

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA HETEROTRÓFICA CULTIVABLE EN EL RÍO ALMENDARES

Jeny A. Larrea Murrell¹, Marcia M. Rojas Badía¹, Daysi Lugo Moya¹, Mayra Heydrich Pérez¹

¹ Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 No. 455 entre J e I Vedado. La Habana. Cuba. Teléfono: 8329241, Fax: 8321321, E-mail: adina@fbio.uh.cu, marcia@fbio.uh.cu, mayra@fbio.uh.cu.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudiaron tres estaciones de muestreo del río Almendares durante un año con los objetivos de comparar la frecuencia de aislamiento de los géneros identificados y caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana heterotrófica cultivable del río Almendares. Para el aislamiento, se sembraron en Agar Nutriente, diluciones seriadas de las muestras de agua y se incubaron a 30°C durante 72h. Las colonias representativas de diferente morfología se aislaron y purificaron en Agar Nutriente. Se obtuvieron en total 60 aislados que se identificaron mediante el sistema API como pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*. El género *Arthrobacter* se aisló con mayor frecuencia en la estación de muestreo Paila, en comparación con el resto de las estaciones del río Almendares, mientras que los géneros *Acinetobacter* y *Bacillus* fueron aislados con mayor frecuencia en la estación Río Cristal. Para la caracterización de la estructura de la comunidad bacteriana se utilizaron los índices de riqueza de especies (S^*), de Simpson (L') y de Shannon-Wiener (H'). Mediante los índices de Simpson y Shannon-Wiener se detectaron diferencias significativas entre la diversidad bacteriana de las tres estaciones de muestreo, siendo Puente de Hierro la de menor diversidad y no se detectaron diferencias significativas al analizar el índice de riqueza de especies. Los resultados obtenidos demostraron la influencia de la contaminación en la diversidad bacteriana, la cual se ve notablemente afectada corriente abajo en el río Almendares.

Palabras clave: diversidad bacteriana, Río Almendares, índices de diversidad, contaminación

1. INTRODUCCIÓN

Los ríos son la mayor fuente de agua potable, la cual es utilizada para el consumo, la industria y la agricultura; por lo que es necesaria su conservación, sin embargo la contaminación de estos ecosistemas dulceacuícolas, constituye una problemática a nivel mundial que se presenta debido al constante vertimiento de aguas residuales de origen doméstico e industrial, que contribuyen al deterioro del ambiente. En este sentido los microorganismos juegan un importante papel en la biodegradación de contaminantes derivados de la actividad humana y contribuyen a la autopurificación natural de los ecosistemas. Las comunidades microbianas en ecosistemas dulceacuícolas de áreas tropicales han sido estudiadas, sin embargo el conocimiento actual de las mismas, aún es limitado (Nishimura y Nagata, 2007; Newton *et al.*, 2011).

La mayoría de las bacterias encontradas en los ambientes acuáticos son de origen telúrico y son llevadas al agua debido a los procesos de arrastre y drenaje del suelo (de Sousa y Silva-Sousa, 2001; Larrea *et al.*, 2009). Sin embargo, toda masa de agua tiene su comunidad bacteriana, aunque estas pueden variar grandemente en grupos presentes y en el número de células (de Sousa y Silva-Sousa, 2001; Sousa, 1996). Entre las bacterias más encontradas en los ecosistemas acuáticos se encuentran las especies de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Vibrio* y *Alcaligenes* (de Sousa y Silva-Sousa, 2001; Obire *et al.*, 2005).

