

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

Aislamiento de bacteriófagos y su aplicación en la contaminación de la Bahía Todos Santos, B.C.

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

Presenta

ROGELIO SEÑEZ REYES

Ensenada, B.C. Enero de 2001

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Aislamiento de bacteriófagos y su aplicación en la contaminación de la
Bahía Todos Santos, B.C.

TESIS

que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

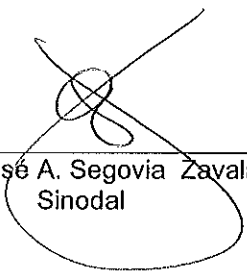
presenta

ROGELIO SEÑEZ REYES

Aprobada por:


M.C. María Victoria Orozco Borbón
Directora de Tesis


Dra. Roxana Rico Mora
Sinodal


M.C. José A. Segovia Zavala
Sinodal

RESUMEN

Con el objetivo de implementar el método para el aislamiento y cuantificación de bacteriófagos en aguas costeras de la bahía de Todos Santos, B.C. se realizaron muestreos durante marzo a abril de 2000 en 15 estaciones (cinco estaciones en zona de playa y diez estaciones a 0.5 y 1.0 km de la costa). Para evaluarlos se utilizó el método modificado de doble capa, el cual se basa en la comprobación de la actividad del bacteriófago con respecto a un cultivo joven de *Escherichia coli* en placas con medio Agar Soya Tripticasa. El número de fagos se determinó por la presencia de zonas claras o de lisis sobre la superficie del medio y reportadas como unidades formadoras de bacteriófagos en 100 ml de muestra (UFF 100⁻¹). Para validar y complementar el aislamiento de bacteriófagos se analizaron las bacterias coliformes totales, coliformes fecales y estreptococos fecales mediante la técnica estandar del número más probable; así como las variables ambientales de temperatura, potencial de hidrógeno y salinidad. Los resultados obtenidos mostraron que las mayores concentraciones de bacteriófagos se presentaron en las estaciones correspondientes a los efluentes de las plantas de tratamiento el Naranjo y el Gallo, y al punto de mezcla con un orden de magnitud igual a las tradicionales bacterias indicadoras de contaminación. El análisis de agrupamiento mostró tres grupos: zona afectada, zona de transición y zona limpia. Este resultado es congruente con la calidad bacteriológica de la bahía, misma que se encontró por debajo de los límites de detección de los métodos y no exceden los límites establecidos para aguas de uso recreativo, mientras que algunas de las estaciones de playa mostraron todavía, aunque en menor magnitud que en años anteriores, la influencia de la descarga del arroyo el Gallo.

DEDICATORIA

A mis padres

Esteban y Ernestina

por ser ejemplo de amor, rectitud y honestidad.

A mis hermanos

Martin E., Hector G., Alejandro, L. Gabriel y J. Maritza

a cada uno los llevo siempre en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis. M.C. Ma. Victoria Orozco Borbón, por sus enseñanzas, consejos, ayuda, paciencia y a esa manera de eliminar la barrera "maestro-alumno" que siempre permitió desarrollarme en su grupo de trabajo.

A mis sinodales, Dra. Roxana Rico Mora y M.C. José A. Segovia Zavala, por haber aceptado ser mis sinodales, por sus sugerencias y recomendaciones para enriquecer el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la Maestría.

A la Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por todo el apoyo y por permitir la realización de éste trabajo.

A mis compañeros, Arturo Ornelas, Lourdes Simental, Paulina V., René Valdivia, Nancy Ramírez, Lorena Ríos, Angel C., Oscar Barocio, Oscar Chacón, Leopoldo Mendoza, César B., Prof. Ma. Elisa L., Lizeth A., por toda su ayuda, sugerencias y ánimos que me dieron durante la realización de esta tesis.

A todas las personas que de una u otra manera intervinieron en la realización de la presente.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	3
1.2. OBJETIVOS	7
2. ÁREA DE ESTUDIO	8
3. METODOLOGÍA	11
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	48
7. REFERENCIAS	49
APÉNDICE A	59
APÉNDICE B	60
APÉNDICE C	62

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización de la área de estudio y estaciones de muestreo en la bahía de Todos Santos, B.C.	10
2	Determinación de bacteriófagos con el método modificado de doble capa de agar.	15
3	Concentración de (a) bacteriófagos (UFF/100 ml) y (b) coliformes totales (NMP/100 ml) en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril del 2000.	22
4	Concentración de (a) coliformes fecales (NMP/100 ml) y (b) estreptococos fecales (NMP/100 ml) en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril del 2000.	23
5	Regresión lineal simple entre coliformes totales y coliformes fecales.	30
6	Regresión lineal simple entre estreptococos fecales y bacteriófagos.	30
7	Regresión lineal simple entre coliformes totales y estreptococos fecales.	31
8	Regresión lineal simple entre coliformes totales y bacteriófagos.	31
9	Regresión lineal simple entre coliformes fecales y estreptococos fecales.	32
10	Regresión lineal simple entre coliformes fecales y bacteriófagos.	32
11	Dendrograma del análisis de agrupamiento modo Ward's en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C. con respecto a los parámetros microbiológicos y físicoquímicos durante el período de marzo a abril del 2000.	36

LISTA DE TABLAS

Tablas		Página
I	Fechas de muestreos en la bahía de Todos Santos, B.C.	12
II	Localización de las estaciones de muestreo en la bahía de Todos Santos, B.C.	13
III	Concentración promedio de bacteriófagos UFF/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	19
IV	Concentración promedio de bacterias coliformes totales y fecales NMP/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	20
V	Concentración promedio de estreptococos fecales NMP/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	21
VI	Valores de temperatura, potencial de hidrógeno y salinidad promedio en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	25
VII	Razones CT/CF en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	27
VIII	Razones CF/EF en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	28
IX	Análisis de correlación y regresión lineal simple entre coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales y bacteriófagos en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.	29

X	Porcentaje de estaciones de muestreo que exceden los valores límites de CT y CF para uso recreativo.	34
XI	Promedio geométrico y porcentaje de muestras que exceden los límites de los indicadores en el área de cultivo para moluscos bivalvos durante marzo a abril de 2000.	35
XII	Porcentaje de muestras que exceden los límites de los indicadores en la descarga de aguas residuales durante marzo a abril de 2000.	35

1. INTRODUCCIÓN

Por décadas, el grupo de las bacterias coliformes fecales ha sido empleado como indicador de la presencia de patógenos humanos en agua de mar. Sin embargo, debido a que la sobrevivencia de varios microorganismos patógenos es amplia y depende de muchos factores tales como: concentración de microorganismos en el agua residual, pH, temperatura, salinidad, presencia de materia orgánica e inorgánica, radiación solar y dilución (Yahya *et al.*, 1998). Se empezó a utilizar a los virus y algunos parásitos como organismos indicadores, por presentar una mayor resistencia al tratamiento de aguas residuales (Katzenelson, 1974; Payment, 1993; citado por Jofre *et al.*, 1995).

La sobrevivencia de virus en agua de mar es cada vez más preocupante para la salud pública debido a las razones siguientes: más de cien tipos de virus patógenos humanos pueden estar presentes en agua contaminada fecalmente, pero pocos pueden ser detectados por los métodos disponibles (Havelaar *et al.*, 1993; citado por Yahya *et al.*, 1998); los virus presentan una mayor estabilidad relativa en el medio ambiente que los indicadores bacterianos tradicionales; además de que, un bajo número de estos virus puede causar infección (Yahya *et al.*, 1998).

El agua contaminada puede albergar una gran variedad de virus originados primariamente del tracto gastrointestinal del hombre. Estos son conocidos como virus "entéricos". Los virus entéricos pueden encontrarse en varios grupos taxonómicos y pueden causar una variedad de enfermedades y síntomas (Melnik, 1984; Havelaar, 1986; citado por IAWPRC, 1991). Estos corresponden a los *Picornaviridae*, una familia muy grande de virus con respecto al número de miembros, pero una de las más pequeñas en términos del tamaño del virión

Un gran número de picornavirus producen enfermedades en el hombre, que van desde parálisis grave hasta meningitis aséptica, pleurodinia, miocarditis, hepatitis, lesiones

cutáneas vesiculares y exantematosas, lesiones mucocutáneas, trastornos respiratorios e intestinales, enfermedad febril indiferenciada y conjuntivitis.

Con frecuencia se hacen distinciones entre virus relacionados con eucariontes y virus que infectan a procariotes; estos últimos virus se denominan bacteriófagos. Los bacteriófagos son virus que infectan células bacterianas huéspedes. Éstos usualmente consisten de un nucleóide de ácido nucleico (genoma) y una cubierta proteica (cápside). Estos virus son capaces de sobrevivir, pero no de proliferar, en ausencia de una célula huésped; ya que la replicación del genoma viral depende de la energía metabólica y de la maquinaria sintetizadora de macromoléculas del huésped, los cuales se manifiestan en cinco fases principales consecutivas: adsorción, penetración del ácido nucleico, síntesis de macromoléculas, maduración y lisis de la célula huésped (De Jawetz *et al.*, 1992).

La forma de clasificar los bacteriófagos se basa principalmente en la morfología de la cápside, vista por microscopía electrónica, y en la naturaleza del ácido nucleico. Existen seis grandes familias, cada una dividida en varios subgrupos: Las familias *Myoviridae*, *Styloviridae* y *Podoviridae* incluyen a los bacteriófagos que presentan cápside con simetría cúbica, una doble cadena de DNA y una cola espiral. La diferencia entre estas tres familias se basa en la complejidad y contractividad de la cola y la dimensión relativa de la cápside. Las familias *Microviridae* y *Leviviridae* presentan simetría cúbica y una cadena sencilla de DNA y RNA, respectivamente. La última familia *Inoviridae* presenta filamentos que son extremadamente largos, más o menos flexibles con cadena sencilla de DNA (IAWPRC, 1991).

Los métodos disponibles actualmente para la detección de virus entéricos humanos son relativamente laboriosos, requieren de personal y equipo especializado, por lo tanto no pueden ser usados como una prueba rutinaria en laboratorio (Yahya *et al.*, 1991). Por lo que es necesario utilizar otros organismos indicadores adicionales como los virus

bacterianos, especialmente los que infectan a *Escherichia coli* (colifagos o bacteriófagos) que son detectados fácilmente por métodos simples, rápidos y baratos, los cuales se utilizan para evaluar la reducción viral en los procesos de tratamiento de aguas (Ignazzitto *et al.*, 1980; IAWPRC, 1990; Jofre *et al.*, 1995; Narkis *et al.*, 1995; Ritva y Helvi, 1995; Turner y Lewis, 1995; Sinton *et al.*, 1999), así como su impacto en la zona costera (Callahan *et al.*, 1995; Lucena *et al.*, 1995; Yahya *et al.*, 1998).

1.1 ANTECEDENTES

El incremento de descargas de aguas residuales, aunado a la falta de infraestructura adecuada para su tratamiento en la zona costera, ha generado la mayor parte de la contaminación en la bahía de Todos Santos (B.T.S.). Debido a esto, el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O) de la Universidad Autónoma de Baja California (U.A.B.C) ha realizado, desde 1978, varios estudios referentes a la calidad del medio ambiente marino, con el propósito de generar información básica que sirva de referencia para diagnosticar los problemas ocasionados por la contaminación y proporcionar posibles alternativas de solución relacionadas con su prevención, control y reducción.

Estos estudios indican un deterioro en la calidad sanitaria y fisicoquímica de la zona costera (I.I.O., 1982; Segovia Zavala, 1982; Sañudo-Wilhelmy, 1983) debido, principalmente, a que las aguas residuales descargadas al mar contienen concentraciones elevadas de materia orgánica y microorganismos, de los cuales algunos son patógenos (Hopkins *et al.*, 1985) entre los que se encuentran las bacterias coliformes, estreptococos, estafilococos, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* y virus de la hepatitis y la poliomielitis (Moore *et al.*, 1988; citado por Orozco-Borbón *et al.*, 1989).

Los efectos de la introducción de este tipo de aguas contaminadas en el ecosistema

marino son muy variados. Por ejemplo, los organismos bentónicos debido a las modificaciones del medio presentan cambios en la abundancia relativa y en la diversidad de especies, asociados a una alteración de la estabilidad poblacional (Sañudo-Wilhelmy y Suárez Vidal, 1984). Además de representar un riesgo potencial para la salud de personas consumidoras de moluscos bivalvos obtenidos de aguas adyacentes, o para bañistas en playas contaminadas (Orozco-Borbón y Sañudo-Wilhelmy, 1988).

Se ha observado que la capacidad de los microorganismos patógenos de sobrevivir en el medio ambiente marino conduce a riesgos de tipo epidemiológico (Arribas, 1988). La infección en el hombre puede ser de manera directa, por ejemplo al practicar la natación, o indirecta ingiriendo alimentos marinos contaminados. Entre las enfermedades adquiridas por estas vías se encuentran la fiebre tifoidea, hepatitis, paratifoidea, cólera, diarreas infantiles y disentería bacilar (Favero, 1985; Rosas *et al.*, 1985; Seyfried *et al.*, 1985). De lo anterior se define que es importante identificar oportunamente el peligro epidemiológico potencial de estos microorganismos.

