

## DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BACTERIÓFAGOS INDICADORES DE *Vibrio cholerae* DETECTION, QUANTIFICATION AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF *Vibrio cholerae* INDICATOR BACTERIOPHAGES

Miguel Talledo<sup>1</sup>, Susana Gutiérrez<sup>1</sup>, Fernando Merino<sup>1</sup> y Nancy Rojas<sup>2</sup>

---

### RESUMEN

La especificidad entre bacteriófagos y bacterias es una característica utilizada exitosamente para la detección de varias especies microbianas. Por este motivo, la detección de vibriófagos es una herramienta útil de investigación y podría ser un método rápido y conveniente de diagnóstico de *Vibrio cholerae*. El objetivo de este estudio fue detectar vibriófagos en muestras de aguas marinas someras y determinar las características morfológicas de estos vibriófagos.

Se determinó la cinética de crecimiento de una cepa de *Vibrio cholerae* serotipo Inaba. Se analizaron cualitativa y cuantitativamente muestras tomadas de cinco puntos de un sector adyacente a la playa La Chira y de las desembocaduras del río Rímac y río Chillón, usándose distintos inóculos y varios períodos de incubación. Los bacteriófagos fueron concentrados y teñidos para el estudio morfológico por microscopía electrónica de transmisión.

Los resultados obtenidos indican que la detección de vibriófagos podría ser una herramienta importante como indicador de la presencia de *Vibrio cholerae*.

**Palabras claves:** *Vibrio cholerae*, vibriófagos, contaminación, aguas, bacteriófagos.

### ABSTRACT

The specificity between bacteriophages and bacteria is a feature that has been successfully used for the detection of several microbial species. For this reason the detection of vibriophages is a valuable research tool, and it might be a fast and convenient method to *Vibrio cholerae* diagnostics. The goal of this study was to detect vibriophages in shallow seawater samples and to determine the morphological characteristics of these vibriophages.

It was determined the growth kinetics of a strain of *Vibrio cholerae* serotype Inaba. Seawater samples taken from five shallow points from an adjacent sector to La Chira beach, and Rimac and Chillon river mouths were analysed qualitatively and quantitatively using different inoculum volumes and several incubation periods. The bacteriophages were concentrated and stained for the morphological study by transmission electron microscopy.

The results we obtained indicate that the vibriophages could be an important tool as a *Vibrio cholerae* indicator.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, vibriophages, pollution, water, bacteriophages.

---

### INTRODUCCIÓN

Desde que el Perú se vio afectado por una epidemia de cólera en 1991, que alcanzó a otros países de la región, se iniciaron una serie de estudios en nuestro país sobre el microorganismo causante de esta enfermedad. El vibrión colérico fue aisla-

do de diversas fuentes, entre las que se incluyen el río Rímac y el colector de La Chira, en muy altas concentraciones. La detección de esta bacteria ha seguido en todos los casos la metodología convencional (Delgado, 1991), que presenta como principal inconveniente el largo tiempo de procesamiento.

En nuestro país, un factor determinante en la dispersión del vibrión colérico ha sido la deficiente situación socioeconómica, que ha conducido a un dramático descenso en el nivel higiénico sani-

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana. Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

<sup>2</sup> Departamento de Patología. Facultad de Medicina - UNMSM.

tario, permitiendo de este modo que el *Vibrio cholerae* encuentre las condiciones ideales de desarrollo y asentamiento. Este hecho se vio reflejado claramente en la epidemia inicial del cólera que en el primer mes de su brote arrojó cerca de cincuenta mil casos de cólera en todo el país; esta cifra es comparable por su similitud a la que indicó la Organización Mundial de la Salud (OMS) para los casos de cólera que se presentaron en todo el mundo en el año 1990 (WHO, 1991).

Con el vibrión en el mar, las condiciones fisicoquímicas de este medio se presentan como el principal escollo que encuentra este microorganismo para sobrevivir, ya que es hostil a él (Barua, 1970). Sin embargo, y en contraposición a este hecho, ha sido reportado que este bacilo, que puede penetrar a las aguas costeras a través de las aguas residuales (Wood, 1977; Garay *et al*, 1985), es capaz de soportar las condiciones allí presentes por períodos variables, los cuales han sido fijados en un promedio de diez a trece días, período que va en aumento a medida que la temperatura del agua de mar es menor (Barúa, 1970; Yates *et al*, 1985; Pérez-Rosas y Hazen, 1989).

