

— Proporcionar información suficiente sobre los aspectos determinantes de la concesión de la ayuda y de su cuantificación.
 — Declarar no haber percibido ni tener en tramitación otras ayudas a fondo perdido procedentes de la Administración Central del Estado o de sus Organismos Autónomos para la misma acción comunitaria. Declarar, en su caso, la cuantía y procedencia de otras posibles subvenciones institucionales disponibles o previstas.
 — En las acciones comunitarias realizadas por agrupaciones de carácter cooperativo formalmente constituidas o que se constituyan, compromiso de continuidad de la entidad al menos por un plazo de seis años.

Duodécimo.—1. Aprobada la concesión de la subvención y comunicada tal decisión a los interesados, se hará efectiva, con cargo a las correspondientes partidas presupuestarias del Servicio de Extensión Agraria que figuren en los Presupuestos Generales del Estado, una vez acreditada la realización de la acción comunitaria en los términos previstos, así como, en su caso, el cumplimiento de lo dispuesto en el apartado 1 de la disposición 7.ª de esta Orden.

2. El incumplimiento del compromiso de permanencia durante seis años de las agrupaciones de carácter cooperativo formalmente constituidas a que alude el apartado 2 de la disposición 11, traerá consigo la obligación de reintegrar al Tesoro Público las ayudas otorgadas, incrementando su importe en la cuantía que resulte de la aplicación del interés legal.

Decimotercero.—La Dirección General de Investigación y Capacitación Agrarias, a través del Servicio de Extensión Agraria, coordinará sus actuaciones con las Comunidades Autónomas de acuerdo con lo previsto en las disposiciones que regulan las transferencias de competencias y en las normas que regulan la coordinación de los traslados de servicios.

De manera señalada se encomienda a la mencionada Dirección General, en coordinación con los correspondientes servicios de las Comunidades Autónomas, la información sobre los planteamientos y contenidos básicos del programa, la asistencia técnica para la organización y promoción de las acciones derivadas del mismo y el seguimiento a nivel nacional de los resultados conseguidos.

Con el fin de potenciar o complementar la acción en este programa, la Dirección General de Investigación y Capacitación Agrarias podrá establecer conciertos de actuación con Organismos y Entidades que desarrollen funciones en materia de desarrollo comunitario, los cuales colaborarán en el fomento y utilización de los auxilios establecidos en la presente Orden, que serán gestionados por la mencionada Dirección General.

Decimocuarto.—Se faculta a la Dirección General de Investigación y Capacitación Agrarias para dictar las resoluciones necesarias para el cumplimiento y desarrollo de la presente Orden.

Decimoquinta.—La presente Orden entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el «Boletín Oficial del Estado».

Lo que comunico a V. I. para su conocimiento y efectos.
 Dios guarde a V. I. muchos años.
 Madrid, 3 de agosto de 1983.

HOMERO HERRERA

Ilmo. Sr. Director general de Investigación y Capacitación Agrarias.

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

21936 ORDEN de 27 de julio de 1983 por la que se establecen métodos oficiales de análisis microbiológicos de aguas potables de consumo público.

Ilustrísimos señores:

Siendo necesaria la determinación periódica de diversos parámetros en el control de la calidad de las aguas potables de consumo público, y dependiendo en muchos casos esta determinación de los métodos de análisis a emplear, parece aconsejable, de una parte, asegurar la defensa del consumidor y, de otra, la seguridad jurídica de los administrados que intervienen en el abastecimiento y control de estas aguas.

En consecuencia, de acuerdo con lo dispuesto en el artículo 32 del Real Decreto 1423/1982, de 18 de junio, Este Ministerio, previo informe del de Agricultura, Pesca y Alimentación, ha tenido a bien disponer:

Artículo único.—Se aprueban como oficiales los métodos de análisis microbiológicos, que se reseñan en el anexo de la

presente Orden, para el control de las aguas potables de consumo público.

Lo que comunico a VV. II.
 Dios guarde a VV. II.
 Madrid, 27 de julio de 1983.

LLUCH MARTIN

Ilmos. Sres. Subsecretario, Secretario general para el Consumo y Director general de Salud Pública:

ANEXO QUE SE CITA

1. TOMA DE MUESTRAS DE AGUAS PARA ANALISIS MICROBIOLÓGICO

1.1 Objeto.

Es obtener una muestra representativa del agua para poder determinar a partir de ella su calidad microbiológica de interés sanitario.

La toma de muestra debe respetar, por consiguiente, la composición microbiana del agua captada.

1.2 Ambito de aplicación.

Estas normas se aplicarán a todos los tipos de aguas, cualquiera que sea su procedencia, ya sean de grifos, pozos, depósitos, lagos, ríos, manantiales, bocas de riego, etc.

1.3 Tipos de muestras.

En el caso de análisis bacteriológicos de aguas, la muestra para analizar debe ser siempre simple, sin que se puedan obtener muestras compuestas ni integradas, de modo que la muestra para el laboratorio sea la obtenida en el punto de muestreo.

1.4 Material.

Exceptuando el material o aparatos específicos que puedan utilizarse para determinadas tomas especiales, los frascos más adecuados son los de vidrio neutro con tapón esmerilado e rosado, muy limpios y esterilizados en autoclave a 120° C durante treinta minutos o en horno de Pasteur a 180° C durante dos horas.

También pueden utilizarse frascos de material macromolecular con tapón rosado, esterilizados mediante óxido de etileno, radiaciones gamma u otros sistemas adecuados.

El tapón y el cuello del frasco se protegerán con una cubierta de papel, papel de aluminio u otro similar.

Los recipientes empleados han de tener una capacidad mínima de 250 ml, si bien es útil disponer de otros de mayor capacidad cuando la técnica analítica así lo exija.

1.5 Técnica de muestreo.

Las operaciones que comporta la toma de muestras varían según la naturaleza del agua a analizar y el punto de muestreo elegido.

1.5.1 Grifos.

Una vez retirados filtros u otros accesorios, se procederá a una cuidadosa limpieza con agua o alcohol.

Con el grifo cerrado se flameará el extremo del mismo, mediante la llama obtenida con un poco de algodón empapado de alcohol y sostenido con unas pinzas o bien una lámpara de soldar.

Se abrirá el grifo para que el agua fluya abundantemente y se renueve la contenida en la tubería que la alimenta. Se destapará el frasco esterilizado sin tocar la boca del mismo ni el interior del tapón.

