

## COMPOSICION DE LA MICROBIOTA ALOCTONA Y AUTOCTONA EN CUERPOS DE AGUA CON DISTINTO GRADO DE CONTAMINACION EN PLAYAS DE VIÑA DEL MAR

Victoriano Campos, y Rodrigo Ríos

Laboratorio de Microbiología Instituto de Biología  
Universidad Católica de Valparaíso

**Palabras Clave:** Ecología, aguas recreacionales, contaminación.

**Key Words:** Ecology, recreational water, pollution.

### RESUMEN

*Se seleccionaron tres playas de Viña del Mar con diferente grado de contaminación determinada de acuerdo a indicadores microbiológicos: coliformes totales y coliformes fecales.*

*Se estudia en ellas la composición de la microbiota autóctona y alóctona, realizando recuentos, aislamientos e identificación de ambos grupos de bacterias.*

*Los resultados permiten apreciar los cambios en las poblaciones bacterianas de acuerdo a los niveles de contaminación.*

### SUMMARY

*[Composition of the allocthonous and autochthonous microbiota in bodies water with different grade of pollution in beaches of Viña del Mar, Chile]*

*Three beaches in Viña del Mar was selected in order at different level of pollution, using microbiological indicators such as total coliforms and fecal coliforms.*

*It studied the microbiota autochthonous and allochthonous, carrying out: recount, isolation and identification the bacteria on both groups.*

*Results show changes in the bacteria population connecting with pollution*

### INTRODUCCION

Como resultado del desarrollo urbano, los volúmenes de aguas domésticas que son evacuadas al mar se ven incrementados en forma significativa. En la zona de estudio los afluentes son liberados directamente al mar sin un tratamiento previo, y transportan un gran número de patógenos bacterianos y virales que dependiendo de diversos factores pueden pervivir durante un tiempo prolongado en el agua de mar, constituyendo una amenaza para la salud pública, tanto para quienes hacen uso del agua en forma recreacional como para consumidores de mariscos crudos (Mitchell, 1971; Brisou, 1968). Este problema ha preocupado a la comunidad científica mundial, así se han realizado numerosos estudios dirigidos a evaluar el grado de contaminación de recursos hídricos por descargas de aguas domésticas, (Crónica OMS 1969), a nivel nacional podemos mencionar los trabajos de Castillo y Cordano (1975), Campos y colaboradores (1983), (1986), (1988).

Algunos de estos estudios se han realizado en la Bahía de Valparaíso, quedando establecido el grado de contaminación bacteriana estacional de las playas de Valparaíso y Viña del Mar. Estos resultados son de gran importancia como índice de la calidad bacteriológica de las aguas recreacionales, sin embargo, existe otro aspecto que es interesante destacar y que no ha sido investigado, sobre como es afectada la microbiota nativa por la incorporación masiva de enterobacterias.

El objetivo del presente trabajo, es determinar la composición genérica o específica de la microbiota alóctona y autóctona, su coexistencia en un momento dado y cómo varía ésta en playas con diferente grado de contaminación microbiológica. Se realizó un muestreo preliminar a fin de determinar el grado de contaminación en diferentes playas, y de acuerdo a estos resultados se eligieron tres: uno con aguas muy contaminadas, uno medianamente contaminado y otro sin contaminación, teniendo como referencia la norma chilena Nº 1333, que establece 1000 CF/100 ml. para aguas recreacionales.

En cada una de estas tres playas se hicieron recuentos, aislamientos e identificación tanto de bacterias alóctonas con énfasis en enterobacterias y bacterias autóctonas.

Los resultados muestran una relación cuantitativa de tipo inversa entre las bacterias alóctonas y autóctonas, cuya magnitud depende del grado de contaminación de las aguas. Esto nos permite postular que la microbiota autóctona es afectada en composición y número por el ingreso masivo de enterobacterias, que ingresan vía afluentes de aguas residuales.

