

---

NORMA CHILENA OFICIAL

*NCh* 2313/22.Of95

---

INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION • INN-CHILE

---

**Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 22:  
Determinación de coliformes fecales en medio EC**

*Waste water - Test methods - Part 22: Determination of faecal coliform organisms in EC medium*

Primera edición : 1995

Reimpresión : 1999

*Descriptor:* calidad del agua, aguas residuales, análisis químico, determinación de contenido, análisis microbiológico, coliformes fecales, bacterias coliformes

---

CIN 13.060.40;07.100.20

COPYRIGHT © 1995 : INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION - INN

\* Prohibida reproducción y venta \*

Dirección : Matías Cousiño N° 64, 6° Piso, Santiago, Chile

Casilla : 995 Santiago 1 - Chile

Teléfonos : + (56 2) 441 0330 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : + (56 2) 441 0425

Telefax : + (56 2) 441 0427 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : + (56 2) 441 0429

Internet : inn@entelchile.net

Miembro de : ISO (International Organization for Standardization) • COPANT (Comisión Panamericana de Normas Técnicas)



## **Agua s residuales - Métodos de análisis - Parte 22: Determinación de coliformes fecales en medio EC**

### **Preámbulo**

El Instituto Nacional de Normalización, INN, es el organismo que tiene a su cargo el estudio y preparación de las normas técnicas a nivel nacional. Es miembro de la INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) y de la COMISION PANAMERICANA DE NORMAS TECNICAS (COPANT), representando a Chile ante esos organismos.

La norma NCh2313/22 ha sido preparada por la División de Normas del Instituto Nacional de Normalización, y en su estudio participaron los organismos y las personas naturales siguientes:

Aguas Industriales Ltda.  
Alex Stewart Intercorp Chile y Cia. Ltda.  
AQUA Ltda.  
Bayer de Chile S.A.  
Centro de Estudios, Medición y Certificación  
de Calidad, CESMEC Ltda.

Centro de Investigación Minero Metalúrgica, CIMM  
Centro de Investigación y Planificación sobre el  
Medio Ambiente, CIPMA  
Cervecera Santiago Ltda.  
CIREN CORFO  
CODELCO - Chile  
Comisión Nacional del Medio Ambiente, CONAMA  
Compañía Minera Disputada Las Condes S.A.

Alejandra Sandoval  
Manuel Montero N.  
Raúl Thiers  
Ricardo Fehlandt G.

Vicenta Lozano R.  
Sandra Muñoz  
Ximena Parra S.  
Olga Ureta B.  
Ruby Utrera C.

Iván Santandreu  
David Carre T.  
José Luis Gómez A.  
Alberto Tello  
Patricia Matus C.  
Fernando Valenzuela D.

NCh2313/22

Compañía Minera El Indio  
Compañía Tecno Industrial S.A.  
Cooperativa Agrícola Lechera Santiago Ltda.  
Departamento de Investigaciones Científicas y  
Tecnológicas, Universidad Católica de Chile, DICTUC  
Dirección General de Aguas, DGA  
Dirección General Territorio Marítimo y Marina  
Mercante, DIRECTEMAR  
EC-LAB  
Embotelladora Andina S.A.  
Empresa de Agua Potable Lo Castillo S.A.,  
EAPLOC  
Empresa de Servicios Sanitarios de Coquimbo,  
ESSCO S.A.  
Empresa de Servicios Sanitarios del Bío-Bío,  
ESSBIO S.A.  
  
Empresa de Servicios Sanitarios El Libertador S.A.,  
ESSEL S.A.  
Empresa Metropolitana de Obras Sanitarias, EMOS S.A.

Empresa Pesquera EPERVA S.A.  
Empresa Servicios Sanitarios de Antofagasta S.A.  
Empresa Servicios Sanitarios de Atacama S.A.  
Empresa Servicios Sanitarios de La Araucanía,  
ESSAR S.A.  
Empresa Servicios Sanitarios de Valparaíso,  
ESVAL S.A.

