

USO DE COLIFAGOS SOMÁTICOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN PLAYAS DE “LA COSTA VERDE”, LIMA–PERÚ

USE OF SOMATIC COLIPHAGES AS INDICATORS OF FAECAL POLLUTION IN BEACHES OF “LA COSTA VERDE”, LIMA–PERU

Hinsby Cadillo Quiroz y Jorge León Quispe*

RESUMEN

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el uso de los colifagos somáticos como indicadores de contaminación fecal en aguas recreacionales marinas. Los colifagos somáticos fueron cuantificados en 140 muestras provenientes de 5 playas del circuito de la “Costa Verde”, Lima, y correlacionados con los indicadores de contaminación fecal convencionales (Coliformes fecales, *E. coli* y Enterococos).

Los colifagos fueron determinados por el método de “capa simple” previa aplicación de la técnica modificada de “filtración de la muestra” y utilizando a *E. coli* ATCC 13706 como cepa hospedero. Los Coliformes fecales (CF), *E. coli* (EC) y Enterococos (EN) fueron cuantificados por el método del Número Más Probable (NMP). Para efectos de análisis estadístico se consideró niveles de contaminación fecal en función de valores arbitrarios de <1000 CF/100 mL (“baja contaminación”) y >1000 CF/100 mL (“alta contaminación”).

Las playas evaluadas presentaron niveles de contaminación fecal de <3 a $2,4 \times 10^5$ CF y EC y <3 a $2,4 \times 10^4$ EN. En las muestras con “baja contaminación” fecal, el 32% de los recuentos de los colifagos fueron mayores que los de CF y EC; mientras que en las muestras con “alta contaminación” ningún recuento de colifagos superó a los de CF o EC. Por otro lado, de acuerdo al análisis estadístico de componentes principales los colifagos y Enterococos fueron los mejores indicadores de contaminación fecal en las playas evaluadas. Asimismo, se determinó correlaciones estadísticamente significativas entre colifagos, CF y EC; siendo mayor en muestras con alta contaminación ($r = 0,89$) que en aquellas con baja contaminación ($r = 0,43$). Mediante la cuantificación de colifagos en las muestras evaluadas se determinó estadísticamente el valor de 115 UFP/100 mL como criterio calificativo de balneabilidad para las playas de la zona evaluada.

De acuerdo a nuestros resultados los colifagos somáticos podrían emplearse como una alternativa de indicadores de contaminación fecal en aguas recreacionales marinas.

Palabras clave: Contaminación fecal, indicadores, colifagos somáticos, aguas recreacionales marinas, calidad de agua.

ABSTRACT

This study was undertaken in order to assess the use of somatic coliphages as faecal pollution indicators in recreational seawater. In 140 samples from 5 beaches at the “Costa Verde” circuit, Lima, somatic coliphages were enumerated and correlated with conventional faecal pollution indicators (Faecal coliforms, *E. coli* and enterococci).

After sample treatment with the “Sample Filtration” modified technique, somatic coliphages were assayed by the “Single-Agar-Layer” method using the strain *E. coli* ATCC 13706 as the bacterial host. Faecal coliforms (FC) *E. coli* (EC) and enterococci (EN) were enumerated by the Most Probable Number method. In the statistical analysis, we took into account faecal pollution levels based on arbitrary values such as <1000 CF/100 mL (“Low pollution”) and 1000 FC/100 mL (“High pollution”).

*Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
E-mail: hinsby@latinmail.com

The beaches surveyed showed faecal pollution levels from <3 to $2,4 \times 10^5$ to both FC and from EC, and <3 to $2,4 \times 10^4$ EN. In samples with "low pollution" the 32% of coliphage's counts were greater than those of FC and EC, whereas on samples with "High pollution" no count was bigger than any of FC and EC. On the other hand, according with the principal component analysis, coliphages and enterococci were the best indicators of faecal pollution in the surveyed beaches.

Furthermore, statistically significant correlations were determined between somatic coliphages with FC and EC; being greater on samples with "High pollution" ($r = 0,89$) than those in samples with "low pollution" ($r = 0,43$). From coliphages determination in the samples evaluated it was determined the value of 115 UFP/100 mL as a guideline for recreational seawater in the beaches under study.

According with the results of this study, the somatic coliphages could be used as alternative faecal pollution indicators in recreational seawater.

Key words: faecal pollution, indicators, somatic coliphages, recreational seawater, water quality.