Todos los movimientos deberán realizarse sin interrupciones, al abrigo de corrientes de aire y con las máximas precauciones de asepsia.

1.5.2 Pozos y depósitos.

Si se dispone de bomba de captación se opera como se ha indicado en el caso del grifo.

Si no existe sistema de bombeo, no es posible obtener una muestra representativa.

Con esta salvedad se introducirá en la masa de agua el frasco de muestreo o un cubo lo más limpio posible, sostenidos con una cuerda y tomando la muestra tras haber agitado la superficie del agua con el mismo recipiente.

También podrán utilizarse aparatos especiales lastrados que permiten introducir el frasco esterilizado y destaparlo a la profundidad deseada. En estos casos deberán utilizarse frascos con tapón a presión.

1.5.3 Lagos, ríos.

En ríos o cursos de agua será preciso considerar diversos factores, tales como: profundidad, caudal, distancia a la orilla, etc. La muestra se tomará lo más lejos posible de la orilla, procurando no remover el fondo y evitando los remansos o zonas de estancamiento.

Para tomar una muestra del agua de un lago o de un río se sujetará el frasco por el fondo en posición invertida, sumergiéndolo completamente y dándole la vuelta en sentido contrario a la corriente (río) o desplazándolo horizontalmente en la dirección de la boca del frasco (lago).

1.5.4 Manantiales.

En manantiales naturales o fuentes de caudal continuo, sin dispositivos de intermitencia, se tomará la muestra directamente sin adoptar medidas especiales de drenaje.

1.5.5 Bocas de riego.

Para el muestreo en bocas de riego se utilizarán acoplamientos especiales que permitan operar como en el caso de un grifo.

En todos los casos la muestra de agua no deberá llenar totalmente el frasco, siendo necesario dejar un espacio interior a fin de facilitar su homogenización en el momento de iniciar los análisis.

1.6 Volumen de la muestra.

El volumen a tomar debe ser el adecuado para que en una sola muestra se puedan efectuar simultáneamente la totalidad de los análisis bacteriológicos y estará en función de la técnica analítica a utilizar.

Para los análisis que utilicen la técnica del NMP se tomarán, como mínimo, 250 ml y para los que empleen la de membranas filtrantes, como mínimo, 500 ml.

1.7 Cerrado y precintado.

Las muestras se cerrarán convenientemente y se precintarán, en su caso, de forma que quede garantizada su inviolabilidad.

1.8 Rotulación.

Antes de la toma de la muestra se marcará el frasco mediante rotulador resistente al agua, con una referencia que permita su identificación. En todo caso la muestra se acompañará de una ficha o etiqueta en la que se consignen los datos necesarios que, como mínimo, serán los siguientes:

1.8.1 Datos del solicitante:

Nombre de la persona o Entidad y dirección completa.

1.8.2 Datos del agua:

Origen de la muestra (pozo, manantial, grifo, cisterna, río, etcétera).

Denominación y/o referencia.

Dirección o emplazamiento exactos, término municipal y provincia.

Fecha y hora de la captación.

1.8.3 Otros datos:

Consignar si el agua es natural o está sometida a algún tratamiento de depuración (cloro, filtración, carbón activo, etc.).

Identificación de la persona que ha tomado la muestra.

1.9 Acondicionamiento y conservación.

Una vez tomada la muestra se acondicionará de modo que quede en la oscuridad, debiendo remitirse cuanto antes al laboratorio. Es conveniente iniciar el análisis antes de que transcurran seis horas desde la toma de la muestra.

Sin embargo, podrá demorarse su análisis hasta veinticuatro horas cuando haya sido conservada en refrigeración a + 4° C ($\pm 2^\circ$ C).

1.10 Precauciones especiales.

Cuando se estime probable que el agua a analizar contenga trazas de cloro, cloraminas u ozono, será necesario neutralizar su efecto bactericida en el momento del muestreo.

Para ello, antes de la esterilización del frasco, se le añadirá una cantidad suficiente de tiosulfato sódico. Para un volumen de 250 ml son suficientes 0,2 ml de una solución acuosa al 3 por 100 de tiosulfato sódico cristalizado ($\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Esta solución puede añadirse sistemáticamente a todos los frascos, ya que en caso de que el agua no contenga cloro, la presencia de tiosulfato a estas concentraciones no posee efectos nocivos sobre el contenido bacteriano del agua.

1.11 Personal.

Las tomas de muestras para análisis bacteriológicos de aguas deberán ser realizadas por personas debidamente adiestradas.

2. BACTERIAS AEROBIAS

2.1 Definición.

Son todas las bacterias heterótrofas, aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas y psicotróficas capaces de crecer en un medio de agar nutritivo.

2.2 Fundamento.

Se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa de medio de cultivo sólido, al que se ha sembrado un volumen conocido de agua, transcurrido un tiempo y una temperatura de incubación determinados.

2.3 Material y medio de cultivo.

2.3.1 Material.

Placas de Petri de 90 a 120 mm de diámetro, estériles.
Pipetas graduadas en ml, divididas en décimas, estériles.
Estufa regulada a 37° C ($\pm 1^\circ$ C).
Estufa regulada a 22° C ($\pm 2^\circ$ C).

2.3.2 Medio de cultivo.

Preparación del agar nutritivo.

Peptona bacteriológica, 5 g.

Extracto de carne, 3 g.

Agar, 15 g.

Agua destilada, 1.000 ml.

Disolver los componentes por calentamiento hasta punto de ebullición y disolución total del agar, evitando la formación de espuma.

Ajustar el pH y repartir a razón de 15 a 20 ml en tubos de ensayo.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.

El pH final del medio deberá ser 6,9-7,1.

2.4 Bacterias aerobias a 37° C.

2.4.1 Procedimiento.

Tomar tantos tubos de medio de cultivo como placas se vayan a emplear.

Fundir totalmente el medio, colocando los tubos en baño maría.

Dejar a temperatura a 45° C, aproximadamente.

Homogeneizar perfectamente la muestra de agua, agitando el frasco repetidas veces.

Mediante pipeta estéril, depositar en placa de Petri 1 ml del agua a analizar.

Si se han efectuado diluciones se procederá del mismo modo con cada una de ellas.

En vez de la dilución 1/10, podrá sembrarse directamente 0,1 ml del agua problema.

Verter el medio contenido en cada tubo, manteniendo a 45° C, sobre el agua depositada en cada una de las placas de Petri.

