

Determinación de coliformes en la evaluación microbiológica de aguas subterráneas en Matanzas (Cuba)

DETERMINATION OF COLIFORMS IN THE MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF GROUND WATERS IN MATANZAS, CUBA

Dainelys CANTERO BARROSO¹, Asela M. del PUERTO RODRÍGUEZ², Susana SUÁREZ TAMAYO², William BROWN VEGA², Anisleydis PÉREZ CASTILLO¹, Isis M. MARTÍNEZ PACHECO¹

¹ Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología / Laboratorio Microbiología Sanitaria / La Habana, Cuba / dainelys.cantero@inhem.sld.cu

² Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología / Centro de Epidemiología y Salud Ambiental Departamento Evaluación de Riesgo, La Habana, Cuba, delpuerto@infomed.sld.cu / susanast@infomed.sld.cu

Correspondencia: Dainelys Cantero Barroso. Avenida Infanta, No.1158, entre Llinas y Clavel. Centro Habana, Habana. Cuba. 10300. Correo-e: dainelys.cantero@inhem.sld.cu

RESUMEN

La ingestión de aguas contaminadas por microorganismos patógenos provenientes de fuentes no controladas, puede traer como consecuencia la aparición de enfermedades de transmisión hídrica como, fiebre tifoidea, cólera, parasitismos, hepatitis, gastroenteritis diversas y otras. Normalmente estos microbios llegan al agua por heces y otros restos orgánicos que producen las personas, animales infectados o portadores sanos, aguas residuales y los efluentes de alcantarillado. En este sentido, el número de bacterias coliformes presentes en el agua, es un buen índice para medir la salubridad de la misma. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la presencia de coliformes en aguas subterráneas de Matanzas y correlacionar resultados con una inspección técnico-sanitaria a las fuentes. Para lograr este fin se determinó coliformes totales y termotolerantes por dos metodologías analíticas; tubos múltiples y filtración de membrana; se realizó una inspección a las fuentes y a sus alrededores para detectar posibles riesgos de contaminación. El empleo de estos métodos permitió evaluar contaminación microbiana por *Escherichia coli* en el 80% de las aguas subterráneas estudiadas, previas a tratamiento. Por otra parte, existe correspondencia de estos resultados con el incumplimiento de los requerimientos establecidos en las normas cubanas, para el uso y explotación de fuentes agua subterráneas.

Palabras clave: Contaminación, aguas subterráneas, coliformes, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The ingestion of water contaminated by pathogenic microorganisms from uncontrolled sources can result in the appearance of water-borne diseases such as typhoid fever, cholera, parasitisms, hepatitis, various gastroenteritis and others. These microbes usually enter the water through feces and other organic debris produced by people, infected animals or healthy carriers, sewage and sewage effluents. In this sense, a good index to measure the healthiness of the waters is the number of coliform bacteria present in the water. The objective of this research was to evaluate the presence of coliforms in underground waters of Matanzas and to correlate results with a technical-sanitary inspection of the sources. To achieve this end, total and fecal coliforms were determined by two analytical methodologies; multiple tubes and membrane filtration and carried out an inspection of the sources with their

surroundings to detect possible risks of contamination. The use of these methods allowed the evaluation of microbial contamination by *Escherichia coli* in 80% of the groundwater studied, prior to treatment. On the other hand, there is correspondence of these results with the non-fulfillment of the requirements established in the Cuban norms, for the use and exploitation of underground water sources.

Keywords: Pollution, groundwater, coliforms, *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la evaluación microbiológica del agua es de vital importancia ya que, cada día son mayores las fuentes de contaminación, ya sean de manera natural o antropogénica y con ello el aumento de las enfermedades asociadas a la ingestión de agua insalubre. Por lo general las aguas subterráneas tienen menor riesgo de contaminación, por lo que deben ser más puras y seguras debido a su localización, pero no por esto se debe prestar menos atención porque una vez contaminadas se hace más difícil su recuperación. El ritmo de renovación del agua del subsuelo es muy lento, de ahí que tarde años (Cantero *et al.*, 2018; Romero, 2013).

Con el creciente desarrollo demográfico, la migración y los nuevos asentamientos, se hace cada día más necesario la explotación de nuevas fuentes de agua y en este sentido se utilizan las aguas subterráneas para el abastecimiento de la población en la ciudad de Matanzas.

