



CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Artículo original de investigación

Diversidad estructural y funcional de las comunidades bacterianas de dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba

Jeny A. Larrea Murrell ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-6067-633>
Marcia M. Rojas Badía ¹ <https://orcid.org/0000-0003-4958-1873>
Beatriz Romeu Álvarez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-4265-290X>
Mayra Heydrich Pérez ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1849-1333>
Ivette García Soto ¹ <https://orcid.org/0000-0001-7010-3628>
Katherin Izquierdo Fiallo ¹ <https://orcid.org/0000-0003-1487-174X>
Daysi Lugo Moya ¹ <https://orcid.org/0000-0002-8401-1430>
Nidia M. Rojas Hernández ¹ <https://orcid.org/0000-0001-8906-6927>

¹ Facultad de Biología, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: adina@fbio.uh.cu

RESUMEN

Introducción: Las comunidades bacterianas pueden ser utilizadas como indicadores del estado ecológico de los ecosistemas dulceacuícolas en la evaluación de la calidad de las aguas. El objetivo es determinar la relación entre la estructura y función de las comunidades bacterianas y la calidad química y microbiológica de los ríos Almendares y San Juan. **Métodos:** Se tomaron muestras de 3 estaciones de muestreo de ambos ríos en el periodo 2013-2017. Se determinó la estructura y composición de las comunidades bacterianas mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y pirosecuenciación 454. Se determinó la actividad proteolítica extracelular y la actividad fosfatasa ácida en las aguas y se aislaron y caracterizaron bacterias a partir de las aguas y rizosedimentos de plantas acuáticas del río Almendares. **Resultados:** La estructura y composición de las comunidades bacterianas permitió establecer diferencias significativas entre ambos ríos. Se demostró que la contaminación fecal, las altas concentraciones de oxígeno disuelto y bajas concentraciones de nutrientes contribuyen a la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas de ambos ríos. La mayor actividad proteolítica se detectó en el río San Juan y la mayor actividad fosfatasa ácida en el río Almendares. Las bacterias pertenecientes al género *bacillus* sp. predominaron en el río Almendares y produjeron proteasas, amilasas, fosfatasas, esterases, aminopeptidasas y glucanasas. **Conclusiones:** Se demostró la factibilidad del uso de las comunidades bacterianas como indicadores del estado ecológico de los ecosistemas dulceacuícolas para evaluar el impacto de la contaminación química y microbiológica sobre el medio ambiente y la salud humana.

Palabras clave: calidad de agua; ríos; electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante; pirosecuenciación 454; enzimas extracelulares

Revisores ^a

Oscar Días Rizo
Instituto de tecnologías aplicadas,
Universidad de La Habana.
La Habana, Cuba

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

^a N. del E: En este apartado figuran los nombres de los árbitros que accedieron a revelar su identidad, como expresión de apertura progresiva del proceso de revisión por pares. No aparecen aquellos que optaron por el anonimato.

Structure and functional diversity of bacterial communities of two freshwater ecosystems in western Cuba

ABSTRACT

Introduction: Bacterial communities can be used as indicators of the ecological status of freshwater ecosystems in the evaluation of water quality. The objective of this research was to determine the relationship between the structure and function of bacterial communities and the chemical and microbiological quality of the Almendares and San Juan rivers. **Methods:** They were taken samples from three sampling stations of both rivers in the period 2014-2017. It was determined the structure and composition of the bacterial communities by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 454 pyrosequencing. It was determined the extracellular proteolytic activity and acid phosphatase activity in the waters of both ecosystems and they were isolated and characterized bacteria from the waters and rhizosediments of aquatic plants of the Almendares River. **Results:** The structure and composition of the bacterial communities allowed to establish significant differences between the two rivers. It was shown that faecal contamination is the factor that most contributes to the variability of the bacterial communities composition of the Almendares River. On the other hand, the high concentrations of dissolved oxygen and low concentrations of nutrients are the factors that most influence the bacterial communities of the San Juan River. The highest proteolytic activity was detected in the San Juan River compared to the Almendares River. Nevertheless, it was detected the highest acid phosphatase activity in Almendares River. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* sp. predominated in the Amendares River and produced proteases, amylases, phosphatases, esterases, aminopeptidases and glucanases. **Conclusions:** It was demonstrated the feasibility of using bacterial communities as indicators of the ecological status of freshwater ecosystems to evaluate the impact of chemical and microbiological contamination on the environment and human health.

