Universidad de La Habana
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología y Virología

COMUNIDADES BACTERIANAS DE DOS ECOSISTEMAS DULCEACUÍCOLAS DEL OCCIDENTE DE CUBA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE SUS AGUAS

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autora: MC. Jeny Adina Larrea Murrell

La Habana
Mayo 2016

Universidad de La Habana
Facultad de Biología
Departamento de Microbiología y Virología

COMUNIDADES BACTERIANAS DE DOS ECOSISTEMAS DULCEACUÍCOLAS DEL OCCIDENTE DE CUBA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE SUS AGUAS

Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autora: MC. Jeny Adina Larrea Murrell

Tutoras: Dra. Marcia M. Rojas Badía
Dra. Mayra Heydrich Pérez

La Habana
Mayo 2016

A mi Familia

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano
Isaac Newton

Agradecimientos

Agradecimientos

En momentos como estos me pongo a pensar en todas aquellas personas que me apoyaron e hicieron posible que llegara hasta aquí, y créanme que la lista pudiera ser interminable, por lo que trataré de mencionarlos a todos sin que se me quede nadie, cosa que resulta algo difícil. En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia por enseñarme a conducirme en la vida y a nunca renunciar a mis sueños, principalmente a mi mamá que tanto me ha apoyado, y también a esa nueva familia que he adquirido, que tanto me apoyan y se preocupan. Quiero agradecer además a mis dos tutoras, la Dra. Marcia y la Dra. Mayra, con las cuales siempre pude contar, no sólo como mis tutoras sino también como mis amigas, gracias por su confianza. A Daisy Lugo por sus consejos y su ayuda con los aislamientos. A mis amigas Betty, Irina e Ivette, las cuales me han demostrado que los amigos verdaderos siempre están presentes en las buenas y en las malas. A la Dra. Nidia por guiarme en el camino de la enseñanza, a las Dras. Eudalys Ortíz, Irina Salgado, Margarita Lugiollo y Maria Elena Carballo por sus magníficos consejos durante la predefensa y defensa de esta tesis. Al Tribunal y a todos los profesores del Departamento que tanto apoyan a los jóvenes en su superación, así como a todos los profesores de la carrera que son ejemplo diario de sacrificio y abnegación. A los compañeros del Complejo Turístico “Las Terrazas”, los cuales nos dieron acceso a todas sus instalaciones para realizar esta investigación, especialmente a Fidel Hernández y Jorge Luis Zamora. A la Dra Cristina Panfet por su ayuda con la identificación de las plantas y por sus consejos. A los Drs. Jose Luis Ponce y Maickel Armenteros por su ayuda con la estadística multivariada. A Lourdes Pérez Malo, por su cariño y apoyo en momentos difíciles. A Freddy, por su apoyo con la esterilización y por su amabilidad. A Marquel por su compañía y enseñanzas durante nuestra estancia en España. A todos los compañeros del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en agua por su ayuda y convertirse en mis amigos, en especial a Raquel, Maria Ángeles, María Leal, Virtu y Corvea. Así como también a los compañeros del Laboratorio de Microbiología Ambiental y de los Alimentos de la Universidad Católica de Lovaina en Bélgica, en especial a los Drs. Jacques Mahillon y Annika Gillis y a Olivier Henriet, por su ayuda con los experimentos de biología molecular.

Por último, pero no menos especial, quiero agradecer a mi novio Ernesto, sin ti hubiese sido casi imposible realizar esta tarea, gracias por las madrugadas en la terminal esperando la guagua para Las Terrazas, gracias por ayudarme con los 24L de agua y sobretodo, gracias por ser mi amigo y compañero en la vida. Te quiero.

Como les dije, la lista es interminable, así que quiero terminar agradeciendo a todos los que siempre me dieron una palabra de aliento.

Muchas gracias

Síntesis

Las comunidades bacterianas desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas acuáticos, ya que contribuyen a la mineralización de la materia orgánica. En el presente trabajo se evaluó la calidad microbiológica y química del río Almendares y del río San Juan. El río Almendares presentó una elevada contaminación química y microbiana, contrario al río San Juan. La estructura de las comunidades bacterianas determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y pirosecuenciación 454, permitió establecer diferencias significativas entre los dos ríos y entre estaciones contaminadas y poco contaminadas dentro de cada río, lo que demuestra la factibilidad del uso de las comunidades bacterianas como indicadoras del estado ecológico de los ecosistemas. Los filos más abundantes en el río Almendares fueron: *Proteobacteria* (52,7%), *Actinobacteria* (24,6%), *Bacteroidetes* (17,5%), y *Firmicutes* (3,96%) y en el río San Juan: *Actinobacteria* (39,1%), *Proteobacteria* (30,9%), *Cyanobacteria* (18,9%), *Bacteroidetes* (5,1%), *Firmicutes* (3,6%) y *Deinococcus-Thermus* (1,1%). Se identificaron 44 órdenes y 73 familias en el río Almendares y 38 órdenes y 60 familias en el río San Juan. Del total de familias identificadas en ambos ríos, 43 constituyen nuevos informes para ecosistemas dulceacuícolas del Caribe. A través del análisis de redundancia, se demostró que la contaminación fecal es el factor que más contribuye a la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas del río Almendares. En cambio, las altas concentraciones de oxígeno disuelto y bajas concentraciones de nutrientes, son los factores que más influyen en las comunidades bacterianas del río San Juan. Para conocer la función potencial de las bacterias productoras de enzimas extracelulares dentro de las comunidades bacterianas de un ecosistema contaminado, se procedió al aislamiento y caracterización micromorfológica-tintorial de aislados del río Almendares. Las bacterias aerobias Gram positivas formadoras de endosporas predominaron entre los aislados de la columna de agua y del rizosedimento de las plantas *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Cabomba* sp., *Hydrocotyle* sp., *Commelina* sp. y *Bidens pilosa* L. Mediante la determinación de la producción de diferentes enzimas extracelulares por los aislados de *Bacillus* sp., se constató la capacidad degradadora de materia orgánica de este género.

Listado de abreviaturas

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFNOR	Agencia Francófona para la normalización
ANAMOX	Oxidación anaerobia de amonio
ANOVA	Análisis de Varianza
APHA	Asociación Americana para la Salud Pública
APS	Adenosina 5´-fosfosulfato
ATP	Adenosina trifosfato
BOA	Bacterias oxidadoras de amonio
BON	Bacterias oxidadoras de nitrito
COD	Carbono Orgánico Disuelto
CTE	Coliformes termotolerantes
DBO_5	Demanda Biológica de Oxígeno
dNTP	Desorribonucleótido trifosfato
DCA	Análisis de correspondencia sin tendencia
DGGE	Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EC	*Escherichia coli*
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Ent	Enterococos
FM	Técnica de Filtración por Membrana
GF/F	Filtros de fibra de vidrio
$g\ P.m^{-2}.a^{-1}$	Gramos de fósforo por metro cuadrado por año
INRH	Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos
NC	Norma Cubana
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos
NMP	Número Más Probable
NH_4-N	Amonio
NO_2-N	Nitrito
NO_3-N	Nitrato
OD	Oxígeno Disuelto
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PERMANOVA	Análisis de Varianza por permutación
PO_4-P	Fosfato
RDA	Análisis de redundancia
STD	Sólidos Totales Disueltos
TAE	Tampón de Tris-Acetato-EDTA
TSA	Agar Triptona Soya
TTC	Cloruro de trifenil 2,3,5 tetrazolio
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPGMA	*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (por sus siglas en inglés)
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
UV	Luz ultravioleta
WHO	*World Health Organization*

Glosario

Biopelículas: Estructuras de células bacterianas adheridas a una superficie y rodeadas por una matriz adhesiva que se produce por la excreción de las células y las células muertas. La matriz está compuesta por una mezcla de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos que unen a las células.

Ciclos biogeoquímicos: Transformaciones de un elemento que son catalizadas por agentes biológicos, químicos o por ambos. Reacciones que generan importantes nutrientes para los organismos.

Eficiencia de crecimiento bacteriano: Es la proporción de carbono asimilado por la bacteria que es convertido en biomasa.

Estrategas K: Organismos adaptados a sobrevivir, crecer y reproducirse en ambientes con altos niveles de competencia. Se caracterizan por tener una baja tasa de reproducción en un largo periodo de tiempo.

Estrategas r: Organismos adaptados a ambientes con bajos niveles de competencia con otra biota. Generalmente son los primeros organismos en colonizar un ecosistema. Se caracterizan por tener una alta tasa de reproducción en un corto periodo de tiempo.

gyrB: Gen que codifica para la proteína ADN girasa.

Materia particulada suspendida: Se define como materiales suspendidos en la columna de agua con un diámetro mayor a 0,45 µm.

Meromíctico: Término que se aplica a los lagos que tienen la característica de que las aguas de las capas profundas no se mezclan nunca con las capas superficiales. Este fenómeno suele ser debido a un gradiente permanente de densidad en el cual la capa inferior llamada hipolimnion es más densa que la capa superior llamada epilimnion.

Sólidos totales disueltos: Indican el nivel de sólidos disueltos menores de 2 µm presentes en una corriente fluvial, los cuales incluyen todos los electrolitos disociados que aumentan la concentración de sales y otros compuestos como la materia orgánica disuelta.

Transmisión horizontal de genes: Transferencia unidireccional de información genética entre organismos no relacionados.

ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN…… 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA…….. 5

1.1. Río Almendares…… 5

1.2. Complejo Turístico "Las Terrazas"……. 5

1.3. Fuentes de contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas……. 6

1.4. Indicadores de contaminación fecal…….. 7

1.4.1. Coliformes Totales…… 8

1.4.2. Coliformes termotolerantes…….. 8

1.4.2.1. *Escherichia coli*…… 9

1.4.3. Enterococos……. 10

1.5. Indicadores de contaminación química del agua…… 10

1.6. Comunidades bacterianas como indicadores del estado ecológico de las aguas……. 11

1.7. Diversidad bacteriana en ecosistemas de agua dulce……... 12

1.8. Técnicas moleculares utilizadas en el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas…… 14

1.9. Influencia de factores físicos y químicos en la distribución, abundancia y actividad de las comunidades bacterianas en ecosistemas dulceacuícolas…..... 16

1.9.1. Temperatura…… 16

1.9.2. pH…… 17

1.9.3. Oxígeno disuelto…….. 17

1.9.4. Nutrientes orgánicos e inorgánicos…… 18

1.10. Funciones de los microorganismos en los ecosistemas acuáticos…… 20

2. MATERIALES Y MÉTODOS…… 22

2.1. Análisis de la dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en el río Almendares y las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"…… 22

2.1.1. Toma de muestras……. 23

2.1.2. Determinación de coliformes termotolerantes y *E. coli*…….. 23

2.2. Análisis de la calidad físico-química y microbiológica en las estaciones de los ríos Almendares y San Juan en el periodo 2011-2013……. 24

2.2.1. Determinación de los indicadores físico-químicos…….. 24

2.2.2. Determinación de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos…….. 25

ÍNDICE

Pág.

2.3. Análisis de la comunidad bacteriana de los ríos Almendares y San Juan en el periodo 2011-2013……..... 25

2.3.1. Extracción de ADN y amplificación de los fragmentos del gen ADNr 16S…….. 25

2.3.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y secuenciación de las bandas predominantes……..…….. 26

2.3.3. Pirosecuenciación 454…….. 27

2.4. Aislamiento y caracterización micromorfológica-tintorial de aislados bacterianos del río Almendares …….. 27

2.5. Determinación de enzimas extracelulares a partir de aislados bacterianos del río Almendares…… 28

2.5.1. Producción de proteasas y amilasas…….. 28

2.5.2. Determinación de otras enzimas extracelulares mediante el sistema API ZYM…… 29

2.6. Identificación de los aislados bacterianos……..... 29

2.6.1. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de los genes ADNr 16S y *gyrB*…….. 29

2.6.2. Producción de cristales proteicos..... 30

2.7. Análisis estadístico…… 30

3. RESULTADOS ……. 33

3.1. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en el río Almendares……. 33

3.2. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"…… 34

3.3. Calidad físico-química y microbiológica de las aguas del río Almendares en el período 2011-2013…….. 35

3.4. Calidad físico-química y microbiológica de las aguas del río San Juan en el período 2011-2013……. 38

3.5. Comparación de la calidad físico-química y microbiológica de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013……..... 40

3.6. Análisis de la comunidad bacteriana mediante DGGE ……. 41

3.6.1. Río Almendares…… 41

3.6.2. Río San Juan……. 42

ÍNDICE

Pág.

3.6.3. Comparación de la estructura de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013……... 44
3.7. Análisis de la comunidad bacteriana mediante la técnica de pirosecuenciación 454……... 44
3.7.1. Río Almendares…… 44
3.7.2. Río San Juan…… 47
3.7.3. Comparación de la composición de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período febrero-julio 2013…….. 49
3.8. Análisis de la relación entre la composición de las comunidades bacterianas y los indicadores físico-químicos y de contaminación fecal…… 50
3.8.1. Río Almendares…….. 50
3.8.2. Río San Juan…… 52
3.9. Caracterización micromorfológica-tintorial de aislados bacterianos del río Almendares……..…… 55
3.10. Determinación de enzimas extracelulares a partir de aislados bacterianos del río Almendares …… 55
3.10.1. Producción de proteasas y amilasas…….. 55
3.10.2. Determinación de otras enzimas extracelulares mediante el sistema API ZYM…… 56
3.10.3. Selección de los mejores aislados productores de enzimas extracelulares….57
3.11. Identificación de las cepas bacterianas…… 58
4. DISCUSIÓN……..... 59
4.1. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *E. coli* en el río Almendares y las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"……..... 59
4.2. Calidad físico-química y microbiológica de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013…..…… 61
4.3. Análisis de la comunidad bacteriana en los ríos Almendares y San Juan mediante DGGE y pirosecuenciación 454…… 73
4.4. Relación entre la composición de las comunidades bacterianas y los indicadores físico-químicos y de contaminación fecal en los ríos Almendares y San Juan…….. 89

ÍNDICE

Pág.

4.5. Caracterización micromorfológica-tintorial, determinación de la producción de enzimas extracelulares y caracterización molecular de los aislados del río Almendares ……..… 93

5. CONCLUSIONES…… ….99

6. RECOMENDACIONES…….. …100

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO 1

Introducción

INTRODUCCIÓN

Los ríos son importantes fuentes de agua dulce y un recurso imprescindible para el desarrollo de diferentes actividades, entre las que se incluyen la agricultura, la industria, la transportación, la recreación y la acuicultura; además constituyen un suplemento de agua potable para la población (Anitha y Ravikumar, 2014). Sin embargo, el incremento de la población, la expansión de las actividades industriales y agrícolas y la contaminación fecal producida por el ser humano, constituyen importantes factores para el rápido deterioro de los ecosistemas dulceacuícolas (Callisto *et al.*, 2014). En los últimos años se ha incrementado el interés por monitorear y restaurar los ecosistemas acuáticos con el objetivo de mejorar su valor ecológico, recreativo, cultural, educacional y económico (Lear *et al.*, 2008; Lear *et al.*, 2012; Washington *et al.*, 2013). El monitoreo exitoso está basado en el uso de indicadores cuantitativos que pueden brindar información sobre el estado de un cuerpo de agua (Ryder y Miller, 2005).

Dependiendo del objetivo del estudio, se tienen en cuenta diferentes variables físico-químicas, tales como: la concentración de oxígeno disuelto, nitrógeno y fósforo, la turbidez, la conductividad eléctrica y el pH (W.H.O, 2003; Tsegaye *et al.*, 2006), y frecuentemente estas variables se complementan con datos relacionados con la presencia de bacterias patógenas u otros indicadores biológicos (W.H.O, 2003; Lear *et al.*, 2011; McLellan y Eren, 2014). Las comunidades bacterianas también se han utilizado como indicadores en el monitoreo de la calidad de los sistemas acuáticos (Lear *et al.*, 2008; Lear y Lewis, 2009; Washington *et al.*, 2013; Read *et al.*, 2015), debido a que son altamente sensibles a los cambios ambientales como consecuencia de su rápido ciclo de vida (Lear *et al.*, 2008; Newton *et al.*, 2011).

Algunos métodos independientes de cultivo se han desarrollado para analizar la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas, entre los que se encuentran la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y la pirosecuenciación 454. Estas técnicas permiten detectar cambios en las comunidades bacterianas y obtener información taxonómica acerca de las poblaciones de bacterias que habitan los ecosistemas acuáticos (Zhong *et al.*, 2015). Los métodos moleculares se han utilizado frecuentemente para estudiar los ambientes acuáticos de climas templados (Berdjeb *et al.*, 2011; Staley *et al.*, 2013; García-Armisen *et al.*, 2014; Newton *et al.*, 2015; Read *et al.*, 2015). Sin embargo, las comunidades microbianas tropicales no se han evaluado con la misma frecuencia (Humbert *et al.*, 2009; Gouvêa *et al.*, 2010; Inceoglu *et al.*, 2015), especialmente en países del Caribe donde no existe referencia de este tipo de estudios.

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 (Newton *et al.*, 2011). En la actualidad el estudio de la biodiversidad constituye uno de los

temas más importantes en la investigación científica en Cuba (CITMA, 2014), ya que permite conocer microorganismos con potencialidades en la producción de compuestos con interés ecológico, biotecnológico e industrial. En este sentido, las enzimas bacterianas tienen gran importancia en la depuración de los ecosistemas, ya que permiten la incorporación de los elementos (ejemplo: carbono, nitrógeno y fósforo) a su ciclo en la naturaleza (Bertilsson *et al.*, 2007).

Entre las bacterias productoras de enzimas extracelulares se han descrito diferentes géneros como son: *Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacter, Arthrobacter, Clostridium, Staphylococcus* y *Cytophaga* (Vermelho *et al.*, 2013). Particularmente las especies de *Bacillus* sp. pueden producir diferentes enzimas como: proteasas, amilasas, fosfatasas, lipasas, esterasas, entre otras. Todas estas enzimas son importantes en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y además poseen aplicación industrial y biotecnológica. Se ha sugerido que las bacterias formadoras de endosporas pueden contribuir a la autopurificación del agua y podrían tener grandes potencialidades biotecnológicas comparado con otros grupos bacterianos (Bal *et al.*, 2009; Geethanjali y Subash, 2011). En este sentido, diferentes especies del género *Bacillus* sp. se han utilizado con éxito en la recuperación ambiental de ecosistemas acuáticos contaminados (Cabranes *et al.*, 2007; Núñez *et al.*, 2010).

El río Almendares constituye una de las corrientes superficiales de mayor importancia en La Habana, Cuba; el cual presenta un alto nivel de contaminación debido al constante vertimiento de aguas residuales de origen doméstico e industrial. En este ecosistema se han descrito alrededor de 249 fuentes contaminantes, 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; Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos, 2010). Aunque se han realizado evaluaciones de la contaminación química y microbiológica del río (Lima *et al.*, 2005; Chiroles *et al.*, 2007; Arpajón *et al.*, 2011; Romeu *et al.*, 2011), los métodos independientes de cultivo nunca se han implementado para evaluar la comunidad bacteriana de este ecosistema. Este tipo de investigación podría ser beneficiosa para conocer desde el punto de vista sinérgico la influencia de la contaminación sobre la estructura de las comunidades bacterianas.

Por otra parte, el río San Juan está ubicado en la provincia de Artemisa, específicamente en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, un área protegida donde se lleva a cabo un programa de desarrollo sostenible. Este ecosistema de agua dulce no se ha caracterizado con la misma frecuencia que el río Almendares, existiendo pocas evaluaciones de la calidad química del mismo y ninguna desde el punto de vista microbiológico.

Estudios de caracterización de la diversidad bacteriana en Cuba, solo se han realizado en aguas oceánicas y costeras (Lugioyo, 2003; Miravet, 2003); sin embargo, no existen

antecedentes de este tipo de análisis en ecosistemas dulceacuícolas. Teniendo en cuenta estos aspectos se propone la siguiente **Hipótesis:** La variabilidad en la estructura de las comunidades bacterianas se relaciona con las características físico-químicas y la contaminación fecal de los ecosistemas dulceacuícolas.

Con la finalidad de aceptar o refutar esta hipótesis se propone como **Objetivo General:**

Analizar las comunidades bacterianas y su relación con la calidad química y microbiológica de las aguas de dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba.

Para dar cumplimiento a este objetivo general, se proponen los siguientes **Objetivos específicos:**

1. Evaluar la calidad química y microbiológica de las aguas del Complejo Turístico “Las Terrazas” y el río Almendares mediante el empleo de indicadores físico-químicos y de contaminación fecal.
2. Identificar las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan (Complejo Turístico "Las Terrazas") mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y pirosecuenciación 454.
3. Determinar la relación entre la estructura de las comunidades bacterianas y la calidad química y microbiológica en los dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba evaluados.
4. Determinar el perfil enzimático con incidencia en la degradación de la materia orgánica en bacterias aisladas del río Almendares.

Esta investigación tiene las siguientes **Novedades Científicas**:

- Por primera vez para países de clima tropical se informa la comparación entre un ecosistema dulceacuícola de un área urbana y un ecosistema dulceacuícola de un área rural, utilizando tres indicadores bacterianos de contaminación fecal y diez indicadores físico-químicos.
- 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. Además, se realiza el análisis de la relación entre factores ambientales naturales y antropogénicos y la composición de estas comunidades.
- Se evalúa por primera vez la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico “Las Terrazas” empleando a los coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos como indicadores de contaminación fecal, lo que representa el primer estudio microbiológico en un área protegida cubana. Además, por primera vez para el Caribe 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.

- 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.

Importancia teórica

Los resultados que se presentan constituyen un aporte al conocimiento de la diversidad bacteriana de ecosistemas dulceacuícolas cubanos. La presente investigación constituye el trabajo más completo acerca de la caracterización físico-química y microbiológica de dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba, todo lo cual posibilita contar con un documento científico que puede ser utilizado como referencia en investigaciones posteriores.

Importancia práctica

Esta investigación proporciona datos cuantitativos actualizados sobre la contaminación química y microbiológica y la calidad de dos ecosistemas dulceacuícolas del occidente de Cuba, lo cual constituye un aporte para el mejoramiento del manejo de estos ecosistemas acuáticos. Se aportan evidencias sobre la utilidad práctica del uso de *Escherichia coli* y enterococos como indicadores de contaminación fecal para la evaluación de la calidad microbiológica de aguas superficiales de ecosistemas dulceacuícolas de clima tropical. 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. Se dispone de una colección de cepas de *Bacillus* sp. con productoras de enzimas extracelulares de interés ecológico depositadas en la colección de la Facultad de Biología.

La tesis consta de 100 páginas, organizadas de la siguiente forma: Síntesis, Índice, Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliográficas. Incluye 19 Tablas, 27 Figuras y 1 Anexo.

Revisión Bibliográfica

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Río Almendares

El río Almendares nace en los alrededores de Tapaste en la provincia de Mayabeque, atraviesa la cuenca hidrogeológica de Vento, y desemboca al oeste de La Habana (Fernández, 2009). El 47% del agua que se consume en la capital proviene de las aguas subterráneas de esta cuenca (Pérez y Valdés, 2011). En el litoral del río se asienta una población de más de medio millón de habitantes y posee una gran importancia desde el punto de vista económico, social, de salud, cultural, recreativo y urbanístico. En la cuenca del río Almendares se encuentran grandes parques científico-recreativos como son los Jardines Botánico y Zoológico, EXPOCUBA, el Parque Lenin y el Gran Parque Metropolitano de La Habana y Centros de Educación Superior e Investigación como la Universidad Agraria de La Habana (UNAH) y el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) (CCAV, 1999).

Actualmente este ecosistema acuático presenta condiciones higiénico-sanitarias críticas como consecuencia de las descargas de aguas residuales de 249 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 (Díaz *et al.*, 2010a; Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos, 2010; Pérez y Valdés, 2011). Varias industrias vierten sus desechos al río como son: fábricas de gas, cervecerías, laboratorios farmacéuticos, fábricas de material de la construcción e industrias alimenticias diversas; lo que causa graves afectaciones debido a la insuficiencia de alcantarillado y ausencia de tratamiento de residuales domésticos, industriales y agropecuarios (Knapp *et al.*, 2012).

Aunque se han realizado evaluaciones de la contaminación química y microbiológica del río (Lima *et al*., 2005; Chiroles *et al*., 2007; Romeu *et al*., 2011), las técnicas independientes de cultivo no se han implementado con anterioridad para estudiar la comunidad bacteriana de este ecosistema.

1.2. Complejo Turístico “Las Terrazas”

El complejo turístico “Las Terrazas”, es una comunidad rural de desarrollo sostenible, localizada en la Sierra del Rosario, Reserva de la Biosfera, en la provincia de Artemisa. Entre los numerosos ríos que atraviesan la zona, se encuentran el San Juan y el Bayate, los cuales poseen pocetas naturales de aguas frescas y cristalinas (Menéndez, 2008).

El sector hidromineral “Las Terrazas” se localiza en el municipio La Palma, en las márgenes del río San Juan, dentro del área de desarrollo del centro turístico Las Terrazas, en la parte noreste de la Sierra del Rosario. Las aguas del sector son representativas de la zona de saturación de los macizos carbonatados y emergen en el contacto con fallas paralelas y transversales a la Falla Pinar (Peña *et al.*, 2001).

De acuerdo a su temperatura, según la clasificación de Castany (1971), las aguas del sector clasifican como aguas hipotermales. Teniendo en cuenta la mineralización global o cuantitativa (Valenzuela y Bacaicoa, 1994), las aguas se consideran mineromedicinales y de acuerdo a su uso, las mismas clasifican como aguas de uso balneológico y terapéutico (Peña *et al.*, 2001).

Este ecosistema de agua dulce no se ha caracterizado de la misma forma que el río Almendares, por lo que no existe conocimiento acerca de la calidad microbiológica y química del río San Juan.

1.3. Fuentes de contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas

El agua es un recurso natural limitado e indispensable para la vida. Todos los seres vivos necesitan agua para su supervivencia no sólo en una cantidad adecuada sino también con la calidad requerida. La calidad biológica de las aguas es un modo de definir la riqueza biológica y el valor ambiental de las comunidades de seres vivos asociados al ecosistema (Harwood *et al.*, 2005).

El agua dulce, se encuentra disponible en la naturaleza formando parte de aguas subterráneas, lagos, ríos, etc. Particularmente, los ríos constituyen uno de los ecosistemas dulceacuícolas superficiales más importantes, debido a que son una fuente de agua dulce para el desarrollo de diferentes actividades económicas como la industria y la agricultura, y además son un suplemento de agua potable para la población (Anitha y Ravikumar, 2014). Sin embargo, la actividad humana ejerce un impacto significativo sobre estos recursos hídricos naturales y los hace vulnerables a la contaminación, lo que provoca una modificación de la composición físico-química y biológica de sus aguas que compromete los usos de estas y/o su reutilización, al dificultarse el proceso natural de autodepuración (Hamilton *et al.*, 2012).

En su ciclo natural, el agua puede entrar en contacto con ciertos elementos de la atmósfera y la corteza terrestre, arrastrando contaminantes de origen natural como arcillas y desechos orgánicos, así como otros de origen antropogénico como: desechos domésticos, desechos industriales, plaguicidas, fertilizantes agrícolas y desechos provenientes de hospitales e instituciones sanitarias (Jurzik *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2011).

Para su mejor estudio, los contaminantes del agua se agrupan en ocho categorías dependiendo de sus propiedades y origen (Janelidze *et al.*, 2011; Kümmerer, 2011). Estas son:

1. Microorganismos patógenos como bacterias, virus y protozoos.
2. Sustancias químicas inorgánicas como ácidos, sales y metales tóxicos.
3. Nutrientes inorgánicos como nitratos, nitritos, amonio y fosfatos.
4. Desechos orgánicos como los producidos por los seres humanos, ganado, etc., (heces y otros materiales).
5. Compuestos orgánicos entre los que se encuentran el petróleo, la gasolina, los plásticos, los plaguicidas, los disolventes, los detergentes, etc.

6. Sedimentos y/o materiales suspendidos que incluye a muchas partículas arrastradas del suelo junto con otros materiales que se encuentran suspendidos en las aguas que constituyen, en términos de masa total, la mayor fuente de contaminación de un cuerpo de agua.
7. Sustancias radiactivas como isótopos radiactivos solubles que pueden estar presentes en el agua, que a veces se pueden ir acumulando a lo largo de las cadenas tróficas y alcanzar concentraciones considerablemente más altas en algunos tejidos vivos que las que tenían en el agua.
8. Contaminación térmica, el agua caliente liberada por centrales de energía o procesos industriales, eleva en ocasiones la temperatura de ríos o embalses, con lo que disminuye su capacidad de contener oxígeno y afecta la vida de los organismos.

Algunos autores incluyen también dentro de los contaminantes del agua a los contaminantes emergentes, los cuales se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias. En esta categoría se incluyen los detergentes de tipo alquilfenol etoxilado, los estrógenos, los retardantes de llama bromados y los antibióticos (Gil *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014).

1.4. Indicadores de contaminación fecal

El control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente puede llevarse a cabo mediante la enumeración de bacterias indicadoras de contaminación fecal. Estas bacterias se pueden utilizar para valorar la calidad de los alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación. No existe un indicador universal, por lo que se debe seleccionar el más apropiado para la situación específica en estudio (Bastholm *et al.*, 2008; Bachoon *et al.*, 2010).

Del Pilar *et al*. (2005) y Boehm y Soller (2013) refieren que un microorganismo indicador de contaminación fecal debe tener las siguientes características: debe ser un constituyente normal de la microbiota intestinal de individuos sanos, estar presente de forma exclusiva en las heces de animales homeotermos, incluido el ser humano, y cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están, presentarse en número elevado, lo que facilita su aislamiento e identificación, debe ser incapaz de reproducirse fuera del tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales homeotermos, su tiempo de supervivencia debe ser igual o superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal, debe ser fácil de aislar y cuantificar y no debe ser patógeno.

Entre los indicadores de contaminación fecal más utilizados se encuentran los coliformes totales y termotolerantes, *Escherichia coli* y los enterococos (Rossen *et al.*, 2008).

1.4.1. Coliformes Totales

Los coliformes totales se definen como bacterias Gram negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperatura de 35 a 37 ºC, producen ácido y gas (CO_2) en 24 h, son aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática ß-D-galactosidasa. Entre ellas se encuentran *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Carrillo y Lozano, 2008).

La prueba más relevante utilizada para la determinación de coliformes, es la hidrólisis de la lactosa. La enzima ß-D-galactosidasa cataliza la ruptura de este disacárido. Para la determinación de la ß-D-galactosidasa se utilizan medios cromogénicos tales como el Agar Chromocult para coliformes (Carrillo y Lozano, 2008).

Actualmente este indicador no se recomienda para la evaluación de la calidad de las aguas debido a que muchos de sus miembros pueden encontrarse de forma natural en aguas, suelos o vegetación (Marchand, 2002), por lo que contribuirían a sobreestimar la contaminación fecal o a clasificar erróneamente un ecosistema como contaminado.

1.4.2. Coliformes termotolerantes

Los coliformes termotolerantes (CTE), denominados así porque soportan temperaturas de hasta 45 ºC, comprenden un número muy reducido de microorganismos, los cuales son indicadores de calidad por su origen. En su mayoría están representados por *E. coli*, pero se pueden encontrar de forma menos frecuente las especies *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae.* Estas últimas forman parte de los coliformes termotolerantes, pero su origen normalmente es ambiental (fuentes de agua, vegetación y suelos) y solo ocasionalmente forman parte de la microbiota normal (Badgley *et al.*, 2011; Santiago-Rodriguez *et al.*, 2012). Por esta razón algunos autores plantean que el término de coliformes fecales, comúnmente utilizado, debe ser sustituido por coliformes termotolerantes (Hamilton *et al.*, 2005; Hachich *et al.*, 2012; Santiago-Rodriguez *et al.*, 2012; Odonkor y Ampofo, 2013).

Los coliformes termotolerantes integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de estos últimos, en que son indol positivo, su rango de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45 ºC) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y agua. La presencia de estos microorganismos indica la existencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen coliformes termotolerantes que están presentes en la microbiota intestinal, donde *E. coli* es la especie más representativa, con un 90-100 % de frecuencia de aparición en las heces (Carrillo y Lozano, 2008).

Numerosos países utilizan la enumeración de coliformes termotolerantes para evaluar la calidad microbiológica del agua. Por ejemplo, en la legislación de Canadá se emplea como indicador de contaminación fecal *Escherichia coli* o los coliformes termotolerantes, debido a que se ha observado que más del 90% de los colifomes termotolerantes son *E. coli* (Health and Welfare Canada, 1992). En Brasil, existe una regulación específica para el empleo de coliformes termotolerantes, *E. coli* y enterococos para la evaluación de la calidad del agua con fines

recreativos (Hachich *et al.*, 2012). En nuestro país, la Norma Cubana 22 (1999) indica el uso de los coliformes totales, coliformes termotolerantes, enterococos y *Pseudomonas aeruginosa* para la evaluación de la calidad de agua en lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto. Actualmente se trabaja en una nueva norma para la redefinición de los indicadores bacterianos a utilizar y la inclusión de la técnica de filtración por membrana para su detección y enumeración, cambios que ya se incluyeron en la Norma Cubana de Higiene Comunal-Fuentes de abastecimiento de agua-Calidad y protección sanitaria (Norma Cubana 1021, 2014).

1.4.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del ser humano y los animales homeotermos, y es la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre 10^8-10^9 UFC.g^{-1} de heces) y por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal más utilizados últimamente (Santiago-Rodriguez *et al.*, 2012).

Carrillo y Lozano (2008) y Odonkor y Ampofo (2013) señalan que es la única especie dentro de las enterobacterias que posee la enzima ß-D-glucuronidasa (GUD), que degrada el sustrato 4-metilumberiferil-ß-D-glucurónico (MUG), formando 4-metilumbeliferona. Por otra parte, estos autores refieren que son bacilos capaces de producir indol a partir de triptófano, en 21 ± 3 horas a 44 ± 0.5 ºC. Poseen la enzima ß-D-galactosidasa, que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y pueden descarboxilar el ácido L-glutámico, pero no tienen la capacidad de utilizar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo con cianuro de potasio.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2002) recomendó el cambio del uso de los coliformes termotolerantes por *Escherichia coli* o enterococos, ya que estos últimos exhiben mayor correlación con las enfermedades asociadas a los bañistas, por lo que se consideran mejores indicadores de contaminación fecal. Además, propuso establecer como base de calidad de agua un nuevo criterio para *E. coli* (63 % de la concentración de los coliformes termotolerantes) para proveer niveles equivalentes de protección para patógenos presentes en las aguas (USEPA, 2002). Sin embargo, diferentes autores en estudios realizados en aguas de ríos contaminados han hallado un elevado grado de relación entre los conteos de *E. coli* y de coliformes termotolerantes superior al propuesto por la USEPA (García-Armisen *et al.*, 2007; Hachich *et al.*, 2012). Asimismo, Hamilton *et al*. (2005) publicaron un estudio en el que se compara la relación *E. coli*/CTE obtenida por diferentes investigadores. Estos autores refieren que se ha observado una relación por encima de 0,63 en diferentes ecosistemas acuáticos que incluyen: lagos, playas, ríos, estuarios, aguas albañales tratadas y aguas residuales sin tratamiento alguno. Por lo que se debe analizar previamente la relación *E.*

coli/CTE en cada ecosistema, para determinar la factibilidad del uso de uno o ambos indicadores para la evaluación de la calidad microbiológica del agua.

1.4.3. Enterococos

Los enterococos son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas, no mótiles, anaerobios facultativos, y quimiorganotrofos con metabolismo fermentativo. Su crecimiento óptimo es a 37 ºC. Tienen la capacidad de crecer en presencia de 6,5 % de NaCl, a 10 y 45 ºC y pH 9,6. Estos microorganismos forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital de la mujer. Por otro lado, los enterococos también pueden estar presentes en suelo, alimentos, agua, plantas, animales e insectos (Köhler, 2007) y suelen considerarse buenos indicadores de contaminación fecal debido a que son muy resistentes a condiciones adversas como la congelación y la desecación (Yamahara *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2010b; Byappanahalli *et al.*, 2012).

El uso del género *Enterococcus* como indicador de contaminación fecal de aguas con fines recreativos fue recomendado por la USEPA en 1986 (Díaz *et al.*, 2008). Al respecto, Vergaray *et al*. (2007) consideran al género *Enterococcus* como el indicador bacteriológico más eficiente para evaluar la calidad de agua de mar para uso recreativo, debido a que es altamente resistente a las condiciones salinas de este medio y está relacionado directamente con gastroenteritis, enfermedades respiratorias, conjuntivitis, dermatitis, entre otras.

Según Díaz *et al*. (2010b) y Byappananahalli *et al*. (2012), la presencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se usa frecuentemente para indicar contaminación de origen fecal. *E. faecalis* se considera un indicador de contaminación fecal de fuentes humanas, mientras que *E. faecium* y otras especies indican contaminación de otras fuentes. En el caso de las especies de *Enterococcus bovis* y *Enterococcus equinus* se utilizan como indicadoras de contaminación producida por animales de granja. Estas especies mueren rápidamente en el medio exterior, por tanto su detección indica contaminación reciente (Díaz *et al.*, 2010b).

Para determinar el origen humano o animal de la contaminación fecal, el empleo de la relación *E. coli*/Enterococos (EC/E) puede ser de gran utilidad. Se ha sugerido que las cantidades de coliformes termotolerantes y enterococos fecales que son descargados por los seres humanos son significativamente diferentes a las descargadas por los animales (Meeroff *et al.*, 2008). Cuando el cociente EC/E es mayor de 4 se está en presencia de una contaminación fecal de origen humano, y cuando este cociente es menor de 0,7 la contaminación es de origen animal. Sin embargo, en el intervalo entre 0,7 y 4 no se puede interpretar el origen de la contaminación, e incluso puede tratarse de una contaminación fecal mixta, es decir, donde haya presencia de materia fecal humana y animal (Coyne y Howell, 1994; Marchand, 2002).

1.5. Indicadores de contaminación química del agua

Para el estudio de la contaminación química del agua se utilizan indicadores tanto de origen biológico como de origen químico propiamente dicho. Los primeros se utilizan para evaluar la

contaminación química, así como la presencia de contaminantes tóxicos en los ecosistemas acuáticos utilizando sistemas biológicos como: algunas especies de almejas, gasterópodos, protozoos ciliados, moluscos bivalvos, bacterias, cianobacterias, algas verdes, crustáceos y peces; así como la determinación de la clorofila *a* que indica la actividad fotosintética del plancton existente. Los segundos comprenden a los nutrientes (nitrato, nitrito, amonio, fosfato), Demanda Biológica de Oxígeno (DBO_5), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Oxígeno disuelto (OD), metales pesados (plomo, zinc, cadmio, mercurio, etc.), así como compuestos orgánicos que afectan las propiedades físico-químicas del agua (Nathan, 2006; Wondie *et al.*, 2007; Purnima *et al.*, 2008; Gikas *et al.*, 2009; Jun *et al.*, 2009).

Los límites permisibles de concentración para los contaminantes tanto de origen químico como microbiológico dependen del uso que tendrá el agua, por ejemplo: agua potable, aguas recreativas, aguas mineromedicinales, etc. Además, existe una legislación contenida en Decretos Ley y Resoluciones emitidas por el gobierno de cada país, en conjunto con las entidades responsables de los recursos hidráulicos de cada nación, con el objetivo de controlar la calidad de cada tipo de agua (W.H.O, 2003; APHA, 2005, 2012).

Las normas de calidad para cada tipo de agua se diseñan territorialmente y algunas, como las europeas y las norteamericanas, se han utilizado como referencia para establecer las normas de otros países. Entre ellas se encuentran las Normas Cubanas de Calidad elaboradas por la Oficina Nacional de Normalización en conjunto con el Consejo de Estado y el Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos, entre otras entidades del Estado (Oficina de Normalización, 2005).

1.6. Comunidades bacterianas como indicadores del estado ecológico de las aguas

Las comunidades bacterianas son altamente sensibles a los cambios ambientales, así como a los cambios persistentes en los ecosistemas debido a la contaminación derivada de la actividad humana o al cambio climático global (Lear *et al.*, 2008). Recientes investigaciones sobre las comunidades de biopelículas bacterianas, sugieren que estas pudieran ofrecer una herramienta adicional para la evaluación de la calidad ecológica de las corrientes de agua (Lear *et al.*, 2011; Washington *et al.*, 2013).

Las comunidades de biopelículas bacterianas ofrecen ventajas como indicadoras, ya que pueden experimentar cambios en su composición en respuesta a perturbaciones ambientales, detectándose los efectos de estos cambios antes de que sean transmitidos a niveles superiores de las cadenas tróficas en los ecosistemas acuáticos (Lewis *et al.*, 2010). Además las comunidades bacterianas se pueden muestrear en sitios en donde otros bioindicadores, como los invertebrados bénticos y los peces no están presentes (Lear *et al.*, 2012). Washington *et al.* (2013) propusieron un modelo conceptual en el que agrupan a las bacterias representadas en las comunidades de biopelículas bacterianas en cuatro grupos ecológicos:

- Bacterias ubicuas: Son aquellas bacterias que están presentes en casi todas las áreas o regiones.

- Bacterias regionales: Son aquellas bacterias que sólo se encuentran en áreas o regiones específicas.
- Bacterias en su estado natural: Son aquellas poblaciones bacterianas asociadas con cuerpos de agua no impactados donde el desarrollo de las comunidades está dirigido por los procesos naturales de sucesión.
- Bacterias relacionadas con el impacto: Son aquellos miembros de las comunidades de biopelículas bacterianas asociados a los efectos de las actividades antropogénicas.

La identificación de los miembros de las comunidades bacterianas que integran cada categoría puede contribuir a la evaluación del estado ecológico de un ecosistema acuático, ya que la diversidad bacteriana en la biopelícula será alta independientemente de la calidad del cuerpo de agua. Sin embargo; la composición de la comunidad diferirá entre los sitios, dependiendo de las condiciones del ecosistema y el nivel de impacto antropogénico (Washington *et al.*, 2013). Por ejemplo, en sistemas contaminados se ha observado que las bacterias pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*), consideradas contaminantes en los ecosistemas dulceacuícolas, son abundantes (Newton *et al.*, 2011). Sin embargo, en ecosistemas dulceacuícolas poco contaminados el filo *Actinobacteria* es más abundante (Newton *et al.*, 2011; Read *et al.*, 2015).

1.7. Diversidad bacteriana en ecosistemas de agua dulce

Anteriormente, las técnicas tradicionales dependientes de cultivo sugerían que no existía una clara distinción entre las bacterias encontradas en el suelo y aquellas encontradas en ambientes acuáticos (de Sousa y Silva-Sousa, 2001); sin embargo, actualmente se conoce que este no es el caso. El análisis de la secuencia de los genes ADNr 16S a partir de hábitats dulceacuícolas proveen evidencias de una estructura bacteriana en el agua dulce diferente de las comunidades terrestres (Yannarell y Kent, 2009). Las comunidades bacterianas de agua dulce se caracterizan por la presencia de los filos bacterianos *Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycete*s y *Verrucomicrobia* (Zwart *et al.*, 2002; Logue *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2014; Read *et al.*, 2015).

El filo *Actinobacteria* forma uno de los grupos dominantes dentro de las comunidades bacterianas de agua dulce, representando más del 70% del bacterioplancton de ríos y lagos distribuidos globalmente (Tang *et al.*, 2009; Ghai *et al.*, 2014). La gran abundancia de este filo en ecosistemas acuáticos se relaciona con diferentes mecanismos que le permiten una supervivencia más exitosa en comparación con otros filos bacterianos. Por ejemplo, se ha observado que algunas actinobacterias pueden tener dos formas de nutrición: quimioheterótrofa y fotoheterótrofa, por lo que pueden obtener energía a través de los compuestos químicos y de la luz solar (Sharma *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2011). Otro mecanismo que favorece su supervivencia en ecosistemas acuáticos es el pequeño tamaño celular que presentan algunas actinobacterias (biovolumen celular <0,1 μm^3), lo cual incrementa el área de superficie por

volumen, por lo que se facilita la adquisición eficiente de nutrientes (Ghai *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de todos estos mecanismos de protección, se ha observado que altas concentraciones de nutrientes inorgánicos contribuyen a la disminución de las actinobacterias en los ecosistemas dulceacuícolas (Newton *et al.*, 2011; Newton y McMahon, 2011; McMahon y Read, 2013).

Las bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria*, son generalmente dominantes en los sistemas acuáticos. Este filo contiene fototrofos, quimiolitotrofos y quimioorganotrofos, y sus miembros pueden encontrarse en ambientes óxicos y anóxicos (Madigan *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2015). Dentro de este filo, los miembros de las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* se pueden encontrar en diversos ambientes, incluyendo la columna de agua y los sedimentos de sistemas de agua dulce y marinos. Los miembros de la clase *Alphaproteobacteria* pueden encontrarse en las capas más superficiales de ríos y lagos llevando a cabo el ciclo de los nutrientes en presencia de oxígeno. En tanto, los miembros de la clase *Gammaproteobacteria* más adaptados a condiciones físico-químicas particulares como por ejemplo, anoxia o altas concentraciones de sulfuro, pueden encontrarse en mayor proporción en las capas más profundas (Barberán y Casamayor, 2011). Esta clase se encuentra con mayor frecuencia en ambientes de aguas saladas (océanos y lagos salobres) y son menos abundantes en ambientes de agua dulce donde se consideran contaminantes. Se plantea que las bacterias de esta clase son miembros transitorios de los ecosistemas dulceacuícolas traídos de otros ambientes, como es el caso de las bacterias entéricas (Newton *et al.*, 2011). En el caso de la clase *Betaproteobacteria*, sus miembros son dominantes de las comunidades bacterianas dulceacuícolas y algunos grupos presentan una distribución muy amplia en lagos de diferentes partes del mundo (Logue *et al.*, 2008; Yannarell y Kent, 2009). Esta clase se encuentra en mayor proporción en ecosistemas acuáticos eutroficados y llevan a cabo la oxidación del amonio, la desnitrificación y la acumulación de polifosfatos (Wagner y Loy, 2002), lo que indica el importante papel de este grupo en el ciclo de los nutrientes en estos ecosistemas (Hartman *et al.*, 2008).

Con respecto al filo *Bacteroidetes*, este incluye a miembros de los géneros *Cytophaga*, *Bacteroides* y *Flavobacterium*, por lo que es conocido como el grupo *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). En ecosistemas dulceacuícolas, *Bacteroidetes* comprende la proporción principal de las comunidades bacterianas asociadas a partículas, y pueden encontrarse además en las profundidades de los lagos, donde degradan macromoléculas recalcitrantes (Newton *et al.*, 2011).

Entre tanto el filo *Cyanobacteria* comprende a las bacterias fototrofas, dominantes en la porción oxigenada de los lagos y ríos (Barberán y Casamayor, 2011). Muchas cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno, por lo que son esenciales en el ciclo del nitrógeno y además llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica. Los géneros de cianobacterias más comunes en agua dulce,

incluyen *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Synechococcus* y *Cyanothece*. Específicamente las picocianobacterias (0,2-2 µm), entre las que se incluyen los géneros *Synechococcus, Cyanobium* y *Cyanothece,* son dominantes en ecosistemas dulceacuícolas (Callieri *et al.*, 2012) y se ha confirmado en diferentes estudios realizados en lagos, que la concentración de picocianobacterias se incrementa con la disminución en la concentración de nutrientes (Callieri, 2007; Callieri *et al.*, 2012).

Aunque menos prominente que los filos anteriores, otros grupos bacterianos pueden encontrarse en sistemas de agua dulce, por ejemplo *Firmicutes* (o bacterias Gram positivas con bajo contenido G + C), los cuales se han encontrado en sedimentos de ecosistemas dulceacuícolas; *Verrucomicrobia*, que se han recuperado a partir de muestras de sedimentos y la columna de agua de lagos oligotróficos y eutróficos y *Planktomycetes* que se detectan con menor abundancia en los lagos, fundamentalmente adheridos a la materia particulada (Yannarell y Kent, 2009). Este último grupo está implicado en la oxidación anaerobia del amonio, por lo que ha despertado gran interés en la comunidad científica (Pollet *et al.*, 2011).

El conocimiento de la diversidad y las funciones de las comunidades bacterianas en los ecosistemas dulceacuícolas, puede brindar numerosos beneficios, los cuales incluyen la potencialidad de predecir a largo plazo los efectos de cambios en la estructura y función de las comunidades microbianas; así como la capacidad de evaluar, monitorear y restaurar ecosistemas acuáticos.

1.8. Técnicas moleculares utilizadas en el estudio de la estructura de las comunidades bacterianas

Los métodos moleculares o independientes de cultivo contribuyen a disminuir el sesgo en el análisis de la riqueza de las comunidades bacterianas comparado con los métodos dependientes de cultivo, debido a la presión selectiva que imponen estos últimos de crecer en un medio de cultivo sólido, favoreciendo el crecimiento de aquellas poblaciones dentro de la comunidad bacteriana capaces de formar colonias. Es por esto que los métodos dependientes de cultivo subestiman la riqueza de especies en una muestra, la cual es mejor estimada a través de los métodos independientes de cultivo que pueden detectar a las bacterias viables pero no cultivables (Kisand y Wikner, 2003; Burtscher *et al.*, 2009).

Los métodos moleculares de huella genética (*fingerprinting*) tales como la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE: siglas en inglés de *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP: siglas en inglés de *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y el análisis automatizado de los espacios intergénicos ribosomales (ARISA: siglas en inglés de *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), permiten establecer los perfiles de la comunidad y las afiliaciones filogenéticas de las especies detectadas en caso de que los fragmentos de ADN puedan ser secuenciados.

Particularmente, el análisis de la diversidad microbiana de ecosistemas dulceacuícolas mediante la DGGE consiste en: (1) la extracción del ADN total que contiene una mezcla de las poblaciones microbianas, (2) el empleo de cebadores específicos para la amplificación de genes de interés presentes en todos los miembros de la comunidad y (3) la separación de los productos de PCR con igual longitud pero diferente composición nucleotídica en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (Muyzer *et al.*, 1993; Duarte *et al.*, 2012). La DGGE permite obtener información taxonómica, debido a que las bandas obtenidas pueden ser escindidas, reamplificadas y secuenciadas. Así, esta técnica combina las ventajas del clonaje, la secuenciación y el T-RFLP (Duarte *et al.*, 2012). Sin embargo, los métodos de huella genética capturan solo una pequeña fracción de todas las especies microbianas presentes en los ecosistemas naturales y la mayoría de los métodos son semicuantitativos (Ramette, 2009; Litchman, 2010).

En los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías para la secuenciación masiva de ADN con un mayor rendimiento comparado con el método de Sanger. Las plataformas actualmente disponibles son comercializadas por Roche (454), Illumina (*Solexa/Genome Analyzer*) y *Applied Biosystems* (SOLiD) (Balzer *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2015). Estas plataformas permiten describir con precisión la composición de las comunidades microbianas. Específicamente la pirosecuenciación 454 es muy utilizada en la actualidad y no requiere subclonaje o manejo de clones individuales (Zhong *et al.*, 2015). Esta técnica se basa en la secuenciación de ADN *de novo* y en la detección del pirofosfato liberado durante la síntesis de ADN (Fakruddin *et al.*, 2012).

En la pirosecuenciación el cebador se hibrida al ADN molde de simple cadena marcado con biotina y se mezcla con las enzimas ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa y los sustratos adenosina 5´-fosfosulfato (APS) y luciferina (Gharizadeh *et al.*, 2007). Los cuatro desoxirrinucleótido trifosfatos (dNTP) se añaden por separado a la mezcla de reacción. La cascada comienza con la reacción de polimerización del ácido nucleico, cada nucleótido incorporado es seguido por la liberación de pirofosfato inorgánico en cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido que se incorporó. Posteriormente el pirofosfato liberado se convierte en ATP mediante la ATP sulfurilasa en presencia de APS. El ATP generado proporciona la energía necesaria para la conversión de la luciferina en oxiluciferina mediante la acción de la luciferasa, produciendo una luz visible en cantidad proporcional a la cantidad de ATP formado. La luz emitida con un máximo de 560 nm de longitud de onda se detecta mediante un fotomultiplicador. La apirasa degrada continuamente el ATP y los dNTP no incorporados en la reacción. Como se conoce el nucleótido que se añade, la secuencia del ADN molde puede determinarse (Fakruddin *et al.*, 2012).

La tecnología de pirosecuenciación se ha aplicado para la caracterización metagenómica de comunidades microbianas de diferentes ambientes, como son ambientes acuáticos, suelo,

humedales naturales, entre otros (Nacke *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2013; García-Armisen *et al.*, 2014; Zhong *et al.*, 2015).

1.9. Influencia de factores físicos y químicos en la distribución, abundancia y actividad de las comunidades bacterianas en ecosistemas dulceacuícolas

Numerosos factores físicos y químicos pueden afectar la estructura de la comunidad bacteriana en ecosistemas acuáticos, los cuales incluyen la temperatura (Lindström *et al.*, 2005; Degerman *et al.*, 2013), el pH (Lindström *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2005), el oxígeno disuelto (Spietz *et al.*, 2015), la calidad de la materia orgánica disuelta (Kritzberg *et al.*, 2006; Amado *et al.*, 2013), la concentración de nutrientes (Berdjeb *et al.*, 2011; Llirós *et al.*, 2014), entre otros.

1.9.1. Temperatura

Las propiedades lumínicas y calóricas de un cuerpo de agua están influenciadas tanto por el clima, como por las características del propio cuerpo de agua: su composición química, suspensión de sedimentos, etc. La temperatura del agua regula en forma directa la concentración de oxígeno, la tasa metabólica de los organismos acuáticos y los procesos vitales asociados, como son el crecimiento y la reproducción (Baron *et al.*, 2003). La temperatura es un factor ambiental crítico que afecta el metabolismo microbiano y desempeña un papel fundamental en diferentes aspectos fisiológicos y estructurales de las comunidades microbianas. Estudios recientes han demostrado que la temperatura correlaciona positivamente con la productividad (PB) y la respiración bacterianas (RB), pero tiene una correlación negativa con la eficiencia de crecimiento bacteriano (ECB=PB/[PB+RB]) (Amado *et al.*, 2013). Diversos autores plantean que un incremento en la temperatura contribuye a la disminución de la solubilidad de los gases en la columna de agua, disminuyendo la disponibilidad de oxígeno para la respiración de los organismos y la descomposición de la materia orgánica y los contaminantes (Carpenter *et al.*, 2011; Ouffoué *et al.*, 2013).

En los lagos, la absorción de energía solar y su disipación como calor son procesos críticos en el desarrollo de gradientes de temperatura entre la superficie y las capas más profundas de agua, así como en los patrones de circulación del agua. Los patrones de circulación y los gradientes de temperatura a su vez, influyen sobre los ciclos de nutrientes, sobre la distribución del oxígeno disuelto y sobre la distribución y el comportamiento de los organismos (Baron *et al.*, 2003). En este sentido, Sakami (2008) e Ibekwe *et al*. (2012) plantearon que la variabilidad en la comunidad bacteriana estaba asociada con la sucesión de la temperatura en la columna de agua y con la temperatura en las diferentes estaciones del año. Ruiz-González *et al*. (2013) sugirieron que la conductividad eléctrica, la temperatura y el nitrógeno inorgánico disuelto fueron los principales determinantes ambientales que influyeron sobre la composición de la comunidad bacteriana en las estaciones de muestreo de tres grandes reservas del Río Ebro (Península Ibérica, España).

En sistemas con bajo contenido de nutrientes (oligotróficos), un aumento en la temperatura puede conllevar a un efecto negativo sobre el crecimiento, debido a que el metabolismo basal se incrementa pero no dispone de la energía necesaria. En cambio en sistemas con alto contenido de nutrientes (eutróficos), los organismos cuentan con un exceso de energía que puede ser utilizado en el aumento de la biomasa. Bajo estas condiciones se produce un aumento de la biomasa con el aumento de la temperatura hasta cierto punto, donde las enzimas y algunos procesos celulares dejan de funcionar (Degerman *et al.*, 2013).

1.9.2. pH

Los microorganismos pueden existir en ambientes que varían desde extremadamente ácidos (por debajo de pH 0) hasta muy alcalinos (tan altos como pH 12), y se agrupan en tres grupos principales, acidófilos (crecimiento entre pH 0 – 5,5), neutrófilos (pH 5,5 – 8,0) y alcalófilos (pH 8,0 – 12) (Madigan *et al.*, 2015).

Aunque la mayoría de los microorganismos de agua dulce son neutrófilos, existen algunas diferencias entre los grupos principales. Las bacterias y los protozoos tienden a habitar en ambientes cercanos a la neutralidad, mientras que los hongos prefieren ambientes ligeramente ácidos (pH 4-6). Las algas muestran una variación amplia, con muchas especies fitoplanctónicas adaptadas a aguas ácidas (frecuentemente oligotróficas) o aguas alcalinas (frecuentemente eutróficas). Bajo condiciones de afloramientos algales en aguas ricas en nutrientes, los lagos se vuelven altamente alcalinos (pH 11), condiciones que toleran las cianobacterias (Sigee, 2005).

El pH del ambiente influye sobre la estructura y función de las comunidades bacterianas en los ecosistemas acuáticos (Lindström *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2011); por ejemplo, se ha observado que algunas bacterias del filo *Actinobacteria* son más abundantes en lagos ácidos con altas concentraciones de carbono orgánico disuelto (COD), en cambio, otras están más adaptadas a condiciones alcalinas con bajas concentraciones de COD. En el caso del filo *Bacteroidetes* sucede algo similar, ya que algunas bacterias son abundantes en lagos con pH 6,5-7,3; sin embargo, otras bacterias de este filo son más frecuentes a pH 7,7-9,5 (Newton *et al.*, 2011). El pH también puede influir en la disociación y solubilidad de muchas moléculas relacionadas con la vida microbiana, como es el caso de la disponibilidad de nutrientes, la solubilidad del CO_2 y la velocidad del proceso de fotosíntesis (Lindström *et al.*, 2005).

1.9.3. Oxígeno disuelto

Esta variable alcanza un nivel elevado en aguas superficiales limpias. Sus bajas concentraciones suelen indicar la presencia de materia orgánica que deteriora la calidad del agua y amenaza a las diferentes formas de vida acuáticas. En un curso de agua de buena calidad, la cantidad de oxígeno disuelto es superior a cuatro partes por millón, cuando el resultado del análisis da un valor inferior, indica serios problemas de la calidad del agua (De La Cruz, 2008).

