

## Análisis microbiológico del agua.

En el agua pueden encontrarse una gran variedad de microorganismos, los cuales afectan en mayor o menor medida a la calidad sanitaria del agua. Además de la flora normal presente en cualquier sistema acuático (ejemplos: *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.), pueden existir otros microorganismos contaminantes, algunos de ellos patógenos para el ser humano y/u otros animales. Una de las fuentes principales de contaminación son las **aguas residuales** que contienen **materia fecal** que puede ser vehículo de **transmisión de patógenos**.

### Objetivo

El objetivo principal del análisis es determinar **si el agua estudiada está contaminada con materia fecal** humana o de otros animales. El análisis repetido del agua, tantas veces como la legislación vigente exige con el fin de obtener una valoración estadísticamente significativa, nos permitirá determinar si el agua cumple con los requisitos de calidad sanitaria exigidos para las aguas potables destinadas al consumo humano o para cualquier otro fin (aguas de playa y cultivo de animales, por ejemplo).

### Análisis del agua

La calidad del agua se valora mediante análisis bacteriológico, utilizando a distintos tipos de microorganismos. Los ensayos que se realizarán en esta práctica serán:

1. **Recuento de bacterias heterótrofas**
2. **Valoración de bacterias indicadoras de contaminación fecal: Coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales (EF)**. Los métodos de análisis a emplear serán los recomendados por la legislación vigente.
  - a) Filtración por membrana
  - b) Diluciones sucesivas y valoración según el número más probable (NMP)
3. **Otros indicadores o bacterias.**

### 1. Recuento total de bacterias viables

Las bacterias que vamos a estudiar en este ensayo son bacterias **heterótrofas, aerobias y anaerobias facultativas, mesófilas**, capaces de crecer en un medio rico (caldo nutritivo). El ensayo se basa en contar el número de colonias capaces de crecer en una placa de medio nutritivo, en la que se ha sembrado un volumen de agua problema conocido, transcurrido un determinado tiempo de incubación a 22 y 37 °C. La incubación a 22 °C nos aporta una idea de la flora autóctona, mientras que en la incubación a 37 °C se seleccionan bacterias adaptadas a vivir a la temperatura corporal humana y de animales homeotérmicos. El ensayo sólo nos indica la cantidad de microorganismos heterótrofos que hay en la muestra de agua analizada. **NO IDENTIFICA** a un microorganismo concreto, ni tan siquiera nos permite sospechar de la presencia de un tipo determinado de microorganismo.

### Objetivo

Cuantificar el número de bacterias presentes en una muestra de agua.

### Procedimiento

1. **Agitar** siempre de forma vigorosa la botella que contiene la muestra de agua antes de tomar cantidad alguna de la misma.
2. **Preparar diluciones** 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10.000, según el método de las diluciones sucesivas (ver más adelante) y usando una pipeta distinta y estéril para cada situación.
3. **Sembrar** 0,5 ml de la muestra original y 0,5 ml de las diluciones anteriormente preparadas en placas de agar nutritivo. Generalmente, es preferible usar las dos o tres últimas diluciones. También, se puede utilizar volúmenes de inóculos más pequeños (0,2 ml).

**4. Incubar** las placas invertidas, a 37 °C durante 24 horas y a 22 °C durante 48 horas.

**Resultados:** Contar el número de colonias existentes en cada placa, seleccionar la placa que contenga entre 20 y 300 colonias para la realización de los cálculos. El resultado se expresa como microorganismos por ml de agua. El número total de bacterias viables se obtiene mediante la fórmula siguiente:

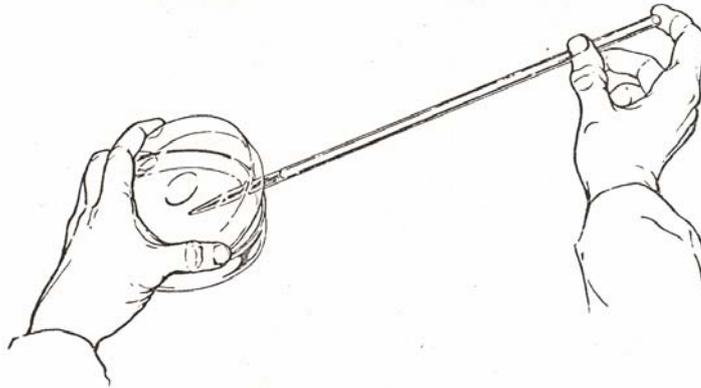
$$N = n \times \frac{1}{i} \times \frac{1}{d}$$

Donde N = microorganismos totales por mililitro

n = número de colonias contadas en la placa

i = inóculo utilizado (0,5 ml)

d = dilución



Depositando el contenido de una pipeta en una placa de Petri.