Empresas CMPC S.A.  
Fundación Chile  
Hidrolab Ltda.  
IANSÁ S.A.  
Industrias Ambrosoli S.A.  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA

Instituto de Investigaciones y Control, IDIC  
Instituto de Investigaciones Pesqueras  
Instituto de Salud Pública de Chile, ISP  
Instituto Nacional de Normalización, INN  
Laboratorios Carlos Latorre  
OXIQUIM S.A.  
Pesquera El Golfo S.A.  
PETROX S.A.

Eugenio Benítez G.  
Pablo Zamorano G.  
Marco Antonio Leiva A.

Arturo Givovich H.  
Alberto Merino G.

CrnI. L.T. Carlos Bastías A.  
Manuel Ruiz M.  
Patricio Delpiano P.

Elizabeth Echeverría

Beatriz Honorato G.

Aquiles Altamirano H.  
Pedro Cisternas O.

Eduardo Alarcón M.  
Mireya Alvarado S.  
Fernando Garcés A.  
Mercedes Rojas S.  
Fernando Sandoval S.  
Isabel Villar A.  
José R. Cañón C.  
Jorge Ponce de León F.  
Claudia Sara Almendares A.

Zita Ruiz I.

Manuel Alvarez C.  
Myriam Rodríguez M.  
Pedro Muga F.  
Laura Avila M.  
Ximena Cuadros M.  
Ricardo Cereceda O.  
Luis Borie Melgar  
Elena Bustamante A.  
Regina Ite D.  
José Matamala G.  
Alfredo Calvo C.  
Luis Furet C.  
Nelly Elgueta M.  
Leonor Ceruti M.  
Ricardo Latorre  
Jorge Orlando Rivas Q.  
Nicos Nicolaidés B.  
Sergio Arévalo E.

Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de Protección de los Recursos Naturales, SAG – DEPROREN	Sergio Rojas P.
Servicio Nacional de Geología y Minería, SERNAGEOMIN SGS Chile Ltda. SGS Eco-Care Ltda. SHELL Chile S.A. SILOB Chile Laboratorios	Luis Hinojosa A. Jessica Burckhardt V. Víctor Arenas C. Jorge Naranjo S. Anita Bontá Z. Silvia Díaz A. Jaime Lobos C. Alberto III Pong L. Aníbal Mege T. Ricardo Cristi L. Christian Maurer G. Ximena Lecaros G. José N. Arenas Eugenio Doussoulin E. Enrique Kaliski K. Ada González S.
Sociedad de Fomento Fabril, SOFOFA Superintendencia de Servicios Sanitarios, SISS	
TECNOLAB Universidad Austral de Chile, UACH Universidad de Tarapacá, Instituto Agronomía Universidad Nacional Andrés Bello, Fac. Ingeniería González S. Ada	

Esta norma se estudió para establecer el método oficial de análisis para la determinación de coliformes fecales en aguas residuales, usando medio EC.

El anexo A forma parte del cuerpo de la norma.

El anexo B no forma parte del cuerpo de la norma, se inserta sólo a título informativo.

Esta norma ha sido aprobada por el Consejo del Instituto Nacional de Normalización, en sesión efectuada el 28 de Julio de 1995.

Esta norma ha sido declarada norma chilena Oficial de la República por Decreto N° 545, de fecha 28 de Septiembre de 1995, del Ministerio de Obras Públicas, publicado en el Diario Oficial N° 35.315, del 13 de Noviembre de 1995.



## **Aguas residuales - Métodos de análisis - Parte 22: Determinación de coliformes fecales en medio EC**

### **1 Alcance**

1.1 Esta norma establece el método de análisis para la determinación de coliformes fecales en medio EC en aguas residuales.

### **2 Referencias**

NCh410            Calidad del agua - Vocabulario.

### **3 Principios**

El método se basa en aislar el grupo coliforme fecal, seleccionando los microorganismos por incubación del inóculo procedente de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas mayores a las normales ( $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ), utilizando la técnica de tubos múltiples.

