

Impacto de los nutrientes inorgánicos sobre de la comunidad bacteriana del río Almendares (Cuba)

IMPACT OF INORGANIC NUTRIENTS ON BACTERIAL COMMUNITY IN ALMENDARES RIVER (CUBA)

Yunier ARPAJÓN¹, Beatriz ROMEU², Anar RODRÍGUEZ², Mayra HEYDRICH², Nidia ROJAS² y Daisy LUGO².

¹ Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Salvador Allende", Ciudad de La Habana, Cuba; ² Laboratorio de Ecología de los Ecosistemas Acuáticos, Facultad de Biología Universidad de La Habana, Cuba. Correo-e: yunierar@infomed.sld.cu, bromeu@fbio.uh.cu.

RESUMEN

Entre las corrientes fluviales de agua dulce de la capital de nuestro país, el Almendares constituye la de mayor importancia debido a las diversas actividades de las cuales depende parte de la población de la misma: recreación, alimentación, suministro de agua, industria. Es por ello que evaluar distintos parámetros de calidad, como son las concentraciones de nutrientes inorgánicos y la carga bacteria total, nos permitirá tener una valoración del daño ecológico al cual se encuentra sometido dicho río producto a, entre otros factores, a la actividad antrópica. En el río Almendares, y afluentes, se obtuvieron concentraciones de: nitratos, nitritos, amonio, fosfatos y bacterias totales, superiores a las recomendadas para aguas con fines recreativos. Las pérdidas de viabilidad-cultivabilidad bacteriana fueron comprobadas de hasta un 85% del total de bacterias cultivables mesófilas. Se demostró el gran deterioro ambiental del río Almendares principalmente por el vertimiento de desechos domésticos e industriales.

Palabras clave: Río contaminado, nutrientes inorgánicos, bacterias cultivables viables.

INTRODUCCIÓN

Los problemas de contaminación de las aguas tienen su origen en la Revolución Industrial, hace aproximadamente unos 200 años y con un rápido aumento en la población mundial, impulsando a la aparición de problemas tanto de calidad como de cantidad de esta sustancia tan importante para la vida en el planeta, esto ha traído consigo problemas ecológicos que han repercutido negativamente tanto para la salud humana y la existencia en el planeta del resto de los seres vivos, como para el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos de los elementos (Roane y Pepper, 2000).

La Ciudad de La Habana, capital de todos los cubanos, no está ajena a los problemas de muchas megalópolis modernas y sus afluentes superficiales de agua están también afectadas por la contamina-

ción, siendo la de mayor importancia la cuenca Almendares-Vento, de la cual se obtiene alrededor del 47% del agua que consume la población de la capital; pero además las aguas del río Almendares y sus tributarios, son utilizadas en la agricultura, la pesca, la industria y la recreación (CENHICA, 2003).

Actualmente este ecosistema acuático presenta condiciones higiénico-sanitarias críticas como consecuencia de las descargas de aguas residuales, de más de 80 fuentes contaminantes bien caracterizadas e identificadas, provenientes del sector industrial y urbano, sin tratamiento o ineficientemente tratadas, zonas críticas de erosión del suelo, inadecuado manejo de las cuencas y deforestación (CENHICA, 2003), condiciones fundamentadas por estudios anteriores donde se han obtenido concentraciones elevadas de contaminantes químicos (compuestos orgánicos, nutrientes y metales pesados) (Rodríguez

et al., 2006); así como de bacterias fecales (Heidrich *et al.*, 2009).

En los últimos años la comunidad científica ha puesto mucho interés en el estudio de las interacciones entre los contaminantes químicos y los microorganismos, pues por las propiedades selectivas que tienen estos pueden reducir la diversidad microbiana e inhibir procesos importantes del ciclo de los elementos en los cuales los microorganismos juegan un papel fundamental, trayendo consigo cambios en la estructura de las comunidades, disminución de la concentración de microorganismos y afectaciones en su fisiología.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado nos propusimos como objetivo, analizar la correlación entre las concentraciones de nutrientes inorgánicos y los recuentos de bacterias totales presentes en dicho ecosistema.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental de corte longitudinal, donde fueron seleccionadas 9 estaciones de muestreo: 6 puntos en el río Almendares y tres en sus afluentes, en las cuales se realizaron 21 muestreos

en cada una de las estaciones, 18 entre junio de 2004 y febrero de 2006, y tres colectas durante el período de octubre del 2006 a abril del 2009. La localización realizadas por Geo-Posicionamiento Espacial (GPS) de las estaciones de muestreo de cada ecosistema se muestra en la Figura 1.