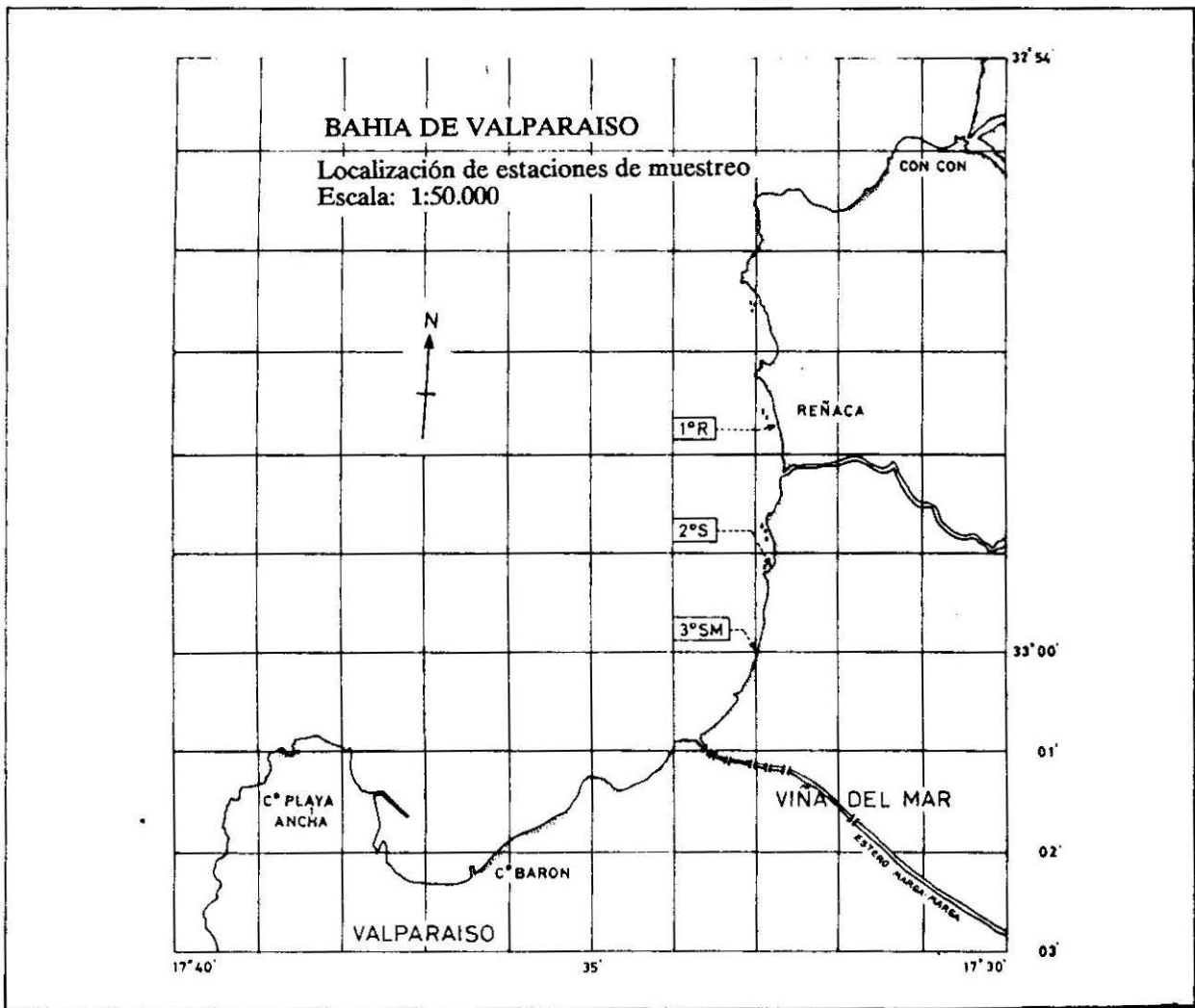
## MATERIALES Y METODOS

**Estaciones de muestreo:** El estudio consideró tres puntos de muestreo; la playa de Reñaca (R) por el norte, playa Acapulco (SM) (frente Sanatorio Marítimo) por el sur y una estación intermedia correspondiente a la playa Las Salinas (S) (Figura 1).

**Muestras:** Se colectaron tres muestras de aguas mensuales durante los meses de Junio a Diciembre, en cada una de las estaciones. Las muestras fueron

Figura 1

### LOCALIZACION DE LAS ESTACIONES DE MUESTREO



tomadas asépticamente en botellas de vidrio de 250 ml. estériles, a 0,3 m. de profundidad y aproximadamente a 3-4 m. de la línea de mareas. Las muestras fueron procesadas antes de 4 horas en el Laboratorio de Microbiología UCV.

**Microorganismos:** Se trabajó con cepas de bacterias aisladas en los puntos de muestreo, considerando a bacterias del grupo coliformes como microbiota alóctona y a heterótrofos de origen marino, definidos más adelante como autóctonas.

**Recuentos:** Los recuentos de coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF) fueron realizados mediante el método de recuento por dilución en tubo (Número Más Probable) empleando cinco tubos por dilución de acuerdo a lo establecido por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1975).

Los recuentos de heterótrofos marinos fueron determinados mediante la técnica de macrocolonias sobre filtro de membrana según Jannasch y Jones (1959) empleando filtros de membrana con tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  GN-6 (Gelma Science) en soporte Millipore.

Para esto se tomaron alicuotas de 0,1; 1,0 y 10 ml de agua de mar y se diluyeron con solución salina marina (SSM) según Austin y colaboradores (1979) a un volumen final de 100 ml el que fué filtrado en soporte Millipore con filtro de membrana M trichel GN6 (Gelma Science) con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Cada dilución se sembró por triplicado en placas conteniendo Marine Medium 2216 (Difco) que fueron incubadas a 18°C durante 48 horas.