Con todo esto en consideración, se hace evidente que la contaminación por *Vibrio cholerae* es un hecho que reviste suma gravedad, ya que sus vehículos contribuyen en grado diverso a que un gran número de personas sufran esta peligrosa enfermedad, que desde el punto de vista epidemiológico se traduce en endemias, epidemias y pandemias (Mukerjee, 1970).

En respuesta al peligro que significa la presencia del vibrión colérico en nuestro país, se ha convertido en una necesidad imperiosa el poder perfeccionar las estrategias con las que actualmente se cuenta para luchar efectivamente contra este mal, haciendo uso de una serie de políticas y programas propuestos y supervisados por la OMS. Aparte de la prevención mediante la adopción de una serie de medidas de seguridad sanitaria, existe otro aspecto, igualmente importante, basado en las técnicas de detección y el modo en que éstas se empleen. La relevancia de éste hecho es mayor si se toma en cuenta la aparición de nuevas cepas del vibrión colérico, cuya patogenicidad es mayor y

representan un nuevo desafío a la epidemiología de esta enfermedad (Higa *et al*, 1993; Islam *et al*, 1994; Nair y Shimada, 1994; Pajni *et al*, 1995).

Aunque en los últimos años se están probando nuevas tecnologías para la tipificación de cepas bacterianas (Bannerman *et al*, 1995), un método bastante preciso para identificar de modo indirecto al *Vibrio cholerae* es el uso de bacteriófagos específicos para este microorganismo, que tienen como una de sus características parasitarlo; estos virus son conocidos también como colerófagos o vibriófagos (Ackermann *et al*, 1984). La adecuada manipulación de estos virus permite una mejor detección y conocimiento de la ecología y la genética de las bacterias a las que afectan y constituye en la actualidad un campo de estudio científico que tiene plena vigencia y amplios horizontes de desarrollo (Brock y Madigan, 1993; Guidolin y Manning, 1987).

