporte* para los tubos 6.1.  
6.3 *Pipeta o jeringa* que permita medir un volumen de  $1 \pm 0,003$  mililitros de leche (ver nota en 6.4).  
6.4 *Pipeta o jeringa* que permita medir un volumen de  $20 \pm 0,02$  mililitros de la solución de negro amido.

Nota: Pueden utilizarse pipetas y jeringas (6.3 y 6.4) de capacidad diferente, siempre que la relación entre el volumen de leche (ver 8.2.1) y el de la solución de negro amido (ver 8.2.2) sea de 1:20 y la concentración de negro amido en el líquido sobrenadante (ver 8.2.4) sea superior a 0,1 gramos/litro.

#### 6.5 *Agitador mecánico o mezclador rotativo o mezclador de aire comprimido.*

Nota: Este aparato es facultativo.

#### 6.6 *Colorímetro o espectrofotómetro*, con una cubeta (preferentemente de flujo continuo) de 1,0 milímetros de recorrido óptico y que permita trabajar en longitudes de onda de 550 a 620 nanómetros.

Nota: No es necesario operar a la longitud de onda que corresponda exactamente a la sensibilidad máxima, la experiencia ha demostrado que las desviaciones pueden compensarse por calibración (ver 8.3 y anexo A2).

#### 6.7 *Centrifuga* con porta-tubos oscilantes. Debe poder alcanzar, en dos minutos una aceleración de $350 \pm g$ en la extremidad inferior del tubo de ensayo. Tal aceleración es producida por las centrifugas cuyo radio útil (distancia horizontal entre el centro del eje de la centrifuga y la extremidad inferior del tubo de ensayo) figura en la tabla siguiente y que funcionan a la velocidad indicada.

Radio útil mm	r/min.
240	1.405
245	1.130
250	1.120
255	1.110
260	1.100
265	1.090
270	1.080
275	1.070
300	1.020
325	980

Nota: La aceleración centrifuga relativa puede calcularse mediante la fórmula:

$$1,12 R N^2 \times 10^{-6}$$

en la que

- R = radio horizontal útil, en milímetros.  
N = velocidad en revoluciones por minuto.

- 6.8 *Balanza de precisión*, de 0,1 miligramo de sensibilidad.  
6.9 *pH-metro*, con electrodo de vidrio y electrodo de referencia y que permita lecturas con precisión de 0,01 unidades de pH.  
6.10 *Matraces aforados*, de 1.000 mililitros de capacidad.

### 7. MUESTREO

Se realizará de acuerdo con lo establecido en la norma UNE 34-828.

### 8. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Llevar la muestra a una temperatura de 20 a 30° C, en el baño María, si es necesario. Mezclar la leche cuidadosamente, invirtiendo 3 ó 4 veces el matraz de muestreo y evitando la formación de espuma y el batido de la grasa. Si resulta difícil dispersar una capa de nata o si la leche aparece ligeramente batida, calentar lentamente en el baño María hasta una temperatura de 35 a 40° C y mezclar suavemente, si es necesario utilizar un homogeneizador apropiado para dispersar mejor la grasa. Una vez obtenida una dispersión uniforme de la grasa, llevarla rápidamente a 20° C. Después de haber alcanzado la temperatura definitiva de la leche, dejarla reposar para que se liberen las burbujas de aire.

#### 8.2 DETERMINACIÓN.

8.2.1 Mediante una pipeta o jeringa (6.3), introducir 1 mililitro de la muestra preparada (8.1) en un tubo de ensayo o de centrifuga (6.1).

8.2.2 Añadir, con una pipeta o jeringa (6.4), 20 mililitros de la solución de negro amido (5.2), a la muestra que se encuentra en el tubo de ensayo o de centrifuga (6.1). Tapar el tubo, si es necesario, y mezclar el contenido durante treinta segundos agitando, a mano o mediante un dispositivo mecánico (6.5), con una amplitud de unos 25 centímetros. Se puede utilizar aire comprimido para obtener un efecto semejante en el tubo de ensayo o de centrifuga.

8.2.3 Destapar el tubo, colocarlo en la centrifuga (6.7) y centrifugarlo durante dos minutos, como mínimo, una vez se haya alcanzado en el fondo del tubo una aceleración de  $350 \pm 50 g$ .