Para los efectos de recuento, se consideraron sólo aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias.

**Aislamiento:** Los aislamientos de bacterias del grupo coliformes fueron hechas tomando alicuotas de 10-1,0 y 0,1 ml de agua de mar y diluidas 10, 100 y 1000 veces respectivamente en solución salina (SS, 8,5 gr NaCl/1 según Harrigan y Mc Cance, 1966) ajustada a pH 7,2. Las diluciones fueron filtradas a través de filtros M trichel GN-6 los que fueron luego depositados sobre una almohadilla de papel filtro Whatman N° 2 impregnada con caldo Lauryl Triptosa (Difco) e incubadas por dos horas a 37°C, para superar el estado de stress, del medio ambiente marino. Transcurrido este tiempo los filtros fueron recogidos asépticamente y depositados por triplicado sobre placas con medio selectivo m-Endo Agar LES (Difco) para incubación a

37°C durante 18-24 horas. De las colonias que se desarrollaron en estas condiciones se aislaron al azar un número de no menos de 10, como promedio, por placa, resemebrándose en tubos con Agar Nutritivo (Difco) inclinado e incubados a 37°C por 24 horas y luego guardados hasta su caracterización.

Los aislamientos de bacterias marinas fueron hechos a partir de las mismas placas de recuentos de heterótrofos marinos (ya descritos) traspasando las colonias aisladas, al azar a tubos con Marine Medium 2216 inclinado e incubando a 18°C durante 48 horas.

**Identificación:** Los microorganismos aislados fueron identificados según sus características morfológicas y bioquímicas.

Todos los ensayos para la identificación de las cepas purificadas fueron hechos empleando la metodología descrita por Smibert y Krieg (1981), a excepción de los que más adelante se indiquen.

La pureza de las cepas se aseguró realizando a cada una de ellas tinción de Gram y observándolas en microscopio óptico Leitz Wetzlar con objetivo de inmersión. En algunos pocos casos hubo que purificar la cepa adicionalmente y fue hecho es-triando sobre placas conteniendo Levine EMB Agar (Difco).

La identificación de las bacterias coliformes fue hecha realizando a cada una de ellas el grupo de pruebas bioquímicas IMVIC empleando respectivamente los medios MIO Medium (Difco), MR-VP Medium (Difco) y Agar Citrato de Simmons (BBL). Para aportar más datos a la identificación, se agregaron otra serie de test: oxidasa, descarboxilación de los aminoácidos Lisina y Ornitina en los medios LIA Agar (Difco) y MIO Medium respectivamente, fermentación de azúcares y producción de  $\text{H}_2\text{S}$  en medio TSI Agar (Merck).

Los resultados se compararon con las Tablas para Identificación Bioquímica de Enterobacterias (Edward y Ewing, 1972).

Para la identificación de los heterótrofos marinos, se hizo en primer lugar pruebas de dependencia a NaCl y a la temperatura.

La dependencia a NaCl se realizó en Marine Salt Water Yeast Extract (MSWYE) según Colwell y colaboradores (1975) variando la concentración de NaCl de 0, 1,5, 3,0 y 7,5% y agregando Agar al 20% p/v. Todas la cepas fueron sembradas por picadura de acuerdo a un patrón de siembra de 24 cepas por placa e incubadas a 10°C por 48 horas.

Para determinar la dependencia a la temperatura se emplearon tres placas con Marine Medium 2216 sembradas por picadura, con 24 cepas por placa. Cada grupo de cultivo fue incubado a 5, 18 y 37°C durante 48 horas.

Las bacterias marinas fueron caracterizadas bioquímicamente hasta género de acuerdo a la clave de identificación sugerida por Shewan y colaboradores (1960) en base a tinción de Gram, movilidad, test de la oxidasa, test O/F, producción de pigmentos difusibles en medio King A y King B (según Harrigan y Mc Cance, 1966), pigmentación de las colonias y susceptibilidad a 0/129.

## RESULTADOS

Las tablas 1 y 2 presentan los valores de recuento para coliformes (alóctonos) y heterótrofos marinos (autóctonos) expresados como promedio aritmético de tres muestras mensuales durante siete meses y el promedio general para cada una de las tres playas estudiadas.

Tabla 1.