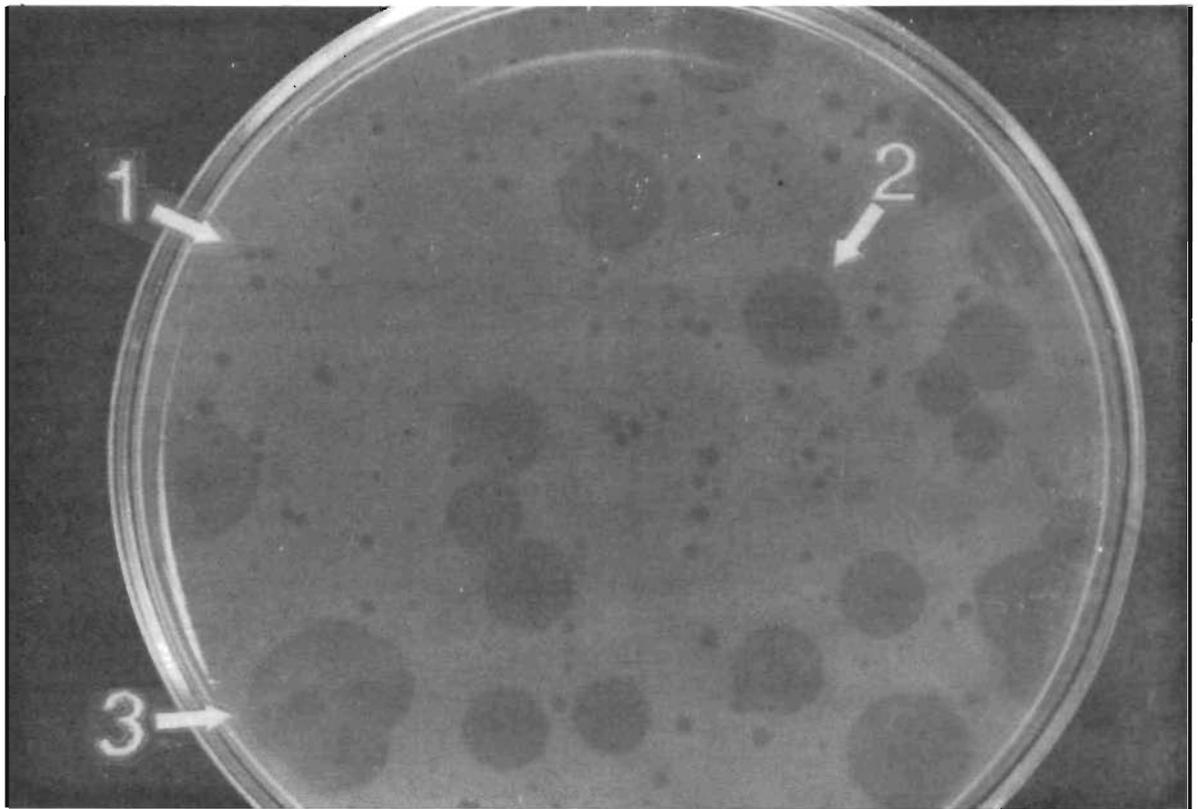
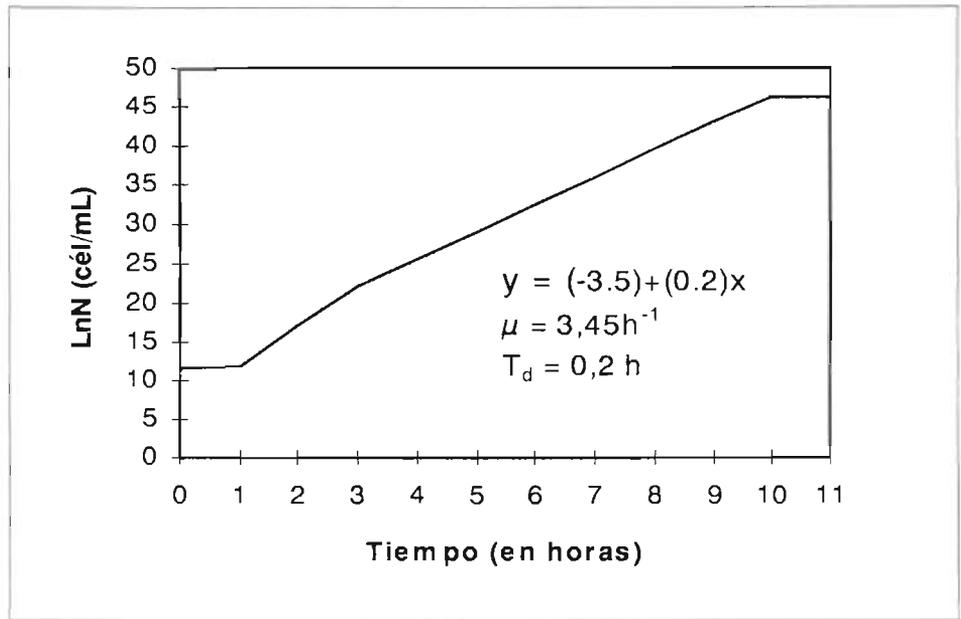
No existe actualmente en el Perú un criterio definido sobre la forma en que los bacteriófagos de *Vibrio cholerae* podrían usarse en favor de la detección y cuantificación de este microorganismo en aguas, por lo que este trabajo constituye un nuevo aporte en su género a nivel nacional y abre las puertas a una serie de investigaciones que pueden ser llevadas a cabo en busca de combatir de manera indirecta los estragos que el cólera puede causar en nuestro país.

Los objetivos de este estudio han sido determinar la presencia de *Vibrio cholerae* en forma indirecta y cuantificarlo mediante el uso de vibriófagos aislados de aguas marinas someras, así como determinar algunas de las características morfológicas de estos vibriófagos.