### **4 Definiciones**

4.1 **aguas residuales:** aguas que se descargan después de haber sido usadas en un proceso, o producidas por éste, y que no tienen ningún valor inmediato para este proceso.

4.2 **técnica de tubos múltiples:** método cuantitativo para estimar la concentración de microorganismos presentes en la muestra, mediante la inoculación de una serie de tubos en concentraciones decimales decrecientes de la muestra, en un medio de cultivo adecuado, las cuales se incuban en condiciones de tiempo y temperatura determinados.

## 5 Reactivos

### 5.1 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad p.a.

**5.1.1 Agua destilada o desmineralizada**, libre de cloro, trazas de metales y compuestos tóxicos o nutrientes que puedan influir en el desarrollo o supervivencia de microorganismos.

#### 5.1.2 Tampón fosfato dilución

a) **Solución concentrada de fosfato diácido de potasio**

Fosfato diácido de potasio, $KH_2PO_4$	34 g
Hidróxido de sodio, $NaOH$ 1 N	
Agua destilada, c.s.p.	1 L

#### Preparación

Disolver el fosfato diácido de potasio en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N. Aforar a 1 L con agua destilada.

b) **Solución concentrada de cloruro de magnesio**. Disolver 81,1 g de cloruro de magnesio hexahidratado en 1 litro de agua destilada.

c) **Tampón fosfato para dilución (agua de dilución)**

Solución concentrada de fosfato diácido de potasio	1,25 ml.
Solución concentrada de cloruro de magnesio	5 ml
Agua destilada, c.s.p.	1 000 ml

#### Preparación

Disolver en botellas y tubos de dilución, las cantidades requeridas de tampón de dilución, de tal forma que después de la esterilización el volumen final tenga una tolerancia del 2%.

Las botellas y tubos de dilución deben ser esterilizados a 121°C por 15 min.

### 5.2 Medios de cultivo

Para asegurarse la uniformidad del medio de cultivo, se deben usar medios deshidratados comerciales.



### 5.2.1 Caldo lauril sulfato triptosa

Composición del medio basal.

	Concentración simple	Concentración doble
Triptosa	20,0 g	40,0 g
Lactosa	5,0 g	10,0 g
Fosfato dipotásico	2,75 g	5,5 g
Fosfato monopotásico	2,75 g	5,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g	10,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g	0,2 g

#### Preparación

Disolver la cantidad adecuada del medio, según sea concentración simple o doble, en un litro de agua destilada y distribuir en volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo, con tubos Durham invertidos en su interior.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH final del medio debe ser  $6,8 \pm 0,2$ .

### 5.2.2 Medio EC

Composición del medio basal

Triptosa o tripticasa	20,0	g
Lactosa	5,0	g
Mezcla de sales biliares o sales biliares N°3	1,5	g
Fosfato ácido de potasio, $K_2HPO_4$	4,0	g
Fosfato diácido de potasio, $KH_2PO_4$	1,5	g
Cloruro de sodio	5,0	g

#### Preparación

Disolver la cantidad adecuada del medio en un litro de agua destilada y distribuir en tubos de ensayo, con tubos Durham invertidos en su interior, en volúmenes suficientes para cubrir el tubo Durham.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. El pH debe ser  $6,9 \pm 0,2$  después de esterilización.

## 6 Aparatos

### 6.1 Incubadoras

Las incubadoras deben mantener una temperatura uniforme y constante de  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  todo el tiempo, en todos los puntos.

Las incubadoras deben estar provistas de bandejas espaciadas de modo de asegurar la uniformidad de la temperatura de la cámara.

Mantener dentro de la incubadora un termómetro de precisión, de sensibilidad mínima  $0,1^{\circ}\text{C}$ , trazable a uno del *National Institute of Standards and Technology*, inmerso en líquido (glicerina, agua o aceite mineral), y llevar un registro diario de la temperatura (mañana y tarde). Es deseable, adicionalmente, mantener un termómetro de registro de máxima - mínima en la bandeja central y registrar el rango de temperatura más alta en un período de 24 h.

Se recomienda controlar y registrar una vez al mes la temperatura de cada bandeja.