De acuerdo a la concentración de oxígeno, los ecosistemas dulceacuícolas son usualmente clasificados como óxicos (6-12 $mgO_2.L^{-1}$), subóxicos (0,1-6 $mgO_2.L^{-1}$) y anóxicos (<0,1 $mgO_2.L^{-1}$), a 20ºC y a presión atmosférica (Briée *et al.*, 2007). El consumo de oxígeno y la regeneración de nutrientes están acoplados, por ejemplo, un incremento en el consumo de oxígeno resulta en un incremento en la liberación o regeneración de nutrientes (Chen *et al.*, 2010); mientras que un incremento en las concentraciones de nutrientes inorgánicos como los nitratos y fosfatos, tienden a disminuir las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua debido al proceso de eutroficación (Sigee, 2005).

Las bacterias estrictamente aerobias utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la respiración, por lo que el oxígeno molecular es vital para estos microorganismos. En aguas bien oxigenadas, las fluctuaciones en el contenido de oxígeno disuelto no afectan grandemente las funciones vitales, siempre y cuando la concentración de éste no decaiga significativamente, sin embargo, en aguas pobres en oxígeno, una pequeña disminución del contenido de oxígeno provoca grandes cambios en las comunidades microbianas (Spietz *et al.*, 2015).

1.9.4. Nutrientes orgánicos e inorgánicos

Las bacterias requieren macronutrientes y micronutrientes para su crecimiento. Entre los macronutrientes se encuentran el carbono, el nitrógeno y el fósforo, los cuales usualmente regulan la actividad bacteriana (Schmitz y Abreu, 2009).

Las concentraciones de nutrientes influyen en la biomasa y composición taxonómica de los organismos fototrofos y subsecuentemente afectan al bacterioplancton heterótrofo, el cual depende de la producción primaria de los fotoautótrofos. En regiones montañosas, la mayoría de los lagos se caracterizan por presentar bajas concentraciones de nutrientes y bajos suplementos de sustratos orgánicos a partir de productores primarios. De esta forma, la entrada de carbono orgánico disuelto (COD) a partir de fuentes terrestres puede considerarse como un importante suplemento de carbono para el bacterioplancton heterótrofo en estos ecosistemas (Fujii *et al.*, 2011).

Por otra parte, la asimilación del carbono orgánico disuelto por el bacterioplancton heterótrofo es un paso clave en el flujo del carbono referido como “el lazo microbiano”, el cual se reconoce como una importante vía de adquisición de carbono en ecosistemas marinos y dulceacuícolas (Farjalla *et al.*, 2009; Amado *et al.*, 2013). Además, se ha informado que la materia orgánica disuelta, se descompone fotoquímicamente en nitrógeno biodisponible, el cual mejora la actividad bacterioplanctónica en muchos ecosistemas acuáticos. Aunque también se plantea, que la fotólisis de la materia orgánica disuelta puede generar sustancias inhibidoras tales como las especies reactivas del oxígeno. Estas sustancias inhibidoras pueden contribuir a la reducción del metabolismo microbiano, mediante la afectación de estructuras celulares, lo cual conlleva al aumento en la activación de los mecanismos de reparación (que consumen energía) y por tanto a la reducción de la eficiencia de crecimiento bacteriano (Amado *et al.*, 2013).

Cuando la carga de nutrientes es baja, los lagos poco profundos son usualmente del tipo aguas claras, con baja biomasa fitoplanctónica y densas macrófitas sumergidas. Sin embargo, cuando se produce un aumento en las concentraciones de nutrientes, estos lagos cambian a un estado de turbidez, donde se desarrollan los afloramientos fitoplanctónicos y las macrófitas sumergidas desaparecen, ocurriendo el proceso de eutroficación. La eutroficación se produce de forma natural y se define como el enriquecimiento desmesurado de las aguas con compuestos que contienen nitrógeno y fósforo (Chislock *et al.*, 2013). El nitrógeno y el fósforo son nutrientes que se encuentran en concentraciones limitantes de forma natural en los ecosistemas acuáticos; sin embargo, la actividad antropogénica libera grandes cantidades de estos nutrientes, acelerando el proceso de eutroficación y con ello la pérdida de biodiversidad (Khan y Mohammad, 2014).

Muchos de los constituyentes inorgánicos disueltos presentes en el agua son requeridos para la producción de biomasa por los microorganismos heterótrofos y autótrofos y califican como "nutrientes inorgánicos" (Sigee, 2005). Algunas de las transformaciones de estos compuestos inorgánicos solubles se producen en los lagos y ríos. Por ejemplo la nitrificación (proceso mediante el cual se convierte el amonio a nitrato) mediada por arqueas y bacterias oxidativas, proporciona el nitrato para la desnitrificación biológica en el ciclo del nitrógeno (Herrmann *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). El proceso de nitrificación, consume una gran cantidad de oxígeno disuelto, lo cual conlleva a la disminución de esta especie química en ríos y arroyos; particularmente a la salida de los efluentes de plantas de tratamiento de residuales, donde las concentraciones de amonio y materia orgánica liberadas son elevadas (Sigee, 2005).

A pesar de que el amonio es eliminado a través del proceso de nitrificación, este elemento puede acumularse en las columnas de agua especialmente en lagos eutroficados. El amonio excesivo puede ser tóxico para la biota del agua y su oxidación puede disminuir los niveles de oxígeno disuelto (Tanner *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2010), lo cual puede afectar o matar a los organismos acuáticos aerobios.

En cuanto al fósforo, este está presente en los ecosistemas acuáticos en forma orgánica soluble (ésteres fosfatos y fosfonatos), orgánica insoluble (biota y detrito) e inorgánica soluble (fosfatos). El fósforo orgánico disuelto, se convierte en fosfato por la acción de las enzimas fosfatasas y junto al fosfato soluble total, constituye el fósforo biológicamente disponible dentro del agua (McMahon y Read, 2013).

En sentido general, altas concentraciones de nutrientes inorgánicos pueden favorecer el crecimiento de algunos miembros de la comunidad bacteriana, como es el caso de las bacterias pertenecientes a las clases *Betaproteobacteria* y *Bacteroidia*; pero pueden contribuir también a la disminución de los miembros pertenecientes a la clase *Actinobacteria* (Newton *et al.*, 2011; McMahon y Read, 2013).

1.10. Funciones de los microorganismos en los ecosistemas acuáticos

Los microorganismos desempeñan un importante papel en todos los ecosistemas, estos contribuyen con más de la mitad de la producción primaria global y ocupan posiciones claves en los ciclos biogeoquímicos (Litchman, 2010; García-Armisen *et al.*, 2014). En los ecosistemas acuáticos, las bacterias degradan y mineralizan compuestos orgánicos, uniendo la reserva de materia orgánica disuelta a niveles tróficos superiores (Huang *et al.*, 2011; Peter, 2011). Además, una gran cantidad de energía y materia en estos ecosistemas pasa a través de las comunidades bacterianas (Yannarell y Kent, 2009), lo cual tiene un gran impacto sobre la calidad del agua de los ecosistemas dulceacuícolas. Determinadas funciones metabólicas, como la degradación de la materia orgánica y la asimilación de carbono, nitrógeno y fósforo son catalizadas por enzimas producidas por los microorganismos (Frossard, 2011).

Entre las bacterias productoras de enzimas extracelulares se han descrito diferentes géneros como son: *Pseudomonas, Bacillus, Acinetobacter, Arthrobacter, Clostridium, Staphylococcus* y *Cytophaga* (Vermelho *et al.*, 2013). Particularmente, las especies de *Bacillus* sp. producen diferentes enzimas extracelulares entre las que se encentran: proteasas, amilasas, fosfatasas, lipasas, esterasas, entre otras. Todas estas enzimas son importantes en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y además poseen aplicación industrial y biotecnológica. Se ha sugerido que las bacterias formadoras de endosporas pueden contribuir a la autopurificación del agua y podrían tener grandes potencialidades biotecnológicas comparado con otros grupos bacterianos (Bal *et al.*, 2009; Geethanjali y Subash, 2011). La capacidad de *Bacillus* sp. de producir enzimas extracelulares en los ecosistemas acuáticos, juega un importante papel en la descomposición de biopolímeros, incluyendo proteínas, celulosas y otros carbohidratos complejos. Tsuboi *et al*. (2014) plantearon que la proteólisis llevada a cabo por las metaloproteasas neutras de *Bacillus* sp., puede incrementar marcadamente la concentración de amonio en el agua intersticial de los sedimentos en lagos hipereutróficos, contribuyendo al suplemento de nitrógeno desde el sedimento hasta el agua que lo cubre.

Por otra parte, se ha observado que las comunidades bacterianas asociadas a las raíces de las macrófitas acuáticas resultan importantes en la transferencia de energía y en el reciclaje de nutrientes en los ecosistemas acuáticos. Particularmente, en la disminución de la tasa de eutroficación de los ecosistemas acuáticos, tienen un papel esencial las bacterias heterótrofas y las bacterias epifíticas de varias hidromacrófitas como *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua), *Nymphaea lotus* (Nenúfar blanco egipcio) y *Pistia stratiotes* (Lechuga de agua) (Haroon y Daboor, 2009).

Las plantas acuáticas *Eichhornia crassipes*, *Hydrocotyle umbellata* (Ombligo de Venus) y *Lemna* sp. (Lenteja de agua), son conocidas por su efecto beneficioso en los procesos de tratamiento de aguas residuales. El sistema radicular de estas plantas proporciona una amplia superficie para la adsorción de sustratos biológicos atractivos para los microorganismos que se

encuentran en abundancia en las aguas residuales. Se plantea que estos microorganismos y su asociación con las plantas desempeñan un papel esencial en los procesos de tratamiento de agua (Kirzhner *et al.*, 2009). Además las raíces de las macrófitas pueden transportar oxígeno y secretar exudados tales como aminoácidos y azúcares. Estos exudados pueden influir en la estructura y función de las comunidades bacterianas en el rizosedimento (Kiely *et al.*, 2006). Yi *et al*. (2013) sugirieron que el cultivo de *Eichhornia crassipes* en aguas eutróficas puede contribuir al aumento de la diversidad y abundancia de bacterias desnitrificantes, resultando en una mayor pérdida de nitrógeno gaseoso a través del proceso de desnitrificación. Por esta razón, el estudio de las potencialidades de los microorganismos que habitan las raíces de las plantas acuáticas puede contribuir a la recuperación de ecosistemas acuáticos contaminados.

Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis de la dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en el río Almendares y las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"

Para el análisis de la dinámica de comportamiento de los coliformes termotolerantes (CTE) y *E. coli*, se seleccionaron nueve estaciones de muestreo en el río Almendares, ubicadas en el área del Gran Parque Metropolitano de La Habana (GPMH) teniendo en cuenta estudios previos acerca de las principales fuentes de contaminación que llegan a estos puntos de muestreo del río Almendares (CCAV, 1999). Estas estaciones de muestreo se analizaron en los meses de noviembre 2005 y enero 2006 y se realizaron un total de dos muestreos en cada estación. Además se estudiaron 10 estaciones de muestreo en el Complejo Turístico "Las Terrazas" localizado en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario en la provincia Artemisa, en el período mayo-junio 2006 y se realizaron un total de dos muestreos en cada estación analizada. Las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas" no se han estudiado con anterioridad desde el punto de vista microbiológico, por lo que para la selección de las estaciones se tuvieron en cuenta los sitios más visitados por el turismo nacional e internacional, la cercanía de la comunidad de "Las Terrazas" y de las lagunas de oxidación para el tratamiento de aguas residuales domésticas a los puntos de muestreo, y algunos arroyos forestales que estuvieran alejados de viviendas o cualquier otra fuente de contaminación. Las estaciones de muestreo y su localización según el sistema de Geoposición Satelital (GPS) se describen en la Tabla 1 (Anexo 1).

Tabla 1. Localización de las estaciones de muestreo en el río Almendares y el Complejo Turístico "Las Terrazas" según el sistema de Geoposición Satelital.

Estaciones de muestreo		Coordenadas	
Símbolo	**Almendares**	**Latitud**	**Longitud**
RC	Río Cristal	23°01'59.99''	82°24'03.77''
P	Arroyo Paila	23°03'23.94''	82°24'09.75''
D	Elevados 100 y Boyeros	23°04'18.96''	82°24'04.78''
S	Arroyo Santoyo	23°05'56.66''	82°24'30.74''
E	Puentes Grandes avenida 51	23°05'59.46"	82°24'28.64"
M	Arroyo Mordazo	23°05'58.64''	82°24'12.58''
G	Puente de Piedra	23°06'29.83''	82°24'25.04''
H	Puente Almendares calle 23	23°07'07.25''	82°24'32.57''
PH	Puente de Hierro	23°07'36.55''	82°24'40.22''

Continuación **Tabla 1**

Estaciones de muestreo		Coordenadas	
Símbolo	**Complejo Turístico "Las Terrazas"**	**Latitud**	**Longitud**
SN	Río San Juan (antes de la presa El Palmar)	22°50'42.03''	82°56'23.04''
S-1	Presa El Palmar (Río San Juan)	22°50'42.35''	82°56'23.33''
S-2	Presa San Juan	22°50'46.01''	82°56'27.09''
S-3	Baños Río San Juan	22°49'24.02''	82°55'35.08''
S-4	Arroyo Nortey	22°50'54.09''	82°57'29.01''
S-5	Arroyo Forestal I	22°50'46.03''	82°59'03.07''
S-6	Arroyo Masón	22°50'48.08''	82°58'26.09''
S-7	Arroyo Forestal II	22°50'47.09''	82°58'25.16''
S-8	Río Bayate I	22°50'22.04''	82°59'24.04''
S-9	Río Bayate II	22°50'14.00''	82°59'26.05''

2.1.1. Toma de muestras

Las muestras puntuales de agua se tomaron aproximadamente a un metro de la orilla y a 15 cm de profundidad. Las colectas se realizaron en horas de la mañana y las muestras se trasladaron al laboratorio en frascos plásticos estériles de 1 L en una nevera refrigerada (4°C) y se procesaron en un período de tiempo menor a las 12 h según las recomendaciones de AFNOR (2009).

2.1.2. Determinación de coliformes termotolerantes y *E. coli*

La concentración de coliformes termotolerantes se determinó mediante el empleo de la técnica de filtración por membrana (FM) que consiste en la filtración de las muestras colectadas (o diluciones de las mismas) a través de membranas estériles de nitrato de celulosa (Sartorius, con un tamaño del poro de 0,45 µm y 47 mm de diámetro) utilizando un equipo de filtración (Sartorius). Las membranas se colocaron en placas de 47 mm con medio Agar lactosa con Tergitol (concentración final 0,095‰ peso/volumen) y cloruro de trifenil 2,3,5-tetrazolio (TTC) (concentración final 0,024‰ peso/volumen) según la metodología establecida por las normas AFNOR (2009). Las colonias amarillo-naranja con un halo amarillo alrededor después de 24 h a 44 °C se consideraron colonias del grupo de bacterias coliformes termotolerantes. Para la determinación de la concentración de *E. coli* se empleó la técnica de filtración por membrana y el medio de cultivo cromogénico Agar Chromocult (Merck, Darmstadt, Germany). Las colonias azul oscuro o violeta obtenidas después de 24 h de incubación a 37 ºC se consideraron colonias de *E. coli* (Ouattara *et al*., 2014). Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresaron en UFC por 100 mL de muestra.

A partir de este análisis se seleccionaron tres estaciones de muestreo en el río Almendares y tres estaciones de muestreo en el río San Juan (Complejo Turístico "Las Terrazas"). Para la selección de estas estaciones se tomó como criterio las diferencias en los niveles de contaminación presentes en las mismas. Además, en el caso de las estaciones seleccionadas

en el Complejo Turístico “Las Terrazas” se tuvo en cuenta la importancia para el turismo nacional e internacional que visita esta localidad, así como la cercanía a las estaciones de sistemas de tratamientos de aguas residuales domésticas.

2.2. Análisis de la calidad físico-química y microbiológica en las estaciones de los ríos Almendares y San Juan en el periodo 2011-2013

A partir de las estaciones de muestreo seleccionadas en los ríos Almendares y San Juan, se evaluó la calidad físico-química y microbiológica de estos ecosistemas utilizando 10 indicadores físico-químicos y tres indicadores bacterianos de contaminación fecal en el periodo comprendido entre octubre 2011-julio 2013. En este mismo periodo se analizó la influencia de la contaminación química y fecal de estos ecosistemas sobre la estructura de las comunidades bacterianas. Además se realizaron aislamientos en las tres estaciones seleccionadas del río Almendares para conocer la función potencial de bacterias productoras de enzimas extracelulares dentro de las comunidades bacterianas de un ecosistema contaminado.

La toma de las muestras de agua para la realización de los análisis físico-químicos y microbiológicos, así como para el análisis de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan se realizó como se explicó en el epígrafe 2.1.1. Particularmente para el análisis de las comunidades bacterianas, se tomaron tres muestras puntuales al momento de la colecta.

2.2.1. Determinación de los indicadores físico-químicos

La medición de los indicadores físico-químicos se realizó *in situ* con el uso del multímetro (Multi 340 i/SET). En todos los puntos de muestreo se determinó la temperatura, el pH, la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos y el oxígeno disuelto. Los datos de precipitaciones fueron proporcionados por la estación meteorológica de Casablanca del Instituto de Meteorología de La Habana para el río Almendares y por la Estación Ecológica Sierra del Rosario en Artemisa para el río San Juan. Se tuvieron en cuenta las precipitaciones de hasta 10 días antes de la fecha de muestreo.

Para la determinación de los nutrientes inorgánicos (nitratos, nitritos, amonio y fosfatos) y la demanda química de oxígeno (DQO), se procedió a realizar la filtración al vacío de 250 mL de cada muestra transportada, para lo que se utilizaron filtros de fibra de vidrio GF/F (Millipore) de diámetro de poro de 0,45 µm previamente desecados a 80 °C. Se reservaron 20 mL de cada filtrado en cinco tubos diferentes, uno para cada nutriente inorgánico y para el ensayo de la DQO. Las muestras se analizaron por triplicado.

La determinación de los nutrientes inorgánicos y la DQO se realizó mediante métodos colorimétricos. Específicamente, la DQO se determinó mediante el método de digestión de reactor dicromato, para lo cual se empleó el test en cubetas DQO (Spectroquant 1.152.0001, gama de 0-1500 $mg.L^{-1}$ de DQO). Para la determinación del amonio se empleó el método de

Nessler y para el fosfato se utilizó el método azul del ácido ascórbico. Todos estos métodos se encuentran descritos en los catálogos de la APHA (2012).

2.2.2. Determinación de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos

Las concentraciones de los coliformes termotolerantes y *E. coli* se determinaron como se explicó previamente en el epígrafe 2.1.2.

Para la determinación de la concentración de enterococos se empleó la técnica de filtración por membrana y se utilizó el medio de cultivo cromogénico Agar Chromocult para enterococos (Merck, Darmstadt, Germany). Las colonias rojas obtenidas después de 24 h de incubación a 37 ºC se consideraron colonias de enterococos (Ouattara *et al.*, 2014). Las muestras se analizaron por triplicado y en todos los casos los resultados se expresaron en UFC por 100 mL de muestra.

2.3. Análisis de la comunidad bacteriana de los ríos Almendares y San Juan en el periodo 2011-2013

2.3.1. Extracción de ADN y amplificación de los fragmentos del gen ADNr 16S

La biomasa microbiana se colectó a partir de la columna de agua y se concentró por filtración. Alícuotas de cada muestra (0,5 L para las estaciones del río Almendares y 1 L para las estaciones del río San Juan) se filtraron por triplicado a través de filtros de nitrato de celulosa de 5 µm y posteriormente de 0,22 µm. Se emplearon diferentes volúmenes de muestra teniendo en cuenta el nivel de contaminación de los ríos analizados y que los volúmenes seleccionados permitieran la transportación y preservación de las muestras (Freese *et al.*, 2006; Buckalew *et al.*, 2015).

A partir de los filtros de 0,22 µm se realizó la extracción de ADN mediante el método de SDS-fenol-cloroformo (Oh *et al.*, 2011). Todas las muestras de ADN se purificaron mediante *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Las soluciones de ADN purificadas se usaron directamente en las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) que se describen a continuación.

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad y facilitar el análisis de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante, se realizó la técnica de PCR anidado. Durante la primera amplificación el tubo de PCR contenía 25 µL de la mezcla de reacción que consistía en una concentración de 1 X de la mezcla *OneTaq Quick-Load* 2 X *Master Mix* con tampón estándar (BioLabs, New England), una concentración final de 0,2 µM de los cebadores universales 27F (5´-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-TACCTTGTTACGACTT-3´) para la amplificación del gen ADNr 16S (Zhou *et al.*, 2009), 1 µL de ADN molde (70 ng de concentración aproximadamente) y agua bidestilada estéril. Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 ºC, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 30 s a 94 ºC, 30 s a 55 ºC y 90 s a 72 ºC y un paso de extensión final de 5 min a 72 ºC.

A partir de los productos de la primera amplificación se realizaron dos reacciones de amplificación independientes, una con los cebadores 341FGC clamp (5´-GCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGG-3´) y 534R

(5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´) que amplifican la región variable V3 del ADNr 16S del dominio *Bacteria* (Muyzer *et al.*, 1993) y la otra con los cebadores 517FGC (5´-GTGCCAGCAGCCGCGG-3´) (Gich *et al.*, 2005) y 1061R (5´-CACGACACGAGCTGACGAC-3´) (Degnan y Ochman, 2012) que amplifican las regiones variables V4-V6 del ADNr 16S del dominio *Bacteria*. Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL de la mezcla de reacción que contenía una concentración de 1 X de la mezcla *OneTaq Quick-Load* 2 X *Master Mix* con tampón estándar (BioLabs, New England), 0,2 µM de los cebadores, 1 µL del producto amplificado y agua bidestilada estéril. Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 ºC, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 1 min a 95 ºC, 1 min a 53 ºC y 2 min a 72 ºC y un paso de extensión final de 7 min a 72 ºC. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un Termociclador (ThermalCycler C 1000 TM BIO-RAD).

Para la visualización de los productos amplificados se prepararon geles de agarosa (BIORAD Certified TM PCR Agarose Cat. #161-3104) al 1 %, y se colocaron en cada pozo 3 µL del producto de la PCR obtenido más 2 µL del tampón de carga (Vivantis, USA). Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron a un voltaje de 100 V por un tiempo de 28 min. Posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (1 $\mu g.mL^{-1}$) y se fotografiaron sobre un gabinete transiluminador UV con una cámara de video (*Alpha Innotech Multimage Light Cabinet Filter Positions*).

2.3.2. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y secuenciación de las bandas predominantes

Las electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante se realizaron mediante el sistema INGENY phor U (Rafer, España). Los productos de PCR obtenidos a partir de la reacción con los cebadores 341FGC y 534R se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % (peso/volumen) en tampón 1 X TAE (20 mM Tris, 10 mM acetato, 0,5 mM EDTA pH 8), en tanto los productos obtenidos de la reacción con los cebadores 517FGC y 1061R se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7 %. Los geles de poliacrilamida se hicieron con un gradiente desnaturalizante de 20-70% (donde el 100 % del desnaturalizante contenía 7 M de urea y 40 % de formamida). Todas las electroforesis se realizaron a un voltaje de 200 V por 6 h y 30 min a 60 ºC. Después de remover los platos del tanque de la DGGE, los geles se tiñeron con SYBR Gold (dilución 1:10 000; FMC BioProducts, Rockland, ME, Estados Unidos de América) durante una hora. Los geles teñidos se fotografiaron sobre un gabinete transiluminador UV con una cámara de video (*Alpha Innotech Multimage Light Cabinet Filter Positions*).

Para conocer la identidad de las poblaciones bacterianas predominantes, a partir de los geles obtenidos con los productos de la reacción con los cebadores 517FGC y 1061R se cortaron las bandas más intensas que estuvieran presentes en las diferentes estaciones de muestreo y aquellas que sólo estuvieran presentes en alguna muestra específica. Las bandas seleccionadas se colocaron en tubos eppendorf con agua bidestilada estéril. Los tubos se

colocaron en refrigeración a 4 ºC toda la noche y posteriomente se amplificaron los fragmentos de ADN en un volumen final de 25 µL de la mezcla de reacción que consistía en una concentración de 1 X de la mezcla *OneTaq Quick-Load* 2 X *Master Mix* con tampón estándar (BioLabs, New England), una concentración final de 0,2 µM de los cebadores 517F (5´-CCAGCAGCCGCGGTAA-3´) (Gich *et al.*, 2005) y 1061R, 1 µL del ADN molde de la banda extraída y agua bidestilada estéril. Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 ºC, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 30 s a 94 ºC, 30 s a 55 ºC y 90 s a 72 ºC y un paso de extensión final de 5 min a 72 ºC.

Los productos de la reacción se visualizaron en geles de agarosa al 1 % y posteriormente se purificaron y secuenciaron en Macrogen Europa (Amsterdam, Holanda). El análisis de las secuencias se realizó mediante la comparación de las secuencias problema con las secuencias de referencia en el Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI por sus siglas en inglés), a través del programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

2.3.3. Pirosecuenciación 454

La pirosecuenciación 454 del gen ADNr 16S se empleó como técnica complementaria de la DGGE para el análisis de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan durante el último año de muestreo (febrero-julio 2013). La pirosecuenciación se basa en los protocolos descritos previamente por Callaway *et al*. (2009) y Smith *et al*. (2010). Se utilizaron los cebadores 27F (5´-GAGTTTGATCNTGGCTCAG-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 por sus siglas en inglés de *Research and Testing Laboratory*) (Lubbock, Texas, Estados Unidos de América). Las secuencias generadas en este estudio se pueden descargar a partir de los Archivos de Lectura de Secuencias del NCBI (NCBI-SRA por sus siglas en inglés de *NCBI Sequence Read Archives*) con el número de acceso SRP063983.

2.4. Aislamiento y caracterización micromorfológica-tintorial de aislados bacterianos del río Almendares

Para el aislamiento se colectaron muestras de la columna de agua y de plantas procedentes de tres estaciones del río Almendares [Río Cristal (RC), Paila (P) y Puente de Hierro (PH)]. Para la colecta de agua se procedió como se explicó en el epígrafe 2.1.1. A partir de las muestras de agua se prepararon diluciones seriadas en solución salina (NaCl, 0,8 %) desde 10^{-1} hasta 10^{-6}. Se sembraron 100 µL de cada dilución por diseminación con espátula de Drigalsky estéril, en placas Petri de 90 mm de diámetro, con medio Agar Nutriente. La siembra de cada dilución se realizó por triplicado y las placas se incubaron a 30 ºC por 48-72 h. Pasado el período de incubación, las colonias representativas con diferente morfología se sembraron en Agar Nutriente por agotamiento y se incubaron a 30 ºC durante 24 h.

En el caso de la colecta de las plantas, se realizó un estudio previo mediante el cual se colectaron las plantas presentes en cada una de las tres estaciones de muestreo del río Almendares. A partir de este estudio se seleccionaron las más abundantes en cada estación de muestreo y que estuvieran presentes en al menos dos de las tres estaciones analizadas. Además, se tuvo en cuenta que en la literatura se describiera la aplicación de las plantas seleccionadas en la fitorremediación. Las plantas fueron identificadas en el Jardín Botánico Nacional de Cuba (Dra. Cristina Panfet). De acuerdo al criterio de selección seguido, se colectaron cinco plantas por cada especie seleccionada, ubicadas a lo largo de la margen izquierda del río (10 m de largo y 50 cm de profundidad). Las plantas colectadas fueron *Eichhornia crassipes* (Jacinto de agua) (RC y PH), *Pistia stratiotes* (Lechuga de agua) (RC), *Cabomba* sp. (RC), *Commelina* sp. (RC y P), *Bidens pilosa* L. (Romerillo) (RC, P y PH) e *Hydrocotyle* sp. (Ombligo de Venus) (RC y P). Todas las muestras se colectaron en la mañana, se trasladaron en bolsas plásticas estériles colocadas en una nevera refrigerada a 4 ºC y se procesaron en un tiempo menor de 12 h. En todo el período, el nivel del río estuvo muy bajo y algunas plantas se colectaron en el lugar que anteriormente ocupaba el agua.

Las cinco plantas de cada especie colectadas en cada estación de muestreo se unieron para formar una muestra homogénea. Se pesó un gramo de raíces de las plantas con el sedimento adherido (rizosedimento). El rizosedimento se diluyó en 100 mL de solución salina y se prepararon diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6}. Posteriormente se siguió el mismo protocolo utilizado para las muestras de agua.

La pureza de cada aislado y la determinación de las características micromorfológicas-tintoriales se comprobó mediante la Tinción de Gram (Koneman *et al.*, 1999). Los aislamientos bacterianos se conservaron en Agar Nutriente en plano inclinado a 4 °C y en LB más glicerol al 30 % a -30 °C.

A partir de la caracterización micromorfológica-tintorial, se procedió a la selección del grupo bacteriano aislado con mayor frecuencia. Dentro de este grupo, a una muestra representativa de aislados de las tres estaciones de muestreo del río Almendares y de las diferentes plantas colectadas, se les determinó la presencia de enzimas extracelulares.

2.5. Determinación de enzimas extracelulares a partir de aislados bacterianos del río Almendares

2.5.1. Producción de proteasas y amilasas

Para la determinación de la producción de proteasas y amilasas, se preparó a partir de cada aislado una suspensión bacteriana a una concentración de 1 x 10^8 células.mL^{-1} correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland.

Para la detección de proteasas, se depositaron 10 µL de cada suspensión bacteriana sobre la superficie del medio Agar Triptona Soya (TSA) con 1 % de gelatina. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente se

inundaron las placas con 8-10 mL de reactivo de Frazier (Harrigan y McCance, 1968). La gelatina no hidrolizada forma con el reactivo un precipitado blanco opaco, mientras que la gelatina hidrolizada aparece como una zona clara. La producción de enzimas se calculó como la diferencia entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo transparente según Gorlach-Lira y Coutinho (2007).

Para la detección de amilasas, se depositaron 10 µL de cada suspensión bacteriana sobre la superficie del medio TSA que contenía 1 % de almidón. Los ensayos se realizaron por triplicado y las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Después del crecimiento bacteriano, se adicionaron 5 mL de solución de iodo (1 %). La presencia de un halo incoloro alrededor de la colonia indicó la secreción de amilasas. La producción de enzimas se calculó como la diferencia entre el diámetro de la colonia y el diámetro del halo incoloro según Khan *et al*. (2011).

2.5.2. Determinación de otras enzimas extracelulares mediante el sistema API ZYM

Los aislados con mayores producciones de proteasas y amilasas se seleccionaron para determinar su capacidad de producir otras enzimas extracelulares mediante el empleo del sistema API ZYM. El sistema miniaturizado comercial API ZYM (Biomérieux, France) es un micro-método semi-cuantitativo diseñado para la evaluación de actividad enzimática. Este sistema consiste en una tira con 20 pocillos que contienen sustratos cromogénicos deshidratados de 19 enzimas diferentes y un control que no contiene ningún sustrato. Las enzimas detectadas con el API ZYM incluyen 3 fosfatasas, 3 esterasas, 3 aminopeptidasas, 2 proteasas y 8 glicosil hidrolasas.

Las tiras de API ZYM se inocularon con una suspensión bacteriana a una concentración de 12 x 10^8 células.mL^{-1} correspondiente al tubo 4 de la escala de Mc Farland siguiendo las instrucciones del productor, y se incubaron durante 4 h y 30 min a 37 ºC. Después de la incubación se añadió una gota del reactivo ZYM A y una gota del reactivo ZYM B a cada pocillo. La aparición de color se informó como positivo y la ausencia como negativo. Para cada pocillo que mostró resultados positivos se asignó un valor en el intervalo de 1-5 según lo señalado por el productor (1= 5 nM; 2= 10 nM; 3= 20 nM; 4= 30 nM; 5= 40 nM; nanomoles de sustrato hidrolizado por inoculo bacteriano de turbidez estándar).

2.6. Identificación de los aislados bacterianos

2.6.1. Extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación de los genes ADNr 16S y *gyrB*

Para la identificación bacteriana, previamente se procedió a la selección de aislados teniendo en cuenta sus capacidades en la producción de enzimas extracelulares y que hubiera representatividad con respecto a las diferentes estaciones de muestreo y plantas colectadas.

El ADN de los aislados seleccionados se extrajo mediante el método de SDS-fenol-cloroformo (Oh *et al.*, 2011). Todas las muestras de ADN se purificaron mediante *DNeasy Blood and*

Tissue Kit (Qiagen). Las soluciones de ADN purificadas se usaron directamente en las PCR. La amplificación del gen ADNr 16S se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL que contenía 25 µL de PCR Master (Roche Diagnostics GmbH, Germany), una concentración final de 0,5 µM de los cebadores universales 27F y 1492R (Zhou *et al.*, 2009), 5 µL de ADN molde (70 ng de concentración aproximadamente) y agua bidestilada estéril. Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 ºC, las muestras se amplificaron durante 35 ciclos de 30 s a 94 ºC, 30 s a 55 ºC y 90 s a 72 ºC y un paso de extensión final de 5 min a 72 ºC.

El gen *gyrB* se amplificó con el par de cebadores gyrB-F2 (5´-ACWCGTATGCGTGARYTRGC-3´) y gyrB-R2 (5´-CCTTGYTTTGCWGAWCCDCC-3´) (Soufiane y Côté, 2009) y el par de cebadores gyrF (5´-AATAATAACTTTATGATAGCGT-3´) y gyrR (5´-CGGTGGCGGTTACAAAGTTTC-3´) (Swiecicka *et al.*, 2008). Después de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 94 ºC, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 30 s a 94 ºC, 30 s a 51 ºC y 30 s a 68 ºC y un paso de extensión final de 7 min a 68ºC.

Los fragmentos amplificados y purificados se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares a través del Instituto de Estudios Avanzados en Agua (IMDEA agua), Alcalá de Henares, España. El análisis de las secuencias se realizó mediante la comparación de las secuencias problema con las secuencias de referencia en el NCBI, a través del programa BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) y la Base de Datos del Proyecto Ribosomal (RDP por sus siglas en inglés) (Cole *et al.*, 2009). Las secuencias del gen ADNr 16S de los aislados bacterianos se depositaron en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ, con su correspondiente número de acceso. Además, las cepas se depositaron en la colección de la Facultad de Biología bajo los números (CCMFB-B225 – CCMFB-B239).

2.6.2. Producción de cristales proteicos

Tomando en consideración los resultados de la secuenciación de los genes ADNr 16S y *gyrB*, se procedió a la detección de cristales proteicos en algunos aislados bacterianos mediante el protocolo establecido por Santana *et al*. (2008). Los aislados se sembraron en medio Agar agua (1,5%) y se incubaron a 30 ºC durante cinco días y posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días. Pasado este tiempo se suspendió una asada del cultivo en 100 µL de agua destilada estéril, se añadió una gota del inóculo en un portaobjeto y se le colocó un cubreobjeto encima. Las muestras se observaron en un microscopio de contraste de fase (Leica, DMF6000B, Germany) a 1000X.

2.7. Análisis estadísticos

Para verificar la distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos, se realizaron las pruebas Kolmogorov–Smirnov y Cochran–Bartlett respectivamente. Se emplearon datos transformados según log (x+1), a los cuales se les aplicaron métodos estadísticos paramétricos. Para verificar si existían diferencias significativas entre las diferentes estaciones de muestreo

teniendo en cuenta los conteos de coliformes termotolerantes, *E. coli* y enterococos, así como los indicadores físico-químicos evaluados, se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para un nivel de significación de 5 % y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey HSD *a posteriori*. Para evaluar la correlación entre los indicadores físico-químicos y los indicadores de contaminación fecal se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r, método paramétrico). Para todos estos cálculos se utilizó el paquete estadístico Statistica 8.0 para Windows (StatSoft, 2007).

Para el análisis de la comunidad bacteriana, se realizaron análisis comparativos a partir de los perfiles de DGGE, basados en la presencia-ausencia de las bandas, mediante el programa PRIMER 6 (Primer-E Ltd., Plymouth,UK) (Clarke y Gorley, 2006) después de transferir los datos del programa PyElph 1.4 (Pavel y Vasile, 2012). Se realizó un análisis de conglomerado aplicando el coeficiente de similitud de Sorensen y una técnica de ligamiento promedio mediante el método del promedio aritmético no ponderado (UPGMA, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Además, a partir de la composición de las comunidades bacterianas detectadas mediante la técnica de pirosecuenciación 454, se realizó un análisis de conglomerado aplicando el índice de similitud de Bray-Curtis y la técnica de ligamiento promedio UPGMA. Para analizar si existían diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo y con respecto a los distintos muestreos realizados en cada uno de los ríos y entre los ríos, se realizó el análisis de varianza por permutación (PERMANOVA, *Permutational Analysis of Variance*) con 999 permutaciones bajo el modelo reducido. Los análisis se realizaron utilizando el programa PRIMER 6 con el paquete adicional PERMANOVA+ (Anderson *et al.*, 2008).

Para investigar la relación entre la composición de la comunidad bacteriana y los indicadores físico-químicos e indicadores bacterianos de contaminación fecal en los ríos Almendares y San Juan durante el período febrero 2013-julio 2013, se realizó el análisis de redundancia (RDA, *Redundancy Analysis*) utilizando el paquete estadístico CANOCO, versión 4.5 para Windows (ter Braak y Šmilauer, 2002) a partir de los datos de la pirosecuenciación 454. El método de análisis de redundancia se seleccionó después de que se comprobó mediante el análisis de correspondencia sin tendencia (DCA, *Detrended Correspondence Analysis*) 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 análisis de redundancia. 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.

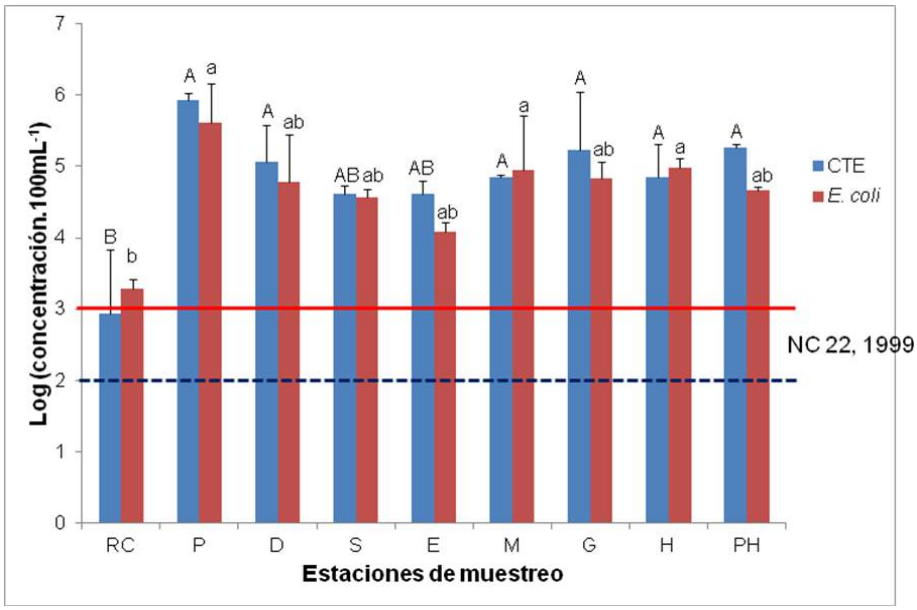
El agrupamiento de los aislados, para la selección de los que mostraron mejores resultados con respecto a la producción de enzimas extracelulares se realizó mediante un análisis de conglomerados a partir de una matriz de distancias euclidianas y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward, para la construcción de los dendrogramas. Además, se realizó el método de agrupamiento de K-medias para determinar cuáles fueron las enzimas extracelulares que más contribuyen a la formación de los grupos. Posteriormente, se realizaron análisis factoriales discriminantes con el propósito de corroborar dichos grupos y detectar las enzimas extracelulares que permiten la diferenciación de los mismos. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica versión 8.0 (StatSoft, 2007).

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en el río Almendares

En la Figura 1 se representa la media de los logaritmos de las concentraciones de coliformes termotolerantes y de *E. coli* en las nueve estaciones de muestreo evaluadas en el río Almendares en los meses noviembre 2005 y enero 2006. Las concentraciones de estos indicadores estuvieron por encima de $2{,}0.10^2$ y $1{,}0.10^3$ NMP.100 mL^{-1}, límites máximos permisibles establecidos por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto, respectivamente.



Leyenda
RC: Río Cristal; **P:** arroyo Paila; **D:** Elevados 100 y Boyeros; **S:** arroyo Santoyo; **E:** Puentes Grandes avenida 51; **M:** arroyo Mordazo; **G:** Puente de Piedra; **H:** Puente Almendares calle 23; **PH:** Puente de Hierro

Figura 1. Media de los logaritmos de las concentraciones de coliformes termotolerantes (azul) y *E. coli* (rojo) en cada estación de muestreo del río Almendares durante el periodo noviembre 2005-enero 2006. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los coliformes termotolerantes (n=2) y *E. coli* (n=2). Línea roja continua indica contacto indirecto con el agua, línea azul oscura discontinua indica contacto directo con el agua según la Norma Cubana 22 de 1999. Las letras mayúsculas diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de los coliformes termotolerantes obtenidos entre las diferentes estaciones de muestreo. Las letras minúsculas diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de *E. coli* obtenidos entre las diferentes estaciones de muestreo según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0{,}05$).

De las nueve estaciones de muestreo analizadas, Río Cristal (RC) fue la que presentó el menor grado de contaminación microbiológica, con valores que oscilaron entre $2{,}0.10^2$ y $3{,}7.10^3$ UFC.100 mL^{-1} para los coliformes termotolerantes y entre $1{,}5.10^3$ y $2{,}4.10^3$ UFC.100 mL^{-1} para *E. coli* durante el período evaluado. Las estaciones corriente abajo de Río Cristal, presentaron elevados valores de concentración de los dos indicadores bacterianos analizados y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Particularmente, la estación Paila (P), presentó

valores de concentración que oscilaron entre $7,3.10^5$ y $1,0.10^6$ UFC.100 mL^{-1} para los coliformes termotolerantes y entre $1,7.10^5$ y $1,0.10^6$ UFC.100 mL^{-1} para *E. coli*. Los tres tributarios del río Almendares en los últimos 10 km analizados (Paila, Santoyo y Mordazo) presentaron un alto nivel de contaminación. En la estación de muestreo Puente de Hierro (PH) localizada en la zona estuarina del río en la costa norte de La Habana, la mezcla del agua dulce contaminada proveniente del río con el agua de mar fue insuficiente para disminuir la contaminación.

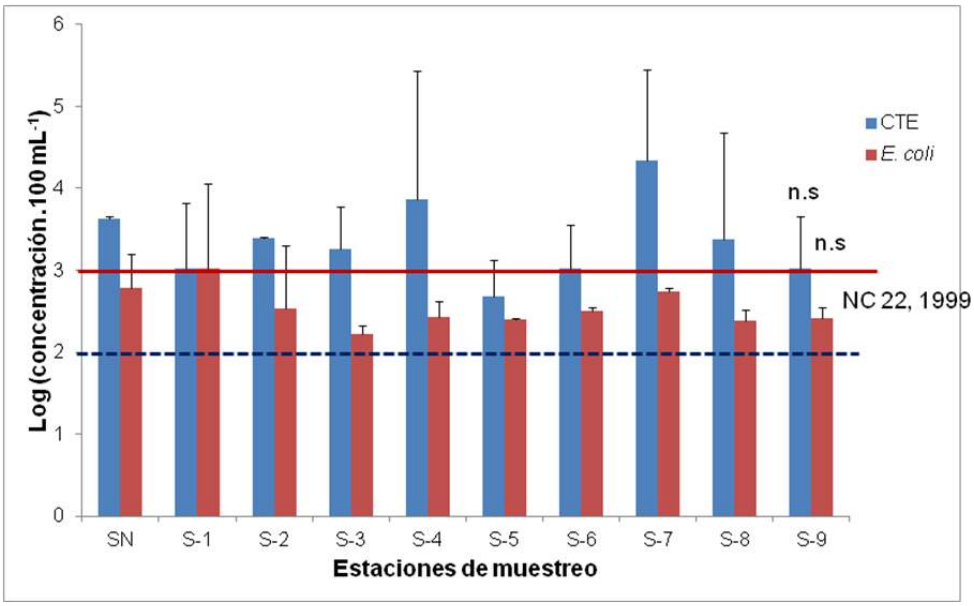
Teniendo en cuenta los resultados de la dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *E. coli* en las estaciones de muestreo del río Almendares, se seleccionaron las estaciones Río Cristal (RC), Paila (P) y Puente de Hierro (PH). La estación RC mostró los menores valores de concentración de los indicadores bacterianos de contaminación fecal. En tanto, la estación Paila es un afluente del río Almendares con un alto nivel de contaminación y la estación PH, además de presentar altos valores de concentración de los indicadores bacterianos, se encuentra en el estuario del río, lo que permite realizar un análisis de la influencia de la salinidad sobre las comunidades bacterianas.

3.2. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* en las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"

En la Figura 2 se representa la media de los logaritmos de las concentraciones de coliformes termotolerantes y de *E. coli* en las 10 estaciones de muestreo de "Las Terrazas" evaluadas en los meses mayo y junio del 2006. Como puede apreciarse, si se comparan las medias de los valores de los coliformes termotolerantes con los establecidos por la norma cubana (NC 22, 1999), la mayoría de las estaciones de muestreo sobrepasan los valores máximos permisibles para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto. Sin embargo, cuando se analizan las medias de las concentraciones de *E. coli*, la mayoría de las estaciones de muestreo se encuentran dentro del límite establecido para aguas recreativas con contacto indirecto. No se encontraron diferencias significativas entre las estaciones de muestreo con respecto a los indicadores bacterianos analizados durante el periodo de estudio.

Teniendo en cuenta los resultados con respecto a las concentraciones de los coliformes termotolerantes y *E. coli* en las diferentes estaciones de muestreo del Complejo Turístico "Las Terrazas", donde no se encontraron diferencias significativas, y la importancia económica y social que presentan las estaciones localizadas en el río San Juan, se seleccionaron para continuar los estudios los puntos de muestreo Presa El Palmar (S-1), Presa San Juan (S-2) y Baños del San Juan (S-3). Estas estaciones son las más visitadas por el turismo nacional e internacional, y específicamente en la estación S-3, se encuentran las piscinas naturales del río San Juan, las cuales se utilizan como lugar de baño. Además, entre la estaciones S-2 y S-3 se encuentra el sistema de lagunas de oxidación anaerobia y aerobia que trata las aguas

residuales domésticas de la comunidad de “Las Terrazas” que se encuentra cercana a la estación S-2.



Leyenda

SN: Río San Juan (Antes de la presa El Palmar); **S-1**: Presa El Palmar (Río San Juan); **S-2**: Presa San Juan; **S-3**: Baños Río San Juan; **S-4**: Arroyo Nortey; **S-5**: Arroyo Forestal I; **S-6**: Arroyo Masón; **S-7**: Arroyo Forestal II; **S-8**: Río Bayate I; **S-9**: Río Bayate II.

Figura 2. Media de los logaritmos de las concentraciones de coliformes termotolerantes (azul) y *E. coli* (rojo) en cada estación de muestreo del Complejo Turístico “Las Terrazas” durante el periodo mayo-junio 2006. Las barras de error indican la desviación estándar del promedio de las concentraciones de los coliformes termotolerantes (n=2) y *E. coli* (n=2). Línea roja continua indica contacto indirecto con el agua, línea azul oscura discontinua indica contacto directo con el agua según la Norma Cubana 22 de 1999, n.s. indica que no existen diferencias significativas entre las estaciones de muestreo teniendo en cuenta los indicadores bacterianos coliformes termotolerantes y *E. coli* según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$).

3.3. Calidad físico-química y microbiológica de las aguas del río Almendares en el período 2011-2013

La medición de los parámetros físico-químicos durante el período octubre 2011-junio 2013 en las tres estaciones seleccionadas del río Almendares, mostró que los valores de la temperatura (Tabla 2) se encontraron entre 20,7-30,2 ºC. El pH se encontró durante la mayoría de los muestreos dentro del rango de 6,1-8,9, valores límites de pH establecidos por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores; sólo en el mes de octubre 2011 se obtuvieron valores por encima de lo informado en la norma. Con respecto a la conductividad eléctrica y los sólidos totales disueltos, los mayores valores se encontraron en las estaciones Puente de Hierro y Paila ($p<0,05$). En la mayoría de los muestreos realizados en el período de estudio analizado, las concentraciones de oxígeno disuelto se encontraron por debajo de 4 $mg.L^{-1}$, límite mínimo permisible establecido por la Norma Cubana 22 (1999), sólo en el mes de octubre 2011, las estaciones Paila y Puente de Hierro presentaron concentraciones de oxígeno disuelto que se encontraron dentro de lo establecido por la norma cubana. En cuanto a la Demanda Química de Oxígeno (DQO), las mayores concentraciones se

Tabla 2. Valores de los indicadores físico-químicos determinados *in situ*[a] en las estaciones de muestreo del río Almendares y datos de las precipitaciones[b] en el período octubre 2011-junio 2013.

	ESTACIONES DE MUESTREO																	
Indicadores físico-químicos	**Río Cristal**						**Paila**						**Puente de Hierro**					
	octubre 2011	**febrero 2012**	**abril 2012**	**febrero 2013**	**abril 2013**	**junio 2013**	**octubre 2011**	**febrero 2012**	**abril 2012**	**febrero 2013**	**abril 2013**	**junio 2013**	**octubre 2011**	**febrero 2012**	**abril 2012**	**febrero 2013**	**abril 2013**	**junio 2013**
Temperatura (ºC)	24,7	22,9	24,0	20,7	23,2	27,9	23,7	23,2	23,7	21,0	23,5	27,0	24,8	25,3	25,3	24,4	25,8	30,2
pH	8,98	7,70	7,60	6,80	7,20	7,40	9,30	8,00	7,70	7,10	7,20	7,60	9,60	8,10	7,80	7,10	7,40	7,60
Conductividad ($\mu s.cm^{-1}$)	660	600	900	670	510	799	1250	1130	1080	1090	1090	1338	2330	5800	6360	5150	5310	3730
Sólidos Totales Disueltos ($mg.L^{-1}$)	480	500	600	450	380	405	830	760	730	760	750	669	1550	3930	4110	3420	3500	1500
Oxígeno Disuelto ($mg.L^{-1}$)	3,52	1,80	0,42	2,30	2,80	0,93	4,68	1,34	0,27	0,60	2,21	0,45	5,32	1,67	3,45	4,84	3,65	3,66
Demanda Química de Oxígeno ($mg.L^{-1}$)	16,7	118,4	138,3	50,0	76,7	145,0	53,4	58,4	66,7	58,3	56,7	290,0	40,0	2250,0	766,7	206,7	6368,0	1600,0
Precipitaciones (mm)	41,5	45,9	0,3	36,0	0,1	0,0	41,5	45,9	0,3	36,0	0,1	0,0	41,5	45,9	0,3	36,0	0,1	0,0

[a] Con excepción de la Demanda Química de Oxígeno, la cual se determinó mediante espectrofotometría en el laboratorio.

[b] Datos obtenidos a partir de la estación meteorológica de Casablanca, Instituto de Meteorología, La Habana. Se tuvieron en cuenta las precipitaciones de hasta 10 días antes de la fecha de muestreo

encontraron en la estación Puente de Hierro ($p<0,05$), aunque todas las estaciones de muestreo superaron los 10 $mg.L^{-1}$. Es necesario destacar que en todo el período analizado los meses muestreados se comportaron como meses poco lluviosos teniendo en cuenta que los valores de las precipitaciones no superaron los 60 mm (Estación Meteorológica de Casablanca del Instituto de Meteorología, La Habana).

Al analizar las concentraciones de nutrientes inorgánicos (Figura 3) se pudo constatar que las estaciones Paila y Puente de Hierro presentaron valores que se encontraron por encima de 10 $mg.L^{-1}$, 0,5 $mg.L^{-1}$ y 0,1 $mg.L^{-1}$, límites máximos permisibles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003) para la concentración de nitratos, amonio y fosfatos respectivamente. Además, la estación Puente de Hierro presentó valores medios de nitritos por encima de 1 $mg.L^{-1}$, límite máximo permisible establecido por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003) para la concentración de nitritos y la estación Río Cristal presentó valores medios de fosfatos por encima de lo establecido por las normas de la WHO (2003). De los tres puntos de muestreo analizados, la estación Puente de Hierro presentó las mayores concentraciones de nitrato y nitrito con valores que oscilaron entre 16,0-90,0 $mg.L^{-1}$ en el caso del nitrato y entre 0,997-3,1 $mg.L^{-1}$ para nitrito, en tanto la estación Paila presentó las mayores concentraciones de amonio (4,51-15,26 $mg.L^{-1}$) y fosfatos (0,30-4,56 $mg.L^{-1}$). Respecto a este último nutriente las estaciones Puente de Hierro y Paila no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Río Cristal fue la estación que presentó menores concentraciones de fosfatos.

Por otra parte, las concentraciones de enterococos, *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes (Figura 4) se encontraron por encima de los límites máximos permisibles establecidos por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto.

La estación Paila presentó las mayores concentraciones de estos indicadores y la estación Río Cristal mostró la menor contaminación microbiológica. Al calcular la relación *E. coli*/coliformes termotolerantes en cada uno de los puntos de muestreo del río Almendares para el período analizado, se obtuvieron valores de 0,77, 0,96 y 0,92 para las estaciones Río Cristal, Paila y Puente de Hierro respectivamente; lo que indica que la mayoría de los coliformes termotolerantes encontrados en las aguas del río Almendares son *E. coli*. En cuanto a la relación *E. coli*/Enterococos se obtuvieron valores de 0,90, 1,14 y 1,32 para las estaciones Río Cristal, Paila y Puente de Hierro respectivamente, estos valores se encuentran entre 0,7 y 4, lo cual indica que en estas aguas la contaminación fecal es mixta, es decir su origen es animal y humano.

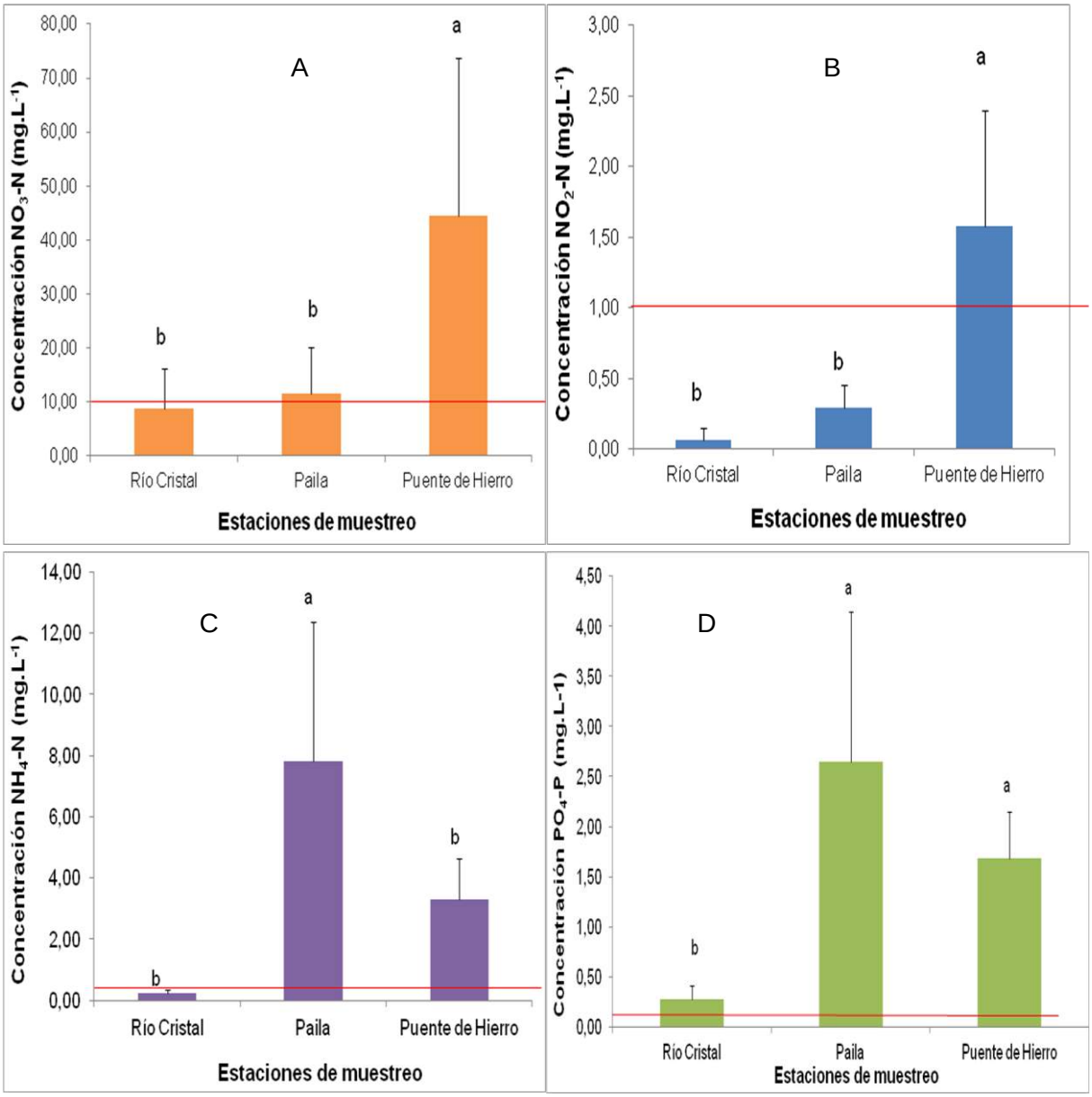


Figura 3. Media de las concentraciones de nutrientes inorgánicos en las estaciones del río Almendares en el período de octubre 2011-junio 2013. Concentraciones de nitratos (A), nitritos (B), amonio (C) y fosfatos (D). La línea roja indica límite máximo permisible según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003). Las barras de error indican la desviación estándar de n=6. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las estaciones de muestreo según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$).