8.2.4 Introducir el líquido sobrenadante de los tubos de la cubeta del colorímetro y efectuar la lectura de absorción, después de haber regulado el colorímetro o el espectrofotómetro (6.6) al cero de la escala, utilizando la solución de referencia al negro amido (5.3.1) a la longitud de onda escogida (ver 6.6).

#### 8.3 CURVA DE CALIBRADO.

Tomar, como mínimo, 40 muestras de diferentes leches, que procedan, si es posible, de distintas vacas, que presenten un contenido en proteínas de 2,5 a 4,5 (m/m) o más (ver nota) y determinar el contenido en proteínas de cada una de ellas aplicando el método de referencia (UNE 34-823). Paralelamente, utilizando el método de negro amido descrito en la presente norma, anotar la lectura de la escala de colorímetro (6.6) obtenida para cada muestra, con el líquido sobrenadante procedente del análisis.

Mediante una gráfica que represente las lecturas de la escala en función de los contenidos en proteínas obtenidos por el método de referencia, anotar los puntos en que se interrumpe la relación lineal y eliminar los resultados que se sitúen más allá de estos puntos para el cálculo de la recta de regresión (ver 10.2).

Calcular la recta de regresión para las lecturas de la escala en función de los contenidos en proteínas (obtenidos por el método de referencia), y trazar la curva de calibrado.

Nota: Las leches reconstituidas que hayan sufrido un tratamiento térmico (pasterizadas o esterilizadas), pueden necesitar curvas de calibrado diferentes.

#### 8.4 SOLUCIONES DE REFERENCIA.

Mientras que se obtiene la curva de calibrado, efectuar las lecturas para las dos soluciones de colorante preparados, tal como se ha indicado en 5.3.2 y 5.3.3 (ver anexo A1).

### 9. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

El contenido en proteínas se calcula a partir de la lectura de la escala, utilizando la curva de calibrado (ver 8.3) y el resultado se expresa en gramos de proteínas por 100 gramos de muestra.

### 10. REPETIBILIDAD

La diferencia entre los resultados obtenidos de dos determinaciones efectuadas simultánea o inmediatamente una después de la otra por el mismo analista, no debe ser superior a 0,03 gramos de proteínas por 100 gramos de muestra.

### 11. CASOS PARTICULARES

#### 11.1 MUESTRAS CON ADICIÓN DE CONSERVADORES.

El método puede aplicarse sin modificación a las muestras de cloruro de mercurio (II) a razón de 0,07 a 0,1 por 100 (m/m), cuando lo permitan los reglamentos antipolución, o con azida de sodio de 0,02 a 0,3 por 100 (m/m). Para las muestras con 0,1 por 100 (m/m) de dicromato potásico, el método puede utilizarse solamente cuando el tiempo transcurrido entre la adición de la solución de negro amido a la leche y la lectura en el colorímetro,

es muy corto, como es el caso por el método de filtración (ver anexo B); el método por centrifugación no es aconsejable. Tampoco es aconsejable el método para las muestras adicionadas de formol.

#### 11.2 DESVIACIÓN DE LA LINEALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRADO.

Las leches cuyos contenidos en proteínas no están de acuerdo con la linealidad de la curva de calibrado (8.3) deben tratarse como se indica a continuación:

Preparar una nueva curva de calibrado pipeteando una cantidad de leche inferior en 0,1 mililitro a la utilizada normalmente (ver 8.3). Igualmente, efectuar una toma de ensayo inferior en 0,1 mililitro a las tomadas normalmente, cuando se trata de aplicar a la muestra a analizar, el método al negro amido.

### 12. INFORME DEL ANALISIS

El informe del análisis debe indicar el método utilizado y los resultados obtenidos.

Debe mencionar:

- El factor utilizado para calcular el contenido en proteínas, a partir del contenido en nitrógeno determinado mediante el método de referencia (UNE 34-823).
- Cualquier detalle susceptible de indicar si la precisión del resultado es dudosa.
- Todos los datos necesarios para la identificación completa de la muestra.

### 13. CORRESPONDENCIA

La presente norma se corresponde con la norma internacional FIL 98:1980 (provisional).

