

## Preliminary research on the presence of viruses and parasites in the Lake of Valencia and its tributary rivers

Ligia Botero de Ledesma<sup>1</sup> y María Cristina García de Hurtado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias, Tel-Fax: 428184, E-mail: lbotero@ven.net.

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Humanidades y Educación. E-mail: magarcia@luz.ve. Universidad del Zulia, Apartado 526. Maracaibo, Venezuela

### Abstract

The reusability of waters with agricultural and industrial aims is a necessity, due to the increasing demand for water and the shortage of this vital resource. The Lake of Valencia, located in the Central Region of the country, in one of the most populated areas in Venezuela, it is a reservoir of fresh water, that is expected, to be used in agriculture, sporting activities or as an alternative water supply for the cities located in its river basin. The reuse of this water can cause problems for public health, since the lake receives water from several rivers that receive residual water discharge from the populations located along them, which could contain pathogenic microorganisms. In order to determine the microbiological quality of this water, and to permit the formulation of active microorganism control policies, samplings in five zones of the Lake and its tributary rivers were made, to detect virus and parasites. Microorganisms were determined following standards techniques, that demonstrated that in three of the zones of the Lake and in its tributary rivers, there was presence of enteric virus, bacteriophage and *Giardia*. The other two zones resulted negative the first year and positive the second year, when the volume of the sample processed was increased. The results demonstrate a high microbial contamination in this reservoir and the necessity to give lake water adequate treatment before using it as drinking water.

**Key words:** Enteroviruses, *Giardia lamblia*, bacteriophage, indicators of water quality.

## Estudio preliminar de la presencia de virus y parásitos en el Lago de Valencia y sus ríos tributarios

### Resumen

La reutilización de las aguas con fines agrícolas e industriales es una necesidad, debido a la demanda creciente de agua y a la escasez de este vital recurso. El Lago de Valencia, ubicado en la Región Central del país, en una de las áreas más pobladas de Venezuela, es un reservorio de agua dulce, que se espera, puede ser empleado en actividades agrícolas, deportivas o como una alternativa para el abastecimiento de agua para las ciudades ubicadas en su cuenca. El reuso de esta agua puede traer problemas de salud pública, ya que el lago recibe agua de varios ríos, que a su vez reciben las descargas de aguas residuales de las poblaciones a su alrededor, las cuales pueden contener microorganismos patógenos. Con el propósito de conocer la calidad microbiológica de esta agua, que permitiera la formulación de políticas de acción para controlar los microorganismos, se hicieron muestreos en cinco zonas del Lago y en sus ríos tributarios, para detectar virus y parásitos. Estos microorganismos fueron determinados siguiendo técnicas estándares, que demostraron que en tres de las zonas del Lago y en sus ríos tributarios, había presencia de virus entéricos, bacteriófagos y *Giardia*. Las otras dos zonas fueron negativas el primer año y positivas el

segundo año, cuando se incrementó el volumen de muestra que se procesó. Los resultados demuestran una alta contaminación microbiana de las aguas en este reservorio y la necesidad de darles un tratamiento adecuado antes de ser reutilizadas.

**Palabras claves:** Enterovirus, *Giardia lamblia*, bacteriófagos, indicadores de calidad de agua.

## Introducción

El Lago de Valencia es el cuerpo de agua natural mayor de Venezuela, es un reservorio de agua dulce de vital importancia para la región Central, una de las áreas más pobladas del país, donde se encuentra ubicado, ocupando una superficie de 356 Km<sup>2</sup> [1]. El aumento de la población en su cuenca, asociado a una rápida expansión de la industria y la agricultura, ha producido una alta contaminación de sus aguas, ya que el lago recibe 16 tributarios entre ellos los ríos Guey, Caño Central, Maracay y Los Guayos, que le hacen un aporte importante de agua durante todo el año, a través de los cuales las descargas domésticas de las zonas pobladas existentes en la cuenca, llegan a este reservorio natural [2].