Agitar suavemente mediante movimientos circulares y de traslación para homogeneizar la mezcla, sin dejar de apoyarlas sobre la mesa de trabajo.

La agitación debe prolongarse, aproximadamente, un minuto, procurando no mojar los bordes ni la tapa de la placa.

El tiempo transcurrido desde que se deposita el agua en la placa, hasta que se agrega el medio no debe ser superior a diez minutos.

Dejar solidificar, invertir las placas y colocarlas en la estufa.

Incubar a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) durante cuarenta y ocho horas.

2.4.2 Lectura y expresión de resultados.

Transcurridas cuarenta y ocho horas (\pm tres horas) contar todas las colonias desarrolladas en cada placa.

Para facilitar el recuento se recomienda utilizar una lupa y un retículo cuantacolonias o cualquier sistema que proporcione iluminación y amplificación suficiente.

Si se ha sembrado más de una placa se seleccionará la que contenga entre 30 y 300 colonias, descartando las demás.

El recuento no se efectuará en placas que contengan menos de 30 colonias, excepto en el caso de aquellas sembradas con agua sin diluir.

En caso de que todas las placas sembradas contengan más de 300 colonias el resultado se dará como aproximado.

El resultado se expresará como número de bacterias aerobias totales en 1 ml en cuarenta y ocho horas a 37° C.

2.5 Bacterias aerobias a 22° C.

2.5.1 Procedimiento.

Se seguirá la misma pauta descrita en el apartado 2.4.1, con excepción de la temperatura y del tiempo de incubación que será de 22° C ($\pm 2^\circ$ C) y de setenta y dos horas (\pm tres horas).

2.5.2 Lectura y expresión de resultados.

Se realizará de la misma forma que en el apartado 2.4.2.

3. BACTERIAS COLIFORMES

3.1 Definiciones.

3.1.1 Coliformes totales.

Son aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativas, no esporógenas, que fermentan la lactosa con producción de

ácido y de gas a 37°C en un tiempo máximo de cuarenta y ocho horas.

Este grupo comprende los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceas.

3.1.2 Coliformes fecales.

Bacterias coliformes de origen fecal son aquellas comprendidas en el grupo anterior, que además son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y de gas a 44°C, en un tiempo máximo de veinticuatro horas.

3.2 Método de los tubos múltiples (NMP número más probable).

Este método podrá utilizarse para cualquier tipo de agua y será el procedimiento oficial obligatorio en casos de litigio.

3.2.1 Fundamento.

Determinación del número de coliformes mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido lactosado y resiembra en medios de cultivo selectivos con incubación a temperaturas adecuadas.

El procedimiento comprende las pruebas: presuntiva, de confirmación de coliformes totales y de confirmación de coliformes fecales.

3.2.2 Material.

Pipetas estériles.

Estufa regulada a 37°C ($\pm 1^\circ$ C).

Estufa o baño termostáticos a 44°C ($\pm 0,5^\circ$ C).

3.2.3 Medios de cultivo.

3.2.3.1 Preparación del medio líquido caldo lactosado, simple.

Extracto de carne de buey, 3 g.

Peptona bacteriológica, 5 g.

Lactosa, 5 g.

Agua destilada, 1.000 ml.

Disolver los componentes por calentamiento, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo.

Los tubos irán provistos de campana de fermentación (tubo Durham).

Para los tubos de la serie que reciban volúmenes de agua de 10 ml deberá prepararse el medio a doble concentración—duplicando las cantidades de los componentes en el mismo volumen de agua destilada—y distribuyéndolo a razón de 10 ml por tubo.

Para los tubos o frascos de la serie que tengan que recibir volúmenes de agua de 50 ml se utilizará el mismo medio concentrado, pero distribuyéndolo a razón de 50 ml por cada uno. Esterilizar en autoclave a 121°C durante quince minutos.

El pH final del medio deberá ser 6,8-7.

3.2.3.2 Preparación del medio de cultivo sólido agar-lactosa-eosina-azul de metileno (Teague Levine o EMB).

Peptona bacteriológica, 10 g.

Lactosa, 10 g.

Fosfato bipotásico (PO_4HK_2), 2 g.

Agar, 15 g.

Eosina amarillenta, 0,4 g.

Azul de metileno, 0,065 g.

Agua destilada, 1.000 ml.

Disolver los componentes por calentamiento suave y repartir a razón de 15 a 20 ml por tubo.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante quince minutos.

El pH final del medio deberá ser 7,1.

3.2.3.3 Preparación del medio de cultivo sólido agar nutritivo.

Utilizar el mismo medio indicado en 2.3.2 para el recuento de bacterias aerobias totales, dejando enfriar los tubos en posición inclinada, colocándolos sobre un soporte adecuado para que quede un amplio bisel y un reducido fondo.

3.2.3.4 Preparación del medio líquido lactosado, sales biliares, fosfatos (medio EC, de Hajna y Perry).

Peptona bacteriológica, 20 g.

Lactosa, 5 g.

Mezcla de sales biliares o sales biliares número 3, 1,5 g.

Fosfato bipotásico (PO_4HK_2), 4 g.

Fosfato monopotásico (PO_4HK), 1,5 g.

Cloruro sódico, 5 g.

Agua destilada, 1.000 ml.

Disolver los componentes en caliente, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo.

Los tubos irán provistos de campana de fermentación (tubo Durham).

Esterilizar en autoclave a 121°C durante quince minutos.

El pH final del medio deberá ser 6,9.

3.2.4 Reactivo.

Reactivo de citocromo oxidasa (Kovacs).

Solución acuosa al 1 por 100 de clorhidrato de tetrametilparafenilendiamina.

El reactivo Kovacs-oxidasa debe ser incoloro y debe conservarse en frasco de color topacio oscuro, cerrado con tapón de vidrio esmerilado y guardado en nevera.

A pesar de tomar estas precauciones el tiempo máximo de duración es de dos semanas.

3.2.5 Procedimiento.

3.2.5.1 Prueba presuntiva.

Es un procedimiento de criba en el que una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme y una reacción positiva indica su posible presencia.

3.2.5.1.1 Técnica.

Disponer en gradilla una serie de tubos y—en su caso—frascos con medio líquido caldo lactoso simple y doble concentrado, según la tabla NMP que se haya elegido.

Mediante pipetas estériles, sembrar los tubos de la serie tomando los volúmenes del agua, ya homogeneizada, que se indican en la tabla.

