



Revista de Ingeniería

ISSN: 0121-4993

reingeri@uniandes.edu.co

Universidad de Los Andes

Colombia

Rueda Ariza, Juan Camilo; Martínez, Aida Juliana; Calvo, Diana Carolina
Efecto del desprendimiento de las biopelículas formadas en una red de acueducto sobre la calidad del
agua

Revista de Ingeniería, núm. 39, julio-diciembre, 2013, pp. 6-11

Universidad de Los Andes

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=121030106001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Efecto del desprendimiento de las biopelículas formadas en una red de acueducto sobre la calidad del agua

Impact of Drinking Water Biofilms Detachment in Water Quality

Juan Camilo Rueda Ariza^{(1)*}, Aida Juliana Martínez^{(2)*}, Diana Carolina Calvo⁽³⁾

^{(1)*}Msc. en Ingeniería. juancrueda@hotmail.com

^{(2)*}Magíster en Ciencias Biológicas. ai-marti@uniandes.edu.co

⁽³⁾ Magíster en Ingeniería. Estudiante de doctorado, Arizona State University, Arizona, Estados Unidos. dianac.calvo@gmail.com

* Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

Recibido 2 de mayo 2013. Modificado 8 de diciembre de 2013. Aprobado 10 de diciembre de 2013.

Palabras clave

Aluminio, biopelículas, calidad del agua, cloración, desprendimiento, desinfección, microorganismo patógenos.

Key words

Biofilm, chlorination, detachment, disinfection, pathogenic microorganisms, water quality.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del desprendimiento de las biopelículas formadas en una red de distribución de agua potable sobre la calidad del agua que llega a los hogares, ya que esta puede afectar la calidad de vida y la salud de las personas. Se realizaron análisis de pH, turbiedad, concentración de metales y microbiológicos en una red de acueducto para evaluar el efecto de las biopelículas sobre la calidad del agua, encontrando altos niveles de aluminio y de microorganismos esporulados que dificultan su control y representan un potencial problema de salud para la población.

Abstract

The aim of this research was to determine the effect of biofilm detachment, formed in a water distribution network, on the quality of water delivered to households, given that this may affect people's health and quality of life. Analyses of pH, turbidity, concentration of metals and microbiological in the water supply network were undertaken to find the effect of biofilms on water quality. We found high levels of aluminum and microorganisms with highly resistance spore structures that are difficult to control and represents a potentially health problem for the population

INTRODUCCIÓN

La calidad de vida y salud de una población depende, en gran medida, de la calidad del agua que consumen sus habitantes. Por esta razón, es de vital importancia garantizar que la calidad del agua sea óptima en todos los puntos de la red de distribución, sin importar la distancia de las cometidas a la planta de tratamiento de agua potable (PTAP), el material de las tuberías de la red, o la edad de las mismas (Momba & Makala, 2004).

Teniendo en cuenta que el proceso de desinfección realizado en las PTAP no remueve la totalidad de microorganismos presentes en el agua, es posible que exista la formación de agregados bacterianos sobre las superficies de las tuberías, dada por diferentes procesos de intercambio de electrones, promoviendo adhesión e incrustamiento de diversos microorganismos en estas (Geldreich, 1990). Estos agregados

son denominados biopelículas, cuya formación es potenciada por procesos de operación en la red, como la pérdida de presión, infiltraciones y cambios en la calidad de la fuente por condiciones meteorológicas, los cuales generan ambientes óptimos para el crecimiento de los microorganismos.

Las biopelículas también constan de una fase inorgánica, la cual está asociada a bacterias tales como la *Pseudomonas sp* que son capaces de formar una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Garrett, Bhakoo & Zhang, 2008) a las cuales se pueden adherir cationes polivalentes como el aluminio, el hierro, el manganeso y el zinc.

En la tabla 1 se muestran las condiciones en las cuales se ha encontrado crecimiento microbiano y formación de biopelículas. Tal como se sugiere en esta tabla, la viabilidad del crecimiento de estas puede darse en cualquier lugar en el que se encuentren nutrientes, microorganismos y algo de humedad (Morato, 2007).