En el agua contaminada con desechos fecales, pueden estar presentes más de 140 serotipos de virus y diversos parásitos [3, 4]. Entre los virus que pueden estar presentes en el agua y que tienen mayor impacto en la salud pública, debido al gran número de epidemias que han causado, se encuentran los siguientes: hepatitis A, calicivirus, adenovirus, rotavirus y los enterovirus: poliovirus, echovirus y coxsackie [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Entre los parásitos que se encuentran en el agua contaminada, *Giardia lamblia*, ha sido uno de los más implicados en brotes epidémicos [11, 12] y es también uno de los más reportados en nuestro país como causante enfermedades entéricas [13].

Debido al peligro que representan los microorganismos presentes en el agua y a la imposibilidad de estudiarlos todos, se ha venido empleando a los coliformes totales y fecales como indicadores de contaminación microbiológica [14]. Sin embargo, estos índices no son adecuados para indicar la persistencia de virus ni de parásitos en el ambiente [15, 16], ya que está bien establecido que los virus entéricos y los parásitos, a diferencia de las bacterias indicadoras, permanecen estables en el ambiente por períodos más prolongados de tiempo [14]. Diversos investiga-

dores han propuesto el empleo de colifagos como indicadores de contaminación viral [17, 18, 19].

Como consecuencia del déficit de agua para consumo humano y agrícola en la región central del país, el Gobierno de Venezuela consideró necesario formular un plan para el saneamiento ambiental del Lago de Valencia, como una alternativa para el abastecimiento de agua en las ciudades ubicadas en su cuenca y para utilización en actividades agrícolas y deportivas [20]. Debido a que, como se mencionó anteriormente, las aguas contaminadas pueden tener numerosos virus y parásitos, con el fin de aportar información concreta sobre su presencia, de manera que permitiera la formulación de políticas de acción para controlarlos de tal forma que esta agua pudiera ser reutilizada sin peligro para la salud pública, se hacía necesario el estudio de estos microorganismos en este reservorio. El objetivo de este trabajo fue detectar en diversas zonas del Lago de Valencia y en sus principales ríos tributarios, la presencia de virus entéricos, colifagos y parásitos.

## Materiales y Métodos

### Toma de muestras

Se realizaron dos campañas de muestreo en dos años consecutivos. En el primer año, en dos oportunidades diferentes (marzo y octubre), se captaron muestras en las estaciones 5, 6, 12, 20 y 33 (Figura 1), de 10 L de agua para determinar virus y de 4 L para parásitos. En el segundo año, en el mes de abril, se analizaron las mismas estaciones incrementándose el volumen de muestra de agua a 120 L, debido a que dos de las estaciones de muestreos habían dado resultados negativos para ambos tipos de microorganismos. Además se analizaron muestras de 100 mL de agua para la detección de colifagos en las estaciones anteriormente mencionadas y en las siguientes: 8, 12A, 36 y 40. También, se captaron igual volumen de muestras en los principales ríos que descargan al lago para la detección de los tres tipos