Los volúmenes de 10 ml y de 50 ml de agua deberán sembrarse en tubos o frascos conteniendo medio a doble concentración.

Homogeneizar los tubos sembrados.

Incubar a 37°C ($\pm 1^\circ$ C) durante veinticuatro horas (\pm dos horas) y, en su caso, hasta cuarenta y ocho horas (\pm tres horas).

3.2.5.1.2 Lectura e interpretación.

Se consideran tubos positivos aquellos en los que se observa enturbiamiento y aparición de gas en la campana de fermentación, independientemente de su cantidad.

La producción de gas se pone también de manifiesto por el desprendimiento de pequeñas burbujas que atraviesan el medio al agitar suavemente el tubo.

La ausencia de gas al cabo de cuarenta y ocho horas (\pm tres horas) se considera como prueba negativa.

3.2.5.2 Prueba de confirmación de coliformes totales.

Es un procedimiento mediante el cual una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme mientras que una reacción positiva indica su presencia inequívoca.

Deben someterse a esta prueba todos los tubos que hayan resultado positivos en la prueba presuntiva.

En los tubos en los que la positividad se manifieste a las veinticuatro horas no es necesario continuar la incubación, pudiendo iniciarse entoces con ellos la prueba de confirmación.

3.2.5.2.1 Técnica.

Tomar tantos tubos de agar-cosina-azul de metileno como tubos positivos presuntivos.

Fundir totalmente el medio, colocando los tubos en baño maría.

Verter el medio contenido en cada tubo en sendas placas de Petri de 10 cm de diámetro.

Dejar solidificar.

Homogeneizar cada uno de los tubos de caldo lactosado presuntivo positivo.

Resembrar con asa en superficie y por agotamiento sobre el medio solidificado en la placa de Petri.

Incubar a 37°C ($\pm 1^\circ$ C) las placas invertidas durante veinticuatro horas (\pm dos horas).

Sobre este medio las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias características opacas y pigmentadas en rosa, azul o violeta oscuro con o sin reflejo metálico.

Las colonias distintas de las descritas corresponden a bacterias no fermentadoras de la lactosa.

De cada placa, seleccionar una colonia de cada uno de los diferentes aspectos descritos como característicos y resembrar mediante hilo o asa de platino sobre agar nutritivo inclinado. A continuación, y sin recargar, resembrar un tubo de caldo lactosado.

En el caso de que el aspecto de las colonias ofrezca duda respecto a las características antes descritas, tomar una o dos de las más similares y proceder como se ha indicado.

Incubar a 37°C ($\pm 1^\circ$ C) durante veinticuatro horas (\pm dos horas).

Al término de la incubación comprobar la producción de gas en el tubo de caldo lactosado y, caso de ser positiva, tomar una porción del cultivo desarrollado sobre el agar inclinado, mediante asa o hilo de platino o pipeta Pasteur (no utilizar material que contenga hierro), y depositarla sobre un trozo de papel de filtro poroso impregnado con dos a tres gotas de reactivo de Kovacs con objeto de investigar la presencia de oxidasa. La presencia de oxidasa se manifiesta por la aparición inmediata (entre cinco-diez segundos) de una coloración violeta o pardo violeta. Al principio la coloración es rosa roja oscura y luego, a los sesenta segundos aproximadamente, se vuelve negra.

Toda reacción tardía debe tomarse como negativa.

3.2.5.2.2 Lectura e interpretación de resultados.

Si en la placa de medio Teague-Levine no se han desarrollado colonias o bien las que han aparecido no son fermentadoras de lactosa con producción de gas, la prueba de confirmación es negativa.

Si la colonia aislada es fermentadora de lactosa con producción de gas y oxidasa negativa, la presencia de coliformes tales se considerará confirmada.

Si la reacción de la oxidasa es positiva, la presencia de coliformes totales se considerará negativa, aunque la colonia aislada haya fermentado la lactosa con producción de gas.

Para el cálculo del NMP de coliformes totales se contabilizarán como positivos aquellos tubos de la serie elegida que hayan dado una prueba de confirmación positiva.

En los tubos en los que la prueba confirmativa de coliformes fecales, que habrá realizado simultáneamente según se expone a continuación, haya resultado positiva, no es necesario proceder a la prueba de la oxidasa.

3.2.5.3 Prueba de confirmación de coliformes fecales.

Es un procedimiento mediante el cual una reacción negativa excluye la presencia de coliformes fecales, mientras que una reacción positiva indica su presencia inequívoca.

Deben someterse a esta prueba todos los tubos que hayan resultado positivos en la prueba presuntiva.

En los tubos en los que la positividad se manifieste a las veinticuatro horas no es necesario continuar la incubación, pudiendo iniciarse entonces con ellos la prueba de confirmación.

3.2.5.3.1 Técnica.

Esta prueba debe llevarse a cabo, tal como se ha indicado, simultáneamente a la de confirmación de coliformes totales.

Disponer en gradilla tantos tubos de medio de cultivo líquido lactosado con sales biliares (medio EC, de Hajna y Perry) como tubos positivos presuntivos.

Resembrar cada tubo con un asa o dos gotas de pipeta Pasteur. Llevar a estufa o baño María antes de transcurrir treinta minutos. Incubar a 44°C (± 0,5°C) durante veinticuatro horas (± dos horas).

3.2.5.3.2 Lectura e interpretación.

Si se observa crecimiento bacteriano con producción de gas a las veinticuatro horas o antes, la presencia de bacterias coliformes fecales se considerará confirmada.

Para el cálculo del NMP de coliformes fecales se contabilizarán como positivos aquellos tubos de la serie que hayan dado prueba de confirmación positiva.

3.2.5 Métodos alternativos.

Con el objeto de impedir o atenuar falsas fermentaciones de lactosa, en los análisis de control sistemático de aguas potabilizadas podrán utilizarse en lugar del caldo lactosado, los medios de cultivo lactosado líquidos siguientes:

3.2.6.1 Caldo lactosado Lauril-sulfato sódico (Caldo Lauril riptosa).

Triptosa, 20 g.
Lactosa, 5 g.
Fosfato bipotásico (PO₄HK₂), 2,75 g.
Fosfato monopotásico (PO₄H₂K), 2,75 g.
Cloruro sódico, 5 g.
Lauril-sulfato sódico, 0,1 g.
Agua destilada, 1.000 ml.
pH final del medio, 6,8.

