

EFFECTO DE LA RADIACIÓN LUMINOSA EN LA DESAPARICIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* (T₉₀) EN MEDIO ACUÁTICO. ESTUDIO EXPERIMENTAL

J.C. Canteras, L. Pérez, P. León, T. Lorda¹

RESUMEN: Se estudia el efecto de la luz de diferentes longitudes de onda: ultravioleta ($\lambda = 350$ nm), azul ($\lambda = 450$ nm), y verde-amarilla ($\lambda = 575$ nm), y de la intensidad lumínica en la tasa de desaparición bacteriana en medio acuático. Se realizaron diferentes experiencias de laboratorio manteniendo constantes las variables ambientales de temperatura, pH, salinidad y utilizándose como indicador bacteriano *Escherichia coli*. Los resultados indican que el T₉₀ es afectado tanto por el aspecto cualitativo de la luz (longitud de onda) como por el cuantitativo (intensidad), siendo los dos factores altamente significativos. No se encontró sinergia entre ambos.

La luz ultravioleta tiene un destacado papel sobre la desaparición bacteriana, siendo su efecto bactericida mayor que el de la luz azul y éste superior al de la luz verde-amarilla. Palabras clave: desaparición bacteriana, intensidad de luz, longitud de onda, T₉₀

INTRODUCCIÓN

La identificación de los factores que favorecen la desaparición bacteriana tras su vertido al mar, la magnitud de sus efectos, y el modo de actuación: simple, acumulativo, sinérgico, etc., son cuestiones no aclaradas suficientemente, a pesar de la amplia bibliografía que existe sobre el tema (Evison, 1988; Fujioka y Narikawa, 1982; El-Sharkawi *et al.*, 1989; Bravo y Vicente, 1991; Kocasoy, 1995; Alkan *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1998) y de las investigaciones realizadas desde hace más de 4 décadas.

El T₉₀ (tiempo necesario para que el 90 % de la población bacteriana desaparezca) se utiliza como parámetro de diseño en la construcción de emisarios submarinos. La actual legislación española (Orden de 13 de julio de 1993 por la que se aprueba la *Instrucción para el proyecto de conducción de vertidos desde tierra al mar*) pone un marcado énfasis en el carácter estadístico del T₉₀ y la significación que tienen los factores ambientales.

Los resultados que figuran en la bibliografía sobre el T₉₀ en medio marino, presentan una amplia variación en lo relativo a los efectos que ejercen los factores ecológicos (temperatura, (Ayres, 1977); salinidad, (Pereira y Alcántara, 1993); depredación (McCambridge y McMeekin, 1981); radiación solar (Barcina *et al.*, 1987); competencia por nutrientes, presencia de sustancias tóxicas producidas por algas (Evison y Tosti, 1980)) y físicos (dilución y dispersión). Esta variación es debida, en parte, a la falta de unificación de condiciones

experimentales y técnicas.

La luz solar figura como uno de los factores que mayor importancia tiene en la tasa de desaparición bacteriana (Sarıkaya y Saatci, 1994). Ésta presenta dos aspectos que conviene destacar, uno que hace referencia a su espectro de emisión (longitud de onda, λ) y otro a su intensidad.

Es conocido que la relación entre la intensidad de luz y el T₉₀ es inversamente proporcional (Bellair *et al.*, 1977; Solic and Krstolovic, 1992; Tudor *et al.*, 1990), pero no está claro el efecto de las diferentes radiaciones (ultravioleta y visible) (Gameson y Gould, 1975; Solic y Krstolovic, 1992; Canteras *et al.*, 1995). Mientras hay quien considera que el mayor efecto de la luz solar en la desaparición bacteriana es debido a los daños que causa la radiación ultravioleta en el DNA (AueryNiehaus, 1993), otros creen que es posible una mayor acción bactericida de la radiación visible frente a la ultravioleta ya que, entre otras razones, en profundidad la radiación ultravioleta es rápidamente atenuada (se admite, en general, que su penetración en la masa de agua no excede de un metro) y sin embargo se obtienen T₉₀ semejantes a los de superficie (Cornax *et al.*, 1990; Fuijoka *et al.*, 1981; Canteras *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo fue estudiar, por una parte, el efecto de diferentes tipos de luz (ultravioleta y visible) y de la intensidad lumínica en la tasa de desaparición bacteriana y, por otra, si el efecto de ambos es simple, acumulativo o sinérgico.