Las muestras fueron tomadas (1000 mL) en cada una de las estaciones anteriormente citadas siempre a unos 4 ó 5 m de la orilla de arrastre utilizando un cubo de plástico cilíndrico, según las Normas Cubanas (1999). Las muestras fueron trasladadas en una caja de refrigeración para su posterior procesamiento en el laboratorio.

En el laboratorio se procedió a realizar la filtración al vacío, con una bomba KNF Neuberger, de 150 mL de cada muestra transportada utilizando filtros de acetato de celulosa Sartorius de diámetro de poro de 0.45 µm previamente desecados a 80°C. Se reservaron 10 mL de cada filtrado en cuatro tubos Corning diferentes, uno para cada nutriente (nitrato, nitrito, amonio y fosfato), en refrigeración para la posterior cuantificación de los mismos (Normas Cubanas, 1999; APHA, 2005).

Además, se procesaron 10 mL de muestra sin filtrar con 200 µL de formaldehído para el posterior conteo de bacterias por epifluorescencia; la observación de las muestras se realizó en el microscopio de fluorescencia Olympus BX40 utilizando la lente de aumento 100x para aceite de inmersión. Se contaron las células de 15 campos visuales por muestra y los resultados se expresaron en número de células/100 mL de muestra (Peduzzi y Schiemer, 2004).

Para el conteo de bacterias totales cultivables-viables mesófilas, se realizaron diluciones seriadas a las muestras colectadas en solución salina (0.8 %) y se sembraron 20 µL de la muestra por diseminación con espátula de Drigalsky en placas de 90x10 mm con Agar Nutriente (Sigma), realizándose 3 réplicas en cada caso.

Análisis estadístico de los resultados

Se realizaron análisis de correlación entre las concentraciones medias de nutrientes y los conteos de bacterias totales a través del cálculo del Coeficiente de Correlación de

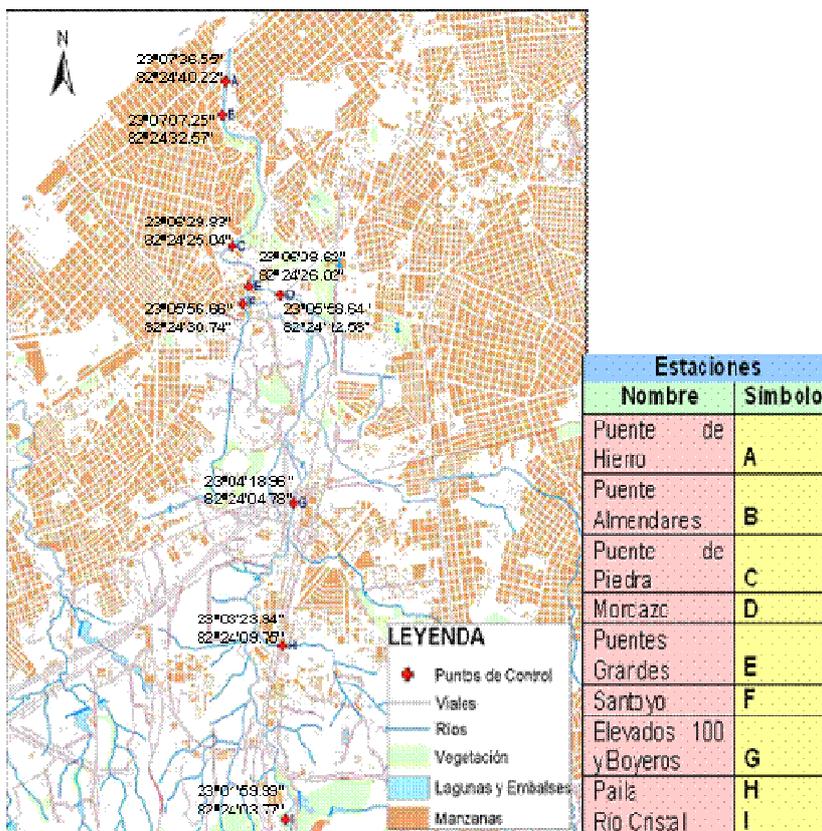


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en el río Almendares y afluentes según el Sistema de Posicionamiento Geoespacial (GPS).