3.2.6.2 Caldo lactosado glutamato sódico.

Glutamato sódico, 12,7 g.
Lactosa, 20,0 g.
Formiato sódico, 0,5 g.
L-cistina, 0,04 g.
1 (-) ácido aspártico, 0,048 g.
1 (+) arginina, 0,04 g.
Tiamina, 0,002 g.
Ácido nicotínico, 0,002 g.
Ácido pantoténico, 0,002 g.
Sulfato magnésico (SO₄Mg·7H₂O), 0,20 g.
Citrato férrico amónico, 0,02 g.
Cloruro cálcico (Cl₂Ca·2H₂O), 0,02 g.
Fosfato monopotásico (PO₄H₂K), 1,80 g.
Cloruro amónico (ClNH₄), 5,0 g.
Bromo-cresol púrpura, 0,02 g.
Agua destilada, 1.000 ml.
pH final del medio, 6,7.

3.3 Método del filtro de membrana (método alternativo).

3.3.1 Fundamento.

Determinación del número de coliformes mediante filtración de volúmenes determinados del agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medios de cultivo a temperaturas adecuadas.

El procedimiento comprende las determinaciones de coliformes totales y de coliformes fecales.

3.3.2 Material.

Membranas filtrantes de ésteres de celulosa, de 0,45 micras de porosidad, de 47 a 50 mm de diámetro, estériles.
Pinzas flameables de extremos planos.
Equipo de filtración por vacío.

Placas de Petri de diámetro superior al del filtro de membrana.

Estufa regulada a 37°C (± 1°C).

Estufa o baño termostáticos a 44°C (± 0,5°C).

3.3.3 Medios de cultivo.

3.3.3.1 Preparación del medio de cultivo sólido agar-lactosa-trifenil-tergitol 7 (Chapman TTC modificado).

Extracto de carne, 5 g.
Peptona bacteriológica, 10 g.
Lactosa, 20 g.
Extracto de levadura, 6 g.
Azul de bromitol (solución al 1 por 100), 5 ml.
Agar, 20 g.
Agua destilada, 1.000 ml.

Disolver los componentes en caliente, ajustar el pH a 7,2 y repartir a razón de 100 ml en matraces o frascos de 150 ml, con tapón de rosca.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante quince minutos.

En el momento de su empleo, fundir al baño maría y añadir a cada frasco:

— 5 ml de solución acuosa de cloruro o bromuro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC) al 0,05 por 100, esterilizada en autoclave a 121°C durante quince minutos.

— 5 ml de solución acuosa de heptadecil sulfato sódico (tergitol 7) al 0,2 por 100. No es necesario esterilizar esta solución.

Mezclar bien y repartir en placas de Petri, dejando solidificar. El espesor del medio en las placas debe ser como mínimo de 5 mm.

Las placas así preparadas pueden conservarse a 4°C (± 2°C) durante ocho días.

3.3.4 Procedimiento.

3.3.4.1 Coliformes totales.

3.3.4.1.1 Técnica.

Los elementos del sistema de filtración que vayan a entrar en contacto con el agua a analizar deben estar estériles.

Colocar un filtro de membrana estéril sobre el soporte de filtración, utilizando pinzas estériles.

Adaptar el embudo.

Filtrar 100 ml de la muestra de agua, previamente homogeneizada, efectuando el vacío necesario.

Lavar con unos 30 ml de agua de dilución estéril.

Retirar el embudo.

Mediante las pinzas esterilizadas transferir la membrana filtrante sobre el medio de cultivo contenido en una placa de Petri, de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba.

Cerrar e invertir la placa e incubar a 37°C (± 1°C) durante veinticuatro horas (± dos horas).

3.3.4.1.2 Lectura e interpretación.

La lectura de los resultados requiere el examen de las colonias aparecidas sobre la membrana y el examen de los halos en la capa de agar subyacente a la membrana.

Las bacterias que reducen fuertemente el trifenil tetrazolio y no fermentan la lactosa dan colonias de color violeta sobre fondo azul.

La ausencia de reducción o la débil reducción del trifenil tetrazolio hace que las colonias adquieran color amarillo, anaranjado o rojo ladrillo.

La fermentación de la lactosa provoca la formación de un halo amarillo.

Por ello, se consideran coliformes aquellas colonias que presentan color amarillo, amarillo con centro naranja o rojo ladrillo y halo amarillo.

Estas colonias deberán ser sometidas a la prueba de la oxidasa según la técnica descrita en 3.2.5.2.1 o bien colocando la membrana sobre una almohadilla empapada en solución de reactivo de Kovacs.

Puede estimarse que el número de coliformes totales presentes en 100 ml corresponde al número de colonias desarrolladas con las características descritas.

3.3.4.2 Coliformes fecales.

3.3.4.2.1 Técnica.

Seguir la misma técnica descrita en 3.3.4.1.1, operando simultáneamente, con la salvedad de incubar la placa a 44°C (± 0,5°C).

3.3.4.2.2 Lectura e interpretación.

Seguir el mismo sistema que el descrito en 3.3.4.1.2. Puede estimarse que el número de coliformes fecales presentes en 100 ml corresponde al número de colonias desarrolladas con las características descritas.

4. ESTREPTOCOCOS FECALES

4.1 Definición.

Son aquellas bacterias cocáceas Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas, catalasa negativas, que fermentan la glucosa con producción de ácido a 37°C, en un tiempo máximo de cuarenta y ocho horas.

El conjunto comprende las especies *Streptococcus faecalis*, *aecium*, *durans*, *bovis* y *equinus*, todas ellas comprendidas en el grupo serológico D de Lancefield.

4.2 Método de los tubos múltiples (NMP número más probable).

Este método podrá utilizarse para cualquier tipo de agua y será el procedimiento oficial obligatorio en casos de litigio.

4.2.1 Fundamento.

Determinación del número de estreptococos mediante siembra de distintos volúmenes del agua a analizar en series de tubos conteniendo medio de cultivo líquido glucosado con agentes inhibidores selectivos e incubación a temperatura adecuada. El procedimiento comprende las pruebas: presuntiva y de confirmación de estreptococos fecales.

4.2.2 Material.

Pipetas graduadas en ml y divididas en 1/10 estériles.
Estufa regulada a 37° C ($\pm 1^\circ$ C).