A nivel mundial, el 80% de las enfermedades infecciosas y parasitarias gastrointestinales se asocian principalmente al consumo de agua insalubre. La falta de higiene y la carencia o el mal funcionamiento de los servicios sanitarios, son algunas de las razones por las que la enfermedad diarreica aguda (EDA) continúa representando un importante problema de salud en países en vía de desarrollo (Cantero *et al.*, 2018; Romero, 2013).

De ahí que el agua y los alimentos contaminados sean considerados como los principales vehículos involucrados en la transmisión de bacterias, virus y/o parásitos. Si estos no son tratados adecuadamente antes de su consumo, pueden provocar diferentes enfermedades como el cólera, fiebre tifoidea, disenterías, poliomielitis, hepatitis, salmonelosis, lesiones en la piel, entre otras (Del Puerto *et al.*, 2018; González, 2010). Las bacterias constituyen el grupo más importante de agentes patógenos contaminantes del agua. Normalmente estos microbios llegan al agua en las heces y otros restos orgánicos que producen las personas o animales infectados o portadores sanos, aguas residuales y efluentes de alcantarillado (Donis, 2008). En 1895 se propuso una prueba de *Escherichia coli* como índice de contaminación de origen fecal para determinar la potabilidad del agua de beber, marcando así el inicio del uso de los coliformes como indicadores patógenos (Donis, 2008), práctica que hasta hoy aplican muchos países para la calificación sanitaria, incluyendo Cuba.

La garantía de la salubridad microbiológica del abastecimiento de agua de beber, se basa en el uso de barreras múltiples aplicadas desde la cuenca de captación hasta su llegada al consumidor. Para evitar la contaminación del agua o reducirla a niveles que no sean perjudiciales para la salud, es necesario monitorearla cuidadosamente. La selección y aplicación correcta de una serie de acciones de tratamiento y la gestión de los sistemas de distribución (de redes de tuberías o de otro tipo) para mantener y proteger la calidad del agua tratada, es una tarea de las instituciones públicas. De ahí que la estrategia preferida sea un sistema de gestión que haga hincapié en la prevención o reducción de la entrada de patógenos a los acueductos y reduzca la dependencia en las operaciones de tratamiento para la eliminación de patógenos (Donis, 2008).

Según recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), un requisito indispensable para el agua de beber es la ausencia total de colonias de microorganismos coliformes por 100 mL de agua (OMS, 2011). La mayoría de las bacterias coliformes son del grupo *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* pertenecientes a la familia de enterobacterias. Estos microorganismos son bacilos gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados con propiedades bioquímicas de oxidasa negativa, capaces de crecer en presencia de sales biliares o agentes tensoactivos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas, y pueden presentar actividad enzimática β -galactosidasa (WHO, 2011; EPA, 2010; ISO, 2005). Propiedades y características que han facilitado el desarrollo de metodologías analíticas microbiológicas para su detección, identificación y cuantificación.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la contaminación microbiana por la presencia de coliformes en aguas subterráneas utilizadas para el consumo en la ciudad de Matanzas, a través de las técnicas de tubos múltiples y filtración por membrana, además correlacionar los resultados con las condiciones de riesgo presentes en las fuentes, que favorecen la contaminación, supervivencia y multiplicación de los microorganismos patógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon 5 fuentes de abasto de la ciudad de Matanzas: El Bello, El Conde, San Juan, Camilito y Canimar; estas fuentes fueron seleccionadas por los investigadores de los Centros de Higiene, Epidemio-

logía y Microbiología Provincial y Nacional (CPHEM e INHEM).

La toma de muestra se realizó en bolsas de nylon estériles con capacidad de 1000 mL, se analizaron antes de ser tratadas para así evaluar la seguridad de estas aguas naturales. En el punto de captación de la fuente se dejó bombear el agua durante 5 minutos antes de la recolección de la muestra, se trasladaron al laboratorio al momento de la realización del muestreo, en neveras para mantenerlas en ambiente fresco y protegido. Se respetaron las normas establecidas para la toma de muestra para examen bacteriológico (NC 827, 2012). Los resultados fueron asentados en los registros del CPHEM e INHEM, lugar donde se analizaron las muestras.