INTRODUCCIÓN

Dentro del contexto de protección de la salud pública, es imperativa una adecuada y constante evaluación de la calidad sanitaria de las playas. Por tal motivo los microorganismos indicadores tales como Coliformes fecales, *Escherichia coli* y Enterococos, han venido siendo comúnmente utilizados para evaluar la contaminación fecal y estimar el riesgo para la salud en aguas recreacionales marinas (WHO, 1998). Sin embargo, otros estudios han mostrado ciertas deficiencias en su empleo, particularmente los Coliformes fecales que en aguas marinas presentan una baja supervivencia (Labelle et al., 1980; Borrego et al., 1983; Sinton et al. 1999) y una baja correlación con la presencia de bacterias y virus patógenos (Stetler, 1984; Borrego et al., 1990; Alvarado et al., 2000). En este sentido, estos indicadores no reflejarían la calidad real de las aguas, por lo que es necesario considerar otros indicadores.

Trabajos previos han sugerido que los colifagos somáticos podrían ser utilizados como indicadores alternativos de contaminación fecal en ambientes marinos (Borrego et al., 1987; Sinton et al., 1999).

Así, el uso de colifagos como indicadores fecales es ventajoso debido principalmente a su presencia constante en aguas con contaminación residual, no proliferan fuera de su huésped, son fácilmente enumerados por métodos

simples con resultados en horas y principalmente porque presentan una mayor resistencia y supervivencia que los indicadores convencionales (Borrego et al., 1987; Kott, 1992).

Particularmente en ambientes marinos, anteriores estudios han mostrado que los colifagos somáticos se inactivan de manera similar a *Salmonella* sp. (Borrego et al., 1990) y se correlacionan positivamente con virus entéricos (Simkova y Cervenka, 1981; Stetler, 1984). Además, se ha determinado que los colifagos somáticos son más prevalentes que los colifagos F-específicos (Cornax et al., 1991; Ricca y Cooney, 1999), debido principalmente a una mayor resistencia frente a las altas radiaciones solares que son comunes en dichos ambientes (Sinton et al., 1999).

El presente estudio fue realizado con el objetivo de evaluar el uso de los colifagos somáticos como indicadores alternativos de contaminación fecal en aguas recreacionales marinas y proponer un nivel guía de calificación sanitaria (balneabilidad) basado en colifagos para las playas evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugares de muestreo

Para este estudio se escogieron 5 playas del circuito de la "Costa Verde", Lima, Perú: Pampilla, Barranquito, Regatas y Cultural Lima (Fig. 1). Las playas fueron selecciona-