Tabla 1. Condiciones fisicoquímicas necesarias para la formación de biopelículas

Recursos	Carbono (orgánico, CO_2)	Condiciones	Temperatura: Fría-cálida-caliente
	Nitrógeno (orgánico, inorgánico)		Potencial hídrico: Seco-húmedo
	Macro nutrientes (S, P, K, Mg)		pH: 1-14
	Micronutrientes (Fe, Mn, Co, Zn, Ni)		O_2 : Aerobio-anaerobio-anóxico
	O_2 y otros aceptores de electrones (NO_3 , SO_4 , Fe)		Luminosidad: Luz brillante-débil-oscuro
	Dados inorgánicos de electrones (H_2 , H_2S , Fe NH_4 , NO_2)		Condiciones osmóticas: Agua dulce-agua salada

La formación de biopelículas está dada por el ingreso de microorganismos a la red, los cuales se adhieren a las tuberías por medio de las EPS, formando una matriz microbiana que se alimenta de nutrientes del agua y de la tubería, que a su vez absorbe compuestos inorgánicos. Dentro de esta matriz se dan procesos de reproducción y desprendimiento que conllevan a la formación de nuevos agregados en otros puntos de la red.

Una de las variables estudiadas en la formación de biopelículas es el material de las tuberías de la red, las cuales sirven como medio de soporte para la formación de biopelículas, si se cumplen las condiciones mostradas en la tabla 1 y, asimismo, si hay presencia de microorganismos en la red de distribución. Los materiales comúnmente utilizados son el cemento (asbesto cemento y concreto), el plástico (PVC) y los metálicos (hierro dúctil, acero). Estos últimos, son más propicios a la formación de biopelículas en tiempos cortos (días o semanas), mientras que los plásticos tardan más tiempo (meses-años) en su formación (Niquette, Servais & Savoir, 2000). Sin embargo, esto depende de las condiciones de flujo y de la calidad del agua y tiende a variar en las diferentes redes de agua potable.

El desprendimiento de las biopelículas produce cambios en la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua, ya que entre otros produce eventos de coloración que pueden afectar la salud de la población (Batté, Appenzeller, Grandjean, Fass, Gauthier, Jorand & Block, 2003).

Existen tres tipos de desprendimiento: Espontáneo, el cual se presenta constantemente en la red y por medio del cual se reintroducen nutrientes, microorganismos y metales al agua. Puede presentar una falla por adhesión y cohesión relacionado con aumento en las fuerzas cortantes en las paredes de las tuberías por cambios en las condiciones de flujo o suspensiones del servicio para mantenimiento y dispersión que se relaciona a gradientes en la concentración de nutrientes y competencia dentro de las biopelículas de los microorganismos por espacio y alimento, lo que provoca migraciones y formación de nuevos agregados microbiológicos en diferentes puntos de la red (de Victorica Almeida, 2009).

El objetivo de la investigación fue encontrar relaciones entre el desprendimiento de las biopelículas que se forman en las redes de distribución de agua potable y la calidad del agua en la cometa del consumidor, en un municipio cercano a Bogotá. Para cumplir este objetivo, se analizó el agua en diferentes puntos de la red, en los cuales se determinaron variaciones fisicoquímicas y microbiológicas. Se utilizó una interrupción del servicio que ocasionó (en su restablecimiento) el desprendimiento de biopelículas generando un evento de coloración. De esta forma fue posible asociar dichas variaciones al desprendimiento de las biopelículas presentes en la red.

METODOLOGÍA

Se tomaron muestras de agua antes y después de la PTAP, al igual que en cinco acometidas en diferentes puntos de la red en dos tiempos distintos, teniendo en cuenta variables reportadas que afectan la formación de biopelículas (material de tubería y distancia a la PTAP). En la tabla 2 se presentan las características de cada punto.