Determinación de coliformes por la técnica de tubos múltiples (NMP)

Se realizó una prueba presuntiva con caldo lactosado de doble concentración y tubo Durham (serie de cinco tubos) por duplicado. Se inocularon 10 mL de la muestra en cada uno de los cinco tubos. Fueron examinados después de 24 y 48 horas de incubación a 37 °C, buscando turbidez y producción de gas en el tubo Durham. Los tubos positivos se sometieron a la prueba confirmativa. El medio confirmativo utilizado para la enumeración de organismos coliformes fue el caldo bilis verde brillante que se incubó 48 horas a 37 °C, mientras que para los coliformes termotolerantes fue el caldo EC incubado en baño de agua termostataado a 44 °C durante 24 horas. El cálculo del Número Más Probable (NMP) de organismos coliformes y termotolerantes se realiza por medio de tablas estadísticas según el número de tubos positivos obtenidos en el ensayo (NC 1095, 2015; NC 828, 2012; WHO, 2011; EPA, 2010; ISO, 2005).

Determinación de coliformes por técnica de filtración por membrana (FM)

Se filtraron 100 mL de la muestra a través de un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro y con poro nominal de 0.22 µm con una cuadrícula impresa. Luego de la filtración se colocó con pinzas estériles el filtro de membrana en una placa Petri que contenía agar cromogénico para coliformes evitando la formación de burbujas. Las placas se incubaron a 36±2 °C durante 21±3 horas. Las colonias típicas de coliformes son de color rosado y las de *E. coli* de color azul oscuro o violeta. Se realiza un recuento de las colonias características y se expresa el resultado en UFC/100 mL. Para la confirmación de la presencia de coliformes se utilizó un test oxidasa. No es necesaria la confirmación de *E. coli* en este medio (ISO 9308-1, 2014).

Inspección a las fuentes en estudio y alrededores

En cada fuente se realizó una inspección técnico-sanitaria por un especialista autorizado del CPHEM de la provincia e investigadores del INHEM, para

determinar las condiciones de las fuentes de abasto de agua a muestrear, clasificar el peligro potencial de contaminación y las deficiencias técnicas de las fuentes en estudio, evaluando los siguientes criterios (NC 1021, 2014):

- Animales domésticos y vaquerías.
- Salideros de la red de distribución.
- Agua sucia estancada.
- Vivienda a menos de 20 metros.
- Presencia de cerca perimetral.
- Si el pozo estaba tapado con protección interna hasta tres metros de su interior.
- La existencia de zonas de cultivos en las cercanías.
- Viviendas aguas arriba con mala disposición de las excretas.
- Cercanías a almacén de fertilización u otras fuentes de contaminación.
- Falta de protección de la abertura superior con tapa de concreto.
- Elevación y declive del borde superior sobre el terreno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de *E. coli* en el agua es un fuerte indicador de una reciente contaminación con aguas residuales o con excretas de animales. Es importante tener en cuenta que *E. coli* y los residuos de animales y humanos pueden entrar en el agua de muchas maneras. Por ejemplo, durante la lluvia por arrastre o filtración de los suelos, fosas sépticas defectuosas, estiércol utilizado como fertilizante, criaderos de cerdos, de gallinas o ganado mayor y hasta la presencia de animales domésticos cerca de las fuentes (NC 1021, 2014; Rock y Rivera, 2014).

La Tabla 1 expone los resultados microbiológicos en materia de coliformes, obtenidos en cada una de las cinco fuentes estudiadas, las cuales abastecen la ciudad de Matanzas. Esta determinación se realizó por dos métodos, el tradicional de fermentación de la lactosa por tubos múltiples dado en número más probable (NMP) y el de filtración por membrana (FM) para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Cada muestra se montó por duplicado (R_1 y R_2).

Según la OMS y las normas cubanas e internacionales adoptadas en este estudio el valor referencial establecido como límite es de 0 UFC para coliformes totales y termotolerantes (fecales) por la determinación por filtración de membrana en 100 mL y por tubos múltiples de NMP menor de 1,8 en 100 mL (NC 1095, 2015; ISO 9308-1, 2014; NC 827, 2012; OMS, 2011).