Una manera de evaluar la contaminación bacteriana es utilizando organismos indicadores, como por ejemplo *Escherichia coli*, ya que su presencia en los cuerpos receptores de aguas residuales indica una contaminación fecal directa (Tanahara-Romero, 1996). Además, algunas investigaciones han demostrado que la técnica para su determinación es más práctica y sencilla en comparación con la de organismos patógenos (Secretaría de Salud, 1989a). Otros organismos indicadores que se utilizan son los estreptococos fecales que han demostrado ser mejores indicadores de contaminación microbiológica que *Escherichia coli* por ser estos más resistentes al estrés ambiental y tener una sobrevivencia mayor en el medio marino (Barcina *et al.*, 1990); no obstante, otros autores consideran que no es la mejor alternativa (Pourcher *et al.*, 1991). Esta controversia generó dos líneas de investigación, una a favor del uso de las bacterias coliformes y otra a favor de los estreptococos fecales.

Es importante mencionar que muchas veces las relaciones entre dos o más

organismos pueden proporcionar cierta información, en particular la relación de coliformes fecales y estreptococos fecales. Si los estreptococos fecales tienen menos de 24 horas y se presentan en cantidad suficiente, la proporción puede permitir la distinción entre los de origen animal y los de origen humano (Secretaría de Salud, 1989a). Lo anterior define que el tiempo es un limitante para proporcionar información cualitativa de su origen.

Otros organismos pueden usarse como indicadores de contaminación fecal potencial, como es el caso de los bacteriófagos los cuales indican la presencia de virus entéricos patógenos. Algunos de estos virus, que específicamente atacan a huéspedes bacterianos (generalmente *Escherichia coli*), se encuentran en concentraciones elevadas en instalaciones de tratamiento de aguas residuales, siendo altamente resistentes a desinfectantes (cloro) y a situaciones ambientales adversas. Estas cualidades los hacen útiles como indicadores de la presencia de otros virus puesto que, en teoría, están presentes en números elevados en el ambiente lo cual permite realizar estimaciones de sus concentraciones (Secretaría de Salud, 1989a).

El creciente interés del área de Salud Pública sobre la calidad virológica de los moluscos y el establecimiento de normas para coliformes en moluscos y aguas de cosecha se debe a que los virus entéricos humanos pueden ser transmitidos por vía fecal u oral. Por lo cual se requiere realizar estudios sobre la incidencia, presencia y el destino de los virus entéricos en estos organismos y en su habitat así como, la relación entre virus entéricos y bacterias indicadoras (Secretaría de Salud, 1989b).

Se han reportado estudios donde *Escherichia coli* muere rápidamente en muestras del efluente de aguas residuales, mientras que arriba del 20 % de los fagos pueden persistir después de 1 año (Ayres, 1977; citado por Ignazzitto *et al.*, 1980). Ignazzitto *et al.*, (1980) menciona que los fagos podrían ser especies indicadoras para enterovirus así como *E. coli* es un indicador de bacterias entéricas. Este criterio virológico podría ser empleado para determinar cualitativamente y cuantitativamente la contaminación en la bahía de Todos Santos.

Actualmente, con base en la información que ha sido generada es posible definir algunos patrones generales de la contaminación orgánica-bacteriológica en la zona costera de la bahía de Todos Santos.

Los estudios referentes a la calidad bacteriológica de esta zona, indican que la contaminación bacteriana ocurre principalmente en dos áreas; en la parte central de la bahía y en zonas cercanas a la desembocadura el arroyo "El Gallo", incluyendo la dársena portuaria y el área correspondiente al Sauzal de Rodríguez (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984; Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa, 1989).

Los valores máximos de bacterias coliformes se detectan en las zonas adyacentes a las descargas. La concentración de ellas varía de acuerdo al grado de contaminación orgánica en determinada zona. La zona de la desembocadura del arroyo El Gallo así como la del Sauzal de Rodríguez están fuertemente contaminadas por materia orgánica, lo que permite una mayor sobrevivencia de bacterias coliformes (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984).

Las concentraciones bacterianas en la bahía de Todos Santos presentan en general una variación temporal. Los valores mínimos se presentan durante el invierno y los máximos en verano, cuando la zona costera es más utilizada para las actividades recreativas (Segovia-Zavala y Orozco- Borbón, 1986). Los estudios de contaminación fecal en la columna de agua (Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo, 1983) reportan que las concentraciones de bacterias coliformes son mayores a los límites establecidos por la legislación mexicana para uso recreativo (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984).

Las zonas que presentan mayor riesgo para la salud de la población que utiliza en forma directa la zona costera son: la dársena portuaria, playa municipal y la zona llamada Cueva de los Tigres, debido a que se ha detectado la presencia de bacterias patógenas entéricas como lo son *Salmonella* sp y *Shigella* sp (Orozco-Borbón y Sañudo- Wilhelmy, 1988; Jiménez-González, 1989). Sin embargo, la parte sur de la bahía

presenta concentraciones bajas de bacterias coliformes, con excepción de la boca del estero de Punta Banda en épocas de precipitación pluvial, por lo que se puede definir como una zona bacteriológicamente limpia.

Estudios recientes han demostrado que la parte norte de la bahía presenta el mayor número de cepas de *Vibrio cholerae* 01 así como la mayor concentración de bacterias heterótrofas viables y bacterias tipo *Vibrio*, en comparación con la parte sur (Portillo-López y Lizárraga-Partida, 1997).

De los antecedentes previamente citados se puede observar que los estudios de contaminación microbiológica en la bahía de Todos Santos se circunscriben a la determinación de bacterias coliformes totales y fecales, además de cepas de *Vibrio cholerae* 01, mismas que presentan sus limitantes como organismos indicadores. Una alternativa viable y de mayor consistencia sería la utilización de bacteriófagos o virus que infectan a bacterias huéspedes de corto periodo de vida. Por lo tanto el uso de bacteriófagos podría explicar mejor la variabilidad estacional y espacial de la contaminación microbiológica que la definida con los estudios de bacterias coliformes fecales y totales, además se podría identificar con mayor exactitud y ser de mayor utilidad desde el punto de vista epidemiológico. De ser así, este criterio tiene un gran potencial de uso en zonas recreativas y de cultivos de especies marinas para consumo humano.

1.2 OBJETIVOS

- Implementación de un método para el aislamiento y cuantificación de bacteriófagos en agua de mar.
- Evaluar la calidad microbiológica del agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C.

2. ÁREA DE ESTUDIO

La bahía de Todos Santos (figura 1) está ubicada en la costa noroccidental de la Península de Baja California entre los 31°40' y 31°55' de latitud norte y los 116°36' y 116°50' de longitud oeste; está limitada al norte por Punta San Miguel, al este por la ciudad de Ensenada, al sur por Punta Banda y al oeste por las Islas de Todos Santos. Tiene una forma rectangular y, un área aproximada de 180 Km². Cuenta con dos conexiones a mar abierto separadas por las Islas de Todos Santos, la boca norte es de 12 Km de ancho, donde la profundidad máxima es de 40 m aunque en la zona existe un bajo con profundidades menores a 10 m, y la boca sur de 6 Km de ancho, donde se alcanzan profundidades hasta de 300 m en el centro del cañón de Punta Banda (Gutiérrez-Gutiérrez, 1999).

La bahía se localiza en una región semiárida, con una precipitación pluvial de 10 mm mensual promedio y, de 250 mm promedio anual. La época de lluvia se presenta a finales de las época de otoño y en la época de invierno, principalmente entre los meses de noviembre y febrero (Vera-González *et al.*, 1998).

Los arroyos Ensenada y San Carlos son importantes afluentes únicamente en invierno, cuando ocurre precipitación pluvial, mientras que el arroyo El Gallo capta las aguas residuales de la Comisión Estatal de Servicios Públicos de Ensenada (CESPE) y desemboca finalmente en el mar (Orozco-Borbón *et al.*, 1994). El volumen promedio de agua residual descargado en nuestra área de estudio es de 391 lps (Comisión Estatal de Servicios Públicos de Ensenada, 2000).

Otro aspecto importante que se debe considerar para entender la problemática

de la contaminación en la bahía de Todos Santos, es el patrón de circulación de corrientes superficiales. La circulación de aguas superficiales de la bahía presenta dos giros, uno anticiclónico en la parte norte y otro ciclónico en la parte sur. El movimiento de agua superficial en la parte sur aparentemente se desplaza hacia el interior de la bahía formando un flujo paralelo a la costa, para cambiar hacia el norte y salir hacia el oeste por la parte media de la bahía (Alvarez-Sánchez *et al.*, 1988; Tanahara-Romero, 1996).

En la zona conocida como Rincón de Ballenas (estaciones 10 a la 15) se realizan actividades de acuicultura, con fines comerciales, del mejillón del Pacífico *Mytilus galloprovincialis* y del ostión Japonés *Crassostrea gigas* (Vera-González *et al.*, 1998).

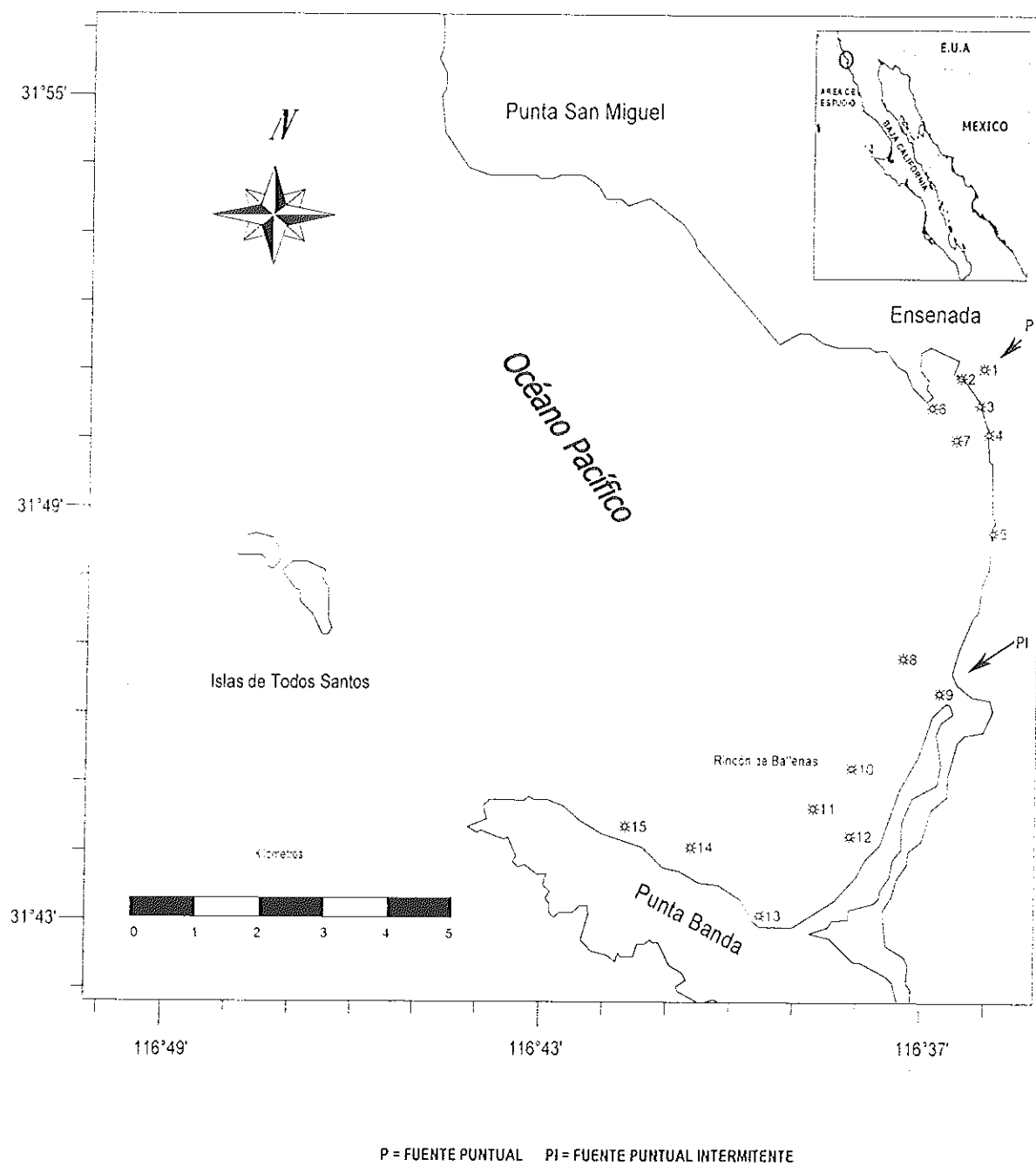


Figura 1.- Localización del área de estudio y estaciones de muestreo en la bahía de Todos Santos, B.C.

3. METODOLOGÍA

Durante marzo a abril de 2000 se realizaron muestreos de agua de mar en 15 estaciones. Cinco estaciones en zona de playa y diez estaciones a 0.5 y 1.0 km de la costa (figura 1). Las muestras de agua fueron tomadas en la superficie, con botellas de plástico de boca ancha de 250 ml. Estas botellas fueron previamente esterilizadas a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Una vez tomadas las muestras se conservaron en hielo mientras se trasladaban al laboratorio para su análisis inmediato. Las fechas de muestreo se presentan en la tabla I. Las estaciones de muestreo (Tabla II) se determinaron considerando los siguientes factores: fuentes de contaminación puntuales y no puntuales, ubicación del cultivo de moluscos bivalvos, aspectos hidrográficos y patrón de circulación de las corrientes. Con lo que respecta al tiempo, se consideró el muestreo durante la época en donde trabajos previos demostraron que la contaminación orgánica-bacteriológica es menor (Segovia-Zavala *et al.*, 1986; Orozco- Borbón *et al.*, 1994; Tanahara-Romero, 1996).

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN VIROLÓGICA

Para evaluar la presencia virológica en agua de mar se utilizó a los bacteriófagos, que se determinaron con el método modificado de doble capa de agar (Yahya *et al.*, 1991). El fundamento del método se basa en la comprobación de la actividad del bacteriófago con respecto a un cultivo joven de *Escherichia coli* en placas con medio Agar Soya Tripticasa. Las unidades son reportadas como UFF 100⁻¹ que indican unidades formadoras de bacteriófagos en 100 ml de muestra.