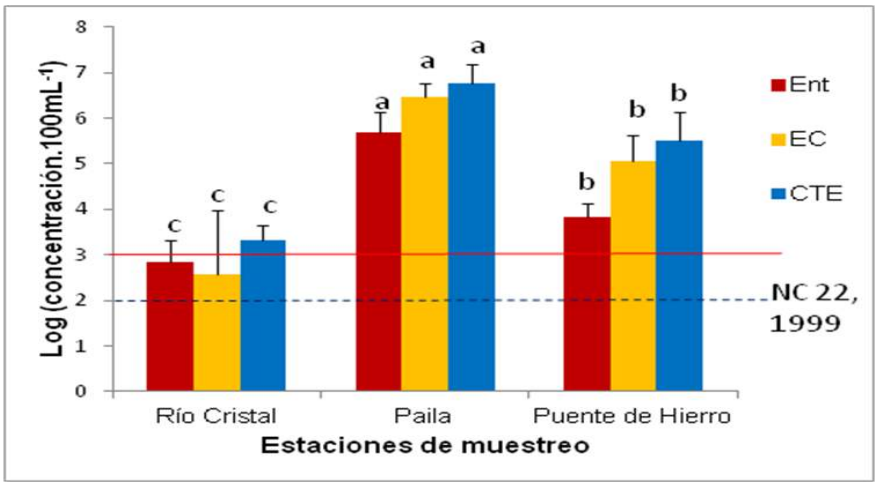


Figura 4. Media de los logaritmos de las concentraciones de indicadores bacterianos de contaminación fecal en las estaciones de muestreo del río Almendares en el período octubre 2011-junio 2013. Ent: enterococos; EC: *Escherichia coli* y CTE: coliformes termotolerantes (CTE). Línea roja continua indica contacto indirecto con el agua, línea azul oscura discontinua indica contacto directo con el agua según la Norma Cubana 22 de 1999. Las barras de error indican la desviación estándar de n=6. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de cada indicador bacteriano entre las estaciones de muestreo según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$).

En las Tablas 3 y 4 se pueden observar los coeficientes de correlación de Pearson para los períodos octubre 2011-abril 2012 y febrero 2013-junio 2013 respectivamente. En las tablas se señalan las correlaciones positivas significativas entre los diferentes indicadores físico-químicos e indicadores de contaminación fecal, lo cual significa que a medida que aumenta un indicador el otro indicador que correlaciona con el primero también se incrementa. En ambos periodos se constató la correlación positiva entre la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos, la concentración de nitritos y la DQO. Además, las concentraciones de nitritos correlacionaron positivamente con la concentraciones de nitratos y las concentraciones de amonio correlacionaron positivamente con los indicadores de contaminación fecal: enterococos, *E. coli* y coliformes termotolerantes y estos indicadores correlacionaron positivamente entre sí.

En el periodo 2011-2012 se puede constatar que la temperatura correlaciona positivamente con la conductividad, sólidos totales disueltos y la concentración de nitritos. El pH correlacionó positivamente con el oxígeno disuelto y las concentraciones de nitratos correlacionaron positivamente con las concentraciones de fosfatos.

En el período 2013 se puede observar que la temperatura correlaciona positivamente con el pH. La conductividad eléctrica y los sólidos totales disueltos correlacionan positivamente con las concentraciones de nitratos. El oxígeno disuelto correlacionó positivamente con las concentraciones de nitratos y las concentraciones de amonio correlacionaron positivamente con las concentraciones de fosfatos.

Tabla 3. Correlaciones de Pearson entre los indicadores físico-químicos y microbiológicos y los valores de precipitaciones determinados en el río Almendares en el período octubre 2011-abril 2012.

	Temp	pH	Cond	OD	STD	NO_2-N	NO_3-N	NH_4-N	PO_4-P	DQO	Ent	EC	CTE	Precip
Temp.	1													
pH	0,2661	1												
Cond.	**0,7669***	0,0126	1											
OD	0,3808	**0,8155****	0,2685	1										
STD	**0,7594***	-0,0027	**0,9971****	0,2777	1									
NO_2-N	**0,7025***	0,5707	**0,7140***	0,6548	**0,7117***	1								
NO_3-N	0,4180	0,6355	0,4990	**0,7566***	0,5132	**0,8075****	1							
NH_4-N	-0,0202	0,0975	0,3285	-0,1016	0,2911	0,2338	0,3497	1						
PO_4-P	0,2088	0,2922	0,5926	0,4708	0,5818	0,4946	**0,6787***	0,5387	1					
DQO	0,4613	-0,4769	**0,7762***	-0,1636	**0,7977***	0,2408	0,0308	0,0145	0,2852	1				
Ent	-0,2458	0,0298	0,0770	-0,2432	0,0295	-0,0202	0,0802	**0,9423****	0,3603	-0,1607	1			
EC	-0,1794	-0,1518	0,3593	-0,2024	0,3342	0,0265	0,1573	**0,8818****	0,5894	0,2559	**0,8605****	1		
CTE	-0,1220	0,1360	0,3485	0,0449	0,3246	0,1382	0,2959	**0,8316****	0,6556	0,1963	**0,7985***	**0,9411****	1	
Precip	-0,1405	0,5834	-0,1525	0,5371	-0,1233	0,1864	0,5762	-0,0360	0,4154	-0,2334	-0,1527	-0,0605	0,1698	1

Leyenda:
Temp: Temperatura
Cond: Conductividad eléctrica
OD: Oxígeno Disuelto
STD: Sólidos Totales Disueltos
NO_2-N: Nitritos
NO_3-N: Nitratos
NH_4-N: Amonio
PO_4-P: Fosfatos
DQO: Demanda Química de Oxígeno
Ent: Enterococos
EC: *Escherichia coli*
CTE: Coliformes termotolerantes
Precip: Precipitaciones
*p<0,05;
** p<0,01
En negritas se señalan las correlaciones significativas

Tabla 4. Correlaciones de Pearson entre los indicadores físico-químicos y microbiológicos y los valores de precipitaciones determinados en el río Almendares en el período febrero-junio 2013.

	Temp	pH	Cond	OD	STD	NO_2-N	NO_3-N	NH_4-N	PO_4-P	DQO	Ent	EC	CTE	Precip
Temp.	1													
pH	**0,9305****	1												
Cond.	0,456	0,3601	1											
OD	0,094	-0,133	0,5534	1										
STD	0,2688	0,1867	**0,9729****	0,6089	1									
NO_2-N	0,5581	0,4882	**0,9184****	0,5244	**0,8436****	1								
NO_3-N	-0,0128	-0,1192	**0,8151****	**0,6929***	**0,8847****	**0,7036***	1							
NH_4-N	0,0018	0,1976	0,4371	-0,1351	0,4547	0,454	0,21	1						
PO_4-P	-0,1559	0,0679	0,3338	-0,1954	0,3919	0,3167	0,2273	**0,953****	1					
DQO	0,4699	0,4767	**0,7077***	0,2962	**0,6959***	0,5592	0,6426	0,1047	0,1332	1				
Ent	-0,0737	0,1636	0,093	-0,5176	0,0733	0,1605	-0,1334	**0,8941****	**0,8757****	-0,1451	1			
EC	-0,1922	0,0363	0,3685	0,0398	0,4336	0,4217	0,333	**0,8847****	**0,8479****	0,1172	**0,719***	1		
CTE	0,0518	0,2699	0,4739	-0,1743	0,4957	0,4633	0,2464	**0,9791****	**0,9611****	0,2451	**0,8609****	**0,8574****	1	
Precip	-0,4188	-0,5369	0,0347	-0,1257	0,0502	-0,0599	0,1169	0,0338	-0,0300	-0,3762	0,1348	-0,0410	-0,0460	1

Leyenda:
Temp: Temperatura
Cond: Conductividad eléctrica
OD: Oxígeno Disuelto
STD: Sólidos Totales Disueltos
NO_2-N: Nitritos
NO_3-N: Nitratos
NH_4-N: Amonio
PO_4-P: Fosfatos
DQO: Demanda Química de Oxígeno
Ent: Enterococos
EC: *Escherichia coli*
CTE: Coliformes termotolerantes
Precip: Precipitaciones
*p<0,05;
** p<0,01
En negritas se señalan las correlaciones significativas

3.4. Calidad físico-química y microbiológica de las aguas del río San Juan en el período 2011-2013

La medición de los parámetros físico-químicos durante el período noviembre 2011-julio 2013 en las tres estaciones seleccionadas del río San Juan en el Complejo Turístico “Las Terrazas”, mostró que los valores de la temperatura (Tabla 5) se encontraron entre 22,3-28,4 ºC. El pH estuvo dentro del rango de 6,1-8,9, valores límites de pH establecidos por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Con respecto a la conductividad eléctrica y los sólidos totales disueltos, los valores aumentaron notablemente en todas las estaciones en el mes de julio 2013 coincidiendo con la abundancia de precipitaciones donde se informaron 242,1 mm de lluvias (Estación Ecológica Sierra del Rosario, Artemisa). Durante los muestreos realizados en todas las estaciones, las concentraciones de oxígeno disuelto estuvieron dentro de lo establecido por la Norma Cubana 22 (1999) (>4 $mg.L^{-1}$). Las concentraciones de la Demanda Química de Oxígeno superaron los 10 $mg.L^{-1}$ en todas las estaciones de muestreo, aunque en el mes de julio 2013 se apreció una disminución de este indicador en las estaciones Presa El Palmar y Baños del San Juan, esta última con un valor de 5 $mg.L^{-1}$. Es necesario destacar que en el período analizado los meses febrero 2012, abril 2012 y julio 2013 se comportaron como meses lluviosos teniendo en cuenta que los valores de las precipitaciones superaron los 60 mm (Estación Ecológica Sierra del Rosario, Artemisa).

Al analizar las concentraciones de nutrientes inorgánicos (Figura 5) se pudo constatar que las estaciones del río San Juan presentaron valores que se encontraron por debajo de 1 $mg.L^{-1}$ y 0,5 $mg.L^{-1}$, límites máximos permisibles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003) para las concentraciones de nitrito y amonio respectivamente. En cambio la media de las concentraciones de nitratos y fosfatos en la estación Baños del San Juan estuvieron por encima de 10 $mg.L^{-1}$ y 0,1 $mg.L^{-1}$, límites máximos permisibles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003) para las concentraciones de nitratos y fosfatos respectivamente. Esta estación presentó las mayores concentraciones de fosfatos (0-1,27 $mg.L^{-1}$) y nitritos (0,02-0,06 $mg.L^{-1}$).

Por otra parte las medias de las concentraciones de bacterias indicadoras de contaminación fecal: enterococos, *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes (Figura 6) se hallaron dentro de los límites máximos permisibles establecidos por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto indirecto en todas las estaciones de muestreo, sólo en la estación Baños del San Juan las medias de las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal sobrepasaron los límites máximos permisibles establecidos por la Norma Cubana 22 para contacto directo.

No se observaron diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de coliformes termotolerantes y enterococos en las estaciones analizadas, sin embargo; las

Tabla 5. Valores de los indicadores físico-químicos determinados *in situ*[a] en las estaciones de muestreo del río San Juan y datos de las precipitaciones[b] en el período noviembre 2011-julio 2013.

Indicadores físico-químicos	ESTACIONES DE MUESTREO																	
	Presa El Palmar						Presa San Juan						Baños del San Juan					
	noviembre 2011	febrero 2012	abril 2012	febrero 2013	abril 2013	julio 2013	noviembre 2011	febrero 2012	abril 2012	febrero 2013	abril 2013	julio 2013	noviembre 2011	febrero 2012	abril 2012	febrero 2013	abril 2013	julio 2013
Temperatura (ºC)	25,2	24,9	28,4	23,7	26,4	26,9	24,9	24,6	27,9	23,3	25,3	26,1	25,0	22,6	25,0	22,3	24,2	25,9
pH	8,39	8,38	8,63	6,59	7,64	7,74	8,60	8,38	8,81	6,46	7,61	7,80	8,90	8,27	8,63	6,72	7,74	7,92
Conductividad ($\mu s.cm^{-1}$)	450	360	300	310	280	4190	450	360	350	380	360	3800	480	430	406	500	500	4360
Sólidos Totales Disueltos ($mg.L^{-1}$)	310	240	200	210	190	2060	300	240	230	250	240	1907	320	310	301	340	330	2210
Oxígeno Disuelto ($mg.L^{-1}$)	11,32	6,97	7,15	7,68	7,62	6,01	9,60	4,37	6,96	7,10	5,76	5,40	9,36	6,82	6,47	6,81	5,23	6,51
Demanda Química de Oxígeno ($mg.L^{-1}$)	80,0	115,0	90,0	96,7	105,0	15,0	53,3	148,3	60,0	68,3	58,3	83,3	45,0	125,0	61,7	173,4	195,0	5,0
Precipitaciones (mm)	0,0	86,2	124,9	24,4	38,3	242,1	0,0	86,2	124,9	24,4	38,3	242,1	0,0	86,2	124,9	24,4	38,3	242,1

[a] Con excepción de la Demanda Química de Oxígeno, la cual se determinó mediante espectrofotometría en el laboratorio.

[b] Datos obtenidos a partir de la Estación Ecológica Sierra del Rosario, Artemisa. Se tuvieron en cuenta las precipitaciones de hasta 10 días antes de la fecha de muestreo.

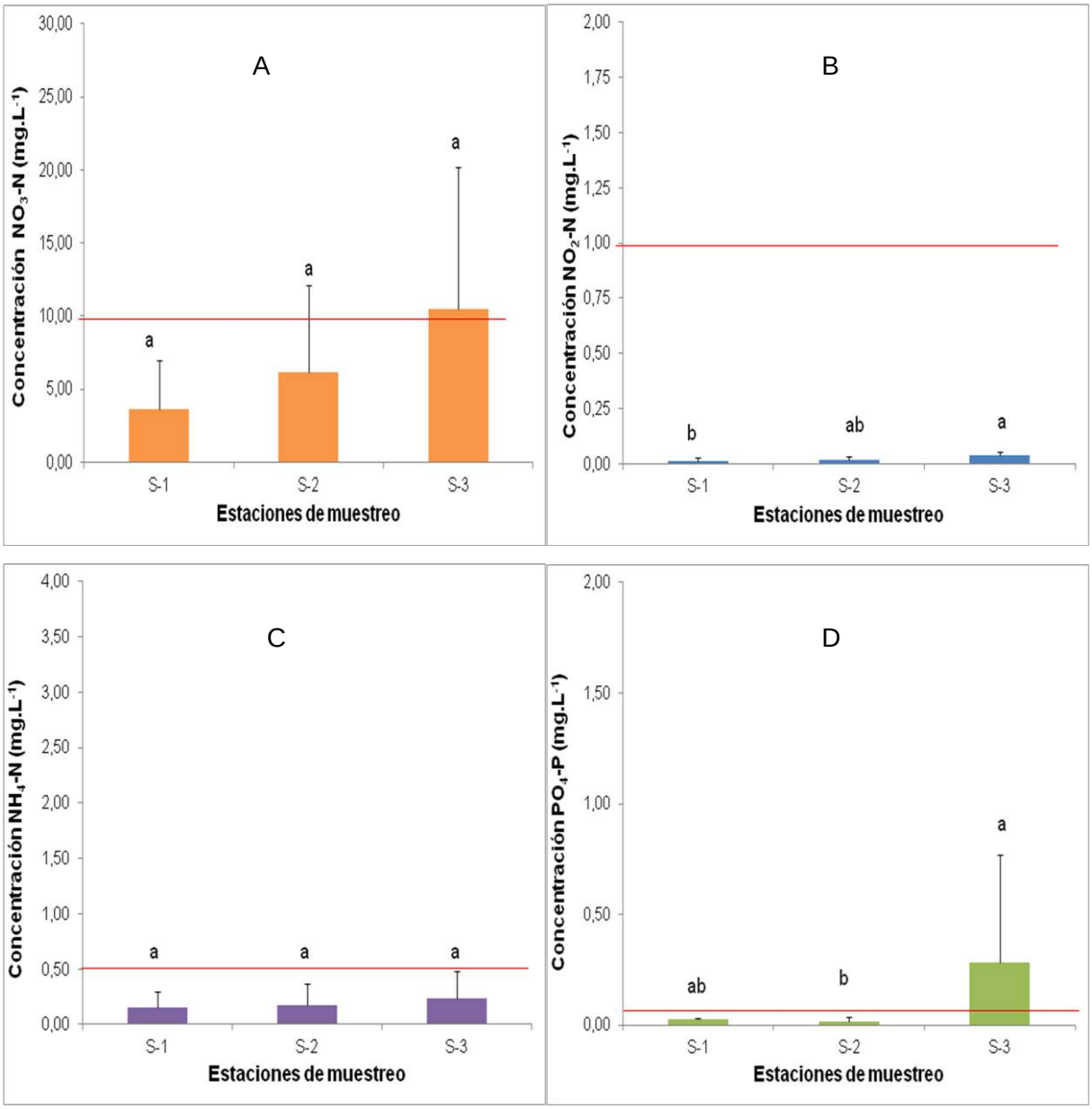


Figura 5. Media de las concentraciones de nutrientes inorgánicos en las estaciones del río San Juan en el período de noviembre 2011-julio 2013. Concentraciones de nitratos (A), nitritos (B), amonio (C) y fosfatos (D). La línea roja indica límite máximo permisible según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003). Las barras de error indican la desviación estándar de n=6. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre las estaciones de muestreo según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$). **S-1**: Presa El Palmar (Río San Juan); **S-2**: Presa San Juan; **S-3**: Baños Río San Juan.

mayores concentraciones de *E. coli* se encontraron en la estación Baños del San Juan. Al calcular la relación *E. coli*/coliformes termotolerantes en las estaciones del río San Juan para el período analizado, se obtuvieron valores de 0,60, 0,34 y 0,82 para las estaciones Presa El Palmar, Presa San Juan y Baños del San Juan respectivamente; lo cual indica que la mayoría de los coliformes termotolerantes presentes en las aguas de las estaciones Presa El Palmar y Baños del San Juan son *E. coli*.

En cuanto a la relación *E. coli*/Enterococos se obtuvieron valores de 0,57, 0,36 y 0,84 para las estaciones Presa El Palmar, Presa San Juan y Baños del San Juan respectivamente, lo que significa que el origen de la contaminación fecal en las dos primeras estaciones es animal; sin embargo en la estación Baños del San Juan el origen de la contaminación fecal es mixto (animal y humano).

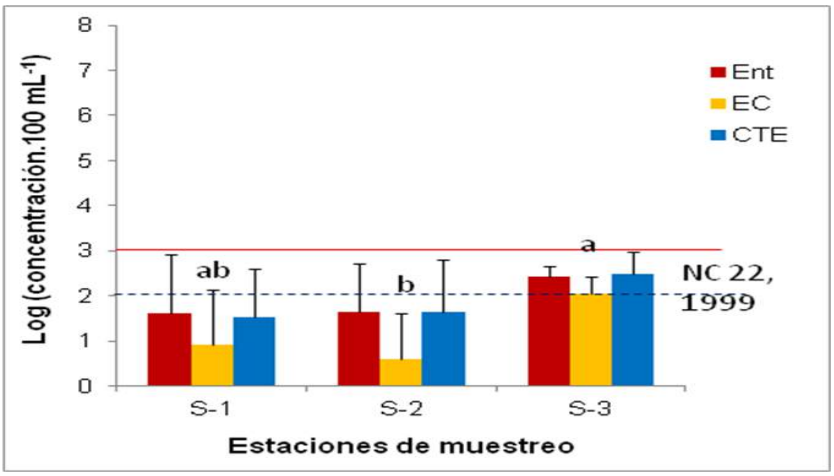


Figura 6. Media de los logaritmos de las concentraciones de indicadores bacterianos de contaminación fecal en las estaciones de muestreo del río San Juan en el período noviembre 2011-julio 2013. Ent: enterococos; EC: *Escherichia coli* y CTE: coliformes termotolerantes. Línea roja continua indica contacto indirecto con el agua, línea azul oscura discontinua indica contacto directo con el agua según la Norma Cubana 22 de 1999. Las barras de error indican la desviación estándar de n=6. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de cada indicador bacteriano entre las estaciones de muestreo según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$). **S-1**: Presa El Palmar (Río San Juan); **S-2**: Presa San Juan; **S-3**: Baños Río San Juan.

En las Tablas 6 y 7 se pueden observar los coeficientes de correlación de Pearson para los períodos noviembre 2011-abril 2012 y febrero 2013-julio 2013 respectivamente. En las tablas se señalan las correlaciones significativas entre los diferentes indicadores físico-químicos e indicadores de contaminación fecal. En el período 2011-2012 se puede observar que la temperatura correlaciona negativamente con los sólidos totales disueltos, lo cual significa que un aumento o disminución de la temperatura se corresponde con una disminución o aumento de los sólidos totales disueltos. El pH correlaciona positivamente con la concentración de nitratos y negativamente con la DQO; por lo que un aumento o disminución del pH se corresponde con un

Tabla 6. Correlaciones de Pearson entre los indicadores físico-químicos y microbiológicos y los valores de precipitaciones determinados en el río San Juan en el período noviembre 2011-abril 2012.

	Temp	pH	Cond	OD	STD	NO_2-N	NO_3-N	NH_4-N	PO_4-P	DQO	Ent	EC	CTE	Precip
Temp.	1													
pH	0,5848	1												
Cond.	-0,6510	0,0399	1											
OD	0,0473	0,2474	0,5833	1										
STD	**-0,7114***	-0,0438	**0,9722****	0,5049	1									
NO_2-N	-0,3772	0,2950	0,4895	0,0909	0,4915	1								
NO_3-N	0,3489	**0,7247***	-0,0129	-0,0620	-0,0083	0,2798	1							
NH_4-N	-0,8470**	-0,5008	0,5597	-0,0548	0,5282	0,4433	-0,5132	1						
PO_4-P	-0,1672	0,5763	0,5377	0,2977	0,4691	**0,8128****	0,2957	0,3323	1					
DQO	-0,3170	**-0,8446****	-0,4387	-0,6228	-0,3738	-0,2880	-0,6623	0,4011	-0,5282	1				
Ent	0,2906	0,3585	-0,1265	0,0608	-0,0853	0,5363	0,4679	-0,3240	0,1743	-0,3080	1			
EC	-0,1198	0,3217	0,0716	-0,0697	0,1481	0,3916	0,2524	-0,0304	0,5612	-0,2120	-0,0213	1		
CTE	-0,0202	0,0989	-0,1739	-0,6062	-0,0446	0,3256	0,3452	-0,0053	0,1627	0,1414	0,2509	0,2513	1	
Precip	0,1844	-0,2161	**-0,7671***	**-0,8162****	-0,6359	-0,3413	-0,0147	-0,3138	-0,4625	0,5492	-0,0581	0,2875	0,4355	1

Leyenda:

Temp: Temperatura
Cond: Conductividad eléctrica
OD: Oxígeno Disuelto
STD: Sólidos Totales Disueltos
NO_2-N: Nitritos
NO_3-N: Nitratos
NH_4-N: Amonio
PO_4-P: Fosfatos
DQO: Demanda Química de Oxígeno
Ent: Enterococos
EC: *Escherichia coli*
CTE: Coliformes termotolerantes
Precip: Precipitaciones
*p<0,05;
** p<0,01
En negritas se señalan las correlaciones significativas

Tabla 7. Correlaciones de Pearson entre los indicadores físico-químicos y microbiológicos y los valores de precipitaciones determinados en el río San Juan en el período febrero-julio 2013.

	Temp	pH	Cond	OD	STD	NO_2-N	NO_3-N	NH_4-N	PO_4-P	DQO	Ent	EC	CTE	Precip
Temp.	1													
pH	**0,8273****	1												
Cond.	0,5729	0,5818	1											
OD	-0,2805	-0,6223	-0,4548	1										
STD	0,5597	0,5792	**0,9997****	-0,4582	1									
NO_2-N	-0,1822	0,1736	0,2406	-0,0846	0,2554	1								
NO_3-N	-0,4935	0,0026	-0,1108	-0,3339	-0,0928	0,6266	1							
NH_4-N	0,6069	0,501	**0,8073****	-0,4233	**0,8023****	-0,2107	-0,1589	1						
PO_4-P	-0,4001	-0,0562	-0,436	-0,1853	-0,4258	0,0449	**0,7426***	-0,1573	1					
DQO	-0,5621	-0,418	**-0,711***	0,0183	**-0,7066***	-0,4319	0,1925	-0,4741	0,6176	1				
Ent	0,3695	**0,7127***	**0,7083***	-0,6639	**0,7184***	0,3476	0,3672	0,592	0,1463	-0,231	1			
EC	0,2912	0,531	**0,8516****	-0,5745	**0,8606****	0,3577	0,3437	**0,753***	0,0459	-0,4092	**0,91****	1		
CTE	0,2785	0,5321	**0,8275****	-0,6736	**0,8351****	0,2660	0,3300	**0,7452***	0,1031	-0,2995	**0,887****	**0,9735****	1	
Precip	**0,7567***	**0,7259***	**0,9673****	-0,4620	**0,9633****	0,1479	-0,2386	**0,8029****	-0,4706	**-0,7222***	**0,6825***	**0,7612***	**0,7450***	1

Leyenda:
Temp: Temperatura
Cond: Conductividad eléctrica
OD: Oxígeno Disuelto
STD: Sólidos Totales Disueltos
NO_2-N: Nitritos
NO_3-N: Nitratos
NH_4-N: Amonio
PO_4-P: Fosfatos
DQO: Demanda Química de Oxígeno
Ent: Enterococos
EC: *Escherichia coli*
CTE: Coliformes termotolerantes
Precip: Precipitaciones
*p<0,05; ** p<0,01

En negritas se señalan las correlaciones significativas

aumento o disminución en la concentración de nitratos y con una disminución o incremento de la DQO. La conductividad correlaciona positivamente con los sólidos totales disueltos y negativamente con las precipitaciones. El oxígeno disuelto correlaciona negativamente con las precipitaciones y las concentraciones de nitritos correlacionan positivamente con las concentraciones de fosfatos.

En el período 2013 se puede apreciar que la temperatura correlaciona positivamente con el pH y las precipitaciones, y el pH correlaciona positivamente con las concentraciones de enterococos y las precipitaciones. En tanto, la conductividad eléctrica correlaciona positivamente con los sólidos totales disueltos, las concentraciones de amonio, enterococos, coliformes termotolerantes, *E. coli* y las precipitaciones y correlaciona negativamente con la DQO. Los sólidos totales disueltos correlacionan positivamente con las concentraciones de amonio, enterococos, coliformes termotolerantes, *E. coli* y las precipitaciones y correlacionan negativamente con la DQO. Las concentraciones de nitratos correlacionan positivamente con las concentraciones de fosfatos y las concentraciones de amonio correlacionan positivamente con las concentraciones de enterococos, *E. coli* y coliformes termotolerantes. Por otra parte la DQO correlaciona negativamente con las precipitaciones y las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal: enterococos, *E. coli* y coliformes termotolerantes correlacionan positivamente entre sí.

3.5. Comparación de la calidad físico-química y microbiológica de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013

Como se aprecia en la Figura 7, las concentraciones de nutrientes inorgánicos durante el periodo de estudio fueron superiores en el río Almendares en comparación con el río San Juan, encontrándose las concentraciones medias de nitratos, amonio y fosfatos por encima de los límites máximos permisibles por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003). En el caso de las concentraciones de oxígeno disuelto, estas fueron superiores en el río San Juan. Además, al analizar las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal, se puede apreciar que las concentraciones de enterococos, *E. coli* y los coliformes termotolerantes (Figura 8) son superiores en el río Almendares comparado con el río San Juan.

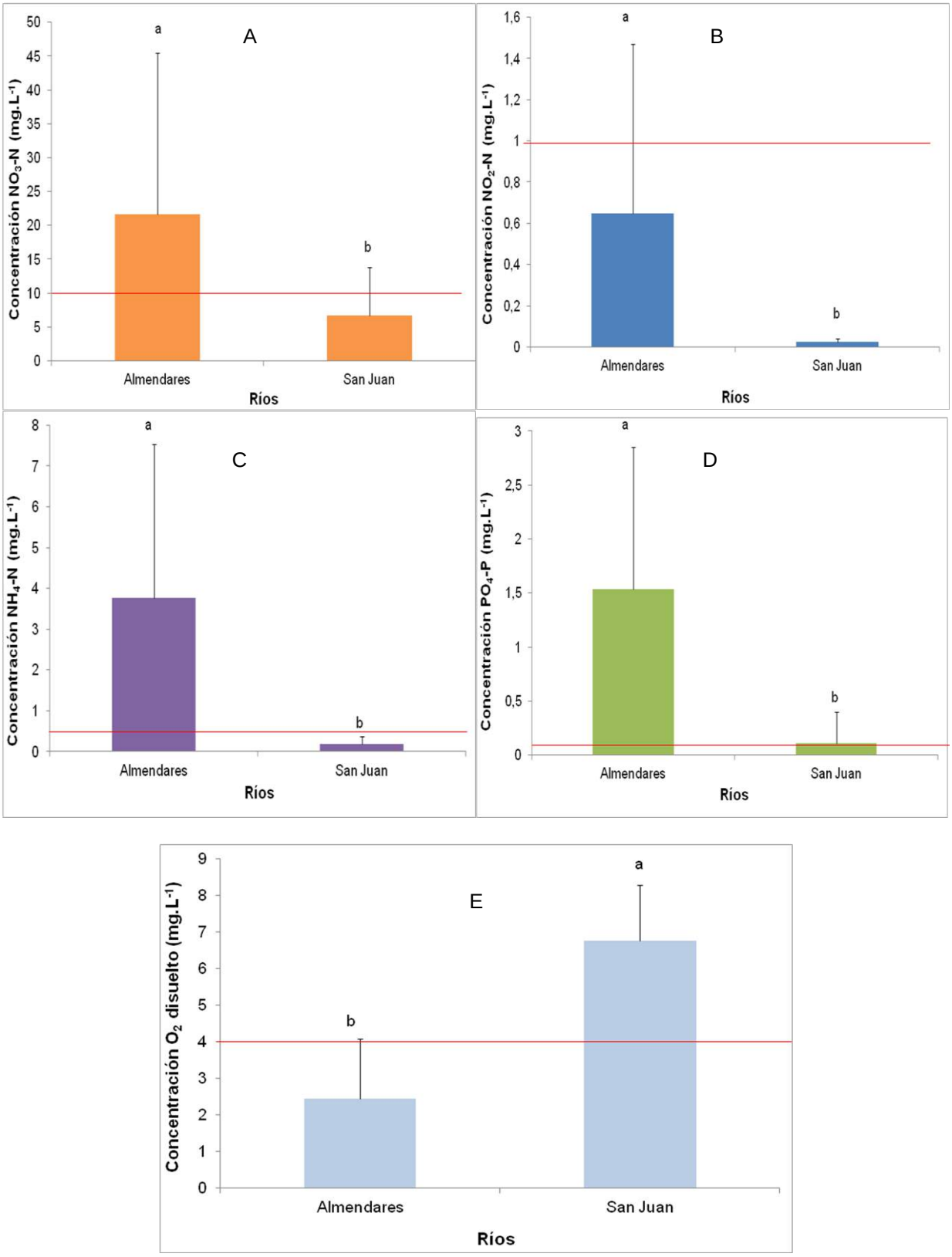


Figura 7. Media de las concentraciones de nutrientes inorgánicos y oxígeno disuelto en los ríos Almendares y San Juan en el período 2011- 2013. Concentraciones de nitratos (A), nitritos (B), amonio (C), fosfatos (D) y oxígeno disuelto (E). La línea roja indica límite máximo permisible según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2003). Las barras de error indican la desviación estándar de n=18. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los ríos según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD ($p<0,05$).

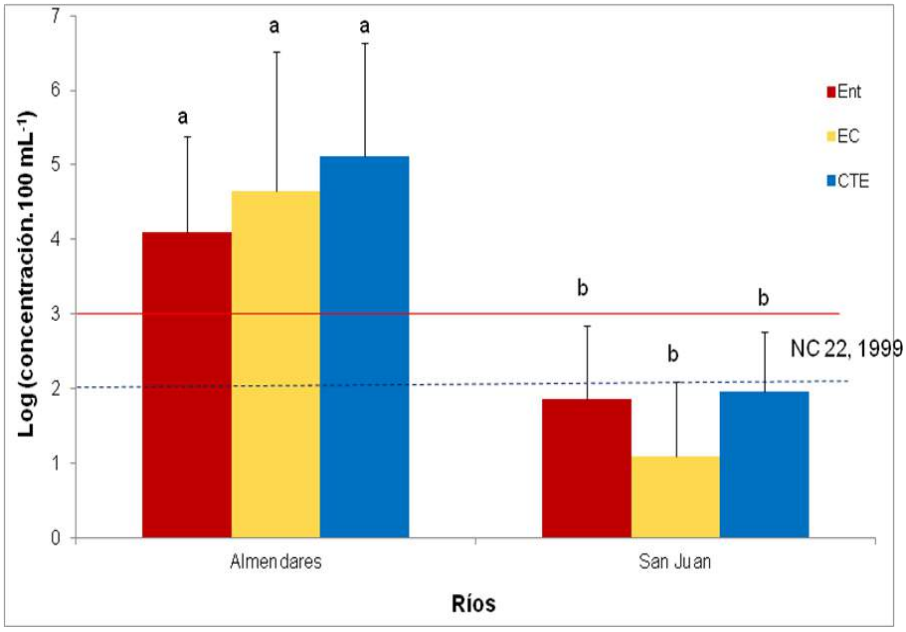


Figura 8. Media de los logaritmos de las concentraciones de indicadores bacterianos de contaminación fecal en los ríos Almendares y San Juan en el período 2011- 2013. Ent: enterococos; EC: *Escherichia coli* y CTE: coliformes termotolerantes (CTE). Línea roja continua indica contacto indirecto con el agua, línea azul oscura discontinua indica contacto directo con el agua según la Norma Cubana 22 de 1999. Las barras de error indican la desviación estándar de n=18. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los valores de las concentraciones de cada indicador bacteriano entre los ríos según la prueba ANOVA (simple)-Tukey HSD (p<0,05).

3.6. Análisis de la comunidad bacteriana mediante DGGE

3.6.1. Río Almendares

La comunidad bacteriana del río Almendares se analizó a través de la DGGE. En la Figura 9A se puede observar el patrón de bandas obtenido a través de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR. El número de bandas por muestra varió entre 17 (Río Cristal octubre 2011) y 29 (Río Cristal abril 2013), además se pueden observar diferencias en los perfiles de bandas de cada estación de muestreo en cada uno de los meses analizados así como diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas.

Teniendo en cuenta los perfiles de bandas se realizó un análisis de agrupamiento por cada período de estudio (Figuras 9B y 9C). En el dendrograma realizado con los perfiles de bandas obtenidos a partir de los muestreos de octubre 2011-abril 2012 (Figura 9B), se puede observar la formación de un grupo con un 60% de similitud, el cual incluye las muestras de la estación Río Cristal colectadas en abril 2012 y las muestras de la estación Puente de Hierro colectadas en febrero 2012. El resto de las muestras quedan separadas entre sí. El análisis de varianza por permutación (PERMANOVA) indicó diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo (p=0,021), así como entre los diferentes meses de colecta (p=0,001). Este resultado se puede constatar a través del análisis de agrupamiento donde las estaciones Río Cristal y Puente de Hierro quedan separadas de la estación Paila.

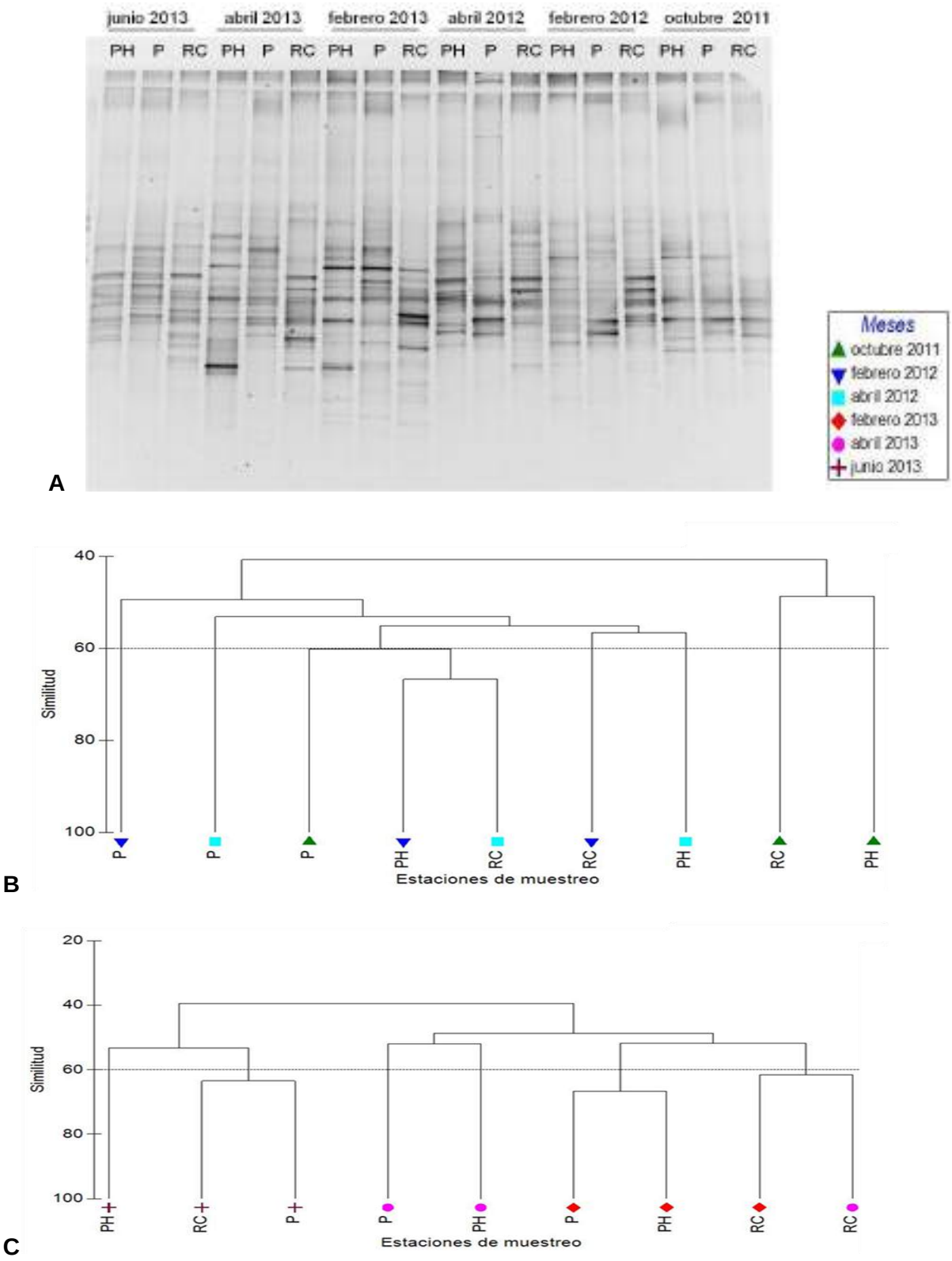


Figura 9. Análisis de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 341FGC y 534R. (**A**) Imagen del gel obtenido a partir de las muestras del río Almendares colectadas en el período octubre 2011- junio 2013. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. (**B**) y (**C**) Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en los patrones de bandas de las muestras del río Almendares obtenidas mediante DGGE en los periodos octubre 2011-abril 2012 y febrero 2013-junio 2013 respectivamente. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Sorensen. Estaciones de muestreo: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal.

Además se observa una separación entre el mes de octubre 2011 con respecto a los meses febrero y abril del año 2012.

Este mismo análisis se realizó teniendo en cuenta los perfiles de bandas obtenidos en el período febrero 2013-junio 2013 (Figura 9C), donde se observa en el dendrograma la formación de tres grupos con un 60 % de similitud. El primer grupo está formado por las muestras de las estaciones Río Cristal y Paila colectadas en el mes de junio 2013, el segundo grupo incluye las muestras de las estaciones Paila y Puente de Hierro colectadas en febrero 2013, y el tercero agrupa a las muestras de la estación Río Cristal colectadas en los meses de febrero y abril 2013. El resto de las muestras quedan separadas entre sí. El análisis de varianza por permutación evidenció la existencia de diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreos (p=0,003), así como entre los diferentes meses muestreados (p=0,001). Este resultado se puede corroborar con el análisis de agrupamiento, donde se observa una separación entre el mes de junio 2013 con respecto a los meses de febrero y abril 2013. Además, en los meses de febrero y abril 2013 se aprecia la separación entre las estaciones Paila y Puente de Hierro con respecto a la estación Río Cristal. Las diferencias detectadas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo, así como entre los meses evaluados, evidencia la variabilidad espacio-temporal en la estructura de las comunidades bacterianas en el río Almendares en ambos periodos de muestreo.

A partir de la DGGE obtenida mediante la amplificación del ADNr 16S utilizando los cebadores 517FGC y 1061R, se cortaron 19 bandas (Figura 10), las cuales se reamplificaron y se secuenciaron. La identificación de las bandas secuenciadas se muestra en la Tabla 8, donde se evidencia el predominio de la clase *Gammaproteobacteria*, siendo identificadas 11 bandas como pertenecientes a esta clase. Además se identificaron cinco bandas pertenecientes a la clase *Betaproteobacteria*, una banda relacionada con la clase *Flavobacteria*, una banda relacionada con el filo *Actinobacteria* y una banda relacionada con el filo *Chloroflexi*. Asumiendo que la intensidad de las bandas es una medida relativa de la abundancia de las poblaciones bacterianas en el ecosistema, las bandas B1, B2, B4, B5, B13, B15, B16 y B18 podrían atribuirse a poblaciones bacterianas metabólicamente activas. Particularmente la banda B5, que se asemeja a las bandas B7 y B19, se puede observar en las estaciones Río Cristal y Puente de Hierro durante los meses de febrero y abril del año 2012, abril 2013 y junio 2013. Durante este último mes puede observarse una banda tenue en la estación Paila.

3.6.2. Río San Juan

En la Figura 11A se aprecia el patrón de bandas obtenido mediante la DGGE a partir de las muestras del río San Juan. El número de bandas por muestra varió entre 15 (Baños del San Juan noviembre 2011) y 33 (Presa San Juan abril 2013), además se pueden observar

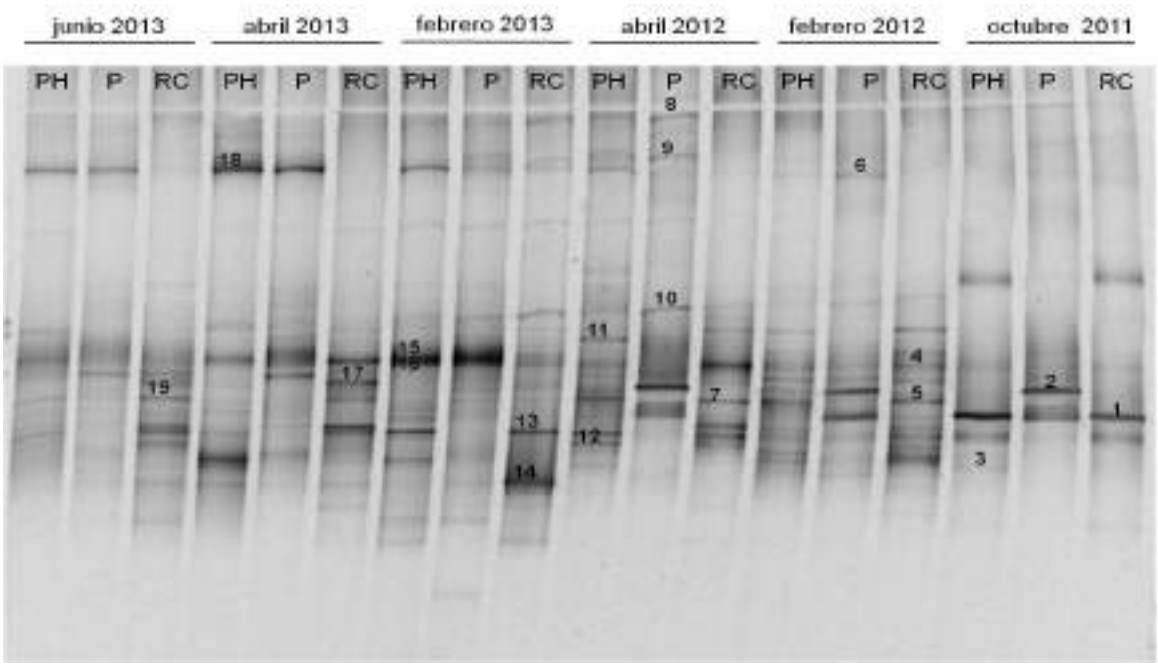


Figura 10. DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 517FGC y 1061R a partir de las muestras del río Almendares colectadas en el período octubre 2011-junio 2013. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. Estaciones de muestreo: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal. Los números indican las bandas seleccionadas para posterior secuenciación e identificación.

Tabla 8. Identificación de las bandas seleccionadas de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 517FGC y 1061R a partir de las muestras del río Almendares colectadas en el periodo octubre 2011-junio 2013.

Banda	Identificación	Filo al que pertenece	Clase	Porcentaje de similitud (%)
1	*Pantoea* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	99
2	*Serratia* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	99
3	*Enterobacteriaceae*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	97
4	*Enterobacteriaceae*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	97
5	*Variovorax* sp.	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	93
6	*Yersinia* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	93
7	*Variovorax* sp.	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	98
8	*Serratia liquefaciens*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	100
9	*Serratia* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	99
10	*Serratia liquefaciens*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	99
11	*Comamonadaceae*	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	90
12	*Variovorax* sp.	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	90
13	*Cloroflexi* no cultivable	*Cloroflexi*	-	90
14	*Gammaproteobacteria*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	97
15	*Acinetobacter oleivorans*	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	99
16	*Acinetobacter* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	98
17	*Actinobacteria* no cultivable	*Actinobacteria*	-	84
18	*Flavobacterium* sp.	*Bacteroidetes*	*Flavobacteria*	83
19	*Variovorax* sp.	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	90

diferencias en los perfiles de bandas de cada estación de muestreo en cada uno de los meses analizados así como diferencias en cuanto a la intensidad de las bandas.

Tomando en consideración los perfiles de bandas obtenidos mediante la DGGE se realizó un análisis de agrupamiento por cada periodo de estudio (Figuras 11B y 11C). Teniendo en cuenta el dendrograma obtenido con las muestras del período noviembre 2011-abril 2012 (Figura 11B), se observa la formación de tres grupos con un 60% de similitud; el primero formado por las muestras de la estación Baños del San Juan colectadas en los meses de febrero y abril 2012, el segundo grupo incluye las muestras de la estación de muestreo El Palmar colectadas en los meses de febrero y abril 2012, y el tercer grupo agrupa a las muestras de la estación Presa San Juan colectadas en febrero y abril 2012. Las muestras del mes de noviembre de cada una de las estaciones analizadas quedaron separadas entre sí. El análisis de varianza por permutación (PERMANOVA) indicó diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreos (p=0,001), así como entre los diferentes meses muestreados (p=0,001). Este resultado se aprecia en el análisis de agrupamiento donde cada grupo formado está representado por una estación en particular, además se aprecia una separación entre las muestras colectadas en los meses de febrero y abril 2012 y las muestras del mes de noviembre 2011.

Este mismo análisis se realizó para las muestras colectadas en el período febrero 2013-julio 2013 (Figura 11C), donde se observa la formación de dos grupos con un 60 % de similitud; el primero agrupa las muestras de las tres estaciones de muestreo del río San Juan colectadas en el mes de julio 2013, y el segundo grupo incluye a las muestras de las estaciones Presa San Juan y Baños del San Juan colectadas en el mes de febrero 2013. El resto de las muestras quedaron separadas entre sí. El análisis de varianza por permutación evidenció que existen diferencias significativas (p=0,014) entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo y entre las comunidades bacterianas detectadas en los diferentes meses de muestreos (p=0,001) en cada estación. Este resultado se puede constatar a través del análisis de agrupamiento, donde se observa la separación entre las muestras colectadas en el mes de julio 2013 con respecto a las colectadas en los meses de febrero y abril 2013. Además, se aprecia la separación entre las estaciones de muestreo, particularmente durante el mes de abril 2013. Las diferencias detectadas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo, así como entre los meses evaluados, evidencia la variabilidad espacio-temporal en la estructura de las comunidades bacterianas en el río San Juan en ambos periodos de muestreo.

A partir de la DGGE obtenida mediante la amplificación del ADNr 16S utilizando los cebadores 517FGC y 1061R, se seleccionaron 15 bandas (Figura 12). En la Tabla 9 se muestra la identificación de las bandas secuenciadas donde se obtuvieron seis bandas relacionadas con la

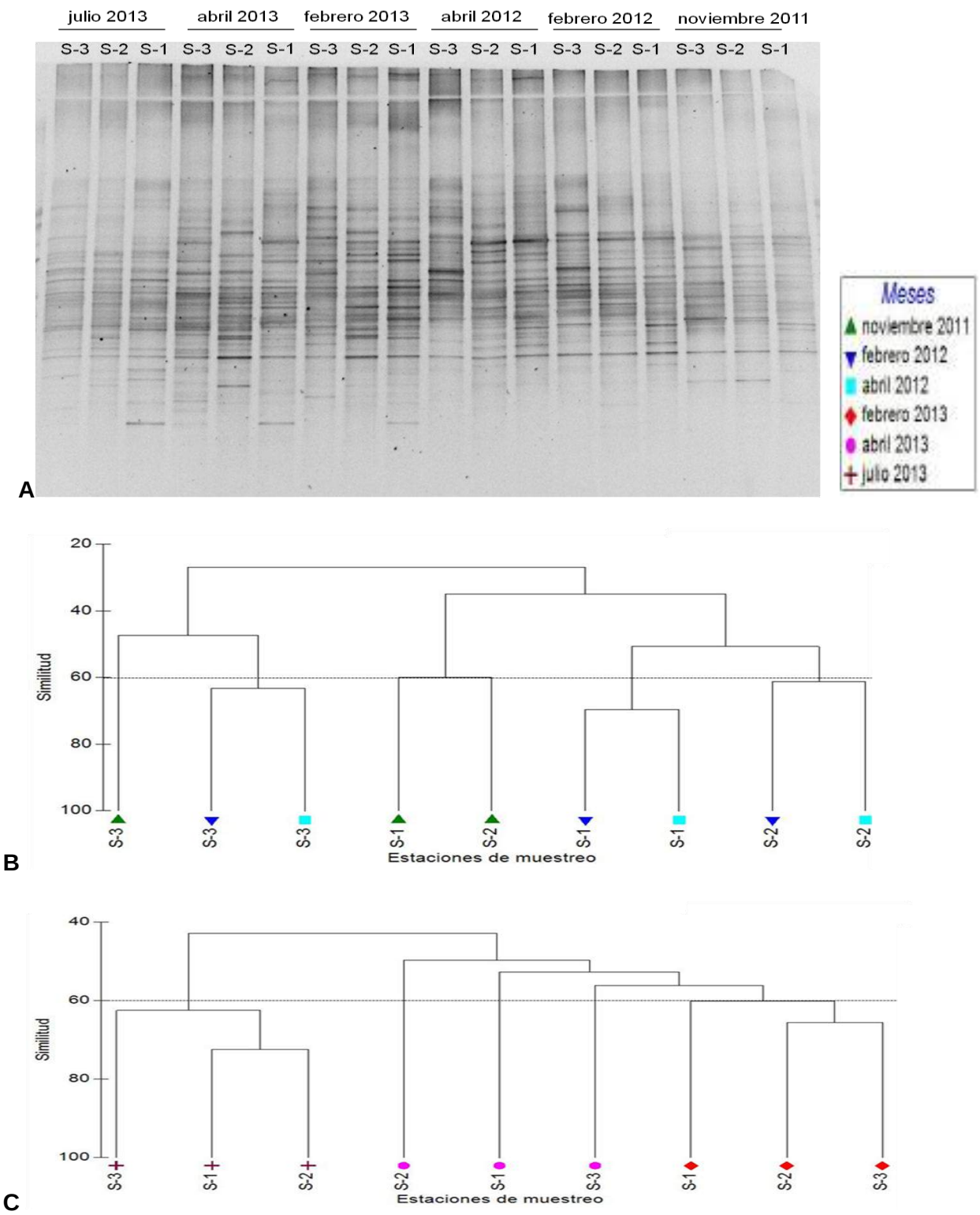


Figura 11. Análisis de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 341FGC y 534R. (**A**) Imagen del gel obtenido a partir de las muestras del río San Juan colectadas en el período noviembre 2011- julio 2013. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. (**B**) y (**C**) Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en los patrones de bandas de las muestras del río San Juan obtenidas mediante DGGE en los períodos noviembre 2011-abril 2012 y febrero 2013-julio 2013 respectivamente. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Sorensen. Estaciones de muestreo: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa El Palmar.

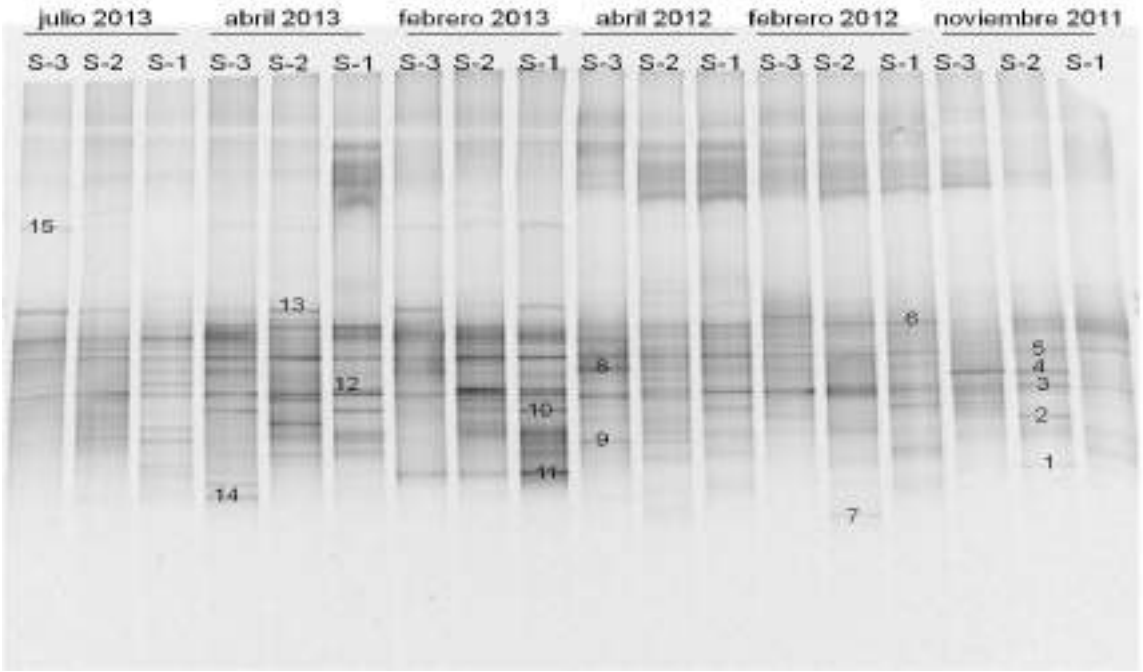


Figura 12. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 517FGC y 1061R a partir de las muestras del río San Juan colectadas en el período noviembre 2011-julio 2013. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. Estaciones de muestreo: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa El Palmar. Los números indican las bandas seleccionadas para posterior secuenciación e identificación.

Tabla 9. Identificación de las bandas seleccionadas de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 517FGC y 1061R a partir de las muestras del río San Juan colectadas en el periodo noviembre 2011-julio 2013.

Banda	Identificación	Filo al que pertenece	Clase	Porcentaje de similitud (%)
1	*Arthrobacter* sp.	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	96
2	*Gammaproteobacteria* no cultivable	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	97
3	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	97
4	*Serratia* sp.	*Proteobacteria*	*Gammaproteobacteria*	97
5	*Betaproteobacteria* no cultivable	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	95
6	*Hydrogenophaga* sp.	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	97
7	Bacteria no cultivable	-	-	85
8	*Bacillus* sp.	*Firmicutes*	*Bacilli*	98
9	*Actinobacteria* no cultivable	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	98
10	*Betaproteobacteria* no cultivable	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	94
11	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	97
12	*Actinobacteria* no cultivable	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	98
13	*Betaproteobacteria*	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	94
14	*Actinobacteria* no cultivable	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*	97
15	*Betaproteobacteria*	*Proteobacteria*	*Betaproteobacteria*	84

clase *Actinobacteria*, cinco bandas relacionadas con la clase *Betaproteobacteria*, dos bandas relacionadas con la clase *Gammaproteobacteria*, una banda relacionada con la clase *Bacilli* y una banda relacionada con una bacteria no cultivable. Asumiendo que la intensidad de las bandas es una medida relativa de la abundancia de las poblaciones bacterianas en el ecosistema, las bandas B3, B4, B5, B6, B8, B9, B10, B11, B13 y B15 podrían atribuirse a poblaciones bacterianas metabólicamente activas. Particularmente las bandas B3 y B5 están presentes durante los dos años de estudio en todas las estaciones de muestreo con una intensidad similar.

3.6.3. Comparación de la estructura de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013

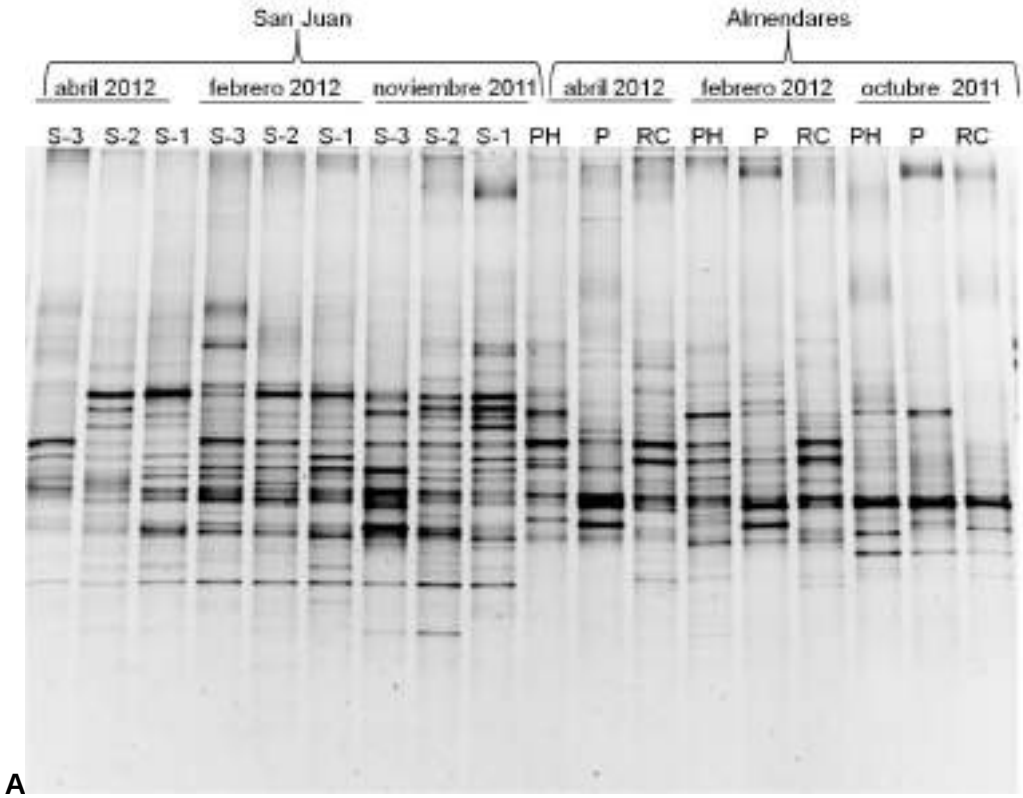
Al analizar la estructura de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2012 (Figura 13A) se puede constatar a partir del análisis de conglomerado la formación de tres grupos con un 60 % de similitud (Figura 13B); el primer grupo agrupa a las muestras de las estaciones Presa San Juan y Río Cristal, ambas colectadas en el mes de abril 2012. El segundo grupo incluye las muestras de las estaciones Baños del San Juan y Presa San Juan colectadas en los meses de abril 2012 y febrero 2012 respectivamente; y el tercer grupo agrupa a las muestras de la estación Presa El Palmar colectadas en febrero y abril 2012 y la muestra de la estación Baños del San Juan colectada en el mes de febrero 2012. El resto de las muestras quedaron separadas. El análisis de varianza por permutación (PERMANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas (p=0,001) entre las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan.