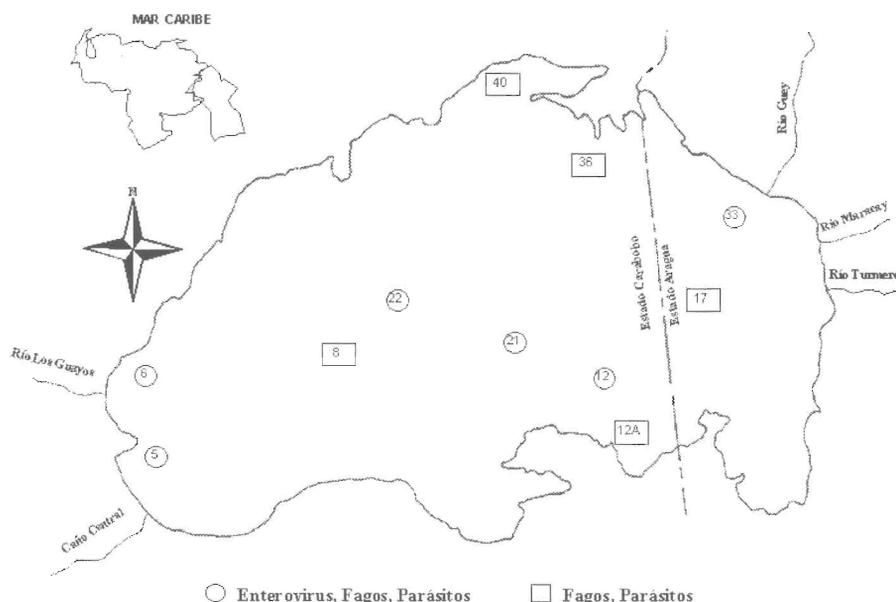


Figura 1. Estaciones de muestreo en el Lago de Valencia.

de microorganismos. Los puntos de muestreo fueron sugeridos por personal del Ministerio de Ambiente y los Recursos Naturales (MARN) a cargo del plan de saneamiento del lago de Valencia.

#### Análisis microbiológico

La determinación de los virus, se realizó empleando la técnica de adsorción-elución [21] como se describe a continuación: el agua se pasó a través de filtros de membranas Zeta-plus (CUNO, Meridian, CT); los virus adsorbidos en los filtros, fueron eluidos usando Extracto de carne (Difco, Detroit, Mich) al 3% en 10% de Caldo trip-tosa fosfato (Difco), pH 10. El eluido fue neutralizado con HCl 1N y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su inoculación en la línea celular MA-104.

Las muestras para el análisis de parásitos fueron concentradas mediante la técnica de floculación con carbonato de calcio, siguiendo la técnica descrita por Vessey y col. [22]. A los 4 L de muestra se le agregó cloruro de calcio y carbonato de sodio 1M y se agitó. Posteriormente se midió el pH de la suspensión y se llevó a 10 con solución NaOH, 3N. Se dejó en reposo por 4 horas, al cabo de las cuales se eliminó el sobrenadante y el sedimento se trató con solución de ácido sulfámico al 10% y se agitó hasta observar la disolución total del floculo. Finalmente, la mezcla resultante se

transfirió a botellas de 250 mL y se centrifugó a 7300 Xg por 10 minutos. Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y al sedimento resultante se le añadió 100 mL de solución Fosfato Salino estéril 1X. Esta mezcla se centrifugó a la misma velocidad utilizada anteriormente, se eliminó el sobrenadante, dejando 5 mL de muestra concentrada que se filtraron a través de una membrana de 5  $\mu\text{m}$  de poro (Nucleopore, Pleasanton, CA). La membrana se coloreó con un anticuerpo monoclonal contra *Giardia* (Meridian, Cincinnati, OH) y con un conjugado FITC anti-globulina. Los filtros se montaron en portaobjetos de vidrio y se examinó toda la superficie empleando un microscopio de fluorescencia (filtro excitador 450 nm - filtro supresor 540 nm). Los quistes fueron identificados por la fluorescencia verde-manzana alrededor de sus paredes, por su forma y tamaño.

Cuando se analizaron muestras de 120 L tanto para virus como para parásitos, el agua se hizo pasar por un sistema de filtración, constituido por: una bomba de gasolina (Homelite- Textron, Charlotte, N.C.), un filtro tipo cartucho DPPPY1 de 1 de poro (CUNO, Meriden CT) para concentrar los parásitos, un filtro Zeta-plus (CUNO, Meriden, CT) para la concentración de virus, y un flujómetro (Kent C-700) para determinar el volumen de muestra procesada. Los virus adsorbidos a los filtros Zeta-plus, fueron eluidos

siguiendo la técnica ya descrita [21] y los parásitos fueron recuperados eluyendolos del filtro con una solución de agua desionizada y tween 80 al 20%. El filtro fue cortado a la mitad y las fibras fueron lavadas en el eluente original. El eluido se reconcentró por centrifugación a baja velocidad y el pellet se resuspendió en una solución salina con 1% de tween 80 y 1% de sodium dodecil sulfato (SDS) y se colocó en un gradiente de citrato de potasio de 1,3 g/mL de gravedad específica. El sobrenadante recuperado de la flotación, se coloreó para IF como se describió anteriormente.

