

# Evaluación de las placas "PETRIFILM™ E. coli" para el recuento de coliformes termotolerantes en aguas recreacionales de Santa Fe (Argentina) \*

Emiliani, Federico<sup>1, 2</sup>; Lajmanovich, Rafael<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Limnología (CONICET) J. Maciá 1933, 3016 Santo Tomé (Santa Fe), Argentina Tel/Fax: 54-42-750394 E-mail: ina-li@arcrde.edu.ar

<sup>2</sup> Cátedra de Microbiología Ambiental, Fac. de Ing. y Ciencias Hídricas, Univ. Nac. Litoral CC 217, 3000 Santa Fe. TELEFAX 54-42-571-143

**RESUMEN.** El método de recuento de coliformes con placas "Petrifilm™ E C", basado en la detección de la actividad enzimática de esas bacterias, es un método aprobado, según diversas normas oficiales, para análisis de alimentos. Aún no se conoce su capacidad para detectar coliformes termotolerantes (C To) en aguas recreacionales en relación con otros métodos clásicos, aún vigentes, como lo son los tubos múltiples de fermentación. Con ese objetivo, se compararon los recuentos de C To ( $44,5 \pm 0,2$  °C) realizados con placas Petrifilm incubadas durante 24 h (PEC<sub>24</sub>), con los recuentos obtenidos por método del Número Más Probable (NMP), en 67 muestras de ríos y lagunas de Santa Fe (Argentina). Los recuentos entre ambos métodos estuvieron correlacionados ( $r = 0,97$ ,  $p < 0,001$ ). El 95,5% de los recuentos PEC<sub>24</sub> se situaron dentro de los límites de confianza al 95% del NMP. La diferencia entre el promedio del PEC<sub>24</sub> y del índice NMP, no fue estadísticamente significativa ( $t = -1,09$ ,  $p = 0,27$ ), si bien el 60% de los recuentos superó al índice NMP. Se obtuvieron relaciones similares con placas incubadas durante 48 h (PEC<sub>48</sub>). Los recuentos PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> estuvieron relacionados entre sí por la ecuación de regresión lineal:  $PEC_{48} = 0,214 + 0,953 PEC_{24}$  ( $r = 0,99$ ;  $p < 0,001$ ). Por otra parte, el número de bacterias no coliformes que se desarrollaron en PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> también estuvieron correlacionadas entre sí ( $r = 0,99$ ;  $p < 0,001$ ) y con los coliformes termotolerantes ( $r = 0,788$ ;  $p < 0,001$ ).

**SUMMARY.** Evaluation of "Petrifilm™ E. coli" count plates for testing thermotolerant coliforms in recreational waters (Santa Fe, Argentina). The 3M Petrifilm™ E. coli count plate method (PEC), based in the detection of the enzymatic activity of coliform bacteria, is an approved method for the enumeration of E. coli and coliforms in many food types. Even now, it is not known its capacity to detect thermotolerant coliforms in recreational waters in relation to the Most Probable Number (MPN) procedures. With that objective, the PEC 24 h ( $44.5 \pm 0.2$  °C) was compared to OMS/CEPIS MPN method, in 67 samples of rivers and lakes of Santa Fe Province. The counts between both methods were correlated ( $r = 0.97$ ,  $p < 0.001$ ). The 95.5% of the PEC<sub>24</sub> counts were within the MPN 95% range. The difference between the average of the PEC<sub>24</sub> and the index MPN, was not statically significant ( $t = -1.09$ ,  $p = 0.27$ ), but the 60% of the PEC<sub>24</sub> counts were higher than the MPN index. For the 48 h PEC counts, similar relations were obtained. The counts PEC<sub>24</sub> and PEC<sub>48</sub> were correlated by the regression line equation:  $PEC_{48} = 0.214 + 0.953 PEC_{24}$  ( $r = 0.99$ ;  $p < 0.001$ ). In the other hand, non-coliforms bacteria counts (in PEC<sub>24</sub> and PEC<sub>48</sub>), were also correlated between them ( $r = 0.99$ ;  $p < 0.001$ ) and with thermotolerant coliforms ( $r = 0.788$ ;  $p < 0.001$ ).