Spearman (R), en ambos casos para un 95% de confianza.

Además se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP) para precisar las variaciones que experimentaron las concentraciones de nutrientes (nitrato, nitrito, amonio y fosfatos) en las distintas estaciones de muestreo en interacción con los valores medios de bacterias totales cuantificadas tanto por epifluorescencia como de viables cultivables mesófilos, para lo cual se tuvo en cuenta el criterio de Kaiser en el análisis factorial en la selección del número de componentes principales.

Con el fin de establecer las diferencias entre las concentraciones totales de bacterias utilizamos la prueba Post-hoc de Tukey HSD paramétrica para $p < 0,05$.

El procesamiento de los datos y los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa Microsoft Office Excel 2007[®] Microsoft Corporation y el programa Statistica StatSoft, Inc. (2006): Statistica (data analysis software system), version 6.1.

RESULTADOS

Una de las formas de evaluar la calidad del agua de un ecosistema acuático es determinando las concentraciones de nutrientes inorgánicos y de la carga bacteriana total existente. En los ecosistemas monitoreados las concentraciones, tanto de: nitratos, nitritos, amonio y fosfatos; como los conteos de bacterias totales por epifluorescencia directa, se muestran en las Tabla 1.

Estos resultados fueron agrupados y procesados estadísticamente mediante el test de Correlación de Spearman (R), observándose que en el río Almendares y afluentes, existe una correlación ($p < 0,05$) entre el número de bacterias totales y las concentraciones de amonio y fosfatos, no siendo así para los restantes nutrientes, lo cual nos sugiere que estos dos nutrientes juegan un rol fundamental en la dinámica poblacional bacteriana de dicho ecosistema.

En esta tabla podemos observar además que, las concentraciones de nitritos, amonio y fosfatos son superiores a los valores máximos permisibles para aguas recreacionales, los dos primeros son indicadores de contaminación por la presencia de materia fecal, y el fosfato por vertimiento de detergentes de rigen doméstico e industrial. Es válido aclarar que en la Estación H se vierten desechos de una fábrica de

Estaciones	Células Totales (cell/100mL)	NO_3^- (10mg/L)*	NO_2^- (1.0mg/L)*	NH_4^+ (0.5mg/L)*	PO_4^{3-} (0.1mg/L)*
A	1,57E+08	1,61	12,5	4,43	1,83
B	7,58E+08	1,44	13,52	5,19	1,57
C	1,21E+09	1,67	4,63	4,80	1,52
D	4,30E+09	1,18	2,12	7,34	2,13
E	4,46E+08	1,06	5,09	5,21	1,38
F	1,82E+09	1,65	8,83	4,78	1,40
G	1,30E+09	1,05	2,50	5,70	1,64
H	1,62E+10	1,21	5,05	10,32	3,75
I	4,22E+08	1,72	1,28	1,54	0,49
Coeficiente R		-0,32	-0,24	0,85	0,90

(*) Estándares de concentraciones máximas permisibles para aguas con fines recreativos según las NC (1999)

Tabla 1. Análisis de correlación entre las concentraciones totales nutrientes y los conteos de bacterias totales cuantificadas por epifluorescencia directa en los ríos Almendares y afluentes ($p < 0,05$).

medicamentos directamente al agua del río, y las estaciones E y F se localizan en áreas muy densamente pobladas de la capital.

El análisis de componentes principales para las concentraciones de nutrientes y bacterias totales se expone en la Figura 2, donde podemos observar que a partir de este estudio se obtuvo una explicación media con una varianza acumulada aproximada de 93.97% a través de dos componentes principales. Aquellos componentes que explican el 6.07% de la varianza se han desechado, asimismo es importante recordar que las varianzas acumuladas con un porcentaje igual o superior al 90% se consideran aceptables para que sean definidas como componentes principales (Johnson y Wichern, 1992; Polo, 2000). En nuestro estudio este valor fue superior, por tanto la selección de los componentes principales fue correcta.

Del análisis gráfico se puede inferir también que existe una asociación entre las concentraciones de nitritos, amonio y fosfatos, y que al parecer no hay relación directa alguna entre estos nutrientes y el contenido de nitratos en el agua del río Almendares y sus afluentes.