El análisis consistió en la inoculación de placas de Agar Soya Tripticasa (AST) con la muestra. Para ello, al medio de cultivo, fundido (3 a 4 mililitros de medio AST

MUESTREO	ESTACIÓN	FECHA
1	1-15	3/MAR/2000
2	1-15	17/MAR/2000
3	1-15	7/ABR/2000
4	1-15	28/ABR/2000

Tabla 1.- Fechas de muestreos en la bahía de Todos Santos, B.C.

ESTACIÓN	LATITUD NORTE	LONGITUD OESTE	TIPO DE FUENTE	OBSERVACIONES GENERALES
1	31°51'16"	116°36'54"	PUNTUAL	Tubo de los efluentes de las plantas de tratamiento del Naranja y el Gallo
2	31°51'04"	116°37'10"	PUNTUAL	Punto de mezcla
3	31°50'42"	116°36'53"	NO PUNTUAL	Cueva de los Tigres
4	31°50'10"	116°56'47"	NO PUNTUAL	Conalep
5	31°48'50"	116°36'40"	NO PUNTUAL	Ciprés
6	31°50'39"	116°37'43"	NO PUNTUAL	
7	31°50'06"	116°37'01"	NO PUNTUAL	
8	31°47'01"	116°38'07"	PUNTUAL INT.	Esguimientos por lluvias
9	31°46'30"	116°37'32"	PUNTUAL INT.	Boca del estero
10	31°45'24"	116°38'54"	NO PUNTUAL	
11	31°44'49"	116°39'30"	NO PUNTUAL	
12	31°44'25"	116°38'55"	NO PUNTUAL	
13	31°43'16"	116°40'20"	NO PUNTUAL	
14	31°44'15"	116°41'26"	NO PUNTUAL	
15	31°44'33"	116°42'28"	NO PUNTUAL	

Tabla II.- Localización de las estaciones de muestreo en la bahía de Todos Santos, B.C.

semi-sólido a una temperatura de 45 a 46.5 °C) en tubo, se le adicionó una cantidad de inóculo, que osciló entre 0.1 a 5.0 mililitros de muestra de agua de mar (directa o diluída) y 1.0 mililitro de cultivo de *E. coli* (ATCC 15597, American Type Culture Collection) crecida por 6 horas en caldo Soya Tripticasa a 35 °C, y se homogenizó. Una vez, constituida la mezcla, se vertió en la caja Petri con AST y se dejó solidificar por 20 minutos. Las placas se incubaron invertidas durante 18-24 horas a 35 °C, para después determinar el número de fagos por la presencia de zonas claras o lisis sobre la superficie del medio (figura 2). El método de Yahya *et al.* (1991) considera agitación constante durante las 6 horas de crecimiento del cultivo joven de *E. coli*, así como una temperatura de incubación de 37 °C.

Como control positivo se empleó un cultivo puro del colifago MS2 (ATCC 15597B1), debido principalmente a que éste presenta las siguientes características: Cadena sencilla de RNA, estructura y tamaño (28 nm) similar al poliovirus, estar presente en material fecal, presentar un mayor estabilidad en el medio ambiente y no ser patógeno para el humano (Yahya *et al.*, 1991).

INDICADORES DE CONTAMINACIÓN BACTERIOLÓGICA

Para validar y complementar el aislamiento de bacteriófagos se analizaron las bacterias coliformes totales y fecales (APHA, 1995); así como estreptococos fecales, que se determinaron con el método del número más probable (NMP) con serie de cinco tubos.

El análisis para bacterias coliformes consistió en las pruebas presuntiva y confirmativa. Se utilizó caldo lactosado como medio presuntivo, a 35 °C durante 48 horas. La confirmación se realizó con medio verde bilis brillante al 2 %, a 35 °C durante 48 horas, para coliformes totales, y medio EC, a 44.5 °C en baño de agua durante 24 horas, para coliformes fecales. Para la determinación de estreptococos fecales se utilizó caldo azida dextrosa como medio presuntivo, a 35 °C durante 48 horas, y medio etil violeta azida (EVA) como confirmativo, a 35 °C durante 48 horas.

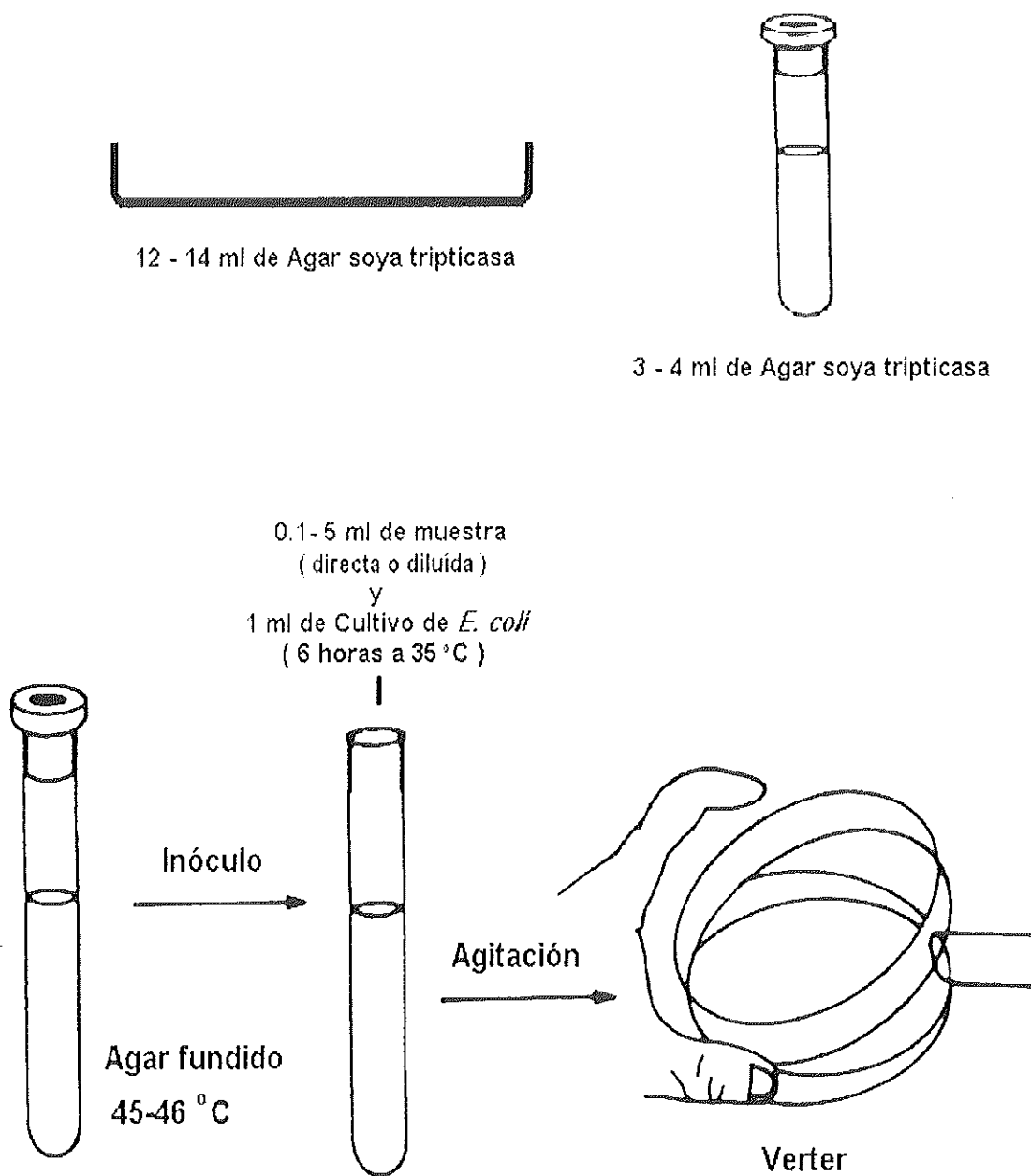


Figura 2.- Determinación de bacteriófagos con el método modificado de doble capa de agar (Yahya *et al.*, 1991).

Los resultados microbiológicos fueron complementados con las determinaciones de las variables ambientales que se registraron en cada una de las estaciones de muestreo. Las variables fueron temperatura (°C), potencial de hidrógeno (pH) y salinidad (‰).

Para establecer la calidad sanitaria de las estaciones de muestreo, los valores serán comparados con los límites establecidos por California Assembly Bill 411 (Noble *et al.*, 2000) para aguas de uso recreativo (estaciones 2 a la 15), Secretaría de Salud (estaciones 8 a la 15) y NOM-001-ECOL-1996 (estación 1). Observar apéndice A.

Para establecer el grado de asociación entre las quince estaciones de muestreo con los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos, se aplicó un análisis de agrupamiento modo Ward's de distancias euclidianas de cadena sencilla. Previo al análisis de agrupamiento los datos fueron transformados en Z (variable adimensional recomendada para construir una matriz de correlación) y que tiene como objeto dar un peso igual a cada una de las variables; para esto se utilizó el paquete estadístico STATISTICA, versión 6.0 para Windows.

4. RESULTADOS

El estudio comprendió de marzo a abril de 2000, y se realizaron cuatro muestreos en las quince estaciones. Además del análisis de bacteriófagos (BT) se realizaron las pruebas para la determinación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y estreptococos fecales (EF). Por lo tanto se tienen 60 datos para cada variable microbiológica, así como las variables ambientales de T °C, S ‰ y pH.

En el caso de los bacteriófagos (tabla III) las mayores concentraciones ocurrieron en las estaciones 1 y 2 con valores promedio de 53,875 y 72,050 UFF 100⁻¹ ml BT, respectivamente. El resto de las estaciones mostraron concentraciones bajas. El valor máximo ocurrió en la estación 2 con 147.000 UFF 100⁻¹ ml BT. En las estaciones 8, 10, 13 y 15 no se detectaron bacteriófagos.

Para el caso de las bacterias coliformes totales y fecales (tabla IV) las concentraciones mayores ocurrieron en las estaciones 1 y 2 con valores promedio de 939 NMP 100⁻¹ ml CT; 667 NMP 100⁻¹ ml CF y 58,100 NMP 100⁻¹ ml CT; 4,400 NMP 100⁻¹ ml CF, respectivamente. El resto de las estaciones (3 a la 15) mostraron concentraciones bajas. Los valores máximos ocurrieron en la estación 2 con 160,000 NMP 100⁻¹ ml CT y 11,000 NMP 100⁻¹ ml CF. Los valores mínimos se presentaron en las estaciones 8 a la 15 con <2 NMP 100⁻¹ ml CT y <2 NMP 100⁻¹ ml CF; con excepción de la estación 13, la cual presentó una concentración un orden de magnitud mayor.

Con respecto a los estreptococos fecales (tabla V), al igual que en los otros organismos indicadores, se presentó el mismo comportamiento. Las concentraciones mayores se presentaron también en las estaciones 1 y 2 con valores promedio de 5,058 y 12,725 NMP100⁻¹ ml EF, respectivamente. El resto de las estaciones presentaron concentraciones bajas. El valor máximo ocurrió en la estación 2 con 35,000 NMP 100⁻¹ ml EF; mientras que los valores mínimos se presentaron en las estaciones 10,11, 14 y 15 con <2 NMP 100⁻¹ ml EF.

En general, las concentraciones de virus (figura 3a) y bacterias indicadoras de contaminación fecal (figuras 3b, 4a y 4b) fueron mayores en las estaciones cercanas a las descargas de aguas residuales del arroyo El Gallo (E1, E2, E6 y E7), disminuyendo en número a mayor distancia de éstas.