¹ Dpto. de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio Ambiente. Universidad de Cantabria. Avda. de los Castras s/n. -39005- Santander. Teléfono 942-201805, e-mail: canteraj@ccaix3.unican.es

Artículo publicado en *Ingeniería del Agua*. Vol.6 Num.3 (septiembre 1999), páginas 269-274, recibido el 30 de noviembre de 1998 y aceptado para su publicación el 18 de mayo de 1999. Pueden ser remitidas discusiones sobre el artículo hasta seis meses después de la publicación del mismo. En el caso de ser aceptadas, las discusiones serán publicadas conjuntamente con la respuesta de los autores en el primer número de la revista que aparezca una vez transcurrido el plazo indicado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones generales

Las experiencias se llevaron a cabo en el laboratorio en una cámara de cultivo que permitía el control de las variables (temperatura, luz). Como indicador bacteriano se utilizó una cepa de *Escherichia coli ssp. communior* (ATCC 4157) procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo.

Las condiciones ambientales generales fueron: medios de incubación basados en solución salina estéril (NaCl (Merck) al 8,5 ‰ en agua desmineralizada filtrada a través de filtros Whatman GF/F y esterilizada en autoclave durante 45 minutos a 120 °C); temperatura constante de 20 °C y pH de 7.

Se ensayaron diferentes luces e intensidades. Los tipos de luz utilizados fueron: luz verde-amarilla ($\lambda = 575$ nm); luz azul ($\lambda = 450$ nm); luz ultravioleta ($\lambda = 350$ nm). Como control y para evaluar el efecto de la luz se realizaron experiencias en oscuridad. En la *Tabla 1* se expresan las diferentes intensidades utilizadas para cada tipo de luz. Se emplearon tubos fluorescentes Sylvania de 36 W.

Diseño experimental

Las suspensiones bacterianas sometidas a la radiación (*Tabla 1*) para los tratamientos experimentales se establecieron en matraces de 1 l. Dichas suspensiones consistían en 1 l de solución salina estéril a la que se le inoculaba, asépticamente, *E. coli* para que la concentración inicial en cada matraz fuera de 10^5 cel/ml. El inóculo procedía de un cultivo de *E. coli* en medio líquido con peptona y glucosa que se encontraba en fase exponencial de crecimiento. El volumen de inóculo necesario para cada tratamiento se calculaba a partir de la curva de crecimiento, previamente elaborada (Canteras *et al.*, 1993), y que relacionaba la turbidez con el número de células viables.

La duración de cada uno de los experimentos fue de 12 horas a lo largo de las cuales se muestreó en el momento de la inoculación y posteriormente cada 3 horas. El muestreo consistía en la extracción, tras la agitación, de 5 ml de la suspensión bacteriana sometida a radiación. De cada muestra se realizaron 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) con solución salina estéril. Las diluciones eran necesarias para asegurar el posterior correcto conteo de

Luz verde-amarilla $\lambda = 575\text{nm}$	Luz Azul $\lambda = 450\text{nm}$	Luz ultravioleta $\lambda = 350\text{nm}$
8660 lux	4900 lux	1000 lux
6740 lux	4000 lux	720 lux
4900 lux	2600 lux	480 lux
2600 lux	1000 lux	240 lux