Para el análisis de colifagos, se siguió el procedimiento descrito en el Standard Methods [11]

## Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del estudio de la determinación de virus entéricos. Se demostró la presencia de estos microorganismos en las estaciones 5 y 6 en todos los muestreos realizados. Las estaciones 12 y 20 fueron negativas para presencia de virus, durante el primer año de trabajo y positivas en el se-

gundo. La estación 33 fue una vez positiva y otra negativa durante el primer año de muestreo y positiva en el segundo año. Todas las muestras provenientes de las aguas de los ríos tributarios, fueron positivas para la presencia de virus entéricos.

Los virus son excretados en altas concentraciones en las heces de los individuos, alcanzando valores hasta de  $10^{10}$  UFP/ mL [23], sin embargo al llegar a los cuerpos de agua se diluyen, por lo que para detectarlos en aguas recreacionales o superficiales se recomienda emplear volúmenes de 50 L [14]. En este trabajo fueron suficientes solo 10 L de muestra para demostrar presencia de virus en las estaciones 5 y 6, en los dos muestreos del primer año y en la estación 33 una vez en el mismo período. En el segundo año, cuando se procesaron 120 L de muestra, además de las estaciones anteriores, también resultaron positivos para presencia de virus, la 12 y 20. De lo anterior se deduce que las estaciones 5 y 6 están altamente contaminadas puesto que los resultados obtenidos son positivos en todas las muestras procesadas; la 33 lo está medianamente, ya que durante el primer año de muestreo resultó una vez positiva y otra negativa, mientras que el

Tabla 1  
Presencia de virus entéricos

Estaciones	Virus entéricos ECP		
	Primer año		Segundo año
	1er muestreo	2do muestreo	
5	+	+	+
6	+	+	+
12	-	-	+
20	-	-	+
33	+	-	+
Río Los Guayos	n.a	n.a	+
Río Los Guayos/Quigua	n.a	n.a	+
Caño Charal	n.a	n.a	+
Caño Central	n.a	n.a	+
Río Guey/Brisas del Lago	n.a	n.a	+
Río Guey	n.a	n.a	+
Río Maracay	n.a	n.a	+
Río Turmero	n.a	n.a	+

+ = presencia; - = ausencia; n.a= no analizado.

Tabla 2  
Presencia de Colifagos en el Lago de Valencia

Estaciones	Colifagos UFP/100 mL	
	1 <sup>er</sup> año	2 <sup>o</sup> año
5	+	-
6	+	3,5x10 <sup>2</sup>
12	-	-
20	-	-
33	-	1,0 x 10 <sup>2</sup>
8	n.a	7,50 x 10 <sup>1</sup>
12A	n.a	3,25 x 10 <sup>3</sup>
17	n.a	1,68 x 10 <sup>2</sup>
36	n.a	3,62 x 10 <sup>2</sup>
40	n.a	7,50 x 10 <sup>1</sup>
Río Los Guayos	n.a	5,3 x 10 <sup>3</sup>
Río Los Guayos/Quigua	n.a	4,4 x 10 <sup>4</sup>
Caño Charal	n.a	1,2 x 10 <sup>4</sup>
Caño Central	n.a	1,1 x 10 <sup>4</sup>
Río Guey/Brisas del lago	n.a	4,5 x 10 <sup>4</sup>
Río Guey	n.a	5,2 x 10 <sup>4</sup>
Río Maracay	n.a	4,4 x 10 <sup>4</sup>
Río Turmero	n.a	8,4 x 10 <sup>4</sup>

+ = Presencia. - = ausencia. n.a = no analizado.

segundo año resultó positiva; las estaciones 12 y 20 son las menos contaminadas debido a que fueron negativas para presencia de virus, durante el primer año de trabajo y positivas en el segundo cuando se emplearon 120 L de muestra. Estudios previos realizados en el Lago de Maracaibo [24], habían sugerido que 10 L de muestra era un volumen adecuado ya que en nuestro país los niveles de contaminación de los cuerpos de agua son elevados.