ESTACIÓN	PROMEDIO DE BT	VALOR MIN/MAX
1	53875	19000 - 86000
2	72050	5500 - 147000
3	360	30 - 1280
4	25	ND - 60
5	18	ND - 30
6	100	35 - 180
7	89	10 - 280
8	ND	ND
9	5	ND - 10
10	ND	ND
11	25	ND - 40
12	3	ND - 10
13	ND	ND
14	5	ND - 20
15	ND	ND

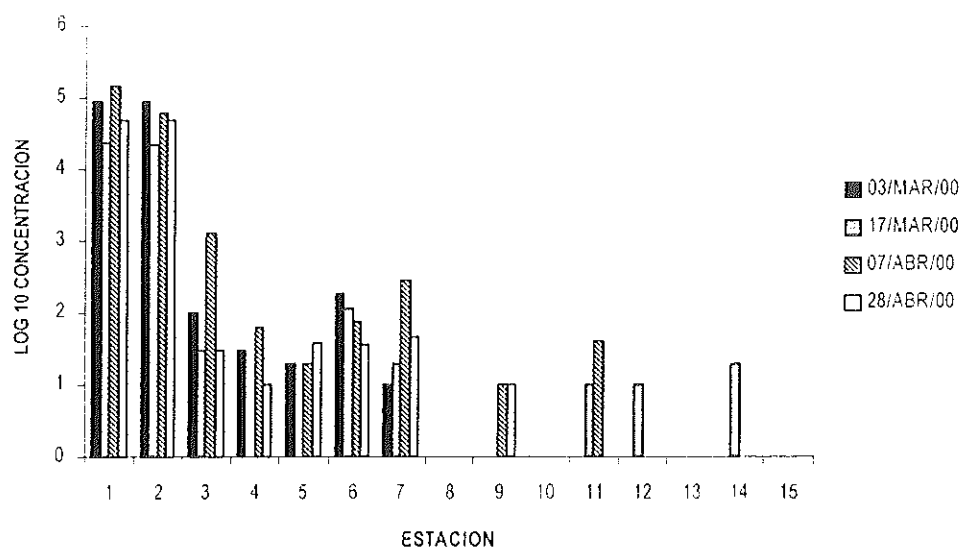
Tabla III .- Concentración promedio de bacteriófagos UFF/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

ESTACIÓN	PROMEDIO DE CT	VALOR MIN/MAX	PROMEDIO DE CF	VALOR MIN/MAX
1	939	34 - 2400	667	17 - 2400
2	58100	2400 -160000	4400	700 - 11000
3	245	8 - 920	16	5 - 23
4	27	5 - 79	15	2 - 49
5	6	2 - 13	4	<2 - 5
6	78	33 - 130	45	23 - 79
7	64	<2 - 240	23	<2 - 79
8	2	<2 - 2	<2	<2 - 2
9	3	<2 - 5	3	<2 - 5
10	<2	<2 - 2	<2	<2 - 2
11	<2	<2 - 2	<2	<2 - 2
12	<2	<2 - 2	<2	<2 - 2
13	14	<2 - 23	8	<2 - 13
14	<2	<2 - 2	<2	<2 - 2
15	<2	<2 - 2	<2	<2 - 2

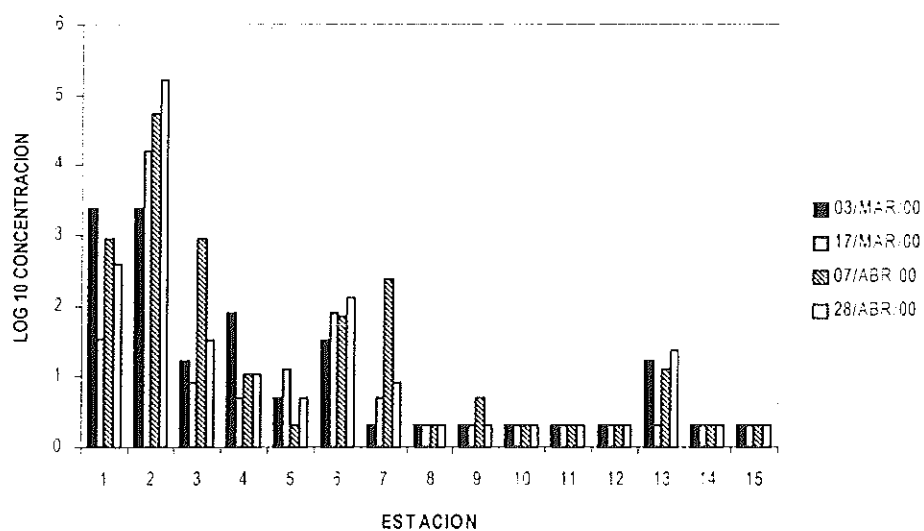
Tabla IV .- Concentración promedio de bacterias coliformes totales y fecales NMP/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

ESTACIÓN	PROMEDIO DE EF	VALOR MIN/MAX
1	5058	130 - 2400
2	12725	2400 - 35000
3	16	5 - 41
4	62	5 - 220
5	15	<2 - 49
6	40	9 - 110
7	11	<2 - 34
8	2	<2 - 2
9	4	<2 - 8
10	<2	<2 - 2
11	<2	<2 - 2
12	3	<2 - 5
13	6	<2 - 2
14	<2	<2 - 2
15	<2	<2 - 2

Tabla V .- Concentración promedio de estreptococos fecales NMP/100 ml en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

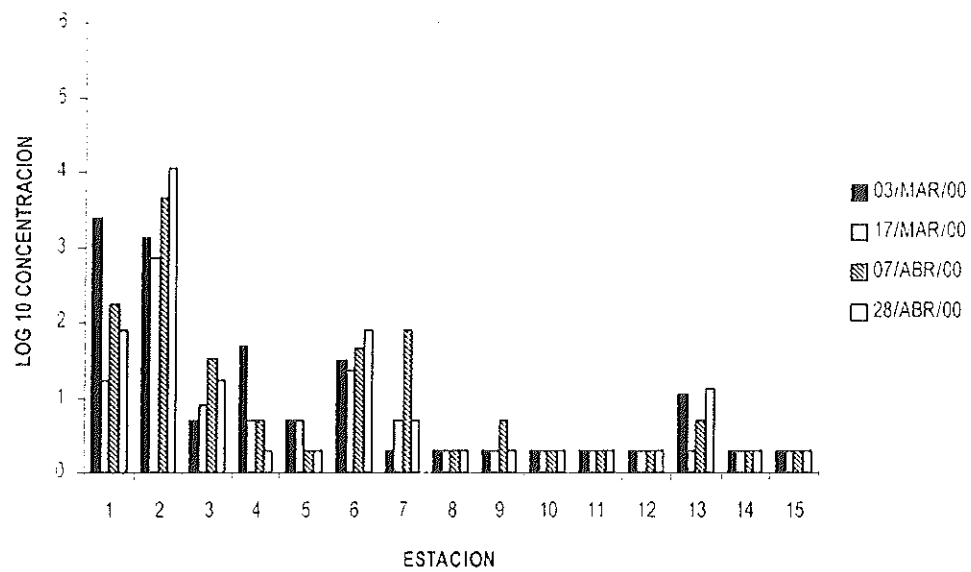


(a)

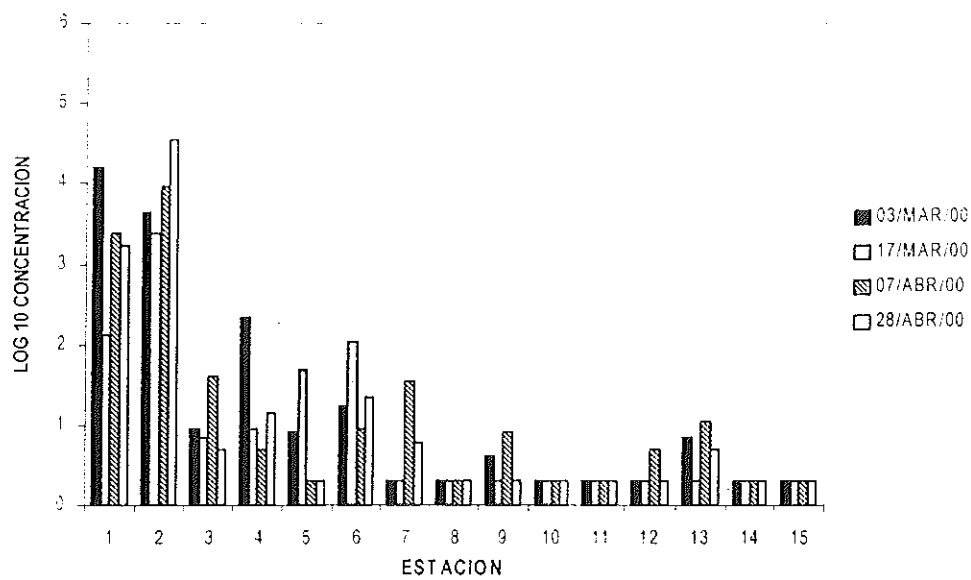


(b)

Figura 3 .- Concentración de (a) bacteriófagos (UFF/100 ml) y (b) coliformes totales (NMP/100 ml) en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.



(a)



(b)

Figura 4.- Concentración de (a) coliformes fecales (NMP/100 ml) y (b) estreptococos fecales (NMP/100 ml) en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

Referente a las variables ambientales los resultados son los siguientes:

Para el período de marzo a abril de 2000 (tabla VI), las estaciones 1 y 2 presentaron las temperaturas más elevadas con valores promedio de 23.3 y 20.3 °C, respectivamente; mientras que para el resto de las estaciones los valores promedio oscilaron entre 15.8 y 17.9 °C. Referente al pH, en general se presentaron valores homogéneos con un promedio de 8.16 en las quince estaciones de muestreo; a diferencia de la salinidad, la cual mostró valores mínimos promedio de 1.38 ‰ y 18.40 ‰ en las estaciones 1 y 2, respectivamente. El resto de las estaciones presentaron valores promedio de 33.47 a 33.68 ‰.

ESTACIÓN	TEMP. °C	VALOR MIN/MAX	pH	VALOR MIN/MAX	SALINIDAD ‰	VALOR MIN/MAX
1	23.3	21.3-25.5	8.12	7.96-8.25	1.38	1.23-1.53
2	20.3	17.5-26.6	8.01	7.74-8.16	18.40	10.99-25.82
3	17.7	15.4-19.7	8.09	7.91-8.22	33.55	33.38-33.72
4	17.9	15.3-20.5	8.13	7.93-8.24	33.56	33.39-33.73
5	17.1	14.7-18.8	8.14	7.82-8.30	33.51	33.35-33.68
6	16.1	14.8-17.6	8.12	7.89-8.22	33.68	33.33-34.11
7	16.1	15.1-17.3	8.17	8.00-8.28	33.57	33.21-33.93
8	16.1	14.8-17.6	8.20	8.02-8.37	33.48	32.91-34.09
9	16.3	15.0-17.7	8.17	8.04-8.32	33.63	33.24-34.07
10	16.5	15.2-18.2	8.24	8.04-8.40	33.61	33.23-34.01
11	16.6	15.6-18.1	8.21	8.09-8.41	33.60	33.22-34.00
12	16.7	15.6-18.7	8.25	8.04-8.45	33.57	33.20-33.96
13	16.5	14.7-18.3	8.22	8.01-8.45	33.56	33.17-33.95
14	16.0	14.3-18.3	8.22	8.07-8.51	33.50	33.10-33.91
15	15.8	14.2-18.1	8.24	8.01-8.48	33.47	33.08-33.88

Tabla VI .- Valores de temperatura, potencial de hidrógeno y salinidad promedio en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

En la tabla VII se muestran las razones entre coliformes totales y coliformes fecales en agua de mar de la bahía de Todos Santos de marzo a abril de 2000. Los valores mayores se registraron en las estaciones 2 y 3, correspondiente al punto de mezcla del arroyo El Gallo y a la Cueva de los Tigres, respectivamente; mientras que los mínimos se presentaron de las estaciones 8 a la 15, con excepción de la estación 13.

La razones coliformes fecales y estreptococos fecales de marzo a abril del 2000 se muestran en la tabla VIII. Los valores mayores ocurrieron en la estación 6 con valores que oscilan de 0.21 a 5.11. El resto de las estaciones mostraron valores bajos. El valor máximo ocurrió en la estación 6 con 5.11, para el mes de abril del 2000; mientras que el valor mínimo se presentó en la estación 1 con 0.05, para el mes de abril de 2000.

ESTACIÓN	3/MAR/00	17/MAR/00	7/ABR/00	28/ABR/00
1	1.00	2.00	5.41	5.06
2	1.85	22.86	11.74	14.55
3	3.40	1.00	27.88	1.941
4	1.61	1.00	2.20	5.50
5	1.00	2.60	1.00	2.50
6	1.06	3.43	1.52	1.65
7	1.00	1.00	3.04	1.60
8	1.00	1.00	1.00	1.00
9	1.00	1.00	1.00	1.00
10	1.00	1.00	1.00	1.00
11	1.00	1.00	1.00	1.00
12	1.00	1.00	1.00	1.00
13	1.55	1.00	2.60	1.77
14	1.00	1.00	1.00	1.00
15	1.00	1.00	1.00	1.00

Tabla VII .- Razones CT/CF en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

ESTACIÓN	3/MAR/00	17/MAR/00	7/ABR/00	28/ABR/00
1	0.15	0.13	0.07	0.05
2	0.30	0.29	0.50	0.31
3	0.55	1.14	0.80	3.40
4	0.22	0.55	1.00	0.14
5	0.62	0.10	1.00	1.00
6	1.32	0.21	5.11	3.59
7	1.00	2.50	2.32	0.83
8	1.00	1.00	1.00	1.00
9	0.50	1.00	0.62	1.00
10	1.00	1.00	1.00	1.00
11	1.00	1.00	1.00	1.00
12	1.00	1.00	0.40	1.00
13	1.57	1.00	0.45	2.60
14	1.00	1.00	1.00	1.00
15	1.00	1.00	1.00	1.00

Tabla VIII .- Razones CF/EF en agua de mar en la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN Y REGRESIÓN LINEAL SIMPLE

Para determinar el grado de asociación entre los organismos indicadores, durante marzo a abril de 2000, se empleó el análisis de correlación de Pearson y el modelo de regresión lineal simple a un nivel de significancia de 0.05 (tabla IX; figuras 5 a la 10).

INDICADORES	CORRELACIÓN DE PEARSON r	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN r^2	ECUACIÓN DE REGRESIÓN
Coliformes totales:Coliformes fecales	0.9751	0.9510	$y = 0.7606x + 0.0579$
Estreptococos fecales:Bacteriófagos	0.8803	0.7749	$y = 1.2416x - 0.0261$
Coliformes totales:Estreptococos fecales	0.9403	0.8843	$y = 0.8894x + 0.0460$
Coliformes totales:Bacteriófagos	0.8651	0.7485	$y = 1.1542x - 0.0243$
Coliformes fecales:Estreptococos fecales	0.9442	0.8915	$y = 1.145x + 0.0002$
Coliformes fecales:Bacteriófagos	0.8575	0.7354	$y = 1.4667x - 0.0665$

Tabla IX .- Análisis de correlación y regresión lineal simple entre coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales y bacteriófagos en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de marzo a abril de 2000.