Tabla 1. Intensidades de luz (lux) utilizadas para cada tipo de luz ensayada (verde-amarilla, azul y ultravioleta)

las colonias. La identificación y recuento de colonias se realizó por el método de filtración por membrana (UNEP/ WHO, 1983). Se utilizaron membranas HA (Millipore) de 0,45 mm de poro y 47 mm de diámetro. La filtración (100 ml) se llevó a cabo mediante vacío. Tras la misma se colocaba el filtro de membrana en una caja Petri que contenía 2 ml de medio de cultivo M-FC (Millipore) y se incubaba durante 24 horas a 44,5 °C \pm 0,2 °C en oscuridad. El recuento se hizo en microscopio binocular de bajo aumento ($\times 10$) con iluminación de luz blanca fluorescente.

Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml).

El cálculo del T_{90} se realizó a partir del modelo propuesto por Chikc (1908) donde:

$$T_{90} = 2,3/K$$

siendo K la pendiente de la curva Log N (número de individuos) frente al tiempo.

Para el tratamiento de los datos se emplearon diversos análisis estadísticos (correlaciones, T-Tukey, ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de T_{90} variaron ampliamente desde 0,95 horas (h) a 39,66 h. Estas diferencias fueron debidas tanto a las distintas intensidades de luz como a las longitudes de onda empleadas. En la *Figura 1* se muestran los valores medios en función de las diferentes luces e intensidades ensayadas. En todas ellas se observa una fuerte disminución de la desaparición bacteriana con el aumento de la intensidad de luz. Los máximos se obtuvieron cuando se utilizó luz verde-amarilla y los mínimos correspondieron a la luz ultravioleta (*Tabla 2*). Para ésta, los resultados obtenidos fueron semejantes a los dados por Evison (1988).

En oscuridad, el T_{90} osciló desde 41,66 h a 52,04 h con una media de 43,14 h. Estos valores están de acuerdo con los obtenidos por diversos autores como Gameson (1984) que para 20 °C y oscuridad obtuvo un valor de 49 horas para coliformes o como los de Sarikaya y Saatcy (1994) de 40 horas.

Para poner de manifiesto la relación que existe entre la intensidad de luz y la desaparición bacteriana se calculó la regresión (con todos los valores obtenidos) entre ambos parámetros obteniéndose un coeficiente no significativo ($r = 0,079$). Este resultado no fue el esperado pues se supone que a mayor intensidad de luz menor valor de T_{90} . Se pensó que los resultados pudieran quedar enmascarados por el efecto de la longitud de onda. Para analizar este posible fenómeno se procedió de la siguiente manera:

1° Se estudió para cada tipo de luz (longitud de onda constante: verde-amarilla, 575 nm, azul, 450 nm, y ultravioleta, 350 nm) su relación entre el T_{90} (horas) y la intensidad. Se realizaron regresiones y se obtuvieron así las ecuaciones de mejor ajuste a la curva por polinomios ortogonales. Las expresiones de ajuste a una recta fueron las siguientes:

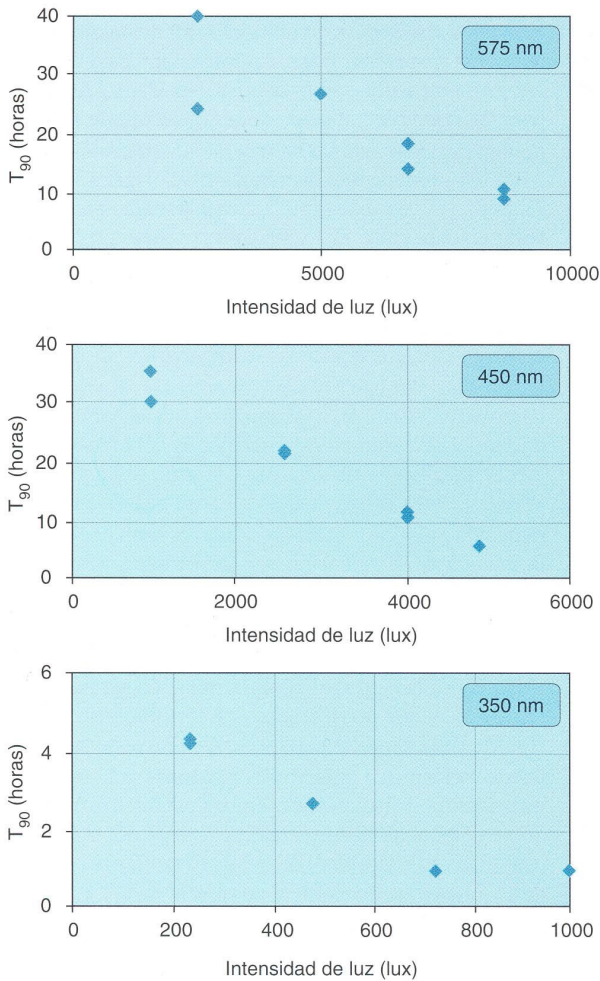


Figura 1. Valores medios de T₉₀ (horas) frente a las distintas intensidades de luz (lux) para cada una de las luces ensayadas (Luz verde-amarilla: $\lambda = 575$ nm; Luz azul: $\lambda = 450$ nm y Luz UV: $\lambda = 350$ nm)

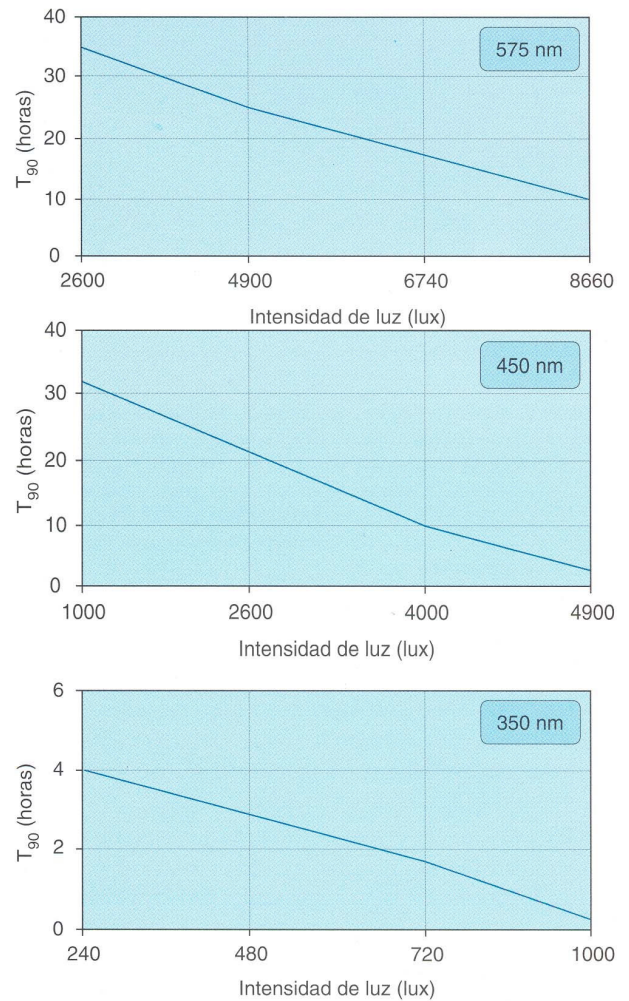


Figura 2. Curvas de ajuste para cada tipo de luz (Luz verdeamarilla: $\lambda = 575$ nm; Luz azul: $\lambda = 450$ nm y Luz UV: $\lambda = 350$ nm) entre las distintas intensidades (lux) y el T₉₀ (horas)

Dichas ecuaciones corresponden a las curvas de la Figura 2.