Sin embargo era de esperar que las concentraciones de nitratos y, nitritos y amonio, tuvieran vectores de sentidos contrarios, lo cual indica que su relación es inversa, o sea que los nitritos y el amonio pueden estar formándose a expensas de los nitratos por procesos de desnitrificación y o amonificación, que solo puede ser llevado a cabo por bacterias. Además por la estrecha cercanía entre los vectores que caracterizan a las concentraciones de amonio y fosfatos, con los de las concentraciones bacterianas nos corrobora la estrecha dependencia de estos

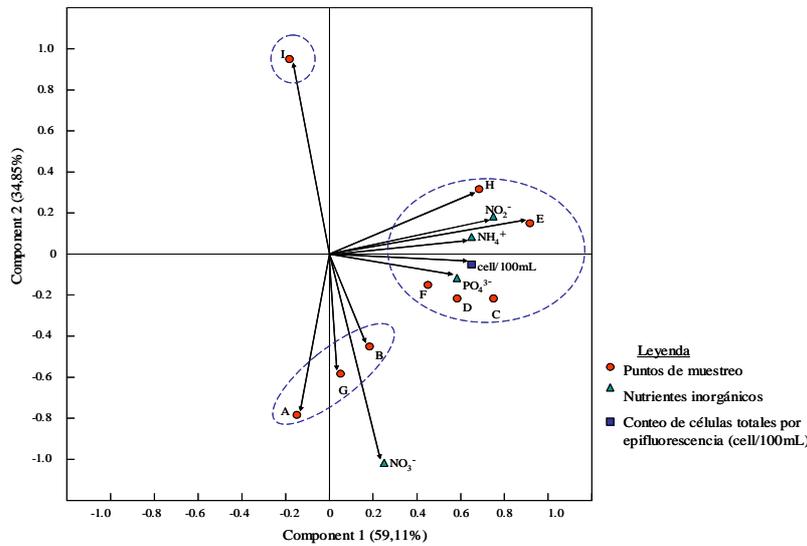


Figura 2. Biplot del análisis de componentes principales de las concentraciones de nutrientes en muestras de agua del río Almendares y afluentes. (NO_3^- = nitratos, NO_2^- = nitritos, NH_4^+ = amonio, PO_4^{3-} = fosfatos).

nutrientes en el número total de bacterias presentes en el río.

Al analizar la relación que existe entre los puntos de muestreo, respecto al par de componentes principales CP-1 y CP-2, podemos clasificar a los puntos de muestreo en tres grupos:

Primer grupo: Representado por el agua obtenida del punto I (río Cristal). Las muestras de esta zona del área de estudio tienen concentraciones mínimas de los nutrientes monitoreados y de bacterias totales.

Segundo grupo: Representado por las estaciones de muestreo A, B y G (Puente de Hierro, Puente Almendares y Elevados de 100 y Boyeros, respectivamente), se caracteriza por presentar concentraciones medias de estos nutrientes y de bacterias totales.

Tercer grupo: Se agrupan los puntos C, D, E, F y H, lo cual evidencia que las muestras obtenidas en estas estaciones son las que tienen máximas concentraciones de los nutrientes estudiados y de bacterias totales; así como la contribución de los afluentes a la contaminación de río Almendares.

En ambos métodos de cuantificación de bacterias totales se obtuvo el mayor conteo de bacterias en el afluente “Paila” (Figura 3), estación con un alto contenido de contaminantes químicos, según lo reportado por Rodríguez *et al.* (2008); y el menor, en

la estación Río Cristal, sin embargo entre la mayoría de las estaciones no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones bacterianas ($p < 0.05$) según la prueba Post-hoc de Tukey HSD; pero sí entre los conteos por epifluorescencia y de bacterias viables mesófilas.

En esta investigación, a partir de las muestras obtenidas en el río Almendares y sus afluentes, pudo recuperarse en cultivo Agar nutriente entre el 15% y el 61% de las bacterias totales cuantificadas por epifluorescencia directa en las distintas estaciones (Figura 4).

Es cierto que estas determinaciones fueron puntuales, pero nos da una idea del daño ecológico que está sufriendo esta importante corriente fluvial y sus afluentes, debido al carácter selectivo que imprimen los nutrientes inorgánicos sobre la microbiota del agua de dicho ecosistema acuático.

DISCUSIÓN

Como se ha podido evidenciar, en el río Almendares y afluentes, existe balance hacia las formas reducidas del nitrógeno, avalado por las altas concentraciones de nitritos y amonio, así como las bajas concentraciones de nitratos, lo cual coincide con el déficit de oxígeno disuelto existente en las aguas de estos dos ecosistemas (Rodríguez *et al.*, 2006).