En general los indicadores mostraron coeficientes de correlación altos siendo el mayor entre los coliformes totales y fecales (0.97). Los coeficientes de determinación de los bacteriófagos y bacterias indicadoras fluctuaron entre 0.73 y 0.77 siendo mayor entre los estreptococos fecales y bacteriófagos (0.77)

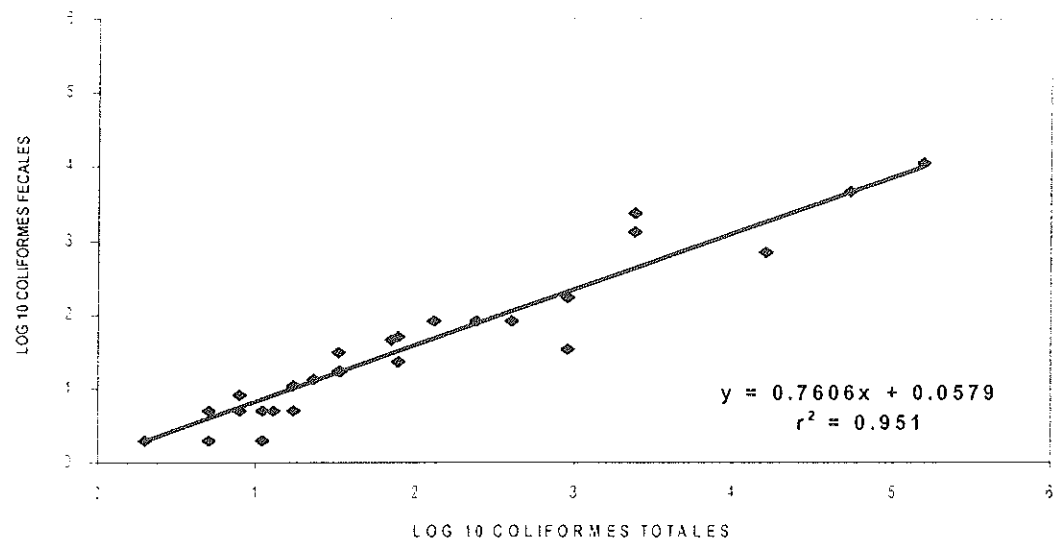


Figura 5.- Regresión lineal simple entre coliformes totales y coliformes fecales.

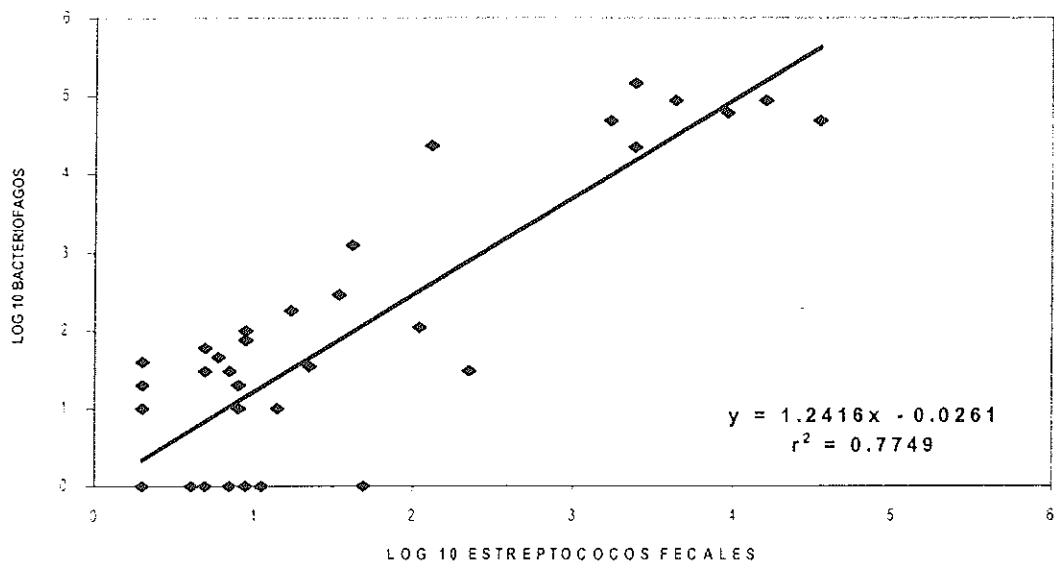


Figura 6.- Regresión lineal simple entre estreptococos fecales y bacteriófagos.

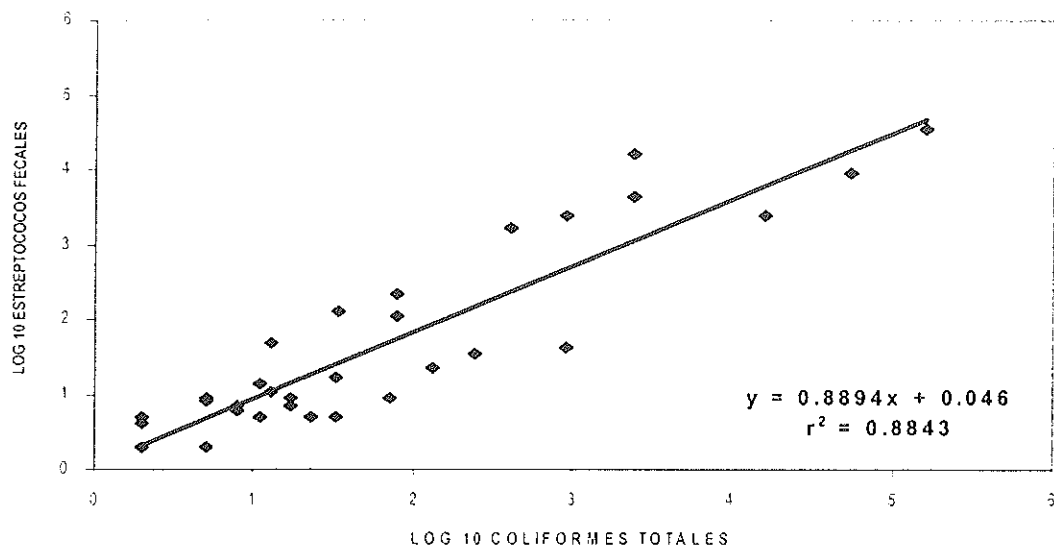


Figura 7.- Regresión lineal simple entre coliformes totales y estreptococos fecales.

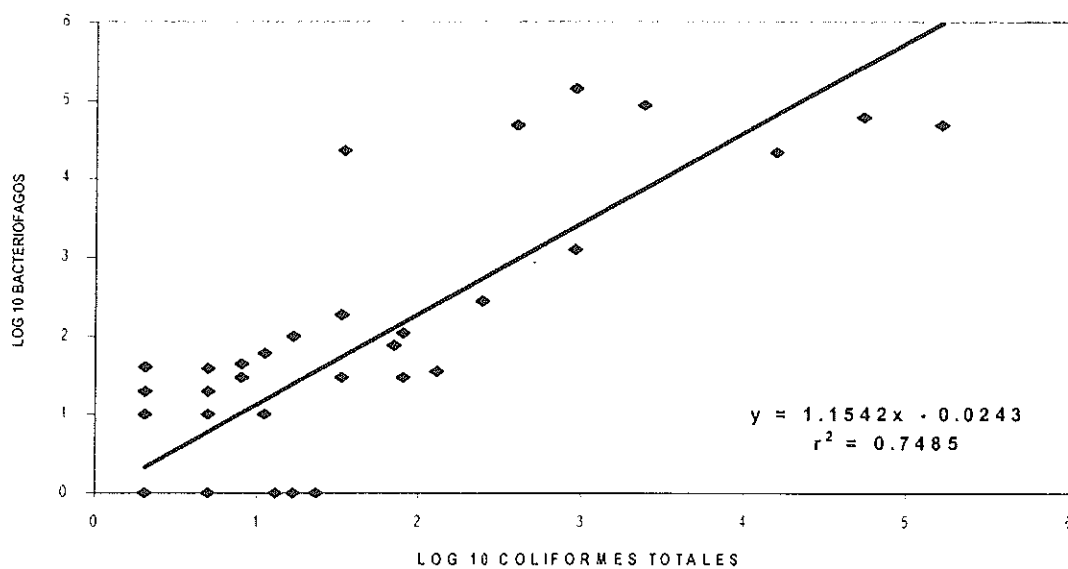


Figura 8.- Regresión lineal simple entre coliformes totales y bacteriófagos.

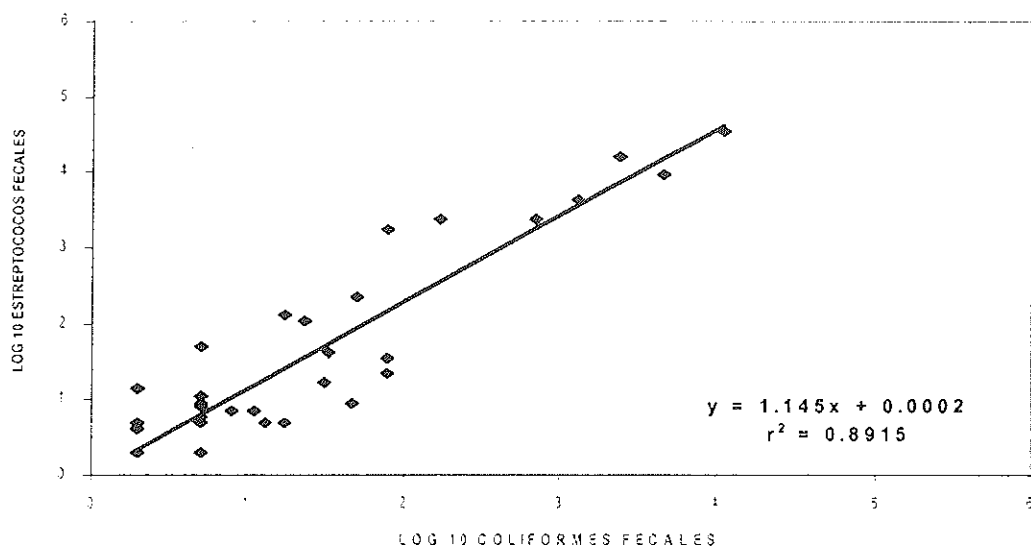


Figura 9.- Regresión lineal simple entre coliformes fecales y estreptococos fecales.

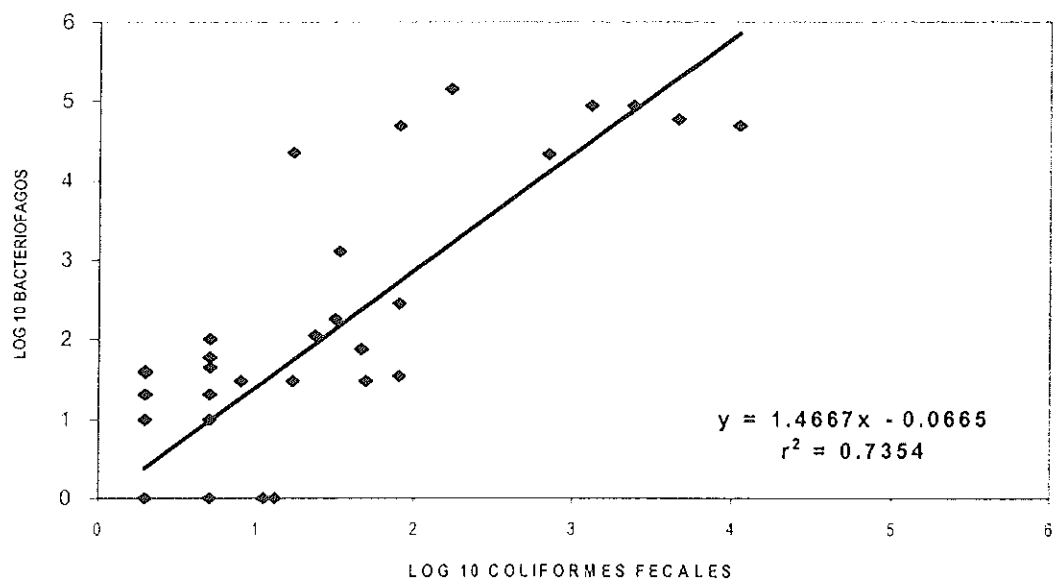


Figura 10.- Regresión lineal simple entre coliformes fecales y bacteriófagos.

Para establecer el grado de calidad sanitaria del agua de mar, se compararon las concentraciones de bacterias indicadoras contra los límites establecidos para uso recreativo con contacto primario (estaciones 2 a la 15), áreas de cultivo para moluscos bivalvos (estaciones 8 a la 15) y descargas de aguas residuales (estación 1).

En la tabla X se muestran los porcentajes de los muestreo por estación que excedieron los límites establecidos para uso recreativo. La estación 2 presentó una mayor alteración en la calidad sanitaria, 75 % de las muestras excedieron los límites para coliformes totales y 100 % para coliformes fecales. El resto de las estaciones presentaron una buena calidad bacteriológica.

En el caso de las áreas de cultivo de moluscos bivalvos (tabla XI) la calidad bacteriológica fué satisfactoria durante todo el período de muestreo.

En lo que respecta a las descargas de aguas residuales (tabla XII), el 25 % de las muestras excedieron los límites para coliformes fecales.

ESTACIÓN	LÍMITE DIARIO NMP/100 ML CT > 10,000	LÍMITE DIARIO NMP/100 ML CF > 400
2	75.0	100.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	0.0
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0
10	0.0	0.0
11	0.0	0.0
12	0.0	0.0
13	0.0	0.0
14	0.0	0.0
15	0.0	0.0

CT = COLIFORMES TOTALES

CF = COLIFORMES FECALES

Tabla X.- Porcentaje de estaciones de muestreo que exceden los valores límites de CT y CF para uso recreativo.