Al analizar la estructura de las comunidades bacterianas en el período febrero 2013-julio 2013 (Figura 14A) se pudo observar a partir del análisis de conglomerado la formación de cuatro grupos con una similitud del 60% (Figura 14B). El primer grupo formado por las muestras de la estación Río Cristal colectadas en abril y junio del 2013, el segundo grupo formado por las muestras de las estaciones Paila y Puente de Hierro del mes de junio 2013, el tercer grupo agrupa las muestras de las estaciones Presa El Palmar y Baños del San Juan del mes de julio 2013 y el cuarto grupo incluye las muestras de la estación Presa El Palmar colectadas en el mes de febrero 2013 y las muestras de la estación Baños del San Juan colectadas en los meses de febrero 2013 y abril 2013. El resto de las muestras quedaron separadas. El análisis de varianza por permutación indicó la existencia de diferencias significativas (p=0,001) entre los ríos Almendares y San Juan.

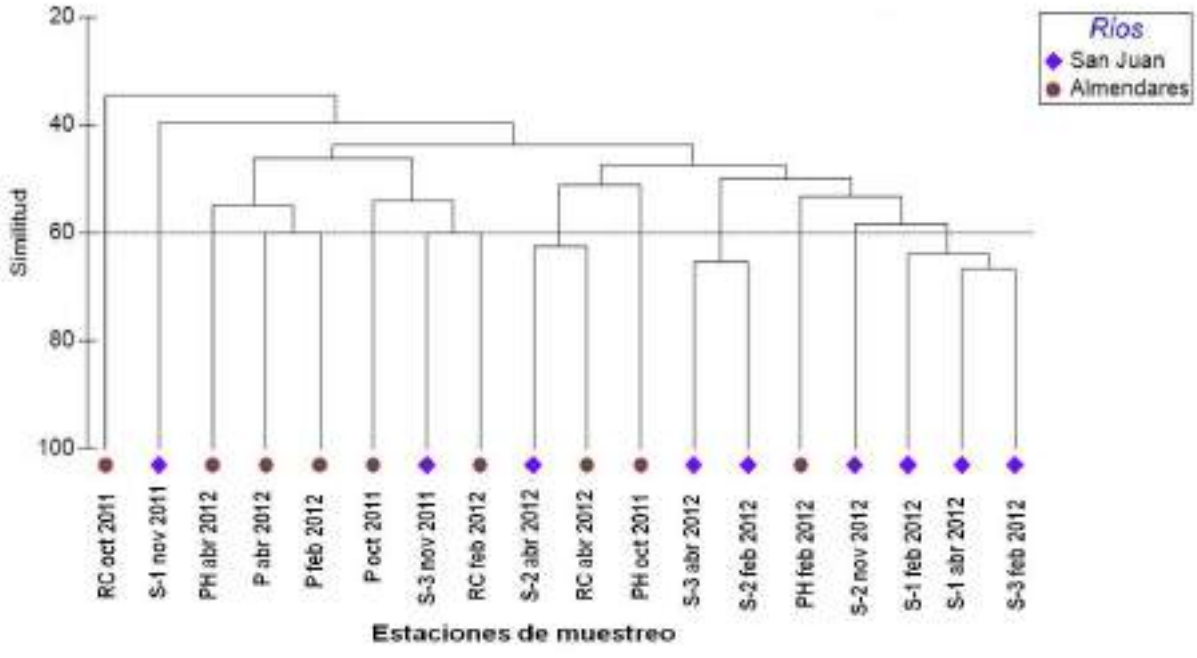
3.7. Análisis de la comunidad bacteriana mediante la técnica de pirosecuenciación 454

3.7.1. Río Almendares

El período febrero 2013-junio 2013 se escogió para el análisis de la composición de las comunidades bacterianas por pirosecuenciación 454, teniendo en cuenta que en el mes de junio

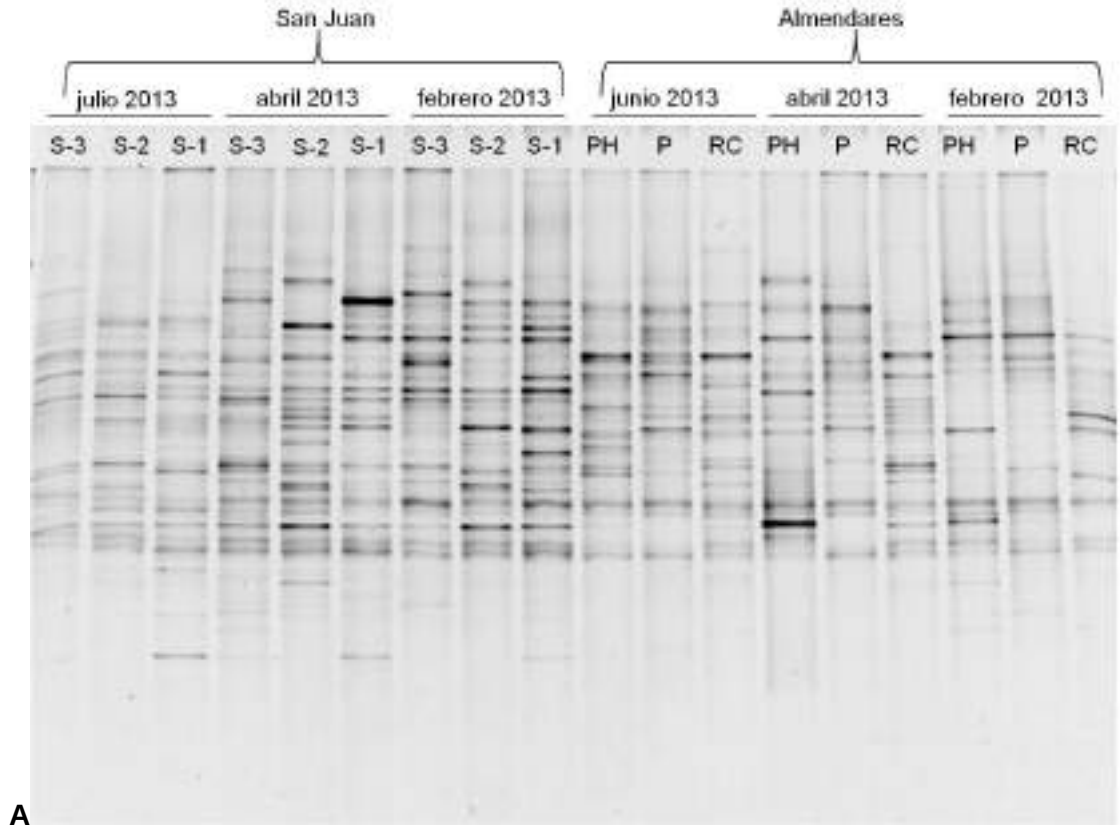


A

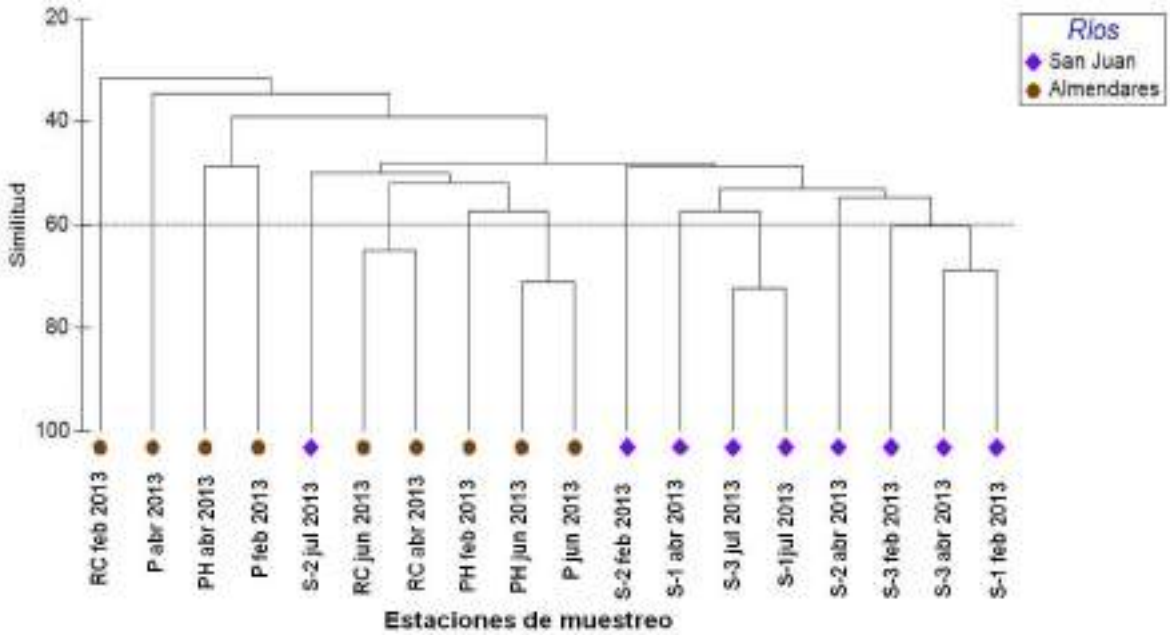


B

Figura 13. Análisis de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 341FGC y 534R. (**A**) Imagen del gel obtenido a partir de las muestras de los ríos Almendares y San Juan colectadas en el período octubre 2011- abril 2012. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. (**B**) Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en los patrones de bandas de las muestras de los ríos Almendares y San Juan. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Sorensen. Estaciones de muestreo río Almendares: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal. Estaciones de muestreo río San Juan: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa el Palmar.



A



B

Figura 14. Análisis de la DGGE de los fragmentos de ADNr 16S amplificados mediante PCR con los cebadores 341FGC y 534R. (**A**) Imagen del gel obtenido a partir de las muestras de los ríos Almendares y San Juan colectadas en el período febrero 2013- julio 2013. Gradiente desnaturalizante empleado: 20-70%. (**B**) Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en los patrones de bandas de las muestras de los ríos Almendares y San Juan. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Sorensen. Estaciones de muestreo río Almendares: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal. Estaciones de muestreo río San Juan: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa el Palmar.

se detectaron las temperaturas más elevadas, lo cual permite analizar no solo la influencia de la contaminación antropogénica en el río Almendares, sino también la influencia de factores ambientales como la temperatura. A partir del análisis de la composición de las comunidades bacterianas se construyó un dendrograma (Figura 15), en el cual se puede apreciar la formación de tres grupos con un 75% de similitud. El primer grupo formado por las muestras de la estación Río Cristal colectadas en abril y junio 2013, el segundo grupo que incluye las muestras de las estaciones Paila y Puente de Hierro colectadas en el mes de junio 2013 y el tercer grupo que agrupa las muestras de Puente de Hierro de los meses febrero y abril 2013 y la muestra de la estación Paila del mes de abril 2013. Las muestras de las estaciones Río Cristal y Paila colectadas en el mes de febrero 2013 quedan separadas de los grupos formados. Teniendo en cuenta los resultados del análisis de varianza por permutación (PERMANOVA), se pudo constatar que con respecto a la composición de las comunidades bacterianas existen diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (p=0,001). Además se encontraron diferencias significativas entre los meses de muestreos (p=0,021).

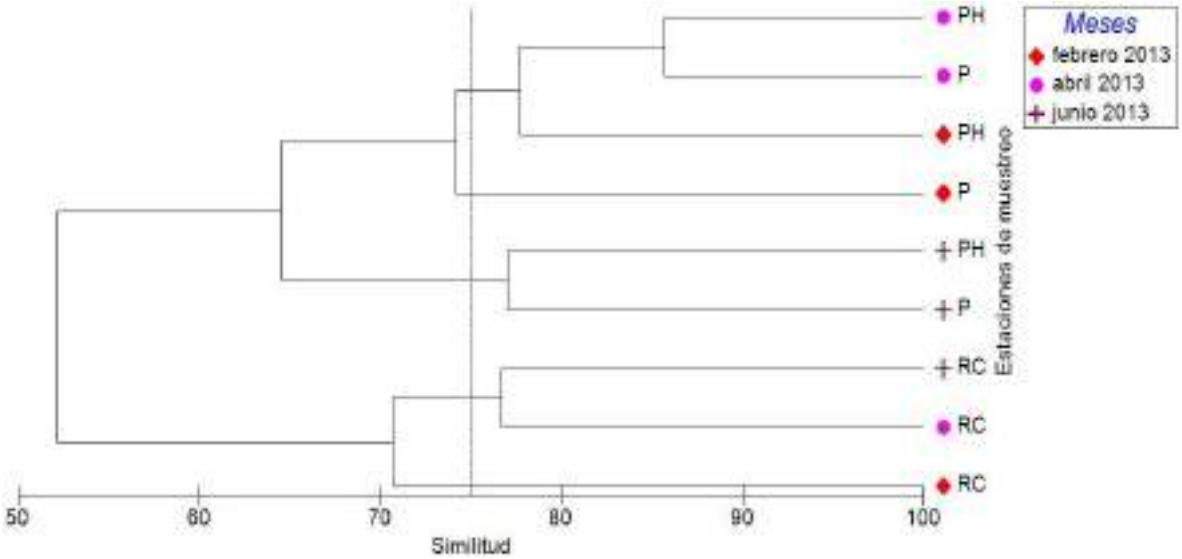


Figura 15. Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en la composición de las comunidades bacterianas de las muestras del río Almendares obtenidas mediante pirosecuenciación 454 en el período febrero 2013-junio 2013. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Bray-Curtis. Estaciones de muestreo: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal.

Este resultado se puede corroborar a través del análisis de agrupamiento, donde la estación Río Cristal queda separada de las estaciones Paila y Puente de Hierro, además, en estas últimas estaciones de muestreo se aprecia la separación de la muestras colectadas en junio 2013 con respecto a las muestras colectadas en los meses de febrero y abril 2013. En la estación Río Cristal, las muestras del mes de febrero 2013 se separan de las muestras de los meses abril y junio 2013.

Mediante la pirosecuenciación 454 se obtuvieron un total de 35 872 secuencias y se apreció que en las estaciones del río Almendares, los filos *Proteobacteria* (52,7%), *Actinobacteria* (24,6%), *Bacteroidetes* (17,5%) y *Firmicutes* (3,96%) eran los más abundantes en el periodo de estudio (más de 500 secuencias) (Figura 16, Tabla 10). Dentro del filo *Proteobacteria* las clases *Gammaproteobacteria* (76,0%), *Betaproteobacteria* (15,0%) y *Alphaproteobacteria* (9,0%) fueron las más frecuentes. Además se observó que al aumentar la proporción del filo *Actinobacteria* se producía una disminución en la proporción del filo *Bacteroidetes* y viceversa.

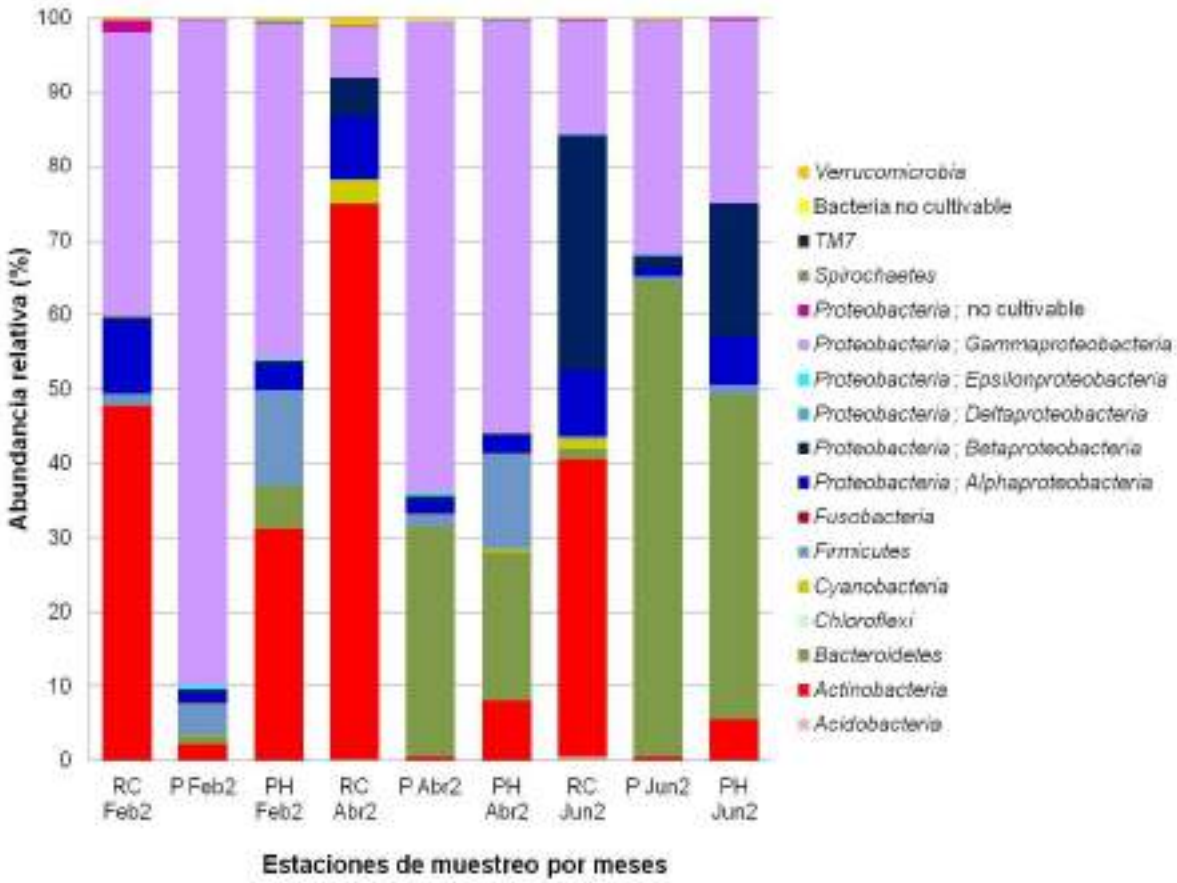


Figura 16. Distribución porcentual taxonómica de los diferentes filo/clase en las estaciones de muestreo del río Almendares en el período febrero-junio 2013. Estaciones: RC: Río Cristal; P: Paila; PH: Puente de Hierro. Meses: Feb2: febrero 2013; Abr2: abril 2013; Jun2: junio 2013.

Tomando en consideración la clasificación taxonómica hasta el nivel de familia (Tabla 10), se pudo observar que las familias más abundantes en el río Almendares eran: *Microbacteriaceae, Mycobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Bacillaceae*, Familia XII *Bacillales Incertae sedis*, *Sphingomonadaceae, Comamonadaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae*. Además se apreció un número considerable de secuencias que correspondieron a bacterias no cultivables de los órdenes *Actinomycetales* y *Burkholderiales*; aunque se debe destacar que en la mayoría de las clases bacterianas se detectaron secuencias que no pudieron ser identificadas.

Tabla 10. Abundancia relativa de las familias identificadas por pirosecuenciación 454 en el río Almendares en el periodo 2013.

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Río Cristal**	**Paila**	**Puente de Hierro**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Acidobacteria	*Acidobacteria*	*Acidobacteriales*	*Acidobacteriaceae**	43	0	0	0,120
	No cultivable[b]	No cultivable	No cultivable	1	0	0	0,003
Actinobacteria	*Actinobacteria*	*Actinomycetales*	*Gordoniaceae**	0	0	3	0,008
			No cultivable[c]	3463	3	68	9,875
		Corynebacteriales	*Mycobacteriaceae*	1353	62	527	5,426
			Nocardiaceae	5	0	4	0,025
		Frankiales	*Geodermatophilaceae**	17	0	0	0,048
		Micrococcales	*Micrococcaceae*	7	5	76	0,246
			Brevibacteriaceae	0	0	3	0,008
			*Intrasporangiaceae**	172	0	11	0,511
			*Microbacteriaceae**	1967	14	823	7,835
			*Promicromonosporaceae**	0	0	2	0,006
			*Sanguibacteraceae**	0	0	2	0,006
		Micromonosporales	*Micromonosporaceae**	9	0	0	0,025
		Propionibacteriales	*Nocardioidaceae**	8	6	16	0,084
		Streptosporangiales	*Nocardiopsaceae**	10	1	2	0,036
		Streptomycetales	*Streptomycetaceae*	79	0	5	0,235
		No cultivable	No cultivable	53	0	4	0,159
	Acidimicrobia	*Acidimicrobiales*	*Acidimicrobiaceae**	3	0	0	0,008
	Coriobacteria	*Coriobacteriales*	*Coriobacteriaceae**	0	30	3	0,092
	Thermoleophilia	*Solirubrobacterales*	*Patulibacteraceae**	17	0	1	0,050
Bacteroidetes	*Bacteroidia*	*Bacteroidales*	*Prevotellaceae**	2	6	0	0,022
	Cytophagia	*Cytophagales*	*Cytophagaceae*	37	0	0	0,103
	Flavobacteria	*Flavobacteriales*	*Flavobacteriaceae*	15	4027	2109	17,187
			No cultivable	2	0	0	0,006
	Sphingobacteria	*Sphingobacteriales*	*Sphingobacteriaceae*	3	12	2	0,048
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	15	4	0	0,053
Chloroflexi	*Thermomicrobia*	*Thermomicrobiales*	*Thermomicrobiaceae**	0	0	1	0,003
Cyanobacteria	*Cyanobacteria*	*Chroococcales*	*Chroococcales*[d]	229	2	22	0,701
		Nostocales	*Nostocaceae*	3	0	0	0,008

Continuación Tabla 10

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Río Cristal**	**Paila**	**Puente de Hierro**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Cyanobacteria	*Cyanobacteria*	No cultivable	No cultivable	5	0	0	0,014
Firmicutes	*Bacilli*	*Bacillales*	*Bacillaceae*	47	4	372	1,182
			*Planococcaceae**	14	75	143	0,648
			Fam. XII Bacillales[e]	0	41	572	1,713
		Lactobacillales	*Lactobacillaceae*	0	10	2	0,034
			Streptococcaceae	0	0	4	0,011
	Clostridia	*Clostridiales*	*Clostridiaceae*	0	5	0	0,014
			*Eubacteriaceae**	0	2	0	0,006
			*Lachnospiraceae**	0	2	0	0,006
			*Ruminococcaceae**	0	55	0	0,154
			No cultivable	0	40	6	0,129
	Negativicutes	*Selenomonadales*	*Acidaminococcaceae**	0	3	0	0,008
			*Veillonellaceae**	0	20	3	0,064
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	0	2	0	0,006
Fusobacteria	*Fusobacteria*	*Fusobacteriales*	*Fusobacteriaceae**	0	5	0	0,014
Proteobacteria	*Alphaproteobacteria*	*Rhodospirillales*	*Rhodospirillaceae*	0	0	5	0,014
			Acetobacteraceae	0	0	2	0,006
		Rhodobacterales	*Rhodobacteraceae*	86	39	72	0,550
		Sphingomonadales	*Erythrobacteraceae**	2	0	5	0,020
			Sphingomonadaceae	513	59	69	1,791
		Caulobacterales	*Caulobacteraceae*	176	37	141	0,989
		Rhizobiales	*Rhizobiaceae*	8	10	12	0,084
			*Phyllobacteriaceae**	3	2	0	0,014
			Bradyrhizobiaceae	33	13	7	0,148
			Hyphomicrobiaceae	27	3	3	0,092
			*Xanthobacteraceae**	0	0	4	0,011
			No cultivable	215	4	14	0,651
		No cultivable	No cultivable	104	4	30	0,386

Continuación Tabla 10

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Río Cristal**	**Paila**	**Puente de Hierro**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Proteobacteria	*Betaproteobacteria*	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	248	2	20	0,754
			*Oxalobacteraceae**	13	0	0	0,036
			Alcaligenaceae	36	1	15	0,145
			Comamonadaceae	308	72	193	1,601
			*Burkholderiales[f]**	10	3	0	0,036
			No cultivable	1288	10	94	3,890
		Methylophilales	*Methylophilaceae**	48	0	3	0,143
		Neisseriales	*Neisseriaceae*	0	5	1	0,017
		Rhodocyclales	*Rhodocyclaceae*	233	18	83	0,933
		No cultivable	No cultivable	5	0	0	0,014
	Deltaproteobacteria	*Desulfobacterales*	*Desulfobulbaceae**	10	0	0	0,028
	Epsilonproteobacteria	*Campylobacterales*	*Campylobacteraceae*	0	42	5	0,131
			Helicobacteraceae	0	0	2	0,006
	Gammaproteobacteria	*Aeromonadales*	*Aeromonadaceae*	0	1	2	0,008
			*Succinivibrionaceae**	0	18	3	0,059
		Alteromonadales	*Alteromonadaceae**	0	0	10	0,028
		Enterobacteriales	*Enterobacteriaceae*	3	122	7	0,369
		Legionellales	*Legionellaceae*	0	0	15	0,042
			Coxiellaceae	0	0	4	0,011
		Methylococcales	*Methylococcaceae**	179	0	0	0,500
		Pseudomonadales	*Pseudomonadaceae*	41	55	279	1,048
			Moraxellaceae	677	6211	4384	31,497
		Xanthomonadales	*Xanthomonadaceae*	1161	1002	99	6,321
		No cultivable	No cultivable	24	28	31	0,232
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	54	12	8	0,207
Spirochaetes	*Spirochaetes*	*Spirochaetales*	*Spirochaetaceae*	8	0	0	0,022
TM7	*TM7*	*TM7*	*TM7**	0	0	8	0,022

Continuación Tabla 10

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Río Cristal**	**Paila**	**Puente de Hierro**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Verrucomicrobia	*Verrucomicrobiae*	*Verrucomicrobiales*	*Verrucomicrobiaceae**	26	0	0	0,073
	Opitutae	*Opitutales*	*Opitutaceae**	13	0	5	0,050
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	11	0	0	0,031
No cultivable	No cultivable	No cultivable	No cultivable	18	32	23	0,204

[a] Para calcular la abundancia relativa se tuvo en cuenta el número de secuencias de cada familia obtenido en el periodo febrero-junio 2013 y se dividió entre el total de secuencias obtenidas en el río Almendares por cien.[b] Las secuencias obtenidas no permitieron la identificación hasta el nivel de filo, clase, orden o familia.[c] Se señalan en gris las familias que presentaron una abundancia relativa mayor de 1 % (~> 400 secuencias) en el río Almendares. [d] Familia I, Familia 1.1, género establecido XIII *Synechococcus*. [e] Familia XII del orden *Bacillales Incertae sedis* (de clasificación desconocida).[f] *Burkholderiales Incertae sedis.* *Familias que se informan por primera vez para ecosistemas dulceacuícolas del Caribe.

3.7.2. Río San Juan

En el período febrero 2013-julio 2013 se realizó el análisis de la composición de las comunidades bacterianas por pirosecuenciación 454, teniendo en cuenta que en el mes de julio se detectaron los mayores valores de precipitaciones, lo cual permite analizar no solo la influencia de la contaminación antropogénica en el río San Juan, sino también la influencia de factores ambientales como las precipitaciones. A partir del análisis de la composición de las comunidades bacterianas del río San Juan se construyó un dendrograma. Como se aprecia en la Figura 17 se forman dos grupos con un 75 % de similitud; el primer grupo incluye a las muestras de la estación Presa San Juan colectadas en los meses de abril y julio 2013 y las muestras de la estación Presa El Palmar colectadas en el mes de abril 2013, y el segundo grupo está formado por las muestras de la estación Baños del San Juan colectadas en el período febrero-julio del 2013. Las muestras de la estación Presa El Palmar colectadas en los meses de febrero 2013 y julio 2013, así como las muestras de la estación Presa San Juan colectadas en el mes de febrero 2013 quedaron fuera de los grupos formados.

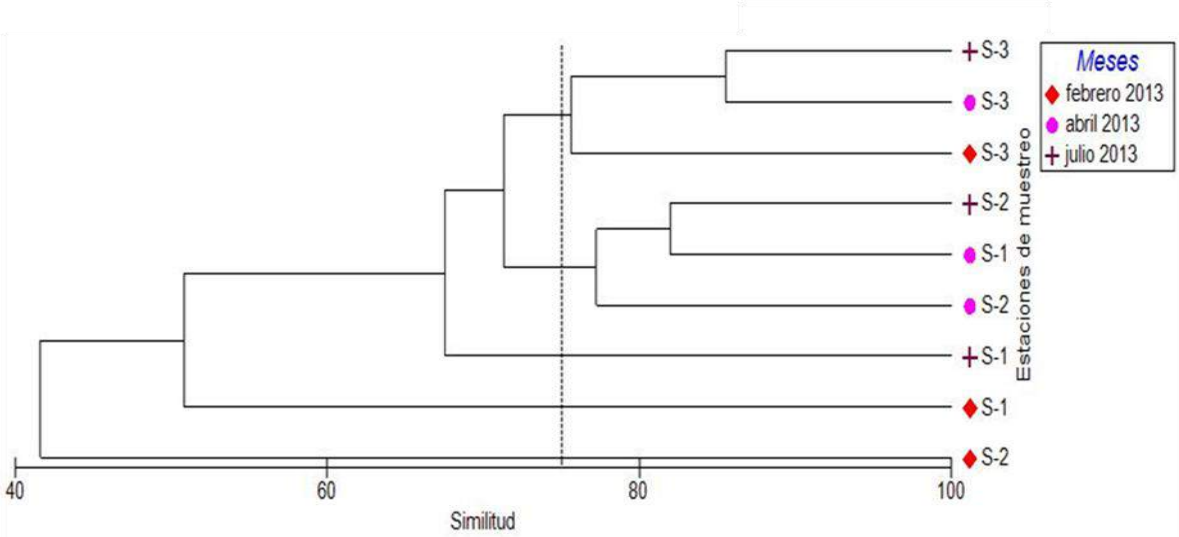


Figura 17. Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en la composición de las comunidades bacterianas de las muestras del río San Juan obtenidas mediante pirosecuenciación 454 en el período febrero 2013-julio 2013. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Bray-Curtis. Estaciones de muestreo: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa El Palmar.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis de varianza por permutación (PERMANOVA), se pudo constatar que con respecto a la composición de las comunidades bacterianas existen diferencias significativas entre las estaciones de muestreo (p=0,002) y entre los meses de muestreos (p=0,001). Este resultado se puede constatar en el análisis de agrupamiento, donde la estación Baños del San Juan (S-3) se separa de las estaciones Presa El Palmar (S-1) y Pres San Juan (S-2). En tanto, en todas las estaciones de muestreo se aprecia una separación de

las muestras colectadas en el mes de febrero 2013 con respecto a las muestras colectadas en los meses abril y julio del 2013.

Mediante la pirosecuenciación 454 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 (aproximadamente más de 500 secuencias) (Figura 18, Tabla 11), observándose además que al aumentar la proporción del filo *Actinobacteria* se producía una disminución en la proporción del filo *Bacteroidetes* y viceversa. Dentro del filo *Proteobacteria* las clases *Alphaproteobacteria* (63,0%), *Betaproteobacteria* (22,0%) y *Gammaproteobacteria* (15,0%) fueron las más frecuentes.

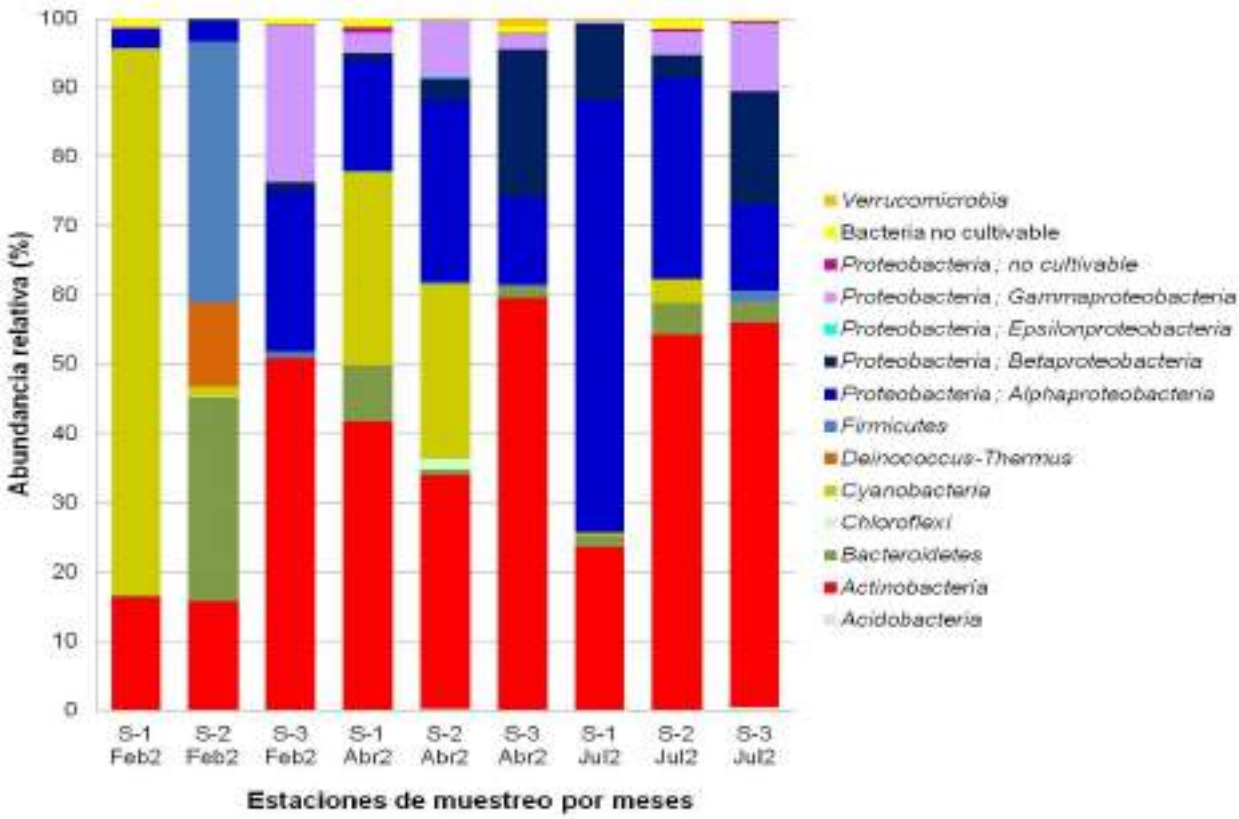


Figura 18. Distribución porcentual taxonómica de los diferentes filo/clase en las estaciones de muestreo del río San Juan en el período febrero-julio 2013. Estaciones: S-1: Presa El Palmar; S-2: Presa San Juan; S-3: Baños del San Juan. Meses: Feb2: febrero 2013; Abr2: abril 2013; Jul2: julio 2013.

Tomando en consideración la clasificación taxonómica hasta el nivel de familia (Tabla 11), se pudo observar que las familias más abundantes en el río San Juan eran: *Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Mycobacteriaceae, Nocardioidaceae, Sphingobacteriaceae, Chroococcales, Deinococcaceae, Bacillaceae, Caulobacteraceae, Sphingomonadaceae, Burkholderiaceae* y *Moraxellaceaeceae*. Además se apreció un número considerable de secuencias que correspondieron a bacterias no cultivables de los órdenes *Actinomycetales* y *Burkholderiales* y

Tabla 11. Abundancia relativa de las familias identificadas por pirosecuenciación 454 en el río San Juan en el periodo 2013.

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Presa El Palmar**	**Presa San Juan**	**Baños del San Juan**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Acidobacteria	*Acidobacteria*	*Acidobacteriales*	*Acidobacteriaceae**	8	2	5	0,032
	No cultivable[b]	No cultivable	No cultivable	1	4	2	0,015
Actinobacteria	*Actinobacteria*	*Actinobacteria*[c]	*Actinobacteria*[c]*	0	6	0	0,013
		Actinomycetales	No cultivable[d]	3025	2611	5597	23,746
		Corynebacteriales	*Corynebacteriaceae*	9	0	0	0,019
			Mycobacteriaceae	7	464	642	2,353
			Nocardiaceae	0	10	0	0,021
		Frankiales	*Geodermatophilaceae**	0	4	2	0,013
		Micrococcales	*Micrococcaceae*	561	396	46	2,120
			*Intrasporangiaceae**	19	25	311	0,750
			*Microbacteriaceae**	723	312	1123	4,562
			*Promicromonosporaceae**	0	0	43	0,091
		Micromonosporales	*Micromonosporaceae**	101	0	5	0,224
		Propionibacteriales	*Nocardioidaceae**	177	173	220	1,205
		Streptomycetales	*Streptomycetaceae*	22	47	13	0,173
		No cultivable	No cultivable	1253	433	45	3,659
	Acidimicrobia	*Acidimicrobiales*	*Acidimicrobiaceae**	0	2	4	0,013
			*Iamiaceae**	0	0	45	0,095
	Thermoleophilia	*Solirubrobacterales*	*Solirubrobacteraceae**	0	3	0	0,006
			*Patulibacteraceae**	0	0	1	0,002
			No cultivable	0	2	0	0,004
Bacteroidetes	*Cytophagia*	*Cytophagales*	*Cytophagaceae*	22	1	41	0,135
	Flavobacteria	*Flavobacteriales*	*Flavobacteriaceae*	0	9	16	0,053
			No cultivable	8	2	36	0,097
	Sphingobacteria	*Sphingobacteriales*	*Saprospiraceae**	0	5	0	0,011
			Sphingobacteriaceae	804	1226	50	4,397
			No cultivable	1	106	5	0,237
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	30	8	59	0,205

Continuación Tabla 11

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Presa El Palmar**	**Presa San Juan**	**Baños del San Juan**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Chloroflexi	*Chloroflexi*	*Chloroflexales*	*Chloroflexaceae*	0	0	3	0,006
Chloroflexi	*Thermomicrobia*	*Thermomicrobiales*	*Thermomicrobiaceae**	0	130	0	0,275
Cyanobacteria	*Cyanobacteria*	*Chroococcales*	*Chroococcales*[e]	6903	2047	2	18,924
		Nostocales	*Nostocaceae*	0	3	0	0,006
Deinococcus-Thermus	*Deinococci*	*Deinococcales*	*Deinococcaceae**	0	497	0	1,051
Firmicutes	*Bacilli*	*Bacillales*	*Bacillaceae*	22	1542	83	3,482
			*Planococcaceae**	1	25	0	0,055
			Fam. XII Bacillales[f]	0	1	1	0,004
	Clostridia	*Thermoanaerobacterales*	*Thermodesulfobiaceae**	3	0	5	0,017
Proteobacteria	*Alphaproteobacteria*	*Rhodospirillales*	*Rhodospirillaceae*	0	2	0	0,004
			Acetobacteraceae	21	3	4	0,059
		Rhodobacterales	*Rhodobacteraceae*	104	17	32	0,323
		Sphingomonadales	*Sphingomonadaceae*	2912	1525	1484	12,517
			*Erythrobacteraceae**	6	21	12	0,082
			No cultivable	0	0	2	0,004
		Caulobacterales	*Caulobacteraceae*	981	776	253	4,249
		Rhizobiales	*Rhizobiaceae*	53	91	40	0,389
			*Phyllobacteriaceae**	1	4	0	0,011
			Bradyrhizobiaceae	13	45	66	0,262
			Hyphomicrobiaceae	48	94	15	0,332
			Methylobacteriaceae	30	47	11	0,186
			No cultivable	57	129	200	0,816
		Parvularculales	*Parvularculaceae**	3	0	0	0,006
		No cultivable	No cultivable	14	28	31	0,154

Continuación Tabla 11

Clasificación Taxonómica				Número de secuencias por estación			
Filo	**Clase**	**Orden**	**Familia**	**Presa El Palmar**	**Presa San Juan**	**Baños del San Juan**	**Abundancia relativa (%)[a]**
Proteobacteria	*Betaproteobacteria*	*Burkholderiales*	*Burkholderiaceae*	488	114	1350	4,126
			*Oxalobacteraceae**	0	3	8	0,023
			Alcaligenaceae	0	2	2	0,008
			Comamonadaceae	6	72	60	0,292
			*Burkholderiales[g]**	0	2	15	0,036
			No cultivable	46	115	761	1,949
		Methylophilales	*Methylophilaceae**	1	18	54	0,154
		Rhodocyclales	*Rhodocyclaceae*	2	2	0	0,008
		No cultivable	No cultivable	8	0	9	0,036
	Epsilonproteobacteria	*Campylobacterales*	*Campylobacteraceae*	0	0	1	0,002
			Helicobacteraceae	0	16	0	0,034
	Gammaproteobacteria	*Enterobacteriales*	*Enterobacteriaceae*	4	43	102	0,315
		Legionellales	*Legionellaceae*	5	0	0	0,011
			Coxiellaceae	0	0	1	0,002
		Methylococcales	*Methylococcaceae**	2	0	1	0,006
		Oceanospirillales	*Halomonadaceae**	0	0	32	0,068
		Pseudomonadales	*Pseudomonadaceae*	0	61	10	0,150
			Moraxellaceae	290	577	981	3,907
		Xanthomonadales	*Xanthomonadaceae*	20	30	7	0,120
		No cultivable	No cultivable	0	0	14	0,030
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	84	14	20	0,249
Verrucomicrobia	*Opitutae*	*Opitutales*	*Opitutaceae**	3	8	100	0,235
	No cultivable	No cultivable	No cultivable	0	5	0	0,011
No cultivable	No cultivable	No cultivable	No cultivable	194	36	130	0,761

[a] Para calcular la abundancia relativa se tuvo en cuenta el número de secuencias de cada familia obtenido en el periodo febrero-julio 2013 y se dividió entre el total de secuencias obtenidas en el río San Juan por cien. [b] Las secuencias obtenidas no permitieron la identificación hasta el nivel de filo, clase, orden o familia. [c] Clase *Actinobacteria Incertae sedis* (de clasificación desconocida). [d] Se señalan en gris las familias que presentaron una abundancia relativa mayor de 1 % (~> 400 secuencias) en el río San Juan. [e] Familia I, Familia 1.1, género establecido XIII *Synechococcus*. [f] Familia XII del orden *Bacillales Incertae sedis* (de clasificación desconocida). [g] *Burkholderiales Incertae sedis*. * Familias que se informan por primera vez para ecosistemas dulceacuícolas del Caribe.

de la clase *Actinobacteria*. Aunque se debe destacar que en la mayoría de las clases bacterianas se detectaron secuencias que no pudieron ser identificadas.

3.7.3. Comparación de la composición de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período febrero-julio 2013

Al analizar la composición de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan en el período febrero-julio 2013, se pudo observar a partir del análisis de agrupamiento la formación de cuatro grupos con una similitud del 70% (Figura 19). El primer grupo está formado por las muestras de la estación Presa San Juan colectadas en abril y julio del 2013 y las muestras de la estación Presa El Palmar del mes de abril 2013, el segundo grupo está formado por las muestras de las estaciones Río Cristal y Baños del San Juan colectadas en el período febrero-julio 2013, el tercer grupo agrupa las muestras de la estación Paila de los meses de abril y junio 2013 y las muestras de la estación Puente de Hierro del mes de junio 2013, y el cuarto grupo incluye las muestras de la estación Puente de Hierro colectadas en los meses de febrero y abril 2013 y las muestras de la estación Paila del mes de febrero 2013. El resto de las muestras quedaron separadas.

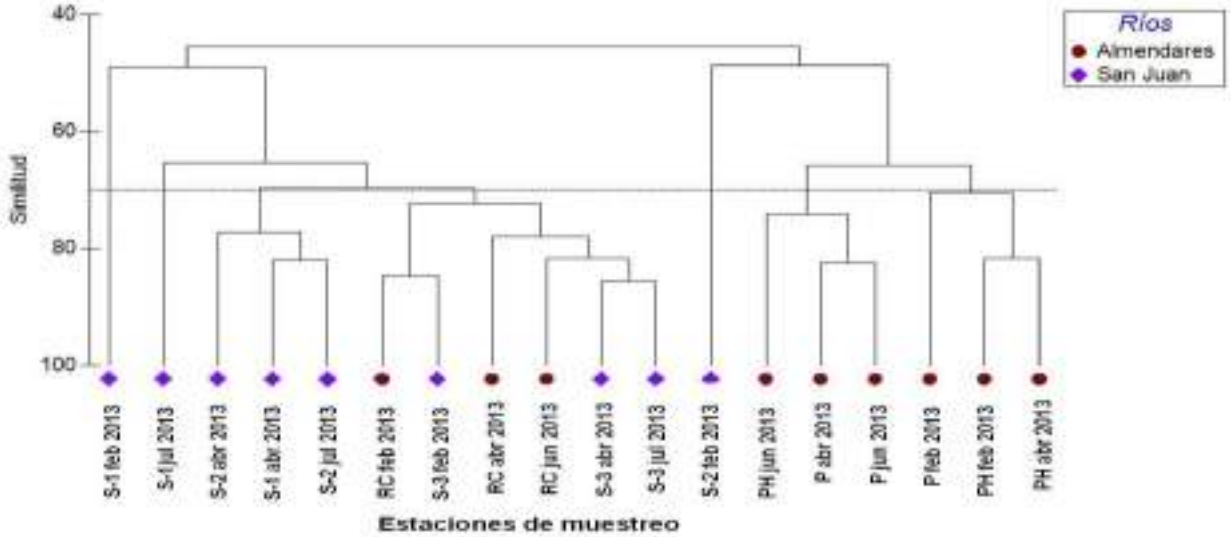


Figura 19. Análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA basado en la composición de las comunidades bacterianas de las muestras de los ríos Almendares y San Juan obtenidas mediante pirosecuenciación 454 en el período febrero 2013-julio 2013. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Bray-Curtis. Estaciones de muestreo río Almendares: **PH**: Puente de Hierro; **P**: Paila; **RC**: Río Cristal. Estaciones de muestreo río San Juan: **S-3**: Baños del San Juan; **S-2**: Presa San Juan; **S-1**: Presa el Palmar.

El análisis de varianza por permutación indicó la existencia de diferencias significativas entre los ríos Almendares y San Juan (p=0,001), lo cual se constata en el análisis de agrupamiento, donde la mayoría de los grupos están formados por las muestras de las estaciones de uno de los dos ríos analizados.

3.8. Análisis de la relación entre la composición de las comunidades bacterianas y los indicadores físico-químicos y de contaminación fecal

3.8.1. Río Almendares

El análisis de redundancia (RDA) se empleó para analizar la relación entre la composición de las comunidades bacterianas del río Almendares y los indicadores de calidad de agua. 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 ($p<0,01$); sin embargo de estos indicadores sólo se muestra el amonio en el diagrama (Figura 20) debido a que el mismo correlacionó significativamente con los indicadores antes mencionados como se muestra en la Tabla 4 y todos indican un mismo fenómeno: la contaminación fecal.

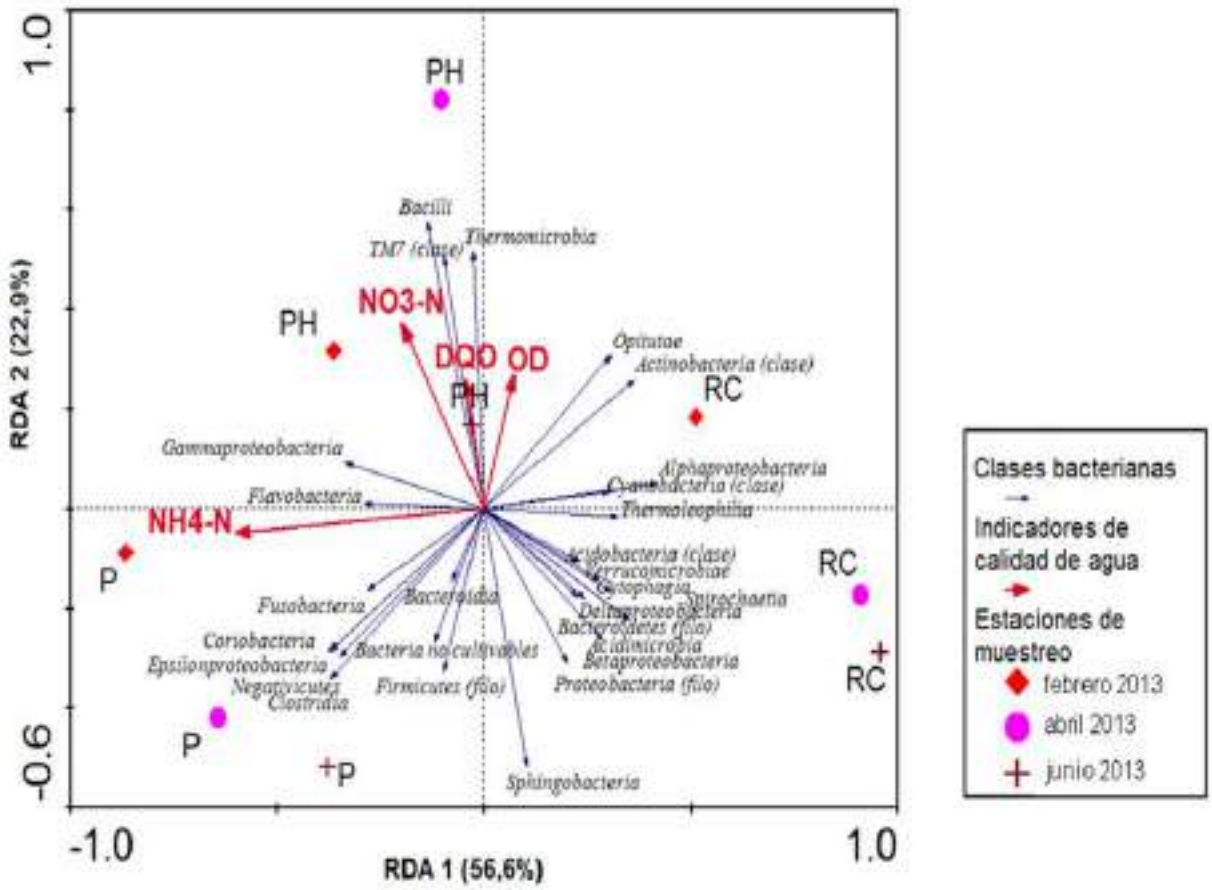


Figura 20. *Triplot* del análisis de redundancia (RDA) de la composición de la comunidad bacteriana de las estaciones de muestreo del río Almendares en el año 2013 utilizando indicadores físico-químicos. Las flechas rojas señalan la dirección en la que se incrementa el valor de cada indicador de calidad 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. NO_3-N: nitratos; NH_4-N: amonio; OD: Oxígeno disuelto; DQO: Demanda Química de Oxígeno; RC: Río Cristal; P: Paila; PH: Puente de Hierro.

La prueba de Monte Carlo para el primer y todos los ejes canónicos fue significativa ($p<0,01$), indicando que las variables seleccionadas (concentración de amonio, nitrato, oxígeno disuelto y demanda química de oxígeno) pueden explicar la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas en las estaciones del río Almendares. Esto no significa que el resto de los indicadores de calidad de agua no estén relacionados con la composición de las comunidades bacterianas, sino que con solo cuatro variables se puede explicar la variabilidad observada. Las altas concentraciones de amonio, nitrato y DQO y las bajas concentraciones de oxígeno disuelto explican el 36,7 %, 17,8 %, 10,9 % y 10,9 % respectivamente de la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas del río Almendares.

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 (Figura 20, Tabla 12). La concentración de amonio correlacionó negativamente con el primer eje canónico, en tanto la concentración de nitratos, DQO y oxígeno disuelto correlacionaron positivamente con el segundo eje canónico. Las correlaciones especies-ambiente de cada eje fueron de 0,991 y 0,981 para el primer y segundo eje respectivamente.

Tabla 12. Resumen estadístico del análisis de redundancia (RDA) para las clases bacterianas e indicadores de calidad de agua en el río Almendares.

	RDA 1	**RDA 2**	**RDA 3**	**RDA 4**	**Varianza Total**
Valores propios	0,384	0,156	0,090	0,049	1,000
Correlación especies-ambiente	0,991	0,981	0,978	0,840	
Varianza acumulada (%):					
Explicada solo por las especies	38,4	54,0	62,9	67,9	
Explicada por la relación especies-variables ambientales	56,6	79,5	92,7	100	
Suma de los valores propios					1,000
Suma de los valores propios canónicos					0,679
Correlación con los ejes					
Concentración de Nitratos (NO_3-N)	-0,3193	**0,9392**	-0,0883	-0,0904	
Concentración de Amonio (NH_4-N)	**-0,9679**	-0,1253	-0,2179	0,0074	
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	-0,0671	**0,6597**	-0,5444	0,5138	
Oxígeno disuelto (OD)	0,1199	**0,6862**	-0,3289	-0,6376	

Nota*:* En negrita las variables consideradas significativas en cada eje.

Las clases bacterianas se distribuyeron dentro de seis grupos con respecto a las características significativas de las estaciones de muestreo del río Almendares. El grupo 1 formado por las clases *Thermoleophilia, Cyanobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria* y *Opitutae*, las cuales están asociadas a la estación Río Cristal en el mes de febrero 2013 caracterizada por las bajas concentraciones de amonio. El segundo grupo formado por las clases *Bacilli, TM7* y

Thermomicrobia asociadas a la estación Puente de Hierro en los meses de febrero 2013, abril 2013 y en menor medida en junio 2013, caracterizada por altas concentraciones de nitrato y DQO y mayor concentración de oxígeno disuelto comparado con las estaciones de muestreo Paila y Río Cristal, aunque por debajo de 4 $mg.L^{-1}$ en los meses de abril y junio 2013.

El tercer grupo incluye las clases *Gammaproteobacteria* y *Flavobacteria* asociadas a las estaciones Paila y Puente de Hierro en el mes de febrero 2013, ambas caracterizadas por las altas concentraciones de amonio. El cuarto grupo está formado por las clases *Fusobacteria, Coriobacteria, Epsilonproteobacteria, Negativicutes, Clostridia, Bacteroidia*, bacterias no cultivables pertenecientes al filo *Firmicutes* y bacterias no cultivables dentro del dominio *Bacteria* asociadas a la estación Paila durante los tres meses analizados en el año 2013, caracterizada por las altas concentraciones de amonio y bajas concentraciones de oxígeno disuelto. El grupo 5 incluye a la clase *Sphingobacteria* asociada a la estación de muestreo Río Cristal en el mes de junio 2013, caracterizada por bajas concentraciones de nitratos y el grupo 6 agrupa a las clases *Acidobacteria, Verrucomicrobiae, Cytophagia, Spirochaetia, Deltaproteobacteria, Betaproteobacteria, Acidimicrobia* y bacterias no cultivables pertenecientes a los filos *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* asociadas a la estación Río Cristal en los meses de abril y junio 2013, caracterizada por bajas concentraciones de amonio, nitratos, DQO y oxigeno disuelto.

3.8.2. Río San Juan

Para analizar la relación entre la composición de las comunidades bacterianas del río San Juan y los indicadores de calidad de agua se empleó el análisis de redundancia (Figura 21).

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 en el río San Juan ($p<0,05$). La prueba de Monte Carlo para el primer ($p<0,05$) y todos los ejes canónicos ($p<0,01$) fue significativa, indicando que las variables seleccionadas (concentración de oxígeno disuelto, fosfatos, sólidos totales disueltos, demanda química de oxígeno y pH) pueden explicar la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas en las estaciones del río San Juan. Las altas concentraciones de oxígeno disuelto, pH, altas concentraciones de fosfatos, sólidos totales disueltos y DQO explican el 20,9 %, 18,7 %, 18,6 %, 8,2 % y 8,1 % respectivamente de la variabilidad de la composición de las comunidades bacterianas del río San Juan.

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 (Figura 21, Tabla 13). La concentración de oxígeno disuelto correlacionó negativamente con el primer eje canónico y la concentración de fosfatos y el pH correlacionaron positivamente con el primer eje canónico, en tanto los sólidos totales disueltos y

la DQO correlacionaron negativamente con el segundo eje canónico. Las correlaciones especies-ambiente de cada eje fueron de 0,986 y 0,989 para el primer y segundo eje respectivamente.