## Introducción

Las enfermedades diarreicas producidas por aguas contaminadas continúan siendo un serio problema para los países en desarrollo y un problema menor, aunque crónico, en los países desarrollados (1). Los coliformes son utilizados en todo el mundo para la vigilancia de la calidad del agua dulce; por consiguiente, se han realizado numerosos esfuerzos para mejorar las técnicas y para que éstas brinden más información en menos tiempo (1).

Para estimar la calidad bacteriológica de las aguas recreacionales en nuestro país se utiliza habitualmente el recuento de coliformes termotole-

rantes (en adelante: C To); grupo que incluye, entre otras especies, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. Estas bacterias (anteriormente denominadas "coliformes fecales") se evalúan por el método del Número Más Probable (MNP) según definiciones y procedimientos tradicionales (2, 3). Hace más de 20 años, se desarrollaron métodos alternativos para el recuento de coliformes, basados en la detección específica de enzimas (-galactosidasa y -glucuronidasa), pero hace poco que fueron reconocidos como tales (4). En algunos métodos, se agregan cromógenos o fluorógenos a los medios de cultivo líquidos (sea para el test MNP, o para el test "presencia/ausencia"); en otros métodos, se utilizan medios agarizados y la tecnología de los filtros de membrana. Uno de los métodos más recientes es el que emplea películas secas rehidratables: placas "Petrifilm™ E. coli Count" (en adelante, "PEC"), producidas por 3M (EE UU). Las colonias

\* Trabajo presentado en el XVII Congreso Nacional del Agua y II Simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur.

de coliformes en el Petrifilm aparecen azules (*E. coli*) o rojas (otros coliformes) y con burbujas de gas. Las colonias que no son coliformes también son rojas, pero sin producción de gas. El recuento PEC ya fue evaluado y comparado con métodos estándares, principalmente con muestras de alimentos (5, 6), aunque no se realizaron recuentos comparativos de C To ( $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ) porque no es requerido por las normas alimentarias (generalmente:  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Por otra parte, 3M no ha documentado el uso de placas Petrifilm EC en industrias que no sean de alimentos y lácteos. Por ejemplo, en fármacos, cosméticos y agua (7).

No se encontraron trabajos publicados donde se comparen recuentos de termotolerantes PEC vs NMP en aguas naturales recreacionales. Por ese motivo, los objetivos de este trabajo fueron: 1) Comparar si existía una correlación estadísticamente significativa entre ambos métodos, y si era significativa la diferencia entre sus medias; 2) Determinar qué porcentaje de los recuentos PEC se situaba dentro de los intervalos de confianza al 95% del NMP, 3) Determinar cuántos recuentos PEC resultaban superiores e inferiores al índice NMP, 4) Determinar si el tiempo de incubación del PEC 24h (en adelante PEC<sub>24</sub>) y el de 48 h (PEC<sub>48</sub>) afectaba los resultados de las comparaciones, y 4) Qué ecuación podía relacionar los dos períodos de incubación para predecir el PEC<sub>48</sub> a partir del PEC<sub>24</sub>.

## Lugares de muestreo

Se obtuvo un total de 67 muestras de agua superficial (0,30 cm) de ríos y lagunas de la cuenca del río Salado (Santa Fe,  $31^\circ 39' 59''$  Latitud Sur y  $60^\circ 45' 20''$  Longitud Oeste) y del río Paraná (Santa Fe,  $31^\circ 42' 34''$  S y  $60^\circ 29' 07''$  W) durante el período comprendido entre junio 1997 y marzo 1998. Las muestras se recolectaron en el centro de las lagunas o del cauce de los ríos mencionados; excepto en los balnearios, donde se extrajeron cerca de las boyas que limitaban la zona. El muestreo se realizó con frascos de vidrio estériles de 500 ml; las muestras se mantuvieron refrigeradas ( $10^\circ\text{C}$ ) en una conservadora de hielo hasta su análisis, realizado dentro de las tres horas de su extracción.

Se recolectaron 20 muestras en el balneario "B. López" situado en el río Salado y 20 en el balneario "Juan de Garay", en la laguna Bedetti. Las características químicas, fisicoquímicas y bacteriológicas fueron descritas por Emiliani y González de Paira (8), y Emiliani, González Paira y Lajmanovich

(9). Según Emiliani y Paira (10), la calidad bacteriológica de ambos balnearios está periódicamente deteriorada por el aporte de aguas residuales ( $10^6 - 10^7$  C To /100 ml), pero el grado de deterioro provocado es muy variable, según factores hidrológicos y climáticos. Por ejemplo, el promedio de C To durante 1993-1994 en el río Salado fue de 1640 NMP/100 ml  $\pm$  1245 (n=11) y durante 1994-1995, de 16500 NMP/100 ml  $\pm$  14290ml (n=15).