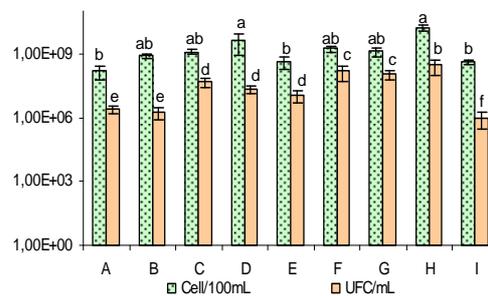


Figura 3.- Conteos de bacterias totales por epifluorescencia directa con DAPI (color verde con puntos negros) y bacterias totales cultivables mesófilas (color beige) en el río Almendares y afluentes. Las letras no comunes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba Post-hoc de Tukey HSD. Las barras representan la desviación estándar de la media.

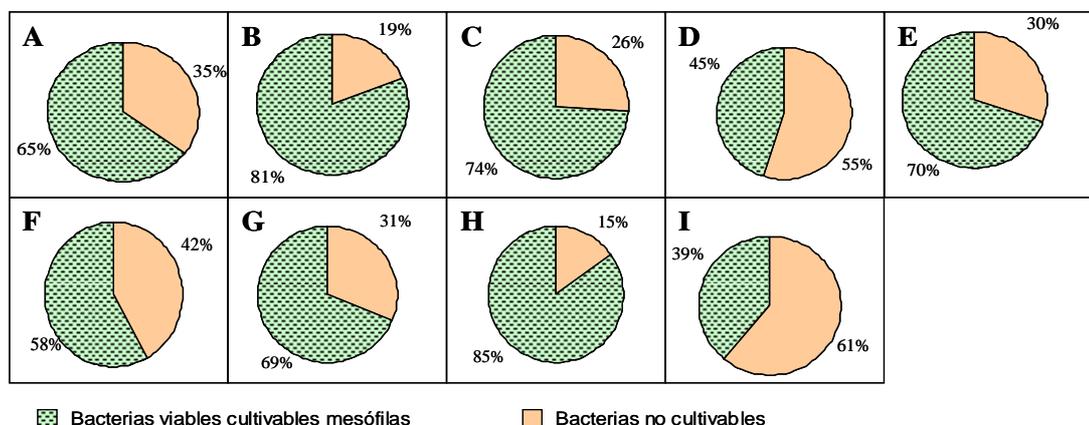


Figura 4. Porcentajes de recuperación de bacterias viables cultivables mesófilas en el río Almendares y afluentes. Las letras indican las estaciones de muestreo correspondientes.

Estas condiciones inducen a la utilización del nitrato como aceptor final de electrones por parte de algunos microorganismos, ocurriendo entonces su reducción desasimilativa, proceso que puede ser llevado a cabo por especies bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp. Este consumo de compuestos nitrogenados por las bacterias pudiera tener profundos efectos en el flujo de este elemento en la columna de agua (Atlas y Bartha, 1998; Allen *et al.*, 2009).

La reducción desasimilativa, a diferencia de la asimilativa, no se inhibe por altas concentraciones de amonio (Atlas y Bartha, 1998), y pudiera ser la causa de la prevalencia de amonio y nitritos sobre nitratos en los ecosistemas acuáticos en estudio.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Domínguez *et al.* (2003), en muestreos realizados en este mismo río; así como por los resultados obtenidos por Karavoltzos *et al.* (2008) en ríos y lagos de algunas regiones de Grecia, donde encontraron concentraciones medias de nitratos inferiores a las de amonio y nitrito en ríos contaminados por la actividad antrópica y natural, así como una alta concentración de bacterias coliformes fecales y totales, índice de contaminación por materia fecal y reducción desasimilativa de nitrato

La principal fuente de nitratos es la agricultura donde se utilizan como componentes de abonos y fertilizantes nitrogenados (Rimski-Korsakov *et al.*, 2002; Muñoz *et al.*, 2004), por lo que las concentraciones de nitratos obtenidas en nuestro estudio no provienen de estas fuentes pues los rangos de valores están dentro de los rangos establecidos para aguas dulces con fines recreativos

La presencia de nitritos en cualquier fuente de agua es indicador de vertimientos resientes de

materia fecal, aunque su origen puede ser industrial también y cabe señalar que este nutriente se encuentra en un estado intermedio de oxidación entre el amonio y el nitrato. Según Martins *et al.*, (2008), valores entre 0.1-0.9 mg/L pueden presentar problemas de toxicidad dependiendo del pH del medio, asimismo valores superiores a 1.0 mg/L son totalmente tóxicos y resultan un impedimento para el desarrollo de la vida piscícola y el establecimiento de un ecosistema fluvial en buenas condiciones. En aguas superficiales, bien oxigenadas, los niveles de nitritos no suelen superar los 0.1 mg/L.