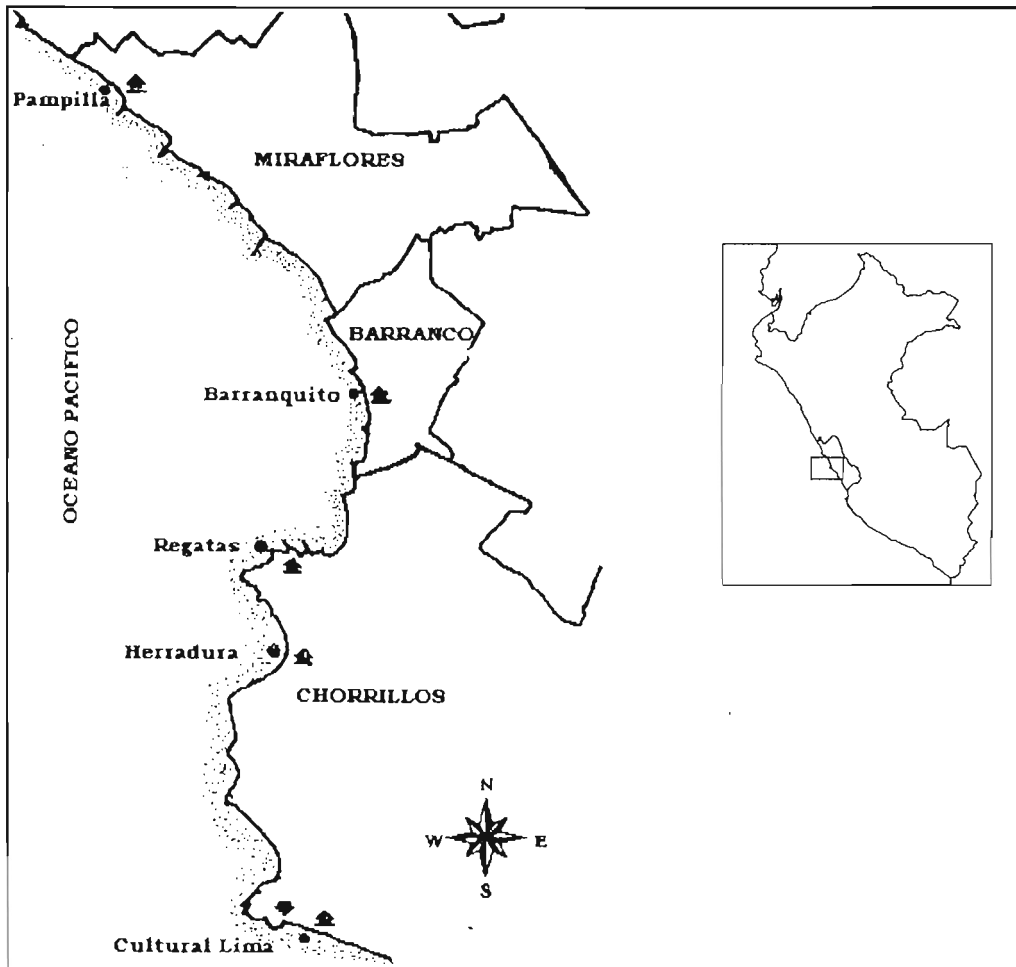


Figura 1. Lugares de muestreo. Playas del Circuito de la "Costa Verde", Lima, Perú.

das tomando como criterio registros previos de contaminación fecal con la finalidad de evaluar los colifagos dentro de un amplio rango de muestras contaminadas que va desde el mínimo hasta el más severo.

Muestreo

Muestras de agua de mar (250-500 mL) fueron colectadas en las playas previamente

escogidas con una frecuencia semanal durante el periodo comprendido entre los meses de noviembre de 1999 a junio del 2000 hasta completar un total de 140 muestras. La toma de muestras se realizó entre 15-20 cm de profundidad en frascos previamente esterilizados, luego transportados al laboratorio a 4 °C y analizados dentro de las 3 horas (h) posteriores a su colecta según la metodología recomendada por APHA (1995).

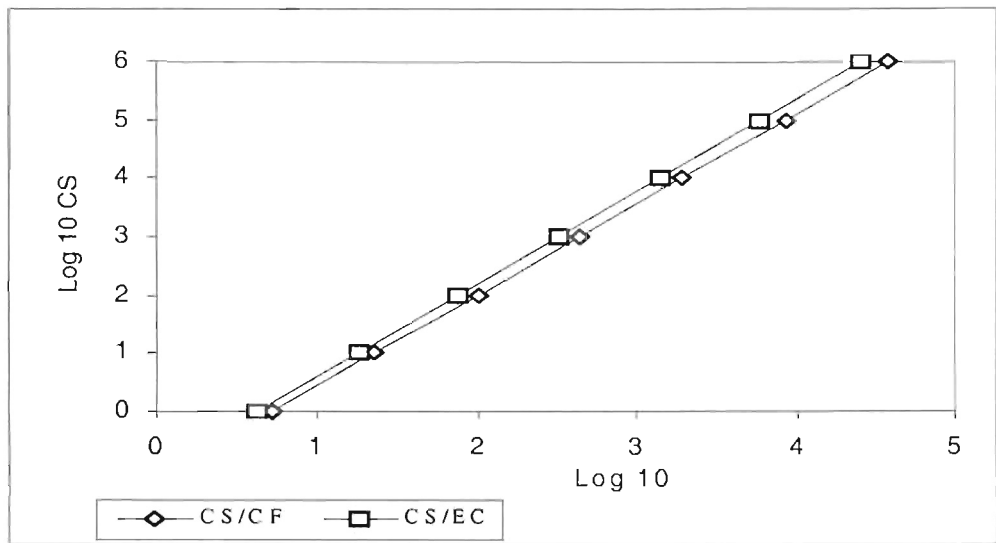


Figura 2. Relación entre colifagos somáticos (CS), Coliformes fecales (CF) y *E. coli* (EC) en muestras con “baja” contaminación fecal. **CS/CF:** $\text{Log CF} = 0,709 + 0,643 \text{ Log CS}$, $n = 111$, $r = 0,435$, $p < 0,001$. **CS/EC:** $\text{Log EC} = 0,619 + 0,630 \text{ Log CS}$, $n = 29$, $r = 0,431$, $p < 0,001$.