Al realizar el análisis de la Tabla 1, y considerando las normativas adoptadas, la muestra de agua de la fuente Canimar se reporta como apta para el consumo humano. En cuanto a las 4 fuentes restantes, Bello, El Conde, San Juan y Camilito, no se encuentran valores admisibles para asumir criterios

Tabla 1. Valores obtenidos en la determinación de coliformes por las técnicas de tubos múltiples y filtración de membrana a las fuentes en estudio de Matanzas.

<i>Determinación</i>	<i>Bello</i>		<i>El Conde</i>		<i>San Juan</i>		<i>Canimar</i>		<i>Camilito</i>	
	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂
Coliformes totales (NMP/100mL)	9,2	9,2	5,1	5,1	>16,0	>16,0	<1,8	<1,8	>16,0	>16,0
Coliformes termotolerantes (NMP/100mL)	5,1	5,1	1,8	1,8	>16,0	>16,0	<1,8	<1,8	16,0	>16,0
Coliformes termotolerantes (UFC/100mL)	25	30	14	18	>300	>300	0	0	>300	>300

Cada muestra se realizó por duplicado (R₁ y R₂).

Tabla 2. Clasificación de peligro potencial a menos de 20 metros y deficiencias técnicas de las fuentes de aguas subterráneas en estudio, de la ciudad de Matanzas.

<i>Peligros</i>	<i>Conde</i>	<i>Bello</i>	<i>San Juan</i>	<i>Canimar</i>	<i>Camilito</i>
Salideros de la red de distribución				x	x
Animales domésticos y vaquerías	x	x	x		
Vivienda a menos de 20 metros	x	x	x		
Fuente sin cerca perimetral	x		x		
Viviendas aguas arribas con malas disposición de las excretas (letrinas)	x		x		
Cercano a otras fuentes de contaminación	x				
Elevación de declive del borde superior sobre el terreno	4 km	1,5 km	1,5 km	2 km	2 km

de potabilidad, siendo las fuentes de San Juan y Camilito las de mayor contaminación microbiana.

Para un correcto análisis e interpretación de la presente investigación es importante recordar que la toma de la muestra fue realizada antes de pasar por la planta de tratamiento, con el objetivo de evaluar el grado de contaminación del agua subterránea, la cual se supone que tiene condiciones de inocuidad natural por su localización. Por eso se asume que, aunque los resultados obtenidos en este ensayo no estén aptos para el consumo, después del tratamiento adecuado como está establecido en las regulaciones vigentes, la concentración de coliformes estará en los criterios de potabilidad (NC 827,2012; WHO, 2011; EPA,2010).

A través de muchos años se han realizado investigaciones similares, como por ejemplo en los años 1996, 1997, 1998 y 1999; Perdomo y cols. realizaron un estudio en aguas superficiales y subterráneas en el litoral sudoeste del Uruguay, donde se tomaron 50 muestras de aguas superficiales (ríos, arroyos y cañadas), y 355 de aguas subterráneas en pozos ubicados en zonas rurales del Uruguay. Se evaluó el nivel de nitrato y coliformes, resultando que el 87%

de los pozos evaluados estaban contaminados con coliformes totales y el 60% con coliformes fecales (Perdomo *et al.*, 2001). Un estudio similar fue realizado en pozos de granjas avícolas en Buenos Aires (Argentina), el cual reveló que el 54% de los pozos evaluados no estaban aptos para el consumo humano por la presencia de coliformes totales y un 16% por coliformes fecales (Rodríguez *et al.*, 2012).

La Tabla 2 muestra las diferencias detectadas en el terreno mediante una inspección que se realizó por los integrantes de esta investigación con el objetivo de poder identificar peligros de contaminación antropogénica, es decir, aquellas que son causadas por la acción de la mano del hombre.