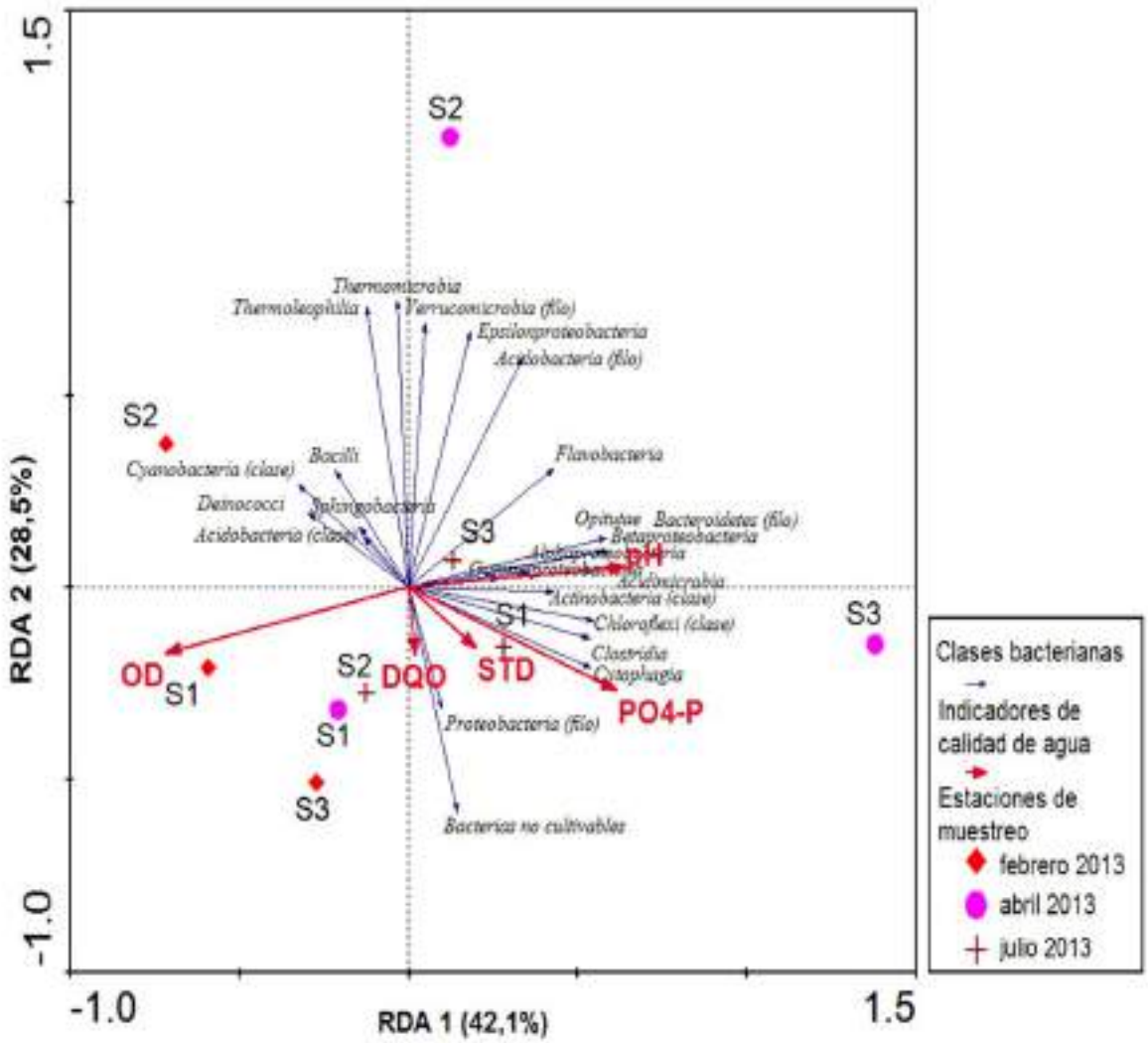


Figura 21. *Triplot* del análisis de redundancia (RDA) de la composición de la comunidad bacteriana de las estaciones de muestreo del río San Juan en el año 2013 utilizando indicadores físico-químicos. Las flechas rojas señalan la dirección en la que se incrementa el valor de cada indicador de calidad 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; PO_4-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.

Las clases bacterianas se distribuyeron dentro de cinco grupos con respecto a las características significativas de las estaciones de muestreo del río San Juan. El primer grupo está formado por las clases *Flavobacteria, Opitutae, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Acidimicrobia* y por bacterias no cultivables pertenecientes al filo *Bacteroidetes* asociadas a la estación Baños del San Juan en el mes de abril 2013

caracterizada por un pH ligeramente alcalino y altas concentraciones de fosfato y en menor medida a esta misma estación en el mes de julio 2013, caracterizada por un pH ligeramente alcalino, bajas concentraciones de fosfatos y altas concentraciones de sólidos totales disueltos.

Tabla 13. Resumen estadístico del análisis de redundancia (RDA) para las clases bacterianas e indicadores de calidad de agua en el río San Juan.

	RDA 1	RDA 2	RDA 3	RDA 4	Varianza Total
Valores propios	0,335	0,227	0,140	0,067	1,000
Correlación especies-ambiente	0,986	0,989	0,954	0,933	
Varianza acumulada (%):					
Explicada solo por las especies	33,5	56,1	70,1	76,8	
Explicada por la relación especies-variables ambientales	42,1	70,6	88,2	96,6	
Suma de los valores propios					1,000
Suma de los valores propios canónicos					0,795
Correlación con los ejes					
pH	**0,6590**	0,0667	0,3462	0,5489	
Oxígeno Disuelto (OD)	**-0,7415**	-0,2142	0,1802	0,0809	
Sólidos Totales Disueltos (STD)	0,2063	-0,1983	-0,3710	**0,6861**	
Concentración de fosfatos (PO_4-P)	**0,6350**	-0,3360	0,0261	-0,5540	
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	0,0208	-0,2213	0,2889	**-0,9311**	

Nota*:* En negrita las variables consideradas significativas en cada eje.

El segundo grupo está formado por las clases *Epsilonproteobacteria, Thermomicrobia, Thermoleophilia* y por bacterias no cultivables pertenecientes a los filos *Acidobacteria* y *Verrucomicrobia* asociadas a la estación Presa San Juan en el mes de abril 2013, caracterizada por bajas concentraciones de DQO. El tercer grupo incluye a las clases *Deinococci, Bacilli, Sphingobacteria, Acidobacteria* y *Cyanobacteria* asociadas a la estación Presa San Juan en el mes de febrero 2013 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*, esta también se asocia a la estación Presa El Palmar en el mes de febrero 2013 caracterizada por bajas concentraciones de fosfatos, altas concentraciones de oxígeno disuelto y pH ligeramente ácido. El cuarto grupo está formado por bacterias no cultivables pertenecientes al dominio *Bacteria* y por bacterias no cultivables pertenecientes al filo *Proteobacteria* asociadas a las estaciones Presa El Palmar en el mes de abril 2013, Presa San Juan en el mes de julio 2013 y Baños del San Juan en el mes de febrero 2013, caracterizadas por altas concentraciones de DQO. El quinto grupo incluye las clases *Actinobacteria, Chloroflexi, Clostridia* y *Cytophagia* asociadas a la estación Baños del San Juan en el mes de abril 2013, caracterizada por un pH ligeramente alcalino y altas concentraciones de fosfatos. En el caso particular de la clase *Cytophagia*, esta también se asocia a la estación Presa El Palmar en el mes de julio 2013, caracterizada por altas concentraciones de sólidos totales disueltos.

3.9. Caracterización micromorfológica-tintorial de aislados bacterianos del río Almendares

Los aislados bacterianos del río Almendares se clasificaron en cuatro grupos atendiendo a sus características micromorfológicas-tintoriales como se muestra en la Tabla 14. Los bacilos Gram positivos formadores de esporas predominaron tanto en las muestras de agua como en las de rizosedimento. De estos, se seleccionaron 64 aislados (42 del rizosedimento y 22 de muestras de agua) para la evaluación de la producción de enzimas extracelulares, de manera que hubiera una representación de todas las estaciones de muestreo y de las plantas colectadas.

3.10. Determinación de enzimas extracelulares a partir de aislados bacterianos del río Almendares

3.10.1. Producción de proteasas y amilasas

Las Tablas 15 y 16 muestran los diámetros de producción de las enzimas proteasas y amilasas obtenidas a partir de los aislados de muestras de agua y de rizosedimento respectivamente. Los aislados del agua tuvieron diámetros de producción de proteasas entre 3 y 30 mm, mientras que los del rizosedimento mostraron diámetros de producción en el rango de 6-27 mm. En el análisis de la producción de amilasas, se observó que los aislados del agua mostraron diámetros entre 3 y 14 mm, mientras que los del rizosedimento produjeron diámetros entre 1 y 15 mm.

Para la selección de los aislados con mayores diámetros de producción de enzimas proteasas y amilasas, se construyó un dendrograma (Figura 22). A partir de este análisis se obtuvieron tres grupos a un nivel de truncado del 50% (p=0,0000). El grupo A formado por el control positivo (modelo ideal con los máximos diámetros de producción de enzimas), los aislados del agua Pa57, PH51, Pa52, Pa51, PH2, RC9, RC34 y los aislados del rizosedimento PailaP1b, 3PailaP11a, PHP14, 4RCP156, RCP18c, 4PHP510a, PHP4c, PaP32 y RCP12a. Estos aislados presentaron las mayores producciones de proteasas y amilasas. El grupo B incluyó los aislados de agua 3RC33, PH22, PH21, PH22a, Pa2, 3RC35, 3RC31, 3Pa61a y los aislados de rizosedimento 3RCP154, PailaP1c, 3RCP37b, PaP11, 3PHP76, 4RCP1512, PaP33c, PaP71a, PaP15, PaP71b, 3RCP141, PHP15, PHP33, PaP31, 4RCP133c, PailaP1g, PaP12, RCP12, PaP74b, PaP72, PHP13, RCP1e, RCP11, PH52, 4PaP18, 3PailaP27, 3PHP77, 4RCP133b, 4PaP110(1), PHP35, RCP1a y RCP12f(2); caracterizados por altas producciones de amilasa y producciones intermedias de proteasas. El grupo C agrupó al control negativo (modelo ideal con los mínimos diámetros de producción de enzimas), los aislados de agua RC521, RC221, RC811, Pa8, Pa3, RC522 y los aislados del rizosedimento 4PaP11 y RCP12c; caracterizados por las producciones más bajas de ambas enzimas. Considerando las características de los grupos se seleccionaron 36 aislados, los 16 del grupo A y 20 aislados del grupo B para evaluar la producción de otras enzimas extracelulares de importancia ecológica.

Tabla 14. Distribución de los aislados bacterianos obtenidos de muestras de agua y rizosedimento del río Almendares.

Grupos bacterianos	**Total (245)**
	Aislados de muestras de agua (60)
Cocos Gram positivos	10
Bacilos Gram positivos, formadores de esporas	32
Bacilos Gram positivos, no formadores de esporas	8
Bacilos Gram negativos	10
	Aislados del rizosedimento (185)
Cocos Gram positivos	18
Bacilos Gram positivos, formadores de esporas	101
Bacilos Gram positivos, no formadores de esporas	16
Bacilos Gram negativos	50

Tabla 15. Diámetros de producción de proteasas y amilasas en medio de cultivo sólido de los aislados obtenidos a partir de las muestras de agua en las diferentes estaciones de muestreo del río Almendares.

Estaciones de muestreo	Aislados	Diámetros de producción de proteasas(mm)	Diámetros de producción de amilasas (mm)
Río Cristal	3RC33	21 ± 2	8 ± 2
	RC9	20 ± 5	0
	RC34	19 ± 1	0
	3RC35	9 ± 2	5 ± 1
	3RC31	9 ± 2	5 ± 1
	RC521	6 ± 4	0
	RC221	4 ± 1	0
	RC522	0	0
	RC811	3 ± 1	3 ± 1
Paila	Pa57	30 ± 3	14 ± 3
	Pa52	25 ± 6	7 ± 3
	Pa51	25 ± 6	6 ± 4
	Pa2	9 ± 3	7 ± 2
	3Pa61a	9 ± 1	4 ± 2
	Pa8	0	6 ± 1
	Pa3	0	0
Puente de Hierro	PH51	27 ± 4	8 ± 2
	PH2	25 ± 3	0
	PH22	19 ± 2	6 ± 0
	PH21	18 ± 1	7 ± 3
	PH22a	18 ± 3	4 ± 1
	PH52	15 ± 7	7 ± 2

Tabla 16. Diámetros de producción de proteasas y amilasas en medio de cultivo sólido de los aislados obtenidos a partir del rizosedimento de plantas en las diferentes estaciones de muestreo del río Almendares.

Estaciones de muestreo	Plantas	Aislados	Diámetros de producción proteasas (mm)	Diámetros de producción amilasas (mm)
Río Cristal	*Pistia stratiotes*	4RCP156	27 ± 5	4 ± 2
	Eichhornia crassipes	RCP18c	26 ± 4	3 ± 1
	Cabomba sp.	3RCP154	22 ± 3	6 ± 2
	Hydrocotyle sp.	3RCP37b	21 ± 4	6 ± 4
	Hydrocotyle sp.	RCP12a	18 ± 1	0
	Pistia stratiotes	4RCP1512	17 ± 2	4 ± 2
	Pistia stratiotes	3RCP141	17 ± 10	9 ± 4
	Cabomba sp.	RCP12	14 ± 3	2 ± 1
	Bidens pilosa L.	4RCP133b	13 ± 4	5 ± 2
	Bidens pilosa L.	4RCP133c	10 ± 2	11 ± 5
	Pistia stratiotes	RCP1e	10 ± 2	0
	Cabomba sp.	RCP11	10 ± 1	0
	Pistia stratiotes	RCP1a	9 ± 2	8 ± 2
	Hydrocotyle sp.	RCP12f(2)	9 ± 1	5 ± 2
	Hydrocotyle sp.	RCP12c	0	3 ± 1
Paila	*Bidens pilosa* L.	PailaP1b	25 ± 6	7 ± 3
	Commelina sp.	3PailaP11a	25 ± 3	8 ± 2
	Hydrocotyle sp.	PaP32	22 ± 3	0
	Bidens pilosa L.	PailaP1c	21 ± 3	6 ± 0
	Bidens pilosa L.	PailaP1g	16 ± 1	0

Continuación Tabla 16

Estaciones de muestreo	Plantas	Aislados	Diámetros de producción proteasas (mm)	Diámetros de producción amilasas (mm)
Paila	*Bidens pilosa* L.	PaP71a	21 ± 3	11 ± 3
	Commelina sp.	PaP11	18 ± 2	7 ± 3
	Commelina sp.	PaP15	18 ± 5	10 ± 5
	Hydrocotyle sp.	PaP33c	18 ± 4	2 ± 1
	Bidens pilosa L.	PaP71b	17 ± 2	12 ± 2
	Commelina sp.	4PaP18	15 ± 1	7 ± 1
	Commelina sp.	PaP12	15 ± 2	0
	Bidens pilosa L.	3PailaP27	14 ± 6	4 ± 1
	Bidens pilosa L.	PaP74b	13 ± 1	1 ± 1
	Hydrocotyle sp.	PaP31	13 ± 9	12 ± 1
	Commelina sp.	4PaP110(1)	11 ± 6	8 ± 2
	Bidens pilosa L.	PaP72	12 ± 3	2 ± 2
	Commelina sp.	4PaP11	6 ± 1	2 ± 1
Puente de Hierro	*Bidens pilosa* L.	4PHP510a	26 ± 5	0
	Eichhornia crassipes	PHP14	25 ± 5	5 ± 4
	Bidens pilosa L.	PHP4c	25 ± 6	0
	Eichhornia crassipes	3PHP76	17 ± 8	6 ± 3
	Eichhornia crassipes	PHP15	15 ± 4	15 ± 3
	Eichhornia crassipes	3PHP77	14 ± 6	4 ± 3
	Bidens pilosa L.	PHP33	13 ± 5	10 ± 2
	Eichhornia crassipes	PHP13	12 ± 2	0
	Bidens pilosa L.	PHP35	11 ± 1	8 ± 2

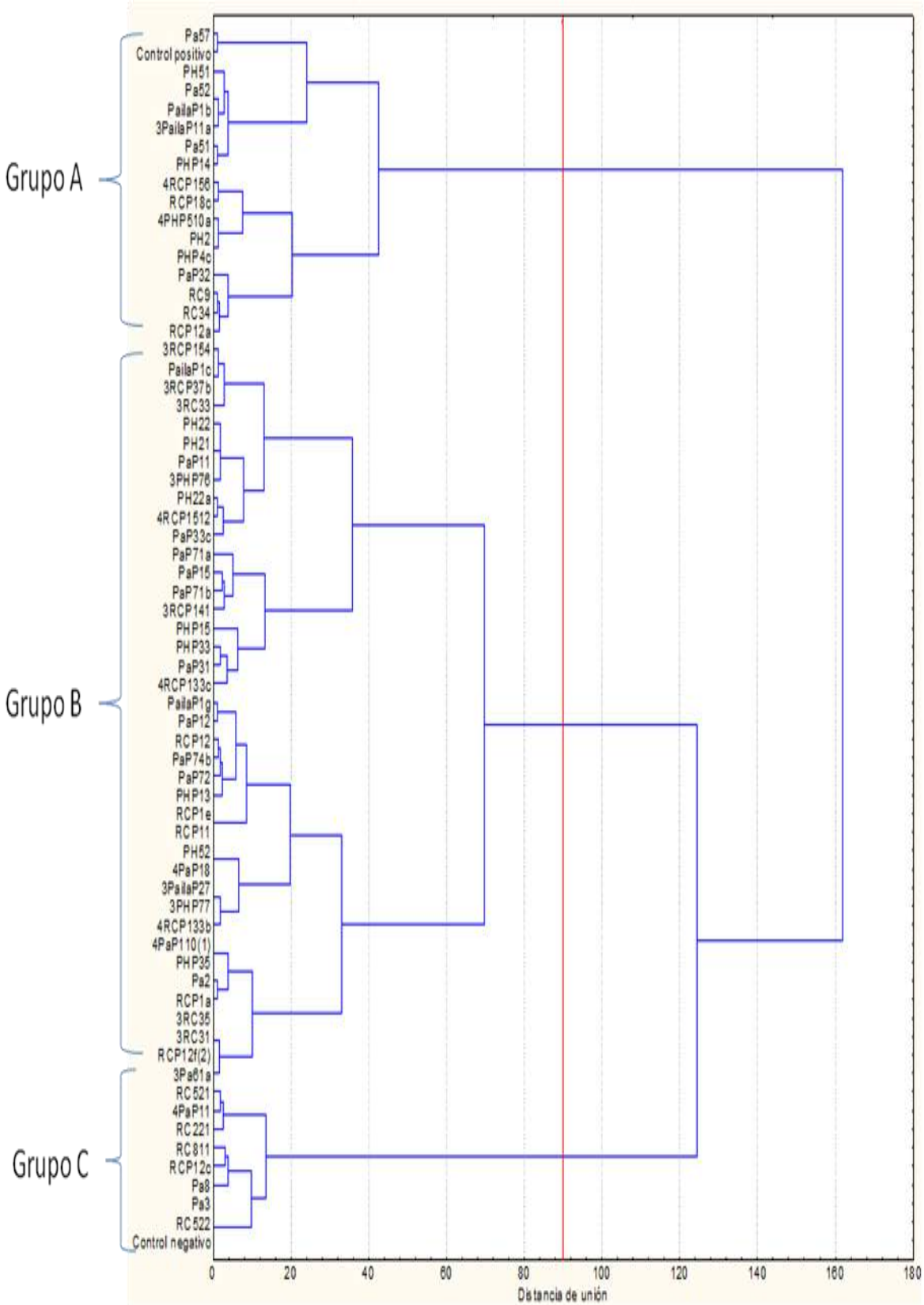


Figura 22. Análisis de agrupamiento mediante el método de varianza mínima de Ward basado en la producción de proteasas y amilasas por los aislados de muestras de agua y rizosedimento del río Almendares. Los grupos se formaron con un 50% de similitud, lo cual se indica a través de la línea roja. A esta distancia se formaron tres grupos con un nivel de confianza del 100%.

3.10.2. Determinación de otras enzimas extracelulares mediante el sistema API ZYM

Para la determinación de enzimas extracelulares mediante del sistema API ZYM, se evaluaron los aislados previamente seleccionados (24 aislados del rizosedimento y 12 aislados de muestras de agua). Las enzimas fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasa lipasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, fosfatasa ácida, α-glucosidasa, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, α-quimotripsina y β-glucosidasa se detectaron con mayor frecuencia entre los aislados de agua (Tabla 17).

Tabla 17. Perfiles de actividad enzimática de los aislados de las muestras de agua del río Almendares.

	Enzimas																		
Aislados del agua	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**
RC34	1	5	4	-	1	1	-	1	3	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PH22	3	3	2	-	5	3	-	-	1	2	3	-	-	-	1	-	-	-	-
RC9	1	3	1	-	5	3	-	-	-	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PH52	3	3	3	-	4	2	-	-	-	4	2	-	-	-	1	-	-	-	-
Pa52	3	3	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2	2	-	-	-
Pa51	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	1	-	-	-
3RC33	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Pa57	3	3	2	-	-	-	-	-	-	1	1	1	5	-	3	4	-	-	-
PH51	4	3	3	-	1	-	-	-	-	2	1	1	1	-	4	2	-	-	-
PH2	3	1	2	1	5	3	1	1	1	4	2	-	-	-	1	-	-	-	-
PH21	2	1	2	-	3	1	-	-	1	5	2	-	-	-	1	-	-	-	-
PH22a	-	-	1	-	1	1	-	-	1	1	1	-	-	-	1	-	-	-	-

Leyenda: Fosfatasa alcalina (A), Esterasa (C 4) (B), Esterasa Lipasa (C 8) (C), Lipasa (C 14) (D), Leucina aminopeptidasa (E), Valina aminopeptidasa (F), Cistina aminopeptidasa (G), Tripsina (H), α-quimotripsina (I), Fosfatasa ácida (J), Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (K), α-galactosidasa (L), β-galactosidasa (M), β-glucuronidasa (N), α-glucosidasa (O), β-glucosidasa (P), N-acetil-β-glucosaminidasa (Q), α-manosidasa (R), α-fucosidasa (S), Reacción negativa (-), 1 = 5 nM, 2 =10 nM, 3 = 20 nM, 4 = 30 nM, 5 = 40 nM (nanomoles de sustrato hidrolizado por inóculo bacteriano de turbidez estándar).

Ninguna de las bacterias aisladas del agua mostró evidencia de actividad β-glucuronidasa, N-acetil-β-glucosaminidasa, α-manosidasa o α-fucosidasa. El aislado PH2 fue el mejor productor de enzimas extracelulares, mostrando 12 actividades enzimáticas diferentes con valores entre 20-40 nM con respecto a cuatro enzimas.

En el caso de los aislados de rizosedimento, las enzimas esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, valina aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa, β-glucosidasa y α-glucosidasa se detectaron con mayor frecuencia (Tabla 18), y ninguno de los aislados del rizosedimento mostró evidencia de actividad β-glucuronidasa, α-manosidasa o α-fucosidasa. El aislado 4PaP18 fue el mejor productor de enzimas extracelulares, mostrando 10 actividades enzimáticas diferentes con valores entre 30-40 nM con respecto a cinco enzimas.

Tabla 18. Perfiles de actividad enzimática de los aislados del rizosedimento del río Almendares.

	Enzimas																		
Aislados rizosedimento	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**
4RCP156	1	2	1	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
4PaP18	4	5	4	-	5	3	1	1	3	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Paila P1c	1	2	1	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PHP4c	1	3	2	1	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
RCP12a	1	5	3	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	-	-	-
3RCP141	4	4	4	-	3	1	-	-	1	5	1	-	-	-	1	-	-	-	-
PHP14	-	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4PHP510a	1	3	2	-	5	4	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
4RCP1512	-	3	3	-	-	-	-	-	-	2	1	2	2	-	-	-	-	-	-
PaP71b	-	3	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
RCP18c	1	3	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3PHP76	1	3	2	-	3	1	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PaP15	1	3	1	-	-	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-
PaP71a	2	2	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
3RCP154	2	2	2	-	2	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
3RCP37b	3	1	2	-	3	1	-	-	2	4	3	-	-	-	1	-	2	-	-
PaP11	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	-	-
PaP31	3	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2	-	-	-
PHP15	3	1	2	-	1	-	-	-	-	2	1	1	1	-	1	2	-	-	-
PaP32	3	1	2	-	2	1	-	-	-	1	3	1	-	-	2	2	-	-	-
3PailaP11a	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
PaP12	1	2	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	1	2	-	-	-
Paila P1g	1	2	3	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	4	-	-	-
Paila P1b	1	1	1	-	1	1	-	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-

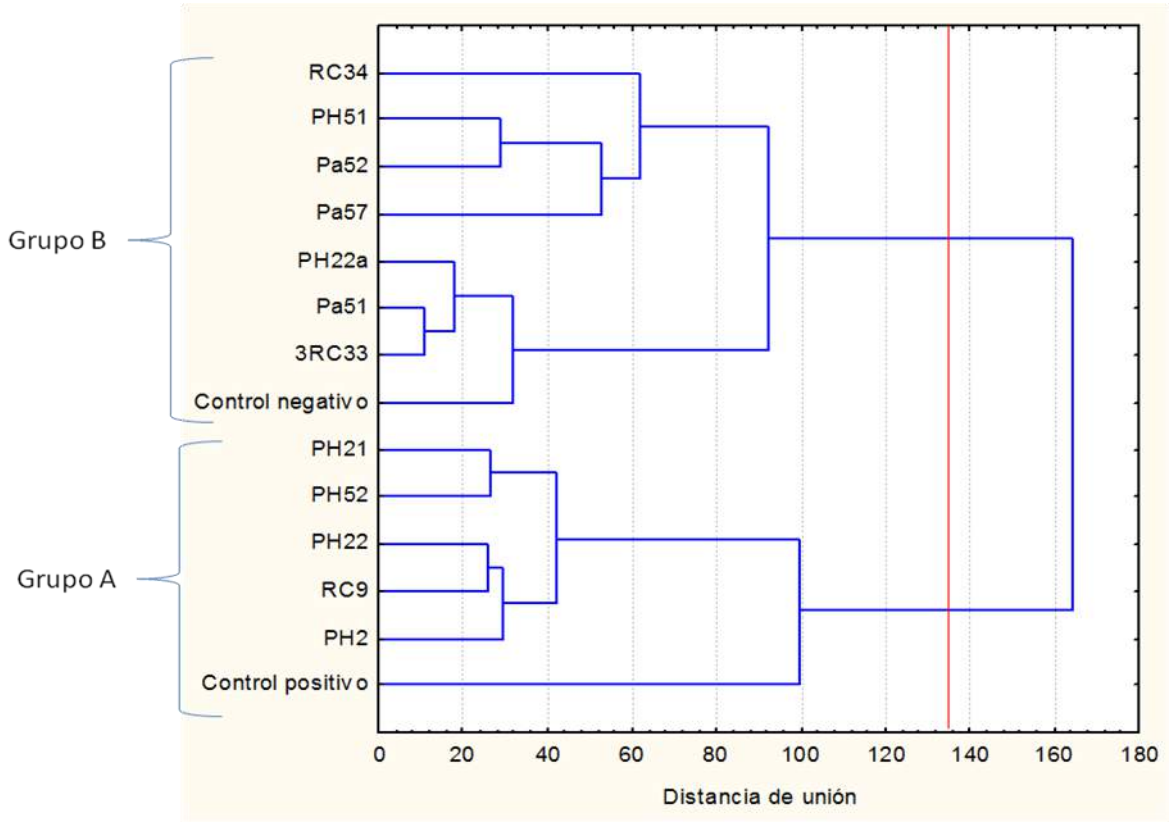
Leyenda: Fosfatasa alcalina (A), Esterasa (C 4) (B), Esterasa Lipasa (C 8) (C), Lipasa (C 14) (D), Leucina aminopeptidasa (E), Valina aminopeptidasa (F), Cistina aminopeptidasa (G), Tripsina (H), α-quimotripsina (I), Fosfatasa ácida (J), Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa (K), α-galactosidasa (L), β-galactosidasa (M), β-glucuronidasa (N), α-glucosidasa (O), β-glucosidasa (P), N-acetil-β-glucosaminidasa (Q), α-manosidasa (R), α-fucosidasa (S), Reacción negativa (-), 1 = 5 nM, 2 =10 nM, 3 = 20 nM, 4 = 30 nM, 5 = 40 nM (nanomoles de sustrato hidrolizado por inóculo bacteriano de turbidez estándar).

3.10.3. Selección de los mejores aislados productores de enzimas extracelulares

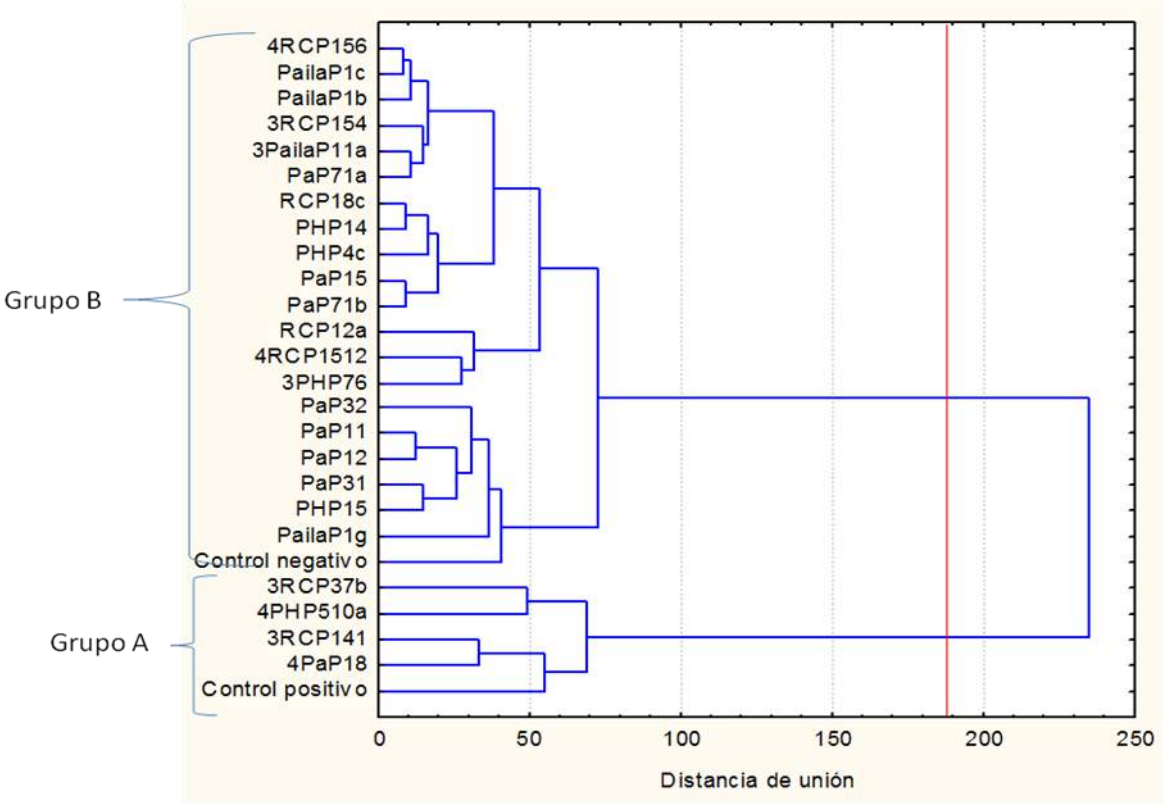
Para la selección de los mejores aislados productores de enzimas extracelulares, se realizó un análisis de agrupamiento basado en las enzimas producidas por la mayoría de los aislados. En el caso de los aislados de agua se consideraron las enzimas proteasas, amilasas, fosfatasa alcalina, esterasa, esterasa lipasa, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, α-quimotripsina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α-glucosidasa y β-glucosidasa. En la selección de los aislados procedentes del rizosedimento se tuvieron en cuenta las mismas enzimas que para los aislados de agua con excepción de la α-quimotripsina.

En la Figura 23A se observa el análisis de agrupamiento para la selección de los mejores aislados productores de enzimas extracelulares procedentes de muestras de agua. La selección se realizó a partir de un nivel de truncado de 75%, donde se forman dos grupos (p=0,0000). El grupo A se formó con el control positivo y los aislados PH2, RC9, PH52, PH22 y PH21. Este grupo se caracterizó por tener altas producciones de proteasas, fosfatasa alcalina, esterasas, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. En el grupo B quedaron incluidos los aislados RC34, PH51, Pa52, Pa57, PH22a, Pa51 y 3RC33, agrupadas con el control negativo. Estos aislados se caracterizaron por tener altas producciones de proteasas, esterasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa y bajas producciones del resto de las enzimas. Dadas las características de cada grupo se seleccionaron los aislados incluidos en el grupo A y el aislado Pa57 del grupo B, por ser el aislado con mayores producciones de proteasa, amilasa y β-glucosidasa entre todos los caracterizados y presentar características micromorfológicas y culturales diferentes a los aislados del grupo A. De esta forma entre los aislados de las muestras de agua quedan representadas las tres estaciones de muestreo del río Almendares.

En la Figura 23B se observa el análisis de conglomerado para la selección de los mejores aislados productores de enzimas extracelulares procedentes del rizosedimento de plantas del río Almendares. A partir de un nivel de truncado del 75% se forman dos grupos (p=0,0000). El grupo A formado por los aislados 3RCP37b, 4PHP510a, 3RCP141 y 4PaP18 agrupados con el control positivo, se caracterizó por tener las mayores producciones de proteasas, fosfatasa alcalina, esterasas, leucina aminopeptidasa, valina aminopeptidasa, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α-glucosidasa y β-glucosidasa. En el grupo B quedaron agrupados con el control negativo los aislados 4RCP156, PailaP1c, PailaP1b, 3RCP154, 3PailaP11a, PaP71a, RCP18c, PHP14, PHP4c, PaP15, PaP71b, RCP12a, 4RCP1512, 3PHP76, PaP32, PaP11, PaP12, PaP31, PHP15 y PailaP1g. Este grupo mostró altas producciones de proteasas y β-glucosidasa y bajas producciones del resto de las enzimas analizadas, por lo que se escogió el grupo A para continuar el análisis y los aislados PailaP1c, PailaP1b, PHP4c, 3PHP76 y PaP32 del grupo B por ser aislados con altas producciones de proteasas y β-glucosidasa y presentar



A



B

Figura 23. Dendrograma de los aislados productores de enzimas extracelulares obtenidos de muestras de agua (A) y rizosedimento (B) del río Almendares. Los grupos se formaron con un 75% de similitud, lo cual se indica a través de la línea roja. A esta distancia se formaron dos grupos con un nivel de confianza del 100%.

características micro-morfológicas y culturales diferentes a los aislados del grupo A. De esta forma entre los aislados de las muestras de rizosedimento quedan representadas las tres estaciones de muestreo del río Almendares, así como las diferentes plantas colectadas en este ecosistema.

3.11. Identificación de las cepas bacterianas

Las 15 cepas seleccionadas se identificaron a través de la secuenciación del gen ADNr 16S (Tabla 19). El análisis de la comparación de las secuencias del gen ADNr 16S de cada cepa con las de referencia en NCBI, reveló que 10 mostraron similitud con el grupo *Bacillus cereus sensu lato*, dos con *Bacillus megaterium*, uno con *Bacillus pumilus* y dos 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 ADNr 16S, pero no permitió la diferenciación de las cepas dentro del grupo. Sin embargo, la presencia de cristales proteicos (Figura 24) permitió identificar las cepas como *Bacillus thuringiensis*.

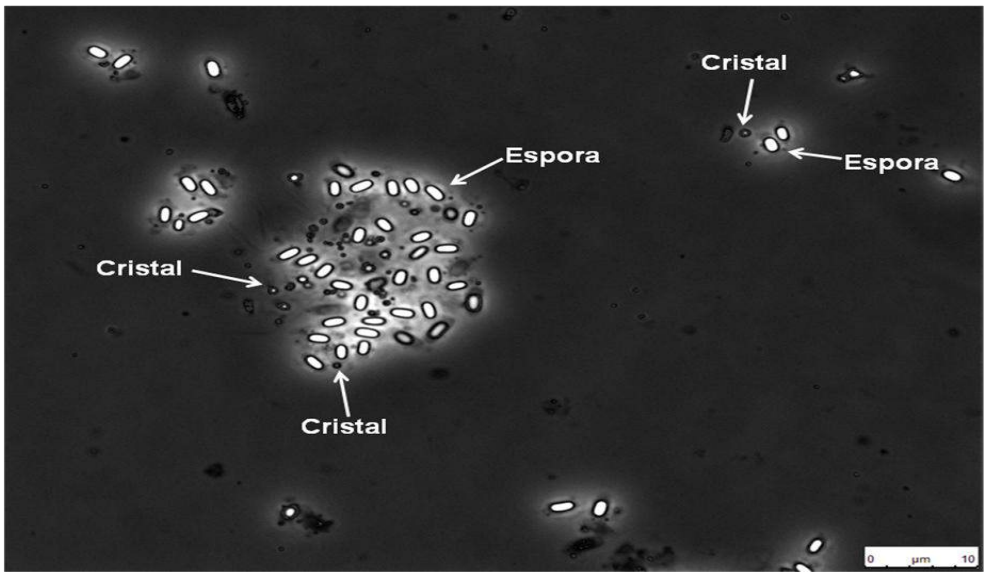


Figura 24. Visualización de cristales y esporas de la cepa 4PHP510a bajo microscopio de contraste de fase (Leica, DMF6000B, Germany) a 1000X.

Tabla 19. Identificación de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la columna de agua y rizosedimento de plantas del río Almendares.

Cepas	Localización	Origen	Identificación por ADNr 16S (% de similitud)	Identificación por *gyrB*, (% de similitud)	Presencia de cristales	Identificación final
3RCP141 *KF910757	Río Cristal	Rizosedimento de *Pistia stratiotes*	*B. cereus sensu lato* [a] (100%)	*B. cereus sensu lato* [a] (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B225
3RCP37b *KF910756	Río Cristal	Rizosedimento de *Hydrocotyle* sp.	*B. cereus sensu lato* (99%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B226
3PHP76 *KF910755	Puente de Hierro	Rizosedimento de *Eichhornia crassipes*	*B. cereus sensu lato* (100%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B227
PH52 *KF910763	Puente de Hierro	Agua	*B. cereus sensu lato* (99%)	*B. cereus sensu lato* (99%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B228
PH2 *KF910760	Puente de Hierro	Agua	*B. cereus sensu lato* (100%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B229
RC9 *KF910764	Río Cristal	Agua	*B. cereus sensu lato* (100%)	*B. cereus sensu lato* (99%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B230
4PaP18 *KF910758	Paila	Rizosedimento de *Commelina* sp.	*B. cereus sensu lato* (99%)	*B. cereus sensu lato* (99%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B231
4PHP510a *KF910759	Puente de Hierro	Rizosedimento de *Bidens pilosa* L.	*B. cereus sensu lato* (100%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B232
PH21 *KF910761	Puente de Hierro	Agua	*B. cereus sensu lato* (100%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B233
PH22 *KF910756	Puente de Hierro	Agua	*B. cereus sensu lato* (99%)	*B. cereus sensu lato* (100%)	+	*B. thuringiensis* CCMFB-B234
PailaP1b *KF910744	Paila	Rizosedimento de *Bi. pilosa* L.	*B. megaterium* (100%)	ND	-	*B. megaterium* CCMFB-B235
PailaP1c *KF910745	Paila	Rizosedimento de *Bi. pilosa* L.	*B. megaterium* (100%)	ND	-	*B. megaterium* CCMFB-B236
PHP4c *KF910748	Puente de Hierro	Rizosedimento de *Bi. pilosa* L.	*B. pumilus* (98%)	ND	-	*B. pumilus* CCMFB-B237
PaP32 *KF910733	Paila	Rizosedimento de *Hydrocotyle* sp.	*B. subtilis* (99%)	ND	-	*B. subtilis* CCMFB-B238
Pa57 *KF910754	Paila	Agua	*B. subtilis* (98%)	ND	-	*B. subtilis* CCMFB-B239

[a] Cepas identificadas como *B. cereus sensu lato* mostraron una alta similitud con secuencias de *B. thuringiensis*, *B. cereus* y *B. anthracis*.
ND: no determinado
* Número de acceso de la secuencia en GenBank, [b]Clave de subcolección Facultad de Biología

Discusión

4. DISCUSIÓN

4.1. Dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *E. coli* en el río Almendares y las aguas del Complejo Turístico "Las Terrazas"

El empleo de bacterias indicadoras de contaminación fecal, entre las que se incluyen los coliformes termotolerantes y *E. coli*, es de gran utilidad para evaluar la calidad de las aguas (Bouvy *et al.*, 2010). En el presente estudio se evaluó la dinámica del comportamiento de los coliformes termotolerantes y *E. coli* en el río Almendares y en ecosistemas dulceacuícolas del Complejo Turístico "Las Terrazas", ubicados en una zona urbana y una zona rural respectivamente.

La Cuenca Almendares-Vento es una de las diez principales cuencas hidrográficas del país y el 47% del abastecimiento de agua potable de la capital depende de su fuente subterránea Vento (Pérez y Valdés, 2011). Por tal motivo, la contaminación microbiana del Almendares, río principal de esta cuenca, es un problema ambiental serio al que se enfrenta la ciudad de La Habana. En el río Almendares se pudo observar que las concentraciones de los coliformes termotolerantes y *E. coli* fueron elevadas en los meses analizados (Figura 1), encontrándose por encima de los valores aceptados según criterios nacionales (Norma Cubana 22, 1999) e internacionales (W.H.O, 2003; AFNOR, 2009). Particularmente la Norma Cubana 22, expresa las concentraciones de los indicadores de contaminación fecal como número más probable por 100 mL (NMP.100 mL^{-1}), sin embargo en la presente investigación se expresó como unidades formadoras de colonias por 100 mL (UFC.100 mL^{-1}). Torres (2004), realizó una comparación entre la técnica de fermentación en tubos múltiples y la técnica de filtración por membrana, y concluyó que la estimación de la concentración de los indicadores de contaminación fecal a través de la técnica de fermentación en tubos múltiples era mayor en una unidad logarítmica en comparación con la técnica de filtración por membrana. Por lo que, se puede afirmar que las concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli* encontradas en el río Almendares sobrepasaron los valores máximos permisibles establecidos por las normas cubanas.

El aumento de la contaminación fecal en las estaciones corriente abajo del río Almendares, está relacionado con la incorporación de fuentes de contaminación en las áreas aledañas a las estaciones de muestreo como consecuencia del desarrollo urbano y agrícola que ha experimentado la ciudad en la última década. Alrededor de 249 fuentes contaminantes bien caracterizadas e identificadas, provenientes del sector industrial y urbano, sin tratamiento o ineficientemente tratadas se han identificado en el río Almendares (Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos, 2010). Al respecto, Ouattara *et al.* (2014) plantean que las aguas residuales de origen doméstico e industrial constituyen un impacto negativo a la calidad de los ríos urbanos. Particularmente al arroyo Paila, que constituyó una de las la estaciones con mayor contaminación fecal, se vierten los residuales del Laboratorio Farmacéutico "Reinaldo Gutiérrez" que consisten en diferentes compuestos químicos provenientes de sus producciones y además

aguas albañales. Romeu *et al.* (2015) pudo constatar también el vertimiento de aguas albañales provenientes de viviendas ubicadas en las márgenes de este arroyo. Por otra parte, los tributarios analizados Paila, Santoyo y Mordazo contribuyen a mantener los niveles de contaminación en la corriente principal del río Almendares. Díaz *et al*. (2010) plantearon que las mayores afectaciones a la calidad de las aguas del arroyo Santoyo se deben a la disposición inadecuada de desechos sólidos y líquidos domésticos e industriales, así como, prácticas agrícolas inadecuadas en terrenos aledaños a la zona de protección del arroyo. Situación que se repite en el resto de los tributarios y en la corriente principal del río Almendares. En el estuario del río, las concentraciones de los coliformes termotolerantes y *E. coli* se mantienen elevadas a pesar de la mezcla con el agua de mar que tiende a aumentar la salinidad, la cual constituye un factor de estrés fisiológico para los organismos de agua dulce. Sin embargo, la contaminación fecal que viene con el río es tan alta que esta mezcla con agua de mar no es suficiente para disminuir significativamente la concentración del indicador de contaminación fecal. En Cuba, muchos estuarios están contaminados debido a la industria, las actividades domésticas y la agricultura, además la hidrología de estos ecosistemas ha sido significativamente alterada debido a la represa de los ríos, la construcción de viviendas y las actividades turísticas (Cobas *et al.*, 2011).

En el Complejo Turístico “Las Terrazas” localizado en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario en la provincia Artemisa, se pudo observar que las concentraciones de los coliformes termotolerantes, aunque son menores a las encontradas en las estaciones del río Almendares, sobrepasaron los límites máximos permisibles por la Norma Cubana 22 (1999) para lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores con contacto directo e indirecto con el agua (Figura 2). Sin embargo, cuando se analiza la concentración de *E. coli*, el coliforme termotolerante de origen fecal más abundante en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y el ser humano (Santiago-Rodriguez *et al.*, 2012), la mayoría de las estaciones no sobrepasan los límites establecidos para aguas recreativas con contacto indirecto. En ocasiones, los coliformes termotolerantes pueden ser detectados aún cuando no existe una fuente de contaminación fecal, lo cual puede traer consigo una sobreestimación de la contaminación (Crim *et al.*, 2012). Por esta razón la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2002) recomendó el cambio del uso de los coliformes termotolerantes por *Escherichia coli* o enterococos. Sin embargo, muchos países continúan utilizándolos como indicadores de contaminación fecal, incluida Cuba (Norma Cubana 22, 1999). Es por esto que en la presente investigación se utilizan ambos indicadores de contaminación fecal.

Las concentraciones de coliformes termotolerantes y *E. coli* detectadas en las estaciones del Complejo Turístico “Las Terrazas” pueden ser el resultado de los procesos de arrastre y drenaje de los suelos aledaños a estas estaciones durante las precipitaciones, teniendo en cuenta que los meses de mayo y junio se encuentran dentro del periodo lluvioso. Se plantea

que el intercambio entre el suelo y el agua constituye una vía de transporte de coliformes termotolerantes hacia las aguas durante las abundantes precipitaciones, lo cual es menos notable bajo condiciones de relativa sequía (Goto y Yan, 2011). Crim *et al*. (2012) sugieren que las cuencas de los bosques típicamente presentan menores conteos de coliformes termotolerantes y *E. coli*, sin embargo los conteos pueden ser altamente variables y relacionados a los tipos de vida salvaje y la resuspensión del sedimento en la columna de agua.

De esta forma, el estudio preliminar de las estaciones de muestreo del río Almendares y del Complejo Turístico "Las Terrazas", permitió seleccionar las tres estaciones de cada ecosistema (Río Cristal, Paila, Puente de Hierro, Presa El Palmar, Presa San Juan y Baños del San Juan), que posteriormente se evaluaron desde el punto de vista físico-químico y microbiológico.

4.2. Calidad físico-química y microbiológica de los ríos Almendares y San Juan en el período 2011-2013

El estudio de la calidad del agua en los sistemas rivereños ha aumentado en las últimas décadas debido al reconocimiento de la importancia de la ecología y la calidad del agua para los diferentes usos de los ríos (Kannel *et al.*, 2011). La clasificación de los cuerpos de agua dulce está basada en los requerimientos específicos de calidad según su uso, por ejemplo: agua potable, doméstica, industrial, agrícola o recreativa; donde las principales diferencias entre estos tipos de agua radica en el contenido de contaminantes, los cuales provienen fundamentalmente de las actividades antropogénicas (López-López *et al.*, 2011). Es por esto que resulta de gran importancia la evaluación de la calidad química y microbiológica de las aguas para su posterior uso.

Atendiendo a los valores de temperaturas que oscilaron entre 20-35 ºC durante los dos años de muestreo en las estaciones de los ríos Almendares y San Juan (Tablas 2 y 5), las aguas de estos ecosistemas se clasifican como aguas hipotermales según la clasificación de Castany (1971). Este indicador se relacionó negativamente con los sólidos totales disueltos en el río San Juan en el periodo 2011-2012 (Tabla 6), lo cual pudiera deberse a que con el incremento de la temperatura se promueve un aumento en la tasa metabólica de los microorganismos, lo que conlleva a la degradación de la materia orgánica, que es utilizada como fuente de carbono y energía (Dinsmore *et al.*, 2013). Este hecho provoca la disminución de la materia orgánica en la columna de agua y por tanto de los sólidos totales disueltos. En cambio, en el periodo 2013, la temperatura correlacionó positivamente con el pH en los ríos Almendares y San Juan (Tablas 4 y 7), lo que puede estar dado porque un incremento en la temperatura conduce a un aumento del número de iones en solución debido a la disociación de las moléculas. Como el pH es una medida de la concentración de iones hidrógeno, un cambio en la temperatura del agua se refleja con el consiguiente cambio en el pH (Zumdahl, 1993). Además en este mismo periodo se observó la relación positiva entre la temperatura y las precipitaciones en el río San Juan,

resultados similares a los descritos por Medeiros *et al*. (2012) y Jung *et al*. (2014) en ecosistemas dulceacuícolas de la cuenca de río Doce en Brasil y en el río Han en Corea del Sur respectivamente. El aumento de la temperatura provoca el incremento de la evaporación del agua, lo cual conlleva al incremento de la humedad atmosférica y por consiguiente, a un aumento en las precipitaciones (McCabe y Wolock, 2011).

Los valores de pH se encontraron dentro de los límites establecidos por la norma cubana para lugares de baño en costas y masas de agua interiores (Norma Cubana 22, 1999) mostrando valores ligeramente alcalinos en la mayoría de los meses de muestreo, lo cual puede deberse al aporte de los suelos donde se encuentran las cuencas de los ríos analizados. En el caso de la cuenca Almendares-Vento, el 70% de los suelos son pardos carbonatados y ferralíticos rojos (CCAV, 1999), en tanto los suelos de la subcuenca del río San Juan se caracterizan por ser húmicos carbonáticos y pardos carbonatados (Peña *et al.*, 2001). Estos suelos contribuyen al aporte de bicarbonato de calcio que provoca el ligero incremento del pH en estos ríos. Este hecho se pudo apreciar en las aguas del río San Juan en el periodo 2013, donde el pH correlacionó positivamente con las precipitaciones y estas a su vez correlacionaron con los sólidos totales disueltos y la conductividad eléctrica, denotando el aporte de los suelos a través de los procesos de arrastre y drenaje, que se producen con mayor frecuencia durante los periodos lluviosos (Crim *et al.*, 2012). Particularmente en el mes de octubre 2011 en las estaciones del río Almendares, se registraron valores de pH ligeramente por encima de lo establecido por la Norma Cubana 22, lo cual pudiera deberse al aporte de los escurrimientos procedentes de las áreas urbanas aledañas, debido a la lixiviación de álcalis a partir del concreto y otras infraestructuras urbanas, las cuales contribuyen al incremento del pH (Kaushal y Belt, 2012; Connor *et al.*, 2014) o alguna otra fuente de contaminación que viene con los vertimientos de aguas residuales industriales y domésticas.

En el caso de la conductividad eléctrica y los sólidos totales disueltos (STD), ambos constituyen una medida indirecta de la salinidad de una solución (Niekerk *et al.*, 2014), lo que explica la correlación positiva observada entre ambos indicadores en los ríos Almendares y San Juan durante los dos años de muestreo (Tablas 3, 4, 6 y 7). La conductividad eléctrica se utiliza frecuentemente como sustituto de los sólidos totales disueltos y es una medida de la capacidad de una solución de conducir la corriente eléctrica entre dos puntos (Dunlop *et al.*, 2005; Niekerk *et al.*, 2014). En cambio los STD brindan una indicación general del nivel de sólidos disueltos menores de dos micrómetros presentes en una corriente fluvial, los cuales incluyen todos los electrolitos disociados que aumentan la concentración de sales y otros compuestos como la materia orgánica disuelta (Tanor *et al.*, 2014). Se plantea que las aguas dulces poseen valores de conductividad y STD entre 20-1500 $\mu S.cm^{-1}$ y 0-1500 $mg.L^{-1}$ respectivamente (Ahiarakwem *et al.*, 2012; Andem *et al.*, 2012), por lo que las aguas de las estaciones Río Cristal y Paila del

río Almendares y las aguas de las estaciones del río San Juan clasifican como agua dulce, mientras que las aguas de la estación Puente de Hierro son salobres.

Los mayores valores de ambos indicadores durante el periodo de estudio se encontraron en las estaciones Paila y Puente de Hierro y en las estaciones del río San Juan en el mes de julio 2013. Este hecho puede deberse a que la estación Puente de Hierro se localiza en la zona estuarina del río Almendares donde se produce una mezcla del agua dulce del río con el agua de mar, lo cual contribuye al aumento de la salinidad. Sin embargo, en la estación Paila que se encuentra corriente arriba, los altos valores de conductividad y STD pueden deberse a la contaminación presente en este punto de muestreo. El arroyo Paila recibe las aguas residuales del Laboratorio Farmacéutico “Reinaldo Gutiérrez”, así como aguas albañales procedentes de viviendas ubicadas en sus márgenes. El laboratorio antes mencionado vierte a las aguas del Paila diferentes compuestos químicos provenientes de sus producciones y aguas albañales, lo que justifica los altos valores de conductividad y STD encontrados en esta estación.

La conductividad eléctrica es un indicador indirecto de contaminación por descargas de aguas residuales debido a que presenta una estrecha relación con el contenido de sales disueltas presentes en los cuerpos de agua dulce contaminados con aguas residuales de origen doméstico, industrial y agrícola (Chalupová *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2012). Este hecho se observó en el río Almendares donde la conductividad y los sólidos totales disueltos correlacionaron positivamente con las altas concentraciones de nitritos y DQO durante los dos años de muestreo y con las altas concentraciones de nitratos en el periodo 2013 (Tablas 3 y 4). Todas estas variables aumentan considerablemente corriente abajo de la estación Río Cristal, encontrándose los mayores valores en el estuario. Resultados similares fueron obtenidos por Bere y Tundisi (2011) en el río tropical Monjolinho de Brasil, donde encontraron altas concentraciones de nutrientes, contaminación orgánica, conductividad eléctrica y fuerza iónica en las estaciones corriente abajo del río. Estos autores observaron un gradiente a lo largo de la corriente fluvial desde las zonas agrícolas hasta las áreas urbanas, lo cual también se observa en el río Almendares.

Existen otros factores que pueden influir sobre la conductividad y los sólidos totales disueltos, como es el caso de la temperatura del agua y la incidencia de las precipitaciones. Particularmente en el período 2011-2012 se observó una correlación positiva entre la temperatura, la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos y la concentración de nitritos en el río Almendares (Tabla 3), esto puede deberse a que con el aumento o disminución de la temperatura aumenta o disminuye la solubilidad de las sustancias en el agua, lo cual contribuye al incremento o decremento de la concentración de las sales y compuestos orgánicos en el río. Resultados similares fueron obtenidos por Halliday *et al.* (2014) en estudios realizados en el río Enborne en Inglaterra, donde la temperatura correlacionó positivamente con los sólidos totales disueltos.

La alta conductividad eléctrica observada en el río Almendares puede deberse también a la baja frecuencia de precipitaciones en el periodo de estudio, lo cual contribuye a la poca dilución de la contaminación en el ecosistema. Se plantea que la conductividad eléctrica tiende a cambiar en función de la recarga del ecosistema: durante periodos lluviosos tiende a disminuir su valor debido que se produce la dilución de las sales; mientras que durante los periodos poco lluviosos ocurre todo lo contrario. Las aguas residuales pueden contener iones y compuestos poco conductores (compuestos orgánicos) que pueden cambiar la conductividad del agua (Rashed y Younis, 2012). Además, este indicador también se ha asociado a altas concentraciones de contaminantes emergentes, entre los que se encuentran los antibióticos, hormonas y esteroides (Ribeiro *et al.*, 2014).

En el caso del río San Juan, los altos valores de conductividad y STD en el mes de julio 2013 coincidieron con las abundantes precipitaciones, donde se informaron 242,1 mm de lluvias (Estación Ecológica Sierra del Rosario) (Tabla 5). Además, es este periodo donde se obtuvieron las correlaciones positivas entre la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos y las precipitaciones (Tabla 7). Este hecho pudo estar dado por la gran cantidad de sedimentos arrastrados desde las montañas hasta las aguas, los cuales se detectaron durante la toma de muestra al día siguiente de ocurridas las precipitaciones, constituyendo un aporte de nutrientes inorgánicos, minerales y compuestos orgánicos que tienden a variar la conductividad eléctrica del agua. Aunque se plantea que la conductividad eléctrica tiende a disminuir con la incidencia de las precipitaciones debido a la dilución de las sales (Rashed y Younis, 2012), tal y como se observó en el río San Juan en el periodo 2011-2012 (Tabla 6), la contribución de sales procedentes de los suelos adyacentes al río que al momento del muestreo no habían precipitado, pudo haber influido en los altos valores de los indicadores detectados en el ecosistema durante el segundo año de muestreo.

El oxígeno es importante para la supervivencia de la vida acuática. Se plantea que en un curso de agua de buena calidad, la cantidad de oxígeno disuelto debe sobrepasar las cuatro partes por millón; sin embargo, cuando el resultado del análisis es inferior a este valor, indica contaminación del agua (De La Cruz, 2008), como sucede en el río Almendares donde se obtuvieron las menores concentraciones de oxígeno disuelto (Figura 7). Este indicador se encontró en el rango de 0,1-6 $mgO_2.L^{-1}$ en las estaciones del río Almendares, por lo que sus aguas se pueden clasificar como subóxicas atendiendo a la clasificación propuesta por Briée *et al.* (2007). En cambio las concentraciones de oxígeno disuelto en las aguas del río San Juan se encontraron en el rango de 6-12 $mgO_2.L^{-1}$, por lo que se consideran aguas óxicas. Las bajas concentraciones de oxígeno disuelto en el río Almendares son el resultado de los sólidos suspendidos que contienen materiales orgánicos e inorgánicos los cuales se oxidan a expensas del oxígeno. En el caso de las estaciones del río San Juan, las concentraciones de oxígeno disuelto por encima de 6 $mg.L^{-1}$, se deben no solo a las bajas concentraciones de

contaminantes, sino también a la presencia de saltos de agua y al aliviadero de la estación Presa El Palmar, que contribuyen a la oxigenación mecánica de las aguas.

El oxígeno disuelto correlacionó positivamente con el pH en el periodo 2011-2012 (Tabla 3) y con las altas concentraciones de nitratos en el periodo 2013 (Tabla 4) en el río Almendares, lo que puede estar dado porque por el día, durante la producción primaria de biomasa mediante la fotosíntesis; los nutrientes fosfatos, amonio y carbonatos son asimilados, lo cual contribuye a la disminución de sus concentraciones en el agua con el consiguiente aumento del pH debido a la eliminación del dióxido de carbono y la producción de oxígeno a través de la fotosíntesis. En cambio durante la noche, los procesos de respiración y descomposición bacteriana del detrito pueden disminuir la concentración de oxígeno y el pH (Kannel *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2014). De igual forma la correlación positiva entre la concentración de oxígeno disuelto y las concentraciones de nitratos, puede deberse a que el proceso de nitrificación, el cual es realizado por las bacterias nitrificantes, se lleva a cabo en presencia de oxígeno (Madigan *et al.*, 2012).