### Preparación de las diluciones sucesivas.

El proceso para la obtención de las diluciones es el siguiente:

- Antes de proceder a la preparación de las diluciones se debe tener preparados tantos tubos con 9 ml de diluyente estéril como diluciones sean necesarias. Los tubos estarán marcados con  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , y sucesivos.
- Agitar enérgicamente la muestra de agua para homogeneizarla y asegurar así una dispersión bacteriana uniforme.
- Tomar 1 ml de la muestra con una pipeta estéril.
- Verter el contenido de esta pipeta en un tubo marcado -1, que contiene 9 ml de diluyente estéril preparado con anterioridad.
- Agitar el tubo para homogeneizar bien la mezcla. Este tubo tendrá una dilución de  $10^{-1}$ , y contendrá 1 ml del agua problema y 9 ml de diluyente estéril.
- Coger otra pipeta estéril y sacar 1 ml del tubo marcado con  $10^{-1}$ .
- Verter el contenido de esta pipeta en el tubo marcado con -2, que contiene también 9 ml de diluyente estéril.
- Agitar el tubo para homogeneizar la nueva mezcla. Este tubo tendrá una dilución de  $10^{-2}$ , y contendrá 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  y 9 ml de diluyente estéril.
- Repetir este proceso tantas veces como sea necesario hasta obtener el número de diluciones previstas, tal y como a continuación

## **2. Valoración de bacterias indicadoras de contaminación fecal**

### **a) Método de la filtración por membrana**

La técnica se basa en el crecimiento, identificación y recuento de los microorganismos retenidos en la superficie de un filtro, a través del cual se ha filtrado un volumen conocido de agua, incubado en un medio de cultivo durante un tiempo determinado y a una temperatura adecuada.

#### **Volumen de agua a filtrar**

Los volúmenes de agua recomendados para la filtración directa sobre membrana filtrante por la normativa vigente para la vigilancia de la calidad sanitaria de las aguas costeras y de playas son: 100 ml, 20 ml, y 5 ml. Esto significa la realización de tres filtraciones e incubaciones para cada muestra de agua y para cada tipo de microorganismo analizado.

Cuando el contenido bacteriano o de materia en suspensión de la muestra inicial de agua haga necesaria la utilización de un volumen inferior a 1 ml, la alternativa apropiada es la dilución de la muestra. La utilización directa de volúmenes inferiores a 1 ml no permite obtener resultados satisfactorios. La dilución del agua se tiene que llevar a cabo en una botella que contenga el volumen adecuado del diluyente estéril (botella con capacidad entre 50 y 200 ml).

#### **Procedimiento**

##### **1. Preparación del equipo de filtración**

El equipo de filtración que se recomienda es una rampa de tres puestos de manera tal que con una sola filtración se procesen las tres filtraciones recomendadas o los tres filtros destinados a la determinación de los tres microorganismos indicadores (CT, CF y EF) para una misma filtración. Antes de proceder a las filtraciones es aconsejable realizar las operaciones siguientes con el objeto de comprobar el buen funcionamiento del equipo.

- a) Dejar que la bomba de vacío funcione durante cinco minutos antes de iniciar los análisis.
- b) Comprobar que los matraces de recogida del filtrado (kitasatos) están bien instalados para proteger la bomba de vacío.

##### **2. Colocación de la membrana filtrante**

Los filtros a utilizar son de 47 mm de diámetro con un tamaño de poro de 0,45  $\mu$ .