Valores mensuales del NMP6100 ml de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF)

ESTACION	COLIFORMES	JUN	JUL	AGO	MESES SEP	OCT	NOV	DIC	PRO-MEDIO
R	CT	247	200	236	462	200	341	550	319
	CF	200	200	200	238	200	216	243	214
S	CT	1300	834	426	340	110	741	1300	863
	CF	330	664	200	200	303	430	260	341
SM	CT	1600	5000	3400	2800	4700	6320	16000	5689
	CF	710	1300	1620	848	1820	2324	3426	1721

Tabla 2

Valores mensuales de Bacterias Heterotrófas Marinas (Bacterias/ml  $\times 10^3$ )

ESTACION	JUN	JUL	AGO	MESES SEP	OCT	NOV	DIC	MEDIO PRO-
R	4,0	6,2	20,0	7,0	6,3	4,8	2,6	7,2
S	3,8	5,8	6,0	5,6	5,2	3,4	9,3	5,6
SM	3,0	6,0	4,8	4,2	4,0	2,0	2,3	3,7

Se han agregado los resultados de las pruebas de dependencia a NaCl y a la temperatura de las bacterias aisladas en Marine Medium 2216 con el fin de indicar que a partir de estos resultados se consideró como concentración óptima de NaCl un rango de 1,5-2,5% y una temperatura de 18°C en los estudios posteriores de identificación, con lo cual los medios diferenciales fueron suplementados

con esta concentración de NaCl y los cultivos incubados a 18°C. Tablas 3 y 4.

Por otra parte, en la Figura 2 se ha confrontado los valores porcentuales de bacterias alóctonas y autóctonas para cada una de las tres estaciones, asimismo en la Figura 3 se ha graficado el desglose de especies que conforma cada grupo, a fin de representar como varían porcentualmente las

especies de bacterias marinas y alóctonas en función al grado de contaminación del agua.

Tabla 3

Dependencia a NaCl de Bacterias Heterótrofas de origen marino.

% NaCl	FRECUENCIA (a)
0	27/115
1.15	107/115
3.0	103/115
7.5	59/115

a) Expresa el número de cepas que presentaron crecimiento respecto de las 115 cepas estudiadas.

Tabla 4.

Dependencia a temperatura de Bacterias Heterótrofas Marinas.

TEMPERATURA (o)	FRECUENCIA(a)
5	87/115
18	115/115
37	4/115

a) Expresa el número de cepas que presenta crecimiento respecto de la 115 cepas estudiadas.

Finalmente, en la Tabla 5 se han tabulado las frecuencias con que fueron aislados cada uno de los géneros y especies identificadas por estaciones de muestreo.

Tabla 5

Distribución de Bacterias Alóctonas y Autóctonas en las Estaciones de Muestreo

BACTERIAS	ESTACIONES DE MUESTREO		
	REÑACA	LAS SALINAS	SANATORIO MARITIMO
Escherichia coli	18 <sup>(a)</sup>	23	45
Enterobacter agglomerans	7	11	13
Enterobacter cloacae	0	6	5
Citrobacter diversus	5	5	3
Klebsiella spp	0	0	4
Pseudomonas spp	31	28	16
Flavobacterium spp.	9	7	0
Acinetobacter spp	9	3	2
Vibrionaceas	0	3	4
Otras	14	3	2
TOTAL	93	89	94

(a) Frecuencia de aislamiento.