INDICADOR	PROMEDIO GEOMÉTRICO * NMP/100 ML	10 % DE LAS MUESTRAS NMP/100 ML < 230	10 % DE LAS MUESTRAS NMP/100 ML < 43
Coliformes totales	2.51	0.0	-----
Coliformes fecales	2.29	-----	0.0

* 70 CT/100 ML ; 14 CF/100 ML

Tabla XI .- Promedio geométrico y porcentaje de muestras que exceden los límites de los indicadores en el área de cultivo para moluscos bivalvos durante marzo a abril de 2000.

INDICADOR	PROMEDIO DIARIO NMP/100 ML < 2000
Coliformes fecales	25.0

Tabla XII .- Porcentaje de muestras que exceden los límites de los indicadores en la descarga de aguas residuales durante marzo a abril de 2000.

ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

En el análisis de agrupamiento Ward's se obtuvieron tres agrupaciones: (1) estaciones 1 y 2; (2) estaciones 3 al 6 y 7 y 9 y (3) estaciones 8 y 10-15 (figura 11).

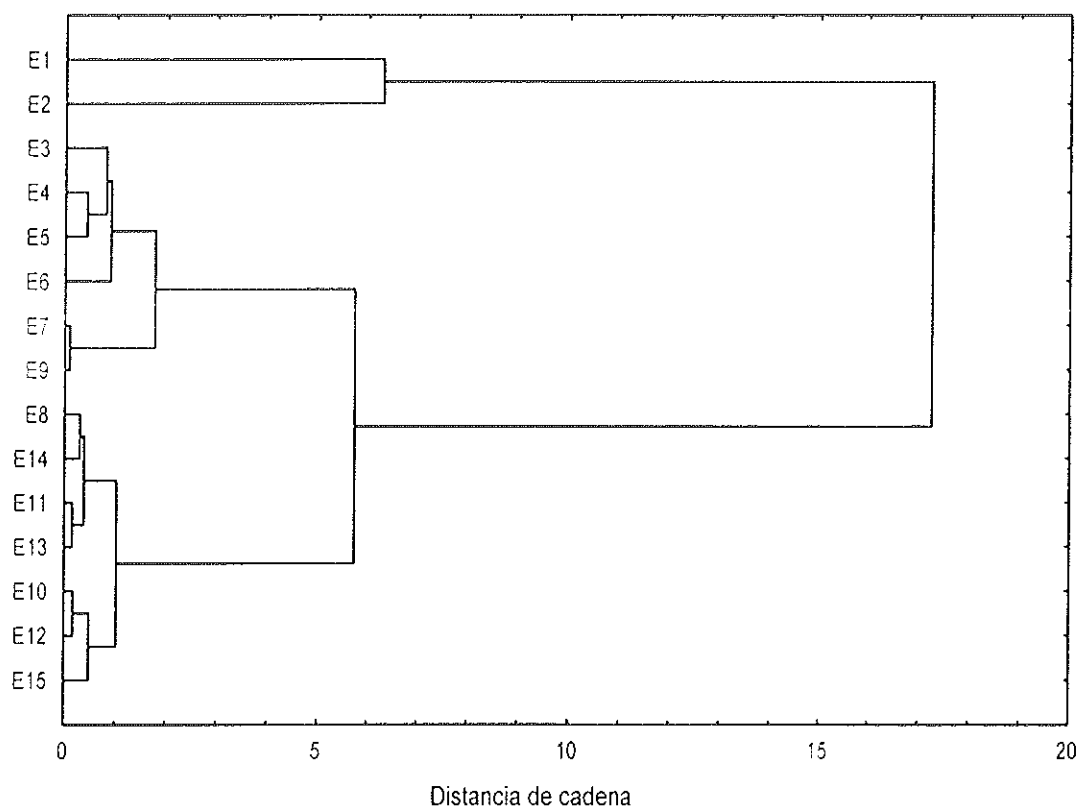


Figura 11 .- Dendrograma del análisis de agrupamiento modo Ward's en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., con respecto a los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos durante el período de marzo a abril de 2000.

5. DISCUSIÓN

COMPORTAMIENTO ESPACIAL

Las mayores concentraciones de bacteriófagos, bacterias coliformes y estreptococos fecales que se registraron en las estaciones 1 y 2 se deben principalmente a su ubicación. La estación 1 corresponde a los efluentes de las plantas de tratamiento del Naranjo y el Gallo, y la 2 al punto de mezcla. La estación 2, por estar a una mayor distancia de la descarga y por efecto de dilución, debería de haber presentado una menor concentración de virus y bacterias que la 1. Sin embargo, es probable que la fuerte energía en la zona por efecto del oleaje y corrientes (Galindo Bect *et al.*, 1984) pongan en resuspensión materia orgánica, virus y bacterias acumulados en el sedimento, ocasionando valores más elevados. Concentraciones altas de bacterias y materia orgánica en sedimento han sido reportados en las zonas aledañas a la descarga (Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa, 1989).

En general en el medio ambiente marino se da una estrecha relación entre los parámetros medioambientales y las poblaciones microbianas determinando su sobrevivencia y distribución, estos, sin embargo pueden funcionar de manera conjunta e interrelacionada sumando sus efectos (sinergismo) lo que posiblemente ocurrió en la estación 2, ya que en esta se presentaron los valores más bajos de salinidad (18.4‰) y pH (7.74), así como una de las mayores temperaturas (20.3 °C). No se descarta la posibilidad de que la materia orgánica presente en la estación 2 desempeñe un papel importante en la sobrevivencia y concentraciones de microorganismos al sumar sus efectos con los parámetros fisicoquímicos del agua de mar.

La evacuación de aguas residuales de la Planta de tratamiento el Gallo en la Playa

Municipal, ha contribuido durante cuatro décadas a la contaminación de la zona costera. Estudios bacteriológicos realizados en el área por Orozco Borbón y Gutiérrez Galindo (1983), y Morales Chávez (1984) mostraron valores de hasta 5, 000 000 NMP 100 ml⁻¹ de bacterias coliformes fecales, mientras que el valor máximo encontrado en este estudio fue de 160,000 NMP 100 ml⁻¹.

Por otra parte, Segovia Zavala y Galindo Bect (1984) encontraron que la eficiencia de la planta de tratamiento de aguas residuales el Gallo con respecto a los parámetros indicativos de contaminación orgánica era muy baja (<35%), en este mismo estudio los sólidos sedimentables presentaron un 62 % de eficiencia; dando como resultado una eficiencia total promedio de 26.8 %. En contraste, la planta de tratamiento el Naranjo la cual empezó operaciones en septiembre de 1999 tiene una eficiencia proyectada para la DBO, DQO y sólidos sedimentables del 95 %. A pesar de que en la actualidad la planta el Naranjo todavía no trabaja a su máxima eficiencia, ha contribuido en gran medida al abatimiento de las altas concentraciones de materia orgánica y bacterias presentes en la estación 1 y 2.

Las menores concentraciones de bacteriófagos, bacterias coliformes y estreptococos fecales que se encontraron en el resto de las estaciones (3 a 15) se deben a la combinación de factores como la dilución y el efecto bactericida de agua de mar que afectan los niveles de sobrevivencia de las bacterias coliformes y otros organismos patógenos (Carlucci y Pramer, 1959 y 1960; Mitchell, 1968; Gauthier *et al.*, 1975; Barja *et al.*, 1977).

La razón de que en la estación 13 se presentaran concentraciones de coliformes totales de 14 NMP 100⁻¹ ml y coliformes fecales de 8 NMP 100⁻¹ ml se debe posiblemente a la precisión del método. El número más probable para la determinación de coliformes totales y fecales es un método que se basa en teoría de probabilidad, el cual es menos exacto y preciso que el método de la doble capa utilizado para la determinación de

bacteriófagos. Estudios realizados en agua de mar por Yahya *et al.* (1998) encontraron un comportamiento similar al nuestro, ya que detectaron valores <1 UFF 100^{-1} de bacteriófagos y <20 NMP 100^{-1} de coliformes totales y fecales.

Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo (1983) en un estudio realizado en la bahía de Todos Santos encontraron, que debido a la dilución y dispersión, la concentración de bacterias coliformes fue mayor en las estaciones localizadas en la zona de rompiente que en las ubicadas a una distancia de 0.5 km.

Con respecto al efecto bactericida del agua de mar, Carlucci y Pramer (1960) encontraron que las tasas de sobrevivencia de las bacterias en el agua de mar dependen de múltiples factores entre ellos del pH y salinidad. Observando que la mortalidad bacteriana es más rápida en reacciones alcalinas que en ácidas. Por lo tanto, el pH del agua de mar medido en la zona de estudio (7.74 a 8.51) tiende a no favorecer la sobrevivencia de *E. coli*.

Por otra parte se ha demostrado que las sales inorgánicas (NaCl y NaK), son las sustancias potencialmente más tóxicas, ya que pueden influir adversamente en la sobrevivencia de las bacterias ya sea por efecto osmótico o bien por toxicidad específica del ión. Existen antecedentes que indican que *E. coli* muere más rápidamente en ausencia de sales que en agua de mar a 25 ‰, y que más allá de este límite la sobrevivencia decrece (Carlucci y Pramer, 1960). Además, Pike *et al.* (1970), en una serie de experimentos realizados con bacterias coliformes, encontraron que la mortalidad de estas bacterias fué mayor con incrementos en la salinidad, por tanto se espera que la sobrevivencia de microorganismos entéricos debe ser menor en las estaciones 3 a 15 en donde se presentaron salinidades promedio de 33 ‰. En contraste, la sobrevivencia de microorganismos entéricos debe ser mayor en las estaciones 1 y 2 porque presentan salinidades promedio de 1.38 y 18.40 ‰, respectivamente

La adsorción de las bacterias por partículas orgánicas e inorgánicas que se

depositan en los sedimentos son otro factor que posiblemente influye en la disminución de bacterias en el agua de mar. Orozco-Borbón y Delgadillo-Hinojosa (1989) mencionan que en general se encuentran más bacterias coliformes en sedimento que en el agua de mar.

Es importante destacar que las concentraciones de bacterias encontradas en las estaciones 3 a 5 correspondientes a las playas Cueva de los Tigres, Conalep y Ciprés, respectivamente; cumplen con los límites establecidos por California Assembly Bill 411 para aguas de uso recreativo con contacto primario (Noble *et al.*, 2000), lo que podemos calificar un resultado importante debido a que estos sitios son muy utilizados por la población de Ensenada, y porque en estudios previos se detectaban concentraciones elevadas de bacterias (Orozco-Borbón y Gutiérrez-Galindo, 1983; Jiménez-González, 1989).

El análisis de agrupamiento de las estaciones de muestreo (dendrograma) mostró tres grupos, la asociación entre ellas depende de su ubicación y su distancia a la fuente de contaminación. Un primer grupo comprendió a las estaciones 1 y 2, mismas que se encuentran cerca de la principal fuente de contaminación microbiológica (aguas residuales domésticas e industriales de las plantas de tratamiento de la CESPE); el segundo correspondió a las estaciones aledañas a las descargas de aguas residuales, las cuales tienen una clara influencia de la contaminación, y un tercer grupo de no influencia integrado por las estaciones más alejadas de las fuentes de contaminación. El análisis estadístico de grupos es congruente con los resultados microbiológicos y fisicoquímicos obtenidos en cada uno de los muestreos, ya que se encontró que las mayores concentraciones de bacteriófagos y bacterias indicadoras ocurrieron en las estaciones 1 y 2, disminuyendo en forma perpendicular y paralela a la costa.

INDICADORES

La mayor concentración de bacteriófagos encontrada en casi todas las estaciones en comparación con la de bacterias coliformes y estreptococos fecales, se debe a que éstos sobreviven por períodos más prolongados en el medio ambiente marino, resisten a la desinfección con cloro y a la radiación solar (Narkis *et al.*, 1995 ; Ritva *et al.*, 1995; Sinton *et al.*, 1999) de manera similar a ciertos enterovirus. Por lo que estas características, aunado a la morfología y facilidad para enumerarlos, los hacen candidatos adecuados para ser utilizados como indicadores de contaminación en zonas de playas, así como de la eficiencia en sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales. Los análisis mostraron una correlación significativa entre los bacteriófagos y bacterias indicadoras en particular con los estreptococos fecales ($r=0.88$).

Las estaciones 1 y 2 presentaron una mayor concentración de estreptococos fecales en comparación con la de coliformes fecales, porque los primeros sobreviven más tiempo en agua de mar. Hanes y Fragala (1967) demostraron que *E. coli* sobrevive 0.8 días en agua de mar, mientras que los enterococos (un subgrupo de los estreptococos) sobreviven 2.4 días. Por otra parte Sieracki (1980) demostró que la tasa de mortalidad de los enterococos no aumenta con incrementos en la intensidad de la radiación solar, mientras que *E. coli* si se ve afectada. De hecho se ha reportado que son mejores indicadores de contaminación que las bacterias coliformes. Cabelli (1982) y Dufour (1984) en sus estudios demostraron que los enterococos se correlacionan mejor con gastroenteritis adquirida por nadar en agua de mar y dulce contaminada con aguas residuales.

La razón coliforme total:coliforme fecal, se utiliza comúnmente para determinar el grado de contaminación fecal (Secretaría de Salud, 1989) de tal manera que un valor mayor a 1 se puede interpretar como una menor contaminación fecal y uno igual a 1 como mayor. No obstante este criterio debe de tomarse con cuidado y analizar las circunstancias

y origen de las muestras, ya que por ejemplo en el presente estudio las estaciones cercanas a la descarga de la CESPE (1 a la 7) presentaron valores mayores a uno, y las estaciones más alejadas de la costa presentaron un valor de 1, sin embargo es evidente que las estaciones 1 a 7 son las más contaminadas y el resto de las estaciones las más limpias. Por lo tanto este criterio no es el mas apropiado para determinar el grado de contaminación fecal.