El uso de bacteriófagos se ha venido proponiendo como indicadores alternativos de la calidad virológica del agua, ya que, la presencia de coliformes que había sido empleada durante largo tiempo como el indicador de polución fecal ha sido muy criticado [15], al comprobarse que los virus entéricos, sobreviven durante períodos más largos que las bacterias en ambientes marinos [25-27] y ha sido difícil establecer correlación entre niveles de bacterias y enterovirus. En este tra-

bajo se decidió incorporar el análisis de fagos, mediante la técnica descrita en el Stándard Methods [11], con el fin de verificar su presencia y contribuir así al establecimiento de técnicas más rápidas, fáciles de implementar y económicas, que permitan conocer la calidad virológica del agua. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y se observa que estos microorganismos alcanzaron valores hasta de 10<sup>4</sup> UFP/100mL en los ríos tributarios, mientras en las estaciones del lago, se encontraron valores entre 10<sup>1</sup> y 10<sup>3</sup>. Los colifagos estuvieron ausentes de las estaciones 12, 20 y 33, durante el primer año de muestreo. En el segundo año de muestreo, no se aislaron de las estaciones 5, 12 y 20. Los resultados obtenidos coinciden, a excepción de la estación 5, con los de virus entéricos. Las estaciones 12 y 20 se comportaron como las menos contaminadas, ya que no presentaron colifagos durante ninguno de los muestreos efectuados.

Tabla 3  
Presencia de *Giardia* en el Lago de Valencia y en sus ríos tributarios

Estaciones	Presencia de <i>Giardia</i>		
	Primer año		Segundo año
	1 <sup>er</sup> muestreo	2 <sup>o</sup> muestreo	
5	+	+	+
6	+	+	+
12	-	-	+
20	-	-	+
33	+	+	+
Río Los Guayos	n.a	n.a	+
Río Los Guayos/Quigua	n.a	n.a	+
Caño Charal	n.a	n.a	+
Caño Central	n.a	n.a	+
Río Guey/Brisas del lago	n.a	n.a	+
Río Guey	n.a	n.a	+
Río Maracay	n.a	n.a	+
Río Turmero	n.a	n.a	+

+ = Presencia. - = ausencia. n.a= no analizado.

Los resultados de la observación de *Giardia* se presentan en la Tabla 3. Las estaciones 5, 6 y 33 fueron positivas en todos los muestreos; las estaciones 12 y 20, al igual que para el caso de virus entéricos y colifagos, fueron negativas en el primer año de muestreo y positivas en el segundo año, cuando se emplearon mayores volúmenes de muestra. Todas las muestras provenientes de los ríos, también fueron positivas para la presencia de *Giardia*. Estos resultados confirman la contaminación de las estaciones 5, 6 y 33. Los resultados obtenidos no son sorprendidos, ya que en nuestro país la Giardiasis tiene carácter endémico.

### Conclusiones y Recomendaciones

En las estaciones 5, 6 y 33 del Lago de Valencia, se detectó la presencia de virus, bacteriofagos y *Giardia*. La estación 6 es la más contaminada de ellas, ya que los tres grupos de microorganismos fueron encontrados en todas las oportunidades en que fue muestreada. En las estacio-

nes 12 y 20 se detectó la presencia de virus entéricos y *Giardia* cuando se emplearon volúmenes mayores de muestras.

Se detectó la presencia de virus y parásitos en todas las muestras provenientes de los ríos tributarios al Lago de Valencia. Debido al riesgo que significa para la salud, la presencia de virus y parásitos, es necesario evaluar permanentemente su presencia en el agua, con el fin de conocer la variedad y cantidad de microorganismos presentes y así poder tomar decisiones ajustadas a la realidad, acerca del tratamiento y uso que deba dársele al agua.