Tabla 2. Puntos de muestro en la red y descripción de las tuberías que llegan a estas

Punto	Materiales de tubería	Distancia PTaP 1 [1]
Pila	Tubería principal en acero de 10 pulgadas y tubería de 3 pulgadas en acero cerca a las cometidas.	1700
Cometida 1	Tubería principal en acero de 10 pulgadas y tubería de 3 pulgadas en acero cerca a las cometidas.	1614
Cometida 2	Tubería principal en acero de 10 pulgadas y tubería de 3 pulgadas en acero cerca a las cometidas.	1574
Cometida 3	Tuberías de 10 pulgadas de acero a lo largo de la red y pequeñas de PVC en las líneas secundarias cerca a la cometida.	2251
Cometida 4	Tuberías de 10 pulgadas de acero a lo largo de la red y de 3 pulgadas en las tuberías secundarias cerca de la cometida con algunos tramos de tubería en PVC de 4 pulgadas.	1653
Cometida 5	Tuberías de 10 pulgadas de acero a lo largo de la red y de 3 pulgadas en las tuberías secundarias cerca de la cometida con algunos tramos de tubería en PVC de 4 pulgadas.	1344

Se tomaron muestras en dos tiempos distintos, en los cuales se encontraron condiciones de operación idénticas en la PTAP. Sin embargo, en los alrededores de la cometida 4 existía suspensión en el servicio en ambos muestreos, lo que varió notoriamente las condiciones de la calidad del agua.

Se realizaron análisis fisicoquímicos del agua, en los que se midieron turbiedad, pH y cloro residual (*in-situ* por medio de un medidor de cloro portátil), al igual que concentraciones de metales identificados típicamente en la fase inorgánica de las biopelículas como lo son manganeso, hierro y aluminio (de Victorica Almeida, 2009). Para esto fue necesario hacer previamente digestión de muestras líquidas por microondas para remover las partículas suspendidas y disueltas en la red que afectan la medición (ver tabla 3).

El recuento y aislamiento de microorganismos del agua se determinó utilizando agar R2A (marca Sharlau). Este medio es útil para el aislamiento de microorganismos heterotróficos provenientes de aguas tratadas. Los microorganismos fueron incubados durante 48 horas a 30 grados Celsius (Knobelsdorf Miranda & Mujeriego Sahuquillo, 1997) y se realizó conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por cada 100 mL de muestra, determinando (Reasoner & Donald, 2004) así la concentración promedio de microorganismos en el agua que circula en la red. Adicionalmente se hizo la caracterización morfológica por medio de Tinción de Gram.

Tabla 3. Análisis de laboratorio realizado

Análisis	Técnica	Método de referencia
Microbiológicos	Filtración directa	
	Siembre en agar R2A	
	Aislamiento en agar R2A	
	Tinción de gram	
Cloro residual	Colorimetría	SM 4500-Cl G
Digestión de muestras líquidas y extractos	Digestión microondas	EPA 3015A
Aluminio	Espectrómetro de emisión por plasma ICP - óptico	EPA 3015 A ICP SM 3120B
Hierro		
Manganeso		
Color	Colorimetría	SM 2120 B
pH	Medición de pH	SM 4500-H+B
Turbiedad	Turbidímetro	SM 2130 B

El evento de coloración en la acometida cuatro, fue ocasionado por cambios en la operación, ya que hubo suspensión en el servicio y al ingresar de nuevo agua al sistema se aumentaron los esfuerzos cortantes de la red, lo que pudo provocar el desprendimiento masivo de las biopelículas. De esta manera, fue posible comparar la calidad del agua en tiempo de operación normal con desprendimientos de adhesión-cohesión por aumento en las fuerzas cortantes en un evento de mantenimiento en el sistema.

RESULTADOS

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y COMPOSICIÓN METÁLICA

La concentración de cloro en las redes de agua potable debe ser constante, de tal forma que se evite el crecimiento de microorganismos. Sin embargo en la figura 1 se puede observar un comportamiento atípico provocado por la falta de automatización en la inyección del cloro en la PTAP, cambios en la demanda de cloro por presencia de materia orgánica y el estado deteriorado de la red, lo que produce que la concentración varíe en el tiempo y en el espacio. Por el contrario, el material de la tubería y la distancia a la PTAP no parecen tener relación con estas oscilaciones, es importante tener en cuenta que, debido al tamaño del sistema, este no se diseñó con puntos de reclusión.