Análisis Bacteriológico

La enumeración de bacterias indicadoras de contaminación fecal se realizó de acuerdo a las recomendaciones de APHA (1995). Los coliformes fecales y *E. coli* fueron enumerados por el método del Número Más Probable (NMP) utilizando Caldo A-1 e incubando a 35 °C por 3 h y luego a 44,5 °C por 21 h. La enumeración de *E. coli* se realizó de manera complementaria a Coliformes fecales mediante cultivos en el Agar EC con MUG (metilumbeliferil-glucoronido) a partir de los resultados positivos en el Caldo A-1 con una incubación de 35 °C por 24 h. Los enterococos se cuantificaron de manera similar por el método del NMP utilizando Caldo Azida Glucosa para la prueba presuntiva y Agar KF para la confirmativa.

Enumeración de colifagos somáticos

Procesamiento de la muestra

Para evitar la interferencia de bacterias marinas en la enumeración de los colifagos, las muestras (100 mL) fueron filtradas a través de membranas de nitrocelulosa (47 mm

diámetro y 0,45 µm porosidad) previamente embebidas por 5 minutos (min) a temperatura ambiente en una solución de extracto de carne 1,5% pH 9,5 de acuerdo a las recomendaciones indicadas por Cornax et al. (1990).

Cuantificación de los colifagos

Los fagos específicos de la cepa *E. coli* ATCC 13706 fueron enumerados por el método de “Capa Simple” recomendado por APHA (1995). Cinco mililitros de la muestra de agua o su correspondiente dilución al décimo previamente filtrada y 1 mL de cultivo de la cepa hospedera en Caldo Trypticasa Soya (TSB) en fase logarítmica: (1×10^9 células/mL) fueron agregados a tubos conteniendo Agar Trypticasa Soya (TSA) modificado (1,5% de agar) temperada a 45 °C y luego de un breve homogenizado fue vertida sobre placas petri estériles. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 6 a 10 h. Al cabo de este tiempo se hace la lectura correspondiente mediante la cuantificación de las placas de lisis bacteriana. Este método evalúa 20 mL de muestra con una sensibilidad de hasta 5 UFC/100 mL.

Tabla 1. Recuento de indicadores de contaminación fecal en muestras de agua de mar de 5 playas del Circuito de la "Costa Verde" (Lima-Perú)

		Pampilla	Barranquito	Regatas	Herradura	Cultural Lima
CS	Máximo	3×10^2	$3,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$	$5,6 \times 10^4$
	Mínimo	<5	<5	<5	<5	5
	MG	$2,6 \times 10$	$1,4 \times 10$	$2,6 \times 10$	$4,9 \times 10$	$6,9 \times 10^2$
CF	Máximo	$2,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$
	Mínimo	4	<3	<3	<3	<3
	MG	$2,1 \times 10$	$2,3 \times 10$	$3,7 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
EC	Máximo	$2,4 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^5$
	Mínimo	4	<3	<3	<3	<3
	MG	$1,8 \times 10$	$1,8 \times 10$	$2,8 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
EN	Máximo	$4,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^3$
	Mínimo	<3	<3	<3	<3	<3
	MG	$3,9 \times 10$	7.9	4.6	$3,5 \times 10$	2.1×10^2
N		28	28	28	28	28

CS: Colifagos somáticos (Unidades Formadoras de Placas de Lisis-UFP/100 mL).

CF: Coliformes fecales **EC:** *Escherichia coli* **EN:** Enterococos (Número Más Probable-NMP/100 mL). **MG:** Media Geométrica. **N:** Número de muestras.

Análisis estadístico

La determinación del coeficiente de correlación de Pearson (r), el análisis de regresión lineal y el Análisis de Componentes Principales (ACP) fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 9,0. Los organismos indicadores considerados en el estudio fue-

ron utilizados como las variables en el análisis de Componentes Principales.

RESULTADOS

Los recuentos de los microorganismos indicadores determinaron que los niveles de

Tabla 2. Muestras con "baja" y "alta" contaminación fecal (CF) y su relación con otros indicadores en agua de mar, Circuito de playas de la "Costa Verde".