FIGURA 2

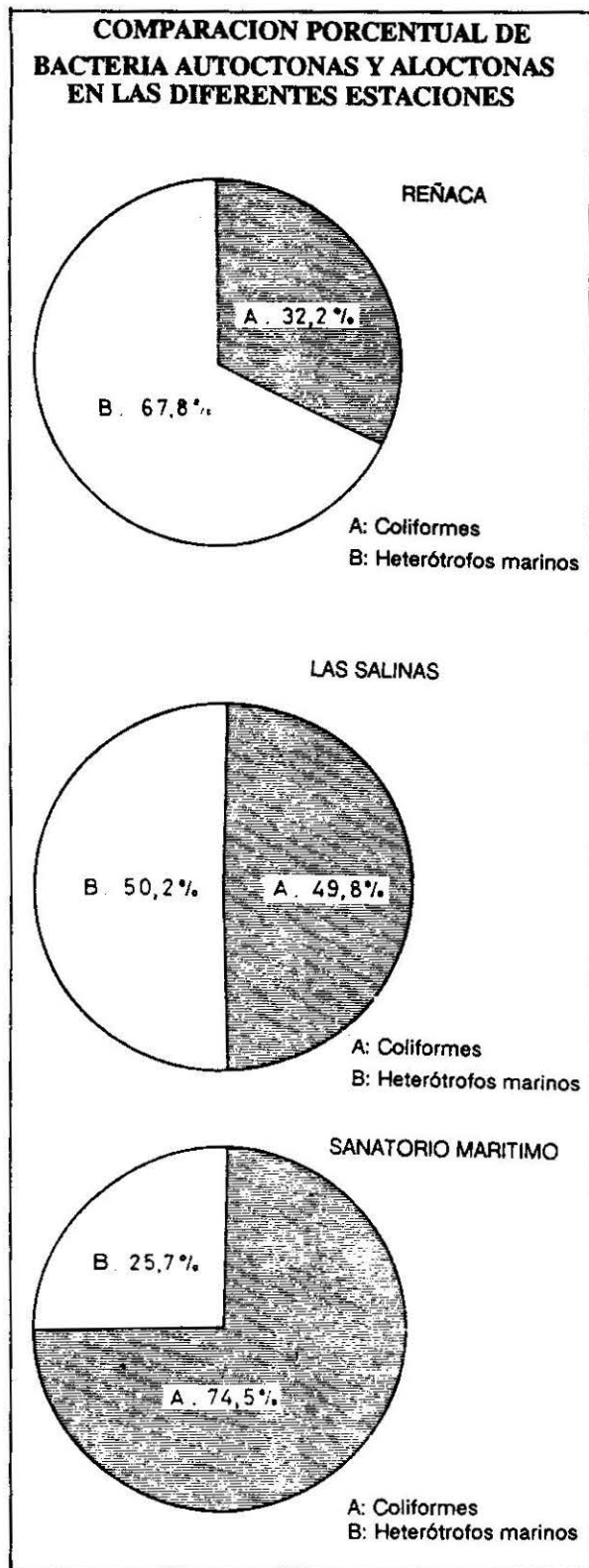
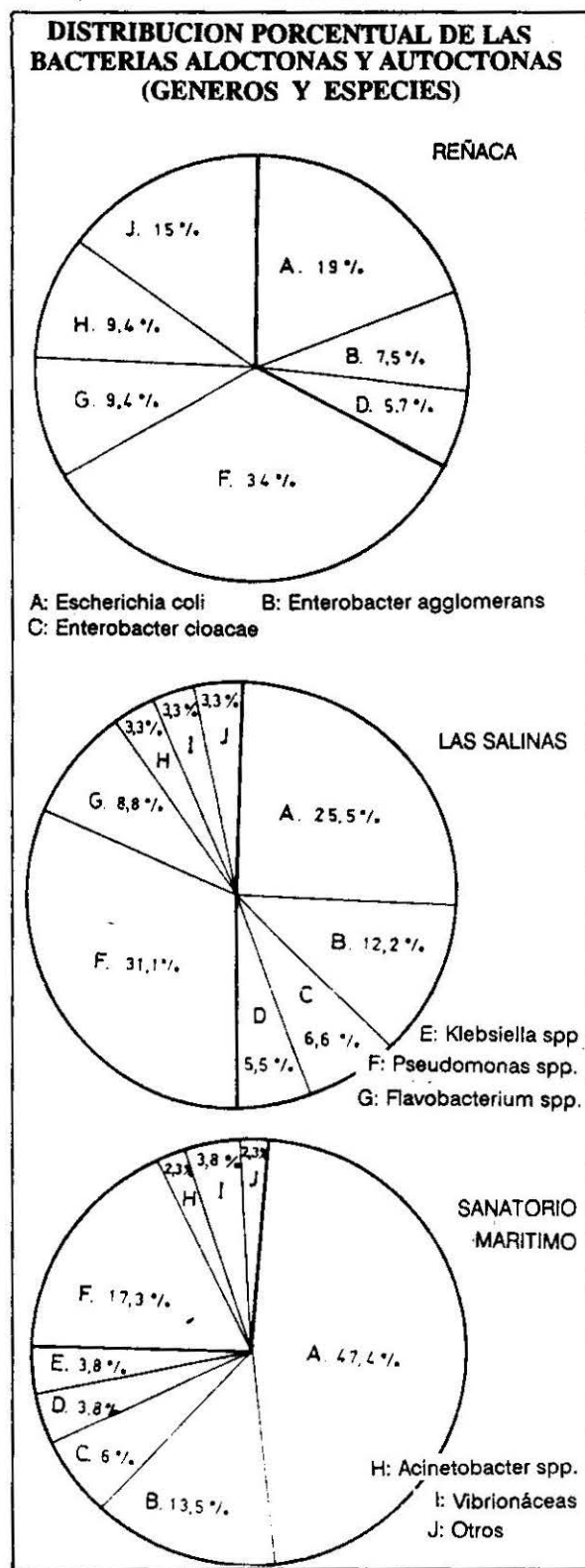


FIGURA 3



## DISCUSION

En un momento dado, en el agua de mar, como producto del ingreso de aguas servidas, podrían estar coexistiendo bacterias propias de este ambiente y aquellas que entran vía emisarios y por tanto ajenas al mar. Las primeras constituirían la microbiota autóctona o nativa y las segundas la alóctona de origen telúrico.

Las bacterias consideradas en el presente trabajo como alóctonas, están constituidas fundamentalmente por las pertenecientes al grupo coliformes, por ser consideradas indicadoras de contaminación microbiológica, estar siempre presente en las aguas servidas y su presencia y número están relacionadas con patógenos intestinales (Geldreich, 1970); Cabelli y col., 1976).