**6.2 Baño termostático**, provisto de una tapa de dos aguas para reducir la pérdida de agua por evaporación y capaz de mantener la temperatura a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  con circulación de agua.

La temperatura debe ser monitoreada usando un termómetro de precisión de sensibilidad mínima  $0,1^{\circ}\text{C}$ , contrastado con un termómetro certificado por el NIST.

El baño debe tener una profundidad que asegure que los tubos incubados queden inmersos sobre el nivel del medio.

**6.3 Horno de esterilización**, de tamaño suficiente para prevenir la sobrecarga en el interior; construido para proporcionar una temperatura uniforme de esterilización de  $170^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  y equipado con los termómetros adecuados. El uso de instrumentos de registros de temperatura es opcional, pero recomendable.

**6.4 Autoclave**, de tamaño suficiente, para evitar la sobrecarga interna, construido para proporcionar una temperatura uniforme dentro de la cámara hasta la temperatura de esterilización de  $121^{\circ}\text{C}$ ; equipado con un termómetro de precisión, cuyo bulbo debe estar ubicado en la línea de descarga del vapor, de tal forma de registrar la temperatura mínima dentro de la cámara de esterilización, (el uso de un instrumento de registro de temperatura es opcional), equipado con un manómetro y válvulas de seguridad apropiadamente ajustadas, conectadas directamente con la línea proveedora de vapor saturado o directamente al generador de vapor y capaz de alcanzar la temperatura deseada dentro de 30 min.

**6.5 Equipo electrométrico para medición de pH**, con precisión y reproducibilidad de 0,1 unidades de pH, equipado con electrodos adecuados.

**6.6 Balanza de precisión**, de sensibilidad mínima 1 mg.

**6.7 Utensilios para la preparación de medio**, de vidrio borosilicato u otro material no corrosivo, tal como acero inoxidable. El material de vidrio debe estar limpio y libre de residuos.

**6.8 Pipetas, de 10, 5 y 1 ml**, capaces de proporcionar el volumen requerido con seguridad y rapidez. El error de calibración dado por el fabricante no debe exceder el 2,5%.

### **6.9 Contenedores de pipetas**

Cajas de aluminio o acero inoxidable, de un ancho de 5 cm a 7,5 cm, cilíndricas o rectangulares y un largo aproximado de 40 cm o mangas de esterilización de plástico resistente al autoclavado.

No usar contenedores o cajas de cobre o aleaciones de cobre.

### **6.10 Tubos y botellas de dilución**

Botellas o tubos de vidrio, preferiblemente vidrio borosilicato, con tapas de vidrio esmerilado o tapas rosca cuyo delineado no produzca compuestos tóxicos o bacteriostáticos durante la esterilización. No usar tapones de algodón. Las marcas de los niveles de graduación deben ser indelebles en los lados de tubos y botellas. Las botellas plásticas o de otros materiales no tóxicos y de tamaño aceptable pueden sustituir al vidrio, siempre que puedan ser esterilizados adecuadamente.

**6.11 Tubos de fermentación**, de 18 mm x 150 mm, 20 mm x 150 mm o 15 mm x 125 mm.

Cuando los tubos son usados para ensayo de producción de gas, se debe incluir un tubo Durham invertido.

Los tubos deben ser de un tamaño tal, que el tubo Durham quede completamente lleno con el medio y al menos parcialmente sumergido en el tubo y lo suficientemente grandes para hacer que las burbujas de gas sean claramente visibles.

No usar tapones de algodón cuando los tubos de fermentación son empleados en el ensayo de coliformes fecales.

**6.12 Asas de inoculación calibradas**, de al menos 3 mm de diámetro, de aleaciones de níquel o iridio-platino, esterilizables por flameado, u otro tipo de asas desechables estériles.

## **7 Procedimiento**

### **7.1 Recolección y preservación de la muestra**

**7.1.1 Usar envases de material neutro e inocuo**, esterilizados. En caso de usar frascos, la tapa y el cuello deben cubrirse con papel antes de su esterilización.