2° Se calculó el índice de correlación parcial (Cramer, 1968) entre la intensidad y el T₉₀, eliminando el efecto del aspecto cualitativo de la longitud de onda, obteniéndose un coeficiente de $-0,884$ con una significación superior al 99,9 %. En consecuencia, se deduce que existe correlación negativa cuando se elimina el aspecto cualitativo (longitud de onda) de la luz y a una mayor intensidad de luz le corresponde un menor T₉₀. Estos resultados están de acuerdo con lo demostrado por varios autores (Bellair *et al.*, 1977; Solic y Krstulovic, 1992; Tudor *et al.*, 1990).

Para determinar si las diferencias observadas eran significativas estadísticamente, se realizó una prueba T-Tukey de contraste de pares de medias, con las intensidades ensayadas en los diferentes tipos de luz (Tabla 3).

El análisis dio los siguientes resultados:

Tipo de luz	Valor T ₉₀ máximo (h)	Valor T ₉₀ mínimo (h)
Verde-amarilla	34,43	9,43
Azul	31,88	4,11
Ultravioleta	4,22	0,94

Tabla 2. Valores máximos y mínimos obtenidos, en el cálculo del T₉₀ (horas), para cada una de las luces ensayadas (verde-amarilla, azul y ultravioleta), de acuerdo con las intensidades máximas y mínimas usadas (ver Tabla 1)

• Luz verde amarilla
 $T_{90} = -0,0043 I + 46,103 \quad r = -0,96 \quad (1)$

• Luz azul
 $T_{90} = -0,00721 I + 39,13 \quad r = -0,99 \quad (2)$

• Luz ultravioleta
 $T_{90} = -0,00471 I + 5,087 \quad r = -0,95 \quad (3)$

siendo $I =$ Intensidad de luz (lux)

Luz verde-amarilla		Luz azul		Luz ultravioleta	
Pares* (lux)	S	Pares* (lux)	S	Pares* (lux)	S
2600-4900	ns	1000-2600	s	240-720	s
2600-6740	s	1000-4000	s	240-720	s
2600-8660	s	1000-4900	s	240-1000	s
4900-6740	ns	2600-4000	s	480-720	s
4900-8660	s	2600-4900	s	480-1000	s
6740-8660	ns	4000-4900	ns	720-1000	ns

Tabla 3. Prueba T-Tukey para diferencias entre pares de medias, con las intensidades ensayadas en los diferentes tipos de luz (verde-amarilla, azul, ultravioleta). Pares*= intensidades de luz comparadas. S = significación. s= significativo, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias n.s.= no significativo se acepta la hipótesis de igualdad de medias

- Con luz verde-amarilla, los pares comparados fueron significativos estadísticamente cuando el aumento de intensidad de luz fue superior a 3500 lux (2600-6740 lux, 2600-8660 lux, 4900-8660 lux). Aquellos pares en los que el incremento fue igual o inferior a 2300 lux no presentaron diferencia significativa (2600-4900 lux, 4900-6740 lux, 6740-8660 lux).
- Para la luz azul y ultravioleta todo aumento de la intensidad fue significativo excepto cuando se pasaba de 4000 a 4900 lux en la luz azul y de 720 a 1000 lux en ultravioleta.

Para establecer la relación que existe entre el T₉₀ y la longitud de onda se procedió de la misma manera que para la intensidad.

Con todos los datos se realizó un análisis de correlación y se obtuvo una correlación significativa con un coeficiente de seguridad superior al 99,9 % (p<0,001) pero se consideró que esta correlación era baja ya que el tipo de luz (la longitud de onda) sólo explicaba el 39,04 %. Lo que se esperaba encontrar es que a menor longitud de onda mayor mortalidad, puesto que las radiaciones cuanto menor longitud presentan son más energéticas. La baja correlación se debió posiblemente a que la intensidad interfirió en el análisis. Del mismo modo se trató de demostrar la teoría siguiendo dos pasos:

a. Manteniendo constante la intensidad, se estudió la relación T₉₀/longitud de onda y se calculó el índice de correlación parcial, los resultados se expresan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. índice de correlación parcial entre T₉₀ y la longitud de onda, manteniendo constante la intensidad de luz.