Globalmente, existe un incremento en el interés de monitorear y restaurar los ecosistemas de agua dulce, con el objetivo de mejorar su valor ecológico, recreacional, cultural, educacional y económico (Lear *et al.*, 2009). Un monitoreo exitoso requiere de la habilidad de describir cambios ecológicos significativos utilizando indicadores cuantitativos (Ryder y Millar, 2005; Lear *et al.*, 2009). Frecuentemente, una serie de parámetros se toman en consideración para determinar la calidad de un ecosistema acuático, los que incluyen las concentraciones de oxígeno disuelto, nitrógeno, fósforo, la turbidez, la conductividad, el pH, entre otros. Sin embargo, las comunidades bacterianas son indicadores que responden rápidamente a los cambios ambientales como consecuencia de su rápido ciclo de vida (Paerl y Pinckney, 1996; Lear *et al.*, 2008) y pueden ser utilizadas para monitorear la variabilidad espacial y temporal presente naturalmente en sistemas de agua dulce; así como cambios persistentes en los ecosistemas debido a la contaminación derivada de la actividad humana o al cambio climático global (Lear *et al.*, 2008).

En los ecosistemas acuáticos es importante evaluar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana, debido a que la misma constituye la base de los ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, nitrógeno y además juegan un importante papel en la biosfera (Azam, 1998; Wetzel, 2001; Sekiguchi *et al.*, 2002; Briée *et al.*, 2007). Por otra parte, la comunidad bacteriana interviene en la descontaminación de aguas residuales liberadas al ambiente a partir actividades urbanas, industriales y agrícolas, lo cual contribuye a mantener la calidad del agua.

Numerosos índices matemáticos que describen la riqueza de especies dentro de la comunidad se han utilizado para describir las poblaciones. Entre estos índices se encuentran la riqueza de especies (S^*), y los índices de Simpson (L') y Shannon-Wiener (H'), los cuales se utilizan para determinar la estructura de una comunidad y evaluar la diversidad.

Actualmente en Cuba existe un marcado interés por el rescate y la preservación de los ecosistemas acuáticos para el mejoramiento de la calidad ambiental. Por esta razón, se han realizado numerosos estudios en el río Almendares (Prats, 2006; Romeu, 2007; Chiroles *et al.*, 2007) para evaluar la calidad de sus aguas y tomar medidas que permitan proteger la salud de la población que habita en sus márgenes, así como la de los visitantes que realizan actividades en sus áreas aledañas.

Sin embargo, no se ha estudiado lo suficiente la comunidad bacteriana de este ecosistema, lo que permitiría tener una idea del impacto que ha sufrido el río Almendares como consecuencia de la contaminación derivada de la actividad antropogénica.

Teniendo en cuenta estos aspectos, los objetivos de este trabajo son comparar la frecuencia de aislamiento de los géneros identificados en las diferentes estaciones de muestreo del río Almendares y caracterizar la estructura de la comunidad bacteriana heterotrófica cultivable de este río.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Toma de muestra

Los muestreos se efectuaron en los meses de Febrero, Abril, Junio y Octubre del año 2009 en el río Almendares. Las muestras se colectaron a partir de tres estaciones de muestreo previamente establecidas (Prats, 2006). En la Tabla 1 se relacionan las estaciones de muestreo evaluadas en este estudio, así como la localización de las mismas. Las colectas se realizaron en horas de la mañana y se trasladaron al laboratorio en frascos plásticos estériles de 2L que se colocaron en una nevera refrigerada. Las mismas se procesaron en un período de tiempo menor a las 4 horas.

Tabla 1. Estaciones de muestreo río Almendares

Estaciones de muestreo	Descripción	Latitud	Longitud
A	Río Cristal	23°01'59.99"	82°24'03.77"
P	Paila	23°03'23.94"	82°24'09.75"
I	Puente de Hierro	23°07'36.55"	82°24'40.22"

2.2. Aislamiento e identificación de los aislados

Para el aislamiento a partir de las muestras de aguas, se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en solución salina (0.8%) y se sembraron por diseminación con espátula de Drigalski en Agar Nutriente las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en el caso de las estaciones Paila y Puente de Hierro y 10^{-3} y 10^{-4} en el caso de la estación Río Cristal. En todos los casos se sembraron 0.1 mL de las diluciones y se realizaron 3 repeticiones por dilución en cada estación de muestreo. Las placas fueron incubadas por 48-72 h a 30°C .