También se recolectaron 18 muestras en otros ríos (Paraná y Correntoso) y en otras lagunas (Los Matadores, El Tigre), no afectadas por contaminaciones de origen humano. Sin embargo, en nuestra región los C To, al igual que en países cálidos (11), se pueden considerar autóctonos (12); una concentración de C To de 50/100 ml a 100/100ml es frecuente ( $\bar{x} = 119 \pm 117$ , n = 23). Esto posiblemente se deba a que tienen hábitats que pueden ser reservorios importantes de coliformes en nuestro sistema fluvial: las macrofitas acuáticas que colonizan lagunas y riberas de ríos. Por ejemplo, recuentos realizados en la rizósfera de *Eichhornia crassipes*, indican concentraciones desde  $10^3$  a  $10^5$ /100 ml de C To (12). Dada su importancia, también incluimos 9 muestras de rizósfera en este estudio.

## Material y métodos

### Análisis microbiológico

El recuento del NMP de C To se realizó según la OMS/CEPIS (3), utilizando cinco tubos por dilución e incubando durante 24 h a  $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$  en un baño termostático. El método es similar al de la APHA (4), pero permite, como alternativa, el uso del caldo McConkey. Algunos estudios (13) indican que este caldo puede dar recuentos más altos que los obtenidos con el caldo EC (adoptado por la APHA) porque se pueden desarrollar algunas bacterias anaerobias formadoras de esporas (dando falsos positivos). En ensayos preliminares y aplicando el *u-test* (14) con  $s = 0,259$ , no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos medios, en aguas del río Salado.

3M también produce Petrifilm para detectar solamente termotolerantes. Las normas para aguas recreacionales de algunos países (p. ej., Canadá, 11) aceptan el simple recuento de termotolerantes como alternativa de un recuento específico de *E. coli*, siempre que se haya demostrado que el grupo está conformado en un 90% por esta especie. Dado

que en nuestras aguas recreacionales no se conoce el porcentaje con que se presenta la especie, adoptamos el producto específico para recabar tal información (como no está relacionada con los objetivos de este trabajo, se detallará en otra publicación).

Las placas Petrifilm se utilizaron según indicaciones generales de los fabricantes (15), y con cuatro a cinco repeticiones por dilución. Como se sabe (14), el número total de colonias contadas en cada dilución en todas las placas, afecta el grado de precisión; en nuestro caso, los límites de confianza al 95% variaron entre  $\pm 20\%C$  y  $\pm 40\%C$  (donde  $C$  es el número de colonias). Ensayos preliminares mostraron que en ambientes no contaminados (excepto en muestras de rizósfera) el número de colonias era bajo y con una variación alta ( $\pm 100\%C$ ); por lo tanto, este tipo de muestras se procesó previamente por filtros de acetato de celulosa (Millipore<sup>TM</sup>, de 0,45  $\mu m$ ). El volumen filtrado fue variable, desde 5 hasta 100 ml. La técnica de filtración se complementó con la técnica de rehidratación (16), agregando 1 ml de agua estéril, una hora antes de insertar el filtro entre las dos láminas de Petrifilm. Este método no presenta inconveniente para visualizar colonias azules, pero puede ser incierta la asignación de burbujas a colonias rojas. Para cerciorarse de la presencia de colonias debajo de las burbujas, los Petrifilm se observaron a trasluz, se dejaban incubados más tiempo, o simplemente se levantaba la película.

Cada placa se separó de las restantes con papel absorbente (Multicorte Scott<sup>TM</sup>, de Kimberly-Clark Tissue) y cada muestra se colocó en una bolsa de plástico estéril a prueba de agua (Whirl-Pak<sup>TM</sup>, de Nasco). Ensayos preliminares indicaron que si no se incluían separadores de papel, las placas tendían a adherirse entre sí (por el vapor de agua formado), lo cual molestaba su manipulación posterior. Se incubaron a la misma temperatura y en el mismo baño termostático que los tubos múltiples de fermentación.