Intensidad (lux)	r	P
1000	0.99	<0.01
2600	0.87	<0.1
4900	0.99	<0.001

Según los resultados obtenidos el valor medio de desaparición bacteriana, para una misma intensidad (de luz verde-amarilla y azul) de 2600 lux es de 27,6 h y para 4900 lux (de luz verde-amarilla y azul) de 13,14 h, lo que supone que un incremento de intensidad de 2300 lux produce una disminución del T₉₀ del 52,38 %. Solic y Krstulovic (1992), con una radiación solar comprendida entre 510 y 830 Wm⁻², obtuvieron una disminución de alrededor el 40 % para cada 100 Wm⁻² de aumento de radiación solar. Nuestros datos (52 % para cada 10 Wm⁻²) superarían estos valores, sin embargo creemos que no son comparables por diversas razones. Por una parte las condiciones experimentales fueron diferentes. Así, mientras que la reducción que se ha obtenido en este trabajo, es debida sólo al efecto de la luz verde-amarilla y la azul, Solic y Krstulovic (1992) la consiguen con todo el espectro de radiación solar. Por otra, las unidades empleadas en la medida de la radiación son diferentes y resultan peligrosas las conversiones (Margalef, 1980).

b. Se calculó el índice de correlación parcial entre el T₉₀ y la longitud de onda eliminando el efecto de la intensidad. Se realizó un análisis de correlación parcial obteniéndose un coeficiente r = 0,906, con una significación superior al 99,9 %. De este resultado se puede deducir que la hipótesis planteada era cierta y que existe correlación entre ambos parámetros cuando se elimina de la correlación el efecto del aspecto cuantitativo (intensidad) de la luz. El tanto por ciento de T₉₀ que se puede explicar por efecto de la longitud de onda es del 82,12%.

De nuestros resultados se deduce que el mayor efecto bactericida lo presenta la luz ultravioleta (con un valor medio de 2,43 h) seguido de la luz azul (valor medio de 10,77 h) y por último de la verde-amarilla (valor medio de 30,50 h). La luz verde-amarilla utilizada tenía una longitud de onda de 575 nm y para que comience a tener un efecto importante en el T₉₀ se necesitaron intensidades altas, superiores a 687 lux, ya que a esta intensidad se obtenía un valor semejante al de las experiencias en oscuridad. A 1000 lux su efecto fue despreciable, reduciendo el T₉₀ en una hora, mientras que a esta misma intensidad la ultravioleta lo reduce al 98 %. La luz azul ensayada (con longitud de onda de 450 nm) presenta un efecto mayor que la verde-amarilla, comenzando a tener influencia cuando las intensidades son mayores de 538 lux (T₉₀ = 43 h).

Gameson y Gould (1975) observaron que en lo que se refiere al efecto letal de las radiaciones, el 50 % es atribuible a longitudes inferiores a 370 nm, el 25 % a las cercanas al UV (370-400 nm) y el 25 % a las de la región del azul-verde (400 a 500 nm).

Según los resultados de este trabajo se puede deducir un mayor efecto letal de la luz ultravioleta que el obtenido por Gameson y Gould (1975). La influencia de la luz verde-amarilla es despreciable, es necesario una elevada intensidad (6000 lux) para que el T₉₀ se reduzca a la mitad respecto de la oscuridad. Gameson y Gould (1975) expresaron que el efecto de las longitudes superiores a

500 nm es despreciable, la longitud de onda que utilizamos fue de 575 nm, lo cual estaría de acuerdo con esta teoría.

Se puede concluir que el T_{90} es afectado tanto por el aspecto cualitativo (longitud de onda) de la luz como por el cuantitativo (intensidad), y que a menor longitud de onda el tiempo necesario para que la población bacteriana disminuya en un 90 % es menor.