En el río San Juan, se observó una correlación negativa entre las concentraciones de oxígeno disuelto y las precipitaciones en el periodo 2011-2012 (Tabla 6). Resultados similares fueron obtenidos por Jung *et al*. (2014) en el río Han en Corea del Sur, quienes observaron que las precipitaciones se relacionaban negativamente con el oxígeno y positivamente con la concentración de sólidos suspendidos. Las precipitaciones pueden contribuir al incremento de la turbidez en los sistemas acuáticos debido a que provocan afloramientos de los sedimentos del fondo del río y arrastre de los suelos adyacentes, esto disminuye la penetración de la luz solar, lo cual afecta la actividad fitoplanctónica y por ende el proceso de fotosíntesis con la consiguiente disminución del oxígeno disuelto. Por lo que un aumento de la turbidez del agua puede provocar una disminución del proceso de fotosíntesis y por lo tanto una disminución del pH y las concentraciones de oxígeno disuelto.

En el mes de octubre 2011 las concentraciones de oxígeno disuelto se encontraron dentro de lo establecido en la Norma Cubana 22 de 1999 (>4 mg $O_2.L^{-1}$) en las estaciones Paila y Puente de Hierro del río Almendares (Tabla 2). Esto pudiera atribuirse a la corriente del agua, la cual a través del movimiento puede contribuir a la oxigenación, particularmente en la zona estuarina (Puente de Hierro) con la subida de la marea. Sigee (2005) planteó que los movimientos de agua dentro del estuario dependen de las corrientes marinas, la circulación estuarina, la descarga del río y la entrada a partir de agua subterránea. Además es precisamente en el mes de octubre 2011 en la presente investigación, donde se obtienen las menores concentraciones de Demanda Química de Oxígeno (DQO) en las estaciones del río Almendares, por lo que se necesita menor cantidad de oxígeno para oxidar la materia orgánica, quedando mayor cantidad de oxígeno disuelto disponible en el cuerpo de agua. En el presente estudio no se observó correlación entre el oxígeno disuelto y la DQO, lo que indica que las concentraciones de

oxígeno que se detectan fundamentalmente en la estación Puente de Hierro, están relacionadas con el movimiento mecánico que se produce a través de la entrada de las mareas y no con la existencia de bajas concentraciones de materia orgánica.

Aunque las concentraciones de DQO fueron superiores en el río Almendares comparado con el río San Juan, en ambos ecosistemas sobrepasaron los 10 $mg.L^{-1}$ (Tablas 2 y 5). Huq *et al*. (2005) sugieren que los valores de DQO en aguas de buena calidad se encuentran entre 6-10 $mg.L^{-1}$, por lo que en ambos ríos hay presencia de altas concentraciones de compuestos oxidables. De las estaciones de muestreo evaluadas en los ríos Almendares y San Juan, Puente de Hierro fue la que mostró los mayores valores de DQO durante el período de estudio (Tabla 2). Este hecho puede deberse a que en los estuarios en comparación con las estaciones corriente arriba de los ríos, ocurre una mayor llegada de nutrientes con la entrada de las mareas y con la descarga del ecosistema dulceacuícola, lo cual se observa a través de la relación positiva entre la DQO y los sólidos totales disueltos obtenida en la presente investigación. Además, la mezcla del agua dulce del río con el agua de mar provoca la floculación de las finas materias suspendidas en grandes partículas, y por otra parte, la acción de las mareas provoca también la resuspensión de las partículas (Sigee, 2005); contribuyendo al incremento de la materia orgánica. Otra causa de los altos valores de DQO en el estuario puede atribuirse a la alta contaminación que viene con el río desde las estaciones corriente arriba, que constituyen un aporte de materia orgánica para el ecosistema, provocando la afectación de su calidad de agua. Se descarta la influencia de las concentraciones de cloruros sobre las concentraciones de DQO en el estuario, debido a que para la determinación de este parámetro químico se empleó el test spectroquant (gama de 0-1500 $mgO_2.L^{-1}$), donde las concentraciones de cloruros de hasta 2000 mg $Cl.L^{-1}$, no interfieren en la determinación debido a la presencia de sulfato de mercurio que enmascara a estos iones (APHA, 2012), en caso de sobrepasar esta concentración, se realizaron diluciones de la muestra, tal y como recomienda la APHA (2012).

En el río San Juan, sin embargo, se observó en el periodo 2013 que la DQO correlacionaba negativamente con los sólidos totales disueltos, la conductividad eléctrica y las precipitaciones (Tabla 7). Estos resultados son similares a los obtenidos por Jung *et al*. (2014), los cuales observaron que durante los periodos lluviosos ocurría la disminución de la DQO como consecuencia de la dilución, sin embargo se producía un aumento en las concentraciones de sólidos suspendidos debido al arrastre de los suelos y el afloramiento de los sedimentos del fondo de los ríos. En tanto, en el periodo 2011-2012 se observó que la DQO se relacionó negativamente con el pH (Tabla 6), lo cual puede deberse a que mientras mayor es la cantidad de materia orgánica en el ecosistema, mayor cantidad de oxígeno disuelto se necesita para descomponerla, proceso que contribuye a la liberación de dióxido de carbono, el cual

disminuye el pH del agua. Varol *et al*. (2012) plantean que la descomposición de la materia orgánica conlleva a la acidificación y por lo tanto a la disminución del pH.

Con respecto a las concentraciones de nutrientes inorgánicos (nitratos, nitritos, amonio y fosfatos), los mayores valores se obtuvieron en el río Almendares (Figura 7), específicamente en las estaciones Paila y Puente de Hierro, los cuales sobrepasaron los límites máximos permisibles establecidos por la Organización Mundial de la Salud (W.H.O, 2003) y se encontraron por encima de los informados por el Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos (INRH) (2002); aunque entre las estaciones del río San Juan, la estación Baños del San Juan mostró los mayores valores de concentración de nitratos y fosfatos.

Las altas concentraciones de nitratos y nitritos en la estación Puente de Hierro (Figura 3), pudieran estar relacionadas con el aporte de nitratos a partir de los suelos cultivados empleados por la agricultura urbana en las cercanías del río Almendares, así como con los vertimientos de origen doméstico e industrial, teniendo en cuenta que la presencia de nitritos es un indicador de vertimientos recientes de materia fecal y que su origen puede ser también industrial (Oliveira de Aguiar *et al.*, 2013). Este hecho constituye una contribución constante al ecosistema, acentuándose en el estuario que recibe toda la contaminación que viene de las estaciones corriente arriba. Además, las concentraciones de nitratos y nitritos correlacionaron positivamente entre sí durante los dos años de estudio, lo que ratifica que estos nutrientes tienen el mismo origen. Esta relación positiva puede indicar también la ocurrencia del proceso de nitrificación, el cual consta de dos pasos, (1) la oxidación de amonio a nitrito por las arqueas y bacterias oxidadoras de amonio y (2) la oxidación de nitrito a nitrato llevado a cabo por las bacterias oxidadoras de nitrito (Chen *et al.*, 2010). Por otra parte, en la presente investigación se constató que las concentraciones medias de nitratos eran superiores a las concentraciones medias de nitritos y amonio en ambos ríos, similar a lo observado en el río Almendares por el INRH (2002), pero diferente a los resultados obtenidos por Arpajón *et al*. (2011) en este mismo ecosistema, los cuales obtuvieron mayores concentraciones de las formas reducidas del nitrógeno. Estas diferencias pudieran estar dadas por las operaciones de dragado que se han llevado a cabo en el río Almendares en los últimos años (Geocuba, 2004). Zhong *et al*. (2010) y Zhang *et al*. (2010) sugirieron que la desnitrificación disminuye más en los sedimentos dragados en comparación con los sedimentos no dragados. Esto se debe a que el dragado puede eliminar contaminantes de la superficie de los sedimentos, exponiendo el sedimento profundo a la superficie y así promueve la aeración del cuerpo de agua (Jing *et al.*, 2013), lo que favorece el proceso de nitrificación.

La entrada de nutrientes a los estuarios está directamente relacionada con el uso de la tierra, debido a que la captación de ríos con una intensa agricultura y una elevada población a su alrededor contribuye al aumento de las concentraciones de nitratos y fosfatos en los estuarios (González-Ortegón y Drake, 2012), indicadores de contaminación química que correlacionaron

positivamente entre sí en el periodo 2011-2012 en el río Almendares. La agricultura es una importante fuente no puntual de contaminación de las aguas. El drenaje de las aguas a partir de los suelos cultivados contiene fósforo y nitrógeno, aunque usualmente contiene más nitrógeno que fósforo debido a que el fósforo se une frecuentemente a los componentes del suelo debido a que no es soluble en agua. En cambio los nitratos, debido a su naturaleza soluble en agua, se mueven con el drenaje de los suelos hacia los ríos (Khan y Mohammad, 2014).

Las mayores concentraciones de fosfatos se obtuvieron en las estaciones Paila y Puente de Hierro y los mayores valores de concentración de amonio se obtuvieron en la estación Paila (Figura 3). Estos dos indicadores correlacionaron positivamente entre sí en el periodo 2013 en el río Almendares, lo cual pudiera estar indicando que en las áreas agrícolas adyacentes al río se emplea fosfato de amonio como fertilizante, similar a lo que ocurre en el río Bagmati en Nepal (Kannel *et al.*, 2011). Específicamente el amonio es un contaminante inorgánico que resulta de la biodegradación de la materia orgánica, a partir del escurrimiento agrícola, la cría de animales y los efluentes domésticos e industriales (Dehedin *et al.*, 2013). Romeu *et al*. (2015) advierte la presencia en las inmediaciones del arroyo Paila de corrales para la cría de animales (aves, carneros y cerdos), así como vertimientos residuales procedentes de viviendas no conectadas al alcantarillado y del Laboratorio Farmacéutico “Reinaldo Gutiérrez”, que contribuyen a que esta estación sea la de mayor contaminación en el río. Además, este resultado está en correspondencia con lo obtenido por Arpajón *et al.* (2011) quienes de nueve estaciones de muestreo evaluadas en el río Almendares, plantearon que la estación Paila presentaba los mayores valores de contaminación química.

Las altas concentraciones de nitratos y fosfatos en la estación Baños del San Juan (Figura 5) pueden deberse a la entrada de estos nutrientes a través de la piel o la orina de los bañistas. Estos dos indicadores correlacionaron positivamente entre sí en el periodo 2013 en el río San Juan, lo que indica que tienen el mismo origen. Se plantea que como promedio cada bañista contribuye con la entrada de 0,094 g de fósforo por día a un cuerpo de agua y que la carga crítica de fósforo no debe exceder los 0,07 g $P.m^{-2}.a^{-1}$ en lagos poco profundos que tengan menos de 5 m de profundidad (Dokulil, 2014). Si se tiene en cuenta que las piscinas naturales de los Baños del San Juan tienen una profundidad de 3 m y que reciben diariamente una gran cantidad de público, particularmente en los meses de verano, esta podría ser una de las causas de las altas concentraciones de nutrientes encontradas en esta estación. Dokulil (2014) plantea que a pesar de que el turismo puede traer beneficios al ambiente contribuyendo a su protección y conservación, puede también traer perjuicios, los cuales se producen cuando el número de visitantes es mayor que la habilidad del ecosistema para hacer frente a este uso dentro de los límites aceptables de cambio.

Por otra parte en el periodo 2011-2012 se observó la correlación positiva entre las concentraciones de nitritos y fosfatos en el río San Juan, las cuales fueron más altas en la estación Baños del San Juan en comparación con las estaciones Presa El Palmar y Presa San Juan; por lo que otra causa que pudiera contribuir a estas concentraciones de nutrientes, son los escurrimientos procedentes de la laguna de oxidación aerobia que se encuentra entre las estaciones Presa San Juan y Baños del San Juan, la cual presenta roturas y recepciona volúmenes de aguas residuales domésticas superiores a su capacidad de retención, según se observó durante los muestreos. En este mismo periodo se observó una correlación positiva entre las altas concentraciones de nitratos y el pH, resultados similares a los obtenidos por Zhang *et al*. (2014) en el lago Erhai en China. Estos autores plantean que a pH 8 se favorece el crecimiento y metabolismo de las bacterias nitrificantes. Además bajo condiciones aerobias, la liberación de amonio a partir de los sedimentos disminuye y este se convierte en nitrato mediante la nitrificación. Este fenómeno contribuye a la disminución del amonio y al incremento de los nitratos en las aguas.

Para la evaluación de la eutroficación existen dos criterios; el primero, aplicado en los países europeos, se basa en las concentraciones de nutrientes para diferenciar entre dos condiciones de calidad de agua: pobre y mala; y el segundo criterio aplicado en los Estados Unidos, se basa en la alta concentración de clorofila *a* y la baja saturación de oxígeno (Dorgham, 2014). Teniendo en cuenta las altas concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto (nitrato, nitrito y amonio) y fosfatos, las aguas del río Almendares se pueden clasificar como hipertróficas atendiendo a la clasificación de Sigee (2005), lo cual demuestra la pobre calidad de este ecosistema caracterizado por aguas turbias y con bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Sin embargo, atendiendo a este mismo criterio, las aguas del río San Juan se puede clasificar como mesotróficas. Las aguas oligotróficas y mesotróficas de lagos y reservas se caracterizan regularmente por ser claras y por presentar macrófitas sumergidas (Guo *et al.*, 2014), aspectos que se observan en las estaciones Presa El Palmar y Presa San Juan del río San Juan.

Al analizar la calidad microbiológica de las estaciones de muestreo de los ríos Almendares y San Juan, se pudo observar que las estaciones del río Almendares presentan los mayores valores de contaminación fecal (Figura 8), específicamente el arroyo Paila mostró las concentraciones más altas de los indicadores bacterianos: enterococos, *E. coli* y coliformes termotolerantes (Figura 4). Este resultado está en correspondencia con resultados anteriores presentados por Chiroles *et al.* (2007) y Romeu *et al.* (2015) quienes informaron las mayores concentraciones de indicadores bacterianos de contaminación fecal en esta estación de muestreo. En tanto en el río San Juan, a pesar de presentar las menores concentraciones de los indicadores de contaminación fecal en comparación con el río Almendares, la estación Baños del San Juan presentó las concentraciones de *E. coli* más elevadas entre las tres estaciones de muestreo evaluadas en este ecosistema (Figura 6), lo cual puede deberse a la

mayor afluencia de público a las piscinas naturales de esta estación así como a los escurrimientos a partir de la laguna de oxidación aerobia.

Los enterococos, los coliformes termotolerantes y *E. coli* son miembros de la microbiota intestinal de muchos animales, incluido el ser humano. Su abundancia en las heces de los animales y los seres humanos, su fácil cultivo y su correlación con la salud humana en los sistemas acuáticos permiten su empleo para evaluar la calidad del agua a nivel mundial (Byappanahalli *et al.*, 2012; Hachich *et al.*, 2012). Se plantea que *E. coli* y los enterococos muestran mayor correlación con las enfermedades asociadas a los bañistas y por eso son mejores indicadores de contaminación fecal comparado con los coliformes termotolerantes (Crim *et al.*, 2012; Hachich *et al.*, 2012). Las fuentes de contaminación fecal en los paisajes urbanos incluyen las fugas y desbordamientos a partir de los alcantarillados y los residuales domésticos (Crim *et al.*, 2012); situación que se presenta en el río Almendares. En tanto, en los paisajes rurales, como la Sierra del Rosario donde se localiza el río San Juan, las fuentes de contaminación incluyen el ganado, el escurrimiento agrícola y la fuga a partir de lagunas de oxidación, estas últimas utilizadas en el tratamiento de las aguas residuales (Crim *et al.*, 2012).

La relación *E. coli*/coliformes termotolerantes fue elevada en las tres estaciones de muestreo del río Almendares y en dos estaciones del río San Juan, principalmente en el arroyo Paila, la estación Puente de Hierro y la estación Baños del San Juan. En las tres estaciones del río Almendares así como en la estación Baños del San Juan se obtuvieron valores por encima de 0,63, valor propuesto por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2002) para estimar la concentración de *E. coli* a partir de la concentración de los coliformes termotolerantes (CTE). Una relación por encima del valor propuesto por la USEPA se ha observado en diferentes ecosistemas acuáticos que incluyen: playas, ríos, estuarios, aguas albañales tratadas y aguas residuales sin tratamiento alguno (Hamilton *et al.*, 2005; García-Armisen *et al.*, 2007; Hachich *et al.*, 2012). Estas diferencias en los valores de relación *E. coli*/CTE, pueden estar dadas porque esta relación depende del sitio de estudio y además de los métodos que se apliquen para enumerar estos dos indicadores.

Con respecto al sitio de estudio, Vernberg *et al*. (1996) en una investigación realizada en la costa de Carolina del Sur, en una zona muy urbanizada y otra forestal, encontraron valores elevados en las proporciones *E. coli*/coliformes termotolerantes en la zona altamente urbanizada y una proporción mucho menor en la segunda zona evidenciando de esta manera que la microdiversidad de bacterias coliformes era mayor en la zona situada en el área forestal donde existía un mayor número de bacterias de origen no fecal. Estos autores relacionaron la marcada incidencia de *E. coli* y la baja microdiversidad con los efectos de la urbanización, tal y como ocurre en el río Almendares en comparación con el río San Juan.

En cuanto a los métodos aplicados para la enumeración de *E. coli* y de coliformes termotolerantes, Noble *et al*. (2004) obtuvieron en un estudio realizado en aguas costeras un

promedio de *E. coli*/CTE de 0,88, en el cual *E. coli* se enumeró mediante el empleo del método del número más probable en placas, el cual se basa en la detección de la actividad enzimática de la enzima β–D-glucuronidasa. Sin embargo, esta relación fue igual a uno cuando los coliformes termotolerantes se enumeraron por el método de filtración por membrana y fue igual a 0,5 cuando se utilizó el método de fermentación en tubos múltiples; o sea que el procedimiento que se emplee para el conteo de ambos indicadores influye en el valor de la relación de *E.coli*/CTE. Sin embargo, teniendo en cuenta los valores de la relación *E. coli*/CTE obtenidos en las estaciones de los ríos Almendares y San Juan, cualquiera de los dos indicadores bacterianos puede ser empleado para estimar la contaminación fecal de estos ecosistemas dulceacuícolas.

En la presente investigación se obtuvieron valores de relación *E. coli*/Enterococos (EC/E) entre 0,7 y 4 en las estaciones del río Almendares y en la estación Baños del San Juan del río San Juan, lo cual indica que la contaminación fecal existente en estas estaciones es de origen animal y humano. Sin embargo en las estaciones Presa El Palmar y Presa San Juan los valores de relación *E. coli*/Enterococos fueron menores que 0,7, lo cual indica que la contaminación fecal existente en estas estaciones es de origen animal. El empleo de la relación EC/E puede ser de gran utilidad para la determinación del origen humano o animal de la contaminación fecal, debido a que las concentraciones de coliformes termotolerantes y enterococos que son descargados por los seres humanos son significativamente diferentes a las descargadas por los animales (Meeroff *et al.*, 2008). Por lo que, cuando la relación EC/E es mayor de 4 se está en presencia de una contaminación fecal de origen humano y cuando esta relación es menor de 0,7 la contaminación es de origen animal. Sin embargo, en el intervalo entre 0,7 y 4 se plantea que se está en presencia de una contaminación fecal mixta (materia fecal humana y animal) (Coyne y Howell, 1994).

Por otra parte durante los dos años de estudio se apreció la correlación positiva entre las variables amonio, *E. coli*, enterococos y coliformes termotolerantes en el río Almendares (Tablas 3 y 4); lo cual indica que el origen de estas variables es el mismo; es decir la contaminación fecal. En investigaciones realizadas por Crim *et al*. (2012) en ecosistemas dulceacuícolas de Georgia (Estados Unidos) encontraron que la concentración de los coliformes termotolerantes correlacionaron positivamente con las concentraciones de amonio pero solo durante el periodo lluvioso. Estos autores atribuyeron esta relación a problemas asociados con el sistema de alcantarillado durante los eventos lluviosos. Sin embargo, en la presente investigación la relación entre las concentraciones de amonio y los indicadores bacterianos de contaminación fecal se mantuvo durante todo el periodo en el río Almendares, el cual se caracterizó por la baja frecuencia de precipitaciones (Estación Casablanca del Instituto de Meteorológica en La Habana). Este hecho puede deberse al constante vertimiento de aguas residuales de origen doméstico e industrial hacia el río (Romeu *et al.*, 2015), los cuales

constituyen un aporte de bacterias indicadoras de contaminación fecal y amonio. Douagui *et al*. (2012) en estudios realizados en aguas subterráneas al sur del distrito Abidjan en Costa de Marfil, observaron que las concentraciones de coliformes termotolerantes y de *E. coli* correlacionaron con las concentraciones de nutrientes, particularmente con las concentraciones de amonio. Estos autores explican que el amonio puede ser empleado como nutriente por las bacterias coliformes en el proceso de asimilación para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Además, el hecho de que los indicadores bacterianos de contaminación fecal hayan correlacionado positivamente entre sí, indica que cualquiera de los tres indicadores puede ser utilizado para evaluar la calidad microbiológica de las aguas del río Almendares, lo que está en correspondencia con los resultados obtenidos por Chiroles *et al*. (2007).

En el caso del río San Juan solamente en el periodo 2013 se apreció la relación entre el amonio, la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos y los indicadores bacterianos de contaminación fecal (Tabla 7), lo cual puede explicarse a través de la ocurrencia de los procesos de arrastre y drenaje de los suelos, así como por la resuspensión de los sedimentos del río, los que se intensifican durante los periodos lluviosos. Crim *et al*. (2012) plantearon que la relación positiva entre las concentraciones de coliformes termotolerantes y los sólidos totales suspendidos durante periodos lluviosos puede ser resultado de la resuspensión de los sedimentos con coliformes termotolerantes adheridos, dado que el sustrato fue perturbado durante el incremento del flujo del agua. Esta relación también puede deberse al aumento de la entrada de los sedimentos a partir de los suelos adyacentes al río. Goto y Yan (2011) plantean que el suelo es una reserva importante de bacterias indicadoras de contaminación fecal y que el intercambio entre el suelo y el agua durante las abundantes precipitaciones constituye una vía de transporte de las bacterias fecales. Estas bacterias pueden llegar a los suelos procedentes de las deposiciones de animales de vida salvaje (ej. pájaros, ciervos, cerdos salvajes, etc.), así como de animales domésticos.

A pesar de que en ambos años de muestreo se observaron coincidencias en cuanto a la relación de los diferentes indicadores físico-químicos y de contaminación fecal, cada periodo analizado tuvo sus particularidades, lo cual puede deberse a diferencias en cuanto al régimen de precipitaciones, de temperaturas, de radiación solar, entre otros factores que pueden influir sobre las relaciones que se establecen entre los factores abióticos y bióticos. En sentido general las aguas del río San Juan presentan mejor calidad química y microbiológica que las aguas del río Almendares. Las aguas del San Juan son claras, con abundancia de peces y macrófitas sumergidas a diferencia de las aguas del río Almendares las cuales son turbias, fétidas y en algunos puntos del río con presencia de macrófitas como *Eichhornia crassipes* (malangueta) que interrumpen el curso del mismo.

Los resultados presentados constituyen una novedad científica, ya que se informa por primera vez para países de clima tropical, la comparación entre un ecosistema dulceacuícola de un

área urbana y un ecosistema dulceacuícola de un área rural, utilizando tres indicadores bacterianos de contaminación fecal y diez indicadores físico-químicos. Esta investigación alcanza una mayor importancia debido a que por primera vez en Cuba se realiza un análisis de la calidad microbiológica de las aguas de una Reserva de Biosfera como lo es la Sierra del Rosario, lo cual contribuye a evitar riesgos biológicos para la salud y el ambiente, así como a la conservación del recurso agua y su entorno. Como parte de las gestiones ambientales necesarias para la preservación del agua como recurso natural, es necesario contar con datos cuantitativos relacionados con la contaminación de las aguas (CITMA, 2009), por lo que el presente estudio constituye un aporte para el mejoramiento del manejo de los ecosistemas acuáticos.

4.3. Análisis de la comunidad bacteriana en los ríos Almendares y San Juan mediante DGGE y pirosecuenciación 454

Para el análisis de la comunidad bacteriana de los ríos Almendares y San Juan se emplearon dos técnicas independientes de cultivo: la DGGE y la pirosecuenciación 454. La combinación de ambas técnicas con métodos multivariados permitió apreciar la variabilidad espacio-temporal en la estructura de las comunidades bacterianas de los ecosistemas evaluados durante el periodo 2011-2013, lo cual se corresponde con resultados obtenidos por diversos autores en diferentes ecosistemas dulceacuícolas (Laque *et al.*, 2010; Berdjeb *et al.*, 2011a; Pollet *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2012; Ibekwe *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; García-Armisen *et al.*, 2014; Llirós *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014) utilizando una o ambas técnicas moleculares. Las comunidades bacterianas analizadas en ambos ecosistemas dulceacuícolas incluyeron bacterias de vida libre y bacterias asociadas a partículas teniendo en cuenta el tamizaje realizado con filtros de diámetro desde 0,22 hasta 5 µm.

Basado en la estructura de las comunidades bacterianas, en el río Almendares se pudo observar como los meses de octubre 2011 y junio 2013 se separan de los meses de febrero y abril 2012 y 2013 (Figuras 9 y 15). Esto mismo sucede en el río San Juan donde el mes de noviembre 2011 se separa de los meses de febrero y abril 2012 y el mes de febrero 2013 se separa de los meses de abril y julio 2013 (Figuras 11 y 17). Además se observa como por lo general, las estaciones menos contaminadas (Río Cristal, Presa El Palmar y Presa San Juan) quedan separadas de las estaciones de mayor contaminación (Paila, Puente de Hierro y Baños del San Juan) y se detectan diferencias entre ambos ríos (Figuras 13, 14, y 19), lo cual sustenta la idea de que las comunidades bacterianas pueden ser utilizadas como indicadores del estado ecológico de los ecosistemas acuáticos (Lear *et al.*, 2012; Washington *et al.*, 2013). Se plantea que las comunidades bacterianas son altamente sensibles a los cambios ambientales, así como a los cambios persistentes en los ecosistemas debido a la contaminación derivada de la actividad humana o al cambio climático global (Lear *et al.*, 2008). Los cambios temporales y espaciales detectados en los dos ecosistemas dulceacuícolas pueden estar relacionados con

factores abióticos tales como: temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica, transparencia del agua, concentración de materia orgánica, nutrientes, entre otros y bióticos como: contenido de clorofila *a*, interacciones con el fitoplancton y el zooplancton, depredación, parasitismo y competencia, que regulan los cambios de las comunidades en los ecosistemas acuáticos (Lindström *et al.*, 2005; Berdjeb *et al.*, 2011a; Berdjeb *et al.*, 2011b; Llirós *et al.*, 2014).

Se determinó a través de la pirosecuenciación 454 que los filos predominantes en el río Almendares eran: *Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes* y *Firmicutes*, en tanto, en el río San Juan predominaron los filos *Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes* y *Deinococcus-Thermus*, lo cual está en correspondencia con resultados presentados por otros autores en estudios realizados en un río subtropical de China (Hu *et al.*, 2014), en los ríos Mississippi (Staley *et al.*, 2013) y Columbia (Fortunato *et al.*, 2013) en Estados Unidos, el río Ohio en Canadá (Schultz *et al.*, 2013) y el río Támesis en Inglaterra (Read *et al.*, 2015). Estos autores observaron que los filos dominantes en las comunidades bacterianas de ecosistemas rivereños son *Actinobacteria, Bacteroidetes y Proteobacteria* y en algunos casos *Cyanobacteria, Firmicutes* y *Verrucomicrobia.*

Por otra parte, ambas técnicas independientes de cultivo coinciden en que en el río Almendares el filo más abundante es *Proteobacteria*, específicamente la clase *Gammaproteobacteria* que presentó la mayor abundancia relativa (Tabla 8 y Figura 16). En tanto en el río San Juan se identificaron con mayor frecuencia los filos *Actinobacteria* y *Proteobacteria* (Tabla 9 y Figura 18), dentro de este último las clases *Alphaproteobacteria* (pirosecuenciación 454) y *Betaproteobacteria* (DGGE) predominaron. Las bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria*, son generalmente dominantes en los sistemas acuáticos. Este filo contiene fototrofos, quimiolitotrofos y quimioorganotrofos, y sus miembros pueden encontrarse en ambientes óxicos y anóxicos (Madigan *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2015). La clase *Gammaproteobacteria* se encuentra con mayor frecuencia en ambientes de aguas saladas (ej: océanos y lagos salobres) y son menos abundantes en ambientes de agua dulce donde se consideran contaminantes. Se plantea que las bacterias de esta clase son miembros transitorios de los ecosistemas dulceacuícolas traídos de otros ambientes, como es el caso de las bacterias entéricas (Newton *et al.*, 2011). Este hecho se ve reflejado en la composición de las comunidades bacterianas del río Almendares donde se aprecia que ocho de las 19 bandas identificadas mediante la DGGE corresponden a bacterias entéricas (Tabla 9) y que particularmente en la estación Paila, la estación con mayor contaminación fecal, la tercera familia más abundante dentro del filo *Proteobacteria* es *Enterobacteriaceae* (Tabla 10). Dentro de esta familia se encuentran los coliformes termotolerantes y *E. coli*, utilizados como indicadores de contaminación fecal, los cuales se obtuvieron en altas concentraciones en el río Almendares como consecuencia de los constantes vertimientos de aguas residuales de origen doméstico y albañal (Chiroles *et al.*,

2007; Romeu *et al.*, 2011; Romeu *et al.*, 2015). García-Armisen *et al*. (2014) en el río Sena, contaminado con aguas residuales, encontró que *Proteobacteria* era el filo más abundante (73% de las secuencias analizadas) y que *Actinobacteria* se encontraba en menor proporción (21% de las secuencias), similar a lo observado en el río Almendares. Sin embargo en el río San Juan la clase *Gammaproteobacteria* se obtuvo en menor proporción por detrás del filo *Actinobacteria* y las clases *Betaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria*, similar a lo observado en el lago mesotrófico Bourget en Francia (Debroas *et al.*, 2009). Estas clases son abundantes en sistemas de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2011), particularmente los miembros de la clase *Alphaproteobacteria* son resistentes a la depredación por protozoos, son competitivos bajo condiciones de bajas concentraciones de nutrientes/sustratos disponibles y son capaces de degradar complejos compuestos orgánicos. En tanto, los miembros de la clase *Betaproteobacteria* crecen rápidamente, pueden desarrollarse en condiciones de altas concentraciones de nutrientes y presentan una vulnerabilidad tamaño-dependiente a la depredación por protozoos (Newton *et al.*, 2011). Se plantea que la clase *Betaproteobacteria* es numéricamente dominante en comparación con la clase *Alphaproteobacteria* en ecosistemas dulceacuícolas, según estudios que se han realizado utilizando la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), librerías de genes o la DGGE (Zwart *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012), esta última empleada en el presente estudio con similares resultados; sin embargo, cuando la comunidad bacteriana se analiza a través de la técnica de pirosecuenciación 454, varios autores coinciden en que la clase más abundante en ecosistemas dulceacuícolas poco contaminados es *Alphaproteobacteria* (Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Llirós *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2015; Inceoglu *et al.*, 2015) tal y como se observó en la presente investigación. Esta diferencia puede estar dada debido al amplificación preferencial de los microorganismos abundantes, lo cual ha sido descrito para ambas técnicas independientes de cultivo (Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Heinrich *et al.*, 2013; Navarro *et al.*, 2014). Sin embargo, se plantea que la pirosecuenciación brinda mayor información sobre la riqueza bacteriana en comparación con la DGGE (Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2014), por lo que se puede plantear que en el río San Juan la clase *Alphaproteobacteria* es más abundante que la clase *Betaproteobacteria.*

El filo *Actinobacteria* forma uno de los grupos dominantes dentro de las comunidades bacterianas de agua dulce y representa más del 70% del bacterioplancton de ríos y lagos distribuidos globalmente (Tang *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2011; Ghai *et al.*, 2014). La gran abundancia de este filo en ecosistemas acuáticos se relaciona con diferentes mecanismos que le permiten una supervivencia más exitosa en comparación con otros filos bacterianos. Por ejemplo, se ha observado que algunas actinobacterias pueden tener dos formas de nutrición: quimioheterótrofa y fotoheterótrofa, por lo que pueden obtener energía a través de los compuestos químicos y de la luz solar (Sharma *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2011). Otro mecanismo que favorece su supervivencia en ecosistemas acuáticos, es el pequeño tamaño

celular que presentan algunas actinobacterias (biovolumen celular <0,1 μm^3), lo cual incrementa el área de superficie por volumen, por lo que se facilita la adquisición eficiente de nutrientes (Ghai *et al.*, 2014). Además son resistentes a la luz ultravioleta, ya que se ha observado que la producción de pigmentos, así como su alto contenido de guanina y citocina (G+C) incrementa la protección contra los daños producidos por la luz ultravioleta (Warnecke *et al.*, 2005). Pueden captar de forma eficiente diferentes nutrientes, dentro de los que se incluyen: el fósforo (a través de la producción de exopolifosfatasas y la adquisición de inositol), el nitrógeno (mediante la degradación de cianoficina) y el carbono (a través de la utilización del xilano y de los productos de la degradación de la lignina) bajo condiciones oligotróficas o de escasa concentración de nutrientes (Ghai *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de todos estos mecanismos de protección, se ha observado que altas concentraciones de nutrientes contribuyen a la disminución de las actinobacterias (Newton *et al.*, 2011; McMahon y Read, 2013), lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos en este estudio donde las actinobacterias se obtuvieron en menor proporción en el río Almendares (mayores concentraciones de nutrientes) comparado con el río San Juan (menores concentraciones de nutrientes), y dentro del río Almendares, la estación Río Cristal (estación con menor contaminación) fue la que mostró mayor abundancia del filo *Actinobacteria*.

La disminución en la abundancia relativa del filo *Actinobacteria* con el aumento en la concentración de nutrientes, puede deberse a que un incremento significativo en la concentración de nutrientes puede influir directamente sobre la composición de las comunidades bacterianas, favoreciendo a aquellas bacterias que tengan la capacidad de consumir rápidamente estos compuestos (Grossart *et al.*, 2008), como es el caso de los representantes de la clase *Betaproteobacteria* o el filo *Bacteroidetes* (Newton *et al.*, 2011; Newton y McLellan, 2015) a diferencia de los miembros del filo *Actinobacteria* que son bacterias de lento crecimiento (Newton *et al.*, 2011). Por otra parte, el aumento en la concentración de nutrientes puede influir también indirectamente sobre las comunidades bacterianas, iniciando cambios en la composición del fitoplancton y la subsecuente producción de materia orgánica disuelta, lo cual crea condiciones que favorecen el crecimiento de algunas bacterias como los representantes del filo *Bacteroidetes* (Kent *et al.*, 2006). Por ejemplo, Parveen *et al*. (2013) y Ghai *et al*. (2014), observaron que la abundancia relativa de las actinobacterias disminuía durante los afloramientos de cianobacterias coloniales como las especies del género *Microcystis*. Este hecho puede deberse a que en condiciones de altas concentraciones de nutrientes (eutroficación), se producen los afloramientos de las cianobacterias y otros productores primarios, los cuales contribuyen con el incremento de la materia orgánica disuelta en la columna agua. Bajo estas condiciones, las aguas se tornan turbias y la concentración de oxígeno disuelto disminuye producto a los procesos de respiración y descomposición de la materia orgánica. Las actinobacterias son microorganismos aerobios, los cuales se afectan con

la disminución del oxígeno disuelto. Además se plantea, que es posible que la alta eficiencia de las actinobacterias, les impida competir bajo circunstancias de altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes inorgánicos, que se producen durante los afloramientos de las cianobacterias coloniales (Ghai *et al.*, 2014). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se puede explicar el efecto de las altas concentraciones de nutrientes sobre las actinobacterias no ha sido dilucidado.

Por otra parte, mediante la pirosecuenciación 454 se observó que tanto en el río Almendares como en el río San Juan, el filo *Actinobacteria* aumentaba con la disminución del filo *Bacteroidetes*, similar a lo observado por Read *et al*. (2015) en el área rural del río Támesis en el Reino Unido. Estos autores sugieren que la sucesión de *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* puede verse como una sucesión de bacterias estrategas r y estrategas K. Los órdenes *Flavobacteriales* y *Bacteroidales* pertenecientes al filo *Bacteroidetes*, están constituidos por microorganismos que se consideran de rápido crecimiento, con un corto ciclo de vida y que utilizan rápidamente los recursos disponibles (estrategas r), en cambio las actinobacterias de agua dulce se ha observado que crecen más lentamente y son más competitivas en comparación con otros filos, ya que tiene la capacidad de utilizar sustancias complejas y son más resistentes a los tóxicos (estrategas K) (Sharma *et al.*, 2009; Read *et al.*, 2015). Read *et al*. (2015) también apreciaron que la abundancia de *Actinobacteria* se incrementaba corriente abajo, tal y como ocurre en el río San Juan donde la estación Baños del San Juan presentó la mayor proporción de este filo (Figura 18), lo cual atribuyeron a que las estaciones corriente arriba se consideran ambientes con bajos niveles de competencia lo que favorece el desarrollo de los estrategas r; sin embargo, la competencia aumenta corriente abajo a medida que el número y complejidad de las bacterias acuáticas aumenta, lo que resulta en la aparición de los estrategas K, que son más competitivos.

En sistemas oligotróficos, donde existen bajas concentraciones de nutrientes y de sustratos orgánicos a partir de los organismos fototrofos, la entrada de carbono orgánico disuelto a partir de fuentes terrestres, se considera un importante suplemento de carbono para los microorganismos heterótrofos (Fujii *et al.*, 2011; Degerman *et al.*, 2013). Bajo estas condiciones, en las estaciones corriente arriba existen bajas concentraciones de microorganismos, los cuales dependen principalmente de la entrada de fuentes de carbono alóctonas; por lo que, aquellos microorganismos como los representantes del filo *Bacteroidetes* que tengan la capacidad de crecer y utilizar rápidamente los nutrientes a medida que llegan a las aguas, se verán favorecidos. En cambio, a medida que fluye el agua de las estaciones corriente arriba a las estaciones corriente abajo, las bacterias autóctonas del ecosistema tienen tiempo de desarrollarse y pueden competir con otros microorganismos por los nutrientes. Además, hacia las estaciones corriente abajo, con el aumento de la concentración de nutrientes y de los microorganismos, se incrementa la depredación por protozoos. Particularmente, algunas

actinobacterias de agua dulce presentan un pequeño tamaño, el cual se ha relacionado con su resistencia a la depredación por protozoos (Hahn, 2009; Jezbera *et al.*, 2009). En tanto, numerosos estudios han demostrado la susceptibilidad a la depredación de los miembros del filo *Bacteroidetes* (Schauer *et al.*, 2005; Newton *et al.*, 2011). Todos estos aspectos pudieran influir en la sucesión de *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* que se observó en el río San Juan.

En el río Almendares ocurre todo lo contrario, ya que *Actinobacteria* es más abundante en la estación Río Cristal (corriente arriba) y disminuye hacia las estaciones corriente abajo. Este hecho puede estar dado porque los estrategas K como las actinobacterias, están adaptados a condiciones más estables (ej: bajas concentraciones de nutrientes), donde el rápido crecimiento no es ventajoso; en cambio, los estrategas r como los microorganismos del filo *Bacteroidetes*, están adaptados a condiciones más inestables (condiciones de estrés ambiental como por ejemplo la contaminación), donde el crecimiento está limitado a pequeños periodos de tiempo y altas densidades poblacionales no pueden establecerse (Sigee, 2005). Bajo las condiciones de contaminación presente en las estaciones corriente abajo del río Almendares, la capacidad de los microorganismos estrategas r de crecer rápidamente y de explotar los recursos disponibles en la medida que estos aparecen puede ser una ventaja. De acuerdo con Odum (1988) y Molozzi *et al*. (2013), los ecosistemas responden a un incremento del estrés ambiental, mediante la reducción de las tramas tróficas, la disminución de la diversidad, el incremento en la proporción de estrategas r y la reducción en el tamaño celular de los organismos para mejorar el uso eficiente de los recursos. Por otra parte, algunos miembros del filo *Bacteroidetes*, son miembros de la microbiota intestinal del ser humano y animales de sangre caliente y pueden llegar a las aguas del río Almendares a partir de los vertimientos de aguas residuales domésticos, los cuales tienden a incrementar la contaminación fecal en las estaciones corriente abajo de Río Cristal.

Por otra parte en el río San Juan se observó que las actinobacterias no cultivables constituían el grupo bacteriano más abundante, lo cual coincide con los resultados presentados por Inceoglu *et al*. (2015) en el Lago Kivu (África); sin embargo, la disponibilidad únicamente de las secuencias del ADNr 16S, hace difícil la inferencia de sus características y de su posible función en estos ecosistemas.

Otra coincidencia entre la DGGE y la pirosecuenciación 454, es que no se encontraron secuencias de bacterias nitrificantes (ej: *Nitrosomonas* sp., sp., *Nitrosococcus* sp. o *Nitrobacter* sp.) en ninguno de los dos ríos, a pesar de detectarse altas concentraciones de nitratos en las estaciones del río Almendares y la estación Baños del San Juan del río San Juan. Este hecho puede estar dado por diferentes causas, entre las que se pueden mencionar: (1) las secuencias de corta longitud (~500 pb) que se obtienen a través de ambas técnicas en ocasiones no son suficientes para la correcta identificación bacteriana (Warnecke y Hugenholtz, 2007; Roh *et al.*, 2010), lo cual puede ser sustentado en este estudio por el hecho de que dentro del filo

Proteobacteria, específicamente en las clases *Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria* y *Alphaproteobacteria* a las que pertenecen los géneros antes mencionados, se encontraron en ambos ecosistemas secuencias que no pudieron ser identificadas hasta el nivel de familia (Tablas 10 y 11); (2) el proceso de nitrificación ocurre en dos pasos llevados a cabo por las bacterias oxidadoras de amonio (BOA) y las bacterias oxidadoras de nitritos (BON) (Chen *et al.*, 2010), algunas de estas bacterias tienden a ser restrictivas a ambientes particulares y dependen de determinadas propiedades físicas de estos ambientes pudiendo residir en la interfase óxica-anóxica donde la nitrificación se acopla con el proceso de la desnitrificación (Kowalchuk y Stephen, 2001). En la presente investigación las muestras de agua fueron tomadas de la superficie de ambos ecosistemas dulceacuícolas (~15 cm de profundidad) lo que pudo haber influido en el hecho de que no se detectaran estas bacterias nitrificantes. Se conoce que existe una relación sintrófica entre las BOA y las BON (Kowalchuk y Stephen, 2001), por lo que no haber encontrado ninguno de los dos grupos es un resultado congruente.

Otro aspecto a destacar, es que la familia *Enterobacteriaceae* (clase *Gammaproteobacteria*) no se encontró entre las más abundantes en el río Almendares (representó menos del 1%, Tabla 10) y no se encontraron secuencias correspondientes a la familia *Enterococcaceae* (clase *Bacilli*) a través de ninguna de las dos técnicas independientes de cultivo empleadas (Tabla 8 y Tabla 10). Dentro de estas dos familias, se encuentran los indicadores de contaminación fecal *E. coli* y *Enterococcus* sp., los cuales se encontraron en altas concentraciones en el río Almendares (10^1-10^6 UFC.100 ml^{-1} y 10^2-10^6 UFC.100 ml^{-1} para *E. coli* y enterococos respectivamente), resultados similares a los mostrados por Newton *et al*. (2013) y García-Armisen *et al*. (2014) en las aguas del Lago Michigan y el río Sena respectivamente. La baja abundancia relativa de estas bacterias en los ambientes acuáticos, incluso en aquellos donde existe una alta contaminación fecal, también se ha observado a través de los métodos dependientes de cultivo, donde para aislar a *E. coli* y a enterococos, se necesitan medios de cultivo selectivos, ya que en medios de cultivo generales, como el Agar para el conteo en placas o el Agar Nutriente, si se aíslan, representan una pequeña fracción de la población cultivable (Vaz-Moreira *et al.*, 2014). Además, en estos resultados pudieron influir, los cortos fragmentos de ADNr 16S que se obtienen mediante la DGGE y la pirosecuenciación 454, los cuales en muchos casos no permiten una identificación bacteriana precisa (Roh *et al.*, 2010; Vaz-Moreira *et al.*, 2011; Vaz-Moreira *et al.*, 2014).

A pesar de las coincidencias encontradas con ambas técnicas moleculares, se aprecian algunas diferencias, por ejemplo a través de la DGGE no se detectaron en el río Almendares bandas correspondientes al filo *Firmicutes*, el cual constituyó el cuarto filo más abundante detectado a través de la pirosecuenciación 454. Con respecto al filo *Chloroflexi* se identificó una banda en el río Almendares mediante la DGGE (Figura 10, Tabla 8), sin embargo a través de la pirosecuenciación 454 este filo representó menos del 0,01%. En el caso del río San Juan a

través de la DGGE no se obtuvieron bandas correspondientes a la clase *Alphaproteobacteria*, que dentro del filo *Proteobacteria* fue la más abundante en este ecosistema, lo cual se detectó a través de la pirosecuenciación 454 (Figura 18). Además los filos *Cyanobacteria, Bacteroidetes* y *Deinococcus-Thermus* que representaron el tercer, cuarto y sexto filos más abundantes a través de la pirosecuenciación 454 no se detectaron mediante la DGGE.

Por otra parte, los dendrogramas obtenidos a través de ambas técnicas en el periodo 2013 (Figura 9C, 11C, 14B y 19) presentan también algunas diferencias en cuanto a los grupos que se forman. Las diferencias entre estas dos técnicas independientes de cultivo están dadas porque la DGGE sólo captura una pequeña fracción de todas las especies microbianas presentes en los ecosistemas naturales, específicamente las poblaciones dominantes de las comunidades bacterianas (Ramette, 2009; Litchman, 2010; Liu *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2015). Además en la DGGE, puede ocurrir comigración de las bandas, por lo que una sola banda puede estar formada por más de una especie y puede suceder también que dos bandas correspondan a una misma especie teniendo en cuenta la variabilidad en el número de copias del gen ADNr 16S (Berdjeb *et al.*, 2011a). Otra desventaja que se puede presentar es la subjetividad para decidir si una banda débil en la DGGE es realmente una banda o un artefacto de fondo de la técnica (Berdjeb *et al.*, 2011a). Todo lo antes expuesto es importante para determinar la presencia/ausencia de las bandas, necesaria para la construcción de los dendrogramas. En tanto, la pirosecuenciación 454 permite una representación más precisa de la abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en un ambiente dado, lo que resulta en una mejor estimación de la biodiversidad bacteriana, al ser identificados no solo las poblaciones abundantes, sino también las menos frecuentes (Huse *et al.*, 2008; Matcher *et al.*, 2011; Pedrós-Alió, 2012; Zhong *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de las limitaciones de la DGGE, esta es una técnica rápida y más económica que la pirosecuenciación 454, que permite detectar cambios en la comunidad bacteriana y puede brindar una buena perspectiva microbiana con una resolución filogenética media en los ecosistemas acuáticos en el tiempo (Liu *et al.*, 2012). Es por esto que en la presente investigación se utilizó la DGGE para analizar la variabilidad espacio-temporal de las comunidades bacterianas en los ríos Almendares y San Juan durante los dos años de muestreo, y la pirosecuenciación 454 se empleó como método complementario en el periodo 2013 para obtener una información taxonómica más precisa del bacterioplancton de estos ecosistemas, teniendo en cuenta que es en este año donde se detectaron los mayores valores de temperatura en las estaciones del río Almendares y los mayores valores de precipitaciones en las estaciones del río San Juan.

A partir de la pirosecuenciación 454 en el periodo 2013, se identificó en cada una de las estaciones de muestreo de los ríos Almendares y San Juan la composición de las comunidades bacterianas hasta el nivel de familia. Entre las estaciones del río Almendares se identificaron un total de 73 familias, aunque de ellas solo se observó el predominio de diez (Tabla 10). En tanto,

entre las estaciones del río San Juan se identificaron un total de 60 familias entre las que predominaron doce (Tabla 11). En ambos ríos se observó una gran cantidad de familias que forman parte de la “biosfera rara”, término referido anteriormente por otros autores como Pedrós-Alió (2006) y Sogin *et al*. (2006) que se atribuye a aquellos microorganismos que no son muy abundantes en los ecosistemas, pero que realizan funciones específicas dentro de los ciclos biogeoquímicos. Resultados similares fueron obtenidos por Inceoglu *et al*. (2015) quienes en el lago meromíctico tropical Kivu (África) observaron un gran número de especies raras. Estos autores sugieren que aunque anteriormente se pensaba que las especies abundantes eran las más activas e importantes en los ciclos biogeoquímicos, ellas solo contribuyen con una pequeña proporción a la diversidad microbiana. Se plantea que la diversidad microbiana está formada por dos fracciones: las especies abundantes y las especies raras (Galand *et al.*, 2009; Pedrós-Alió, 2012). Estas últimas han podido ser determinadas dentro de las comunidades microbianas debido a la implementación de técnicas de nueva generación de secuencias tales como la pirosecuenciación 454 (Pedrós-Alió, 2012). En el presente estudio se pudo observar que las especies raras eran más inestables en el tiempo en comparación con las especies abundantes y que en muchos casos sólo se presentaban en una sola estación de muestreo dentro de cada río, similar a lo obtenido por Inceoglu *et al*. (2015) en el lago Kivu (África). Estos autores observaron que las especies abundantes mostraban una mínima variabilidad temporal, mientras que las especies raras mostraban mayores fluctuaciones entre las estaciones del año.

Tomando en consideración las familias que predominaron en ambos ríos (señaladas en gris en las Tablas 10 y 11), sólo se observó coincidencias en cinco familias pertenecientes a los filos *Actinobacteria* (*Microbacteriaceae* y *Mycobacteriaceae*), *Firmicutes* (*Bacillaceae*) y *Proteobacteria* (*Sphingomonadaceae* y *Moraxellaceae*), aunque no se obtuvieron en igual proporción en los dos ecosistemas dulceacuícolas. Este resultado podría indicar que los miembros de estas familias son ubicuos y que pueden encontrarse en diferentes áreas o regiones. Por ejemplo las familias *Bacillaceae* y *Microbacteriaceae* fueron las más abundantes en el río Mississippi (Staley *et al.*, 2013); y en el río Támesis, *Microbacteriaceae* fue una de las familias predominantes (Read *et al.*, 2015). Los miembros de la familia *Microbacteriaceae* pueden encontrase en el suelo, el agua o la piel de los mamíferos, pueden degradar algunos herbicidas y pesticidas y son probablemente importantes en la mineralización y asimilación de moléculas orgánicas (Nawel *et al.*, 2011; Adegboye y Babalola, 2012). En el caso de la familia *Mycobacteriaceae*, se ha observado que algunos de sus miembros pueden degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular. Estos microorganismos han sido aislados de sedimentos de agua dulce contaminados y no contaminados en diferentes regiones geográficas (Sho *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007; DeBruyn *et al.*, 2012). Las especies del género *Mycobacterium* pertenecientes a la familia *Mycobacteriaceae* pueden además degradar lípidos y polisacáridos (Kragelund *et al.*, 2007) y pueden ser patógenos

oportunistas como es el caso de las micobacterias atípicas o patógenos primarios como *Mycobacterium tuberculosis* (Bibby et al., 2010).

Dentro de la familia *Bacillaceae* se encuentra el género *Bacillus*, cuyos miembros tienen la capacidad de formar esporas, lo cual les confiere resistencia a la radiación, la desecación y los químicos, pudiendo sobrevivir bajo condiciones adversas por periodos prolongados; además estas esporas pueden viajar largas distancias, incluso entre continentes, utilizando las corrientes de aire (Kellogg y Griffin, 2006; Smith *et al.*, 2013), lo que justifica su presencia en diferentes áreas geográficas. Los miembros de esta familia han sido aislados de diferentes ambientes como son: suelo, aire, sedimentos, ecosistemas dulceacuícolas y marinos, así como del ser humano (Mandic-Mulec *et al.*, 2015). Numerosas especies de *Bacillus* sp. son capaces de degradar la celulosa, hemicelulosa y la pectina, lo cual sugiere que están involucrados en la degradación y mineralización de plantas y sustancias húmicas procedentes de los suelos; además desempeñan importantes funciones en el ciclo del nitrógeno (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

La familia *Sphingomonadaceae* perteneciente a la clase *Alphaproteobacteria*, se ha encontrado en diferentes ambientes y es abundante en ecosistemas de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). Esta familia incluye numerosas bacterias fisiológicamente diferentes, tales como degradadores de compuestos aromáticos y fototrofos anoxigénicos (Kim *et al.*, 2007). Además se ha visto que los miembros de esta familia pueden degradar las hepatotoxinas cianobacterianas producidas por las cianobacterias durante sus afloramientos (Berg *et al.*, 2009). Por otro parte, los miembros de la familia *Moraxellaceae* pertenecientes a la clase *Gammaproteobacteria*, pueden ser aislados del agua o el suelo y se han encontrado con frecuencia en aguas residuales, específicamente el género *Acinetobacter* que forma parte de esta familia (Ponce-Terashima *et al.*, 2014), lo cual se comprobó en el presente estudio ya que en el río Almendares, un ecosistema contaminado con aguas residuales, la familia *Moraxellaceae* fue la más abundante representando el 31,5 % de las secuencias detectadas; en tanto, en el río San Juan esta familia solo representó el 3,9 % de las secuencias. Las especies del género *Acinetobacter* son capaces de acumular fosfatos en forma de polifosfatos y pueden tener potencialidades en la remoción biológica de los fosfatos (Doughari *et al.*, 2011).

Entre las familias que predominaron solamente en uno de los ríos evaluados se encuentran: *Flavobacteriaceae*, Familia XII *Bacillales Incertae sedis*, *Comamonadaceae, Pseudomonadaceae* y *Xanthomonadaceae* en el río Almendares (Tabla 10) y *Micrococcaceae, Nocardioidaceae, Sphingobacteriaceae, Chroococcales Incertae sedis*, *Deinococcaceae, Caulobacteraceae* y *Burkholderiaceae* en el río San Juan (Tabla 11). Aunque con excepción de la familia *Deinococcaceae*, el resto se encontró en los dos ecosistemas acuáticos, por lo que también se consideran bacterias ubicuas.

Los miembros de la familia *Flavobacteriaceae* son quimiorganotrofos aerobios y descomponen un gran número de polisacáridos con excepción de la celulosa (Bernardet y Nakagawa, 2006). Los miembros del género *Flavobacterium,* perteneciente a la familia *Flavobacteriaceae*, se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, agua dulce y ambientes salinos y toleran un amplio rango de salinidad (Bernardet y Bowman, 2006), lo cual se observó particularmente en las estaciones Paila y Puente de Hierro (elevada conductividad eléctrica y sólidos totales disueltos) en el río Almendares donde se obtuvieron numerosas secuencias pertenecientes a la familia *Flavobacteriaceae*. Al igual que los miembros de la familia *Sphingomonadaceae* pueden degradar las hepatotoxinas cianobacterianas producidas durante los afloramientos (Berg *et al.*, 2009) y se ven favorecidos en condiciones de altas concentraciones de nutrientes (Newton *et al.*, 2011). En el caso de la familia XII *Bacillales Incertae sedis* (de clasificación desconocida) (De Vos *et al.*, 2009), a ella pertenecen los miembros del género *Exiguobacterium*. Las especies de este género han sido aisladas o detectadas molecularmente, en un amplio rango de hábitats que incluyen ambientes fríos y calientes con temperaturas que van desde los -12 ºC hasta los 55 ºC (Vishnivetskaya *et al.*, 2009). Además tienen potencialidades únicas que los hacen interesantes para aplicaciones en la biotecnología, la biorremediación, la industria y la agricultura, como por ejemplo pueden reducir el Cromo (VI) en un amplio rango de temperatura, pH y concentraciones de sales (Okeke *et al.*, 2007), pueden neutralizar aguas residuales de la industria textil, altamente alcalinas (Kumar *et al.*, 2006), muestran potencialidades en la remoción de pesticidas (Lopez *et al.*, 2005) y son capaces de reducir el arsenato a arsenito (Anderson y Cook, 2004). Precisamente en un humedal natural del río Almendares se obtuvo una cepa perteneciente al género *Exiguobacterium*, aislada de la rizosfera de *Typha dominguensis* (cola de gato), con potencialidades en la remoción de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y resistencia a elevadas concentraciones de metales pesados (Salgado, 2012).

Los miembros de la familia *Comamonadaceae* se encuentran distribuidos globalmente en ecosistemas de agua dulce y son particularmente abundantes en ríos con altos niveles de contaminación orgánica como los ríos Spittelwasser y Cértima en Alemania y Portugal respectivamente (Brümmer *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2012) y el río Almendares en el presente estudio. Mukherjee *et al*. (2013) sugirieron que los miembros de la familia *Comamonadaceae* pueden ser indicadores de eutroficación ya que los géneros *Hydrogenophaga*, *Comamonas* y *Acidovorax*, son bien conocidos por la utilización de un amplio espectro de fuentes de carbono y pueden reducir nitratos en ambientes eutróficos. Esta familia perteneciente a la clase *Betaproteobacteria* es fisiológicamente heterogénea e incluye autótrofos, heterótrofos y quimiolitótrofos que utilizan el hidrógeno (Assis *et al.*, 2015). Algunos de sus miembros pueden degradar hepatotoxinas cianobacterianas como las microcistinas y las

nodularinas (Rapala *et al.*, 2005; Lymperopoulou *et al.*, 2012) y otros como los miembros del género *Acidovorax* son metilotrofos (Kalyuzhnaya *et al.*, 2008).

La familia *Pseudomonadaceae* se encuentra mundialmente distribuida en diferentes ambientes como el suelo y ecosistemas dulceacuícolas (Hahn, 2006). Las pseudomonas conjuntamente con especies de la familia *Enterobacteriaceae* pueden encontrase de forma libre o asociadas a biopelículas en los ambientes altamente contaminados con materia fecal (Muniesa *et al.*, 2011). Las pseudomonas tienen un metabolismo respiratorio obligado, aunque algunas pueden crecer en condiciones anóxicas con nitrato, fumarato u otro aceptor de electrones que soporte la respiración anaerobia (Madigan *et al.*, 2012). Las especies del género *Pseudomona*s se caracterizan por poseer un alto grado de adaptabilidad fisiológica y genética, de esta forma pueden degradar compuestos aromáticos (Alfreider y Vogt, 2007), resistir altas concentraciones de metales (Teitzel y Parsek, 2003), degradar compuestos orgánicos complejos como el poli-vinil-alcohol o el polipropileno (Cacciari *et al.*, 1993; Shimao, 2001), pueden reducir el Hierro (III) (Sikora *et al.*, 2011) y pueden reducir nitrato (Medihala *et al.*, 2012). Además, la especie *Pseudomonas aeruginosa* se utiliza como indicador de contaminación en aguas destinadas a uso recreativo, debido a su persistencia aún cuando otros indicadores se encuentran en bajas concentraciones o están ausentes (Mena y Gerba, 2009). Toda esta versatilidad, así como la contaminación fecal en el río Almendares, puede justificar la abundancia de la familia *Pseudomonadaceae* en este ecosistema. Por otra parte, dentro de la familia *Xanthomonadaceae* se encuentran las especies del género *Stenotrophomonas*, las cuales toleran altas concentraciones de amonio y su abundante presencia en ecosistemas de agua dulce se ha asociado a altas concentraciones de materia orgánica derivadas de los escurrimientos del suelo y las actividades antropogénicas (Piccini *et al.*, 2006; Chauhan *et al.*, 2009). Se ha observado además, que las especies de este género predominan en las heces de puercos y pollos y son patógenos oportunistas humanos (Drancourt *et al.*, 1997), por lo que su posible presencia como miembro de la familia *Xanthomonadaceae* en el río Almendares puede derivarse de los vertimientos de aguas residuales procedentes de corrales de animales presentes en los alrededores de este ecosistema.