- a) Flamear las pinzas.
- b) Coger con cuidado una membrana filtrante estéril utilizando la punta de las pinzas.
- c) Colocar la membrana filtrante, con la cuadrícula hacia arriba, sobre el soporte de filtración, prestando atención a que la membrana quede bien centrada.
- d) Colocar el embudo de filtración estéril sobre el soporte, procurando no desplazar ni deteriorar la membrana filtrante.
- e) Ajustar el embudo de filtración al soporte de filtración.

##### **3. Vertido del volumen de muestra a filtrar**

La técnica utilizada para la filtración de la muestra varía según el volumen de muestra a filtrar.

###### **Volumen de muestra igual o superior a 50 ml.**

- a) Cuando el embudo de filtración tenga una escala de volumen graduada, se ha de agitar enérgicamente la muestra y verterla directamente en el embudo, utilizando la escala para medir el volumen de muestra a filtrar.
- b) Cuando el embudo de filtración no tenga una escala de volumen graduada, se ha de medir la muestra de agua con una probeta estéril, una vez agitada enérgicamente.  
Verter, a continuación, la muestra contenida en la probeta en el embudo

de filtración. Añadir un volumen igual de agua tamponada estéril en la probeta y verterla en el embudo, juntamente con la muestra

#### **Volumen de la muestra entre 1 y 50 ml.**

- a) Añadir 20 ml, aproximadamente, de agua tamponada estéril en el embudo de filtración, antes de añadir la muestra.
- b) Agitar la muestra enérgicamente.
- c) Medir el volumen de muestra, utilizando una pipeta estéril.
- d) Verter el contenido de la pipeta en el embudo de filtración.
- e) Añadir 20 ml aproximadamente de agua tamponada estéril en el embudo de filtración.

#### **Volumen de muestra inferior a 1,0 ml.**

En este caso es necesario efectuar una dilución adecuada de la muestra de agua, para que el volumen realmente filtrado sea superior a 1,0 ml. El procedimiento a seguir con la muestra diluida es idéntico al anteriormente descrito.

No se debe analizar una dilución después de transcurridos 20 minutos desde su preparación. Una vez vertido el volumen de muestra, se procede seguidamente a su filtración, de la manera siguiente:

#### **4. Filtración**

- a) Tapar el embudo de filtración. Encender la bomba de vacío.
- b) Manteniendo un vacío parcial moderado, abrir la válvula del correspondiente embudo de filtración.
- b) Dejar que el líquido contenido en el embudo pase completamente a través de la membrana filtrante.
- c) Cerrar la válvula del embudo de filtración y apagar la bomba

#### **5. Lavado y desmontado del embudo**

- a) Verter 25 ml, aproximadamente, de agua estéril en el embudo de filtración de manera que permita un lavado de las paredes.
- b) Abrir la válvula del embudo de filtración, encender bomba y dejar que el volumen de lavado pase a través de la membrana, manteniendo siempre el vacío parcial indicado anteriormente.
- c) Repetir este proceso de lavado dos veces más.
- d) Dejar que toda el agua del lavado pase completamente a través del filtro.
- e) Parar la bomba de vacío y girar la válvula correspondiente para que deje de hacerse el vacío sobre la membrana filtrante.

#### **6. Retirada del embudo de filtración**

- a) Soltar el mecanismo de sujeción del embudo de filtración del soporte correspondiente.
- b) Retirar con cuidado el embudo de filtración para que la membrana filtrante se conserva inalterada.
- c) Colocar el embudo de filtración entre las dos partes de una placa estéril, hasta que se realice una nueva filtración.

#### **7. Colocación de la membrana en la placa de Petri**

- a) Acercar la placa de Petri apropiada.
- b) Flamear las pinzas.
- c) Retirar cuidadosamente la membrana filtrante del soporte, cogiéndola con la punta de las pinzas por uno de los bordes. Esta operación requiere la máxima atención para no doblar o romper el borde de la membrana.

- d) Colocar con cuidado la membrana filtrante sobre el medio de cultivo contenido en la placa de Petri, deslizándola por uno de los bordes hasta que tape completamente la superficie del agar.
- e) No soltar la membrana con las pinzas hasta que se esté seguro de que no existen burbujas de aire entre la membrana y el agar.