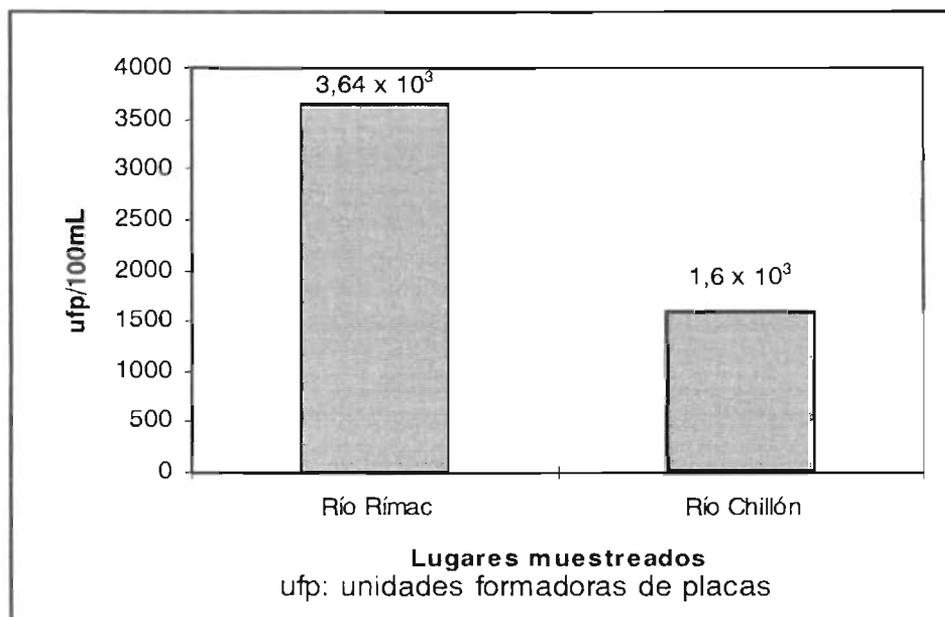
## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cepa y cinética de crecimiento.**- Se utilizó la cepa de *Vibrio cholerae* PACINI 1854, 411 Serotipo Inaba como estándar positivo, proporcionada por el Instituto Nacional de Salud del Niño. Para determinar el tiempo de incubación necesario para que el vibrión alcance la fase exponencial de crecimiento, se estudió su cinética de crecimiento según metodología previamente difundida (Sharp, 1969; Sokach, 1969).

**Figura 1.** Análisis de la cinética de crecimiento del *Vibrio cholerae* en agua peptonada alcalina. De acuerdo al número de células, a las 2 horas el cultivo de *V. cholerae* ya ha entrado a la fase logarítmica.



**Figura 2.** La placa Petri fue inoculada con muestra de agua somera sin diluir procedente de una zona adyacente a la desembocadura del río Rímac. Se puede apreciar la abundante formación de zonas o placas de lisis pequeñas (1), así como otras de mayor diámetro (2), algunas de las cuales han confluido (3). (Fotografía: Luis Torres T.)



**Figura 3.** Gráfico que muestra la presencia de bacteriófagos contra *Vibrio cholerae* en dos zonas donde se tomaron muestras. Se observa la mayor concentración de estos bacteriófagos en la zona de la desembocadura del río Rímac.

**Toma de muestras.**- Las muestras de agua de mar fueron obtenidas de zonas someras de tres puntos de la costa de Lima: playa La Chira, en el sector adyacente al colector de aguas servidas que existe en el lugar; desembocadura del río Chillón y desembocadura del río Rímac, entre febrero y marzo de 1991. En cada una de estas zonas se tomaron cinco muestras, cada una a 100 m de la siguiente, tratando de cubrir la zona de influencia de las descargas, para lo cual se utilizaron frascos estériles de 1000 mL y con los que se tomaron las muestras a 15 cm por debajo de la superficie del agua. El volumen muestreado fue 1000 mL por muestra. Todas las muestras fueron transportadas en recipientes refrigerados para su inmediato procesamiento en el laboratorio.

**Procesamiento de muestras.**- Estas fueron centrifugadas y filtradas en membrana de nitrocelulosa de porosidad  $0,45\mu\text{m}$ . Se llevaron a cabo dos tipos de análisis de las muestras: análisis cualitativo o lisis en medio líquido (agua peptonada alcalina pH=8,6) y análisis cuantitativo o lisis en medio sólido (agar tripticosa soya), conocido también como método de la bicapa de agar (Adams, 1959).

Se tomó en cuenta la multiplicidad de infección usando dos volúmenes distintos de inóculo (0,1 mL y 1 mL) para determinar el volumen

óptimo a utilizar. Asimismo, se emplearon tiempos de incubación de 2, 4 y 6 horas y la temperatura de incubación en todos los casos fue de  $37^\circ\text{C}$ . Además, se consideraron algunas características de las placas de lisis, como forma, diámetro y aspecto de las mismas. A partir de las diversas placas de lisis obtenidas, se purificaron los bacteriófagos que luego fueron enfrentados a la cepa de *V. cholerae*.