Las características que presentan los miembros de las familias predominantes en el río Almendares los hacen potencialmente deseables para la recuperación ambiental de este ecosistema. Se plantea que la determinación de la diversidad microbiana debe realizarse como primer paso en los procesos de recuperación ambiental, para entender el papel fundamental de los microorganismos responsables de los ciclos biogeoquímicos y como sensores de cambios ambientales, centrando al mismo tiempo su valor como fuente abundante de recursos biotecnológicos (Newton *et al.*, 2011), por lo que el presente trabajo constituye un aporte para las futuras acciones de recuperación que se lleven a cabo en el río Almendares.

Entre las familias que predominaron solamente en el río San Juan se encuentra la familia *Micrococcaceae*, la cual está compuesta por bacterias con metabolismo respiratorio y/o fermentativo pudiendo utilizar carbohidratos y/o aminoácidos como sustratos. Los miembros de esta familia se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo, el agua y la piel de los mamíferos y son importantes en la mineralización y asimilación de compuestos orgánicos (Adegboye y Babalola, 2012). En particular el género *Micrococcus* incluye bacterias Gram positivas que se han aislado de diferentes ambientes (Manzari *et al.*, 2015). Otro género de esta familia, *Arthrobacter*, ha sido relacionado con el ciclo del nitrógeno, particularmente con la fijación de nitrógeno (Adrados *et al.*, 2014). En el caso de la familia *Nocardioidaceae*, las especies pertenecientes al género *Nocardioides* se han aislado de diferentes ambientes como son plantas, aguas subterráneas, organismos de suelos y agua dulce y de ambientes marinos (Tóth *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2013). Estos microorganismos pueden reducir el nitrato a dinitrógeno gaseoso y producen numerosas enzimas extracelulares como fosfatasas, esterasas, leucina-aminopeptidasa, entre otras, importantes en la asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno (Cho *et al.*, 2013).

Los miembros de la familia *Sphingobacteriaceae* se han detectado en numerosos ecosistemas de agua dulce (Zwart *et al.*, 2002) y pueden estar asociados a partículas, desempeñando un importante papel en la degradación de biopolímeros complejos (Newton *et al.*, 2011). Estas bacterias pueden utilizar distintas fuentes de carbono que incluyen: D-ribosa, D-xylosa, sacarosa, D-arabinosa, celobiosa, fructosa, lactosa, D-manosa y D-galactosa (Liebner *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2013) y producen numerosas enzimas extracelulares como son: N-acetil-β-glucosaminidasa, fosfatasa ácida y alcalina, cistina-aminopeptidasa, esterasa, esterasa lipasa, β-galactosidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, leucina-aminopeptidasa, entre otras (Choi y Lee, 2012).

Los representantes del orden *Chroococcales*, pertenecen al filo *Cyanobacteria* y son componentes fundamentales de las comunidades de agua dulce, desempeñando un papel importante en los ciclos biogeoquímicos (Callieri, 2007). Estas cianobacterias proporcionan la mayor parte de la producción primaria en los ecosistemas acuáticos (Pajares *et al.*, 2012) y constituyen los representantes más pequeños del picoplancton autotrófico, los cuales predominan en todos los ecosistemas marinos y dulceacuícolas (Callieri *et al.*, 2012; Parfenova *et al.*, 2013). Los géneros de picocianobacterias dominantes en ecosistemas dulceacuícolas son *Cyanobium* y *Synechococcus* (Callieri *et al.*, 2012) y se ha confirmado en diferentes estudios realizados en lagos, que la concentración de picocianobacterias se incrementa con la disminución en la concentración de nutrientes, lo cual se observó en las estaciones Presa El Palmar y Presa San Juan (Río San Juan) y Río Cristal (Almendares), que mostraron las menores concentraciones de nutrientes y la mayor abundancia relativa de *Synechococcus* sp. Este hecho puede ser explicado debido a la alta afinidad que tiene *Synechococcus* sp. por el

ortofosfato, donde a bajas concentraciones de fosfato inorgánico, puede utilizar fuentes orgánicas de este nutriente. Además, bajo condiciones de escasas concentraciones de fosfato, pueden sustituir este nutriente por sulfato en los lípidos, produciendo sulfolípidos en lugar de fosfolípidos (Callieri, 2007; Callieri *et al.*, 2012). Además, se plantea que la abundancia de las picocianobacterias puede variar con el tiempo (Callieri *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014), como se observó en las estaciones del Río San Juan en los meses de febrero y abril 2013 donde fueron más abundantes en comparación con el mes de julio 2013 (Figura 18). Resultados similares se han obtenido en lagos de clima templado, donde se ha observado que la abundancia de las picocianobacterias muestra un patrón bimodal, obteniéndose las mayores concentraciones en primavera y otoño (Stockner *et al.*, 2000). Muchas veces se ha asociado la presencia de cianobacterias (ejemplo: *Microcystis* sp. y *Anabaena* sp.) con altas concentraciones de nutrientes (condiciones eutróficas), sin embargo *Synechococcus* sp. se ha aislado de diferentes ecosistemas acuáticos con diferentes estados tróficos, tal y como se observó en la presente investigación. Este hecho se ha atribuido a la adquisición de un número variable de genes por transmisión horizontal localizados en una isla genómica altamente variable, lo cual les confiere una gran adaptabilidad a diferentes nichos ecológicos (Dufresne *et al.*, 2008).

La familia *Deinococcaceae* se caracteriza porque sus miembros son resistentes a la desecación y a la radiación y son termófilos (Ahmed *et al.*, 2014). El género *Deinococcus*, pertenece a esta familia, el cual ha sido aislado de sitios radiactivos (Asker *et al.*, 2011), suelos contaminados con radiación (Wang *et al.*, 2010), desiertos (Yuan *et al.*, 2009), lodos activados (Srinivasan *et al.*, 2012), suelos (Cha *et al.*, 2014), agua y manantiales termales (Kämpfer *et al.*, 2008), muestras de aire (Yoo *et al.*, 2010), peces (Shashidhar y Bandekar, 2009), el intestino de las termitas (Chen *et al.*, 2012) y reservas naturales de agua dulce (Wang *et al.*, 2015). Los miembros de este género son cocos aerobios estrictos, no mótiles, asporógenos, producen pigmentos amarillo, rojo, naranja, o rosado (Ahmed *et al.*, 2014) y pueden reducir el Hierro (III) y el nitrato (Im *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2012). Además son resistentes a las especies reactivas del oxígeno (Slade y Radman, 2011). Por todas estas características resulta interesante su hallazgo en la estación Presa San Juan del río San Juan, teniendo en cuenta que la familia *Deinococcaceae* no es muy abundante en ecosistemas dulceacuícolas (Logue *et al.*, 2008). Se ha observado que estos microorganismos pueden degradar contaminantes nucleares y sustancias tóxicas como los hidrocarburos clorinados (Fredrickson *et al.*, 2000; Govender *et al.*, 2011), por lo que pueden ser utilizados en la biorremediación.

Los representantes de la familia *Caulobacteraceae* se han asociado con la presencia de cianobacterias (Berg *et al.*, 2009), tal y como se observó en el presente estudio en las estaciones Presa El Palmar y Presa San Juan del río San Juan, donde ambas familias fueron abundantes (Tabla 11). Los miembros de la familia *Caulobacteraceae* pueden promover o inhibir los afloramientos de algunas cianobacterias a través de diferentes tipos de interacciones

como la recirculación de nutrientes y la producción de compuestos que inhiben el crecimiento o que lisan las células (Berg *et al.*, 2009). Se caracterizan por ser aeróbicos, quimiorganotrofos, tienen un alto grado de versatilidad metabólica (Gray y Engel, 2013) y se encuentran con frecuencia en ecosistemas dulceacuícolas oligotróficos asociados a partículas (Newton *et al.*, 2011; Bižic-Ionescu *et al.*, 2014). La característica fundamental de esta familia es la presencia de una prosteca que evita el hundimiento en zonas anóxicas donde no podrían respirar (Madigan *et al.*, 2012).

Entre los miembros de la familia *Burkholderiaceae*, se encuentra el género *Polynucleobacter*, el cual se halla en abundancia en ecosistemas dulceacuícolas de diferentes zonas climáticas y con diferentes características tróficas (Hahn, 2003; Wu y Hahn, 2006; Watanabe *et al.*, 2009). Este género es el único dentro de la familia *Burkholderiaceae* cuyos miembros tienen un estilo de vida planctónico, ya que el resto de los representantes de esta familia, o bien son bacterias encontradas en los suelos o se encuentran asociados a plantas o a animales (Hahn *et al.*, 2012). Las especies del género *Polynucleobacter* se caracterizan por ser aerobios, quimioheterótrofos, resistentes al estrés oxidativo, algunos pueden ser simbiontes obligados como es el caso de *Polynucleobacter necessarius* subespecie *necessarius,* endosimbionte del ciliado *Euplotes aediculatus,* y otros son bacterias de vida libre (*Polynucleobacter necessarius* subespecie *asymbioticus*) (Hahn *et al.*, 2009; Hahn *et al.*, 2012). Además pueden utilizar como fuente de carbono los ácidos carboxílicos con dos a cinco átomos de carbono, el acetato, el piruvato y el succinato, y como fuente de nitrógeno pueden emplear urea, nitrato o nitrito. Como fuente de azufre pueden emplear tiosulfato o sulfato (Hahn *et al.*, 2012). Se ha informado que los miembros del género *Polynucleobacter* pueden utilizar fuentes de materia orgánica alóctona, como por ejemplo, los productos fotooxidados de sustancias húmicas en ecosistemas oligotróficos (Watanabe *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2011; Hahn *et al.*, 2012). Este hecho pudiera favorecer su abundancia en las estaciones del río San Juan, cuyos suelos circundantes presentan sustancias húmicas que pueden ser fotooxidadas hasta sustancias de bajo peso molecular como el piruvato, acetato o el succinato que son utilizadas como fuentes de carbono y energía por las especies de *Polynucleobacter* sp.

Las poblaciones bacterianas predominantes en los ecosistemas dulceacuícolas analizados en la presente investigación, así como aquellas menos frecuentes, desempeñan una importante función en los ciclos biogeoquímicos, tal y como se muestra en las Figuras 25, 26 y 27, donde se representan los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre respectivamente, y las funciones potenciales que se conocen de los diferentes órdenes identificados en los ríos Almendares y San Juan con respecto a estos ciclos.

En el río Almendares, aunque las reacciones en presencia de oxígeno pueden ocurrir en la superficie, en el resto de la columna de agua se ven más favorecidas las reacciones en anaerobiosis debido a las bajas tensiones de oxígeno que presentan las estaciones de este

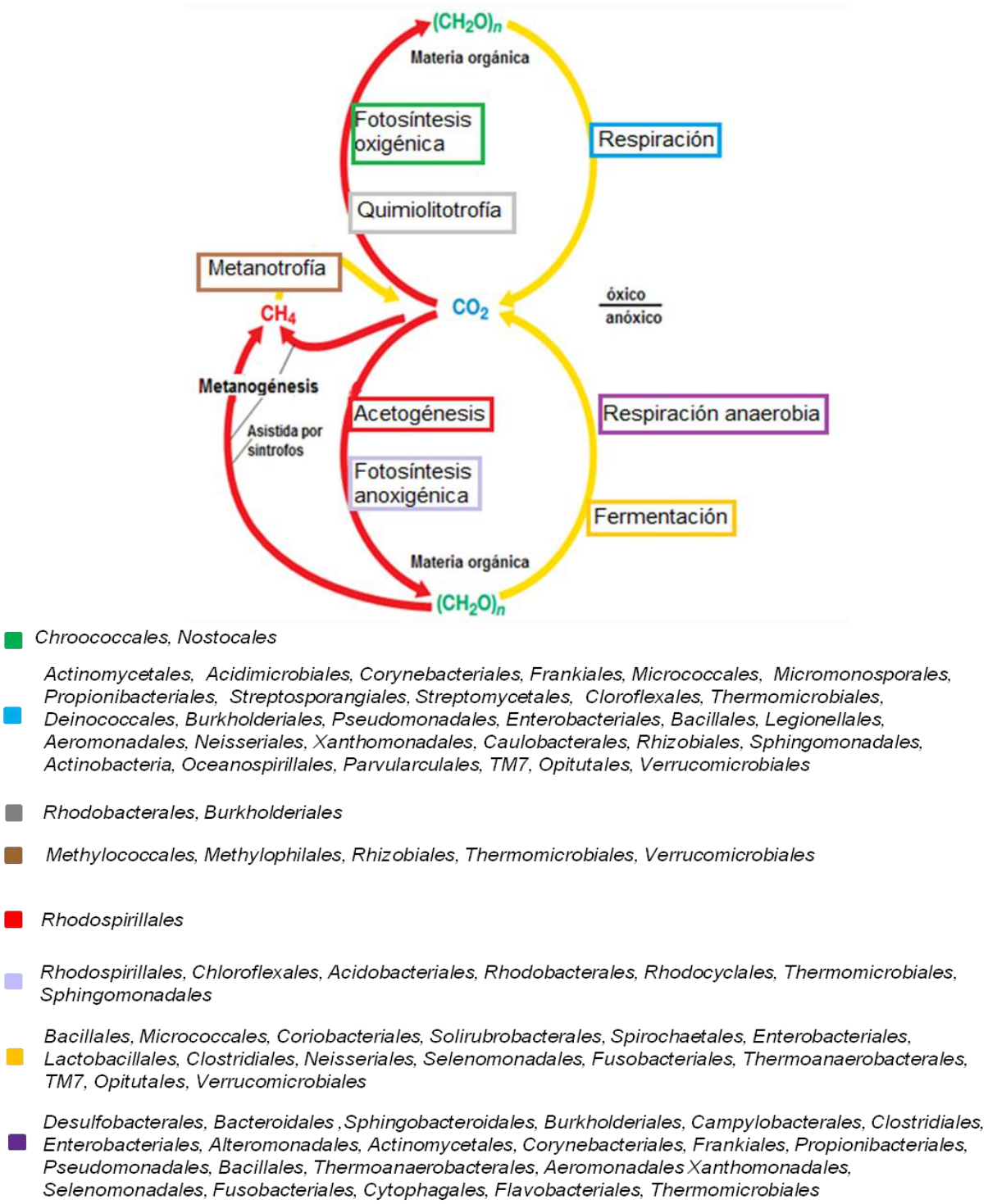


Figura 25. Ciclo del carbono y funciones potenciales de los órdenes identificados en los ríos Almendares y San Juan. Adaptado de Madigan *et al*. (2012). Las flechas amarillas indican las reacciones de oxidación y las flechas rojas indican las reacciones de reducción. Los cuadros en colores al lado de los órdenes bacterianos representan los diferentes procesos realizados por estos microorganismos en el ciclo biogeoquímico del carbono.

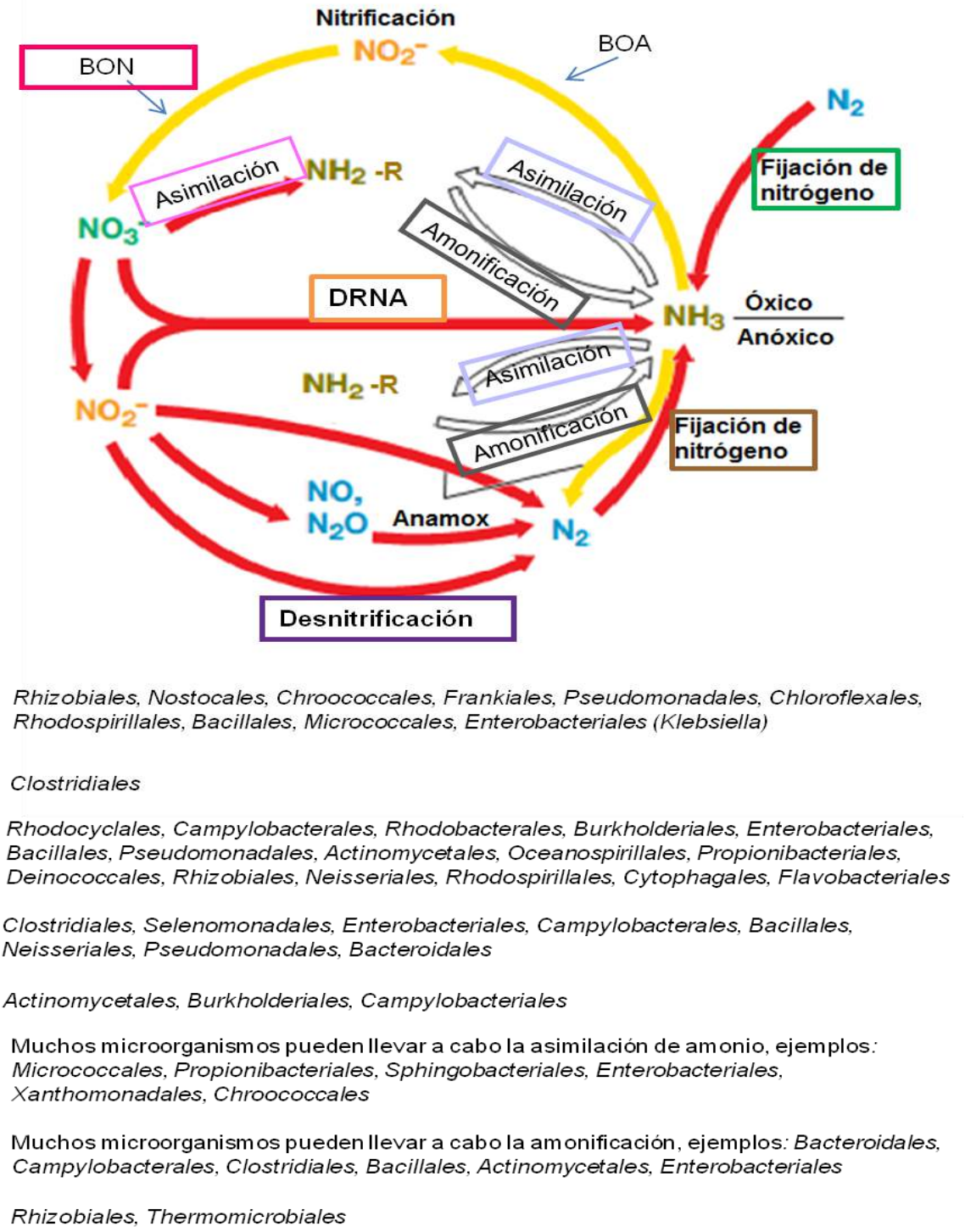


Figura 26. Ciclo del nitrógeno y funciones potenciales de los órdenes identificados en los ríos Almendares y San Juan. Adaptado de Madigan *et al.* (2012). Las flechas amarillas indican las reacciones de oxidación y las flechas rojas indican las reacciones de reducción. Las flechas en blanco indican las reacciones que ocurren sin cambios redox. Los cuadros en colores al lado de los órdenes bacterianos representan los diferentes procesos realizados por estos microorganismos en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. BON: Bacterias oxidadoras de nitrito; BOA: Bacterias oxidadoras de amonio; DRNA: Desasimilación reductiva del nitrato a amonio.

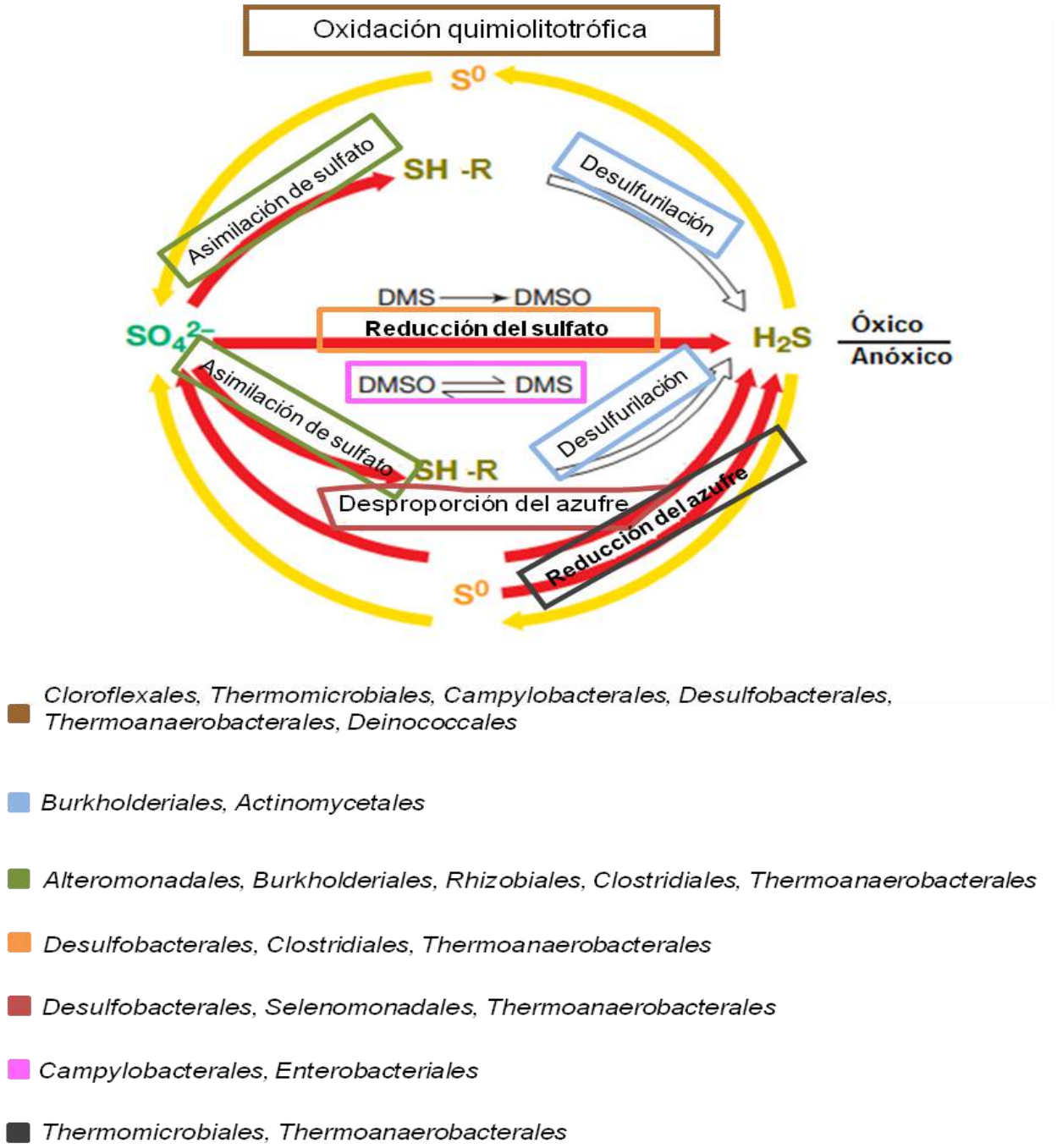


Figura 27. Ciclo del azufre y funciones potenciales de los órdenes identificados en los ríos Almendares y San Juan. Adaptado de Madigan *et al*. (2012). Las flechas amarillas indican las reacciones de oxidación y las flechas rojas indican las reacciones de reducción. Las flechas en blanco indican las reacciones que ocurren sin cambios redox. Los cuadros en colores al lado de los órdenes bacterianos representan los diferentes procesos realizados por estos microorganismos en el ciclo biogeoquímico del azufre. DMS: dimetil sulfuro; DMSO: dimetil sulfóxido.

ecosistema producto de la contaminación química y fecal. De esta forma muchos microorganismos pueden utilizar compuestos inorgánicos como el nitrato o el sulfato para llevar a cabo la respiración anaerobia, acoplándose así los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre. En cambio en el río San Juan, un ecosistema óxico, se ven favorecidas las reacciones en aerobiosis, aunque las reacciones en anaerobiosis pueden ocurrir en las capas más profundas de la columna de agua y los sedimentos donde hay menores tensiones de oxígeno o en la parte más madura de las biopelículas adheridas a la materia particulada suspendida, ya que se ha detectado la ocurrencia de metanogénesis, fijación de nitrógeno y producción de sulfuro de hidrógeno, reacciones que ocurren bajo condiciones anóxicas, en las partículas de materia orgánica suspendidas en ecosistemas acuáticos óxicos (Davey y O´Toole, 2000).

Con respecto a los ciclos del carbono y el nitrógeno llevados a cabo en ambos ríos (Figuras 25 y 26), no se detectaron microorganismos con potencialidades para la sintrofía, la metanogénesis o la oxidación anaeróbica del amonio (ANAMOX), lo cual pudiera estar dado porque estos microorganismos son anaerobios estrictos y están presentes en las capas más profundas de la columna de agua o en los sedimentos, y en este estudio la toma de la muestra se realizó a 15 cm de profundidad (aguas superficiales). Además, particularmente la metanogénesis es llevada a cabo sólo por arqueas anaerobias (Madigan *et al*., 2012), y la presente investigación se centró solamente en las comunidades pertenecientes al dominio *Bacteria*. Tampoco se detectaron bacterias nitrificantes, lo cual pudo estar dado porque algunas de estas bacterias tienden a ser restrictivas a ambientes particulares y dependen de determinadas propiedades físicas de estos ambientes pudiendo residir en la interfase óxica-anóxica donde la nitrificación se acopla con el proceso de la desnitrificación (Kowalchuk y Stephen, 2001).

De esta forma, la identificación de los miembros de las comunidades bacterianas de los ríos Almendares y San Juan hasta el nivel de familia, constituye un nuevo informe para la región del Caribe, notificándose la presencia de 44 órdenes y 73 familias en el río Almendares y 38 órdenes y 60 familias en el río San Juan, de los cuales 43 familias constituyen nuevos informes para ecosistemas dulceacuícolas del Caribe. En el V Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica de la República de Cuba (CITMA, 2014), se plantea la necesidad de incrementar los conocimientos acerca de la diversidad biológica; por lo que los resultados que aquí se presentan constituyen un aporte al conocimiento de la diversidad bacteriana de ecosistemas dulceacuícolas cubanos, lo que pudiera permitir una mejor conservación de estos ambientes, así como el empleo de las potencialidades de la microbiota presente, en la recuperación y preservación de estos ecosistemas. Además por primera vez para el Caribe insular se analiza la comunidad bacteriana de un ecosistema dulceacuícola de una Reserva de

Biosfera, como Sierra del Rosario, lo cual contribuye al incremento del valor biológico de esta área protegida.

4.4. Relación entre la composición de las comunidades bacterianas y los indicadores físico-químicos y de contaminación fecal en los ríos Almendares y San Juan

En el río Almendares el factor que más contribuyó a la variabilidad de la composición del bacterioplancton fue la contaminación fecal, lo cual se evidenció a través de los indicadores bacterianos *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes y enterococos y los indicadores químicos amonio y fosfato. Estos indicadores fueron notablemente elevados en la estación Paila durante el periodo febrero-junio 2013 y las clases bacterianas que se relacionaron con la contaminación presente en el río fueron *Gammaproteobacteria, Flavobacteria, Fusobacteria, Bacteroidia, Coriobacteria, Epsinloproteobacteria, Negativicutes* y *Clostridia* (Figura 20). Algunos microorganismos pertenecientes a las clases bacterianas mencionadas pueden utilizar el nitrato como aceptor final de electrones en la respiración anaerobia (Figura 25), ocurriendo el proceso de desasimilación reductiva del nitrato a amonio (Figura 26), lo cual contribuye al acoplamiento de los ciclos del carbono y el nitrógeno en el río Almendares en condiciones anóxicas. Fundamentalmente, estos microorganismos provienen del suelo y de los vertimientos de aguas residuales de origen doméstico que llegan continuamente a las aguas de este río, por lo que se consideran contaminantes. Dentro de la clase *Gammaproteobacteria* se encuentran los coliformes termotolerantes y *E. coli* empleados como indicadores de contaminación fecal debido a su abundante presencia en el tracto gastrointestinal del ser humano y animales de sangre caliente (Field y Samadpour, 2007) y el género *Acinetobacter*, el cual constituye el componente más abundante de las aguas residuales (Newton *et al.*, 2013). Este género pertenece a la familia *Moraxellaceae*, la cual se detectó con una abundancia relativa alta en el presente estudio. De igual forma las familias *Prevotellaceae* perteneciente a la clase *Bacteroidia, Clostridiaceae, Lachnospiraceae* y *Ruminococcaceae* pertenecientes a la clase *Clostridia* y *Veillonellaceae* perteneciente a la clase *Negativicutes* se encuentran en las heces de varios animales y el ser humano y han sido detectados con frecuencia en aguas residuales y ríos contaminados con estas aguas, como el río Michigan en Estados Unidos (Newton *et al.*, 2013; Newton *et al.*, 2015). Washington *et al*. (2013) propusieron un modelo conceptual en el que agrupan a las bacterias representadas en las comunidades de biopelículas bacterianas en cuatro grupos ecológicos: ubicuas, regionales, bacterias en su estado natural y bacterias relacionadas con el impacto. Dentro del último grupo se encuentran los miembros de las comunidades de biopelículas bacterianas asociados con los efectos de las actividades antropogénicas; por lo que las clases bacterianas asociadas con la contaminación fecal en el río Almendares pertenecen a este grupo, cuya abundancia relativa es elevada en ecosistemas contaminados.

Las clases *Bacilli, TM7* y *Thermomicrobia* se asociaron a las altas concentraciones de nitratos y DQO, y mayores concentraciones de oxígeno disuelto en comparación con las estaciones Paila y Río Cristal detectadas en la estación Puente de Hierro. Es preciso destacar que las concentraciones de DQO y oxígeno disuelto no correlacionaron entre sí como se observa en la Tabla 4 (ver explicación en epígrafe 4.2 último párrafo página 65, primer párrafo página 66). A la clase *Bacilli* pertenece el género *Bacillus*, el cual se caracteriza por producir un amplio rango de enzimas extracelulares como proteasas, fosfatasas, esterasas, amilasas, entre otras, que desempeñan un importante papel en la biodegradación de la materia orgánica y por lo tanto en el reciclaje de los nutrientes (Mandic-Mulec *et al.*, 2015). La mayoría de los miembros del género *Bacillus* son heterótrofos aerobios y están asociados a lugares con altas concentraciones de carbono y nitrógeno (Mandic-Mulec *et al.*, 2015), como se observó en la estación Puente de Hierro, la cual presentó un alto contenido de materia orgánica, indicado a través de la Demanda Química de Oxígeno. Además, desempeñan una importante función en los procesos de desnitrificación y fijación del nitrógeno, pasos del ciclo del nitrógeno, como se muestra en la Figura 26.

En el caso de la clase *Thermomicrobia*, esta agrupa a microorganismos termófilos aerobios. Recientemente se describió a la bacteria *Nitrolancetus hollandicus*, la cual tiene la capacidad de utilizar nitrito como fuente de energía y lo oxida hasta nitrato. Esta bacteria pertenece a la clase *Thermomicrobia* y se relaciona filogenéticamente con la especie *Thermomicrobium roseum*, siendo hasta el momento la única especie oxidadora de nitrito perteneciente al filo *Chloroflexi* (Sorokin *et al.*, 2012). *N. hollandicus* se desarrolla en ambientes de altas concentraciones de nitritos, como las presentes en la estación Puente de Hierro del río Almendares, por lo que pudiera estar presente en estas aguas. Con respecto a la clase *TM7*, esta agrupa a bacterias filamentosas que no han sido cultivadas con anterioridad, por lo que se desconoce su función en el ecosistema. Sin embargo se encuentra altamente distribuida en el ambiente, ya que se han encontrado secuencias de *TM7* en el suelo, agua dulce, agua de mar, sedimentos, lodos activados y en la cavidad oral humana (Hugenholtz *et al.*, 2001; Dinis *et al.*, 2011).

Las clases bacterianas detectadas con mayor frecuencia en la estación Río Cristal del río Almendares se relacionaron con las menores concentraciones de nutrientes encontradas en esta estación en comparación con los puntos de muestreo Paila y Puente de Hierro. Se plantea que las estaciones corriente arriba y corriente abajo de los cuerpos de agua se diferencian en sus características físico-químicas y consecuentemente, también se diferencian en sus comunidades planctónicas (Ruiz-González *et al.*, 2013). Ruiz-González *et al.* (2013) encontraron a partir del análisis de redundancia realizado en el río Ebro en España, que las clases *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* se asociaron a estaciones con baja conductividad y bajas concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto, tal y como ocurre en la estación Río Cristal. En el caso de la clase *Betaproteobacteria*, esta se ha identificado con mayor frecuencia

en ambientes con altas concentraciones de nutrientes (Newton *et al.*, 2011; Gray y Engel, 2013), sin embargo en la presente investigación esta se encontró con mayor frecuencia en la estación Río Cristal, que presentó las menores concentraciones de nutrientes comparado con las otras dos estaciones del río Almendares. Se ha observado que algunos miembros de esta clase como las bacterias pertenecientes a los géneros *Polynucleobacter* (Familia *Burkholderiaceae*) y *Methylophilus* (Familia *Methylophilaceae*) se relacionan negativamente con la conductividad (Fujii *et al.*, 2011; Hahn *et al.*, 2015), evidenciando que pequeños cambios en la salinidad de los ecosistemas dulceacuícolas pueden afectar a las bacterias de estos géneros. Este hecho se corresponde con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde la estación Río Cristal fue la que presentó los menores valores de salinidad determinados a través de la conductividad eléctrica y la mayor frecuencia de identificación de miembros de la clase *Betaproteobacteria*.

Con respecto a la clase *Cyanobacteria*, se ha observado que el género *Synechococcus* perteneciente a este grupo, se caracteriza por presentar una abundancia relativa alta en ecosistemas con bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos, ya que su pequeño tamaño hace que sus células estén menos limitadas por la difusión molecular de nutrientes debido al incremento de la proporción área superficial/volumen y tienen una alta afinidad por el ortofosfato en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes (Callieri *et al.*, 2012). Además se ha observado que las clases *Alphaproteobacteria* y *Cyanobacteria* se relacionan entre sí (Berg *et al.*, 2009; Newton *et al.*, 2011), tal y como se observó en el presente estudio donde ambas clases correlacionaron positivamente (Figura 20). El filo *Verrucomicrobia* es ubicuo del suelo y de ambientes marinos, donde en ocasiones se detecta con gran abundancia (Bergmann *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2012), aunque se ha encontrado también en ambientes de agua dulce y en heces humanas en menor proporción (Newton *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2012). Particularmente la clase *Verrucomicrobiae*, se detecta con mayor abundancia en océanos y en algunos lagos (Arnds *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2012) y rara vez en el suelo (Bergmann *et al.*, 2011), por lo que su hábitat primario pudieran ser los ambientes acuáticos. Esta clase no ha sido muy estudiada en ambientes dulceacuícolas en relación con los factores bióticos y abióticos que pueden influir en su abundancia relativa. Sin embargo en ambientes marinos se ha observado que las clases *Verrucomicrobiae* y *Opitutae* se favorecen con bajas concentraciones de nitratos y salinidad (Freitas *et al.*, 2012) como se observó en el presente estudio en la estación Río Cristal del río Almendares. El resto de las clases asociadas a la estación Río Cristal, forman parte de los filos detectados con menor frecuencia en ambientes dulceacuícolas, y se desconoce la influencia de factores bióticos y abióticos sobre los mismos (Newton *et al.*, 2011).

En el río San Juan, las clases *Acidimicrobia, Chloroflexi, Actinobacteria, Opitutae, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Clostridia, Flavobacteria* y *Cytophagia* se asociaron a condiciones de pH ligeramente alcalino y altas concentraciones de

fosfato presentes en la estación Baños del San Juan. Las cinco últimas clases se han encontrado en ecosistemas dulceacuícolas ricos en nutrientes y particularmente *Gammaproteobacteria, Clostridia, Flavobacteria* y *Cytophagia* se consideran contaminantes de los ecosistemas dulceacuícolas que llegan a estos a través del suelo o de vertimientos de aguas residuales (Newton *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2013; Newton *et al.*, 2015), pero también pueden presentarse en la columna de agua como consecuencia de la resuspensión del sedimento (Crim *et al.*, 2012). Particularmente a la estación Baños del San Juan llegan los escurrimientos procedentes de la laguna de oxidación aerobia que se encuentra entre las estaciones Presa San Juan y Baños del San Juan, la cual presenta roturas y recepciona volúmenes de aguas residuales domésticas superiores a su capacidad de retención, por lo que esta pudiera ser una de las causas de la presencia de estas clases bacterianas en las aguas de esta estación de muestreo, junto con la resuspensión del sedimento y el aporte a partir de los animales de vida salvaje. En el caso de las clases *Actinobacteria, Acidimicrobia, Chloroflexi, Opitutae, Alphaproteobacteria* y *Betaproteobacteria*, las mismas se han identificado a partir de ecosistemas dulceacuícolas con altos valores de pH (Newton *et al.*, 2011; Lanzén *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2015).

Las clases *Epsilonproteobacteria, Thermomicrobia* y *Thermoleophilia* se asociaron a condiciones de bajas concentraciones de DQO y de oxígeno disuelto, presentes en la estación Presa El San Juan en el mes de abril 2013. Los microorganismos pertenecientes a las clases *Epsilonproteobacteria* y *Thermomicrobia* pueden encontrarse en sitios con alto contenido de azufre (Steenbergh *et al.*, 2014; Madigan *et al.*, 2015) como es el caso de las aguas del río San Juan, las cuales clasifican como aguas sulfuradas (Peña *et al.*, 2001). Particularmente, los miembros de la clase *Epsilonproteobacteria* son microaerófilos y metabólicamente versátiles, pudiendo tener un metabolismo quimioautótrofo o quimioheterótrofo y son capaces de llevar a cabo la oxidación quimiolitotrófica del azufre (*Campylobacterales*, Figura 27) (Steenbergh *et al.*, 2014; Llorens-Marès *et al.*, 2015). Por ejemplo, dentro de la familia *Helicobacteraceae* perteneciente a la clase *Epsilonproteobacteria*, los géneros *Sulfurimonas* y *Sulforovum* están involucrados en los ciclos del azufre y el nitrógeno. Estos microorganismos utilizan el azufre como donor de electrones en la oxidación de este elemento químico, y el nitrato como aceptor de electrones en el proceso de desnitrificación en ambientes oligotróficos (Inceoglu *et al.*, 2015), acoplándose así ambos ciclos. Con respecto a la clase *Thermomicrobia*, sus miembros son aerobios estrictos, quimiotrofos y pueden llevar a cabo la fotosíntesis anoxigénica (Figura 25) y la oxidación quimiolitotrófica del azufre (Figura 27) acoplándose de esta forma los ciclos del carbono y el azufre.

Las clases *Cyanobacteria, Acidobacteria, Deinococci, Bacilli* y *Sphingobacteria* se relacionaron con bajas concentraciones de DQO, altas concentraciones de oxígeno disuelto, bajas concentraciones de fosfato y pH ligeramente ácido presentes en la estación Presa San Juan en

el mes de febrero 2013. La mayoría de los microorganismos pertenecientes a estas clases tienen en común que son aerobios, por lo que las altas concentraciones de oxígeno disuelto favorecen su abundancia relativa. Por otra parte, las bacterias del género *Synechococcus* son picocianobacterias que se favorecen en condiciones de bajas concentraciones de nutrientes (Callieri *et al.*, 2012), y además llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, contribuyendo a la producción de oxígeno en la columna de agua. Los miembros de la clase *Acidobacteria* también se favorecen con las bajas concentraciones de nutrientes inorgánicos y carbono orgánico y pH ácido (Foesel *et al.*, 2013). En el caso de las clases *Deinococci, Bacilli* y *Sphingobacteria* están formadas por microorganismos quimioheterótrofos aerobios que han sido aislados a partir del suelo y ambientes dulceacuícolas con diferentes características tróficas (Zwart *et al.*, 2002; Im *et al.*, 2008; Fernandez-Bunster *et al.*, 2012; Llorens-Marès *et al.*, 2015). Particularmente los miembros de la clase *Deinococci* son oxidadoras del azufre (Madigan *et al.*, 2015) (Figura 27) por lo que su presencia en el río San Juan pudiera verse favorecida por el contenido de azufre de sus aguas.

Los resultados de la presente investigación, tienen un gran valor práctico para el manejo de los ecosistemas, ya que los cambios en la composición de las comunidades bacterianas pueden emplearse como indicadores de cambios en los cuerpos de agua, que se producen como resultado de variaciones en procesos internos (ej: propiedades físico-químicas de la columna de agua o tiempo de retención) y externos (ej: condiciones climáticas, entrada de materia orgánica y nutrientes) (Lear *et al.*, 2011; Lear *et al.*, 2012; Washington *et al.*, 2013; Llirós *et al.*, 2014). Con anterioridad se ha demostrado que los factores abióticos y bióticos regulan los cambios temporales y espaciales de las comunidades bacterianas en los ecosistemas acuáticos (Lindström *et al.*, 2005; Berdjeb *et al.*, 2011a; Berdjeb *et al.*, 2011b; Llirós *et al.*, 2014). Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo con mayor frecuencia en ecosistemas dulceacuícolas de clima templado y poco se conoce acerca de las comunidades bacterianas de ecosistemas dulceacuícolas de clima tropical, donde los pocos trabajos realizados se concentran en Brasil y el continente africano (Wondie *et al.*, 2007; Schmitz y Abreu, 2009; Gouvêa *et al.*, 2010; Inceoglu *et al.*, 2015); en tanto en la región del Caribe no existen antecedentes de estos análisis, por lo que los resultados presentados en este estudio constituyen una novedad científica para la región caribeña.

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

Como se ha observado en el presente trabajo, la composición de la microbiota varía en función del tipo de agua y depende principalmente de la concentración de sales y compuestos orgánicos, la turbidez, la temperatura y las fuentes contaminantes (Lindström *et al.*, 2005; Reche y Fiuza, 2005; Berdjeb *et al.*, 2011a; García-Armisen *et al.*, 2014). En los ecosistemas acuáticos, se plantea que comúnmente las bacterias que predominan son los bacilos Gram

negativos (Ramkumar *et al.*, 2011); sin embargo, en ecosistemas contaminados las bacterias formadoras de endosporas tienen ventajas sobre el resto de las bacterias; ya que bajo condiciones de estrés pueden formar esporas. Las esporas bacterianas son estructuras resistentes que contribuyen al mantenimiento y protección del material genético de los organismos hasta que las condiciones se vuelven apropiadas para el crecimiento vegetativo (Bueche *et al.*, 2013; Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

En el presente estudio, los bacilos Gram positivos 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 (Tabla 2). Teniendo en cuenta que los miembros de la clase *Bacilli* son bacilos Gram positivos, aerobios y formadores de endosporas (Hikmate *et al.*, 2011) se puede inferir que la mayoría de los aislados de esta investigación pertenecen a esta clase. Este resultado confirma que el filo *Firmicutes* es uno de los grupos predominantes en el río Almendares y que en el mismo, la clase *Bacilli* se asocia a lugares con alto contenido de compuestos orgánicos (Figura 20) como son el rizosedimento y las partículas suspendidas en la columna de agua. Respecto a este aspecto, Reche y Fiuza (2005) y Ramkumar *et al*. (2011), informaron que en los sistemas acuáticos contaminados con materia orgánica y con efluentes domésticos no tratados, las bacterias Gram positivas predominan en el agua y los sedimentos, y pueden servir como indicadores de contaminación por materia orgánica. Otro aspecto que pudo influir en el predominio de la clase *Bacilli*, particularmente en la columna de agua, es que durante los muestreos el caudal del río estaba muy bajo, y producto de la resuspensión del sedimento, pudieran pasar los microorganismos de este último a la columna de agua. Puede haber influido también la presión selectiva que se produce durante el cultivo, aislándose aquellas bacterias cultivables, copiotrofas y de rápido crecimiento. En este sentido, Burscher *et al*. (2009) plantearon que las diferencias entre los métodos dependientes de cultivo y los métodos independientes de cultivo, radica en la presión selectiva que ejerce el medio de cultivo sobre los microorganismos, teniendo en cuenta las altas concentraciones de sustratos orgánicos degradables en el rango de $g.L^{-1}$, en comparación a la concentración que pueden encontrarse en algunos ecosistemas en el rango de $mg.L^{-1}$ o $\mu g.L^{-1}$. Estas son algunas razones que justifican el hecho de que a través de los aislamientos realizados en el río Almendares, la clase *Bacilli* fue más abundante; sin embargo, no lo fue mediante la DGGE o la pirosecuenciación.

En los ambientes dulceacuícolas, las proteínas, péptidos y carbohidratos se han identificado como los principales sustratos utilizados por los microorganismos heterótrofos (Bertilsson *et al.*, 2007; Bushaw-Newton *et al.*, 2011). Para el aprovechamiento de estos sustratos, los microorganismos producen enzimas extracelulares que catalizan la conversión de moléculas complejas en compuestos más simples empleados en la nutrición microbiana. Existen diferentes enzimas extracelulares, como las proteasas y amilasas que contribuyen a la ruptura de

numerosos compuestos orgánicos y desempeñan una importante función en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes (Acosta-Martínez *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2008). Por ejemplo, la hidrólisis de proteínas por las proteasas extracelulares es clave en el proceso de amonificación en el ciclo del nitrógeno (Tsuboi *et al.*, 2014) (Figura 26).

En la presente investigación se observó la producción de proteasas y amilasas a partir de las bacterias formadoras de endosporas aisladas. Particularmente, la producción de proteasas fue más común entre los aislados en comparación con la producción de amilasas, donde el 94% de los aislados produjeron proteasas extracelulares y sólo el 75% produjeron amilasas. Este resultado puede tener diferentes explicaciones, como por ejemplo: (1) el mecanismo de degradación de las proteínas comparado con el del almidón. Los microorganismos prefieren degradar proteínas debido a que es una vía más rápida para obtener aminoácidos (para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucléicos) y fuente de energía, en vez de degradar almidón que es un polímero compuesto de amilopectina y amilosa más complicado de degradar (Moat *et al.*, 2002). (2) Muchas proteasas son constitutivas en lugar de las amilasas que son inducibles (Moat *et al.*, 2002), lo que implicaría un gasto de energía para la síntesis de estas últimas. (3) La fuente de contaminación. El río Almendares es un ecosistema contaminado debido al constante vertimiento de aguas residuales domésticas e industriales (Arpajón *et al.*, 2011; Romeu *et al.*, 2011), las cuales son una fuente de materia orgánica que afecta la calidad de esta corriente fluvial. La materia en descomposición, tales como las plantas, animales y bacterias muertas, pueden provocar contaminación cuando se encuentran en exceso y esta fuente puede ser degradada por los microorganismos a través de las proteasas extracelulares, contribuyendo a los ciclos del nitrógeno y el carbono, y (4) los puntos calientes de materia orgánica no solo posibilitan el mejoramiento de la productividad bacteriana, sino que también seleccionan a los tipos bacterianos que están más adaptados a tipos específicos de materia orgánica, eucariontes o superficies (Hunt *et al.*, 2010).

En general, la producción de amilasas fue baja en comparación con la informada por Khan *et al*. (2011), quienes estudiaron la producción de esta enzima en dos cepas de colección identificadas como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus subtilis*, obteniendo halos de producción de 39,5 y 29,5 mm de diámetro respectivamente. Las especies de *Bacillus* sp. tales como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus stearothermophilus* son potentes productoras de amilasas, pero esta producción depende de varios factores tales como: el tipo de cepa, la composición del medio, los métodos de cultivo, el crecimiento celular, los requerimientos de nutrientes, los iones metálicos, el pH, la temperatura, el tiempo de incubación y la termoestabilidad (Pandey y Gupta, 2011). Estos factores pudieron influir en la producción de amilasas de los aislados del presente estudio.

A partir de la producción de las enzimas proteasas y amilasas, se seleccionaron 36 aislados (Figura 22), los cuales fueron representativos de las tres 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 stratiotes*, *Commelina* sp., *Hydrocotyle* sp., *Cabomba* sp. y *Bidens pilosa* L. en Cuba. Hui-Qing *et al.* (2006) sugirieron que las macrófitas acuáticas pueden ser útiles para el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas. Se ha informado que la asociación entre los microorganismos y las macrófitas acuáticas puede favorecer el proceso de fitorremediación, debido a las potencialidades de los microorganismos de solubilizar nutrientes y de promover el crecimiento de las plantas, aumentando su capacidad de remover nitrógeno y fósforo a partir de ecosistemas acuáticos eutróficos (Li y Wong, 2011; Yi *et al.*, 2013), por lo que los microorganismos aislados en el presente trabajo pudieran tener aplicaciones futuras en este campo.

Mediante el sistema API ZYM se constataron las capacidades metabólicas de los bacilos formadores de endosporas, los cuales produjeron fosfatasas, esterasas, aminopeptidasas y glicosil hidrolasas. Mudryk y Skórczewski (2006) sugirieron que los patrones de actividades enzimáticas pueden utilizarse para inferir la composición de las fuentes de materia orgánica en los ecosistemas acuáticos. Por lo que el presente 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.

Las fosfatasas son el grupo de fosfohidrolasas que más intensamente participan en la liberación de fosfato en los ecosistemas acuáticos (Cunha *et al.*, 2010; McMahon y Read, 2013). Estas enzimas pueden presentarse en dos formas: alcalina y ácida, ambas capaces de hidrolizar los ésteres fosfóricos (Mudryk y Skórczewski, 2006). Particularmente las fosfatasas alcalinas catalizan la hidrólisis de una variedad de ésteres fosfatos, incluyendo ésteres de alcoholes primarios y secundarios, alcoholes cíclicos, fenoles y aminas, liberando fosfato inorgánico (Cunha *et al.*, 2010), por lo que contribuyen al reciclaje de este elemento en los sistemas acuáticos.

Las esterasas fueron también una de las enzimas extracelulares más detectadas entre los aislados del río Almendares. Estas enzimas pueden hidrolizar mono-, di- y triglicéridos emulsificados hasta glicerol y residuos de ácidos grasos (Mudryk y Skórczewski, 2006). Los aislados mostraron una alta actividad lipolítica contra los ácidos grasos de pequeña cadena (C8) en comparación con los ácidos grasos de cadena larga (C14) (Tablas 17 y 18), lo cual está en correspondencia con los resultados obtenidos por Mudryk y Skórczewski (2006), quienes estudiaron la actividad enzimática de bacterias heterótrofas aisladas de un lago estuarino en Polonia.

Otras enzimas como la leucina aminopeptidasa y la valina aminopeptidasa se produjeron con frecuencia entre los aislados. La leucina aminopeptidasa está distribuida ampliamente en los

ecosistemas acuáticos y su actividad se asocia fundamentalmente con las bacterias heterótrofas. Esta enzima hidroliza un gran número de péptidos y aminoácidos de la configuración L, con particular afinidad por los L-leucil-péptidos y las L-leucil-amidas (Cunha *et al.*, 2010). Se ha sugerido que el nivel de leucina aminopeptidasa es un buen indicador de actividad proteolítica producida por bacterias (Mudryk y Skórczewski, 2006), lo cual se evidenció en este trabajo a través de la evaluación de la producción de proteasas.

En tanto, la actividad glicosil hidrolasa estuvo presente en algunos aislados del rizosedimento y de la columna de agua (Tablas 17 y 18). Tiquia (2011) sugirió que la presencia de estas enzimas es consistente con la degradación de plantas, animales y detrito microbiano. Particularmente, la β-glucosidasa es producida por las bacterias heterótrofas en aguas y sedimentos de ecosistemas dulceacuícolas, esta enzima puede hidrolizar enlaces β de disacáridos de glucosa, celuhexosa y carboximetilcelulosa (Cunha *et al.*, 2010). 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 los nutrientes a la biosfera.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el sistema API ZYM, mediante el cual se evidenció las capacidades de los aislados de la clase *Bacilli* del río Almendares de producir enzimas extracelulares importantes en la funcionalidad del ecosistema y particularmente en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes, se realizó la selección de 15 aislados para la caracterización molecular de los mismos. A través de la secuenciación del gen ADNr 16S se identificaron diez cepas pertenecientes al complejo *Bacillus cereus sensu lato*, dos cepas como *Bacillus megaterium,* una cepa como *Bacillus pumilus* y dos cepas como *Bacillus subtilis.* Las cepas pertenecientes al complejo *B. cereus s.l.*, fueron identificadas además a través de la secuenciación del gen *gyrB,* arrojando igual resultado al obtenido con el gen ADNr 16S (Tabla 19). El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen ADNr 16S dentro del grupo *B. cereus s.l.* mostró una similitud ≥ 99%; lo cual concuerda con los planteamientos de diversos autores acerca de que el análisis de la secuencia de este gen sólo puede utilizarse para caracterizar cepas como pertenecientes al grupo sin llegar a la identificación de la especie (Tourasse *et al.*, 2006; Maughan y Van der Auwera, 2011; Økstad y Kolstø, 2011). Además la secuenciación del gen *gyrB*, tampoco permitió la diferenciación de las cepas dentro del complejo, lo cual también concuerda con lo planteado en la literatura (Soufiane y Côté, 2009). El complejo *B. cereus s.l.*, comprende siete especies reconocidas: *B. cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihensthephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus cytotoxicus* (Guinebretière *et al.*, 2013) todas con una similitud superior al 99%. Sin embargo, se conoce que las cepas de *B. thuringiensis* pueden distinguirse del resto de las especies del grupo por su capacidad de producir inclusiones cristalinas proteicas (cristales) durante la esporulación (Aronson, 2002; Santana *et al.*, 2008), tal y como se observó en el caso de las diez cepas pertenecientes al grupo *B. cereus s.l.* del presente estudio (Figura 24), por lo

que se confirmó su identificación como *B. thuringiensis* (Tabla 19). Las especies de *Bacillus* sp. identificadas pueden encontrarse con frecuencia en diferentes ambientes, entre los que se incluyen el suelo, los sedimentos, el aire, plantas de tratamiento y el agua dulce (Mohanty *et al.*, 2011; Paes *et al.*, 2012; Ceuppens *et al.*, 2013; Shishir *et al.*, 2014; Brillard *et al.*, 2015). Particularmente *B. thuringiensis,* es una bacteria entomopatógena que se emplea como biopesticida, debido a que sus toxinas son altamente específicas para determinados organismos, son inocuas para el ser humano y otros mamíferos, para las aves, anfibios, reptiles y plantas y son biodegradables, por lo que ningún producto tóxico residual se acumula en el ambiente (Bravo *et al.*, 2011). Además esta bacteria es ampliamente utilizada en el mundo para el control selectivo de poblaciones de larvas de mosquitos (Despres *et al.*, 2011; Fayolle *et al.*, 2015). Existe una formulación comercial de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis,* que se utiliza para el control de mosquitos, el VectoBac G, que se aplica por espray aéreo en diferentes países (Duchet *et al.*, 2010; Caquet *et al.*, 2011; Fayolle *et al.*, 2015). En Cuba se aplica un larvicida líquido sobre la base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serotipo H-14 para el control de diferentes especies de mosquitos (Bactivec, LABIOFAM, Cuba) (Corbillón *et al.*, 2012), por lo que esta podría ser una vía a través de la cual llegan las bacterias de la especie *B. thuringiensis* a las aguas del río Almendares.

De esta forma, a partir de los resultados de esta investigación, se muestra la diversidad fenotípica de cepas de *Bacillus* sp. productoras de enzimas extracelulares de interés ecológico, aisladas de un ecosistema dulceacuícola contaminado.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Las aguas del río Almendares presentan una alta contaminación microbiana y química, contrario a las aguas del Complejo Turístico “Las Terrazas” que presentan mejor calidad, dada la menor presión antropogénica a la que se encuentran sometidas.
2. La existencia de correlación lineal entre las concentraciones de coliformes termotolerantes, *E. coli* y enterococos, así como entre estos y los indicadores físico-químicos, indica que cualquiera de los indicadores bacterianos puede ser utilizado para estimar la contaminación fecal de ecosistemas dulceacuícolas con diferente grado de contaminación.
3. La estructura de las comunidades bacterianas determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante y pirosecuenciación 454, permitió establecer diferencias significativas entre los ríos Almendares y San Juan y entre estaciones contaminadas y poco contaminadas dentro de cada río, por lo que pueden utilizarse como indicadoras del estado ecológico de los ecosistemas dulceacuícolas.
4. Se identificaron 44 órdenes y 73 familias en el río Almendares y 38 órdenes y 60 familias en el río San Juan, de las cuales 43 familias constituyen nuevos informes para agua dulce en el Caribe. Los filos predominantes en el río Almendares fueron *Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes* y *Firmicutes*, en tanto en el río San Juan predominaron los filos *Actinobacteria, Proteobacteria, Cyanobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes* y *Deinococcus-Thermus*, lo que está relacionado con las características físico-químicas y de contaminación fecal de cada ecosistema evaluado y demuestra que la composición de las comunidades bacterianas en los ecosistemas dulceacuícolas constituye una respuesta a los cambios ambientales presentes.
5. Dentro de las comunidades bacterianas del río Almendares, se identificaron cepas de *Bacillus* sp. productoras de diferentes enzimas extracelulares con importancia en la degradación de materia orgánica, lo que indica su función en los ecosistemas dulceacuícolas.

Recomendaciones

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar el monitoreo sistemático de la calidad química y microbiológica en los ecosistemas evaluados e informar a las autoridades pertinentes de los resultados para priorizar su recuperación y la labor de educación ambiental entre las personas que habitan en las márgenes de estos ríos.
2. Extender estos estudios a otras corrientes fluviales de la capital para conocer el comportamiento de las comunidades bacterianas en relación con la calidad química y microbiológica de estos sistemas.
3. Realizar estudios moleculares que permitan conocer la influencia de factores bióticos sobre la estructura de las comunidades bacterianas y su función en ecosistemas dulceacuícolas con diferente grado de contaminación.
4. Evaluar las potencialidades de bacterias aisladas del río San Juan con incidencia en la degradación de la materia orgánica.