## ANEXO A

### CONTROL DE CALIBRADO

#### A.1 Solución al negro amido.

Como la concentración de negro amido puede variar de una partida a otra, es necesario adaptar esta concentración (5.2), para cada nueva partida (ver nota), con el fin de poder obtener, con las soluciones preparadas en 5.3.2 y 5.3.3, lecturas de la escala idénticas a las obtenidas durante el calibrado (ver 8.4). Conviene proceder a una última comprobación y ajuste mediante una muestra de control representativa de una cantidad importante de leche, cuyo contenido en proteínas se ha determinado según el método de referencia (UNE 34-823).

Nota: Conviene efectuar cualquier dilución mediante la solución tamponada especificada en 5.2.

#### A.2 Muestras de leche de control.

El calibrado puede verse afectado por los cambios estacionales de la composición de las diferentes fracciones nitrogenadas de la leche, por lo que conviene comprobar regularmente su validez. Esto se realiza mediante, al menos, una muestra representativa de una cantidad importante de leche (procedente de un gran número de vacas), de un contenido medio en proteínas o preferiblemente mediante dos de estas muestras, una con un bajo contenido en proteínas y la otra con un contenido elevado. El contenido en proteínas de estas muestras se habrá determinado según el método de referencia (UNE 34-823) a partir del contenido en nitrógeno total.

## ANEXO B

### DETERMINACIONES EN SERIE

#### B.1 Instrumental.

Cualquier aparato de pipeteado múltiple que se utilice para este fin, responderá a las mismas condiciones que las descritas en la presente norma para el método de pipeta única.

#### B.2 Filtración.

En lugar de centrifugación puede utilizarse la filtración a través de un filtro de fibra de vidrio, preferentemente siliconado, ayudándose con una ligera presión. Es necesario comprobar que la cantidad de colorante absorbida por el filtro es mínima y constante en toda su superficie. Para una presión determinada, la porosidad del filtro debe permitir un filtrado correcto del precipitado formado por el complejo colorante-proteínas.

#### B.3 Muestras de leche de control.

Se tomará un número suficiente de muestras de control de las procedentes de la leche mencionada en el anexo A.2. Se les añadirá un conservador (ver 11.1) de forma que se puedan utilizar durante cierto número de días sin que el valor de referencia del contenido en proteínas se modifique por deterioro. Las muestras de control deben analizarse dos veces, antes de analizar las de rutina. Deben incluirse, normalmente, en cada serie a razón de 1 por 10, o interponerlas a intervalos regulares durante los análisis en serie. Igualmente es necesario comprobar las lecturas de la escala del colorímetro mediante las soluciones de referencia del colorante para las que estas lecturas se determinaron durante el calibrado (ver 8.4 y anexo A.2).

## ANEJO 3

### Recuento de microorganismos (técnicas por recuento de colonias a 30° C en leche líquida)

#### NORMA ESPAÑOLA UNE 34-805/1983

### 1. OBJETO Y AMBITO DE APLICACION

La presente norma describe un método de recuento de microorganismos en la leche líquida por la técnica de recuento de colonias a 30 °C.

El método es aplicable a la leche cruda y a la tratada por el calor.

### 2. REFERENCIAS

UNE 34-828. Leche y productos lácteos. Guía de las técnicas de muestreo.

### 3. DEFINICION

Para las necesidades de la presente norma, se entiende por microorganismos aquellos organismos que forman colonias cuando se les incuba a 30° C en las condiciones operatorias descritas a continuación.

### 4. PRINCIPIO

Siembra, en placas Petri, de un medio de cultivo con una toma para ensayo determinada o con series de diluciones decimales e incubación de las placas a 30° C durante setenta y dos horas. Recuento de colonias y cálculo del número de microorganismos por milímetro de muestra.

### 5. REACTIVOS

- Hidróxido sódico, solución 1 M aproximadamente.
- Acido clorhídrico, solución 1 M aproximadamente.