Keywords: water quality; rivers; denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); 454 pyrosequencing; extracellular enzymes

INTRODUCCIÓN

Los ríos son importantes fuentes de agua dulce y un recurso imprescindible para el desarrollo de diferentes actividades sociales y económicas; sin embargo, el incremento poblacional y la contaminación producida por el ser humano, las actividades industriales y agrícolas, constituyen importantes factores para el rápido deterioro de los ecosistemas dulceacuícolas. La determinación de la diversidad microbiana debe realizarse como primer paso en los procesos de recuperación ambiental, para entender el papel de los microorganismos como responsables de los ciclos biogeoquímicos y como sensores de cambios ambientales, considerando al mismo tiempo su valor como fuente abundante de recursos biotecnológicos. En la actualidad el estudio de la biodiversidad constituye uno de los temas más importantes en la investigación científica en Cuba, ya que permite conocer microorganismos con potencialidades en la producción de compuestos con interés ecológico, biotecnológico e industrial. Estudios de

caracterización de la diversidad bacteriana en Cuba, solo se han realizado en aguas oceánicas y costeras; sin embargo, no existen antecedentes de este tipo de análisis en ecosistemas dulceacuícolas. El objetivo de esta investigación fue determinar la relación entre la estructura y función de las comunidades bacterianas y la calidad química y microbiológica en 2 ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba.

MÉTODOS

Evaluación de la calidad microbiológica y química de las aguas de los ríos Almendares y San Juan

Se tomaron muestras puntuales de 3 estaciones de muestreo del río Almendares (Río Cristal, Paila y Puente de Hierro) y de 3 estaciones del río San Juan (presa El Palmar, presa San Juan y Baños del San Juan) durante el periodo 2013-2017. Estas estaciones se seleccionaron de acuerdo a caracterizaciones previas realizadas en ambos ríos.^(1,2) La recolección de las

muestras, así como la determinación de la temperatura, pH, conductividad eléctrica, sólidos totales disueltos (STD), oxígeno disuelto, nutrientes ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$, $\text{NO}_3^-\text{-N}$), demanda química de oxígeno (DQO), indicadores bacterianos (*Escherichia coli*, enterococos y coliformes termotolerantes) se realizaron según Larrea *et al.* ⁽³⁾

Análisis de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante y pirosecuenciación 454

La extracción del ADN a partir de las muestras de agua y posterior análisis de las comunidades bacterianas mediante la electroforesis en gel con gradiente desnaturante Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE por sus siglas en inglés). ⁽³⁾ La pirosecuenciación 454 del gen ADNr 16S se empleó como técnica complementaria de la DGGE para el análisis de las comunidades bacterianas de ambos ríos. Se utilizaron los cebadores 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 519R (5'-GWNTTACNGCGGCKGCTG-3') para abarcar las regiones variables V1-V3 del gen ADNr 16S del dominio bacteria. Esta técnica se realizó en el Laboratorio de Investigación y Ensayo (RTL) de Lubbock, Texas, Estados Unidos. Las secuencias generadas en este estudio se pueden descargar a partir de los archivos de lectura de secuencias del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information), con el número de acceso SRP063983.

Determinación de la actividad proteolítica extracelular y la actividad fosfatasa ácida extracelular en las aguas de los ríos Almendares y San Juan

En todas las estaciones de muestreo de los ríos Almendares y San Juan se determinó la actividad proteolítica y la actividad fosfatasa ácida a partir de las muestras de agua. La metodología empleada se describe en Izquierdo *et al.* ⁽⁴⁾ y Larrea *et al.* ⁽⁵⁾

Caracterización micromorfológica-tintorial, determinación de la producción de enzimas extracelulares y caracterización molecular de los aislados del río Almendares

Para el aislamiento de bacterias productoras de enzimas extracelulares se colectaron muestras de la columna de agua y de plantas procedentes de las 3 estaciones del río Almendares. La metodología empleada para la caracterización micromorfológica-tintorial, la determinación de la producción de enzimas extracelulares y la caracterización molecular de los aislados se describe en Larrea *et al.* ⁽⁶⁾

Análisis biométricos

Para investigar la relación entre la composición de la comunidad bacteriana y los indicadores físico-químicos e indicadores bacterianos de contaminación fecal en ambos ríos, se realizó el análisis de redundancia (RDA) utilizando el paquete estadístico CANOCO, versión 4.5 para windows. El RDA se seleccionó después de que se comprobó mediante el análisis de correspondencia sin tendencia (DCA) que los datos de la comunidad bacteriana exhibían una respuesta lineal a los gradientes de las variables físico-químicas y de contaminación fecal. Se realizó una selección a priori de los indicadores físico-químicos e indicadores bacterianos significativos ($p < 0,05$) mediante la prueba de permutación de Monte Carlo (999 permutaciones no restringidas) bajo el modelo reducido. Las variables correlacionadas se eliminaron antes de realizar el RDA. Para representar los gráficos triplots entre las estaciones de muestreo, las variables físico-químicas e indicadores de contaminación y las clases bacterianas se utilizó el programa CANODRAW incluido en el paquete estadístico CANOCO 4.5. ⁽⁷⁾

Para evaluar la correlación entre los indicadores físico-químicos, los indicadores de contaminación fecal, la actividad proteolítica, la actividad fosfatasa ácida y la concentración de bacterias proteolíticas se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r , método paramétrico) para los casos en los cuales se cumplieron con las premisas. En los que no se cumplieron, se realizó la prueba no paramétrica de correlación lineal de Spearman. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa statistica versión 8.0. ⁽⁸⁾

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturante y pirosecuenciación 454