Después de la incubación, las colonias representativas de diferente morfología presentes en cada placa fueron aisladas y resembradas en nuevas placas de Agar Nutriente hasta su purificación. Los aislados purificados fueron conservados en glicerol al 20%. Los cultivos puros de cada bacteria aislada fueron identificados mediante el sistema API y el software asociado a la identificación (Biomérieux, Lyon, France).

Para el análisis de la frecuencia de aislamiento de los géneros identificados en las estaciones de muestreo, se verificó la distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos, a través de las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Cochran-Bartlett respectivamente. Posteriormente se aplicó la prueba de comparación múltiple de proporciones, utilizando el paquete estadístico Tonystat (Sigarroa, 1985).

2.3. Determinación de los índices de diversidad

Para determinar la estructura de la comunidad bacteriana a partir de las estaciones de muestreo estudiadas en el río Almendares se calcularon los índices de riqueza de especie (S^*), de Simpson (L') y de Shannon-Wiener (H'). El índice de riqueza de especie representa el número de especies en una muestra y los índices de Simpson y de Shannon fueron calculados según las fórmulas:

$$(L') = \frac{\sum_{i=1}^s n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \approx \sum_{i=1}^s p_i^2$$

$$: (H') = \sum_{i=1}^s (p_i)(\log_e p_i)$$

(n_i = número de especie i en la muestra, s = número de especies en la muestra, p_i = proporción de la especie i en la muestra, N = número de individuos en la muestra).

Las diferencias en S^* , L' y H' fueron evaluadas utilizando el método de Solow (Solow, 1993; Edwards *et al.*, 2001). Para los cálculos de S^* , L' y H' se utilizó un macro-programa de Excel (Análisis de Monte Carlo) que permite aplicar el método de Solow.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de la frecuencia de aislamiento de los géneros identificados en las diferentes estaciones de muestreo.

En el río Almendares se obtuvo un total de 60 aislados que se identificaron como pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*. Estos géneros se aíslan con frecuencia de las fuentes de agua, aunque puede variar su concentración en función de las condiciones ambientales existentes en estas fuentes (Obire *et al.*, 2005).

En la Figura 1 se muestra la comparación entre la frecuencia de aislamiento de los géneros bacterianos obtenidos en las tres estaciones del río Almendares. Como se puede apreciar en la estación de muestreo Paila, el género *Arthrobacter* fue aislado con mayor frecuencia en comparación con la frecuencia de aislamiento de este género en las estaciones Río Cristal y Puente de Hierro, encontrándose diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). La estación Paila, constituye un afluente del río Almendares, el cual presenta serios problemas de contaminación, donde se han detectado concentraciones de coliformes fecales (indicadores bacterianos de contaminación fecal) de 1.4×10^6 UFC.100mL⁻¹ (Prats, 2006). En este afluente se vierten directamente los residuales y las aguas albañales procedentes del Laboratorio Farmacéutico Reynaldo Gutiérrez, lo que contribuye a la contaminación de este ecosistema. Este afluente se caracteriza por presentar aguas oscuras y fétidas con bajas concentraciones de oxígeno y altas concentraciones de amonio (Rodríguez *et al.*, 2006); condiciones que favorecen el crecimiento de algunas especies del género *Arthrobacter* (Eschbach *et al.*, 2003).

Por otra parte los géneros *Acinetobacter* y *Bacillus* se aislaron con mayor frecuencia en la estación Río Cristal comparado con las estaciones Paila y Puente de Hierro ($p < 0.01$). Estos géneros pueden encontrarse en agua dulce, aguas residuales y suelos y además, pueden ser aislados con gran frecuencia en ecosistemas acuáticos eutrofizados (Edwards *et al.*, 2001) como es el caso de la estación de muestreo Río Cristal, la cual presenta abundante crecimiento de plantas acuáticas, como es el caso de la lechuga de agua (*Pistia stratioides*). Estas plantas consumen gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua, contribuyendo a la hipoxia del agua, característica que se hace más crónica cuando las 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; Arpajón *et al.*, 2011).