4.2.3 Medios de cultivo.

4.2.3.1 Preparación del medio glucosa fosfatos-azida (Rothe), simple.

Peptona bacteriológica, 20 g.
Glucosa, 5 g.
Cloruro sódico, 5 g.
Fosfato bipotásico (PO_4HK_2), 2,7 g.
Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$), 2,7 g.
Azida sódica, 0,2 g.
Agua destilada, 1.000 ml.
Disolver los componentes por calentamiento, ajustar el pH y repartir a razón de 10 ml por tubo.

Para los tubos de la serie que reciban volúmenes de agua de 10 ml deberá prepararse el medio a doble concentración, duplicando las cantidades de los componentes en el mismo volumen de agua destilada y distribuyéndola a razón de 10 ml por tubo.

Para los tubos o frascos de la serie que tengan que recibir volúmenes de agua de 50 ml se utilizará el mismo medio concentrado, pero distribuyéndolo a razón de 50 ml por cada uno.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.
El pH final del medio deberá ser 6,8-7.

4.2.3.2 Preparación del medio de cultivo glucosa-fosfatos-azida-etilvioleta (Litsky).

Peptona bacteriológica, 20 g.
Glucosa, 5 g.
Cloruro sódico, 5 g.
Fosfato bipotásico (PO_4HK_2), 2,7 g.
Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$), 2,7 g.
Azida sódica, 0,3 g.
Solución acuosa de etil-violeta al 0,01 por 100 (P/V), 5 ml.
Agua destilada, 1.000 ml.
Disolver los componentes, menos el etil-violeta, por calor suave, ajustar el pH, añadir el etil-violeta a razón de 10 ml por tubo.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.
El pH final del medio deberá ser 6,8-7.

Para ambos medios se recomienda utilizar tubos con tapón de rosca para su cierre hermético. No se utilizará algodón ya que debe evitarse la evaporación del medio durante el almacenamiento.

4.2.4 Procedimiento.

4.2.4.1 Prueba presuntiva.

Disponer en una gradilla una serie de tubos con medio de Rothe, según la tabla de NMP que se haya elegido.

Mediante pipetas estériles, sembrar los tubos de la serie, tomando los volúmenes del agua, ya homogeneizada, que se indican en la tabla.

Homogeneizar los tubos sembrados.
Incubar a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) durante cuarenta y ocho horas (\pm tres horas).

Se consideran tubos positivos aquellos que presenten enturbiamiento y/o sedimento.

4.2.4.2 Prueba de confirmación.

Todos los tubos positivos de la prueba presuntiva se someterán a la prueba de confirmación.

De cada tubo positivo presuntivo homogeneizar su contenido y transferir tres asas al tubo con medio de Litsky.

Si el sedimento es escaso o insuficiente, es imprescindible eliminar previamente a la homogeneización el líquido sobrenadante.

También puede tomarse directamente el sedimento por capilaridad, mediante pipeta Pasteur.

Incubar los tubos resembrados a 37° C ($\pm 1^\circ$ C).

Si a las veinticuatro horas no se observa ni enturbiamiento ni sedimento violeta prolongar la incubación hasta cuarenta y ocho horas (\pm tres horas).

4.2.4.3 Lectura y expresión de resultados.

Se considerarán tubos positivos aquellos que presenten enturbiamiento y/o sedimento de color violeta.

Se calculará por tabulación el número más probable (NMP) de estreptococos fecales referidos a 100 ml de agua.

4.3 Método del filtro de membrana (método alternativo).

4.3.1 Fundamento.

Determinación del número de estreptococos fecales mediante filtración de volúmenes determinados del agua a analizar por filtros de membrana e incubación sobre medio de cultivo selectivo a temperatura adecuada.

4.3.2 Material.

Membranas filtrantes de ésteres de celulosa, de 0,45 micras de porosidad, de 47 a 50 mm de diámetro, estériles.

Pinzas flameables de extremos planos.
Equipos de filtración por vacío.
Placas de Petri de diámetro superior al del filtro de membrana.
Estufa regulada a 37° C ($\pm 1^\circ$ C).

4.3.3 Medio de cultivo.

Preparación del medio de cultivo sólido-agar glucosa-fosfato-azida-trifenil-tetrazolio (Sianetz):

Peptona bacteriológica, 20 g.
Extracto de levadura, 5 g.
Glucosa, 2 g.
Fosfato bipotásico (PO_4HK_2), 4 g.
Azida sódica (N_3Na), 0,4 g.
2,3,5, trifeniltetrazolio cloruro (TTC), 0,1 g.
Agar, 15 g.
Agua destilada, 1.000 ml.
Disolver los componentes por calentamiento hasta punto de ebullición, dejar enfriar a 50° C, aproximadamente, y ajustar el pH a 7,2.

Homogeneizar y repartir en placas dejando solidificar.
El espesor del medio en las placas debe ser como mínimo de 5 mm.

Las placas así preparadas pueden conservarse a 4° C ($\pm 2^\circ$ C) durante tres a cuatro semanas.

4.3.4 Procedimiento.

Seguir la misma técnica en 3.3.4.1.1 para coliformes totales e incubar a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) durante cuarenta y ocho horas (\pm tres horas).

4.3.5 Lectura e interpretación.

Contar las colonias desarrolladas que tengan color rojo ladrillo, violeta o rosa.

Las colonias que no presenten esta coloración no se tienen en cuenta por no corresponder a estreptococos fecales.

Puede estimarse que el número de estreptococos fecales presentes en 100 ml corresponde al número de colonias desarrolladas con las características descritas.

5. CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES

5.1 Definición.

Son aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram positivas, anaerobias estrictas, capaces de formar esporas, y con actividad sulfito reductora.

5.2 Fundamento.

Se basa en contar el número de colonias de bacterias esporuladas y con capacidad sulfito reductora, desarrolladas en medio de cultivo sólido glucosado, conteniendo sulfito sódico y una sal de hierro.

5.3 Material y medio de cultivo.

5.3.1 Material.

Pipetas graduadas en ml, divididas en décimas y estériles.
Estufa regulada a 37° C ($\pm 1^\circ$ C).
Baño termostático a 80° C.

5.3.2 Medio de cultivo.

a) Preparación del medio agar-glucosa-sulfito-hierro (Wilson Blair):

Peptona bacteriológica, 10 g.
Extracto de carne, 3 g.
Cloruro sódico, 5 g.
Glucosa, 20 g.
Agar, 30 g.
Agua destilada, 1.000 ml.
Disolver los componentes por calentamiento hasta punto de ebullición y disolución total del agar, evitando la formación de espuma.
Ajustar el pH a 7,6.