A partir de la DGGE obtenida con las muestras del río Almendares, se cortaron 10 bandas, las cuales se reamplificaron y se secuenciaron. La identificación de las bandas secuenciadas evidenció el predominio de la clase *Gammaproteobacteria*, siendo identificadas 5 bandas como pertenecientes a esta clase. Además, se identificaron 2 bandas pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*, 1 banda relacionada con la clase *Flavobacteria*, 1 banda relacionada con el filo *actinobacteria* y 1 banda relacionada con el filo *Chloroflexi*. ⁽³⁾ En el caso del río San Juan se seleccionaron 12 bandas. Se obtuvieron 6 bandas relacionadas con la clase *Actinobacteria*, 5 bandas relacionadas con la clase *Betaproteobacteria* y 1 banda relacionada con la clase *Bacilli*. ⁽³⁾

Mediante la pirosecuenciación 454 se obtuvieron en las estaciones del río Almendares un total de 35 872 secuencias y se apreció que los filos *Proteobacteria* (52,7 %), *Actinobacteria* (24,6 %), *Bacteroidetes* (17,5 %) y *Firmicutes* (3,96 %) eran los más abundantes en el periodo de estudio con más de 500 secuencias (figura 1A).

Dentro del filo *Proteobacteria* las clases *Gammaproteobacteria* (76 %), *Betaproteobacteria* (15 %) y *Alphaproteobacteria* (9 %) fueron las más frecuentes. En el río San Juan se obtuvieron un total de 47 305 secuencias y se apreció que los filos *Actinobacteria* (39,1 %), *Proteobacteria* (30,9 %), *Cyanobacteria* (18,9 %), *Bacteroidetes* (5,1 %), *Firmicutes* (3,6 %) y *Deinococcus-Thermus* (1,1 %) eran los más abundantes en el periodo de estudio. Dentro del filo *Proteobacteria* las clases *Alphaproteobacteria* (63 %), *Betaproteobacteria* (22 %) y *Gammaproteobacteria* (15 %) fueron las más frecuentes (figura 1B).

Tomando en consideración la clasificación taxonómica hasta el nivel de familia, se identificaron en el río Almendares un total de 73 familias pertenecientes a 44 órdenes. Particularmente dentro de la clase *Gammaproteobacteria*, se identificaron con mayor frecuencia las familias: *Moraxellaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Methylococcaceae* y *Enterobacteriaceae* (figura 2). En cambio, en el río San Juan se identificaron un total de 60 familias pertenecientes a 38 órdenes, y específicamente dentro de la clase *Alphaproteobacteria*, se identificaron con mayor frecuencia las familias: *Sphingomonadaceae* y *Caulobacteraceae* (figura 2).

De las familias identificadas en ambos ríos 43 constituyen nuevos informes para ecosistemas dulceacuícolas del Caribe. Por primera vez para el Caribe se identifican los miembros de las comunidades bacterianas de ecosistemas dulceacuí-

colas con diferente grado de contaminación hasta el nivel de familia, de los cuales 43 familias constituyen nuevos informes para ecosistemas dulceacuícolas de esta área, lo que representa un aporte al conocimiento de la diversidad bacteriana. Además, por primera vez se analiza la comunidad bacteriana de un ecosistema dulceacuícola en una reserva de biosfera como Sierra del Rosario, lo cual contribuye al incremento del valor biológico de esta área protegida.

Determinación de la relación entre la estructura de las comunidades bacterianas y la calidad química y microbiológica en los ecosistemas dulceacuícolas Almendares y San Juan

En el río Almendares, las altas concentraciones de amonio, fosfatos, enterococos, *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes fueron los factores que más influyeron en la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas en el río Almendares ($p < 0,01$); todos estos indicadores muestran un mismo fenómeno: la contaminación fecal.

De acuerdo al análisis de redundancia, el porcentaje de la varianza acumulada explicada por la relación especies-variables ambientales indicó que el primer y segundo ejes canónicos describen el 79,5 % de la varianza. Las correlaciones especies-ambiente de cada eje fueron de 0,991 y 0,981 para el primer y segundo eje respectivamente (figura 3).

Las clases bacterianas se distribuyeron de acuerdo a las características significativas de las estaciones de muestreo del río Almendares. Las clases *Thermoleophilia*, *Cyanobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Cytophagia*, *Spirochaetia*, *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Acidimicrobia*, *Opitutae* y bacterias no cultivables pertenecientes a los filos *Pro-*