El análisis de la tabla anterior demuestra la existencia de deficiencias sanitarias en los alrededores de las fuentes, lo cual representa un factor de riesgo de contaminación. Los resultados obtenidos en la determinación de coliformes se corresponden con las deficiencias técnicas y sanitarias detectadas en el terreno, en la inspección que se les realizó a las fuentes en estudio el día del muestreo. El estudio de riesgo asociado mostró que los resultados de la determinación

de coliformes se corresponden en gran medida con el incumplimiento de los requerimientos establecidos en las normas cubanas, para el uso y explotación de fuentes de captación de agua subterráneas de consumo (NC 1021, 2014). Las Fuentes San Juan y Camilito presenta valores elevados de coliformes totales y termotolerantes, siendo la fuente San Juan la de mayor violación de lo establecido para las unidades de abastecimiento de agua potable, con potencial de contaminación por tener animales domésticos y vaquerías cercanas, vivienda a menos de 20 metros sin cerca perimetral y con mala disposición de las excretas (letrinas a menos de 10 metros). Sin embargo, la fuente de abasto Camilito no presenta ninguno de estos peligros potencial de contaminación por lo que se deben evaluar en próximos estudios a profundidad el posible origen de la contaminación microbiana. Para las fuentes Conde y Bello también hay factores que condicionan la contaminación debido a la presencia de viviendas, animales y vaquerías cercanas y el Conde con letrinas de viviendas cercanas.

Silvia Rodríguez y cols. (2012), en Argentina, realizaron un estudio en aguas superficiales y subterráneas para determinar coliformes y su relación con las concentraciones de nitratos. La determinación de coliformes se realizó por la misma técnica empleada en este trabajo. Todas las fuentes de agua presentaron contaminación con bacterias coliformes, con valores que excedieron el valor crítico establecido por el CAA (Código Alimentario Argentino) para aguas de consumo humano. La mayor cantidad de coliformes totales detectadas, corresponden a las muestras de agua de pozo y de laguna. La contaminación con coliformes en las fuentes de agua subterráneas analizadas según los autores pueden ser atribuidas a sistemas sépticos inapropiados, mala construcción o ubicación de los pozos, cría de animales (porcinos, aves de corral, vacunos y caballos), lugares de acumulación de residuos cercanos y actividad agrícola (Rodríguez *et al.*, 2012).

Por otra parte, existen una serie de condiciones que favorecen la supervivencia y multiplicación de los organismos patógenos en el agua subterránea, entre los que se encuentran, la disponibilidad de nutrientes porque cuando existe materia orgánica, los organismos abundan y si no, estos mueren (Herrero *et al.*, 1997). El agua subterránea de la región estudiada tiene una disponibilidad de nutrientes medida en términos de concentraciones de NO_3 y K, con valores promedio de 16,91 y 1.52 mg/L, respectivamente.

La temperatura es un factor importante para la supervivencia, ya que temperaturas de 37°C da como resultado una rápida multiplicación microbiana (Rodríguez *et al.*, 2012). La temperatura promedio de las aguas subterráneas muestreadas fue de 24.46°C, valor admisible para la NC: 827: 2012, sin embargo, este valor es inferior al reportado en la bibliografía como idóneo para favorecer esta condición microbiana.

Por otra parte, valores altos y bajos de pH son desfavorables a la mayoría de las bacterias y virus patógenos; por lo que parámetros entre 6.4 y 7.6, usualmente dan como resultado largos períodos de supervivencia (Herrero *et al.*, 1997). Los valores del pH en el agua subterránea del área de estudio, fluctuaron de 6.9 a 7.1, resultados que favorecen esta condición. Este comportamiento del pH es debido a la naturaleza del subsuelo conformado por rocas calizas (Herrero *et al.*, 1997).

Ciertas bacterias como los coliformes termotolerantes (fecales) los cuales son aerobios, requieren oxígeno para sobrevivir, y en los casos en los que el ambiente en que viven se contamina, aquellas bacterias que no requieren oxígeno, las anaerobias se multiplican y eliminan a las aerobias.

De ahí que llame la atención que las fuentes estudiadas poseen características que favorecen la supervivencia y multiplicación de organismos patógenos, tales como la disponibilidad de nutrientes en términos de nitrógeno y potasio; disponibilidad de oxígeno disuelto, con un valor promedio de 2.4 mg/L, valores de temperatura en un rango de 23.5 °C a 28.0 °C y valores de pH entre 6.9 y 7.1, condiciones que aunadas con las deficiencias técnicas sanitarias detectadas en las diferentes fuentes permiten que la contaminación bacteriológica sea permanente y constituya un riesgo para la salud de la población si se exponen al consumo de estas aguas sin previo tratamiento.