Es importante tener en cuenta este comportamiento, ya que produce dificultades para mantener la red en condiciones de salubridad, pues los gradientes en las concentraciones de cloro favorecen la existencia de zonas en las que los microorganismos pueden reproducirse de forma abundante y generar estructuras de resistencia como esporas.

En cuanto al análisis de pH en la red, este muestra una estabilización del valor después del tratamiento en la PTAP y tal como se observa en la figura 2, se mantiene en un rango constante, incluso en la cometida 4 donde se tomó el evento de coloración por el desprendimiento de la biopelícula. Los valores oscilan entre 6,5 y 9 tal como lo exige la legislación colombiana.

Los análisis de metales en el agua principalmente durante los eventos de coloración permiten relacionar estas concentraciones con la composición de la fase inorgánica de la biopelícula, encontrando que esta está compuesta principalmente hierro, aluminio y manganeso, formando incrustaciones en las tuberías de acero presentes en la red (ver tabla 2). Estas tuberías a su vez son oxidadas rápidamente por algunos microorganismos que las utilizan como medio de soporte, permitiéndoles reproducirse y formar biopelículas provocando procesos de corrosión en las mismas (LeChevallier, Babcock & Lee, 1987).

Gracias al evento de coloración en la red, fue posible ver cómo el desprendimiento de las biopelículas puede afectar la calidad del agua, pues tal como se ve en la figura 3, el aumento en la concentración de metales en la cometida 4 es significativo, lo que a su vez sube los niveles de turbiedad a valores inaceptables para el consumo humano (>2 NTU).

Bajo condiciones normales de operación se obtuvo que la cantidad de metales en el agua es de 25% manganeso, 16% aluminio y 63% hierro. En el desprendimiento se obtuvieron porcentajes de 30% manganeso, 15% aluminio y 54% hierro, lo que corresponde a porcentajes encontrados usualmente en una biopelícula formada en una tubería de acero (Reasoner & Donald, 2004).

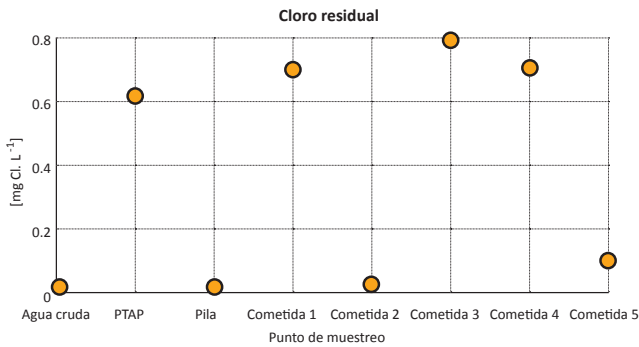


Figura 1. Media cloro residual analizado en diferentes puntos de la red en los dos días de medición, se observa un claro comportamiento aleatorio en los dos días

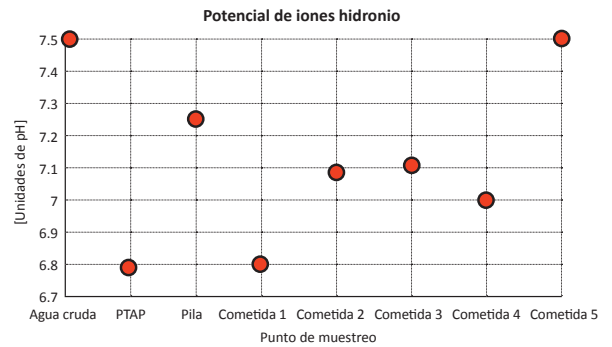


Figura 2. Media pH estable en todos los puntos de la red en los dos días de medición