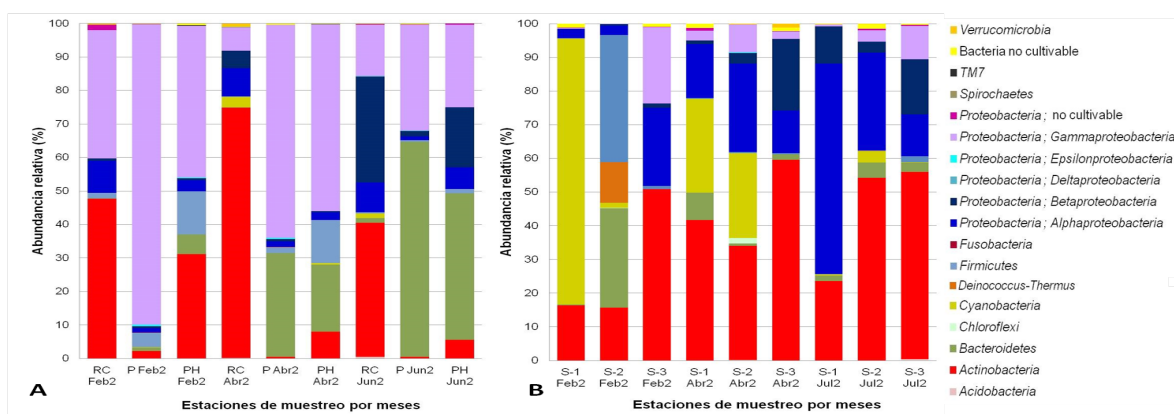


Fig. 1. Distribución porcentual taxonómica de los diferentes filo/clase en las estaciones de muestreo de los ríos Almendares (A) y San Juan (B). Estaciones del río Almendares: RC, Río Cristal; P, Paila; PH, Puente de Hierro. Meses: Feb2, febrero 2013; Abr2, abril 2013; Jun2, junio 2013. Estaciones del río San Juan: S-1, presa El Palmar; S-2, presa San Juan; S-3, Baños del San Juan. Meses: Feb2, febrero 2013; Abr2, abril 2013; Jul2, julio 2013.

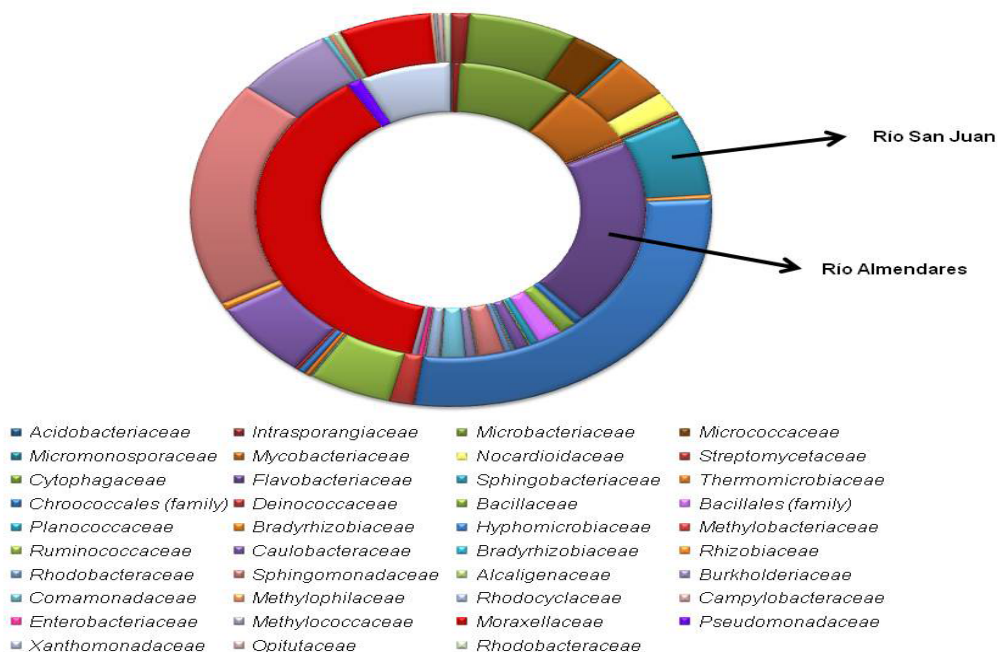


Fig. 2. Distribución porcentual taxonómica de las diferentes familias identificadas en los ríos Almendares y San Juan.

teobacteria y Bacteroidetes, se asociaron a la estación Río Cristal caracterizada por las bajas concentraciones de amonio, DQO y nitratos. Las clases Bacilli, TM7 y Thermomicrobia se asociaron a la estación Puente de Hierro, caracterizada por altas concentraciones de nitrato y DQO. Las clases Gammaproteobacteria y Flavobacteria se asociaron a las estaciones Paila y Puente de Hierro, ambas caracterizadas por las

altas concentraciones de amonio. Las clases Fusobacteria, Coriobacteria, Epsilonproteobacteria, Negativicutes, Clostridia, Bacteroidia, bacterias no cultivables pertenecientes al filo Firmicutes y bacterias no cultivables dentro del dominio bacteria se asociaron a la estación Paila, caracterizada por las altas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de oxígeno disuelto.