Los resultados de recuentos indican valores bajos de contaminación fecal en la estación Reñaca (R) con un NMP del orden de 214 CF/100 ml intermedios para la estación Las Salinas (S), 341 CF/100 ml y altos para la estación Sanatorio Marítimo (SM) con un NMP cercano a los 2000 CF/100 ml de agua de mar (Tabla 1).

El reducido número de coliformes de origen fecal en Reñaca se explica por el hecho que en el período de estudio no existían colectores que evacuaran aguas residuales en ese sector; por el contrario, las playas al frente del Sanatorio Marítimo reciben una gran descarga de aguas contaminadas lo que explicaría el alto número de bacterias alóctonas en esas aguas.

En general estos datos concuerdan con los señalados por Zahr (1983) para estas estaciones.

Por otro lado, los recuentos de heterótrofos de origen marino oscilan entre  $2 \times 10^5$  y  $2 \times 10^4$  bacterias/ml (Tabla 2). Hay que hacer notar que estos valores de recuento corresponden a las bacterias marinas que se encuentran libres en el agua; probablemente aumentarían si se considerarían las bacterias perfitas y las que habitan los sedimentos marinos (Zobell, 1946; Marshall y col., 1971; Corpe y col., 1976).

Al analizar las Tablas 1 y 2 se aprecia que los recuentos de heterótrofos marinos varían en forma inversa con respecto a los coliformes; pensamos que esto podría ser resultado de la distinta metodología empleada en la cuantificación de ambos grupos ya que, inicialmente se calculó el número de coliformes por el método de dilución en tubo (NMP) y el de heterótrofos marinos mediante filtro de membrana. Para revisar esta posible fuente de error se optó por realizar paralelamente el método de filtro de membrana para cuantificar y aislar bacterias coliformes de la manera como fue indicado en la sección Materiales y Métodos.

Las frecuencias con que fueron aisladas tanto bacterias autóctonas como alóctonas aparecen graficadas en la Figura 2 donde se aprecia que efectivamente la proporción de bacterias marinas es bastante menor respecto de las alóctonas en playas altamente contaminadas en comparación con la estación R donde existe un alto porcentaje de bacterias nativas.

A partir de estos resultados nos interesó ver cuáles géneros de bacterias autóctonas resultaban más afectadas con la presencia de la microbiota alóctona y a su vez cómo variaba la composición de especies de coliformes. Para lo cual se identificaron hasta género las bacterias aisladas sobre Marine Medium 2216 y hasta género o especie las aisladas sobre m-Endo Agar LES.

Se aislaron un total de 276 cepas, distribuidas en: 144 enterobacterias y 132 que se desarrollaron sobre Marine Medium. Estas últimas presentaron requerimientos de NaCl a una concentración del 2,5 % (Tabla 3) y crecieron bien a temperaturas entre 5 y 18°C (Tabla 4). Todas fueron Gram negativas, la mayoría oxidasa positivas, generalmente móviles y oxidativas en la prueba O/F. Mediante el esquema de identificación de Shewan y colaboradores (1960) se caracterizaron las bacterias de este grupo perteneciendo, en orden de abundancia a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter*. Se consideraron como Vibrionaceas aquellas cepas que resultaron sensibles al compuesto vibriostático 0/129. Además hubo 13 especímenes a los que no fue posible caracterizar con este esquema (Tabla 5).

Las bacterias alóctonas fueron todas Gram negativas, oxidasa negativas y metabolismo fermentativo en el test O/F con producción de ácido y gas a partir de glucosa. Con estos datos más los aportados por el IMVIC, descarboxilación de los aminoácidos Lisina y Ornitina, reacción en el medio TSI Agar, etc., se pudo identificar, mediante tablas para identificación bioquímica de Enterobacterias (Edward y Ewing, 1972) cuatro géneros comprendiendo cinco especies: *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus* y *Klebsiella* spp. (Tabla 5).

En la figura 3 se aprecia que los porcentajes de distribución de los distintos géneros y especies se presenta diferente dependiendo del grado de contaminación de la playa.

*E. coli* fue la especie alóctona más abundante que junto a *E. agglomerans* siempre tendieron a aumentar hacia playas más contaminadas, a diferencia de *E. cloacae* y *C. diversus* que se encuentran en bajos porcentajes y con escasa variación.

*Klebsiella* spp. solamente fue detectada, aunque en bajo porcentaje, en la estación más contaminada, (SM) (Tabla 5, Figura 3).

De los heterótrofos de origen marino el género más abundante fue *Pseudomonas* y estuvo presente, aunque en forma diferencial en las tres estaciones; *Flavobacterium* nunca se presentó en más del 10% de las muestras y no se aisló en la estación Sanatorio Marítimo. *Acinetobacter* estuvo presente en bajo número en estaciones con contaminación mediana y alta; al igual que las Vibrionáceas. Sin embargo, estas últimas presentan un porcentaje levemente mayor en playas muy contaminadas como en SM. Es probable que este hecho sea resultado de la eutroficación de las aguas por la materia orgánica exógena aportada por los emisarios. De las bacterias que no fue posible identificar, un 15 % correspondió a *Reñaca* y baja a un 3% en los puntos de muestreo que presentan una contaminación entre mediana y alta.