MUESTRAS	Coliformes fecales (CF)	<i>E. coli</i>	Colifagos somáticos	Enterococos
< 1000 CF/100 mL				
Número de muestras	111	111	111	111
Resultados positivos (%)	94%	89%	79%	58%
Recuentos mayores que CF	–	0%	32%	10%
Correlación con colifagos (r)	0,435***	0,431***	–	0,196
≥1000 CF/100mL				
Número de muestras	29	29	29	29
Resultados positivos (%)	100%	100%	100%	100%
Recuentos mayores que CF	–	0	0	0
Correlación con colifagos (r)	0,895**	0,891***	–	0,537**

** p< 0,01 *** p<0,001 r: coeficiente de correlación de Pearson.

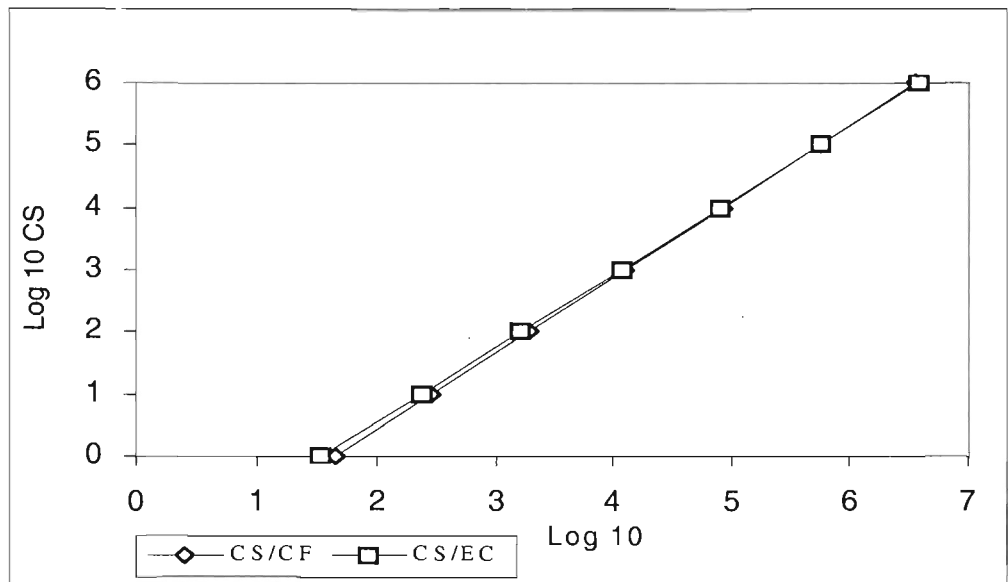


Figura 3. Relación entre colifagos somáticos (CS), Coliformes fecales (CF) y *E. coli* (EC) en muestras con “alta” contaminación fecal. **CS/CF:** $\text{Log CF} = 1,651 + 0,817 \text{ Log CS}$, $n = 111$, $r = 0,895$, $p < 0,01$. **CS/EC:** $\text{Log EC} = 1,530 + 0,824 \text{ Log CS}$, $n = 29$, $r = 0,891$, $p < 0,001$.

contaminación fecal en las playas evaluadas ocurrieron desde niveles mínimos a muy altos. La media geométrica (MG), valor mínimo y valor máximo de los diferentes parámetros microbiológicos en las 5 playas en estudio son mostrados en la Tabla 1. Los recuentos (68%) de coliformes fecales y *E. coli* comúnmente fueron mayores que los de colifagos somáticos en un logaritmo decimal. Con excepción de la playa Pampilla, los recuentos promedios de colifagos fueron mayores que los recuentos obtenidos para los enterococos.

La Tabla 2 muestra las relaciones entre los grupos evaluados y la concentración de coliformes fecales en las muestras con “bajos” y “altos” niveles de contaminación fecal (<1000 y 1000 CF/100 mL respectivamente). En muestras con “baja” contaminación los Coliformes fecales (94%), *E. coli* (89%) y colifagos somáticos (79%) fueron detectados en un amplio porcentaje, mientras que los Enterococos mostraron el menor porcentaje de muestras positivas (58%). Se resalta que

el 32% de los recuentos de colifagos somáticos fueron mayores que los de Coliformes fecales y *E. coli*; mientras que los Enterococos sólo en un 10% tuvieron registros mayores que los Coliformes fecales o *E. coli*. En las muestras con “altos” niveles de contaminación fecal todos los indicadores microbiológicos fueron detectados en un 100% y en ninguna ocasión los recuentos de colifagos o Enterococos superaron a los de Coliformes fecales o *E. coli*. Así mismo, la Tabla 2 presenta los índices de correlación (r) obtenidos entre colifagos y demás indicadores, determinándose una mayor correlación con *E. coli* y Coliformes fecales que con Enterococos. Asimismo, en las muestras con “alta” contaminación las correlaciones entre los indicadores fueron las más altas ($r = 0,89$) disminuyendo para aquellas muestras con “baja” contaminación ($r = 0,43$) donde la correlación colifagos-enterococos ($r = 0,196$) no fue estadísticamente significativa.