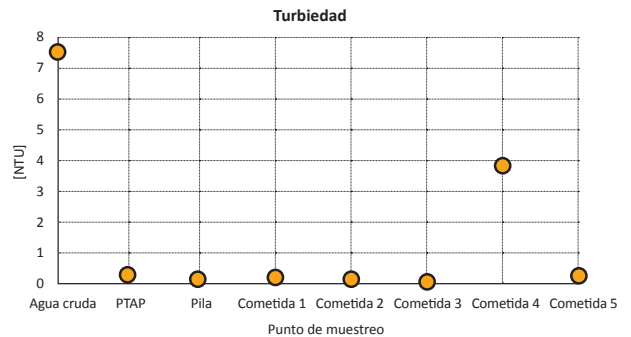
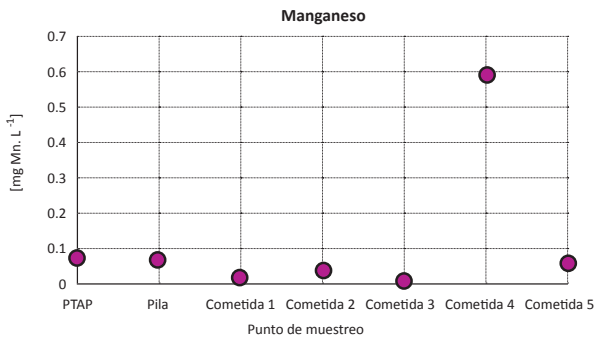
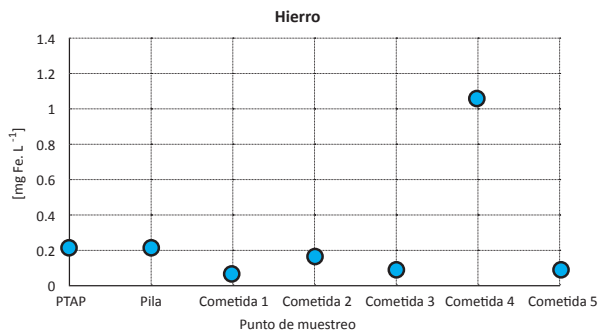
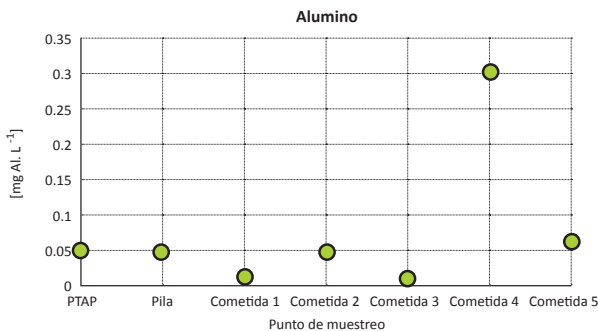


Figura 3. Se observa el efecto en el aumento de la concentración media de dos días de muestreo de Al, Fe y Mn y el aumento en turbiedad (NTU) en la cometida 4 debido al evento de coloración registrado en el muestreo y concentraciones constantes en los muestreos en las cometidas bajo condiciones de operación normal

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Al realizar los recuentos y descripción macro y microscópica de las colonias, se encontró que existe una alta diversidad de microorganismos heterótrofos. La mayoría de morfotipos presentes correspondió a bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos. También se encontraron bacilos Gram positivos esporulados. Los análisis microscópicos mostraron que los bacilos estuvieron presentes a lo largo del recorrido de la red iniciando con la planta de tratamiento y terminando con las diferentes cometidas analizadas.

Los bacilos Gram positivos, Gram negativos y esporulados encontrados en las cometidas pertenecen a colonias macroscópicas similares entre sí, al igual que a colonias similares con las encontradas en la PTAP y la pila (ver tabla 4), lo cual puede ser una evidencia de que el tratamiento de desinfección realizado en esta planta no está siendo eficaz en la remoción de microorganismos y puede llegar a representar un riesgo en salud pública ya que se ha documentado que la desinfección por medio de cloro no es la más efectiva para microorganismos esporulados (Morrow, Almeida, Fitzgerald & Cole, 2004).