## NCh2313/22

**7.1.2** Para muestras que contengan cloro, previo a la esterilización, agregar al envase 0,1 ml de solución de tiosulfato de sodio al 10% m/v por cada 100 ml de muestra.

**7.1.3** Para muestras que contengan metales pesados, previo a la esterilización, agregar 0,3 ml de solución al 15% m/v de EDTA ajustada a pH 6,5, por cada 120 ml de muestra.

## 7.2 Muestra

Antes de efectuar los cultivos, la botella con la muestra y las diluciones, deben ser agitadas vigorosamente preferentemente por agitación mecánica, con movimientos hacia arriba y hacia abajo.

## 7.3 Diluciones

**7.3.1 Dilución 1:10 ( $10^{-1}$ )** Tomar 1 ml de la muestra y depositarla en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de dilución estéril.

**7.3.2 Dilución 1:100 ( $10^{-2}$ )** De la dilución 1:10, tomar 1 ml y depositarlo en un tubo de ensayo, con 9 ml de agua de dilución estéril.

**7.3.3** Las siguientes diluciones se efectúan de igual forma, de acuerdo a la cantidad de microorganismos esperados.

## 7.4 Ensayo presuntivo: (caldo lauril triptosa).

### Inoculación

Las muestras se inoculan de acuerdo al siguiente procedimiento:

**7.4.1** Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración doble, con 10 ml de la muestra.

**7.4.2** Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 ml de la muestra.

**7.4.3** Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 ml de la dilución 1:10 ( $10^{-1}$ ) de la muestra.

**7.4.4** Inocular 5 tubos de fermentación con caldo lauril triptosa concentración simple, con 1 ml de la dilución 1:100 ( $10^{-2}$ ) de la muestra.

**7.4.5** Así sucesivamente se inocula de acuerdo con la cantidad de microorganismos esperados.

## 7.5 Incubación

Los tubos inoculados deben ser agitados suavemente para mezclar la muestra con el medio de cultivo.

**7.5.1** Incubar los tubos de fermentación a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 h a 48 h.

**7.5.2** Examinar los tubos a las 24 h  $\pm$  2 h. Registrar el número de tubos por dilución que presentan formación de gas y enturbiamiento como positivo. Incubar los tubos negativos hasta completar 48 h  $\pm$  3 h.

- a) La formación de gas se reconoce por la presencia de una burbuja de gas en el tubo de Durham. La burbuja de gas resultante de la fermentación, es reconocida porque el caldo está turbio y en activa fermentación, lo cual se manifiesta por la aparición de pequeñas burbujas a través del medio cuando es golpeado o agitado suavemente.
- b) Después de finalizado el período de incubación registrar los tubos que presenten alguna formación de gas como positivos.
- c) La ausencia de formación de gas al final de 48 h de incubación, constituye un ensayo negativo para los organismos del grupo coliforme.

## **7.6 Coliformes fecales, NMP**

### **7.6.1 Ensayo confirmativo, caldo EC**

Todos los tubos positivos, que mostraron alguna formación de gas y enturbiamiento en caldo lauril triptosa, a las 24 h y 48 h de incubación a 35°C  $\pm$  0,5°C, deben ser sometidos a ensayos confirmativos. Aquellos tubos que muestran activa fermentación a las 24 h de incubación deben ser sometidos sin demora al ensayo confirmativo.

### **7.6.2 Procedimiento**

- a) Homogeneizar los tubos positivos del ensayo presuntivo por agitación o rotación suave.
- b) Todos los tubos de caldo EC deben estar a temperatura ambiente antes de la inoculación.
- c) Transferir una asada completa del cultivo viable desde los tubos positivos del ensayo presuntivo, a un tubo de fermentación con caldo EC.
- d) Sumergir los tubos inoculados en el baño termostataado a 44,5°C  $\pm$  0,2°C, de tal forma que el nivel de agua del baño sea superior al nivel del medio en el tubo, e incubar antes de que transcurran 30 min desde la inoculación.
- e) Junto con la incubación de las muestras llevar un control positivo *E. coli* y un control negativo *Enterobacter aerogenes*.
- f) Registrar la presencia o ausencia de formación de gas y enturbiamiento en los tubos de caldo EC, después de 24 h  $\pm$  2 h de incubación a 44,5°C  $\pm$  0,2°C.
- g) La producción de gas dentro de 24 h  $\pm$  2 h, es considerada como un ensayo positivo de coliformes fecales.
- h) La ausencia de gas dentro de 24 h  $\pm$  2 h, es considerada como un ensayo negativo de coliformes fecales.