El recuento de  $C$  To (suma de colonias azules y rojas asociadas con gas) se realizó a las 24 h en las 67 muestras. Por problemas de infraestructura, los recuentos a las 48 h se pudieron realizar solamente con 54 muestras.

Las colonias azules sin gas pueden ser o no *E. coli* (5); para decidir si agregar o sustraerlas de la comparación con el NMP, se repicaban en el caldo confirmativo y se observaba si producían gas. La "Guía de interpretación" (15) sugiere no contar las colonias que a veces aparecen en la zona blanca, debido a que éstas se encuentran lejos de la influen-

cia selectiva del medio. En esa zona, aparecen azules o rojas, pero nunca con gas; a los fines comparativos de este trabajo, para decidir si computarlas o no, realizamos el mismo procedimiento que el detallado anteriormente, agregándolas al recuento si formaban gas repicadas en el caldo confirmativo.

Para averiguar qué ecuación podría relacionar los resultados obtenidos con el PEC según el tiempo de incubación (24 y 48 h), posteriormente se recolectaron muestras adicionales, en los cuerpos de agua mencionados anteriormente, para completar las 67 muestras. También se realizó el recuento de las colonias no coliformes (rojas no asociadas a burbujas de gas), a las 24 y 48 h. Para conocer si estas colonias podían pertenecer presuntamente al grupo de las pseudomonas fluorescentes, se repicaron 38 colonias desde el Petrifilm al caldo asparagina (4).

#### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Stagraphics® plus for Windows* v. 1,1 (Statistical Graphics Corp). Todos los valores implicados en los cálculos de los modelos de regresión y en las pruebas de hipótesis de diferencias de medias fueron transformados a sus logaritmos naturales en base 10 para disminuir la curvilinearidad de los datos, asegurar su distribución normal y reducir su dispersión (17, 18). Se realizaron análisis de regresión lineal para estimar la correlación entre los recuentos NMP, PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub>. Los modelos de regresión se compararon con el *test F* para determinar si la diferencia entre coeficientes de regresión era significativa (18). Las diferencias de los valores medios del índice del NMP y los PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> fueron evaluadas a través de sendos *test t*.

Según Matner *et al.* (5), debido a la falta de precisión de los recuentos por NMP, la comparación convencional entre los métodos NMP y PEC, pueden no ser apropiados. Por consiguiente, también comparamos los recuentos PEC con los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza del NMP al 95%. Cada recuento PEC que se situaba fuera del intervalo fue considerado diferente, en forma significativa del recuento por NMP. Se utilizó el *test* de los signos para comparar el número de recuentos PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> superiores e inferiores al índice NMP.

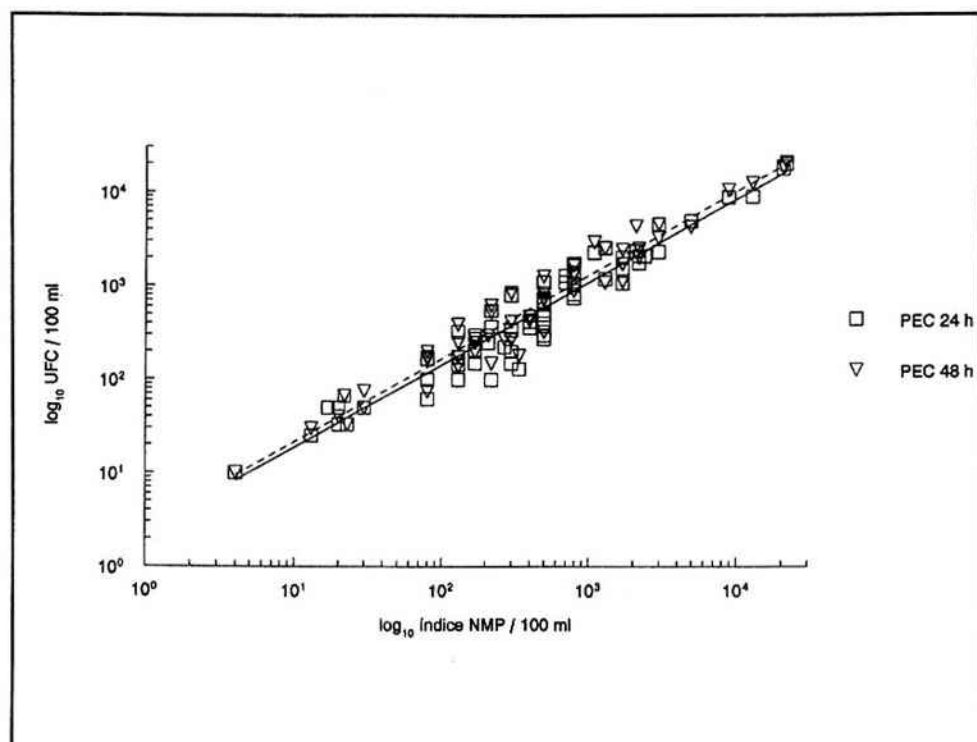
**Tabla 1.** índice del NMP vs PEC (24h y 48 h) para recuentos de coliformes termotolerantes: coeficientes de correlación y diferencias entre las medias.