Esta incongruencia se debe a que las estaciones 1 a 7 presentan una mayor concentración de bacterias totales con respecto a las fecales, aunque es obvio que éstas se encuentran en mayores concentraciones que en el resto de estaciones. Por otra parte las estaciones 8 a 15 presentaron concentraciones de bacterias coliformes totales y fecales tan bajas que en algunos casos se ubican en el límite de detección del método (<2 bacterias/100 ml) y por lo tanto su razón CT/CF es igual a 1 lo que concuerda con Secretaría de Salud (1989), que menciona que si la razón CT/CF es 1 y las concentraciones de bacterias son bajas, la contaminación es reciente y diluida.

Otro criterio que se utiliza para determinar el origen de la contaminación (humana o animal) es la razón coliforme fecal:estreptococo fecal, ya que si ésta es mayor a 4 indica una contaminación humana y si es menor a 0.7 es animal (Geldreich y Kenner, 1969). En el presente estudio las razones menores se encontraron en las estaciones 1,2 y 4; por lo que, si se aplicara el criterio establecido se tendría una contaminación de tipo animal, sin embargo es evidente que estas estaciones son impactadas por las descargas de las plantas de tratamiento el Gallo y el Naranjo, las cuales en su mayoría tienen una carga microbiana de origen humano. La validez de la razón coliforme fecal:estreptococo fecal ha sido cuestionada y se considera útil únicamente para determinar contaminación fecal reciente (Noble *et al.*, 2000) ya que existen variaciones de estas razones en función del tiempo. En el caso de contaminación humana la razón de 4 disminuye y en la animal aumenta.

En la estación 1 se descarta la variación de la razón coliforme fecal:estreptococo

fecal con respecto al tiempo porque es el punto cero de las descargas de las plantas de tratamiento el Gallo y el Naranjo, en donde la contaminación es casi instantánea o reciente. El hecho de encontrar bajas razones de coliforme fecal: estreptococo fecal se puede atribuir a que los estreptococos sobreviven más tiempo que las coliformes fecales en procesos de tratamientos de aguas residuales dependiendo del grado de tratamiento que reciben las aguas residuales, así como de los procesos utilizados para la eliminación de los microorganismos indicadores (Narkis *et al.*, 1995; Turner y Lewis, 1995).

Las bajas razones de coliforme fecal:estreptococo fecal en las estaciones 2 y 4 indican que la contaminación no es reciente y que su presencia se debe a la resuspensión de sedimento con bacterias adheridas por oleaje y corrientes.

CALIDAD DEL AGUA

Tradicionalmente se han utilizado a las bacterias indicadoras para determinar contaminación fecal en el agua de mar, porque presentan más ventajas que las bacterias patógenas, no obstante a la fecha no se ha encontrado una relación directa entre los niveles de éstas y la incidencia de enfermedades. Sin embargo estudios realizados recientemente han encontrado que algunos microorganismos como los enterococos y bacteriófagos sobreviven más tiempo en el agua de mar al igual que los microorganismos patógenos, por lo que se correlacionan mejor con la incidencia de enfermedades en bañistas y consumidores de moluscos bivalvos (Gareth-Rees, 1993; Christensen *et al.*, 1998; Miossec *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que los estándares para determinar la calidad sanitaria de los cuerpos de agua se basan en la utilización de múltiples indicadores de contaminación como es el caso de la normatividad de la Assembly Bill 411 de California, Estados Unidos la cual emplea coliformes totales, fecales, enterococos y virus. En contraste Noble *et al.* (2000) recomiendan el uso de un sólo indicador (enterococos)

porque detecta en un mayor porcentaje la contaminación de playas y descargas que otros indicadores, permitiendo disminuir tiempo y costo de los análisis con lo que se puede incrementar la periodicidad y número de estaciones de muestreo. Esta propuesta debe ser aprobada por las autoridades y comunidad científica con base en estudios epidemiológicos para seleccionar el indicador más apropiado.

Con base en los resultados de correlación obtenidos en el presente trabajo se sugiere utilizar a los bacteriófagos como indicadores de contaminación microbiológica en aguas costeras de manera rutinaria, ya que se encontró una buena relación con las bacterias indicadoras. Además, su presencia en el agua de mar, a diferencia de otros organismos indicadores, puede ser utilizada para determinar contaminación de tipo viral, ya que se ha encontrado que son los que se correlacionan mejor con el grupo de los enterovirus los cuales en su mayoría son patógenos (IAWPRC, 1990; Yahya *et al.*, 1991; Lewis, 1995).

No obstante lo anterior, para la utilización de bacteriófagos como indicadores únicos de contaminación microbiológica, se requiere de un mayor número de estudios microbiológicos y epidemiológicos. Además, es fundamental que las legislaciones ambientales de los países, entre ellos México, los incorporen en los estándares establecidos para agua de mar.

Debido a que se obtuvieron altas correlaciones entre los bacteriófagos y bacterias coliformes, se utilizaron las ecuaciones de regresión para predecir la concentración de bacteriófagos durante los meses de septiembre de 1999 a enero de 2000 (apéndice B), así como sus posibles límites de calidad para aguas de uso recreativo con contacto primario (apéndice C).

Para la predicción de la concentración de bacteriófagos se pueden utilizar también a los estreptococos fecales ya que se conoce que se correlacionan positivamente. De hecho en el presente trabajo los mayores coeficientes de determinación se encontraron entre los

bacteriófagos y estreptococos fecales, porque poseen períodos de sobrevivencia similares en agua de mar. Estudios realizados con bacteriófagos y enterococos (Sinton *et al.*, 1999) han mostrado que tienen tasas de sobrevivencia similares y que reaccionan de la misma forma a los parámetros físicoquímicos y medioambientales.

De los indicadores bacterianos utilizados en el presente trabajo se recomienda el uso de los estreptococos porque son mejores predictores de riesgos a la salud por exposición con aguas contaminadas. Cabelli (1982) y Dufour (1984) mostraron que los enterococos se correlacionan mejor con gastroenteritis asociada a la natación en aguas marinas y dulces contaminadas con agua residual

Con base en los límites establecidos por la Assembly Bill 411 de California para aguas de uso recreativo con contacto primario (Noble *et al.*, 2000), en general la calidad bacteriológica de las aguas fue buena, a excepción de la estación 2 (Punto de mezcla de la descarga). Esto es excelente ya que estudios bacteriológicos realizados con anterioridad mostraban altas concentraciones de bacterias indicadoras en el agua de mar de la bahía y en las principales playas de uso recreativo (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 1984 y Jiménez-González, 1987).

Por otra parte, en la zona conocida como Rincón de Ballenas (estaciones 10 a la 15) se realizan actividades de acuacultura con fines comerciales del mejillón del Pacífico *Mytilus galloprovincialis* y del ostión Japonés *Crassostrea gigas* (Vera-González *et al.*, 1998). De acuerdo a los criterios establecidos para la calidad bacteriológica que debe de presentar el agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos, se tiene que la bahía es apta para el cultivo de los mismos (Secretaría de Salud, 1989b). Esto se debe principalmente a la ausencia de fuentes puntuales de contaminación y a la ubicación geográfica de la zona con recambio constante de agua por el patrón de corrientes.

Alvarez-Sánchez *et al.* (1988) encontraron que la circulación de aguas superficiales de la bahía presenta dos giros, uno anticiclónico en la parte norte y otro ciclónico en la parte

sur. El movimiento del agua superficial en la parte sur aparentemente se desplaza hacia el interior de la bahía formando un flujo paralelo a la costa, para cambiar hacia el norte y salir hacia el oeste por la parte media de la bahía. Por lo que la zona de cultivo ubicada en la parte sur de la bahía queda libre de contaminación, lo cual concuerda con estudios realizados por Tanahara-Romero (1996).

VARIABLES FISICOQUIMICAS

Se conoce que la salinidad, pH y temperatura influyen sobre las concentraciones de los microorganismos entéricos en el agua de mar y que su influencia puede ser positiva o negativa. En el presente trabajo la salinidad y pH del agua de mar al parecer afectaron negativamente a los microorganismos entéricos y condicionaron su distribución, ya que las mayores concentraciones de microorganismos se encontraron en las estaciones 1 y 2 con clara influencia de agua residual con valores relativamente bajos de pH y salinidad, mientras que las estaciones con mayor pH y salinidad presentaron las concentraciones más bajas.

Uno de los factores más importantes que determinan la sobrevivencia de los microorganismos patógenos en el medio marino, es la temperatura, sin embargo en el presente trabajo parece indicar que no influyó en la distribución de los microorganismos. Los valores fluctuaron entre los 14.2 a 26.6 °C, con una gran variabilidad, lo que concuerda con Bonde (1968) que observó que las temperaturas entre 0° y 20 °C no son dañinas para bacterias entéricas

Existe una gran controversia con respecto a la temperatura, ya que existen estudios que indican que un incremento de la misma beneficia a la población microbiana porque acelera su metabolismo, mientras que otros indican que a temperaturas más bajas se incrementa la sobrevivencia de bacterias entéricas. Por ejemplo, en un estudio de T_{90}

(tiempo para reducir en un 90 % la población de microorganismos) realizado con *E. coli* se encontró que a bajas temperaturas se incrementaba el T_{90} (Solic y Krstulovic, 1992).

Estudios realizados en la bahía de Todos Santos han reportado mayores concentraciones de bacterias entéricas durante verano y principios de otoño (Segovia-Zavala y Orozco-Borbón, 1986; Orozco-Borbón y Sañudo-Wilhelmy, 1988), por lo que se puede llegar a pensar que las temperaturas elevadas favorecen la sobrevivencia de estos microorganismos, sin considerar tal vez, que pudiera ser un reflejo de las actividades industriales y turísticas que se realizan en el área.

6. CONCLUSIONES

- El método empleado para la determinación de bacteriófagos en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., demostró tener mayores ventajas sobre los tradicionales indicadores de contaminación.
- Las mayores concentraciones de bacteriófagos y bacterias indicadoras se presentaron en las estaciones 1 y 2 correspondientes a los efluentes de las plantas de tratamiento del Naranjo y el Gallo, y al punto de mezcla, respectivamente.
- Por medio de ecuaciones de regresión lineal simple y a partir de concentraciones de bacterias coliformes se puede determinar la concentración de bacteriófagos.
- El agua de mar de la bahía, con excepción de la estación 2, es apta para uso recreativo con contacto primario.
- La zona de Rincón de Ballenas es apta para el cultivo de moluscos bivalvos.

7. REFERENCIAS

- Alvarez-Sánchez, L.G., Hernández-Walls, R. y Durazo-Arvizu, R. (1988). Patrones de deriva de trazadores lagrangianos en la bahía de Todos Santos. *Ciencias Marinas*, 14(4): 135-162.
- American Public Health Association (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 19 th. Ed. American Public Health Association, New York, 9-49 pp.
- Argote-Espinoza, M.L., Buenrostro, M. y Morales-Zúñiga, C. (1975). Distribución de los parámetros salinidad y temperatura y tendencia de la circulación en la Bahía de Todos Santos, B.C. *Memorias de la primera Reunión de los Centros de Investigación en Baja California y la Institución Scripps de Oceanografía*. CICESE. Ensenada, B.C. México. 3-30 pp.
- Arribas, R.M. (1988). Survey of viral pollution in Duero river. Occurrence of natural virucidae phenomena. *Environment International*. 14(1): 37-41.
- Barja J.L., Nieto T.P. and Barja J. (1977). Method of average birth and death rate evaluation in the marine terrestrial bacteria interactions. *Rev. Int. Océanogr. Med.* (47): 199-202.
- Barcinas I., González J.M., Iriberry J. and Egea L. (1990). Survival strategy of *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *Journal of Applied Bacteriology*. 68: 189-198.

-
- Bonde, G.J. (1968). Studies on the dispersion and disappearance phenomena of enteric bacteria in the marine environment. *Rev. Int. Océanogr. Med.* 9: 17-44.
 - Cabelli, V.J., Dufour A.P., McCabe L.J. and Levin M.A. (1982). Swimming-associated gastroenteritis and water quality. *American Journal of Epidemiology*, 115: 606-616.
 - Callahan K.M., Taylor D.J. and Sobsey M.D. (1995). Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Science & Technology*, 31: 189-193.
 - Carlucci, A.F. and Pramer D. (1960). An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. I. Experimental procedures. *Appl. Microbiol.*, 8(4): 243-247.
 - Carlucci, A.F. and Pramer D. (1960). An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. II. Salinity, pH and nutrients. *Appl. Microbiol.*, 8(4): 247-250.
 - Chee-Barragán, A. y Pérez-Higuera, R. (1982). Patrón de circulación a partir de algunas características naturales de los sedimentos en la Bahía de Todos Santos. *Instituto de investigaciones Oceanológicas*, UABC, Reporte Annual, Ensenada, B.C. México, 48 pp.
 - Christensen, B.F.; Lees, D.; Henshilwood, K.; Bjergskov, T. and Green, J. (1998). Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. *Journal of Shellfish Research*, 17(5): 1633-1635.