Repartir a razón de 20 ml por tubo de capacidad mínima de 50 ml.

Esterilizar en autoclave a 121° C durante quince minutos.

b) Solución acuosa de sulfito sódico puro cristalizado $SO_3Na_2 \cdot 10H_2O$ al 10 por 100.

Esterilizar al baño María durante diez minutos. Esta solución debe utilizarse recientemente preparada.

c) Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 5 por 100. Preparar asépticamente, sin esterilizar por el calor.

5.4 Procedimiento.

Según el criterio de calificación que se desee determinar (tolerable u orientador de calidad), colocar uno o cinco tubos del medio de cultivo base, en baño maría, hasta fusión total del agar.

Atemperar hasta unos 7° C y añadir:

Solución de citrato de hierro amoniacal, 0,5 ml.

Solución de sulfito sódico, 1 ml.

Después de la adición de los reactivos, mezclar suavemente para evitar la incorporación de aire en el medio.

Con el objeto de destruir las formas vegetativas, calentar la muestra de agua en baño termorregulado a 80° C durante cinco minutos, dejando enfriar a continuación hasta 60° C, aproximadamente.

Sembrar cada tubo de medio preparado, como se ha indicado, con 20 ml del agua a 60° C.

Mezclar y enfriar rápidamente.

Incubar a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) durante cuarenta y ocho horas.

5.5 Lectura y expresión de resultados.

Las colonias de Clostridium sulfito reductores aparecerán de color negro debido a la formación de sulfuro ferroso por reducción del sulfito.

Transcurridas cuarenta y ocho horas, contar el número de colonias negras desarrolladas en la totalidad de la columna de agar, sin tener en cuenta las puntiformes.

El resultado se expresará como número de esporas de clostridios sulfito reductores en el volumen de agua sembrada (20 ml a 100 ml).

Con objeto de evitar la dificultad de recuento que puede producirse al confluir las colonias desarrolladas se efectuará una primera lectura a las veinticuatro horas, y si por este motivo no es posible el recuento a las cuarenta y ocho horas se dará la lectura de las veinticuatro horas como resultado aproximado.

ANEXO

1. Las definiciones que se exponen en la presente norma, así como los métodos analíticos que se detallan en la misma, deben entenderse válidos únicamente a efectos de la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el Abastecimiento y Control de la Calidad de las Aguas Potables de Consumo Público.

2. Diluciones:

Si en algún caso se estima necesario diluir la muestra a analizar, debido a que se presume un alto contenido bacteriano, como líquido de dilución, se utilizará la solución estéril siguiente:

- Peptona tripsica, 1 g.
- Cloruro sódico, 8,5 g.
- Agua destilada, 1.000 ml.
- Ajustar el pH a 7.

3. Medios de cultivo:

De cada lote de medio recién preparado debe practicarse un control de esterilidad incubando uno o más tubos a la temperatura y durante el tiempo adecuados.

De igual modo debe practicarse un control positivo, sembrando una cepa de la bacteria correspondiente, comprobando su correcto desarrollo y características propias.

Para la conservación prolongada los medios de cultivo, una vez preparados, no requieren más precaución especial que la de estar herméticamente cerrados y almacenados en lugar fresco y en la oscuridad. No es necesario conservarlos en nevera a excepción de aquellos en cuya técnica de preparación se indica expresamente.

La mayor parte de los medios de cultivo necesarios se encuentran disponibles en el mercado en forma deshidratada.

Algunos de ellos también se encuentran ya preparados para uso inmediato.

Asimismo se encuentran comercializados la mayoría de los reactivos que se citan, por ejemplo, discos o tiras para la reacción de Kovacs-oxidasa, etc.

Para la preparación de los medios de cultivo deshidratados deberán seguirse estrictamente las indicaciones especificadas por los fabricantes.

4. Técnicas complementarias recomendables:

a) Comprobar la morfología y caracteres tintoriales de las bacterias identificadas en las técnicas descritas, mediante tinción de Gram, especialmente para coliformes y estreptococos.

b) Completar la identificación de los estreptococos fecales con la prueba de la catalasa, según la técnica siguiente:

Partiendo del cultivo líquido resembrar con asa, en superficie y por agotamiento sobre agar nutritivo (medio 2.3.2) en placa.

Incubar las placas invertidas a 37° C ($\pm 2^\circ$ C) durante veinticuatro horas (\pm dos horas).

Sobre un portaobjetos de vidrio, limpio y desengrasado, colocar una gota de agua destilada estéril. Homogeneizar en ella un asa bien cargada de la colonia que se quiera ensayar. Añadir una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes. El desprendimiento espontáneo de burbujas indica una actividad catalasa positiva. Los estreptococos fecales son catalasa negativos.

c) A efectos de la calificación sanitaria de las aguas de consumo público, de acuerdo con la Reglamentación Técnico-Sanitaria, es suficiente efectuar la técnica descrita en el apartado 3. Bacterias coliformes.

Sin embargo, para estudios epidemiológicos, de investigación u otros, y especialmente para la tipificación del Escherichia coli, es recomendable completar el análisis con la identificación de las colonias de coliformes aisladas.

Para ello pueden seguirse las pruebas bioquímicas IMVIC o bien otras más completas. La mayor parte de ellas se encuentran disponibles en el mercado.

5. Tablas NMP.

Para el cálculo del número de coliformes y/o de estreptococos presentes se utilizarán las tablas del Número Más Probable.

Para los análisis sistemáticos se elegirá en cada caso la tabla más adecuada a las necesidades del control y conveniencia del laboratorio, recomendándose como más conveniente para las aguas tratadas la tabla de una sola serie de cinco tubos de 10 ml (tabla I).

Para la investigación de coliformes en los puntos de entrada a la red de distribución y en los casos en que en los controles rutinarios de potabilidad del resto de la red: 1) Se encuentre de forma repetida de una a diez bacterias coliformes totales por cien (100) mililitros de agua; 2) Se observe un número más elevado en muestras aisladas; 3) Se detecte la presencia de coliformes fecales, o cuando el análisis se efectúe para calificar sanitariamente un agua, se sembrarán volúmenes de 100 ml de agua, distribuidos en: un frasco de 50 ml y cinco tubos de 10 ml, utilizándose para el cálculo del NMP la tabla III.