Las altas concentraciones de fosfatos y compuestos nitrogenados presentes en estos ecosistemas, han provocado que, en diversas zonas de los mismos, exista una sobrepoblación de plantas acuáticas, principalmente de *Eichornia crassipes* (malangueta) y *Pistia stratioides* (culantrillo de agua), las cuales consumen gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua, dando características de hipoxia al agua, característica que se hace más crónica cuando estas plantas mueren, por la gran cantidad de sólidos en suspensión existente, que se traduce en altas concentraciones de materia orgánica (Pearl, 2006; Torbick *et al.*, 2008)

Aparejado a esto disminuye también la penetración de la luz al agua, y como el espacio superficial está ocupado por estas plantas se ve limitado el crecimiento y presencia del fitoplancton. Por ende se da un estado de desequilibrio ecológico en estos sistemas acuáticos, con aguas oscuras y malolientes y aptas para que se desarrollen principalmente organismos anaerobios facultativos como son algunas especies de bacterias mayoritariamente entéricas, dentro de las cuales hay un grupo representado por bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, donde se

encuentras las bacterias coliformes fecales y totales, importantes indicadores de contaminación microbiológica de las aguas, y que llegan a los cuerpos de agua a través de la descarga de materia fecal proveniente de los sistemas de desagües sanitarios (Willey *et al.*, 2008), de ahí que también existan altas concentraciones de amonio en las muestras obtenidas de estos ecosistemas contaminados.

Según lo planteado por Tsai *et al.* (1998), cuando los miembros de un mismo componente principal se encuentran agrupados su origen es el mismo, por lo que con este análisis se comprueba que las fuentes de contaminación por los nutrientes nitritos, amonio y fosfatos es la misma, en este caso de origen doméstico e industrial, y que la presencia de nitratos depende de otra fuente, de ahí las bajas concentraciones existentes de este último en dicho cuerpo de agua.

Según reportes de Yagi y Madsen (2009) y Eun-Young (2010), para la estimación de la carga bacteriana en un ecosistema acuático, los métodos más recomendados son el conteo por epifluorescencia directa y el cultivo en medio sólido, pues se tienen que comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas de conteo celular y así medir las pérdidas por viabilidad-cultivabilidad de los miembros de las comunidades bacterianas presentes en el medio, índice también de daño ecológico cuando estos valores son elevados.

Otros investigadores han planteado que en aguas superficiales la cantidad de bacterias va a ser más alta si el acuífero está afectado por las actividades antrópicas y estas provienen principalmente de contaminantes de origen albañal, como es el caso de estudios realizados por Sánchez *et al.* (2003) y Pang *et al.* (2005) se obtuvieron, en aguas superficiales contaminadas con efluentes de tanques sépticos, totales de bacterias viables mesófilas superiores a 10^4 UFC/mL, mientras que Yee y Fein (2002) reportaron valores en el orden de 10^{10} UFC/mL también en aguas superficiales contaminadas, mientras que las concentraciones de bacterias totales mesófilas reportadas por Balogun y Fagade (2010) estuvieron en el orden de 10^6 UFC/mL. Resultados similares fueron obtenidos por Dorador *et al.* (2007), quienes cuantificaron concentraciones de bacterias cultivables mesófilas entre 6.9×10^6 - 9.7×10^6 UFC/mL en un lago con un nivel medio de eutrofización.

La contaminación por agentes químicos en ecosistemas de agua dulce influye notablemente en la composición de la comunidad microbiana que habita en dichos ecosistemas (Aguilera *et al.*, 2006). Sin embargo, no existen muchos reportes que aborden la interacción entre los componentes abióticos y los componentes bióticos en los ecosistemas dulceacuícolas, debido a que gran parte de las especies bacterianas no son cultivables, y resulta difícil reproducir las condiciones naturales *in vitro* para los estudios fisiológicos, por lo que se requiere en muchos de los casos herramientas basadas en

estudios de Biología Molecular, que si bien son muy rápidos y sensibles, resultan extremadamente caras (Feris *et al.*, 2004; Sano *et al.*, 2006).