### 6. INSTRUMENTAL

Material corriente de laboratorio de microbiología y

- Autoclave, que permita operar a  $121 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- Horno de aire caliente, que permita operar hasta  $170^\circ \text{C}$ .
- Estufa, que permita mantener una temperatura uniforme de  $30 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- pH-metro, con compensación de temperatura y precisión de 0,1 unidad pH.
- Balanza de precisión, sensibilidad 0,01 gramo.
- Baño de agua, que permita operar a  $45 \pm 1^\circ \text{C}$ .
- Lupa de 2-4 x aumentos.
- Lupa de 8-10 x aumentos.
- Matraces para dilución, de 150-250 mililitros de capacidad, o probetas de unos 20 mililitros de capacidad, provistas de cápsulas o de tapones de caucho o de material sintético adecuado. Una varilla de vidrio o de acero hundida en el tapón del matraz facilita su retirada.

Nota: El material de vidrio debe ser esterilizable.

6.10. Matraces de 150-250 mililitros de capacidad, o probetas de unos 20 mililitros de capacidad, destinados a contener el medio de cultivo.

6.11. Pipetas graduadas, con la extremidad no desportillada, calibradas para liberar  $1,00 \pm 0,02$  mililitros,  $10,0 \pm 0,2$  mililitros y  $11,0 \pm 0,2$  mililitros.

6.12. Placas Petri, de vidrio no coloreado; la placa inferior tendrá un diámetro interior aproximado de 90 milímetros. La profundidad interior debe ser como mínimo de 10 milímetros. El fondo no debe presentar ninguna irregularidad que interfiera durante el recuento de las colonias.

Nota: Pueden utilizarse pipetas y placas Petri de material sintético, esterilizadas en lugar de las de vidrio.

6.13. Embudos de filtración, para la preparación de los medios.

6.14. Papel de filtro rápido, que se adapte a los embudos.

6.15. Algodón no absorbente, o celulosa o torundas de algodón o celulosa listas para su empleo, para los matraces y tubos. El material no debe ser tóxico después de la esterilización.

## 7. MUESTREO

Se realizará de acuerdo con lo establecido en la norma UNE 34-828.

## 8. MEDIO DE CULTIVO

### 8.1. Composición.

Extracto de levadura, 2,5 gramos.

Triptona, 5,0 gramos.

Glucosa, 1,0 gramo.

Leche en polvo desnatada, 1,0 gramo.

Agar-agar, 10 a 15 gramos, según las propiedades gelificantes del agar-agar utilizado.

Agua, 1.000 mililitros.

El pH, después de la esterilización, debe ser de  $6,9 \pm 0,1$  a  $30^\circ\text{C}$ .

Nota: En todos los casos, es necesario añadir la leche en polvo desnatada tanto si el medio de cultivo está comprado ya listo para su empleo y aun cuando el proveedor considere que tal adición es inútil.

### 8.2. Características de los componentes del medio de cultivo.

8.2.1. El extracto de levadura, triptona, glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y agar-agar deben ser de calidad adecuada para bacteriología.

8.2.2. La leche en polvo desnatada debe estar exenta de sustancias inhibitoras. Este punto se confirmará mediante pruebas comparativas utilizando una leche en polvo desnatada reconocida exenta de sustancias inhibitoras.

8.2.3. El agua será destilada en un aparato enteramente de vidrio o de sílice pura. Puede utilizarse agua desionizada (desmineralizada por intercambio iónico) si está exenta de sustancias tóxicas.

### 8.3. Preparación.

8.3.1. Preparación a partir de medios deshidratados del comercio. Seguir las prescripciones del fabricante pero añadiendo leche en polvo desnatada (véase nota 8.1). Si es necesario, ajustar el pH a 7,0-7,1 utilizando la solución del hidróxido sódico (5.1) o la solución de ácido clorhídrico (5.2) para obtener un pH requerido después de la esterilización.

8.3.2. Preparación a partir de ingredientes separados. Disolver y dispersar en agua en el siguiente orden: Extracto de levadura, triptona, glucosa y, por último, la leche en polvo desnatada. El calentamiento del agua facilita esta operación. Añadir agar-agar y llevar a ebullición agitando frecuentemente, hasta que el agar-agar esté completamente fundido o calentado al vapor durante treinta minutos.

Filtrar sobre papel de filtro, si es necesario. Ajustar el pH a 7,0-7,1 utilizando la solución de hidróxido sódico (5.1) o la solución de ácido clorhídrico (5.2) para obtener el pH requerido después de la esterilización.