7. Otros métodos alternativos.

Los métodos oficiales en casos de litigio son los descritos en la presente norma a excepción de los señalados como alternativos.

Salvo en casos de litigio, los laboratorios podrán seguir otros métodos o técnicas alternativas diferentes de los descritos como tales, siempre que sus resultados sean equivalentes a los obtenidos con los expuestos en la presente norma.

Tablas para hallar el número más probable (NMP) de coliformes o estreptococos existentes en 100 ml de agua

TABLA I
NMP (número más probable)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva entre	Índice NMP	Límites de confianza del 95 por 100	
		Límite inferior	Límite superior
5 tubos de 10 ml			
0	0	0	6,0
1	2,2	0,1	12,8
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,8	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	Infinito	8,0	Infinito

TABLA II
NMP (número más probable)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Números de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml	5 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	2	0,5	7
0	1	0	2	0,5	7
0	2	0	4	0,5	11
1	0	0	2	0,5	7
1	0	1	4	0,5	11
1	1	0	4	0,5	11
1	1	1	6	0,5	15
1	2	0	6	0,5	15

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml	5 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
2	0	0	5	< 0,5	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	2	1	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	28	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	28	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	96
4	4	1	23	7	70
5	0	0	31	11	89
5	0	1	43	15	114
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	154
5	2	0	49	17	126
5	2	1	70	23	168
5	2	2	94	28	219
5	3	0	79	25	187
5	3	1	109	31	253
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	4	0	130	35	302
5	4	1	172	43	486
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	5	0	240	68	754
5	5	1	348	118	1.005
5	5	2	542	180	1.405
5	5	3	918	303	3.222
5	5	4	1.609	635	5.605

TABLA III

NMP (número más probable)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva entre		Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
1 tubo de 50 ml	5 tubos de 10 ml		Límite inferior	Límite superior
0	1	1	< 0,5	4
0	2	2	< 0,5	6
0	3	4	< 0,5	11
0	4	5	1	13
1	0	2	0,5	6
1	1	3	< 0,5	9
1	2	6	1	15
1	3	9	2	21
1	4	16	4	40

TABLA IV

NMP (número más probable)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
1 tubo de 50 ml	5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	1	< 0,5	4
0	0	2	2	< 0,5	6
0	1	0	1	< 0,5	4
0	1	1	2	< 0,5	6
0	1	2	3	< 0,5	9

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
1 tubo de 50 ml	5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	2	0	2	< 0,5	6
0	2	1	3	< 0,5	8
0	2	2	4	< 0,5	11
0	3	0	3	< 0,5	8
0	3	1	5	< 0,5	13
0	4	0	5	< 0,5	13
1	0	0	1	< 0,5	4
1	0	1	3	< 0,5	8
1	0	2	4	< 0,5	11
1	0	3	5	< 0,5	15
1	1	0	3	< 0,5	8
1	1	1	5	< 0,5	13
1	1	2	7	< 0,5	17
1	1	3	9	< 0,5	21
1	1	4	11	< 0,5	28
1	2	0	7	< 0,5	17
1	2	1	10	< 0,5	23
1	2	2	12	< 0,5	28
1	3	0	8	< 0,5	19
1	3	1	11	< 0,5	26
1	3	2	14	< 0,5	34
1	3	3	13	< 0,5	53
1	4	0	13	< 0,5	56
1	4	1	17	< 0,5	31
1	4	2	22	< 0,5	47
1	4	3	23	< 0,5	66
1	4	4	23	< 0,5	85
1	5	0	24	< 0,5	101
1	5	1	35	< 0,5	117
1	5	2	43	< 0,5	138
1	5	3	54	< 0,5	178
1	5	4	62	< 0,5	217
1	5	5	81	< 0,5	> 450

TABLA V

NMP (número más probable)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml	5 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	1	< 0,5	2
0	1	0	1	< 0,5	2
0	1	1	1	< 0,5	2
0	2	0	1	< 0,5	2
0	3	0	1	< 0,5	2
1	0	0	1	< 0,5	2
1	0	1	1	< 0,5	2
1	1	0	1	< 0,5	2
1	1	1	1	< 0,5	2
1	2	0	1	< 0,5	2
1	2	1	2	< 0,5	4
1	3	0	2	< 0,5	4
2	0	0	1	< 0,5	2
2	0	1	1	< 0,5	2
2	1	0	1	< 0,5	2
2	1	1	2	< 0,5	4
2	2	0	2	< 0,5	4
2	2	1	2	< 0,5	4
2	3	0	2	< 0,5	4
2	3	1	3	< 0,5	7
2	4	0	3	< 0,5	7
3	0	0	2	< 0,5	4
3	0	1	2	< 0,5	4
3	1	0	2	< 0,5	4
3	1	1	2	< 0,5	4
3	2	0	3	< 0,5	7
3	2	1	3	< 0,5	7
3	3	0	3	< 0,5	7
3	3	1	4	< 0,5	9
3	4	0	4	< 0,5	9
4	0	0	4	< 0,5	9
4	0	1	4	< 0,5	9
4	1	0	3	< 0,5	7
4	1	1	3	< 0,5	7
4	1	2	4	< 0,5	9
4	2	0	4	< 0,5	9

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml	5 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
4	2	0	4	1	9
4	2	1	4	1	9
4	2	2	5	2	12
4	3	0	5	2	12
4	3	1	5	2	13
4	3	2	6	2	14
4	4	0	6	2	14
4	4	1	7	3	17
4	5	0	7	3	17
4	5	1	8	3	19
5	0	0	4	1	9
5	0	1	4	1	9
5	0	2	8	2	14
5	1	0	5	2	12
5	1	1	6	2	14
5	1	2	7	3	17
5	2	0	6	2	14
5	2	1	8	3	19
5	2	2	10	4	23
5	2	3	12	4	28
5	3	0	9	3	21
5	3	1	11	4	26
5	3	2	14	5	34
5	3	3	18	6	53
5	4	0	13	5	31
5	4	1	17	6	47
5	4	2	22	7	70
5	4	3	28	9	85
5	4	4	38	11	101
5	5	0	24	8	75
5	5	1	35	11	101
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	27	218
5	5	4	161	39	424

TABLA VI
NMP (número más probable)
 Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límite de confianza del 95 por 100	
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	3	<< 0,5	9
0	1	0	3	<< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	1	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	480	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800