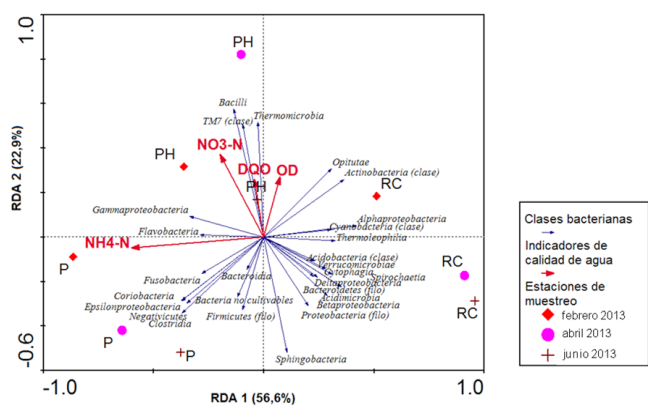


Fig. 3. Triplot del análisis de redundancia (RDA) de la composición de la comunidad bacteriana de las estaciones de muestreo del río Almendares en el año 2013 utilizando indicadores físico-químicos. Las flechas rojas señalan la dirección en la que se incrementa el valor de cada indicador de calidad de agua. Las flechas azules representan las diferentes clases bacterianas. La longitud de las flechas indica el grado de correlación con el eje representado. La posición de las estaciones de muestreo relativa a las flechas se interpreta por la proyección de los símbolos sobre las flechas, e indica el grado de influencia del indicador de calidad de agua representado por la flecha roja sobre la composición de la comunidad bacteriana de la estación de muestreo. NO3-N (nitratos), NH4-N (amonio), OD (oxígeno disuelto), DQO (demanda química de oxígeno), RC, Río Cristal; P, Paila; PH, Puente de Hierro.

En el río San Juan, la concentración de oxígeno disuelto y las bajas concentraciones de nutrientes fueron los factores que más influyeron en la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas ($p < 0,05$).⁽³⁾ De acuerdo al análisis de redundancia, el porcentaje de la varianza acumulada explicada por la relación especies-variables ambientales indicó que el primer y segundo ejes canónicos describen el 70,6 % de la varianza. Las correlaciones especies-ambiente de cada eje fueron de 0,986 y 0,989 para el primer y segundo eje respectivamente (figura 4).

Las clases bacterianas también se distribuyeron de acuerdo a las características significativas de las estaciones de muestreo. Las clases *Flavobacteria*, *Opitutae*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidimicrobia*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Clostridia*, *Cytophagia* y las bacterias no cultivables pertenecientes al filo *Bacteroidetes* se asociaron a la estación Baños del San Juan caracterizada por un pH ligeramente alcalino y altas concentraciones de fosfato y altas concentraciones de STD. Las clases *Epsilonproteobacteria*, *Thermomicrobia*, *Thermoleophila*, *Deinococci*, *Bacilli*, *Sphingobacteria*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria* y las bacterias no cultivables pertenecientes a los filios *Acidobac-*

teria y *Verrucomicrobia* se asociaron a la estación presa San Juan, caracterizada por bajas concentraciones de DQO, altas concentraciones de oxígeno disuelto, bajas concentraciones de fosfato y pH ligeramente ácido. En el caso particular de la clase *Cyanobacteria*, también se asoció a la estación presa El Palmar caracterizada por bajas concentraciones de fosfatos, altas concentraciones de oxígeno disuelto y pH ligeramente ácido. Por primera vez en el Caribe se realiza el análisis de la relación entre factores ambientales naturales y antrópicos y la composición de las comunidades bacterianas.

Determinación de la actividad proteolítica y la actividad fosfatasa ácida en los ríos Almendares y San Juan y su relación con indicadores físico-químicos y microbiológicos

La mayor actividad proteolítica se detectó en el río San Juan en comparación al río Almendares lo que indica que en ecosistemas más contaminados la actividad enzimática proteolítica disminuye respecto a otro sistema menos impactado. Además, se evidenció la variación temporal anual de la actividad proteolítica en ambos ríos.⁽⁴⁾ La actividad enzimática proteolítica no siempre se corresponde con la presencia de