En su mayoría, los contaminantes presentes en el agua actúan como agentes selectivos para la microbiota por lo que promueven la eliminación de una gran cantidad de microorganismos, beneficiándose aquellos que logren adaptarse a las condiciones del medio (Lee *et al.*, 2009). Por esta razón, se utilizan con mayor frecuencia los métodos directos de enumeración sobre los métodos de cultivo; sin embargo, es necesario utilizar los métodos de cultivo, cuando se requiere aislar los microorganismos para su posterior estudio fisiológico, independientemente de que existan pérdidas por estos conceptos (Eun-Young *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

- Existe una gran carga contaminante por desechos de origen doméstico, demostrado por las altas concentraciones de nitritos, amonio y fosfatos obtenidos.
- La alta carga microbiana del río Almendares tiene una relación directa con las altas concentraciones de amonio y fosfatos.
- Se evidencia una pérdida en la biodiversidad bacteriana, pues existen diferencias significativas entre los conteos de bacterias totales y viables mesófilas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A.; Manrubia, S. C.; Gomez, F.; Rodriguez, N. Y Amils, R. (2006)-Eukaryotic Community Distribution and Its Relationship to Water Physicochemical Parameters in an Extreme Acidic Environment, Rio Tinto (Southwestern Spain). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5325-5330
- Allen, JD; Miller, EM; Schwark, E; Robbins, JL; Duscha, BD y Annex, BH. (2009)- Plasma nitrite response and arterial reactivity differentiate vascular health and performance. *Nitric Oxide.* **20**(4):231-7.
- APHA (2005)- Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater, 21st Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. www.standardmethods.org/.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. (1998)- Microbial Ecology: fundamentals and applications 4th Edition. Addison Wesley Longman.
- CENHICA (Centro Nacional de Hidrología y Calidad de las Aguas) (2003)- Informe técnico del estado de la calidad de las aguas en el Río Almendares. Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos.
- Domínguez, J., Borroto, J., Hernández, A. y Santiago, J.F. (2003)- Empleo de modelos matemáticos en la predicción de parámetros de calidad de agua