**Microscopía electrónica.**- Se trabajó con lisados del cultivo de *Vibrio cholerae*. A estas muestras se les aplicó el método de tinción negativa con ácido fosfotúngstico como paso previo a su observación al microscopio electrónico de transmisión (Ghosh *et al*, 1989).

## RESULTADOS

La cepa de *Vibrio cholerae* creció con una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $3,45\text{h}^{-1}$ , y con un tiempo de duplicación (td) de 12 min. (Figura 1). De los diferentes tiempos de incubación probados, sólo en la incubación por 2 horas se obtuvieron resultados óptimos, como era de esperar según el análisis de la cinética de crecimiento. El uso de dos volúmenes de inóculo de muestra permitió determinar que el de 0,1 mL era óptimo para la lectura de las placas de lisis.

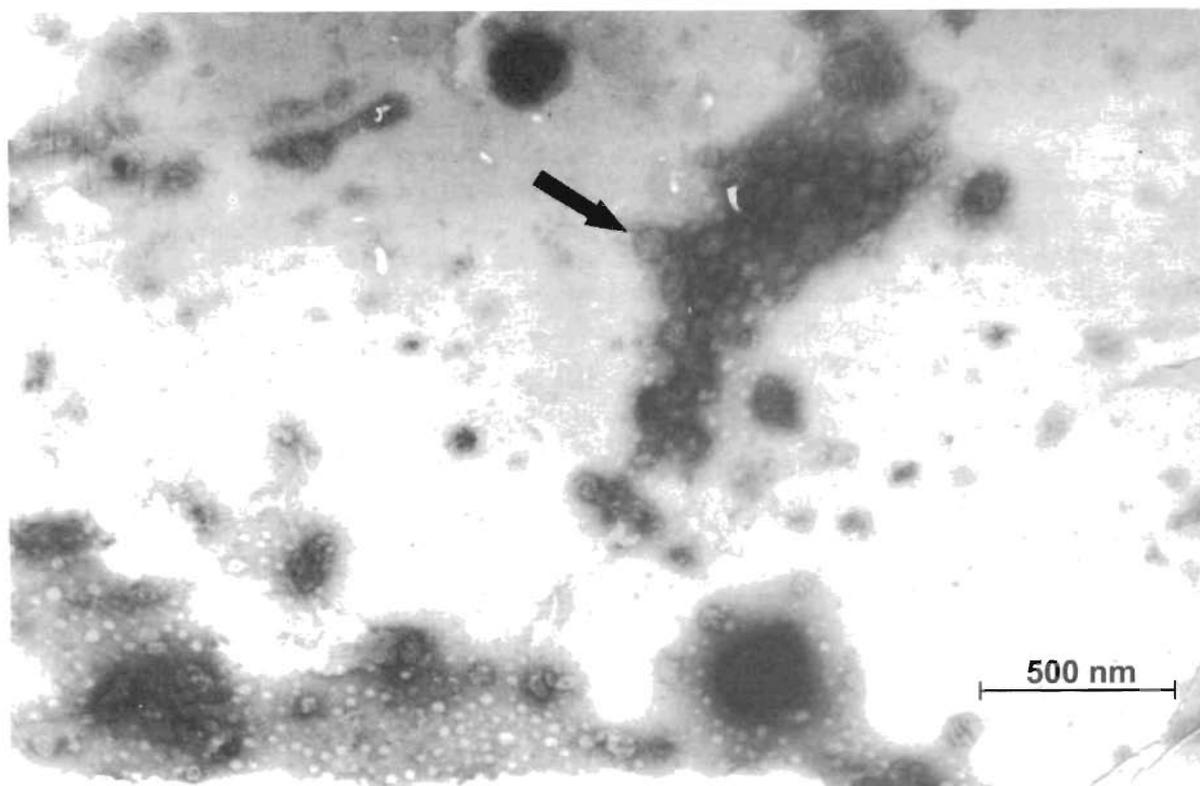
Las placas de lisis obtenidas tuvieron forma circular, claras a trasluz y limpias. Presentaron diferentes diámetros, que estuvieron en el rango de 0,1 cm a 0,9 cm. De la misma forma se observaron placas de lisis confluentes, aunque la mayoría aparecieron perfectamente individualizadas (Figura 2).

El análisis cualitativo dio positivo para dos de cinco muestras obtenidas en la playa La Chira. Por otra parte, dos de cinco muestras de la desembocadura del río Chillón y tres de cinco muestras de la desembocadura del río Rímac dieron positivo a este análisis.