Tabla 4. Resultados microbiológicos, media de concentración UFC/100 mL de agua en dos días de muestreo, y su respectiva descripción morfológica, se encuentran microorganismos esporulados a lo largo de toda la red. Se evidencia aumento en la concentración de microorganismos en la cometida 4 posiblemente asociado al desprendimiento de las biopelículas. x=no hubo presencia de más colonias

Muestra	Colonias						Total
	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5	Colonia 6	
Agua cruda entrada PTAP	Colonia amarilla pequeña puntiforme. Se obtienen bacilos gram negativos pequeños.	Colonia blanca pequeña puntiforme. Se obtienen bacilos gram positivos esporulados.	x	x	x	x	
UFC/100mL	45	Incontable	-	-	-	-	Incontables
PTAP	Colonia blanca de forma irregular y de aspecto granuloso. Se obtienen bacilos esporulados gram negativos.	Colonia de color blanco, de forma irregular y de aspecto cremoso. Se obtienen bacilos gram positivos.	x	x	x	x	
UFC/100mL	14	1					15
	Colonia blanca de forma y aspecto granuloso. Se obtienen bacilos esporulados gram negativos.	Colonia blanca de forma irregular de tamaño grande, de la cual se observan cocos gram negativos.	Colonia amarilla de forma irregular de aspecto cremoso. Se obtienen bacilos gram negativos.	x	x	x	
UFC/100mL	3	Incontable	5	-	-	-	Incontable
	Colonia blanca de forma irregular de aspecto cremoso. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos esporulados.		Colonia blanca irregular de aspecto cremoso. Después de gram se obtienen bacilos gram negativos.	x	x	x	
UFC/100mL	42	5	27				74

Muestra	Colonias						Total
	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5	Colonia 6	
Cometida 2	Colonia blanca forma irregular de aspecto granuloso, después de la coloración de gram se obtienen bacilos gram negativos.			x	x	x	
UFC/100mL	34	Incontable	62	-	-	-	Incontables
Cometida 3	Colonia roja de forma pluriforme. Después de la coloración de gram se obtienen que son bacilos gram negativos.	Colonia color curuba de forma puntiforme. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram negativos.	Colonia de color amarillo oscuro. Después de la coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos.	Colonia de color amarillo claro de forma indefinida. No se obtiene caracterización morfológica, en el microscopio.	Colonia blanca puntiforme de forma indefinida. Después de la coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos.	Colonia amarilla puntiforme. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos.	
UFC/100mL	7	14	1	1	212	Incontable	Incontables
Cometida 4	Colonia rosada, grande y de forma indefinida. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram negativos.	Colonia amarilla de forma irregular. Se encuentran bacilos gram positivos esporulados, es una colonia filamentosa.	Colonia blanca puntiforme. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos.	x	x	x	
UFC/100mL	4	2	700	-	-	-	706
Cometida 5	Colonia blanca puntiforme. Después de coloración de gram se obtienen bacilos gram negativos.	Colonia amarilla puntiforme. Después de la coloración de gram se obtienen bacilos gram positivos.	x	x	x	x	
UFC/100mL	400	Incontable					Incontable

Debido a que algunos bacilos *gram* negativos están relacionados con la familia *Enterobacteriaceae* en la cual se encuentran algunos géneros potencialmente patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, entre otros, es de vital importancia que se regule la cantidad de desinfectante y la periodicidad a la cual se aplica. Así mismo, la erradicación de bacilos Gram positivos esporulados de este sistema debe recibir mayor atención pues esta estructura de resistencia hace que se requiera una mayor dosis y un mayor tiempo de contacto con el desinfectante.