En sentido general los géneros más aislados en el río Almendares fueron *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Acinetobacter* lo cual está en correspondencia con lo planteado por Edwards *et al.* (2001), quienes aislaron fundamentalmente los géneros *Bacillus* y *Acinetobacter* en un lago eutrofizado en Reino Unido. Por otra parte, el género *Arthrobacter*, puede ser aislado en ambientes acuáticos donde existen altas concentraciones de amonio (Eschbach *et al.*, 2003), situación que se presenta fundamentalmente en la estación Paila.

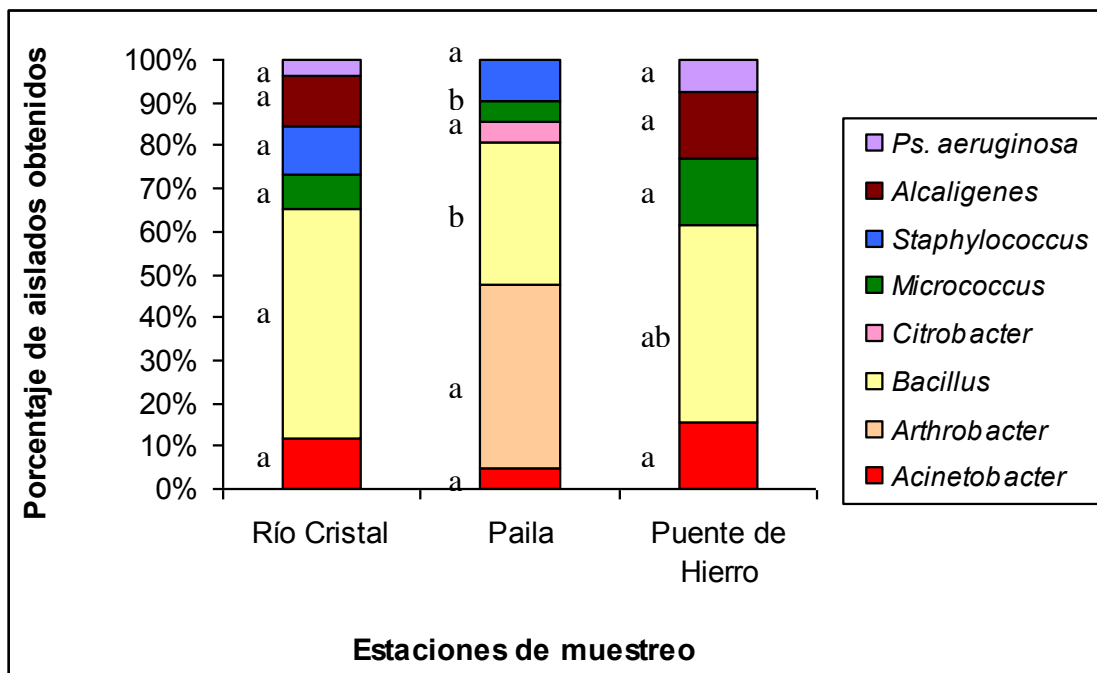


Figura 1. Comparación entre la frecuencia de aislamiento de los géneros bacterianos obtenidos en las estaciones del río Almendares. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ($p < 0.001$) entre la frecuencia de aislamiento del mismo género en las diferentes estaciones de muestreo.

3.2. Estructura de la comunidad bacteriana en el río Almendares

Para la determinación de la diversidad de la comunidad bacteriana heterotrófica cultivable en las tres estaciones del río Almendares, se compararon sus estructuras, utilizando los índices S^* , L' y H' , calculados para las muestras tomadas en las diferentes estaciones.