Una vez demostrada la influencia de los dos aspectos de la luz, se calculó la regresión múltiple entre T_{90} , longitud de onda e intensidad. La expresión obtenida fue la siguiente:

$$T_{90} = 0,198 \lambda - 0,0049 I - 62,08 \quad r = 0,931 \quad (4)$$

donde: I= Intensidad de luz medida en lux y λ = longitud de onda en nanómetros.

Para determinar si entre ambos factores existe algún tipo de interacción, es decir, si la desaparición bacteriana varía debido a un efecto de intensidad más otro debido a la longitud de onda, o bien si hay además sinergia, se realizó un análisis de la varianza de doble vía con dos factores (Tabla 5):

Factor 1: Longitud de onda con dos niveles (luz verde-amarilla y azul);

Factor 2: Intensidad de luz con dos niveles (2600 lux y 4900 lux).

Los resultados demuestran que los dos factores son altamente significativos, al contrario que la interacción de ambos. En consecuencia, la desaparición bacteriana se debe puramente a la suma del efecto de la intensidad de luz y la longitud de onda, no existiendo sinergia entre ambos.

Fuente de variación	SC	GL	MS	F	p
Intensidad (I)	324,69	1	324,69	26,41	0,003
Longitud de onda (L)	716,61	1	716,61	64,91	0,000
Interacción I-L	716,61	1	43,44	3,93	0,104
Explicada	1263,225	3	421,07	38,14	0,001
Residual	55,19	5	11,04		
Total	1318,42	8	164,80		

Tabla 5: Resultados del análisis de la varianza (ANOVA), realizado con los factores: longitud de onda con dos niveles (luz verde-amarilla y luz azul) e Intensidad de luz con dos niveles (2600 lux y 4900 lux)

CONCLUSIONES:

- La intensidad de luz y la longitud de onda afectan de forma inversa al grado de desaparición bacteriana.
- La luz ultravioleta tiene un destacado papel sobre la desaparición bacteriana, siendo su efecto bactericida mayor que el de la luz azul y éste superior al de la luz verde-amarilla.
- El efecto de la intensidad de luz y la longitud de onda son aditivos pero no sinérgicos.

REFERENCIAS

- Alkan, V., Elliott, D.J. and Evison, L.M. (1995). *Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters*. *Wat. Res.*, 29: 2071-2081.
- Auer, M.T. and Niehaus, S.L. (1993). *Modeling fecal coliform bacteria. I. Field and laboratory determination of loss kinetics*. *Wat. Res.* 27 (4): 693-701.
- Ayers, P.A. (1977). *Coliphages in sewage and the marine environment*, In: *Aquatic Microbiology*. F.A. Skinner and J.M. Shewan, (eds), Academic Press. New York, pp. 275-298.
- Bellair, J. T., Parr-Smith, G.A. and Wallis, I.G.(1977). *Significance of diurnal variation in faecal coliform die-off rates in the design of ocean outfalls*. *J. Water Pollut. Control Fed.* 49: 2022-2030.
- Barcina, L, Arana, I., Iriberry, J. and Egea, L. (1986). *Influence of light and natural microbiota of the Butrón river on E. coli survival*. *Antonie van Leeuwenhoek* 52: 555-566.
- Bravo, J.M., Vicente, D. (1991), *Bacterial die-off from sewage discharges through submarine outfalls*. *Int. Spec. Conf. on Marine Disposal systems (Lisboa)*.
- Canteras, J.C.; Pérez, L; P. León., J. Juanes, C. Alvarez. K. Nikolov. (1993). *Realización de las campañas de campo para la calibración del modelo de inactivación bacteriana a emplear en el estudio de implantación y seguimiento ambiental de emisarios submarinos en el mar Cantábrico (Cuenca Norte)*. Confederación Hidrográfica del Norte. Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente. Dirección General de Calidad de Aguas. 115 pp.
- Canteras, J.C., Juanes, J.J., Pérez, L. and Koev, K. (1995). *Modelling the coliforms inactivation rates in the Cantabrian sea (Gulf of Biscay) from "in situ" and laboratory determinations of T_{90}* . *Wat. Sc. Tech.* 32, 2: 37-44.
- Cornax, R., Moriñigo, M.A., Romero, P. y Borrego, J.J. (1990). *Survival of pathogenic microorganisms in seawater*. *Current microbiology* 20:293-298.
- Cramer, H. (1968). *Métodos matemáticos de estadística*. Aguilar, Madrid.
- Chick, H. (1980). *Investigation of the Laws of Disinfection*. *J. Hygiene.* 8, 92
- El-Sharkawi, F., El-Attar, L., Gawad, A.A. and Mola-zem, (1989). *Some environmental factors affecting survival of fecal pathogens and indicator organisms in seawater*. *Wat. Sci. Technol.* 21 (1): 115-120.
- Evison, L.M. and Tosti E., (1980). *An Appraisal of Bacterial Indicators of Pollution in Sea Water*. *Prog. Water Technology*. IAWPR, 12: 591-599, Pergamón Press.