	PEC 24 h	PEC 48 h
Número de muestras	67	54
Coefficiente de correlación (r)	0,97	0,98
Pendiente (b)	0,89 **	0,89 **
Intersección (a)	0,35 **	0,44 **
Diferencia entre las medias		
t	-0,53	-0,89
p	0,50 (ns)	0,37 (ns)

\*\* p < 0,001

(ns) = no significativa

**Figura 1.** Relaciones entre los coliformes termotolerantes determinados según el  $\log_{10}$  del índice NMP y el recuento en placas Petrifilm,  $\log_{10}$  PEC<sub>24</sub> (□) y  $\log_{10}$  PEC<sub>48</sub> (▽).



## Resultados

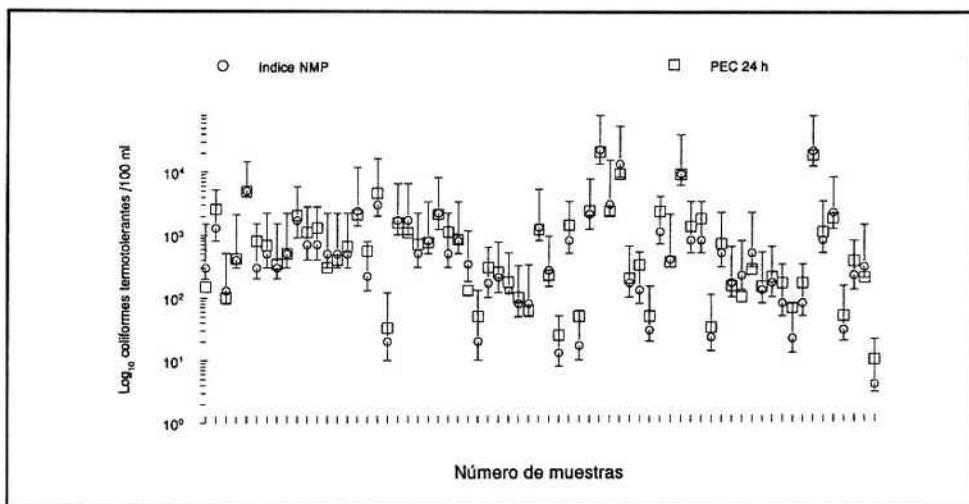
El índice del NMP estuvo correlacionado significativamente con los recuentos PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> (tabla 1, fig 1). La diferencia entre los coeficientes de regresión no resultó significativa ( $F_s = 1,8^{-1}$ ;  $p > 0,05$ ). Por otra parte, la diferencia entre las medias de los recuentos ( $\log_{10}$ ) obtenidos con el PEC<sub>24</sub> ( $2,74 \pm 0,09$ ;  $n = 67$ ) y PEC<sub>48</sub> ( $2,85 \pm 0,11$ ;  $n = 54$ ), con respecto a la media del índice NMP ( $2,53 \pm 0,10$ ;  $n = 67$  y  $2,70 \pm 0,12$ ;  $n = 54$ ) no resultó significativa (tabla 1). No obstante, el índice NMP fue superado en el 60% de los casos por PEC<sub>24</sub> y en el 77% por PEC<sub>48</sub>. Aplicando la dócima no paramétrica de los signos, el número de valores de

PEC<sub>24</sub> superiores e inferiores al índice NMP, no resultó significativo al 95% ( $p = 0,10$ ). En cambio, para PEC<sub>48</sub>, resultó significativo ( $p < 0,001$ ).