CONCLUSIONES

La colonización de la red se presenta por biopelículas compuestas por una fase inorgánica, en la que predomina el hierro (tal como se comprobó en el evento de coloración en la acometida 4) y por una fase orgánica compuesta por algunos microorganismos que lograron sobrevivir el tratamiento en la PTAP y se alojan en las biopelículas, encontrando un nicho propicio para su crecimiento, reproducción y posterior desprendimiento. Esta situación permite que estos microorganismos puedan llegar a la cometa del consumidor exponiendo así al usuario a un riesgo de contaminación microbiológica.

El mantenimiento en la red hace que las condiciones hidráulicas de flujo cambien, aumentando los esfuerzos cortantes en las paredes de las tuberías provocando el desprendimiento de las biopelículas, lo que ocasiona que las condiciones fisicoquímicas del agua varíen notoriamente como se mostró para la cometa 4. Sin embargo las variaciones en cloro residual y pH no son tan significativas como las que se presentan en la concentración de metales típicos formados dentro de las biopelículas (Becton, Dickinson and Company. bd. S.f), los cuales al desprenderse, se diluyen en el agua alcanzando niveles de concentración que sobrepasan los niveles aceptables para el consumo humano.

Se presume que existe acumulación y desprendimiento de microorganismos a lo largo de la tubería, pues las concentraciones de estos en el agua cambian aleatoriamente en función de las variables estudiadas. Adicionalmente, se puede inferir que existen infiltraciones debidas al deterioro de la red, que causan la presencia de bacilos Gram negativos en esta, los cuales no están presentes en el agua cruda.

Los bajos niveles de cloro en la red permiten que exista una alta carga de microorganismos circulando en el agua. Esto no solo se ve reflejado en un potencial problema de salud pública sino también en un problema técnico y económico ya que existen microorganismos que han generado resistencias a los desinfectantes y que son potencialmente patógenos, lo que encarece el tratamiento e impide garantizar que el agua sea potable en todos los puntos de la red (Environmental Protection Agency - EPA, 1992).

Es necesario realizar una identificación de los géneros y especies encontradas en este estudio por medio de técnicas bioquímicas ó de biología molecular con el propósito de relacionar los efectos de cloración en la planta.

REFERENCIAS

- Batté, M., Appenzeller, B. M. R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., & Block, J. C. (2003). Biofilms in drinking water distribution systems. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2-4), 147-168.
- Becton, Dickinson and Company. bd. (S.f) Recuperado de: http://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difco-bblmanual_2nded_preview.pdf.
- de Victorica Almeida, J. L. Formación de biopelículas y su impacto en los sistemas de conducción de agua. Recuperado del sitio de internet de Instituto de Ingeniería, UNAM: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/peru/mexapa020.pdf>
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-1056.
- Geldreich, E. (1990). *Microbial quality control in distribution systems*. [ed.] McGraw-Hil. Cuarta. New York : American Water Works Association.
- Knobelsdorf Miranda, J., & Mujeriego Sahuquillo, R. (1997). Crecimiento bacteriano en las redes de distribución de agua potable: una revisión bibliográfica. *Ingeniería del agua*, 1997, vol. 4, núm. 2.
- LeChevallier, M. W., Babcock, T. M., & Lee, R. G. (1987). Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2714-2724.
- Momba, M. N., & Makala, N. (2004). Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems. *Water SA*, 30(2), 175-182.
- Morató, J. (2007) "Sostenibilidad y el uso del agua: la gestión de la demanda". *Seminario Internacional: Evaluación y Gestión Integral del Riesgo en Sistemas de Abastecimiento de Agua*. Tulua – Cali, Colombia.
- Morrow, J. B., Almeida, J. L., Fitzgerald, L. A., & Cole, K. D. (2008). Association and decontamination of *Bacillus* spores in a simulated drinking water system. *Water research*, 42(20), 5011-5021.
- Niquette, P., Servais, P., & Savoir, R. (2000). Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water research*, 34(6), 1952-1956.
- Reasoner, Donald J. "Heterotrophic plate count methodology in the United States." *International journal of food microbiology* 92.3 (2004): 307-315.
- United States. Environmental Protection Agency (EPA). Office of Research. (1992). *Control of biofilm growth in drinking water distribution systems*. Office of Research and Development.