Para analizar si existían diferencias significativas entre las estaciones de muestreo, los parámetros S^* , L' y H' se compararon utilizando el método de Solow. Esta prueba permite conocer si las diferencias entre los parámetros analizados para dos muestras son producto de la aleatorización del muestreo (permitiendo diferencias en el tamaño de las muestras) o son el resultado de diferencias reales en la distribución bacteriana, aislada a partir de las diferentes estaciones del río Almendares.

Respecto al índice de riqueza de especies, no se obtuvieron diferencias significativas entre las tres estaciones de muestreo analizadas, con valores de 6, 6 y 5 para Río Cristal, Paila y Puente de Hierro respectivamente (Figura 2a); sin embargo, se puede observar que los índices de Simpson (L') y Shannon-Wiener (H') disminuyen de corriente arriba (estación Río Cristal) a corriente abajo (estación Puente de Hierro), lo que significa que la probabilidad de que dos aislados tomados al azar resulten ser la misma especie (expresado a través del índice de Simpson) y la diversidad bacteriana (expresada a través del índice de Shannon) disminuyen en esta dirección.

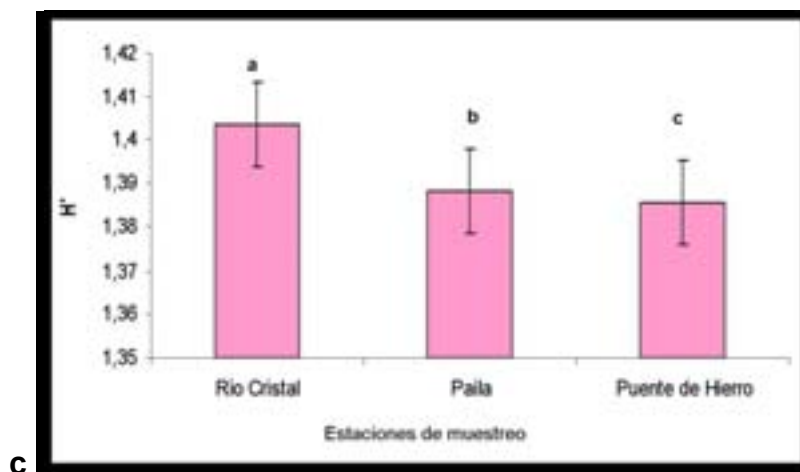
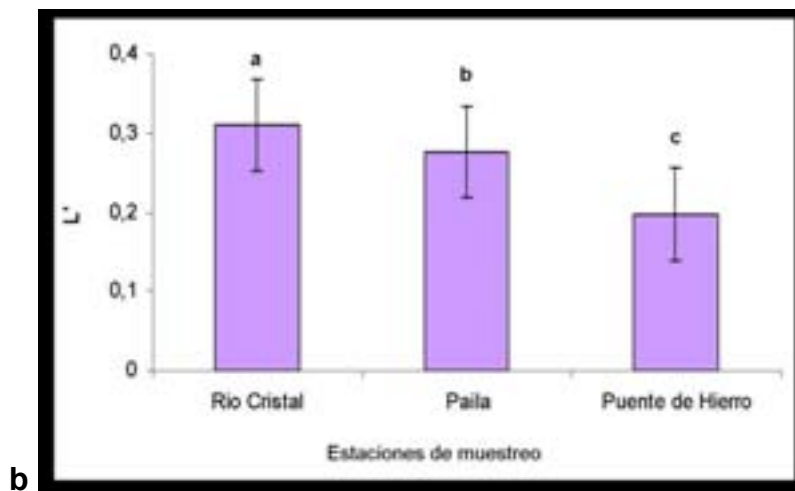
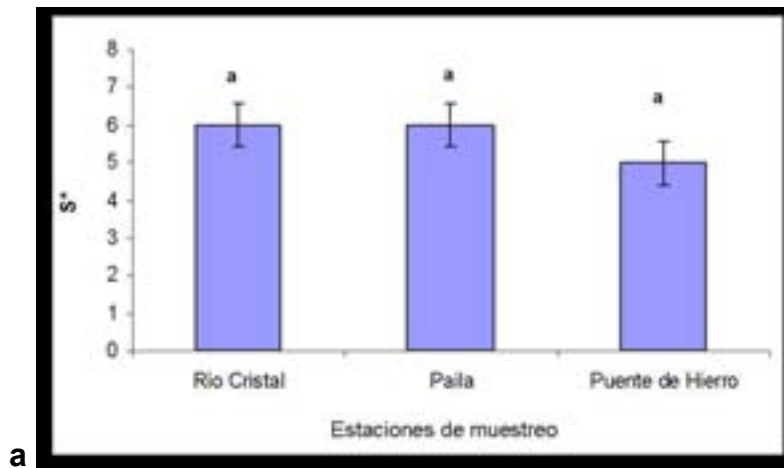