### 8. Incubación

- a) Tapar la placa de Petri.
- b) Identificar la placa de Petri con la muestra filtrada. La identificación debe contener el origen o estación de la muestra, la posible dilución efectuada y el volumen de agua realmente filtrada.
- c) Invertir las placas de Petri para que la membrana filtrante quede por debajo del agar, completamente adherida al mismo.
- d) Colocar las placas de Petri invertidas en las estufas de incubación a las temperaturas recomendadas para cada tipo de microorganismo, donde permanecerán el tiempo adecuado:
  - CT:** medio Endo y/o Chapman TTC. Incubación a 37 °C ± 0,5°, durante 24 horas.
  - CF:** medio m-FC. Incubación a 44,5 °C ± 0,2°, durante 24 horas.
  - EF:** medio KF-*Streptococcus*. Incubación a 37 °C ± 0,5°, durante 48 horas

### 9. Recuento de colonias y cálculo de concentraciones

- a) Abrir la placa de Petri
- b) Colocar la placa bajo el objetivo de una lupa binocular y realizar el conteo de colonias usando para su identificación las características visuales descritas para cada microorganismo.

Características identificativas de los organismos indicadores de contaminación fecal crecidos en los medios de cultivo recomendados.		
Indicador	Medio de cultivo	Identificación colonias
CT	Endo	Colonias con color rosa a rojo con o sin brillo metálico. El brillo metálico puede cubrir completamente la colonia o concentrarse en el centro. Tamaño variable.
	Chapman TTC	<i>Enterobacter</i> : color rojo ladrillo o amarillo con centro naranja. <i>Escherichia</i> y <i>Citrobacter</i> : color amarillo con centro naranja. <i>Klebsiella</i> : color rojo ladrillo o naranja.
CF	m-FC	Color azul típico.
EF	KF- <i>Streptococcus</i>	Color rosa pálido a rojo oscuro con bordes rosados. Tamaño de 0,5 a 2 mm de diámetros. Cada colonia se considera como un EF, aunque estos organismos existen normalmente en cadenas de dos o más miembros.

- c) Realizar el cálculo de la concentración bacteriana por 100 ml de muestra de agua original:

$$\text{Número de } \mu\text{Os}/100 \text{ ml} = \frac{\text{Número de colonias en el filtro}}{\text{Volumen muestra original filtrada, ml}} \times 100$$

$$\text{Volumen muestra original filtrada} = \frac{\text{Vol. muestra diluida}}{\text{Vol. dilución}} \times D_2 \times D_2 \times \dots \times \text{Volumen filtrado}$$

## b) Método de las diluciones sucesivas y valoración según el NMP

La técnica de las diluciones sucesivas y la valoración según el NMP es un método de enumeración indirecta, basado en la interpretación estadística del crecimiento, o no crecimiento, observado en varias series de tubos, inoculados con volúmenes decrecientes de la muestra de agua.

Ya que el método exige el no crecimiento de gérmenes en una serie dada de tubos correspondientes a una determinada dilución, después de la inoculación e incubación adecuadas, es necesario realizar las diluciones suficientes para ello. El número de diluciones a realizar dependerá del grado de contaminación de la muestra. La tabla de la página siguiente muestra las diluciones recomendadas según el tipo de microorganismo a valorar y el nivel de contaminación presente en el agua.

### Objetivo

El objetivo principal de la técnica es el desarrollo, identificación y cuantificación de los microorganismos que crecen en un determinado medio de cultivo.

Diluciones recomendadas para la aplicación del método del número más probable, según el microorganismo considerado y el grado de contaminación del agua.														
Tipo de agua	Coliformes totales					Coliformes fecales					Estreptococos fecales			
Agua residual	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Efluente secundario	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Agua de mar contaminada	10	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	1	10 <sup>-1</sup>	
Agua de mar limpia	10	1	10 <sup>-1</sup>			10	1	10 <sup>-1</sup>			100	10	1	
Agua consumo humano	10	1	10 <sup>-1</sup>			10	1	10 <sup>-1</sup>			100	10	1	

## Colimetría presuntiva

El agua problema se siembra en un medio que contiene lactosa, que permite el enriquecimiento e identificación de las bacterias coliformes. Uno de los medios recomendados es el caldo de MacConkey, que lleva sales biliares en su composición y que inhiben el crecimiento de las bacterias no entéricas, cocos Gram (+) y bacilos formadores de endosporas, y que no inhibe a los bacilos entéricos Gram (-). La lactosa presente es fermentada produciendo gas (detectado en la campana de Durham) y ácido (detectado por el cambio de color del medio).