La Figura 2 y Figura 3 muestran las relaciones entre las concentraciones de colifagos somáticos y demás bacterias indicadoras para

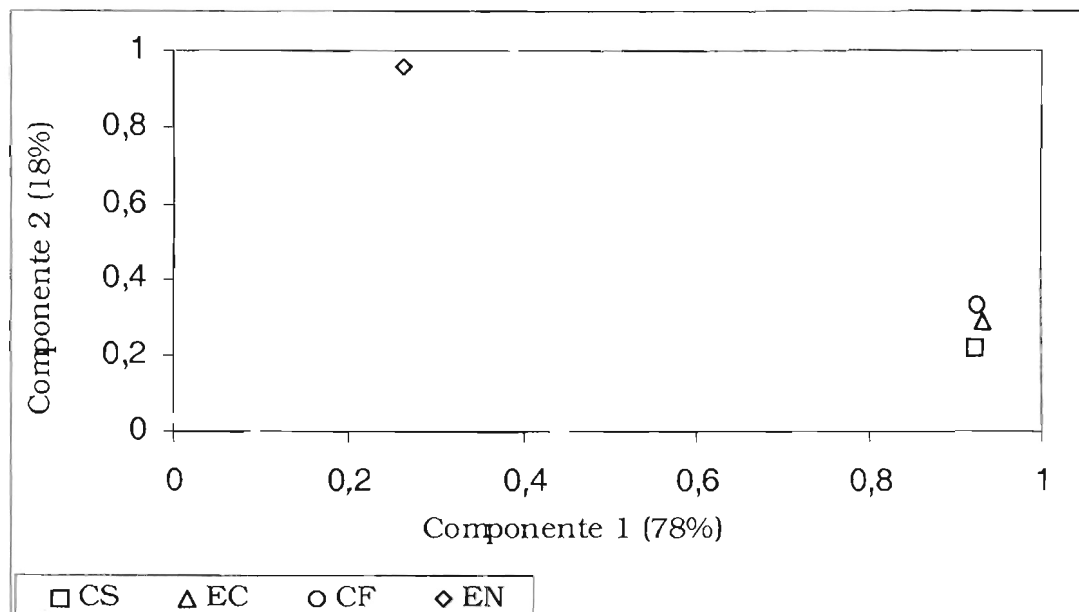


Figura 4. Gráfico del Análisis de Componentes Principales de los indicadores de contaminación fecal en muestras de agua de mar. CS: colifagos somáticos, CF: Coliformes fecales, EC: *E. coli* y EN: Enterococos.

muestras con “baja” o “alta” contaminación, determinándose las correspondientes fórmulas de regresión lineal con una probabilidad del 95% ($p < 0,05$).

El Análisis de Componentes Principales del conjunto de parámetros microbiológicos de las 5 playas consideradas determina que las dos componentes generadas acumulan el 96% de la varianza, mostrando que los colifagos somáticos seguidos por *E. coli* y Coliformes fecales se agrupan más cercanamente al eje del componente 1, mientras que sólo los Enterococos al eje del componente 2 (Fig. 4).

Finalmente, tomando como referencia el valor de 1000 CF/100 mL establecido en la legislación peruana vigente (Ley General de Aguas, 1970) se estimó estadísticamente un valor calificativo de la calidad microbiológica de aguas recreacionales marinas basado en la agrupación de recuentos de colifagos somáticos. De esta manera, se determinó el valor de colifagos de 115 UFP/100 mL como

una propuesta adecuada ($p < 0,05$) para la calificación de las aguas en la zona evaluada (Tabla 3).

DISCUSIÓN

Dada la necesidad de estandarizar una metodología de detección de fagos en aguas marinas planteada por Mooijman et al. (1999), los resultados obtenidos en este estudio permiten apreciar que el método de enumeración de “Capa Simple” (APHA, 1995) es aplicable en nuestro medio para aguas marinas con diferentes niveles de contaminación fecal, ya que el nivel de sensibilidad de la metodología es además complementada con el método modificado de “Filtración de la Muestra” (Cornax et al., 1990). Esta metodología evita interferencia de las bacterias marinas en la enumeración de colifagos; además, la cepa receptora (*E. coli* C ATCC 137006) presenta un mayor número de receptores para el fago y su uso se recomienda sólo en cultivos frescos y no congelados para evitar pérdida de sensibi-

Tabla 3. Calificación de balneabilidad en base a recuento de colifagos para aguas recreacionales marinas.