El análisis cuantitativo fue positivo en dos de las tres zonas estudiadas, determinándose la concentración de fagos en estas zonas (Tabla 1).

Al comparar los resultados del análisis cuantitativo de las muestras de las desembocaduras del río Chillón y río Rímac ( $1,6 \times 10^3$  ufp/100 mL y  $3,64 \times 10^3$  ufp/100 mL al promedio aritmético), se observó una concentración de fagos menor en la primera de ellas, como se puede comprobar en la Figura 3.

La microscopía electrónica de las muestras demostró que los vibriófagos aislados tienen una



**Figura 4.** Micrografía electrónica que muestra cápsides de vibriófagos (flecha) purificados de placas de lisis en bicapa de agar obtenidas a partir de una muestra de agua de mar. Se utilizó una técnica de tinción negativa para resaltar estas estructuras. (Micrografía electrónica: Blga. Nancy Rojas).

**Tabla 1.** Resultados de la detección y cuantificación de vibriófagos en las muestras obtenidas de las zonas de estudio.

Zona	A. Cualitativo	A. Cuantitativo
Playa La Chira	Positivo en dos de cinco puntos	Negativo
Desembocadura río Chillón	Positivo en 3 de 5 puntos	$1,6 \times 10^3$ ufp/100mL
Desembocadura río Rímac	Positivo en dos de cinco puntos	$3,64 \times 10^3$ ufp/mL

cápside de simetría icosaédrica, sin presentar una cola visible. El diámetro de la partícula viral es de 88nm (Figura 4).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se conoce ampliamente, *Vibrio cholerae* es detectado mediante la aplicación de una metodología estandarizada que se ha caracterizado por un fácil manejo y por la obtención de resultados consistentes (WHO, 1991). Otros aspectos relacionados a la identificación de este microorganismo, como la serotipia y fagotipia (Mukerjee, 1962; Basu y Mukerjee, 1968; Drozhevskina y Arutyunov, 1979; Lee y Furniss, 1981; Biswas *et al*, 1992) han sido bastante estudiados. La fagotipia de esta bacteria no ha demostrado ser de utilidad profiláctica o terapéutica (Mukerjee, 1970), lo que ha originado que los estudios en este campo hayan sido redirigidos hacia el desarrollo de técnicas de detección, teniendo en cuenta, fundamentalmente, la alta especificidad que muestran los bacteriófagos frente a sus hospederos. El presente estudio ha empleado la detección de bacteriófagos de *Vibrio cholerae* por visualización de lisis en medio líquido y por la formación de placas de lisis en medio sólido, al punto de determinar la concentración de estos bacteriófagos en los puntos muestreados y reconocer algunas características morfológicas de los mismos.

El vibrión colérico no es capaz de permanecer viable por mucho tiempo en agua de mar (Barua, 1970). Esta bacteria puede llegar a estos ambientes por una serie de medios, principalmente por aguas residuales (Wood, 1977). La observación de la Figura 3 apoya esta afirmación, al mostrar una comparación entre la concentración de ufp/100 mL hallada en el litoral relacionado a la

desembocadura del río Chillón y la de aquél adyacente a la desembocadura del río Rímac; esta figura muestra una mayor presencia de vibriófagos en la segunda zona. En ésta, situada en el Pueblo Joven Acapulco, de la Provincia Constitucional del Callao, existe un colector de desagües que descarga su contenido en el mar. A pesar de que la zona de la desembocadura del río Chillón arroja una concentración mucho menor (menos del 50%) de lo hallado en la zona del río Rímac, es menester anotar que la descarga del primero configura un factor importante para la llegada del microorganismo hospedero al litoral costero. Su detección por medio de bacteriófagos parecer ser posible. Mediante esta metodología y otras, de corte convencional, se ha podido determinar su utilidad como índice de contaminación fecal en algunas zonas litorales del país (Aguilar y López, 1990) y también su empleo como marcador de vigilancia epidemiológica. Sin embargo, se sugiere la realización de un estudio a mayor escala en estas zonas para validar el empleo de estos elementos como indicadores de contaminación por *Vibrio cholerae*.