### Objetivo

Estudiar la posible presencia de bacterias del grupo coliformes indicativa de posible contaminación fecal.

### Preparación de los tubos

Se tiene que preparar una serie de tubos con los contenidos siguientes:

- 10 ml de medio de cultivo estéril de MacConkey a concentración doble. Se prepararán tres tubos y se marcarán, para su identificación, con un 10.

- b) 10 ml de medio de cultivo estéril a concentración simple. Se prepararán los tubos siguientes:
- b1) Tres tubos para la inoculación posterior de 1 ml de muestra original. Se marcarán, para su identificación con un 1.
  - b2) Tantas series de tres tubos como número de diluciones sean necesarias. Se marcarán tres tubos con -1, tres con -2, y así sucesivamente, hasta llegar al número de series de diluciones previstas.

### Procedimiento

1. Prepare al menos cuatro diluciones de la muestra original mediante la técnica de las diluciones sucesivas. Marque los tubos con  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ . Homogeneizar las muestras de los diferentes tubos.
2. Agitar la muestra original. Inocular 10 ml de la muestra en 3 tubos grandes conteniendo 10 ml de caldo MacConkey, preparado previamente con concentración doble de lo normal, y con campana de Durham. Marque los tubos con un 10.
3. Repetir la agitación. Inocular 1 ml de la muestra en 3 tubos con 10 ml de caldo MacConkey concentración normal y con campana de Durham. Marque el tubo con un 1.
4. Inocular 1 ml de cada una de las diluciones en las series de 3 tubos con 10 ml de caldo MacConkey concentración normal y con campana Durham. Marcar los tubos con -1, -2, y sucesivos hasta completar las diluciones previstas.
5. **Incubar** a 37 °C durante 24 horas.

NOTAS: 1) Homogeneizar las muestras diluidas antes de tomar los inóculos.  
2) Usar pipetas estériles distintas para los inóculos, cuando se cambie de muestra original a muestra diluida y entre las diferentes diluciones.

**Resultados:** se consideran **tubos positivos** aquellos en los que aparece **formación de ácido** con **cambio de color en el indicador** y **formación simultánea de gas** en la campana. Los tubos negativos se incuban otras 24 h. La valoración se realiza según la tabla del NMP. La tabla indica el número más probable de microorganismos presentes en 100 ml de agua teniendo en cuenta los tubos en que hay crecimiento, o no crecimiento, así como las diluciones realizadas.

### Colimetría confirmativa

La presencia de coliformes fecales se determina a partir de los tubos que han sido considerados positivos en los análisis de coliformes totales.

### Objetivo

Estudiar y confirmar la presencia de coliformes totales y fecales.

### Procedimiento

1. De cada tubo considerado positivo de la terna utilizada para la lectura del NMP en la determinación de coliformes totales, y después de haberlo agitado bien para homogeneizar, se toma una muestra con un asa de sembrar y se **siembra en estría** en placas de EMB (medio de Teague-Levine, medio selectivo y diferencial para coliformes).
2. **Incubar a 37 °C** durante 24 a 48 horas.
3. De cada tubo considerado positivo de la terna utilizada para la lectura del NMP, se toma una muestra con un asa de siembra, o bien con una pipeta Pasteur estéril, diferente para cada tubo, y se inocula en dos nuevos tubos:
  - 3.1. El primer tubo contendrá 1 ml de agua de peptona y triptófano para determinar la producción de indol. Incubar a  $44,5 \pm 0,2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

3.2. El segundo grupo de tubos contendrá 10 ml de caldo Verde Brillante al 2 % de bilis para determinar el crecimiento y la fermentación de lactosa. En este tubo ha de haber una campana de Durham. Incubar a  $44,5 \pm 0,2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

**Resultados:** En el medio EMB los microorganismos fermentadores de lactosa forman colonias características opacas y pigmentadas en rosa, azul o violeta con o sin brillo metálico (por ejemplo, *E. coli* forma colonias planas de color verde-violeta oscuro metálico típicas sobre este medio). La prueba es positiva si aparecen este tipo de colonias fermentadoras de lactosa. Se considerará que hay producción de indol si al añadir el reactivo de Kovacs, después de incubar a  $44,5 \pm 0,2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas, se forma un anillo de color rojo cereza. En el medio Verde brillante, se considerará que hay crecimiento y fermentación de lactosa si se observa turbiedad y formación de gas en la campana de Durham después de incubar a  $44,5 \pm 0,2$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.