Figura 2. Comportamiento de los índices de diversidad S^* (a), L' (b) y H' (c) en las estaciones del río Almendares. Letras no comunes indican diferencias significativas ($p < 0.05$). Los valores de los índices de diversidad fueron estimados re-muestreando 10 000 veces a partir de las muestras originales y tomando la media de los datos calculados. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 repeticiones.

En la estación Río Cristal se obtuvieron 26 aislados y existe un predominio del género *Bacillus* con respecto a los demás, sin embargo, en la estación Paila donde se obtienen un total de 21 aislados, se puede observar el predominio de los géneros *Arthrobacter* y *Bacillus*. En cambio en la estación Puente de Hierro sólo se obtuvieron 14 aislados, predominando el género *Bacillus*. Sekiguchi *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares en un estudio realizado en el río Changjiang durante dos años, en el cual la diversidad bacteriana determinada por el índice de Shannon, disminuía gradualmente de corriente arriba a corriente abajo. Este resultado indicó que de corriente arriba a corriente abajo la variedad de las especies bacterianas disminuía y cepas bacterianas específicas comenzaban a dominar, situación muy similar a la encontrada en el río Almendares, donde el género *Bacillus*, predomina en las tres estaciones analizadas.

En nuestro estudio la estación Río Cristal muestra los mayores valores de diversidad con índices de Simpson y Shannon de 0.311 y 1.403 respectivamente, siendo esta la estación menos contaminada. Con respecto al índice de Shannon, Edwards *et al.* (2001) obtuvieron valores de 1.96-2.32 en un lago eutroficado de Reino Unido, resultados superiores a los nuestros. Río Cristal es una estación eutroficada debido a las altas concentraciones de fosfatos (2 mg.L^{-1}) que se encuentran por encima de lo establecido por las normas según Rodríguez *et al.* (2006), lo cual ha favorecido el crecimiento excesivo de plantas acuáticas como es el caso de *Eichhornia crassipes* y *Pistia stratioides*. El hecho de que nuestros resultados sean inferiores a los de los autores anteriores puede deberse a la excesiva acumulación de materia orgánica a partir de las plantas acuáticas presentes en Río Cristal (Figura 3), las cuales limitan la difusión del oxígeno, lo que influye en la composición de la comunidad bacteriana heterotrófica.



Figura 3. Plantas acuáticas en la estación de Río Cristal

Con respecto a la estación Paila, en ella se encontraron valores de índice de Simpson y Shannon inferiores a los de Río Cristal, apreciándose la influencia del aumento de la contaminación sobre la diversidad. En estudios previos, Prats (2006), Rodríguez *et al.* (2006) y Romeu (2007) plantearon que el Paila era la estación más contaminada del río Almendares, con altos valores de contaminación fecal y metales pesados y bajas concentraciones de oxígeno disuelto; debido al constante vertimiento de aguas

residuales de origen doméstico e industrial proveniente de asentamientos poblacionales y del Laboratorio Farmacéutico “Reynaldo Gutiérrez”, que afectan la calidad de esta agua.