El análisis cualitativo de las muestras (lisis en medio líquido) arroja una importante evidencia de la presencia del vibrión colérico, pero al mismo tiempo no es capaz de indicarnos la concentración del mismo en los puntos muestreados. Este objetivo se consigue mediante la aplicación del análisis cuantitativo, o lisis en medio sólido, basado en la técnica de Adams (1959). Esta técnica, fue modificada en su contenido de agar, utilizándose a un 75% de la original para facilitar el manejo de este agar en la formación de la bicapa, al conseguir un mayor tiempo de manipulación en estado líquido. Este paso a través de un agar licuado es importante, pues permite una correcta homogeneización

del inóculo de muestra frente al inóculo de *Vibrio cholerae*. La solidificación temprana del agar estropea las placas de lisis que pudiera aparecer en la placa Petri y con ello dificultar la lectura y conteo de las mismas. En nuestro caso, el uso del sistema de baño maría facilitó enormemente esta tarea, permitiendo la observación de las placas de lisis en la forma esperada.

La observación de la forma, tamaño y disposición de las placas de lisis permite la determinación de algunos rasgos de la relación fago-bacteria; por esta razón, una lectura cuidadosa de las mismas es bastante importante. Si bien es cierto se suele considerar que las diferencias en las características de las placas de lisis indican la presencia de distintos bacteriófagos infectantes, esto no siempre es el caso, lo cual se comprueba en nuestra investigación por el hecho de que, a pesar de haber purificado bacteriófagos a partir de placas de lisis de diverso diámetro, en todas las muestras la microscopía electrónica mostró siempre bacteriófagos con las mismas características específicas de forma y tamaño. Un estudio más profundo, que involucre la extracción y digestión de DNA de los bacteriófagos aislados, podría dar evidencia de alguna variabilidad. Algunos detalles de la relación fago-bacteria son susceptibles a variaciones, dependiendo ello de diversos factores.

La siembra e incubación del microorganismo colérico toma la mayor parte del análisis de una sola muestra, pero aún así cabe resaltar que la técnica misma es rápida, muy específica y de bajo costo. El perfeccionamiento de ésta es muy importante para la determinación de otro tipo de características de los bacteriófagos que afectan al vibrión colérico, como son los rasgos fisicoquímicos y de ultraestructura, lo que puede llevarnos a un mejor conocimiento de estos virus y de su ecología.

La purificación de bacteriófagos se desarrolla en base a la formación de placas de lisis obtenidas a partir de las muestras de agua de mar. Esto conduce en última instancia al estudio de las características morfológicas de la partícula viral. Al mismo tiempo está íntimamente relacionada con la

propagación de estos bacteriófagos, puesto que se requiere de una mínima cantidad para poder llevar estas muestras al microscopio electrónico. En el presente estudio este proceso tuvo mucha similitud al efectuado para la determinación de concentración de fagos en las muestras de agua de mar, con la diferencia de que en este paso no interesó tanto el número de placas formadas, sino el poder recortar estas placas (puesto que es donde se concentra la mayor cantidad de bacteriófagos) y resuspenderlas en un caldo de cultivo con *Vibrio cholerae* para permitir su multiplicación y obtener un título alto de fagos en la muestra.

Con respecto a la morfología de los bacteriófagos aislados, las micrografías electrónicas obtenidas muestran formas hexagonales tanto en el caso de placas de lisis grandes como de placas pequeñas. Esta forma ha sido reportada previamente para los bacteriófagos específicos para esta especie de vibrión (Chattopadhyay *et al.*, 1993) en la India, aunque la proporción entre ancho y altura de la misma es muy variable aun dentro de los bacteriófagos que afectan a este género de bacterias. No obstante, es necesario subrayar que se requiere de un estudio más amplio (en términos geográficos y en este tipo de medio) para saber si esta morfología de vibriófagos es la única que se presenta en nuestro medio o si existen otras variantes virales que afecten a la cepa epidémica del *Vibrio cholerae*.

## AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al señor Luis Torres T. por su colaboración para las tomas fotográficas.