- Evison, L.M. (1988). *Comparative studies on the survival of indicator organisms and pathogens in fresh and sea water*. Wat. Sci. Technol. 20, 309-315.
- Fujioka, R.S., Hashimoto, H.H., Siwak, E.B. and Yung, R.H.F. (1981). *Effect of sun light on survival of indicator bacteria in seawater*. Appl. Environ. Microbiol. 41,690-696.
- Fujioka, r. and Narikawa O.T. (1982). *Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions*. Appl. Envir. Microbiol. 44, 395-401.
- Gameson, A.L.H. (1984). *Investigations of sewage discharges to some British coastal waters*. Chapter 8, Bacterial Mortality, Part 1. Water Research Centre. Technical Report TR 201.
- Gameson A.L.H. and Gould DJ. (1975). *Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in seawater*. In Discharge of Sewage from sea outfalls (ed. Gameson A.H.L.) pp. 209-219. Pergamon Press: London.
- Kocasoy, G. (1995). *Waterborne disease incidences in the Mediterranean region as a function of microbial pollution and T₉₀* Wat. Sci. Tech. 32, 9-10: 257-266.
- Margalef, R. (1980). Ecología. Ed. Omega. Barcelona.
- McCambridge, J. and McMeekin, T.A. (1981). *Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of faecal and other bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1083-1087.
- Mezrioui, N., Baleux, B. and Troussellier, M. (1995). *A microcosm study of the survival of Escherichia coli and Salmonella typhimurium in brackish water*. Wat. Res. 29,2: 459-465.
- Pereira, M.G. and Alcántara, F. (1993). *Culturability of Escherichia coli and Streptococcus faecalis in batch culture and "in situ" in estuarine water (Portugal)*. Wat. Res. 27, 8: 1351-1360.
- Sarikaya, H.Z. and SaatVi, A.M. (1994). *Bacterial die-away rates in red sea waters*. International Specialized Conference on Marine Disposal Systems. Estambul-Turkia 35-43.
- Serrano, E., B. Moreno, M. Solaun, J.J. Aurrekoetxea and J. Ibarluzea. (1998). *The influence of environmental factors on microbiological factors on microbiological indicators of coastal water pollution*. Wat. Sci. Tech. 38, 12: 195-199.
- 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 Poli. Bull. 24 (8): 411-416.
- Tudor, M., Solic, M and Krstulovic, N. (1990). *T₉₀ of total coliforms, faecal coliforms and faecal streptococci in the Kastela Bay*. Acta Adriat. 31, 67-74.
- UNEP/WHO. (1983). *Determination of faecal coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method*. Reference Methods for Marine Pollution Studies. No.3, Rev. 1, UNEP.