En la estación Puente de Hierro fueron obtenidos los menores valores de índices de Simpson y Shannon ($L' = 0.198$ y $H' = 1.386$) (Figuras 2b y 2c). La estación Puente de Hierro se encuentra localizada en el estuario del Río Almendares, con valores de salinidad de $2\ 439\ \text{mg.L}^{-1}$ según Chiroles *et al.* (2007). Se ha informado que la tolerancia a la salinidad en aguas salobres ejerce una selección sobre la flora y la fauna, siendo estas más pobres en términos de especies, en los estuarios comparado con los ríos y océanos (Sekiguchi *et al.*, 2002). Este hecho podría constituir una de las causas de la baja diversidad bacteriana heterotrófica.

Simek *et al.* (2001) sugirieron que las diferencias en la comunidad bacteriana en el río Ter en España, eran el resultado de complejas interacciones asociadas con numerosos factores, tales como variaciones en las condiciones hidrológicas y nutrientes, disponibilidad de sustrato y la predación. Rodríguez *et al.* (2006) determinaron las concentraciones de nitratos en la estación de Puente de Hierro, las cuales fueron de $1.7\ \text{mg.L}^{-1}$. Estas concentraciones se encuentran por debajo de los valores de referencia ($10\ \text{mg.L}^{-1}$) (Frits, 1990), lo cual constituye otro hecho que justifica la baja diversidad bacteriana en Puente de Hierro. Otros factores que pueden contribuir a los resultados obtenidos en esta estación son la concentración de oxígeno disuelto y las altas concentraciones de zinc, cadmio y plomo, las cuales fueron de $11.51\ \mu\text{g.L}^{-1}$, $0.61\ \mu\text{g.L}^{-1}$ y $65.56\ \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Estos parámetros muestran la pérdida de la calidad de estas aguas, debido a la contaminación, factor que según Atlas y Bartha (1998) contribuye a la pérdida de diversidad.

4. CONCLUSIONES

- La composición de la comunidad bacteriana fue diferente en las estaciones estudiadas, aislándose con mayor frecuencia el género *Arthrobacter* en el Paila y los géneros *Bacillus* y *Acinetobacter* en la estación Río Cristal.
- No se encontraron diferencias significativas con respecto a la riqueza de especies, sin embargo los índices de Simpson y Shannon disminuyen de corriente arriba (Río Cristal) a corriente abajo (Puente de Hierro), evidenciándose una disminución de la diversidad bacteriana.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Atlas, R.M. y Bartha, R. (1998): *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. 4ta Edición. Addison Wesley Longman.
- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280:694–696.
- Briée, C., Moreira, D., López-García, P. (2007). Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology* 158, 213-227.
- Chiroles, S., González, M. I., Torres, Rojas, T., Valdés, Águila, M., Domínguez, I. (2007): Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Hig. Sanid. Ambient.* 7: 222-227.
- de Sousa, J.A y Silva-Sousa, A.T. (2001): Bacterial community associated with fish and water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brasil. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 44 (4): 373-381.
- Edwards, M.L., Lilley, A.K., Timms-Wilson, T.H., Thompson, I.P. and Cooper, I. (2001): Characterisation of the culturable heterotrophic bacterial community in a small eutrophic lake (Priest Pot). *FEMS Microbiology Ecology* 35: 295-304.
- Eschbach, M., Möbitz, H., Rompf, A. and Jahn, D. (2003): Members of the genus *Arthrobacter* grow anaerobically using nitrate ammonification and fermentative processes: anaerobic adaptation of aerobic bacteria abundant in soil. *FEMS Microbiology Letters* 223 : 227-230.
- Frits, V.L. (1990): *The Water Encyclopedia*. Lewis Publishers.
- Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Prapagdee, B., Mikami, E. and Naso, M. (2001): Bacterial Community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *Journal of Health Science* 47 (4): 353-361.
- Larrea, J. Rojas, M.M., Romeu, B. Lugo, D., Rojas, N. Y Heydrich, M. (2009): Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico “las Terrazas”. *Higiene y Sanidad Ambiental* 9: 492-504.
- Lear, G. Boothroyd, I.K.G., Turner, S.J., Roberts, K and Lewis, G.D. (2009): A comparison of bacteria and benthic invertebrates as indicators of ecological health in stream. *Freshwater Biology*, 54: 1532-1543
- Lear, G., Anderson, M.J., Smith, J.P., Boxen, K. and Lewis, G.D. (2008): Spatial and temporal heterogeneity of bacterial communities in Stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiol Ecol.*, 65: 463-473.
- Obire, O., Tamuno, D.C., Wemedo, S.A. (2005): Bacteriological water quality of Elechi Creek in Port Harcourt, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 9(1): 79-84.