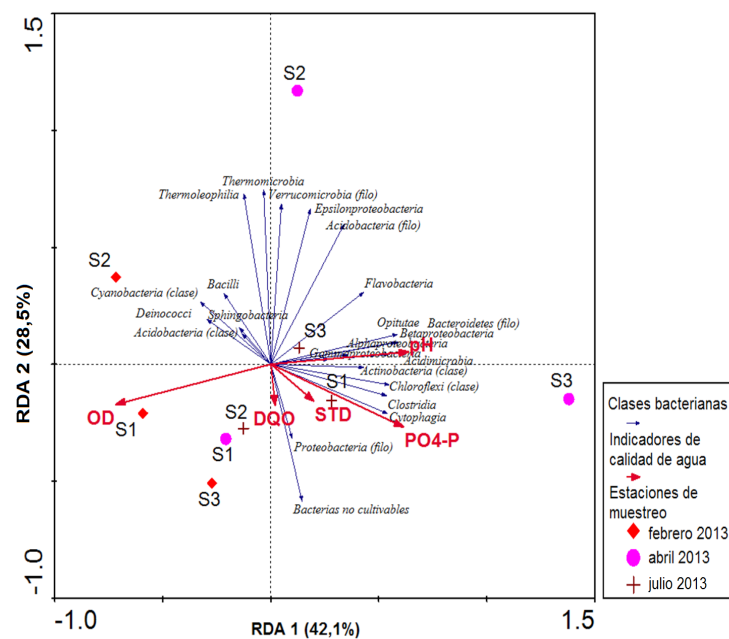


Fig. 4. Triplot del análisis de redundancia (RDA) de la composición de la comunidad bacteriana de las estaciones de muestreo del río San Juan en el año 2013 utilizando indicadores físico-químicos. Las flechas rojas señalan la dirección en la que se incrementa el valor de cada indicador de calidad de agua. Las flechas azules representan las diferentes clases bacterianas. La longitud de las flechas indica el grado de correlación con el eje representado. La posición de las estaciones de muestreo relativa a las flechas se interpreta por la proyección de los símbolos sobre las flechas, e indica el grado de influencia del indicador de calidad de agua representado por la flecha roja sobre la composición de la comunidad bacteriana de la estación de muestreo. OD, oxígeno disuelto; PO4-P, fosfatos; DQO, demanda química de oxígeno; STD, sólidos totales disueltos; S-1, presa El Palmar; S-2, presa San Juan; S-3, Baños del San Juan.

bacterias proteolíticas, lo que indica que su actividad depende de diversos factores bióticos y abióticos como la composición de la comunidad microbiana, la disponibilidad de materia orgánica disuelta y la concentración de nutrientes. En los análisis de correlación en el río San Juan se obtuvo relación entre la actividad proteolítica, la concentración de bacterias productoras de proteasas y los indicadores físico-químicos de la calidad del agua. Esto indica que la actividad proteolítica está relacionada con contaminantes de origen natural procedentes de la descomposición de las hojas, los escurrimientos o los productos de la actividad fitoplanctónica. ⁽⁴⁾ En cambio, en el río Almendares no se observó esta relación, lo que indica que la actividad proteolítica se encuentra afectada por otros contaminantes vertidos a sus aguas no evaluados en este estudio ⁽⁴⁾. Además, se obtuvo que la mayoría de los aislados bacterianos proteolíticos en ambos ríos eran bacilos grampositivos formadores de endosporas, lo cual demuestra el predominio de especies pertenecientes a la clase *Bacilli*. ^(10,11)

La mayor actividad fosfatasa ácida se detectó en el río Almendares en comparación al río San Juan, lo cual puede deberse a los altos valores de materia orgánica encontrada en el río Almendres y el pH ligeramente alcalino observado en el río San Juan. ⁽⁵⁾ Con anterioridad, en sistemas dulceacuícolas con un mayor impacto antropogénico se han detectado incrementos de la actividad enzimática fosfatasa. Además, se evidenció la variación espacio-temporal de la actividad fosfatasa ácida en ambos ríos siendo significativas las diferencias entre el periodo lluvioso y el periodo poco lluvioso en el río San Juan.

En los análisis de correlación en el río San Juan se obtuvo una relación positiva entre la actividad fosfatasa ácida, la clorofila a, la concentración de *Escherichia coli* y la concentración de heterótrofos totales y una relación negativa con el pH. En cambio, en el río Almendares se observó una relación positiva con la demanda química de oxígeno y la concentración de nitratos. ⁽⁵⁾ Estos resultados muestran que, en los ecosistemas de agua dulce con pH neutro o ligeramente alcalino, la actividad potencial de la fosfatasa ácida puede estar presente y también juega un papel importante en el reciclaje de materia orgánica en estos entornos. Además, en sistemas de agua dulce contaminados, esta actividad está más influenciada por factores contaminantes (ej. concentración de nitratos, materia orgánica) en comparación con sistemas menos impactados donde depende de las condiciones naturales (ej. precipitación, pH, actividad del fitoplancton) por lo que la actividad de la fosfatasa ácida en la columna de agua puede ser un buen indicador del impacto antropogénico sobre el funcionamiento microbiano en ecosistemas de agua dulce.

Por primera vez en Cuba se relaciona la actividad enzimática proteolítica y la actividad fosfatasa ácida con la calidad de agua de ecosistemas dulceacuícolas, lo que evidencia la factibilidad del uso de las actividades enzimáticas extracelulares como indicadores del estado ecológico de estos sistemas.

Caracterización micromorfológica-tintorial, determinación de la producción de enzimas extracelulares y caracterización molecular de los aislados del río Almendares

En el presente estudio, los bacilos grampositivos formadores de endosporas predominaron entre los aislados de muestras de agua y rizosedimento del río Almendares, ecosistema contaminado con altas concentraciones de materia orgánica como se apreció a través del indicador DQO. ^(6,10,11) Teniendo en cuenta que los miembros de la clase *Bacilli* son bacilos grampositivos, aerobios y formadores de endosporas se puede inferir que la mayoría de los aislados de esta investigación pertenecen a esta clase. Se observó la producción de proteasas y amilasas a partir de las bacterias formadoras de endosporas aisladas. ⁽¹⁰⁾ A partir de la producción de las enzimas proteasas y amilasas, se seleccionaron 36 aislados, los cuales fueron representativos de las 3 estaciones de muestreo del río Almendares, así como de las diferentes plantas colectadas. Con respecto a los aislados del rizosedimento, no existen informes previos de aislamientos a partir del rizosedimento de las plantas *Eichhornia crassipes*, *Pistia startiotes*, *Commelina* sp., *Hydrocotyle* sp., *Cabomba* sp. y *Bidens pilosa* L. en Cuba.