	Calificación	
	< 1000 CF/100 mL (apta)	≥ 1000 CF/100 mL (no apta)
n	339	81
MG	23,05	2423,5
DS	45,55	1080,5
LS (± 2)(*)	115	≥ 115

n: Número de muestras **MG**: media geométrica **DS**: Desviación estándar **LS**: Límite superior; (*) p: <0,05.

lidad y viabilidad (Havelaar y Hogeboon, 1983).

En la enumeración de los indicadores microbiológicos se observó que en las muestras con “baja” contaminación fecal (<1000CF/100 mL) el 32% de los recuentos de colifagos somáticos superaron a aquellos de los Coliformes fecales y *E. coli*. Este comportamiento sería explicado por la mayor capacidad de supervivencia de estos fagos en el ambiente marino reportada anteriormente por Borrego et al. (1987) y Sinton et al. (1999). En algunos casos donde no se detectó la presencia de colifagos somáticos los niveles de Coliformes fecales y *E. coli* fueron determinados pero en proporciones bajas (14% y 10% respectivamente). Esta diferencia puede atribuirse a las variaciones de sensibilidad de las metodologías utilizadas.

La menor detección cuali-cuantitativa de Enterococos obtenida en el presente estudio difiere de los hallazgos referidos por Borrego et al. (1983), quienes determinan porcentajes mayores para este indicador. Se sugiere que esta baja recuperación de Enterococos podría deberse a la variabilidad en la capacidad de supervivencia de los miembros de este grupo en el ambiente marino (Moriñigo et al., 1992).

El Análisis de Componentes Principales del total de recuentos en las muestras evaluadas determinó la formación de dos agrupaciones entre los indicadores (96% de varianza acumulada), donde los más cercanos al eje de

cada Componente y por tanto los más correlacionados a éste fueron los colifagos somáticos para el Componente 1 y los Enterococos para el Componente 2 (Figura 4). Debido a que las variables gráficamente más cercanas a cada componente son determinadas por las más representativas de sus subgrupos (Legendre, 1981), se puede afirmar que los colifagos somáticos junto a los Enterococos representan mejor la contaminación fecal en aguas recreacionales marinas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Mariño et al. (1995) en un estudio epidemiológico en playas fuertemente contaminadas.

Los colifagos somáticos mostraron correlaciones altas y estadísticamente significativas ($p < 0,001$), siendo mayores las establecidas con *E. coli* y coliformes fecales, además de observarse una relación directamente proporcional con el nivel de contaminación fecal presente en las playas, es decir, mayor correlación en muestras más contaminadas o viceversa. Los valores de correlación determinados están de acuerdo con aquellos obtenidos en anteriores estudios por los autores, que propusieron a los colifagos somáticos como buenos indicadores de la presencia de bacterias patógenas (Borrego et al., 1987; Okeefe y Green, 1989; Moriñigo et al., 1992) y de virus entéricos (Simkova y Cervenka, 1981; Stetler, 1984). Contrariamente, las correlaciones encontradas en este estudio difieren significativamente de los hallazgos de Ricca y Cooney (1999) quienes obtuvieron

bajas correlaciones en playas constantemente impactadas por descargas de lagunas de oxidación. Esto podría explicarse principalmente por la variabilidad cualitativa y cuantitativa de los indicadores fecales en las aguas residuales crudas y tratadas (León, 1999).

Por otro lado, considerando la buena correlación entre colifagos somáticos con *E. coli* y Coliformes fecales, se puede afirmar que las ecuaciones de regresión lineal obtenidas describen adecuadamente su relación numérica ($p < 0,01$) siendo posible su uso con fines de estimación (Borrego et al., 1983).

La propuesta inicial de 115 UFP/100 mL permite utilizar a los colifagos como un criterio de calidad (balneabilidad) de playas, siendo necesaria su evaluación epidemiológica para su uso en la predicción y estimación del riesgo en la salud de los bañistas.