- Paerl, H. and Pinckney, J. (1996): A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb. Ecol.* 31: 225-248.
- Prats, J., Larrea, J., García-Armisen, T., Lugo, D., Rodríguez, A., Servais, P., Rojas, N. and Heydrich, M. (2006): Potential risk due to the microbial pollution in the Almendares river, Havana Cuba. *Contribution to the Education and Environmental Protection*. Vol. 7. ISBN 959-7136-43-0
- Rodríguez, A.J., Arpajón, Y., Castaño, Z., Marsán, R., Lugo, D., Røevros, N., C., Chou, L., Rojas, N. y Heydrich, M. (2006): Análisis de contaminantes inorgánicos tóxicos en las aguas del río Almendares, Cuba. file:///F:/ENMA/PDF%20CONYMA%202006/Data/HTML/Pag...20Análisis%20de%20contaminantes%20inorganicos.htm (1 of 11)05/02/2008 10:01:07
- Romeu, B. (2007): Caracterización higiénico-sanitaria de las aguas del río Almendares en la zona del Gran Parque Metropolitano de La Habana. Tesis para optar por el título académico de Master en Microbiología. Mención Microbiología Clínica. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Ryder, D.S. and Miller, W. (2005): Setting goals and measuring success: linking patterns and processes in stream restoration. *Hydrobiologia*, 552: 147-158.
- Sekiguchi, H., Watanabe, M., Nakahara, T., Xu, B. y Uchiyama, H. (2002): Succession of Bacterial Community Structure along the Changjiang River Determined by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Library Analysis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol 68 (10), p. 5142–5150
- Sigarrosa A. (1985): *Biometría y Diseño Experimental*. La Habana. Pueblo y Educación, 734 p.
- Simek, K., Armengol, J., Comerme, M., García, J.C., Kojecka, P., Nedoma, J. y Hejzlar, J. (2001): Changes in the epilimnetic bacterial community composition, production, and protest-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. *Microb. Ecol.* 42: 359-371.
- Solow, A.R. (1993) A simple test for change in community structure. *J. Anim. Ecol.* 62, 191-193.
- Sousa, J.A. (1996): Estudo epidemiológico em duas fruticulturas do norte de Portugal e caracterização dos agentes bacterianos e virais de maior impacto em aquacultura. PhD Thesis, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Wetzel, R. G. 2001. Bacterioplankton, p. 489–525. *In* R. G. Wetzel (ed.), *Limnology. Lake and river ecosystems*, 3rd ed. Academic Press, New York, N.Y
- Nishimura, Y. and Nagata, T. (2007). Alphaproteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquat. Microb. Ecol.* 48:231-240.

- Newton, R.J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K.D. and Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1): 14–49.
- Paerl, H. (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.
- Torbick, N.; 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.
- Arpajón, Y., Romeu, B., Rodríguez, A., Heydrich, M., Rojas, N. y Lugo, D. (2011). Impacto de los nutrientes inorgánicos sobre la comunidad bacteriana del río Almendares (Cuba) *Hig. Sanid. Ambient.* 11: 731-738