La reutilización de las aguas con fines agrícolas e industriales es una necesidad imperativa con el fin de permitir que el agua de mejor calidad sea empleada para el consumo humano. La presencia de microorganismos patógenos en ellas, si bien es un obstáculo muy importante que no debe dejarse de lado, puede ser controlado mediante evaluaciones periódicas y un tratamiento adecuado.

Es recomendable buscar técnicas que permitan mayor agilidad en los resultados, menor

costo y procesamiento de mayor número de muestras en un tiempo más corto. También lo es, el realizar estudios de monitoreo que cubran las diferentes épocas del año (sequía y lluvia) lo cual debe afectar seriamente los niveles microbianos de las aguas.

### Agradecimientos

A la FUNDACION POLAR y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia. (CONDES) por el soporte económico a este proyecto.

A la Lic. Neobe Leal, la Ing. Fanny Rodríguez y el personal del MARNR en las ciudades de Valencia y Maracay quienes nos dieron todo el apoyo logístico y las facilidades que hicieron posible la toma de muestras en el Lago de Valencia y el procesamiento inicial de ellas en el laboratorio de Microbiología del MARNR en Maracay.

A la Lic. Lilibiana Marcano por el apoyo técnico para el procesamiento de las muestras de bacteriofagos.

### Referencias Bibliograficas

1. Convenio M.A.R.N - Fundación Polar. Segundo Seminario Técnico del Programa de Saneamiento Ambiental Integral de la Cuenca del Lago de Valencia (1995).
2. Alarcón A.: Estudio de Calidad de Agua de los Rios Preseleccionados para la Evaluación de excedentes del Lago de Valencia. M.A.R.N.R. Dirección General Sectorial de Planificación y Ordenación del Ambiente. Dirección de Planificación de los Recursos Hidráulicos, 1997
3. Griffin D., Gibson III CH., Lipp E., Riley K., Paul III J., Rose J.: "Detection of Viral Pathogens by Reverse Transcriptase PCR and of Microbial Indicators by Standard Methods in the Canals of the Florida Keys". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 65, No. 9 (1999), 4118-4125.
4. Moe, Ch.: Waterborne Transmission of Infectious Agents. En: Hurst Ch, Knudsen G, McInerney M, Stetzenbach L, Walter M (ed), Manual of Environmental Microbiology. ASM press Washington, D.C.(1997), 136 - 152.
5. Gantzer C., Maul J., Audic J., Schwartzbrod L.: "Detection of Infectious Enteroviruses, Enterovirus Genomes, Somatic Coliphages, and *Bacteroides fragilis* Phages in Treated Wastewater". Appl. Environ. Microbiol. Vol. 64, No. 11 (1998), 4307-4312.
6. Melnick J.: Enteroviruses. En: B.N. Fields and D.M. Knipe (ed), Virology. Ravan Press, USA (1990), 549-605.
7. Sellwood, J., Dadswell, J.: Human Viruses and Water. En: P. Morgan- Carper (ed.), Current Topics in Clinical Virology. The Laverham Press, Salisbury, England. (1991), 29 - 45.
8. Moore, A., Herwaldt, G., Craun, R., Calderon, A., Highsmith, K., Juranek, D.: Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks - United States, 1991 - 1992. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42 (SS-5), (1993), 1 - 22.
9. Girones R., Puig M., Allard A., Lucena F., Wadell G and Jofre J.: "Detection of Adenovirus by PCR amplification in polluted waters". Wat. Sci. Tech.. Vol. 31, No. 5 (1995), 351-357.
10. Jagals P., Grabow W., Villiers J.: "Evaluation of indicators for assessment of human and animal faecal pollution of surface run-off". Wat. Sci. Tech. Vol. 31, No. 5 y 6 (1995), 235-241.
11. APHA. Standard Methods for the Examination of water and wastewater. American Public Health Association. APHA, Inc., New York, 1995.
12. Schaefer III, F.: Detection of Protozoan parasites in Source and Finisherd Drinking Waters. En: Hurst Ch, Knudsen G, McInerney M, Stetzenbach L, Walter M (ed), Manual of Environmental Microbiology. ASM press Washington, D.C. (1997), 153 - 167.
13. Botero L., Quintero W., Medina Z., Oliveros C.: "Quistes de Giardia en Aguas Negras". KAMERA. Vol. 24, No 2 (1996), 83-91.
14. Fujioka, R.: Indicators of Marine Recreational Water Quality. En: Hurst Ch., Knudsen G., McInerney M., Stetzenbach L., Walter M (ed): " Manual of Environmental Microbiology". ASM press Washington, D.C. (1997), 176 - 183.