En conclusión, los colifagos somáticos son encontrados como indicadores adecuados y/o complementarios de contaminación fecal en aguas recreacionales marinas en general y playas del Circuito de la "Costa Verde" en particular.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, D.; R. Orozco; L. Flores; A. Guerrero; Z. Vicente; J. Ibarra; N. Bravo; P. Ramírez; R. Quiroz; J. Coña y R. García. 2000. Significado del uso de coliformes como indicadores de contaminación en áreas de pesca. En: IX Reunión Científica ICBAR, UNMSM, 87 pp.
- APHA. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th ed. American Public Health Association: Washington, D. C. USA.
- Borrego, J. J.; F. Arrabal; A. De Vicente; L. Gómez & P. Romero. 1983. Study of microbial inactivation in the marine environment. Jour. Wat. Poll. Cont., **55(3)**: 297-302.
- Borrego, J. J.; M. A. Moriñigo; A. De Vicente; R. Cornax & P. Romero. 1987. Coliphage as Indicator of fecal Pollution of Water. Its Relationship with indicators and pathogenic microorganisms. Wat. Res., **21(12)**. 1473-1480.
- Borrego, J. J.; R. Cornax; M. Moriñigo; E. Martínez-Manzanares & P. Romero. 1990. Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. Wat. Res., **24(1)**: 111-116.
- Cornax, R.; M. Moriñigo; J. Paez; M. Muñoz & J. Borrego. 1990. Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated-water samples. Appl. Environ. Microb., **65(8)**: 3605-3613.
- Cornax, R.; M. Moriñigo; C. Balebona; D. Castro & J. Borrego. 1991. Significance of several bacteriophages groups as indicators of sewage pollution in marine waters. Wat. Res., **56(10)**: 3170-3173.
- Havelaar, A. & W. Hogeboom. 1983. Factors affecting the enumeration of in seaweage and sewage polluted waters. Antonie van Leeuwenhoek **49(2)**: 387-397.
- Havelaar, A.; M. van Olphen & Y. Drost. (1993) F-Especific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. Appl. Environ. Microb., **59(9)**: 2956-2962.
- Kott, Y. 1992. Wastewater Upgrading as Measured by Coliphage. Environmental Toxicology and Water Quality, **7**: 61-67.
- LaBelle R. L.; CH. P. Gerba; S. M. Goyal; J. L. Melnick; I. Cech & G. Bogdan. 1980. Relationship Between Environmental Factors, Bacterial Indicators, and the Occurrence of Enteric Viruses in Estuarine Sediments. Appl. Environ. Microb., **39(3)**: 588-596.
- Legendre, L. 1981. Principal Component Analysis. In: Numerical Ecology, Scientific Publishing Company, 1st ed. Amsterdam.
- Leon G. 1999. Lagunas de Estabilización. Sexto Curso-Taller Internacional, DIGESA-MINSA, CEPIS- Perú, 100 pp.
- Mariño, F.; E. Martínez-Manzanares; M. Moriñigo & J. Borrego. 1995. Applicability of the recreational water quality standard guidelines. Wat. Sci. Tech., **31(6)**: 27-31.
- Mooijman, K. A.; M. Bahar & A. H. Havelaar. 1999. Detection and Enumeration of Somatic Coliphages. National Institute of Public Health and the Environment, RIVM report 285690 003, Bilthoven, The Netherlands, 34 pp.
- Moriñigo, M. A.; D. Wheeler; C. Berry; C. Jones; M. Muñoz and J. J. Borrego. 1992. Evaluation of Different Bacteriophage Groups as Faecal Indicators in Contaminated Natural Waters in Southern England. Wat. Res., **26(3)**: 267-271.
- O'Keefe, B. and J. Green. 1989. Coliphages as indicators of fecal pollution at three recreational beaches on the firth of forth. Wat. Res., **23(8)**: 1927-1030.
- Ricca D. M. & J. J. Cooney. 1999. Coliphages and Indicator Bacteria in Boston Harbor,

- Massachusetts. Jour. Env. Tox. **14**: 404-408.
- Simkova, A. & J. Cervenka. 1981. Coliphage as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. In Bull. World Health Org., **59(4)**: 611-618.
- Sinton, L.; R. Finlay & P. Lynch. 1999. Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater. Appl. Environ. Microb., **65(8)**: 3605-3613.
- Stetler R. E. 1984. Coliphages as Indicators of Enteroviruses. Appl. Environ. Microb., **48(3)**: 668-670.
- WHO 1998. Guidelines for Safe Recreational-water Environments. Coastal and freshwater. World Health Organization, Draft for Consultation, 123 pp.