### Estreptometría presuntiva

La presencia de azida sódica en el medio utilizado permite la inhibición de todas las bacterias Gram negativas y de gran parte de las Gram positivas, permitiendo el cultivo de *Streptococcus faecalis*.

#### Objetivo

Determinar la presencia o no de estreptococos especialmente *Streptococcus faecalis*, que en caso positivo indicaría contaminación fecal de la muestra de agua que se analiza.

#### Procedimiento

De acuerdo con la técnica de diluciones e inoculaciones ya descritas, se inoculan los tubos que contienen el caldo de glucosa azida sódica, o medio de Rothe y se incuban a continuación a  $37 \pm 0,5$  DC durante  $24 \pm 2$  horas.

Se usarán 3 series de 3 tubos cada una con 10 ml de medio. La primera serie tendrá concentración doble que las otras dos. Se inocularán 10, 1 y 0,1 ml de la muestra original.

En el caso de ser considerados negativos algunos tubos, se incubarán hasta  $48 \pm 2$  horas, contadas desde el inicio de la prueba.

**Resultados:** Se considerarán positivos aquellos tubos que presenten turbidez o sedimento y, posteriormente, de acuerdo con los resultados se recontará el número de estreptococos con la tabla del NMP.

### Estreptometría confirmativa

#### Objetivo

Confirmar la presencia de estreptococos fecales

#### Procedimiento

De cada tubo considerado positivo en la prueba presuntiva, se toma una muestra con un asa de sembrar o bien con una pipeta Pasteur estéril, diferente para cada tubo, y se inocula en un tubo con 10 ml de caldo Violeta de etil-glucosa azida sódica, o medio de Litski. Después se incuban durante  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 0,5$  °C.

**Resultados:** Serán considerados positivos los tubos que presenten crecimiento, manifestado por la aparición de turbiedad y un precipitado blanco-violeta. Determinar la concentración de EF usando la tabla del NMP.

**Número más probable por 100 ml de muestra, usando series de tres tubos inoculados con 10, 1 y 0,1 ml de agua de la muestra original.**

Nº tubos que dan reacción positiva entre			NMP μO/100 ml	Límites de confianza			
3 tubos 10 ml	3 tubos 1 ml	3 tubos 0.1 ml		al 95%		al 99%	
				lím. inf.	lím. sup.	lím. inf.	lím. sup.
0	0	0	< 3				
0	0	1	3	< 1	17	< 1	23
0	1	0	3	< 10	17	< 1	23
0	2	0	6,2	2	23	1	29
1	0	0	3,6	1	21	< 1	28
1	0	1	7,2	2	27	1	35
1	1	0	7,3	2	28	1	36
1	1	1	11	4	34	2	43
1	2	0	11	4	35	2	44
1	2	1	15	6	41	4	51
1	3	0	16	6	42	4	52
2	0	0	9,1	2	38	1	50
2	0	1	14	5	48	3	62
2	1	0	15	5	50	3	65
2	1	1	20	8	61	5	77
2	2	0	21	8	63	5	80
2	2	1	28	11	75	7	93
2	3	0	29	12	78	8	97
3	0	0	23	7	129	4	177
3	0	1	39	10	180	10	230
3	0	2	64	20	230	10	290
3	1	0	43	20	210	10	290
3	1	1	75	20	280	20	370
3	1	2	120	40	350	20	450
3	2	0	93	30	390	20	620
3	2	1	150	50	510	30	650
3	2	2	210	80	540	50	820
3	2	3	290	120	800	80	990
3	3	0	240	100	1.400	< 100	1.900
3	3	1	460	200	2.400	100	3.200
3	3	2	1.100	300	4.800	200	6.400
3	3	3	> 2.400				

lím. inf. = límite inferior; lím. sup. = límite superior.