El ambiente marino en un medio oligotrófico donde la concentración de carbono orgánico es baja, no supera los 0,5 mg de C por litro de agua (Menzel y Ryther, 1970), esto se traduce en que la tasa de crecimiento bacteriana sea muy baja (Torrella y Morita, 1981) al menos para aquellas bacterias que viven libres en el agua.

Por otra parte, las aguas litorales frente a las grandes ciudades reciben descargas de desechos domésticos, lo que haría suponer una eutroficación de estas aguas y como consecuencia una concentración de compuestos orgánicos tal, que permita el crecimiento heterotrófico. Sin embargo, al evaluar los resultados del presente trabajo, este hecho no parece real puesto que, como se discutió para las figuras 2 y 3, la microbiota autóctona, en términos generales, se ve afectada con el ingreso de aguas residuales al ambiente marino. Toda vez que al filtrar una muestra de agua de mar en un instante dado y depositar el filtro con bacterias en un medio apropiado para el desarrollo de la microbiota autóctona y otro para las bacterias alóctonas, después de incubar se observan cambios según el punto de muestreo, este cambio se refleja en la figura 3. Por ejemplo: el género *Pseudomonas* que fue el más abundante de los autóctonos en playas no contaminadas se aisló en porcentajes de no menos de 34% en cambio, en playas muy contaminadas este porcentaje disminuyó al 17%. De manera que independiente de la eutroficación del agua, las *Pseudomonas* marinas van desapareciendo. Un comportamiento inverso presenta *E. coli*, la bacteria alóctona, más abundante en este estudio, cuyos porcentajes de aislamiento aumentan en playas más contaminadas. Es más

razonable pensar que esto es debido al abundante y constante volumen de aguas residuales evacuadas al mar sobre todo en la zona de la estación SM, que a la improbable posibilidad de que esta bacteria se haya desarrollado o multiplicado en estas condiciones ya que, por un lado *E. coli*, sobre todo la de origen fecal, por provenir de un habitat muy particular como es el intestino no se multiplica en el agua de mar y por otro, existe evidencia suficiente acerca de que *E. coli* sobrevive períodos cortos de tiempo en el ambiente marino (Carlucci y Pramer, 1950, 1960).

En contraposición con nuestros resultados están los de Mitchell (1971), quien sostiene, a partir de estudios realizados por él "in vitro", que en el agua de mar existen bacterias, probablemente *Pseudomonas*, que utilizarían las paredes de *E. coli* como fuente de carbono, con la consecuente lisis de ésta. Esto como evidencia para explicar el fenómeno de autodepuración del agua de mar. Estos resultados permiten suponer que las *Pseudomonas* marinas estarían enriquecidas en forma natural en aguas contaminadas con *E. coli*. Sin embargo, "in situ" y a contaminación constante, esto no parece ser real.

En suma, nuestros resultados evidencian que de alguna manera la microbiota autóctona se ve afectada por la contaminación probablemente debido a un "stress" medioambiental impuesto, por la gran cantidad de bacterias alóctonas y por el gran volumen de aguas residuales que ingresan al océano en la zona estudiada, transportando, además de bacterias, compuestos químicos, iones de metales pesados, aceites, etc.

Para concluir, podemos decir que resulta extremadamente difícil definir qué tipo de interrelaciones se producen entre poblaciones de bacterias autóctonas y alóctonas en el agua de mar en un momento dado, debido a que son muchos los factores que estarían interviniendo y que de alguna manera afectan a ambos grupos. No obstante, en el presente trabajo, con una metodología sencilla queda establecido un bosquejo de lo que estaría pasando con la microbiota natural del agua de mar como consecuencia de la evacuación de aguas residuales al mar.

Como conclusión general, podemos decir que las poblaciones de bacterias naturales en el mar son afectadas negativamente por las bacterias alóctonas que ingresan a las comunidades marinas vía desagües de aguas residuales.