-
- Comisión Estatal de Servicios Públicos de Ensenada (2000). Laboratorio de Control de Calidad.
 - Comisión Nacional del Agua (2000). Gerencia Regional de la Península de Baja California. Subgerencia Regional de Operación. Departamento Climatológicos y Control de Presas. Zona Ensenada B.C.
 - De Jawetz E., Melnick J.L. y Adelberg E.A. (1992). Microbiología Médica. *El Manual Moderno*. México, 505-518 pp.
 - Dufour, A.P. (1984). Bacterial indicators of recreational water quality. *Canadian Journal of Public Health*, 78:49.
 - Favero, M.S. (1985). Microbiologic indicators of health risks associated with swimming. *Am. Jour. Pub. Health*, 75(9): 1051-1054.
 - Galindo Bect, M.S., Segovia Zavala J.A. y Rivera Duarte I. (1984). Contenido de materia orgánica en sedimento superficial de la Bahía de Todos Santos, Baja California. *Ciencias Marinas*, 10(3): 93-102 (10).
 - Gareth-Ress (1993). Health implication of sewage in coastal waters the british case. *Marine Poll. Bull.*, 26(1):14-19.
 - Gauthier M.J., Shewan J.M. and Gibson D.M. (1975). Taxonomic position and seasonal variations in marine neretic environment of some gram-negative antibiotic producing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* (87): 211-218.
 - Geldreich, E.E. and Kenner, B.A. (1969). Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 41(8): 336-352.

-
- Gutiérrez Gutiérrez O.Q. (1999). Análisis numérico y descripción barotrópica en la Bahía de Todos Santos, B.C. Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. 64 pp.
 - Hanes, N.B. and Fragala (1967). Effect of seawater concentration on the survival of indicator bacteria. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 39: 97.
 - Havelaar A.H., Furuse K. and Hogeboom W.M. (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of Applied Bacteriology*, 60: 255-262.
 - Hopkins, R.S. Shillan, P., Gaspard, B., Eissach, L. and Karlin, R.J. (1985). Waterborne Disease in Colorado: Three Years' Surveillance and 18 Outbreaks. *American Journal of Public Health*, 75(3): 254-257.
 - IAWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology (1991). Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, 25: 525-545.
 - Ignazzitto G., Volterra L., Aulicino F.A. and D'Angelo A.M. (1980). Coliphages as indicators in a treatment plant. *Water, Air, and Soil Pollution*, 13: 391-398.
 - Instituto de Investigaciones Oceanológicas (1982). Estudio general de contaminación costera en el estado de Baja California. Informe anual I.I.O.-S.E.P. Apdo. Postal 453, Ensenada, B.C. 87 pp.
 - Jiménez González, R. (1989). Contaminación fecal en las principales playas de uso recreativo de la bahía de Todos Santos, B.C., durante la estación de verano de 1987. Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. 48 pp.

-
- Jofre J., Ollé E., Ribas F., Vidal A., and Lucena F. (1995). Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3227-3231.
 - Lizárraga Arciniega, J.R. (1976). Variaciones estacionales de la Playa en la Bahía de Todos Santos, B.C. *Ciencias Marinas*, 31(1): 30-44.
 - Lucena F., Lasobras J., Muñoz R., Araujo R. and Jofre J. (1995). Bacteriophage persistence in the sea environment. *Water Science & Technology*, 31:195-198.
 - Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L., Comps M.A. and Pommeputy M. (1998). Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. *Journal of Shellfish Research*, 17(5): 1661-1664.
 - Mitchell, R. (1968). Factors affecting the decline of non marine microorganisms in seawater. *Water Resear.* (2): 635-643.
 - Morales Chávez, R. (1984). Colimetría en descargas de aguas industriales, domésticas y en la zona de rompientes de la Bahía de Todos Santos, B.C. Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. 42 pp.
 - Nakamura M., Stone R.L and Krubsack J.E. (1964). Survival of *Shigella* in sea water. *Nature*, 203(4941): 213-214.
 - Narkis N., Katz A., Orshansky F., Kott Y. and Friedland (1995). Disinfection of effluents by combinations of chlorine dioxide and chlorine. *Water Science & Technology*, 31:105-114.

-
- Noble, R.T., Dorsey J.H., Leecaster M.K., Mazur M., McGee C.D., Moore D., Orozco-Borbón V., Reid D., Schiff K., Vainik P.M. and Weisberg S.B. (2000). Southern California Bight 1998 Regional Monitoring Program: I. Summer Shoreline Microbiology. ***Southern California Coastal Water Research Project***. Westminster, C.A., 78 pp.
 - Orozco Borbón, M.V. y Delgadillo Hinojosa, F. (1989). Contaminación fecal en sedimentos superficiales de la Bahía de Todos Santos, Baja California. ***Ciencias Marinas***, 15(1): 47-62.
 - Orozco Borbón, M.V. y Gutiérrez-Galindo, E.A. (1983). Contaminación fecal costera en la zona del Puerto de Ensenada, Baja California. ***Ciencias Marinas***, 9(1): 27-34.
 - Orozco Borbón, M.V. y Sañudo Wilhelmy, S.A. (1988). Estudio de coliformes, estreptococos y bacterias patógenas a lo largo de la Costa de Baja California. ***Ciencias Marinas***, 14(3): 1-8.
 - Orozco Borbón, M.V., Segovia Zavala, J.A., Delgadillo Hinojosa, F. y Muñoz Barbosa, A. (1994). Estudio bacteriológico de agua de mar para el cultivo de moluscos bivalvos en Baja California. ***Ciencias Marinas***, 20(2): 183-198.
 - Pike, E.B., Gameson A.L.H. and Gould D.J. (1970). Mortality of coliform bacteria in sea water samples in the dark. ***Rev. Int. Oceanogr. Med.***, 18(19): 97-107.
 - Portillo-López, A. y Lizárraga-Partida, M.L. (1997). Detección de *Vibrio cholerae* 01 en diferentes hábitats de la bahía de Todos Santos, Baja California, México. ***Ciencias Marinas***, 23(4): 435-447.

-
- Pourcher A.M., Devrise L.A., Hernandez J.F. and Delattre J.M. (1991). Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and *enterococci* as indicators of the origin of faecal pollution of waters. ***Journal of Applied Bacteriology***. 70: 25-530.
 - Rítva L., Rajala-Mustonen and Helvi Heinonen-Tanski (1995). Effect of advanced oxidation processes on inactivation of coliphages. ***Water Science & Technology***, 31:131-134.
 - Rosas, I., Yala A. y Baez (1985). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en ostión (*Crassostrea virginica*) durante su desarrollo y procesamiento en el mercado. ***Cont. Amb.***, 1: 51-64.
 - Sañudo-Wilhelmy, S.A. (1983). Estimación de la descarga orgánica de la ciudad de Tijuana, B.C. Tesis de la licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, B.C. 81 pp.
 - Sañudo Wilhelmy, S.A. y Suárez Vidal C.E. (1982). Carga orgánica de las aguas negras municipales de la de la ciudad de Tijuana, Baja California. ***Ciencias Marinas***, 8(2): 155-166.
 - Sañudo Wilhelmy, S.A. y Suárez Vidal C.E. (1984). Variación temporal de la descarga orgánica en las aguas residuales de la ciudad de Tijuana, Baja California, México. ***Ciencias Marinas***, 10(2): 107-118.
 - Sañudo-Wilhelmy, S.A., Morales-Yáñez, A. y Vargas-Flores, J.A. (1984). Contaminación fecal en la Bahía de Ensenada, Baja California. ***Ciencias Marinas***. 10(1): 7-17.

-
- Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial, 6 de enero de 1997.
 - Secretaría de Salud (1989a). Curso sobre control sanitario de moluscos bivalvos. dirección genaral de salud ambiental ocupacional y saneamiento básico. Vol. I, 52 pp y Vol. II, 45 pp.
 - Secretaría de Salud (1989b). Control sanitario de áreas de producción de moluscos bivalvos. Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Vol. I 80 pp y Vol. II 131 pp.
 - Segovia Zavala J.A. (1982). Estudios de contaminación por materia orgánica en la zona industrial de El Sauzal, B.C., Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. 96 pp.
 - Segovia Zavala J.A. y Galido Bect M.S. (1984). Fuentes de contaminación por materia orgánica en la Bahía de Todos Santos, Baja California. I. Caracterización y eficiencia de la planta de tratamiento de aguas negras de la ciudad de Ensenada, Baja California. *Ciencias Marinas*. 10(1): 19-32.
 - Segovia Zavala J.A. y Orozco Borbón M.V. (1986). Calidad bacteriológica del agua de mar en la zona costera noroccidental de Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 12(1): 93-102 (10).
 - Seyfried, P.L., Tobin, R., Brown, N. and Ness, P.F. (1985). A Prospective Study of Swimming-Related Illness I. Swimming-Associated Health Risk. *American journal of Public Health*. 75(9): 1068-1070.

-
- Sieracki, M. (1980). The effects of short exposures of natural sunlight on the decay rates of enteric bacteria and coliphage in a simulated sewage outfall microcosm. Master of Science Thesis, University of Rhode Island, 1980.
 - Sinton W.L., Finlay K.R. and Lynch A.P. (1999). Sunlight inactivation of faecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Applied and Enviromental Microbiology*, 3605-3613 pp.
 - Solic, M. and Krstulovic, N. (1992). Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity, and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 24(8): 411-416.
 - Vera González, R., Nassar Prado, T. y Martínez Zabatdeny, L. del C. (1998). Informe de calidad de agua y producto de la zona de cultivo de moluscos "Rincón de Ballenas". *Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos*. 3-13 pp.
 - Tanahara Romero, T.Y.A. (1996). Variabilidad espacio temporal de bacterias coliformes en la bahía de Todos Santos, B.C. Tesis de Licenciatura. FCM. UABC. 70 pp.
 - Turner S.J. and Lewis G.D. (1995). Comparison of F-specific bacteriophage, enterococci, and faecal coliform densities through wastewater treatment process employing oxidation ponds. *Water Science & Technology*, 31: 85-89.
 - Yahya Moyasar T., Hoff Kevin G., Reed Charles E., McGee Charles D. (1998). Survival of microorganisms in wastewater and sea water. **Extended Abstractc.** Water Quality International Conference, IAWQ 19th Biennial International Conference-Health Related Microbiology, 21-26 June 1998- Vancouver, Canada.

-
- Yahya, M.T., Straub T.M., Gerba C.P. and Magnolin A.B. (1991). Inactivation of bacteriophage MS-2 and poliovirus in copper, galvanized and plastic domestic pipes. *International J. of Enviromental Science*, 1: 76-86.

APÉNDICE A

Tabla A-1 .- Normas de calidad bacteriológica para aguas de uso recreativo (Noble *et al.*, 2000).

INDICADOR	LÍMITE DIARIO/100 ML	LÍMITE MENSUAL/100 ML
Coliformes totales	10,000	20 % de las muestras > 1,000
Coliformes fecales	400	200 (G.M.)*
Enterococos	104	35 (G.M.)*

* Promedio geométrico

Tabla A-2 .- Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 para descargas de aguas residuales vertidas a cuerpos receptores y bienes nacionales (Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; 1997)

INDICADOR	PROMEDIO DIARIO NMP/100 ML	PROMEDIO MENSUAL NMP/100 ML
Coliformes fecales	2000	1000

Tabla A-3 .- Normas de calidad bacteriológica para áreas de cultivos bivalvos (Secretaría de Salud, 1989a).

INDICADOR	PROMEDIO GEOMÉTRICO NMP/100 ML	10 % DE LAS MUESTRAS NMP/100 ML
Coliformes totales	< 70	< 230
Coliformes fecales	< 14	< 43

APÉNDICE B

Tabla B-1 .- Concentración promedio de bacteriófagos (BT) UFF/100 ml apartir de las ecuaciones de regresión lineal simple en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., de septiembre a octubre de 1999 (estaciones 1 a la 5) y de noviembre de 1999 a enero de 2000 (estaciones 6 a la 15).

ESTACIÓN	PROMEDIO DE CT	PROMEDIO DE BT*	PROMEDIO DE CF	PROMEDIO DE BT**
1	8 073	30 556	233	2 544
2	11 073	44 005	8 573	503 616
3	1 000	2 743	169	1 588
4	437	1 055	116	915
5	37	61	21	75
6	362	849	234	2 561
7	4 022	13 671	896	18 348
8	12	17	10	25
9	16	23	8	18
10	3	3	3	4
11	<2	2	<2	2
12	6	7	6	12
13	4	5	4	7
14	2	2	<2	2
15	<2	2	<2	2

* Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.1542x - 0.0243$
 donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos
 $x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes totales

** Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.4667x - 0.0665$
 donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos
 $x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes fecales

Tabla B-2 .- Concentración promedio de bacteriófagos (BT) UFF/100 ml apartir de las ecuaciones de regresión lineal simple en agua de mar de la bahía de Todos Santos, B.C., para febrero de 2000.

ESTACIÓN	PROMEDIO DE CT	PROMEDIO DE BT*	PROMEDIO DE CF	PROMEDIO DE BT**
1	40	67	<2	2
2	9650	34 549	1045	22 993
3	920	2 491	49	258
4	407	972	114	891
5	11	15	11	29

* Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.1542x - 0.0243$
 donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos
 $x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes totales

** Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.4667x - 0.0665$
 donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos
 $x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes fecales

APÉNDICE C

Tabla C-1 .- Límites diarios y mensuales de bacteriófagos UFF/100 ml para aguas de uso recreativo apartir de las ecuaciones de regresión lineal simple.

INDICADOR	LÍMITE DIARIO/100 ML	LÍMITE MENSUAL/100 ML
Coliformes totales	10,000	20 % de las muestras > 1,000
Bacteriófagos*	39,129	
Coliformes fecales	400	200 (G.M.)***
Bacteriófagos**	5,620	2,034 (G.M.)***

* Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.1542x - 0.0243$

donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos

$x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes totales

** Ecuación de regresión lineal simple $y = 1.4667x - 0.0665$

donde $y = \log_{10}$ de la concentración promedio de bacteriófagos

$x = \log_{10}$ de la concentración promedio de coliformes fecales