CONCLUSIONES

La determinación de coliformes totales y fecales por estos dos métodos tradicionales permitió caracterizar la contaminación microbiológica de las aguas subterráneas de la ciudad de Matanzas, encontrándose que cuatro de las fuentes no están aptas para el consumo sin previo tratamiento. Estos resultados tienen estrecha relación con un grupo de deficiencias técnicas y sanitarias detectadas en las cercanías de las fuentes.

Otros parámetros medidos exponen la existencia de factores condicionantes de la supervivencia y multiplicación de los microorganismos patógenos. A tono con estos resultados, es recomendable que las autoridades gubernamentales y sanitarias trabajen de conjunto para minimizar los riesgos de contaminación en las cercanías de las fuentes de captación y mitigar la posible exposición a agentes microbianos de la población abastecidos por estas fuentes.

BIBLIOGRAFÍA

Cantero Barroso D, Pérez García L, Pérez Castillo A, Del Puerto Rodríguez AM. Evaluación ecotóxica de aguas subterráneas utilizadas para el consumo humano en Cuba. *Hig. Sanid. Ambient.* 2018; 18 (1): 1597-1603.

- Del Puerto Rodríguez A. M, Suárez Tamayo S, Solano Suárez R, Cuellar Luna L, Maldonado Cantillo G, Cantero Barroso D. Factores ambientales y contaminación de fuentes de abasto de agua por nitratos en una zona rural. *Hig. Sanid. Ambient.* 2018; 18 (1): 1579-1587.
- Donis JA. Importancia de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua potable del municipio Nueva Santa Rosa. Guatemala. 2008.
- Environmental Protection Agency. Estándares del Reglamento Nacional Primario del agua potable. EPA: 2010. Disponible en: www.epa.gov/safewater/agua/estándares.htm/
- González M. Calidad físico-química del agua en fuentes subterráneas para consumo de la población en tiempo de sequía. Municipio Las Tunas, Tesis de Diplomado de Toxicología Ambiental, Microbiología y Química Sanitaria. INHEM. 2010.
- Herrero, M.A.; Birhman, E.; Villar, E.; Flores, M.; Carbó, L.; Sardi, G. Y Silvestre, A. Aspectos químicos y microbiológicos del agua subterránea en granjas de producción avícola. In: Congreso Internacional sobre Aguas, Libro de Resúmenes. Ed. Universidad de Buenos Aires: III-41. Buenos Aires, Argentina. 1997.
- ISO 8199. Switzerland. International Standard. Water quality. General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture. 2005.
- ISO 9308-1. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. 2014.
- NC 1021: 2014. Higiene Comunal - Fuentes de Abastecimiento de agua - Calidad y protección Sanitaria. 1ª ed. 2014.
- NC 1095: 2015 Microbiología Del Agua - Detección y enumeración de coliformes - Técnica del Número Más Probable (NMP). 2015.
- NC 827: 2012. Agua Potable. Requisitos Sanitarios. 2ª ed. 2012.
- Organización Mundial de la Salud. Enfermedades relacionadas con el agua. OMS: 2011. Disponible en: <http://www.who.int/watersanitationhealth/diseases/es/>
- Perdomo CH., Casanova ON., Cinganda VS. Contaminación de aguas subterráneas con nitratos y coliformes en el litoral sur-oeste de Uruguay. *Agrociencia.* 2001. Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/agrociencia/VOL5/1/P10-22.pdf>
- Rock CH y Rivera B. La calidad del agua, *E. coli* y su salud. College of Agriculture and Lifes Sciences. Arizona. 2014.
- Rodrigues S, Guana L, Martinez G, Acevedo H, Romeri C. Relación de nitratos sobre la contaminación de bacterias en el agua. 2012. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792012000200111
- Romero M, del Puerto A, Suárez S, Cuellar Luna L, Maldonado G. Programa Ramal Calidad de Vida. Nitratos y nitritos en fuentes de aguas subterráneas y su impacto sobre la salud en tres provincias del occidente del país. 2011-2013. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. 2013.
- World Health Organization. Guidelines for Drinking water quality. 4ª ed. Ginebra. WHO: 2011.