8.3.3. Distribución del medio. Repartir el medio preparado según 8.3.1. ó 8.3.2 en los matraces (6.10) en cantidades de 100 a 150 mililitros o en las probetas (6.10) en cantidades de 10 a 12 mililitros. Esterilización en autoclave (6.1) durante quince minutos a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Comprobar el pH del medio, que debe ser de  $6,9 \pm 0,1$  a  $30^\circ\text{C}$ .

Conservar el medio en la oscuridad, a una temperatura que no sobrepase los  $5^\circ\text{C}$ .

El medio debe utilizarse antes de los tres meses de su preparación.

## 9. DILUYENTE O SOLUCIÓN DE RINGER

### 9.1. Composición (solución de Ringer no diluida).

Todos los productos deben ser de calidad analítica adecuada para bacteriología.

Cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ ), 9,00 gramos.

Cloruro potásico ( $\text{KCl}$ ), 0,42 gramos.

Cloruro cálcico, anhídrido ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,24 gramos.

Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), 0,20 gramos.

Agua (pureza, véase 8.2.3), 1.000 mililitros.

Nota: El diluyente puede prepararse también a partir de pastillas disponibles en el comercio.

### 9.2. Preparación.

9.2.1. Preparar la solución no diluida de Ringer disolviendo las sales (9.1) en agua y, antes de su empleo, diluir una parte de esta solución con tres partes de agua para obtener una solución de Ringer diluida al cuarto.

9.2.2. Repartir en los matraces para dilución o en los tubos de ensayo (6.9) la solución de Ringer diluida al cuarto (9.2.1), de tal manera que después de la esterilización cada matraz contenga  $90 \pm 2$  mililitros o  $99 \pm 2$  mililitros y  $9 \pm 0,2$  mililitros cada tubo.

9.3. Esterilizar en autoclave (6.1) durante quince minutos a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Nota: Algunas veces se recomienda sustituir la solución de Ringer diluida al cuarto por una solución de peptona al 0,1 por 100, pero los datos disponibles actualmente son insuficientes para justificar tal cambio.

## 10. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

### 10.1. Preparación del material de vidrio.

Esterilizar las pipetas (6.11) y las placas Petri (6.12) en el horno de aire caliente (6.2) a  $170^\circ\text{C}$  durante una hora como mínimo; si no se dispone de horno de aire caliente, esterilizar en el autoclave durante veinte minutos a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los recipientes que se utilicen para la esterilización del material en el autoclave no deben cerrarse herméticamente. El material de vidrio esterilizado en autoclave debe secarse por evaporación.

### 10.2. Fusión del medio.

Antes de proceder al examen bacteriológico, fundir rápidamente la cantidad requerida del medio en un baño de agua hirviendo o bajo una corriente de vapor en un recipiente parcialmente cerrado. Enfriar el medio fundido en el baño de agua (6.6) regulado a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Nota: Para controlar la temperatura del agar-agar, situar un termómetro en una solución de agar-agar al 1,5 por 100 introducido en un recipiente idéntico al utilizado para el medio. Esta solución de control de la temperatura debe calentarse y enfriarse en la misma forma que el medio.

### 10.3. Preparación de la muestra.

Con el fin de asegurar un reparto uniforme de los microorganismos, mezclar cuidadosamente la muestra, volteando rápidamente 25 veces el recipiente que la contiene. En la práctica agitar las 25 veces en siete segundos con una amplitud de 30 centímetros. Igualmente es posible agitar la muestra mecánicamente, si se obtiene el mismo resultado. El tiempo transcurrido desde la mezcla hasta la toma para ensayo no debe ser superior a tres minutos.

Si es necesario, antes de abrir un recipiente con muestra, limpiar exteriormente junto a la zona donde va a tomarse para eliminar todo lo que pueda contaminar la muestra. Esta zona puede limpiarse con alcohol etílico al 70 por 100 para prevenir así toda contaminación ulterior. En otros casos, utilizar el procedimiento más adecuado.

### 10.4. Preparación de las diluciones.

Preparar las diluciones y sembrar (véase 10.5) para obtener placas que contengan entre 10 y 300 colonias.