- del río Almendares. Contribución a la Educación y Protección Ambiental. Vol. 4. ISBN 959-7136-20-1.
- Dorador, C; Castillo, G; Witzel, K y Vila, I (2007) - Bacterial diversity in the sediments of a temperate artificial lake, Rapel reservoir. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 80(2):213-224
- Eun-Young, Seo; Tae-Seok, Ahn y Young-Gun, Zo (2010)- Agreement, Precision, and Accuracy of Epifluorescence Microscopy Methods for Enumeration of Total Bacterial Numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(6):1981-1991
- Feris KP, Ramsey PW, Frazar C, Rillig M, Moore JN, Gannon JE y Holben WE. (2004)- Seasonal Dynamics of Shallow-Hyporheic-Zone Microbial Community Structure along a Heavy-Metal Contamination Gradient. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4):2323-2331.
- Heydrich Pérez, Mayra; Rojas Hernández, Nidia; Rodríguez Cheang, Anar; Romeu Alvarez, Beatriz; Larrea Murrell, Jeny; Prats Reyes, Josué; Arpajón, Yunier; Lugo Moya, Daysi. (2009)- “La contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas de nuestra ciudad: un enfoque desde la universidad”. VII Taller Internacional “Universidad, Medio Ambiente, Energía y Desarrollo Sostenible”. En: Universidad 2010, evento provincial, sede Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Editorial Universitaria, 2009, ISBN 978-959-16-1137-7
- Johnson, R y Wichern, D (1992) - Applied Multivariate Statistical Analysis II. Inferences about multivariate means and linear models. Prentice-Hall, London, p-23.
- Karavoltzos, S.; Sakellari, A., Mihopoulos, N., Dassenakis, M. y Scoullou, M. (2008)-“Evaluation of the quality of drinking water in regions of Greece.” *Desalination*. 224(1-3):317-329
- Lee, C. W.; Bong, C. W. y Hii, Y. S. (2009)- Temporal Variation of Bacterial Respiration and Growth Efficiency in Tropical Coastal Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7594-7601
- Martins, Gilberto; Ribeiro, D. C.; Pacheco, Dina; Cruz, J. Virgílio; Cunha, R.; Gonçalves, V.; Nogueira, R. y Brito, A. G. (2008)- Prospective scenarios for water quality and ecological status in Lake Sete Cidades (Portugal) : the integration of mathematical modelling in decision processes. *Applied Geochemistry* 23(8):2171-2181. ISSN 0883-2927.
- Muñoz, H.; Armienta, M.; Vera, A y Cenicerros, N. (2004)- “Nitrato en el agua subterránea del Valle de Huamantla, Tlaxcala, México”. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 20(3):91-97
- Norma Cubana (NC) (1999)- Lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios. Primera Edición. Oficina Nacional de Normalización. Cuba.
- Paerl, Hans (2006) - Assessing and managing nutrient-enhanced eutrophication in estuarine and coastal waters: Interactive effects of human and climatic perturbations. *Ecological Engineering*, 26(1):40-54.
- Pang, L.; Close, M.E.; Flintoft, M.J. y P. van den Brink. (2005)- A Laboratory Study of Bacteria-Facilitated Cadmium Transport in Alluvial Gravel Aquifer Media. *J. Environ. Qual.* 34:237-247.
- Peduzzi, P. y Schiemer, F. (2004)- Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs. *Environmental Microbiology* 6(7):707.
- Polo, C (2000)- Estadística multivariable aplicada. Editorial EPOP, Terrassa, p-143
- Rimski-Korsakov, H; Torres Duggan, M. y Lavado, R. (2002)- “Influencia de la Fertilización y el Riego en la Lixiviación de Nitratos en un Suelo Arenoso”. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Mar del Plata, 11 al 14 de abril de 2002
- Roane TM y Pepper IL. (2000)- Microorganisms and Metal Pollution in Environmental Microbiology. Maier RM, Pepper IL, Gerba CP, editores. Academic Press.
- Rodríguez, A. J., Arpajón, Y., Castaño, Z., Marsán, R., Lugo, D., Roevros, N., Chou, L. Rojas, N. y Heydrich, M. (2006): Análisis de contaminantes inorgánicos tóxicos en las aguas del río Almendares, Cuba. IV Taller Internacional de Contaminación y Protección del Medio Ambiente. Campeche, México. ISBN.958-7136-43.0, vol.7.
- Rodríguez, A. J., Roevros, N., Arpajón, Y., Martínez, H., Marsán, R., Castaño, Z., Lugo, D., Rojas, N., Heydrich, M., Chou, L. (2008)- Assessment of heavy metals bioaccumulation in polluted rivers in Havana. *Revista Contribución a la Educación y la Protección Ambiental*, Volumen VIII. ISBN: 978-959-7136-56-9.
- Sánchez, M. J.; Delgado, G.; Ramos, I.; Fernández, R.; Lima, L. y De La Rosa, D. (2003)- Uso de bioindicadores para la determinación de la calidad de las aguas en el río Ariguanabo, San Antonio de los Baños, Cuba. *Contribución a la Educación y la Protección Ambiental*. Vol. 4. ISBN 959-7136-20-1 .
- Sano, D.; Myojo, K. y Omura, T. (2006)- Cloning of a heavy-metal-binding protein derived from activated-Sludge Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(9): 6377-6380
- Torbick, Nathan; Hu, Feng; Zhang, Jianying; Qi, Jianguo; Zhang, Hangjun y Becker, Brian (2008)- Mapping Chlorophyll-a Concentrations in West Lake, China using Landsat 7 ETM+. *Journal of Great Lakes Research*, 34(3):559-565.
- Tsai, L. J.; Yu, K. C.; Chang, J.S. y Ho, S. T. (1998)- Fractionation of heavy metals in sediments cores from the Ell-Ren river Taiwan. *Water science Technology* 37, 217-224.
- Wiley, JM; Sherwood, LM y Woolverton, CJ (2008). Enterobacteriaceae family. En: Prescott, Harley and Klein’s Microbiology. Seventh Edition. McGraw – Hill. New York pp. 643-742.

Yagi, J. M. y Madsen, E. L. (2009). Diversity, abundance, and consistency of microbial oxygenase expression and biodegradation in a shallow contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6478-6487

Yee, N. y Fein, J.B. (2002)- Does metal adsorption onto bacterial surfaces inhibit or enhance aqueous metal transport? Column and batch reactor experiments on Cd-Bacillus subtilis-quartz systems. *Chem. Geol.* 185:303-319.