El 95,5% de PEC<sub>24</sub> y el 95% de los PEC<sub>48</sub> se encontraron dentro de los intervalos de confianza al 95% del NMP (fig. 2).

Los recuentos PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub> estuvieron correlacionados:  $r = 0,991$ ;  $n = 67$  (tabla 2). Los resultados obtenibles a las 48 h se podrían predecir con los obtenidos a las 24 h según una ecuación lineal simple, del tipo  $y = a + bx$ , donde  $y = \text{PEC}_{24}$ ,  $x = \text{PEC}_{48}$ ,  $a = 0,21$  (límites de confianza al 90% = 0,158 y 0,269) y  $b = 0,953$  (límites de confianza al 90% = 0,934 y 0,971).

**Figura 2.** Representación del  $\log_{10}$  del índice NMP (○). Las barras indican los límites superior e inferior (al 95%). El símbolo (□) indica la ubicación del valor del recuento obtenido con las placas Petrifilm ( $\log_{10}$  PEC<sub>24</sub>)



**Tabla 2.** Coeficientes de correlación entre recuentos PEC 24 h y 48 h y diferencias entre las medias ( $n = 67$ )

Coefficiente de correlación (r)	0,991
Pendiente (b)	0,95 **
Intersección (a)	0,21 **
Diferencia entre las medias	
PEC <sub>24</sub> :	$2,80 \pm 0,01$
PEC <sub>48</sub> :	$2,88 \pm 0,095$
t =	0,10
p =	0,91 (ns)

\*\*  $p < 0,001$

(ns) = no significativa

El mayor número de coliformes a las 48 h, con respecto al de las 24 h, se debió casi exclusivamente a la producción tardía de gas en las colonias rojas (no *E. coli*), muy raramente a la producción tardía de glucuronidasa (9,4 % de las observaciones). Las colonias azules sin gas aparecieron en el 47% de las muestras, pero representaron solamente el 1% de las azules con gas.

El número de bacterias no coliformes (tabla 3) estuvo asociado positivamente con los recuentos de C To, sea a las 24 o a las 48 h de incubación. El 60% de los 38 repiques demostró fluorescencia amarillo verdosa, celeste o anaranjada, en el caldo asparagina (APHA, 1992) después de 24 a 72 h de incubación, bajo luz UV.

**Tabla 3.** Coeficientes de correlación entre la concentración de bacterias no coliformes incubados durante 24 y 48 h (Nocoli<sub>24</sub> y Nocoli<sub>48</sub>) en relación con los coliformes termotolerantes (PEC<sub>24</sub> y PEC<sub>48</sub>) en placas Petrifilm, a 44,5 °C; n = 67. Entre paréntesis, el nivel de significancia.

	Nocoli 24	PEC 24	PEC 48
Nocoli <sub>24</sub>	---	0,778 (0,001)	0,768 (0,001)
Nocoli <sub>48</sub>	0,995 (0,001)	0,763 (0,001)	0,765 (0,001)

## Discusión y conclusiones

Los resultados indican que con ambos métodos se pueden obtener resultados comparables, pues el 95% de los recuentos PEC (o poco más, si se consideran los PEC<sub>24</sub>) se pueden situar dentro del 95% del intervalo de confianza del NMP. Ese porcentaje supera a los encontrados por Matner *et al.*, (5) en alimentos y a 35 °C (77 - 85%).

Si bien las diferencias entre las medias del índice NMP y las medias de PEC<sub>24</sub> o PEC<sub>48</sub> no son significativas, este último generalmente (el 77% de los casos) es más eficaz en la detección de coliformes termotolerantes. Por lo tanto, el PEC puede constituirse en un método alternativo para el análisis de la calidad bacteriológica de las aguas recreacionales de nuestra zona. Por otra parte, el método NMP tiene una serie de inconvenientes conocidos (dos tipos de incubadoras, incubaciones más prolongadas, gran despliegue de material de vidrio, etc.,) que no tiene el PEC.

Las correlaciones positivas entre los no coliformes Gram negativos y los C To no evidencian un antagonismo entre ambos grupos, que interfiera los recuentos de coliformes, como fuera observado por otros autores en recuentos a 35 °C (Brassard *et al.*, 1997) y en el método del NMP (5), más bien sugiere un origen común.