## 8 Expresión de resultados

8.1 El número más probable, NMP, se obtiene de la tabla N°1 que se incluye en Anexo A de esta norma. Las cantidades inoculadas están señaladas y sólo indican la dilución decimal, no necesariamente son indicativas de los volúmenes sembrados.

8.2 El número más probable para combinaciones que no aparecen en la tabla, o para otras combinaciones de tubos o diluciones, puede ser estimado por la siguiente fórmula:

$$NMP \times 100 \text{ ml} = \frac{\text{número tubos positivos} \times 100}{\sqrt{(\text{ml muestra tubos negativos}) \times (\text{ml muestra todos los tubos})}}$$

8.3 Cuando se emplean más de tres diluciones decimales, se debe usar el resultado de sólo tres de éstas para calcular el número más probable. Para seleccionar estas tres diluciones se debe elegir la dilución que dio resultados positivos en los cinco tubos y las siguientes dos diluciones más altas. Se deben usar los resultados de estos tres volúmenes para calcular el número más probable. (Ver ejemplo en anexo B de esta norma).

## 9 Informe

9.1 El informe del análisis debe contener la información siguiente:

- a) la identificación precisa de la muestra, incluyendo lugar, día, hora de muestreo y la fecha de análisis;
- b) los resultados obtenidos según se indica en cláusula 8 de esta norma;
- c) la referencia a esta norma;
- d) cualquier desviación del procedimiento especificado en esta norma o cualquier otra circunstancia que pueda afectar los resultados.

## 10 Bibliografía

- [1] Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18<sup>th</sup> Edition.

## Anexo A

Tabla 1 - Tabla para el cálculo del número más probable

Combinación de tubos positivos	NMP/ 100 ml	Límite de confianza 95%		Combinación de tubos positivos	NMP/ 100 ml	Límite de confianza 95%	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
0-0-0	< 2	-	-	4-2-0	22	9,0	56
0-0-1	2	1,0	10	4-2-1	26	12	65
0-1-0	2	1,0	10	4-3-0	27	12	67
0-2-0	4	1,0	13	4-3-1	33	15	77
				4-4-0	34	16	80
1-0-0	2	1,0	10	5-0-0	23	9,0	86
1-0-1	4	1,0	15	5-0-1	30	10	110
1-1-0	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-1	6	2,0	18	5-1-0	30	10	120
1-2-0	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
				5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
3-0-0	8	3,0	24	5-3-3	170	80	410
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
				5-5-5	≥ 1 600	-	-

**Anexo B**  
(Informativo)

**Ejemplo de cálculo del número más probable**

**B.1** En el siguiente ejemplo, el numerador representa los tubos positivos y el denominador el total de tubos sembrados.

Ejemplo	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml	Combinación de positivos	NMP/ 100 ml
(a)	5/5	5/5	2/5	0/5	5-2-0	5 000
(b)	5/5	4/5	2/5	0/5	5-4-2	2 200
(c)	0/5	1/5	0/5	0/5	0-1-0	20

**B.2** En el ejemplo (c), se elige las tres primeras diluciones de tal forma de incluir el resultado positivo en la dilución del medio.

**B.3** En otras oportunidades hay que corregir como se muestra en (d). Cuando aparecen resultados positivos en diluciones más altas que las tres elegidas, tal como en e).

Ejemplo	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0,001 ml	Combinación de positivos	NMP/ 100 ml
(d)	5/5	3/5	1/5	1/5	5-3-2	1 400
(e)	5/5	3/5	2/5	0/5	5-3-2	1 400