## LITERATURA CITADA

- Ackermann, H-W.; S.S. Kasatiya; T. Kawata; T. Koga; J.V. Lee; A. Mbiguino; F.S. Newman; J-F. Vieu y A. Zachary. 1984. Classification of *Vibrio* bacteriophages. *Intervirology* 22:61-71.11. Brock, T.D. y Madigan, M.T. 1993. Microbiología. Sexta Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México. 956 pp.
- Adams, M. 1959. Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc. New York.
- Aguilar, M., y C. López. 1990. Determinación del colifago en agua de mar como un indicador de contaminación

- fecal. Resúmenes del VIII Congreso Peruano de Microbiología y Parasitología. Lima.
- Bannerman, T.L.; G.A. Hancock; F.C. Tenover y J.M. Miller. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol* **33**:551-555.
- Barua, D. 1970. Supervivencia del vibrión colérico en los alimentos, el agua y los fomites. En: Principios y Práctica de la Lucha contra el Cólera. O.M.S. Ginebra. pp. 29-31.
- Basu, S. y S. Mukerjee. 1968. Bacteriophage typing of *Vibrio eltor*. *Experientia* **24**(3):299.
- Biswas, S.K.; R. Chowdhury y J. Das. 1992. A 14-kilodalton inner membrane protein of *Vibrio cholerae* biotype El Tor confers resistance to group IV cholera phage infection to classical vibrios. *J Bacteriol* **174**:6221-6229.
- Brock, T. y M. Madigan. 1993. Microbiología. Sexta ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. México. 956 pp.
- Chattopadhyay, D.J.; B.L. Sarkar; M. Ansari; B. Chacrabarty; M. Roy; A. Ghosh y S. Pal. 1993. New phage typing scheme for *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains. *J. Clin Microbiol* **31**:1579-1585.
- Delgado, A. 1991. El cólera. Unidad de Epidemiología Hospital Dos de Mayo. Departamento de Medicina de la UNMSM. Lima.
- Drozhevskina, M. y Y. Arutyunov. 1979. Phage typing of *Vibrio cholerae* using a new collection of phages. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **23**:340-347.
- Garay, E.; A. Arnau y C. Amaro. 1985. Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. *Appl Environm Microbiol* **50**:426-430.
- Ghosh, A.N.; M.Q. Ansari y G. Datta. 1989. Isolation and morphological characterization of El Tor cholera phages. *J Gen Virol* **70**:2241-2243.
- Guidolin, A. y P.A. Manning. 1987. Genetics of *Vibrio cholerae* and its bacteriophages. *Microbiol. Reviews.* **51**:285-298.
- Higa, N.; Y. Honma; M.J. Albert y M. Iwanaga. 1993. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal isolated from patients with cholera-like disease in Bangladesh. *Microbiol Immunol* **37**:971-974.
- Islam, M.S.; M.K. Hasan; M. Miah; M. Yunus; K. Zaman y M.J. Albert. 1994. Isolation of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal from the aquatic environment in Bangladesh: implications for disease transmission. *Appl Environm Microbiol* **60**:1684-1686.
- Lee, J. y A. Furniss. 1981. The phage typing of *Vibrio cholerae* serovar O1. En: Acute enteric infections in children, new prospects for treatment and prevention. Elsevier/North Holland Publishing Co. Amsterdam, pp. 119-122.
- Mukerjee, S. 1962. Characterization of cholera typing phages. V. Antigenic specificity. *Ann Biochem exp Med* **22**:5-8.
- Mukerjee, S. 1970. Bacteriófagos. En: Principios y Práctica de la Lucha contra el Cólera. O. M.S. Ginebra. pp. 39-45.
- Nair, G.B. y T. Shimada. 1994. Characterization of phenotypic, serological and toxigenic traits of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *J. Clin Microbiol* **32**:2775-2779.
- Pajni, S.; C. Sharma; N. Bashin; A. Ghosh; T. Ramamurthy; G.B. Nair; B. Das; S. Kar y S. Roychowdhury. 1995. Studies on the genesis of *Vibrio cholerae* O139: identification of probable progenitor strains. *J Med Microbiol* **42**:20-25.
- Pérez-Rosas, N. y T. Hazen. 1989. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *App. and Environm. Microbiol.* **55**:495-499.
- Sharp, M.S. 1969. Laboratory instructions in biology of microorganisms. C.V. Mosby, Co., New York.
- Sokach, J.R. 1969. Bacterial physiology and metabolism. Academic Press, New York.
- Wood, P.C. 1977. Manual de higiene de los mariscos. Ed. Acibia, Zaragoza.
- World Health Organization. 1991. Cholera in Peru. *Weekly epid. record* **66**:141-148.
- Yates, M.; C. Gerba y L.M. Kelley 1985. Virus persistence in groundwater. *App. and Environm. Microbiol.* **49**:778-781.