Mediante el sistema API ZYM, se constataron las capacidades metabólicas de los aislados seleccionados, los cuales produjeron fosfatasas, estererasas, aminopeptidasas y glicosil hidrolasas. ⁽⁶⁾ Este resultado brinda una información aproximada de la composición polimérica de las fuentes de materia orgánica que pudieran estar presentes en el río Almendares, así como de las capacidades de los microorganismos aislados de este ecosistema. De esta forma, los microorganismos aislados contribuyen a la degradación de la materia orgánica en descomposición en el río Almendares participando en el reciclaje de nutrientes como el carbono, el fósforo y el nitrógeno a la biosfera.

A partir de la producción de enzimas extracelulares detectadas mediante el sistema API ZYM se seleccionaron 15 aislados bacterianos. Los aislados seleccionados se identificaron a través de la secuenciación del gen ADNr 16S. El análisis de la comparación de las secuencias del gen ADNr 16S de cada cepa con las secuencias de referencia en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI), re-

veló que 10 mostraron similitud con el grupo *Bacillus cereus sensu lato*, 2 con *Bacillus megaterium*, 1 con *Bacillus pumilus* y 2 con *Bacillus subtilis*. Las cepas pertenecientes al grupo *B. cereus* se identificaron también a través de la secuenciación del gen *gyrB*, lo cual confirmó los resultados obtenidos con el gen ADN_r 16S, pero no permitió la diferenciación de las cepas dentro del grupo. Sin embargo, la presencia de cristales proteicos permitió identificar las cepas como *Bacillus thuringiensis*.⁽⁶⁾ Las cepas identificadas fueron depositadas en la colección de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana bajo los números CCMFB-B225 al CCMFB-B239. Por primera vez en Cuba se identifican cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la columna de agua y el rizosedimento de las plantas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Hydrocotyle* sp., *Bidens pilosa* L. y *Commelina* sp. de un ecosistema dulceacuícola contaminado, productoras de enzimas extracelulares con interés ecológico.