Nota: Las indicaciones siguientes están basadas sobre 10 mililitros de muestra en 10 mililitros de diluyente (dilución 1/10). Pueden utilizarse otras series de diluciones como 1 mililitro de muestra en 9 mililitros de diluyente (dilución 1/10) u 11 mililitros de muestra en 99 mililitros de diluyente (dilución 1/10).

La fidelidad y precisión del método son mejores cuando se utilizan cantidades de muestra más importantes.

10.4.1. Tomar 10 mililitros de muestra con una pipeta estéril y añadir 90 mililitros de diluyente (9.3). Agitar la muestra diluida. Se obtiene de esta manera la dilución 1/10.

10.4.2. Con otra pipeta estéril tomar 10 mililitros de la dilución 1/10 (10.4.1) añadir 90 mililitros de diluyente (9.3) y agitar. Así se obtiene la dilución 1/100.

10.4.3. Preparar otras diluciones de la misma manera utilizando una pipeta estéril para cada dilución.

Nota: No introducir la pipeta más de 1 centímetro por debajo de la superficie del líquido. Evitar introducir burbujas de aire en la pipeta. Durante las transferencias no introducir la pipeta en el nuevo diluyente.

### 10.5. Siembra de las placas Petri.

Preparar dos placas para cada dilución escogida (10.4). Transferir con una pipeta estéril, 1 mililitro de la muestra y/o de las diluciones apropiadas en cada placa.



Poner en contacto la extremidad de la pipeta con una superficie seca en la placa Petri. Utilizar una pipeta estéril para cada dilución transferida a las placas.

10.6. Distribución del agar-agar en las placas Petri.

10.6.1. Verter en cada placa sembrada de 10 a 12 mililitros del medio fundido a la temperatura de  $45 \pm 1^\circ \text{C}$  (10.2).

10.6.2. Mezclar inmediatamente, por rotación de la placa Petri, con el fin de obtener colonias regularmente dispersadas después de la incubación.

10.6.3. Dejar reposar las placas, en una superficie horizontal y limpia, hasta la solidificación del medio, invertirlas de posición y situarlas en la estufa (6.3) regulada a  $30^\circ \text{C}$ .

Nota: El tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y la distribución del medio en las placas Petri no debe exceder de quince minutos. Las operaciones descritas en los apartados 10.3 a 10.6 no deben efectuarse a la luz solar directa.

10.7. Incubación de las placas Petri.

Las placas Petri en posición invertida se ponen a incubar, apilando, 6 o más. Las pilas de placas no deben tocarse, ni estar en contacto con las paredes o la parte superior de la estufa. Incubar a  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  durante  $72 \pm 2$  horas.

10.8. Recuento de colonias.

10.8.1. Contar las colonias en las placas Petri. Examinar las placas bajo luz atenuada. Para facilitar el recuento, se puede utilizar una lupa (6.7) y/o un contador-registrador. Evitar confundir las partículas, de la muestra, no disueltas o las sustancias precipitadas, con las colonias del tamaño de una punta de alfiler. En caso de duda examinarlas con atención utilizando, si es necesario, una lupa más potente (6.8).

10.8.2. Las colonias invasoras se consideran como colonias únicas. Si menos de un cuarto de la placa está recubierto por las colonias invasoras, contar las existentes en la parte no afectada de la placa y calcular el número correspondiente para la placa entera. Si más de un cuarto de la placa estuviera cubierto de colonias, eliminarla.

11. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

11.1. Cálculo y fórmula.

En principio, utilizar los resultados de las placas que contengan entre 10 y 300 colonias.

11.2. Calcular el número de microorganismos por milímetro mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\sum n}{f_a \times 1 + f_b \times 0,1} \times d$$

en la que:

$\sum n$  = la suma de todas las colonias obtenidas a partir de las placas utilizadas como se ha indicado más arriba (11.1).

$f_a$  = al número de placas utilizadas para la primera dilución a las que se ha aplicado 11.1.

$f_b$  = al número de placas utilizadas para la segunda dilución a las que se ha aplicado 11.1.

$d$  = al inverso del factor de dilución por el que se han obtenido los primeros recuentos; esta dilución está en relación con  $f_a$ .