## Agradecimientos

A 3M-Argentina, División Microbiología, por el apoyo económico brindado al proyecto oportunamente presentado para su evaluación, y a los Lic. Diego J. Varrá y Esteban Di Bona (de la empresa 3M) por el asesoramiento ofrecido.

Deseamos agradecer también al personal del Instituto Nacional Limnología (CONICET): S. M. González de Paira, Ramón Regner, Gladis de Beguelín y Silvia Regner por su colaboración en los trabajos de campo y de laboratorio.

## Bibliografía

- 1- Grant, M. A. 1997. A new membrane filtration medium for simultaneous detection and enumeration of *Escherichia coli* and total coliforms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3526-3530.
- 2- American Public Health Association. 1985. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 17th ed. American Public Health Association (Washington).
- 3- OMS/CEPIS. 1983. GEMS/AGUA: "Sistema Mundial de Monitoreo del Ambiente". OMS/CEPIS (Ginebra).
- 4- American Public Health Association. 1992. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 19th ed. American Public Health Association (Washington).
- 5- Matner, R. R., Fox T. L., McIver D. E. y Curiale M. S. 1990.



Efficacy of Petrifilm TM *E. coli* Count Plates for *E. coli* and coliform enumeration. J.Food Protect., **53**: 145-150.

6- Curiale, M. S., Sons T., McIver D., McAllister J. S., Halsey B., Roblee D. y Fox T. L. 1991. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in Foods: Collaborative study. J.Assoc. Official Anal. Chem., **74**: 635-648.

7- 3M Microbiology Products. 1997. "3M Petrifilm *E. coli* / Coliform Count Plate". 3M Microbiology Products (Minnesota).

8- Emiliani, F. y González de Paira S. M. 1996. Concentraciones de coliformes termotolerantes en un balneario fluvial. Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral, **27**: 23-33.

9- Emiliani, F., González de Paira S. M. y Lajmanovich R. 1997. Frecuencia de aislamiento de *Vibrio cholerae* en aguas y en plancton de la cuenca inferior del río Salado (Santa Fe, Argentina). Rev. Arg. Microbiol., **29**: 195-201.

10- Emiliani, F. y S. M. González de Paira. 1995. Fuentes puntuales y dispersas de coliformes fecales en dos balnearios urbanos (p.: 41-45). En: Paoli (ed.) "Recursos Hídricos". Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe).

11- Toranzos, G. A. y McFeters G. A. 1997. Detection of indicator microorganisms in environmental freshwaters and drinking waters (p.: 184-194). En: Hurst *et al.* (eds). "Manual of Environmental Microbiology". American Society of Microbiology, ASM Press (Washington).

12- Emiliani, F. y González de Paira S. M. 1997. Bacterias coliformes en ambientes acuáticos no contaminados del río Paraná Medio (Santa Fe, Argentina): distribución y correlaciones con variables ambientales. Rev. Fac. Bioq. Cienc. Biol. (FABICIB) **1**: 39-51.

13- Geldreich, E. E. 1973. Fecal coliforms (p.: 25-42). En: "Proceedings of the First Microbiology Seminar on Standardization of Methods, San Francisco, California". United States Environmental Protection Agency. Document n° EPA-R4-73-022) (Washington).

14- Ormerod K., Bonde G. J. y Kristensen K. K. 1982. Bacteriological examination (p.:273-461). En: Suess (ed.), "Examination of Water for Pollution Control, A Reference Handbook. Vol. 3: Biological, Bacteriological Examination". World Health Organisation/ Pergamon Press (Oxford).

15- 3M Productos Microbiológicos. 1994. "Guía de Interpretación". 3M Microbiology Products (Minnesota).

16- Buhler, H. P., Luthi T. y Spuhler A. 1993. Microbiological evaluation of drinking-water: Modified application of the 3M Petrifilm system under field conditions. Schweiz. Z. Mitt. Med., **70**: 9-12.

17- Jones, J. G. 1979. "A Guide to Methods for Estimating Microbial Numbers and Biomass in Fresh Waters". Freshwater Biological Association (Ambleside).

18- Sokal, R. y Rohlf J. 1979. Biometría. Blume (Madrid).