## REFERENCIAS

- American Public Health Association. 1975. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th. ed. American Public Health Association, Inc., New York.
- Austin, B., D. Allen, A. Zachary, Mr. Belas and R. R. Colwell. 1979. Ecology and taxonomy of bacteria attaching to wood surfaces in a tropical harbor, Can. J. Microbiol. 25: 447-461.
- Brisou, J. 1968. Bull. Wild. Hith. Org. 38:79.
- Cabelli, V.S., A.P. Dufour, M. A. Levin and P.W. Haberman. 1976. The impact of pollution on marine bathing beaches: An epidemiological study-Limnol. and oceanograph. Spec. Symp. 2: 213-219.
- Campos, V. 1983. Microbiología y Medio Ambiente. Los microorganismo con indicadores de contaminación. Bol. Micol., 1: 185-186.
- Campos, V. y M. Zahr. 1983. Contaminación microbiológica en zonas costeras chilenas y sus posibles efectos. Primer Encuentro Científico sobre el Medio Ambiente Chileno. Vol. I. Pág. MAR 40-44.
- Campos, V., E. Navarrete, R. Ríos y M. Zahr. 1986. Determinación de la contaminación por aguas residuales mediante indicadores en el Estero Marga-Marga. Viña del Mar. Bol. Inst. S.P. Vol. XXVI, N° 1,2 pag. 36-47.
- Campos, V., H. Pinochet, I. De Gregori, F. Lund, M. Zahr, D. Delgado, X. Sepúlveda, A. Joyas y L. Arismendi. 1988. Water Pollution in the Valparaíso Bay. Boletín Inst. de Salud Pública de Chile. Vol. 27-28 N° 1-2.
- Carlucci, A.F. and D. Pramer. 1959. Factors Affecting the survival of Bacteria in Sea Water. Appl. Microbiol. 7: 388-392.
- Carlucci, A.F. and D. Pramer. 1960. An Evaluation of Factors Affecting the survival of E. coli in Sea Water III Antibiotics. Appl. Microbiol. 8: 251-253.
- Castillo, G. y A.M. Cordano. 1975. Enterobacteriaceae en una corriente fluvial. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 17: 213-219.
- Colwell, R.R., K. Sizemore, J.F. Carney, R.Y. Morita, J.D. Nelson, J. H. Pickar, I.R. Schwartz, S.D. Van Vilkenberg, J.D. Walker and R.T. Wright., 1975. Marine and Estuarine Microbiology Laboratory Manual, University Park Press, Baltimore, Md., USA.
- Corpe, W.A., L. Matsuuchi and B. Armbruster, 1976. Secretion of adhesive polymers and attachment of marine bacteria to surface. In: Sharpley M.Y. and A. Kaplan. Proceeding of the Third International Biodegradation Symposium Kingston, Jamaica.
- Edwards, P.R. and W.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. Ed. Buryness Publishing Co., Minneapolis. Minn.
- Geldreich, E.E. 1970. Applying bacteriological parameters to recreational water quality. I Am. Water Works Assoc. 62: 113-119.
- Harrigan, W.F. and M.E. Mc Cance. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press. London.
- Jannash, H.W. and G.E. Jones. 1959. Bacterial Population in sea water as Determined by different Methods of Enumeration. Limnol and Oceanogr. 4: 128-139
- Ketchom, B.H., C.L. Carey and M. Briggs. 1949. Preliminary Studies on the Viability and Dispersal of Coliform bacteria in Sea. In: Limnological Aspects of Water Supply and Waste Disposal. Publ. Amer. Assoc. Adv. Sci. Washington, 64-73.
- Marshall, K.C., R. Stout and R. Mitchell. 1971. Selective Sorption of bacteria from seawater. Can J. Microbiol. 17: 1413-1416.
- Mitchell, R. and J.C. Morris. 1969. The fate of intestinal bacteria in the sea. In: S.H. Jenkins (ed.). Fourth Int. Conf. Water Pollut. Res. Pergamon Press, New York, pp. 811-821.
- Mitchell, Ralph. 1971. Destruction of Bacteria and Viruses in seawater. Journal of the Sanitary Engineering Division, ASCE, Vol. 97, N° SA4, Proc. Paper 8299 pp. 425-432.
- Menzel, D.W. and H.J. Ryther. 1970. Distribution and Cycling of organic matter in the oceans, pp. 31-54. In: D.W. Hood (ed.). Organic Matter in natural Waters Institute of Marine Science Publication College, Alaska.
- Shewan, J.M., G. Hobbs and W. Hodkins. 1960. A Determinative Schema for the identification of Certain Genera of Gram negative bacteria with Special Reference to Pseudomonaceae. I. Appl. bacteriol. 23: 379-390.
- Smibert, R.M., and N.R. Krieg. 1981. General Characterization, p. 409-443. In: P. Gerhardt, R.G. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips (eds.), Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Torrella, F. and R.Y. Morita. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microbiology and ultramicrobiology formation by heterotrophic bacteria in seawater. Appl. Environ. Microbiol. 41: 518-527.
- Vaccaro, R.F., M.P. Briggs. C.L. Carey and B.H. Ketchum. 1950. Viability of Escherichia coli in sea water. Amer. J. Public. Health. 40: 1257-1266.
- Zahr, M. 1983. Estudio sobre contaminación microbiológica del agua de la Bahía de Valparaíso. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas. Universidad Católica de Valparaíso.
- Zobell, C.E. 1946. Marine Microbiology. Chronica Botánica Co., Waltham, Mass.