15. Grabow, W. O and Coubrough, P.: "Practical direct plaques assay for coliphages in 100 mL of sample of drinking water". *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 52, N° 3 (1986), 430-433.
16. Moriñigo M. A., Wheeler D., Berry C., Jones C., Muñoz M. A., Cornax R., Borrego J. J.: "Evaluation of Different Bacteriophages Groups as Faecal Indicator in Contaminated Natural Waters in Southern England". *Wat. Res.* Vol. 26, No. 3 (1992), 267-271.
17. Armon R. and Kott Y.: "Bacteriophages as Indicators of Pollution". *Crit. Rev. En Env. Sci. and Tech.* Vol 26, No. 4 (1996), 299-335.
18. Palmateer G. A., Dutka B. J., Janzen E. M., Meissner S. M., Sakellaris M. G.: "Coliphages and Bacteriophages as Indicators of Recreational Water Quality". *Wat. Res.* Vol. 25, No. 3 (1991), 355-357.
19. Morriñigo, M., Wheeler, D., Berry, C.; C. Jones.: "Evolution of different Bacteriophages groups as faecal indicator in contaminated natural waters in Southern England". *Wat. Res.* Vol 26, N° 3 (1992), 267-271.
20. Ore H.: Estimación de la carga poluente en los principales tributarios al Lago de Valencia. Segundo Seminario Técnico del Programa de Saneamiento Ambiental Integral de la Cuenca del Lago de Valencia. Convenio M.A.R.N.R- Fundación Polar. (1995).
21. Goyal S., Gerba Ch.: Concentration of Viruses from Water by Membrane Filters. En: Gerba C and Goyal S (ed): "Methods in Environmental Virology", Marcel Dekker, Inc, USA (1982), 59-116.
22. Vessey G., Slade J., Byrne M., Shepherd K., Fricker C.: "A new method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water". *J. Appl. Bacteriol.* Vol. 75, No. 5 (1993), 82-85.
23. Gerba, Ch.; Rose, J.: Viruses in Source and Drinking Water. En: McFeters, A (ed): *Drinking water Microbiology*. Springer-Verlag New York Inc, USA (1990), 380 - 396.
24. Botero L., Molaro G., Salas R., Hernández H.: "Detection of viruses in the lake of Maracaibo". *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* Vol. 19, No. 12 (1996), 141-146.
25. Goyal S.: Phage as Indicators of Fecal pollution. In: S. Goyal., Ch. Gerba., G. Bitton (ed): *Phage Ecology*, Wiley Interscience Publications, USA (1987), 202.
26. Borrego J. J., Moriñigo M. A., DE Vicent A., Cornax R., Romero P.: "Coliphages as an Indicator of Faecal Pollution in Water. Its Relationship with Indicator and Pathogenic Microorganisms". *Wat. Res.*, Vol. 21, No. 12 (1987), 1473-1480.
27. Cornax R., Moriñigo M. A., Babelona M. C., Castro D., Borrego J. J.: "Significance of Several Bacteriophages Groups as Indicators of Sewage Pollution in Marine Waters". *Wat. Res.* Vol. 25, No. 6 (1991), 673-678.

Recibido el 24 de Enero de 2000

En forma revisada el 30 de Octubre de 2000