Conclusiones

Esta investigación permitió obtener evidencias concretas sobre la utilidad práctica del empleo de las comunidades bacterianas como indicadoras del estado ecológico de aguas superficiales de clima tropical. Los resultados obtenidos contribuyen a la sostenibilidad medioambiental del complejo turístico Las Terrazas, pues brindan información oportuna sobre el estado actual de la calidad del agua del río San Juan (Las Terrazas, Artemisa), el cual se encuentra ubicado en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario. La información obtenida en este trabajo avala la factibilidad del Programa de Desarrollo Sostenible que se lleva a cabo en la comunidad de Las Terrazas. Además, estos resultados han contribuido a mitigar los efectos de la contaminación en este ecosistema, ya que a partir de los datos brindados a la Estación Ecológica Sierra del Rosario se han podido acometer medidas correctivas para mejorar la calidad ambiental y la preservación del recurso agua. Los resultados que se presentan constituyen un aporte al conocimiento de la diversidad bacteriana de ecosistemas dulceacuícolas cubanos. Se brinda información acerca de las diferentes familias bacterianas presentes en los ríos Almendares y San Juan, lo cual constituye la base para cualquier acción de recuperación que se lleve a cabo en el río Almendares y contribuye a aumentar el valor biológico del área protegida donde se localiza el río San Juan. Por primera vez para el Caribe se identifican los miembros de las comunidades bacterianas de ecosistemas dulceacuícolas con diferente grado de contaminación hasta el nivel de familia, de los cuales 43 familias constituyen nuevos informes para ecosistemas dulceacuícolas de esta área, lo que representa un aporte al conocimiento de la diversidad bacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Larrea J, Rojas M, Bacchetti T, Lugo D, Heydrich M, Estéve A, Boltes K. Influencia de la contaminación química y fecal sobre la estructura de las comunidades bacterianas del río Almendares. Revista Científica Interdisciplinaria Investigación y Saberes [Internet]. 2014 [citado 8 Jun 2023];3(3):1-11. Disponible en: http://revistasdigitales.utelvt.edu.ec/revista/index.php/investigacion_y_saberes/article/view/71
2. Romeu B, Quintero H, Larrea J, Rojas N, Heydrich M. Calidad química y microbiológica de las aguas del río San Juan, Artemisa (Cuba). Higiene y Sanidad Ambiental [Internet]. 2015 [citado 8 Jun 2023];15(4):1367-74. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/311486922_Calidad_quimica_y_microbiologica_de_las_aguas_del_rio_San_Juan_Artemisa_Cuba
3. Larrea JA, Heydrich M, Romeu B, Lugo D, Mahillon J, Rojas MM. Bacterial community structure of Almendares and San Juan rivers. Relationship with water quality. Revista Cubana de Ciencias Biológicas [Internet]. 2020 [citado 8 Jun 2023];8(2):1-14. Disponible en: <https://revistas.uh.cu/rccb/article/view/1014>
4. Izquierdo K, Larrea JA, Lugo D, Rojas MM. Proteolytic enzyme activity and its relationship with physicochemical and microbiological indicators in freshwater ecosystems of western Cuba. Water, Air and Soil Pollution [Internet]. 2020 [citado 8 Jun 2023];231:1-15. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-020-04909-z>
5. Larrea J, Romeu B, Lugo D, Rojas M. Acid phosphatase activity in freshwater ecosystems of western Cuba and its relationship with water quality. Water, Air and Soil Pollution [Internet]. 2022 [citado 8 Jun 2023];233:57. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-022-05514-y>
6. Larrea JA, Rojas MM, García I, Romeu B, Bacchetti T, Gillis A, Boltes AK, Heydrich M, Lugo D, Mahillon J. Diversity and enzymatic potentialities of *Bacillus* sp. strains isolated from a polluted freshwater ecosystem in Cuba. World Journal of Microbiology and Biotechnology [Internet]. 2018 [citado 8 Jun 2023];34:1-11. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-018-2411-1>
7. ter Braak CJF, Smilauer P. CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). [Internet] Ithaca, NY, USA, Microcomputer Power; 2002 [citado 8 Jun 2023]. 500 p. Disponible en: www.canoco.com; <https://edepot.wur.nl/405659>
8. StatSoft. Statistica [sistema de software de análisis de datos]. Version 8.0.
9. Larrea JA, Heydrich M, García I, Romeu B, Lugo D, Bacchetti T, Estéve A, Boltes AK, Rojas MM. Impact of chemical and microbiological water quality on bacterial community assemblage of San Juan River (Sierra del Rosario, Biosphere Reserve, Cuba). Tecnología y Ciencias del Agua [Internet]. 2021 [citado 8 Jun 2023];12(3):82-123. Disponible en: <http://www.revistatyca.org.mx/index.php/tyca/article/view/2259>
10. García I, Larrea JA, Rojas MM. Detección de la producción de enzimas extracelulares de interés ecológico a partir de aislados del río Almendares. Revista Estudiantil Nacional de Ingeniería y Arquitectura (Renia) [Internet]. 2013 [citado 9 Jun 2023];4(1-2):37-41. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/371445099_Deteccion_de_la_produccion_de_enzimas_ex

[tracelulares_de_interes_ecologico_a_partir_de_aislados_del_rio_Almendares/related](#)

11. Larrea JA, Rojas MM, Lugo D, Heydrich M. Structure of rapid growth culturable heterotrophic bacterial community in Almendares River, Havana, Cuba. Revista Cubana de Ciencias Biológicas [Internet] 2020 [citado 8 Jun 2023];8(1):1-9. Disponible en: https://www.academia.edu/73041076/Structure_of_rapid_growth_culturable_heterotrophic_bacterial_community_in_Almendares_River_Havana_Cuba

Recibido: 12/06/2023

Aprobado: 12/07/2023

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Heidi Quintero, Fidel Hernández Figueroa, Jorge Luis Zamora Martín, Ana Karina Boltes Espínola, Tristano Bacchetti, Abraham Estéve, Jacques Mahillon, Annika Gillis, Olivier Henriët.

Conflictos de interés

No existen conflictos de interés en relación con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Jeny Larrea, Marcia Rojas

Curación de datos: Jeny Larrea

Análisis formal: Jeny Larrea

Adquisición de fondos: Marcia Rojas, Beatriz Romeu

Investigación: Jeny Larrea, Beatriz Romeu, Ivette García, Katherin Izquierdo, Daysi Lugo

Metodología: Jeny Larrea, Marcia Rojas, Mayra Heydrich, Nidia Rojas
Administración del proyecto: Marcia Rojas, Beatriz Romeu
Supervisión: Marcia Rojas, Mayra Heydrich
Visualización: Jeny Larrea
Redacción-borrador original: Jeny Larrea
Redacción-revisión y edición: Jeny Larrea, Marcia Rojas, Beatriz Romeu, Mayra Heydrich, Nidia Rojas

Financiamiento

La investigación estuvo financiada por 2 proyectos del Programa Nacional de Ciencias Básicas y del Programa Nacional sobre la Diversidad Biológica, por el proyecto International Foundation for Science, Suiza y el proyecto de la Región de Valonia, Bélgica.

Cómo citar este artículo

Larrea Murrell JA, Rojas Badía MM, Romeu Álvarez B, Heydrich Pérez M, García Soto I, Izquierdo Fiallo K *et al.* Diversidad estructural y funcional de las comunidades bacterianas de dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba. An Acad Cienc Cuba [internet] 2023 [citado en día, mes y año];13(3):e1458. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1458>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