11.3. Expresar los resultados con dos cifras significativas solamente. Para un número de tres cifras, redondear al cero más próximo. Si la tercera cifra es 5, redondear a la decena inferior si las dos primeras cifras forman un número par, y a la decena superior si las dos primeras cifras forman un número impar. Por ejemplo:

234	.....	230
235	.....	240
225	.....	220
245	.....	240

11.4. Si solamente hay recuentos inferiores a 10, indicar que el número de microorganismos por milímetro es inferior a  $10 \times d$ ; siendo «d» el inverso del más bajo factor de dilución.

11.5. Si hay solamente recuentos superiores a 300, calcular un recuento estimado a partir de las placas que tengan un número de colonias próximo a 300 y multiplicarlo por el inverso del factor de dilución. Registrar este resultado como «número estimado de microorganismos por mililitro».

11.6. El resultado puede expresarse en un número comprendido entre 1,0 y 9,9 multiplicado por  $10^x$ ; siendo «x» la potencia de 10 apropiada.

12. REPETIBILIDAD

La experiencia enseña que si el resultado más alto de dos ensayos independientes sobre la misma muestra sobrepasa frecuentemente el resultado más bajo en un 30 por 100, el analista debe examinar su procedimiento operatorio para determinar sus fuentes de error.

13. INFORME DEL ANALISIS

El informe del análisis debe indicar el método utilizado, el resultado obtenido y su forma de expresión. Debe mencionar todos los detalles operatorios no previstos en la presente norma o los facultativos, así como los incidentes eventuales susceptibles de influir sobre los resultados.

El informe debe proporcionar todos los datos necesarios para la completa identificación de la muestra.

14. CORRESPONDENCIA

La presente norma se corresponde con la norma internacional FIL 100:1981 (provisional).

ANEJO 4

Relación de equipos analizadores automáticos

1. PARA DETERMINACION DE MATERIA GRASA

Milko - Tester Menor; Milko - Tester MK II y Milko - Tester MK III.

2. PARA DETERMINACION DE PROTEINAS

Pro - Milk MK II.

3. PARA DETERMINACION DE MATERIA GRASA, PROTEINAS Y OTROS COMPONENTES

Infra Alyzer 400D; Milko - Scan Serie 100; Milko - Scan Serie 303; Milko - Scan Serie 605; Multispec y Neotec 7000.

4. PARA RECuentos MICROBIANOS

AMS 40 - 10; Bactometer M-123; Bactometric; Bactoscan; Lumac Bio-Counter; Malthus Systems y Petri - Foss.

**13428** ORDEN de 1 de julio de 1985, por la que se dictan normas de acreditación de Laboratorios Privados para la realización de pruebas analíticas con validez oficial a efectos de sanciones y arbitrajes.

Ilustrísimo señor:

El Real Decreto 1945/1983, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria, establece en su artículo 16 que las pruebas periciales analíticas se realizarán en Laboratorios oficiales o privados acreditados por la Administración para estos fines.

Para el ejercicio de las funciones, facultades y competencias que corresponden a este Departamento, en orden a la defensa de la calidad y represión de fraudes en medios de producción y productos agrarios y alimentarios y para facilitar a los administrados la aportación de pruebas analíticas realizadas en otros Laboratorios distintos de los oficiales - pertenecientes a las Administraciones Públicas-, en los expedientes sancionadores tramitados por presuntas infracciones, en materia de defensa de la calidad de la producción agroalimentaria, procede desarrollar el citado Real Decreto 1945/1983, regulando los requisitos que tales Laboratorios deben reunir y las condiciones de los análisis en ellos realizados para tales fines.

En consecuencia y en virtud de las facultades concedidas por la disposición final 1.ª del Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio, dispongo:

1.º La acreditación de centros o establecimientos privados para la realización de determinaciones analíticas, con validez oficial en expedientes sancionadores tramitados por este Departamento por presuntas infracciones en materia de defensa de la calidad de la producción agroalimentaria, corresponderá a la Dirección General de Política Alimentaria.

2.º La petición de acreditación del centro interesado deberá ir acompañada de:

Especificación de los productos que desea analizar y de los controles de calidad para los que desea ser autorizado.