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acosta-Martínez,** V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D. y Pérez-Alegria, L. (2007). Enzyme activities as affected by soil properties and land use in tropical watershed. *Applied Soil Ecology, 35*, 36-45.
2. **Adegboye,** M. F. y Babalola, O. O. (2012). Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *African Journal of Agricultural Research, 7*(15), 2255-2261.
3. **Adrados,** B., Sánchez, O., Arias, C. A., Becares, E., Garrido, L., Mas, J., Brix, H. y Morató, J. (2014). Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: Vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilter. *Water Research, 55*, 304-312.
4. **AFNOR**. (2009). Qualité de l'eau . Analyses biochimiques et biologiques - Analyses microbiologiques. Norme NF EN ISO 16061. Paris, France: Association Française de Normalisation.
5. **Ahiarakwem,** C. A., Nwankwor, G. I., Iwuagwu, C. J., Ejike, E. N. y Onyekuru, S. O. (2012). Water quality monitoring of a tropical lake and associated rivers: A case study of Oguta Lake and its tributaries, Niger Delta Basin, Southeastern Nigeria. *Journal of Environmental Science and Engineering, A 1*, 818-826.
6. **Ahmed,** I., Abbas, S., Kudo, T., Iqbal, M., Fujiwara, T. y Ohkuma, M. (2014). *Deinococcus citri* sp. nov., isolated from citrus leaf canker lesions. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 64*, 4134–4140.
7. **Ahmed,** I., Jurzik, L., Überla, K. y Wilhelm, M. (2011). Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. *Water Research, 45*(3), 1358-1368.
8. **Albert,** R. A., Waas, N. E., Pavlons, S. C., Pearson, J. L., Ketelboeter, L., Rosselló-Móra, R. y Busse, H.-J. (2013). *Sphingobacterium psychroaquaticum* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from Lake Michigan water. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 63*, 952-958.
9. **Alfreide**r, A. y Vogt, C. (2007). Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water Air Soil Pollution, 183*, 415-426.
10. **Altschul,** S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology, 215*, 403-410.
11. **Amado,** A. M., Meirelles-Pereira, F., Vidal, L. O., Sarmento, H., Suhett, A. L., Farjalla, V. F., Cotner, J. B. y Roland, F. (2013). Tropical freshwater ecosystems have lower bacterial growth efficiency than temperate ones. *Frontiers in Microbiology, 4*, 1-8.
12. **Andem,** A. B., Udofia, U., Okorafor, K. A., Okete, J. A. y Ugwumba, A. A. A. (2012). A study on some physical and chemical characteristics of Ona River, Apata, Ibadan South-west, Oyo State, Nigeria. *European Journal of Zoological Research, 1*(2), 37-46.
13. **Anderson,** C. R. y Cook, G. M. (2004). Isolation and characterization of arsenate-reducing bacteria from arsenic-contaminated sites in New Zealand. *Current Microbiology, 48*, 341-347.
14. **Anderson,** M. J., Gorley, R. N. y Clarke, K. R. (Eds.). (2008). *PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods*: PRIMER-E Ltd., Plymouth, United Kingdom.
15. **Anitha,** M. y Ravikumar, S. (2014). Assessment of physiochemical and microbial concentrations in different freshwaters in Tiruchirappalli city: A special emphasize on their correlation. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Analysis, 4*(2), 88-95.
16. **APHA**. (2005). Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater. In Joint publication of the American Public Health Association, A. W. W. A., and Water Environment Federation. (Ed.). 21st. Edition.
17. **APHA**. (2012). Standard Methods for the Analysis of Water and Wastewater. In American Public Health Association, A. W. W. A., and Water Environment Federation. (Ed.), (22nd ed.).

18. **Arnds,** J., Knittel, K., Buck, U., Winkel, M. y Amann, R. (2010). Development of a 16S rRNA-targeted probe set for *Verrucomicrobia* and its application for fluorescence in situ hybridization in a humic lake. *Systematic Applied Microbiology, 33*, 139-148.
19. **Aronson,** A. (2002). Sporulation and δ-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 59*(3), 417-425. doi: 10.1007/s00018-002-8434-6
20. **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). *Higiene y Sanidad Ambiental, 11*, 731-738.
21. **Asker,** D., Awad, T. S., McLandsborough, L., Beppu, T. y Ueda, K. (2011). *Deinococcus depolymerans* sp. nov., a gamma- and UV- radiation-resistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 61*, 1448-1453.
22. **Assis,** D., Jucá, R. T., Gomes, P., Azevedo, R., Ghilardi, R., Cruz, M. P. y Silva, A. (2015). Semiconductor sequencing reveals the diversity of bacterial communities in an amazonian reservoir. *Aquatic Science and Technology, 3*(1), 18-32.
23. **Bachoon,** D. S., Markand, S., Otero, E., Perry, G. y Ramsubaugh, A. (2010). Assessment of non-point sources of fecal pollution in coastal waters of Puerto Rico and Trinidad. *Marine Pollution Bulletin, 60*, 1117-1121.
24. **Badgley,** B. D., Thomas, F. I. M. y Harwood, V. J. (2011). Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environmental Microbiology, 13*(4), 932-942.
25. **Bal,** S., Mishra, R. R., Rath, B., Sahu, H. K. y Thatoi, H. N. (2009). Characterization and extracellular enzyme activity of predominant marine Bacillus spp. isolated from sea water of Orissa Coast, India. *Malaysian Journal of Microbiology, 5*(2), 87-93.
26. **Balzer,** S., Malde, K., Lanzén, A., Sharma, A. y Jonassen, I. (2010). Characteristics of 454 pyrosequencing data—enabling realistic simulation with flowsim. *Bioinformatics, 26*(18), i420-i425. doi: 10.1093/bioinformatics/btq365
27. **Barberán,** A. y Casamayor, E. O. (2011). Euxinic freshwater hypolimnia promote bacterial endemicity in continental areas. *Microbial Ecology, 61*, 465-472.
28. **Baron,** J. S., Poff, N. L., Angermeier, P. L., Dahm, C. N., Gleick, P. H., Hairston, N. G., Jackson, R. B., Johnston, C. A., Richter, B. D. y Steinman, A. D. (2003). Ecosistemas de Agua Dulce Sustentables. *Tópicos en Ecología, 10*, 1-16.
29. **Bastholm,** S., Wahlstrøm, L., Appel, L. y Roslev, P. (2008). A simple bioluminescence procedurefor early warning detection of coliform bacteria in drinking water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24*, 2323-2330.
30. **Berdjeb,** L., Ghiglione, J. F. y Jacquet, S. (2011a). Bottom-up versus top-down control of hypo- and epilimnion free-living bacterial community structures in two neighboring freshwater lakes. *Applied and Environmental Microbiology, 77*(11), 3591–3599
31. **Berdjeb,** L., Pollet, T., Domaizon, I. y Jacquet, S. (2011b). Effect of grazers and viruses on bacterial community structure and production in two contrasting trophic lakes. *BMC Microbiology, 11*, 88.
32. **Bere,** T. y Tundisi, J. G. (2011). Influence of ionic strength and conductivity on benthic diatom communities in a tropical river (Monjolinho), Sao Carlos-SP, Brazil. *Hydrobiologia, 661*, 261-276.
33. **Berg,** K. A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P. y Rapala, J. (2009). High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 3*, 314-325.
34. **Bergmann,** G. T., Bates, S. T., Eilers, K. G., Lauber, C. L., Caporaso, J. G. y Walters, W. A., et al. (2011). The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology Biochemistry, 43*, 1450-1455.
35. **Bernardet,** J. F. y Bowman, J. P.(2006). The genus *Flavobacterium*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H.y Stackebrandt, E. (Eds.), The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria (pp. 481-531). Springer-Verlag, N.Y., USA.
36. **Bernardet,** J. F. y Nakagawa, Y.(2006). An introduction to the family *Flavobacteriaceae*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H.y Stackebrandt, E. (Eds.), The

prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria (3rd ed., pp. 455-480). Springer-Verlag, N.Y., USA.

37. **Bertilsson,** S., Eiler, A., Nordqvist, A. y Jorgensen, N. O. G. (2007). Links between bacterial production, amino-acid utilization and community composition in productive lakes. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 1*, 532-544.
38. **Bibby,** K., Viau, E. y Peccia, J. (2010). Pyrosequencing of the 16S rRNA gene to reveal bacterial pathogen diversity in biosolids. *Water Research, 44*(14), 4252-4260.
39. **Bižic-Ionescu,** M., Zeder, M., Ionescu, D., Orlic, S., Fuchs, B. M., Grossart, H.-P. y Amann, R. (2014). Comparison of bacterial communities on limnic versus coastal marine particles reveals profound differences in colonization. *Environmental Microbiology*, 1-15.
40. **Boehm,** A. B. y Soller, J. A. (2013). Recreational Water Risk: Pathogens and Fecal Indicators. In Laws, E. A. (Ed.), *Environmental Toxicology* (pp. 441-459): Springer New York.
41. **Bouvy,** M., Arfi, R., Bernard, C., Carré, C., Got, P., Pagano, M. y Troussellier, M. (2010). Estuarine microbial community characteristics as indicators of human-induced changes (Senegal River, West Africa). *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 87*, 573-582.
42. **Bravo,** A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S. y Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemical and Molecular Bioloy, 41*, 423-431.
43. **Briée,** C., Moreira, D. y López-García, P. (2007). Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology, 158*, 213-227.
44. **Brillard,** J., Dupont, C. M. S., Berge, O., Dargaignaratz, C., Oriol-Gagnier, S., Doussan, C., Broussolle, V., Gillon, M., Clavel, T. y Bérard, A. (2015). The water cycle, a potential source of the bacterial pathogen *Bacillus cereus*. *Biomedical Research International*, 1-15.
45. **Brümmer,** I. H. M., Felske, A. y Wagner-Döbler, I. (2003). Diversity and seasonal variability of b-*Proteobacteria* in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied and Environmental Microbiology, 69*(8), 4463–4473
46. **Buckalew,** D. W., Tuono, A. J., Simmons, A. K., Lankford, T. W. y Smith, D. H. (2015). Homogeneous distribution of *Escherichia coli* measured within the vertical water column of small, freshwater streams. *Journal of Water Resource and Protection, 7*, 410-421.
47. **Bueche,** M., Sauvain, L., Wunderlin, T., Junier, T., Tercier, M., Loizeau, J. L., Masson, M., Gascon, E. y Junier, P. (2013). Endospore-forming bacteria as an indicator of pollution in sediments of Lake Geneva. *E3S Web of Conferences, 1*. doi: 10.1051/ e3sconf /20130133011.
48. **Burtscher,** M. M., Zibuschka, F., Mach, R. L., Lindner, G. y Farnleitner, A. H. (2009). Heterotrophic plate count vs. *in situ* bacterial 16S rRNA gene amplicon profiles from drinking water reveal completely different communities with distinct spatial and temporal allocations in a distribution net. *Water SA, 35*(4), 495-504.
49. **Bushaw-Newton,** K. L., Ewers, E. C., Velinsky, D. J., Ashley, J. T. F. y Macavoy, S. E. (2011). Bacterial community profiles from sediments of the Anacostia River using metabolic and molecular analyses. *Environmental Science of Pollution Research*, 1-9.
50. **Byappanahalli,** M. N., Nevers, M. B., Korajkic, A., Staley, Z. R. y Harwood, V. J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76*(4), 685-706. doi: 10.1128/mmbr.00023-12
51. **Cabranes,** Y., Núñez, R., Martínez, J. y Ortiz, E. (2007). Bacterias del género *Bacillus* degradadoras de n-hexadecano aisladas del sedimento marino: Parámetros cinéticos. *Revista Cubana-Mexicana del CIM*, 36-41.
52. **Cacciari,** I., Quatrini, P., Zirletta, G., Mincione, E., Vinciguerra, V., Lupattelli, P. y Sermanni, G. G. (1993). Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial community: physicochemical character- ization of metabolites produced. *Applied and Environmental Microbiology, 59*(11), 3695−3700.
53. **Callaway,** T. R., Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y. y Mcreynolds, J. L. (2009). Evaluation of the bacterial diversity in cecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tagencoded FLX amplicon pyrosequencing. *Poultry Science, 88*, 298-302.

54. **Callieri,** C. (2007). Picophytoplankton in freshwater ecosystems: the importance of small-sized phototrophs. *Freshwater Review, 1*, 1-28.
55. **Callieri,** C., Cronberg, G. y Stockner, J. G.(2012). Freshwater Picocyanobacteria: Single Cells, Microcolonies and Colonial Forms. In Whitton, B. A. (Ed.), Ecology of *Cyanobacteria* II: Their diversity in space and time (Vol. II, pp. 229-269): Springer Science+Business Media B.V.
56. **Callisto,** M., Molozzi, J. y Barbosa, J. L. E.(2014). Eutrophication of Lakes. In Ansari, A. A.y Gill, S. S. (Eds.), Eutrophication: Causes, Consequences and Control: Springer Science+Business Media Dordrecht.
57. **Caquet,** T., Roucaute, M., Le Goff, P. y Lagadic, L. (2011). Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicology Environmental Safe, 74*, 1122-1130.
58. **Carpenter,** S. R., Stanley, E. H. y Vander Zanden, M. J. (2011). State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annual Review of Environment and Resources, 36*(1), 75-99. doi: doi:10.1146/annurev-environ-021810-094524
59. **Carrillo,** E. M. y Lozano, A. M. (2008). *Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando Agar Chromocult.* Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de Microbióloga Industrial, Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
60. **Castany,** G. (1971). Tratado Práctico de las Aguas Subterráneas. In Ediciones Omega, S. A. (Ed.). Barcelona.
61. **CCAV**. (1999). (Consejo de la Cuenca Almendares-Vento). Informe del estudio de la Cuenca Almendares-Vento.
62. **CENHICA**. (2003). Centro Nacional de Hidrología y Calidad de las Aguas. Informe técnico del estado de la calidad de las aguas en el Río Almendares: Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos.
63. **Ceuppens,** S., Boon, N. y Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology, 84*(3), 433-450.
64. **CITMA**. (2009). IV Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba. La Habana. Cuba.
65. **CITMA**. (2014). V Informe Nacional al Convenio sobre la Diversidad Biológica. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba. La Habana. Cuba.
66. **Clarke,** K. R. y Gorley, R. N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial
67. **Cobas,** L. S., Perigó, E., Piñeiro, R. y Duthit, R. (2011). Pollution in the estuary of the Baracoa river, La Habana, Cuba. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, 6*(1), 54-64.
68. **Cole,** J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M. y Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research, 37*(suppl 1), D141-D145. doi: 10.1093/nar/gkn879
69. **Connor,** N. P., Sarraino, S., Frantz, D. E., Bushaw-Newton, K. y MacAvoy, S. E. (2014). Geochemical characteristics of an urban river: Influences of an anthropogenic landscape. *Applied Geochemistry, 47* 209-216.
70. **Corbillón,** C. A., González, A., Menéndez, Z., Bruzón, R. Y., Díaz, M. y Gato, R. (2012). Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Revista Cubana de Medicina Tropical, 64*(3), 235-243.
71. **Coyne,** M. S. y Howell, J. M. (1994). The fecal coliform/fecal streptococci ratio (FC/FS) and water quality in the Bluegrass Region of Kentucky. *Soil and Science News and Views, 15*(9), 1-8.
72. **Crim,** J. F., Schoonover, J. E. y Lockaby, B. G. (2012). Assessment of fecal coliform and *Escherichia coli* across a land cover gradient in west Georgia streams. *Water Qual Expo Health, 4*, 143-158.

73. **Cunha,** A., Almeida, A., Coelho, F. J. R. C., Gomes, N. C. M., Oliveira, V. y Santos, A. L.(2010). Bacterial extracellular enzymatic activity in globally changing aquatic ecosystems. In Méndez, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbology and Microbial Biotechnology (Vol. 2, pp. 124-135): Formatex Microbiology.
74. **Cha,** S., Srinivasan, S., Seo, T. y Kim, M. K. (2014). *Deinococcus soli* sp. nov., a gamma-radiation-resistant bacterium isolated from rice field soil. *Current Microbiology, 68*, 777-783.
75. **Chalupová,** D., Havlíková, P. y Janský, B. (2012). Water quality of selected fluvial lakes in the context of the Elbe River pollution and anthropogenic activities in the floodplain. *Environmental Monitoring and Assessment, 184*, 6283-6295.
76. **Chao,** Y., Mao, Y., Wang, Z. y Zhang, T. (2015). Diversity and functions of bacterial community in drinking water biofilms revealed by high- throughput sequencing. *Nature Scientific Reports, 5*, 1-13.
77. **Chauhan,** A., Fortenberry, G. Z., Dawn, E. L. y Williams, H. N. (2009). Increased diversity of predacious *Bdellovibrio*-like organisms (BLOs) as a function of eutrophication in Kumaon Lakes of India. *Current Microbiology, 59*(1), 1-8.
78. **Chen,** G., Cao, X., Song, C. y Zhou, Y. (2010). Adverse effects of ammonia on nitrification process: the case of chinese shallow freshwater lakes. *Water Air Soil Pollution, 210*, 297–306.
79. **Chen,** W., Wang, B. J., Hong, H. Z., Yang, H. y Liu, S. J. (2012). *Deinococcus reticulitermitis* sp. nov., isolated from a termite gut. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 62*, 78-83.
80. **Chiroles,** S., González, M. I., Torres, T., Valdés, M. y Domínguez, I. (2007). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en aguas del río Almendares (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental, 7*, 222-227.
81. **Chislock,** M. F., Doster, E., Zitomer, R. A. y Wilson, A. E. (2013). Eutrophication: Causes, Consequences, and Controls in Aquatic Ecosystems. *Nature Education Knowledge, 4*(4), 10.
82. **Cho,** Y., Jang, G., Hwang, C. Y., Kim, E.-H. y Cho, B. C. (2013). *Nocardioides salsibiostraticola* sp. nov., isolated from biofilm formed in coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 63*, 3800-3806.
83. **Choi,** H.-A. y Lee, S.-S. (2012). *Sphingobacterium kyonggiense* sp. nov., isolated from chloroethene-contaminated soil, and emended descriptions of *Sphingobacterium daejeonense* and *Sphingobacterium mizutaii*. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 62*, 2559-2564.
84. **Davey,** M. E. y O´Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64*(4), 847-867.
85. **De La Cruz,** A. (2008). *Evaluación de la calidad físico-química y microbiológica de la Cuenca del Río La Villa, Península de Azuero.* Proyecto de investigación. (14-04.00-08-2008-01)
86. **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.
87. **De Vos,** P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H. y Whitman, W. B. (Eds.). (2009). *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (2nd ed. Vol. Three The Firmicutes). New York: Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
88. **Debroas,** D., Humbert, J. F., Enault, F., Bronner, G., Faubladier, M., Cornillot, E., Blaise, U. y Laboratoire, P. (2009). Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget – France). *Environmental Microbiology, 11*(9), 2412-2424.
89. **DeBruyn,** J. M., Mead, T. J. y Sayler, G. S. (2012). Horizontal transfer of PAH catabolism genes in *Mycobacterium*: Evidence from comparative genomics and isolated pyrene-degrading bacteria. *Environmental Science and Technology, 46*, 99-106.

90. **Degerman,** R., Dinasquet, J., Riemann, L., Sjöstedt de Luna, S. y Andersson, A. (2013). Effect of resource availability on bacterial community responses to increased temperature. *Aquatic Microbial Ecology, 68*, 131-142.
91. **Degnan,** P. H. y Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 6*, 183-194
92. **Dehedin,** A., Piscart, C. y Marmonier, P. (2013). Seasonal variations of the effect of temperature on lethal and sublethal toxicities of ammonia for three common freshwater shredders. *Chemosphere, 90*, 1016-1022.
93. **Del Pilar,** M., Ávila, S., Mónica, S. y Gómez, A. C. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA, 3*(4), 1794-2470.
94. **Despres,** L., Lagneau, C. y Frutos, R.(2011). Using the bioinsecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* in mosquito control. In Stoytcheva, M. (Ed.), Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment (pp. 93-126). Rijeka, Croatia: In Tech.
95. **Díaz,** Á. M., Izquierdo, C. C. S., Fernández de la Paz, T. y Izquierdo, A. M. (2008). Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por enterococos en el niño. *Revista Cubana de Pediatría, 79*(1).
96. **Díaz,** G., Herrero, G. y Herrera, P. (2010a). Situación actual de la subcuenca del arroyo Santoyo, cuenca Almendares – Vento. *Agricultura orgánica, 3*, 38-40.
97. **Díaz,** M., Rodríguez, C. y Zhurbenko, R. (2010b). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48*(2), 47-161.
98. **Dinis,** J. M., Barton, D. E., Ghadiri, J., Surendar, D., Reddy, K., Velasquez, F., Chaffee, C. L., Lee, M.-C. W., Gavrilova, H., Ozuna, H., Smits, S. A. y Ouverney, C. C. (2011). In search of an uncultured human-associated *TM7* bacterium in the environment. *PLoS ONE, 6*(6), 1-9.
99. **Dinsmore,** K. J., Billett, M. F. y Dyson, K. E. (2013). Temperature and precipitation drive temporal variability in aquatic carbon and GHG concentrations and fluxes in a peatland catchment. *Global Change Biology, 19*, 2133-2148.
100. **Dokulil,** M. T. (2014). Environmental impacts of tourism on lakes. In Ansari, A. A.y Gill, S. S. (Eds.), *Eutrophication: causes, consequences and control* (Vol. 2). New York: Springer Dordrecht Heidelberg London
101. **Dorgham,** M. M.(2014). Effects of Eutrophication. In Ansari, A. A.y Gill, S. S. (Eds.), Eutrophication: Causes, Consequences and Control: Springer Science+Business Media Dordrecht.
102. **Douagui,** A. G., Kouame, I. K., Koff, K., Goula, A. T. B., Dibi, B., Gone, D. L., Coulibaly, K., Seka, A. M., Kouassi, A. K., Mangoua, J. M. O. y Savane, I. (2012). Assessment of the bacteriological quality and nitrate pollution risk of Quaternary groundwater in the southern part of Abidjan District (Cote d'Ivoire). *Journal of Hydro-environment Research, 6*, 227-238.
103. **Doughari,** H. M., Ndakidemi, P. A., Human, I. Z. y Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments, 26*(2), 101-112.
104. **Drancourt,** M., Bollet, C. y Raoult, D. (1997). *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology, 47*, 160-163.
105. **Duarte,** B., Reboreda, R. y Caçador, I. (2008). Seasonal variation of extracelular enzymatic activity (EEA) and its influence on metal speciation in a polluted salt marsh. *Chemosphere, 73* 1056-1063.
106. **Duarte,** S., Cassio, F. y Pascoal, C.(2012). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology -Insights from Freshwaters. In Sameh, M. (Ed.), Gel Electrophoresis - Principles and Basics (pp. 174-196): InTech. Retrieved from http://www.intechopen.com/books/gelelectrophoresis-principles-and-basics/denaturing-gradient-gel-electrophoresis-dgge-in-microbial-ecologyinsights-from-freshwaters.
107. **Duchet,** C., Caquet, T., Franquet, E., Lagneau, C. y Lagadic, L. (2010). Influence of environmental factors on the response of a natural population of *Daphnia magna*

(Crustacea: Cladocera) to spinosad and *Bacillus thuringiensis israelensis* in Mediterranean coastal wetlands. *Environmental Pollution, 15*, 1825-1833.

108. **Dufresne,** A., Ostrowski, M., Scanlan, D. J., Garczarek, L., Mazard, S., Palenik, B. P., Paulsen, I. T., Tandeau, d. M. N., Wincker, P., Dossat, C., Ferriera, S., Johnson, J., Post, A. P., Hess, W. R. y Partensky, F. (2008). Unraveling the genomic mosaic of a ubiquitous genus of marine cyanobacteria. *Genome Biology, 9*.
109. **Dunlop,** J., McGregor, G. y Horrigan, N. (Eds.). (2005). *Potential impacts of salinity and turbidity in riverine ecosystems:Characterisation of impacts and a discussion of regional target setting for riverine ecosystems in Queensland*: The State of Queensland.
110. **Fakruddin,** M. D., Chowdhury, A., Hossain, M. D. N., Mannan, K. S. B. y Mazumdar, R. M. (2012). Pyrosequencing-Principles and applications. *International Journal of Life science and Pharma Reseach, 2*(2), 65-76.
111. **Farjalla,** V. F., Amado, A. M., Suhett, A. y Meirelles-Pereira, F. (2009). DOC removal paradigms in highly humic aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research, 16*(5), 531-538. doi: 10.1007/s11356-009-0165-x
112. **Fayolle,** S., Bertrand, C., Logez, M. y Franquet, É. (2015). Does mosquito control by Bti spraying affect the phytoplankton community ? A 5-year study in Camargue temporary wetlands (France) *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology, 51*, 189-198.
113. **Fernandez-Bunster,** G., Gonzalez, C., Barros, J. y Martinez, M. (2012). Quorum sensing circuit and reactive oxygen species resistance in *Deinococcus* sp . *Current Microbiology, 65*, 719-725.
114. **Fernández,** A. (2009). Contribución a la evaluación y el monitoreo de la sequía meteorológica en el sistema del INRH. *Voluntad Hidráulica, 101*(9), 53-59.
115. **Field,** K. G. y Samadpour, M. (2007). Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. *Water Research, 41*, 3517-3538.
116. **Figueiredo,** D., Ferreira, R. V., Cerqueira, M., Condesso, T., Pereira, M. J., Castro, B. B. y Correia, A. (2012). Impact of water quality on bacterioplankton assemblage along Cértima River Basin (central western Portugal) assesed by PCR-DGGE and multivariate analysis. *Environmental Monitoring and Assessment, 184*, 471-485.
117. **Foesel,** B., Nägele, V., Naether, A., Wüst, P. K., Weinert, J., Bonkowski, M., Lohaus, G., Polle, A., Alt, F., Oelmann, Y., Fischer, M., Friedrich, M. W. y Overmann, J. (2013). Determinants of *Acidobacteria* activity inferred from the relative abundances of 16S rRNA transcripts in German grassland and forest soils. *Environmental Microbiology*, 1-18.
118. **Fortunato,** C. S., Eiler, A., Herfort, L., Needoba, J., Peterson, T. D. y Crump, B. C. (2013). Determining indicator taxa across spatial and seasonal gradients in the Columbia River coastal margin. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 7*, 1899-1911.
119. **Fredrickson,** J. K., Kostandarithes, H. M., Li, S. W., Plymale, A. E. y Daly, M. J. (2000). Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(5), 2006-2011.
120. **Freese,** H. M., Karsten, U. y Schumann, R. (2006). Bacterial abundance, activity, and viability in the eutrophic river Warnow, northeast Germany. *Microbial Ecology, 51*, 117-127.
121. **Freitas,** S., Hatosy, S., Fuhrman, J. A., Huse, S. M., Welch, D. B. M., Sogin, M. L. y Martiny, A. C. (2012). Global distribution and diversity of marine *Verrucomicrobia*. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 6*(8), 1499-1505.
122. **Frossard,** A. (2011). *Microbial dynamics during stream ecosystem succession: community structure and enzyme activities.* Doctor of Sciences, University of Neuchâtel, La Chaux-de-Fonds, NE, Switzerland. (DISS. ETH NO. 19820)
123. **Fujii,** M., Kojima, H., Iwata, T., Urabe, J. y Fukui, M. (2011). Dissolved organic carbon as major environmental factor affecting bacterioplankton communities in mountain lakes of Eastern Japan. *Microbial Ecology*. doi: 10.1007/s00248-011-9983-8
124. **Galand,** P. E., Casamayor, E. O., Kirchman, D. L. y Lovejoy, C. (2009). Ecology of the rare microbial biosphere of the Arctic Ocean. *Proceedings of the National Academy of Science USA, 106*, 22427−22432.

125. **García-Armisen,** T., Inceoglu, Ö., Ouattara, N. K., Anzil, A., Verbanck, M. A., Brion, N. y Servais, P. (2014). Seasonal variations and resilience of bacterial communities in a sewage polluted urban river. *PLoS ONE, 9*(3), 1-13.
126. **García-Armisen,** T., Prats, J. y Servais, P. (2007). Comparison of culturable fecal coliforms and *Escherichia coli* enumeration in freshwaters. *Canadian Journal of Microbiology, 53*, 798-801.
127. **Geethanjali,** S. y Subash, A. (2011). Optimization of protease production by Bacillus subtilis isolated from mid gut of freshwater fish Labeo rohita. *World Journal of Fish and Marine Science, 3*(1), 88-95.
128. **Geocuba**. (2004). Estudio de Impacto ambiental. Dragado Desembocadura Río Almendares (pp. 30): Informe Final, Geocuba, Estudios Marinos (Inédito).
129. **Ghai,** R., Mizuno, C. M., Picazo, A., Camacho, A. y Rodriguez-Valera, F. (2014). Key roles for freshwater *Actinobacteria* revealed by deep metagenomic sequencing. *Molecular Ecology, 23*, 6073-6090.
130. **Gharizadeh,** B., Ghaderi, M. y Nyren, P. (2007). Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *Technology, 47*(129-132).
131. **Gich,** F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H. y Overmann, J. (2005). Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(10), 5908-5919.
132. **Gikas,** G. D., Tsihrintzis, V. A., Akratos, C. S. y Haralambidis, G. (2009). Water quality trends in Polyphytos reservoir, Aliakmon River, Greece. *Environmental Monitoring and Assessment, 149*(1-4), 163-181.
133. **Gil,** M. J., Soto, A. M., Usma, J. I. y Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas,efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia, 7*(2), 52-73.
134. **González-Ortegón,** E. y Drake, P. (2012). Effects of freshwater inputs on the lower trophic levels of a temperate estuary: physical, physiological or trophic forcing? . *Aquatic Sciences, 74*, 455-469.
135. **Gorlach-Lira,** K. y Coutinho, H. D. M. (2007). Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology, 38*, 135-141.
136. **Goto,** D. K. y Yan, T. (2011). Effects of land uses on fecal indicator bacteria in the water and soil of a tropical watershed. *Microbes and Environments, 26*(3), 254-260.
137. **Gouvêa,** R., Vieira, F., de Souza, F., Mui, S. y Soares, A. (2010). Influence of the bacterioplankton community of a tropical eutrophic lagoon on the bacterial community of its neighbouring ocean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26*, 1865–1873. doi: 10.1007/s11274-010-0368-9
138. **Govender,** A., Shaik, R., Abbai, N. S. y Pillay, B. (2011). Dehalogenase gene detection and microbial diversity of a chlorinated hydrocarbon contaminated site. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27*, 2407-2414.
139. **Gray,** C. J. y Engel, A. S. (2013). Microbial diversity and impact on carbonate geochemistry across a changing geochemical gradient in a karst aquifer. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 7*, 325-337.
140. **Green,** T. J., Barnes, A. C., Bartkow, M., Gale, D. y Grinham, A. (2012). Sediment bacteria and archaea community analysis and nutrient fluxes in a sub-tropical polymictic reservoir. *Aquatic Microbial Ecology, 65*, 287–302.
141. **Grossart,** H. P., Jezbera, J., Hornak, K., Hutalle, K. M. L., Buck, U. y Simek, K. (2008). Top-down and bottom-up induced shifts in bacterial abundance, production and community composition in an experimentally divided humic lake. *Environmental Microbiology, 10*, 635-652.
142. **Guinebretière,** M.-H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.-L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C. y Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*(Pt 1), 31-40. doi: 10.1099/ijs.0.030627-0

143. **Guo,** L., Hu, Z., Fang, F., Liu, T., Chuai, X. y Yang, L. (2014). Trophic status determines the nirS-denitrifier community in shallow freshwater lakes. *Annals in Microbiology, 64*, 999-1006.
144. **Hachich,** E. M., Di Bari, M., Christ, A. P., Lamparelli, C. C., Ramos, S. S. y Sato, M. I. (2012). Comparison of thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* densities in freshwater bodies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 675-681.
145. **Hahn,** M. W. (2003). Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in three climatic zones. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 5248- 5254.
146. **Hahn,** M. W. (2006). The microbial diversity of inland waters. *Current Opinion in Biotechnology, 17*, 256-261.
147. **Hahn,** M. W. (2009). Description of seven candidate species affiliated with the phylum *Actinobacteria*, representing planktonic freshwater bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59*, 112-117.
148. **Hahn,** M. W., Koll, U., Jezberová, J. y Camacho, A. (2015). Global phylogeography of pelagic *Polynucleobacter* bacteria: Restricted geographic distribution of subgroups, isolation by distance and influence of climate. *Environmental Microbiology, 17*(3), 829-840.
149. **Hahn,** M. W., Lang, E., Brandt, U., Wu, Q. L. y Scheuerl, T. (2009). Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *P. necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subspecies *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 59*, 2002-2009.
150. **Hahn,** M. W., Scheuerl, T., Jezberova, J., Koll, U., Jezbera, J., Simek, K., Vannini, C., Petroni, G. y Wu, Q. L. (2012). The passive yet successful way of planktonic life: genomic and experimental analysis of the ecology of a free-living *Polynucleobacter* population. *PLoS ONE, 7*(3), 1-17.
151. **Halliday,** S. J., Skeffington, R. A., Bowes, M. J., Gozzard, E., Newman, J. R., Loewenthal, M., Palmer-Felgate, E. J., Jarvie, H. P. y Wade, A. J. (2014). The water quality of the River Enborne, UK: Observations from high-frequency monitoring in a rural, Lowland River System *Water, 6*, 150-180.
152. **Hamilton,** P. B., Lavoie, I. y Poulin, M. (2012). Spatial, seasonal and inter-annual variability in environmental characteristics and phytoplankton standing stock of the template, Lowland Rideau River, Ontario, Canada. *River research and applications, 28*, 1551-1566.
153. **Hamilton,** W. P., Kim, M. y Thackston, E. L. (2005). Comparison of commercially available *Escherichia coli* enumeration test: Implications for attaining water quality standars. *Water Research, 39*, 4869-4878.
154. **Haroon,** A. H. y Daboor, S. M. (2009). The role of different macrophyte group in water quality, sediment chemistry and microbial flora of broth irrigation and drainage canals. *World Applied Science, 6*, 1221-1230.
155. **Harrigan,** W. F. y McCance, M. E. (1968). *Métodos de Laboratorio en Microbiología*: Editorial Academia, León, España.
156. **Hartman,** W. H., Richardson, C. J., Vigalys, R. y Bruland, G. L. (2008). Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Science USA, 105*(46), 17842-17847.
157. **Harwood,** V., Levine, A., Scott, T., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. y J., R. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(8), 316-370.
158. **Health and Welfare Canada**. (1992). Guidelines for Canadian Recreational Water. Minister of National Health and Welfare. Otawwa. Canada: Canadian Governement Publishing Centre Supply and Services Canada.
159. **Heinrich,** F., Eiler, A. y Bertilsson, S. (2013). Seasonality and environmental control of freshwater SAR11 (LD12) in a temperate lake. *Aquatic Microbial Ecology, 70*, 33-44.
160. **Herrmann,** M., Saunders, A. M. y Schramm, A. (2008). Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in the rhizosphere of the freshwater macrophyte *Littorella uniflora*. *Applied and Environmental Microbiology, 74*(10), 3279–3283.

161. **Hikmate,** A., Charles, F., Nabil, B. O. y Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews, 35*, 201-232.
162. **Hu,** A. Y., Yang, X. Y., Chen, N. W., Hou, L. Y., Ma, Y. y Yu, C. P. (2014). Response of bacterial communities to environmental changes in a mesoscale subtropical watershed, Southeast China. *Science of Total Environment, 472*, 746-756.
163. **Huang,** S., Chen, C., Wu, Y., Wu, Q. y Zhang, R. (2011). Characterization of depth-related bacterial communities and their relationships with the environmental factors in the river sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27*, 2655-2664.
164. **Hugenholtz,** P., Tyson, G. W., Webb, R. I., Wagner, A. M. y Blackall, L. L. (2001). Investigation of candidate division *TM7*, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(1), 411-419.
165. **Hui-Qing,** C., Xia, Y., Yun-Ying, F., Pei-Min, P., Zheng-Kui, L. y Zed, R. (2006). *In-situ* nitrogen removal from the eutrophic water by microbial-plant integrated system. *J. Zhejiang University Science, 7*, 521-531.
166. **Hunt,** D. E., Ortega-Retuerta, E. y Nelson, C. E. (2010). Connections between bacteria and organic matter in aquatic ecosystems: linking microscale ecology to global carbon cycling. *Eco-DAS VIII, Chapter 7, p. 110-128*.
167. **Huq,** S. M. I. y Alam, M. D. (2005). *A Handbook on analyses of Soil, Plant and Water*: BACER-DU, University of Dhaka.
168. **Huse,** S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A. y Sogin, M. L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS Genetics, 4*, e1000255.
169. **Ibekwe,** A. M., Leddy, M. B., Bold, R. M. y Graves, A. K. (2012). Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 1-12.
170. **Im,** W.-T., Jung, H.-M., Ten, L. N., Kim, M. K., Bora, N., Goodfellow, M., Lim, S., Jung, J. y Lee, S.-T. (2008). *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from freshwater, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 58*, 2348–2353 DOI.
171. **Inceoglu,** Ö., Llirós, M., García-Armisen, T., Crowe, S. A., Michiels, C., Darchambeau, F., Descy, J.-P. y Servais, P. (2015). Distribution of bacteria and archaea in meromictic tropical Lake Kivu (Africa). *Aquatic Microbial Ecology, 74*, 215-233.
172. **Instituto Nacional de Recursos Hidraulicos**. (2002). Informe técnico del estado de la calidad de las aguas en el Rio Almendares (zona comprendida dentro del Parque Metropolitano) (pp. 5). Ciudad Habana: Departamento de Calidad de Agua.
173. **Instituto Nacional de Recursos Hidráulicos**. (2010). Informe técnico Cuencas Hidrográficas de La Habana: Situación del saneamiento ambiental La Habana, Cuba.
174. **Janelidze,** N., Jaiani, E., Lashkhi, N., Tskhvediani, A., Kokashvili, T., Gvarishvili, T., Jgenti, d., Mikashavidze, e., Diasamidze, Narodny, s., Obiso, r., Whitehous, C. A., Huq, A. y Tediashvili, M. (2011). Microbial water quality of the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin, 62*(3), 573-580.
175. **Jezbera,** J., Sharma, A. K., Brandt, U., Doolittle, W. F. y Hahn, M. W. (2009). '*Candidatus* Planktophila limnetica,' an actinobacterium representing one of the most numerically important taxa in freshwater bacterioplankton. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 59*, 2864-2869.
176. **Jing,** L. D., Wu, C. X., Liu, J. T., Wang, H. G. y Ao, H. Y. (2013). The effects of dredging on nitrogen balance in sediment-water microcosms and implications to dredging projects. *Ecology Engineering, 52*, 167-174.
177. **Jun,** L., Tao, T., Xue-bin, L., Jiao-lan, Z., Tong, L., Jin, L., Shu-hui, L., Li-zhen, C., Chun-yang, X., Yong, L. y Yan-li, W. (2009). A spectrophotometric method for determination of chemical oxygen demand using home-made reagents. *Desalination, 239*(1-3), 139-145.
178. **Jung,** S. W., Kwon, O. Y., Yun, S. M., Joo, H. M., Kang, J.-H. y Lee, J. H. (2014). Impacts of dam discharge on river environments and phytoplankton communities in a regulated river system, the lower Han River of South Korea. *Journal of Ecology and Environment, 37*(1), 1-11.

179. **Jurzik,** L., Ahmed, I., Puchert, W., Überla, K. y Wilhelm, M. (2010). Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health., 213*(3), 210-216.
180. **Kalyuzhnaya,** M. G., Lidstrom, M. E. y Chistoserdova, L. (2008). Real-time detection of actively metabolizing microbes by redox sensing as applied to methylotroph populations in Lake Washington. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 2*, 696-706.
181. **Kämpfer,** P., Lodders, N., Huber, B., Falsen, E. y Busse, H.-J. (2008). *Deinococcus aquatilis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 58*, 2803-2806.
182. **Kannel,** P. R., Kanel, S. R., Lee, S. y Lee, Y.-S. (2011). Chemometrics in assessment of seasonal variation of water quality in fresh water systems. *Environmental Monitoring and Assessment, 174*, 529-545.
183. **Kaushal,** S. S. y Belt, K. T. (2012). The urban watershed continuum: evolving spatial and temporal dimensions. *Urban Ecosystems, 15*(2), 409-435.
184. **Kellogg,** C. A. y Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecology Evolution, 21*, 638-644.
185. **Kent,** A. D., Jones, S. E., Lauster, G. H., Graham, J. M., Newton, R. J. y McMahon, K. D. (2006). Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. *Environmental Microbiology, 8*, 1448-1459.
186. **Khan,** A. A., Peiris, P., Sharma, N., Maddini, G., Raghvan, V. y Corteau, C. (2011). Effect on alpha-Amylase production by employing polyethylene glycol at different concentartions in medium. *American Journal of Food Technology, 6*(4), 289-297. doi: 10.3923/ajft.2011.289.297
187. **Khan,** M. N. y Mohammad, F. (2014). Eutrophication: Challenges and Solutions. In Ansari, A. A.y Gill, S. S. (Eds.), *Eutrophication: Causes, Consequences and Control*: Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
188. **Kiely,** P., Haynes, J., Higgins, C., Franks, A., Mark, G., Morrissey, J. y O'Gara, F. (2006). Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant – bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial Ecology, 51*, 257-266.
189. **Kim,** M. K., Schubert, K., Im, W. T., Kim, K. H., Lee, S. T. y J., O. (2007). *Sphingomonas kaistensis* sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing *pufLM* genes,. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57*, 1527-1534.
190. **Kirzhner,** F., Zimmels, Y., Malkovskaja, A. y Starosvetsky, J. (2009). Removal of microbial biofilm on water hyacinth plants roots by ultrasonic treatment. *Ultrasonics, 49*, 153-158.
191. **Kisand,** V. y Wikner, J. (2003). Combining culture-dependent and -independent methodologies for estimation of richness of estuarine bacterioplankton consuming riverine dissolved organic matter. *Applied and Environmental Microbiology, 69* 3607–3616.
192. **Knapp,** C. W., Lima, L., Olivares-Rieumont, S., Bowen, E., Werner, D. y Graham, D. W. (2012). Seasonal variations in antibiotic resistance gene transport in the Almendares River, Havana, Cuba. *Frontiers in Microbiology, 3*, 1-11.
193. **Köhler,** W. (2007). The present state of species within the genera Streptococcus and Enterococcus. *International Journal of Medical Microbiology, 297*(3), 133-150.
194. **Koneman,** E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. y Win, W. C. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas en color (5ta edn Panamericana ed.).
195. **Kowalchuk,** G. A. y Stephen, J. R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology, 55*, 485-529.
196. **Kragelund,** C., Remesova, Z., Nielsen, J. L., Thomsen, T. R., Eales, K. y Seviour, R., *et al.* . (2007). Ecophysiology of mycolic acid-containing *Actinobacteria* (Mycolata) in activated sludge foams. *FEMS Microbiology Ecology, 61*, 174-184.
197. **Kritzberg,** E. S., Langenheder, S. y Lindström, E. S. (2006). Influence of dissolved organic matter source on lake bacterioplankton structure and function-implications for seasonal dynamics of community composition. *FEMS Microbiology Ecology, 56*, 406-417.

198. **Kumar,** A., Singh, V. y Kumar, R. (2006). Characterization of an alkaliphile, Exiguobacterium sp. and it's application in bioremediation. Paper presented at the International conference on extremophiles, Brest, France.
199. **Kümmerer,** K. (2011). Emerging Contaminants. *Treatise on Water Science, 3*, 69-87.
200. **Lanzén,** A., Simachew, A., Gessesse, A., Chmolowska, D., Jonassen, I. y Øvreas, L. (2013). Surprising prokaryotic and eukaryotic diversity, community structure and biogeography of ethiopian soda lakes. *PLoS ONE, 8*(8), 1-12.
201. **Laque,** T., Farjalla, V. F., Rosado, A. S. y Esteves, F. A. (2010). Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. *Microbial Ecology, 59*, 819-829.
202. **Lear,** G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K. y Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology, 65* 463-473.
203. **Lear,** G., Dopheide, A., Ancion, P. y Lewis, G. D. (2011). A comparison of bacterial, ciliate and macroinvertebrate indicators of stream ecological health. *Aquatic Ecology, 45*, 517-727.
204. **Lear,** G., Dopheide, A., Ancion, P., Roberts, K., Washington, V., Smith, J. y et al.(2012). Biofilms in freshwater: their importance for the maintenance and monitoring of freshwater health. In Lear, G.y Lewis, G. D. (Eds.), Microbial Biofilms: Current Research and Applications (pp. 129-151): Caister Academic Press, Norfolk, UK.
205. **Lee,** K. B., Liu, C. T., Anzai, Y., Kim, H., Aono, T. y Oyaizu, H. (2005). The hierarchical system of the 'A*lphaproteobacteria*': description of *Hyphomonadaceae* fam. nov., *Xanthobacteraceae* fam. nov. and *Erythrobacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55*, 1907-1919.
206. **Lee,** S. H., Liu, Q. M., Lee, S. T., Kim, S. C. y Im, W. T. (2012). *Nocardioides ginsengagri* sp. nov., isolated from the soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62*, 591-595.
207. **Lewis,** G. D., Washington, V., Lear, G., Roberts, K., Curran J., Fan, V. y et al. (2010). A Bacterial Community Index (BCI) for New Zealand Streams - Year 1 (pp. 125). Auckland, New Zealand: Auckland Regional Council.
208. **Li,** W. C. y Wong, M. H. (2011). Interaction of Cd/Zn hyperaccumulating plant (*Sedum alfredii*) and rhizosphere bacteria on metal uptake and removal of phenanthrene. *Journal of Hazardous Materials, 209-210*, 421-433.
209. **Liebner,** S., Harder, J. y Wagner, D. (2008). Bacterial diversity and community structure in polygonal tundra soils from Samoylov Island, Lena Delta, Siberia. *International Microbiology, 11*, 195-202.
210. **Lindström,** E. S., Kamst-Van Agterveld, M. P. y Zwart, G. (2005). Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(8201-8206).
211. **Litchman,** E. (2010). Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters, 13*, 1560-1572.
212. **Liu,** Z., Huang, S., Sun, G., Xu, Z. y Xu, M. (2012). Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiology Ecology, 80*, 30-44.
213. **Logue,** J. B., Bürgmann, H. y Robinson, C. T. (2008). Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria. *BioSience, 58*(2), 103-113.
214. **López-López,** J. A., García-Vargas, M. y Moreno, C. (2011). A chemometric approach to the evaluation of atmospheric and fluvial pollutant inputs in aquatic systems: The Guadalquivir River estuary as a case study. *Environmental Pollution, 159*, 1136-1143.
215. **Lopez,** L., Pozo, C., Rodelas, B., Calvo, C., Juarez, B., Martinez-Toledo, M. V. y Gonzalez-Lopez, J. (2005). Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities. *Ecotoxicology, 14*, 299-312.
216. **Lugioyo,** M. (2003). *Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba.* Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, La Habana.

217. **Luo,** W., Chen, H., Lei, A., Lu, J. y Hu, Z. (2014). Estimating Cyanobacteria community dynamics and its relationship with environmental factors. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 11*, 1141-1160.
218. **Lymperopoulou,** D. S., Kormas, K. A. R. y Karagouni, A. D. (2012). Variability of prokaryotic community structure in a drinking water reservoir (Marathonas, Greece). *Microbes and Environments, 27*(1), 1-8.
219. **Llirós,** M., Inceoglu, Ö., García-Armisen, T., Anzil, A., Leporcq, B., Pigneur, L.-M., Viroux, L., Darchambeau, F., Descy, J.-P. y Servais, P. (2014). Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. *PLoS ONE, 9*(12), 1-27.
220. **Llorens-Marès,** T., Yooseph, S., Goll, J., Hoffman, J., Vila-Costa, M., Borrego, C. M., Dupont, C. L. y Casamayor, E. O. (2015). Connecting biodiversity and potential functional role in modern euxinic environments by microbial metagenomics. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 1-14.
221. **Madigan,** M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th ed.). San Francisco, CA: Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.
222. **Madigan,** M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. y Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed.). San Francisco, CA: Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.
223. **Mandic-Mulec,** I., Stefanic, P. y van Elsas, J. D. (2015). Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology Spectrum, 3*(1), 1-24.
224. **Manzari,** C., Fosso, B., Marzano, M., Annese, A., Caprioli, R., D´Erchia, A. M., Gissi, C., Intranuovo, M., Picardi, E., Santamaria, M., Scorrano, S., Sgaramella, G., Stabili, L., Piraino, S. y Pesole, G. (2015). The influence of invasive jellyfish blooms on the aquatic microbiome in a coastal lagoon (Varano, SE Italy) detected by an Illumina-based deep sequencing strategy. *Biological Invasions, 17*, 923-940.
225. **Marchand,** E. O. (2002). *Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo humano en Lima Metropolitana.* Tesis para optar al título profesional de biólogo con mención en Microbiología y Parasitología, Universidad del Perú, Decana de América.
226. **Matcher,** G. F., Dorrington, R. A., Henninger, T. O. y Froneman, P. W. (2011). Insights into the bacterial diversity in a freshwater-deprived permanently open Eastern Cape estuary, using 16S rRNA pyrosequencing analysis. *Water SA, 37*(3), 381-390.
227. **Maughan,** H. y Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution, 11*, 789-797.
228. **McCabe,** G. J. y Wolock, D. M. (2011). Independent effects of temperature and precipitation on modeled runoff in the conterminous United States. *Water Resources Research, 47*(W11522), 1-11.
229. **McMahon,** K. D. y Read, E. K. (2013). Microbial contributions to phosphorus cycling in eutrophic lakes and wastewater. *Annual Review in Microbiology, 67*, 199-219.
230. **Medeiros,** A. O., Missagia, B. S., Brandão, L. R., Callisto, M., Barbosa, F. A. R. y Rosa, C. A. (2012). Water quality and diversity of yeast from tropical lakes and rivers from the Rio Doce Basin in southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 1582-1594.
231. **Medihala,** P. G., Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W. y Korber, D. R. (2012). Effect of pumping on the spatio-temporal distribution of microbial communities in a water well fiel. *Water Research, 46*, 1286-1300.
232. **Meeroff,** D. E., Bloetscher, F., Bocca, T. y Morin, F. (2008). Evaluation of water quality impacts of on-site treatment and disposal systems on urban coastal waters. *Water Air Soil Pollution, 192*, 11-24.
233. **Mena,** K. D. y Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 201*, 71-115.
234. **Menéndez,** I. (2008). Pinar del Río, un lugar para el disfrute y el descanso *Periódico Guerrillero, Órgano del Comité Provincial del Partido Comunista en Pinar del Río, Cuba*.

235. **Miller,** C. D., Child, R., Hughes, J. E., Benscai, M., Der, J. P., Sims, R. C. y Anderson, A. J. (2007). Diversity of soil *Mycobacterium* isolates from three sites that degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology, 102*(1612-1624).
236. **Miravet,** M. E. (2003). *Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadoras ambientales.* Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Bioloógicas, La Habana.
237. **Moat,** A. G., Foster, J. W. y Spector, M. P. (2002). *Microbial Physiology* (4th ed.). New York: Wiley-Liss, Inc.
238. **Mohanty,** S., Choudhury, P. K., Dash, A., Samanta, M. y K., M. N. (2011). Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from freshwater ecosystems. *Journal of Aquaculture Research and Development, 2*(2), 112.
239. **Molozzi,** J., Salas, F., Callisto, M. y Marques, J. C. (2013). Thermodynamic oriented ecological indicators : Application of Eco-Exergy and Specific Eco-Exergy in capturing environmental changes between disturbed and non-disturbed tropical reservoirs. *Ecological Indicators, 24*, 543-551.
240. **Mudryk,** Z. J. y Skórczewski, P. (2006). Enzymatic activity and degradation of organic macromolecules by neustonic and planktonic bacteria in an estuarine lake. *Polish Journal of Ecology, 54*(1), 3-14.
241. **Mukherjee,** S., Kumar, D., Nanda, A. K. y Chakraborty, R. (2013). 16S rRNA gene sequence analyses of the metagenome derived from waters of river Mahananda at Siliguri: An approach to understand bacterial diversity. *Indian Journal of Biotechnology, 12*, 80-87.
242. **Muniesa,** M., Imamovic, L. y Jofre, J. (2011). Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microbial Biotechnology, 4*(6), 725-734.
243. **Muyzer,** G., de Waal, E. y Uitterlinden, A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology, 59*, 695–700.
244. **Nacke,** H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schrumpf, M. y Daniel, R. (2011). Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE, 6* (2), 1-12. doi: e17000. doi:10.1371/journal.pone.0017000
245. **Nathan,** B. (2006). Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. *Free Radical Biology and Medicine, 41*(5), 691-701
246. **Navarro,** M. B., Balseiro, E. y Modenutti, B. (2014). Bacterial community structure in Patagonian Andean Lakes above and below Timberline : from community composition to community function. *Environmental Microbiology*. doi: DOI 10.1007/s00248-014-0439-9
247. **Nawel,** B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H. y Duchiron, F. (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by Jonesia denitrificans isolated in Algerian soil. *Process Biochemistry, 46*, 519-525.
248. **Newton,** R. J., Bootsma, M. J., Morrison, H. G., Sogin, M. L. y McLellan, S. L. (2013). A microbial signature approach to identify fecal pollution in the waters off an urbanized coast of Lake Michigan. *Microbial Ecology, 65*, 1011-1023.
249. **Newton,** R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D. y Bertilsson, S. (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75*(1), 14-49.
250. **Newton,** R. J. y McLellan, S. L. (2015). A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. *Frontiers in Microbiology, 6: 1028.* doi: 10.3389/fmicb.2015.01028
251. **Newton,** R. J., Mclellan, S. L., Dila, D. K., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Eren, A. M. y Sogin, M. L. (2015). Sewage reflects the microbiomes of human populations. *mBio, 6*(2), 1-9.
252. **Newton,** R. J. y McMahon, K. D. (2011). Seasonal differences in bacterial community composition following nutrient additions in a eutrophic lake. *Environmental Microbiology, 13*, 887-899.

253. **Niekerk,** H. V., Silberbauer, M. J. y Maluleke, M. (2014). Geographical differences in the relationship between total dissolved solids and electrical conductivity in South African rivers. *Water SA, 40*(1), 133-137.
254. **Noble,** R. T., Leecaster, M. K., McGee, C. D., Weisberg, S. B. y Ritter, K. (2004). Comparison of bacterial indicator analysis methods in stormwater-affected coastal waters. *Water Research, 38*, 1183-1188.
255. **Norma Cubana 22**. (1999). *NC 22: Lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios*. Cuba.
256. **Norma Cubana 1021**. (2014). *NC 1021: Higiene Comunal-Fuentes de abastecimiento de agua-Calidad y protección sanitaria*. Cuba.
257. **Núñez,** R. R., Lorenzo, M. y Ortiz, E. (2010). Biorremediación de la contaminación de petróleo en el mar. *Revista Electrónica Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo, 19*.
258. **Odonkor,** S. T. y Ampofo, J. K. (2013). *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. *Microbiology Research, 4*(2), 5-11.
259. **Odum,** E. P. (Ed.). (1988). *Ecologia*. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.422.
260. **Oficina de Normalización**. (2005). Sistema de Normas de Protección del Medio Ambiente *1ra Edición* (pp. 6-10): Oficina Nacional de Normalización.
261. **Oh,** S., Caro-Quintero, A., Tsementzi, D., DeLeon-Rodriguez, N., Luo, C., Poretsky, R. y Konstantinidis, K. T. (2011). Metagenomic insights into the evolution, function, and complexity of the planktonic microbial community of Lake Lanier, a temperate freshwater ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology, 77*(17), 6000-6011.
262. **Okeke,** B. C., Laymon, J., Oji, C. y Crenshaw, S. (2007). *Rapid bioreduction of hexavalent chromium in water by Exiguobacterium sp. GS1.* Paper presented at the ASM general 107th meeting, Toronto, ON, Canada.
263. **Økstad,** O. A. y Kolstø, A.-B. (2011). Genomics of *Bacillus* species genomics of foodborne bacterial pathogens. In Wiedmann, M.y Zhang, W. (Eds.), (pp. 29-53): Springer New York.
264. **Oliveira de Aguiar,** A., Borges, C. A., Hora, J., Anastácio, R. y Gonzaga, M. (2013). Physical and chemical characteristics of water from the hydrographic basin of the Poxim River, Sergipe State, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment, 185*, 4417-4426.
265. **Ouattara,** N. K., Garcia-Armisen, T., Anzil, A., Brion, N. y Servais, P. (2014). Impact of wastewater release on the faecal contamination of a small urban river: The Zenne River in Brussels (Belgium). *Water Air Soil Pollution, 225*(2043), 1-12.
266. **Ouffoué,** K. S., Salla, M., Kicho, D. Y., Soro, D., Da, K. P. y TONZIBO, Z. F. (2013). Water quality assessment of the coastal tropical river'Sboubo (Côte d'Ivoire): physico-chemical and biological aspects. *Journal of Environment Pollution and Human Health, 1*(2), 9-15.
267. **Paes,** F. A., Hissa, D. C., Angelim, A. L., Pinto, N. W., Grangeiro, T. B. y Melo, V. M. M. (2012). Diversity of a chlorine-resistant *Bacillus* population isolated from a wastewater treatment station. *Water Environment Research, 84*(3), 274-281.
268. **Pajares,** S., Bonilla-Rosso, G., Travisano, M., Eguiarte, L. E. y Souza, V. (2012). Mesocosms of aquatic bacterial communities from the Cuatro Cienegas Basin (Mexico): A tool to test bacterial community response to environmental stress. *Microbial Ecology, 64*, 346-358.
269. **Pandey,** A. y Gupta, L. (2011). Effect of UV radiations on enzyme kinetics of extracellular amylases Isolated from *Bacillus subtilis*. *Advanced Biotechnology, 11*, 20-24.
270. **Parfenova,** V. V., Gladkikh, A. S. y Belykh, O. I. (2013). Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal. *Microbiology, 82*(1), 91-101.
271. **Parveen,** B., Ravet, V., Djediat, C., Mary, I., Quiblier, C., Debroas, D. y Humbert, J. F. (2013). Bacterial communities associated with *Microcystis* colonies differ from free-living communities living in the same ecosystem *Environmental Microbiology, 5*(5), 716-724.
272. **Pavel,** A. B. y Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics, 13*(9), 1-6.
273. **Pedrós-Alió,** C. (2006). Marine microbial diversity: Can it be determined? *Trends in Microbiology, 14*, 257−263.
274. **Pedrós-Alió,** C. (2012). The rare bacterial biosphere. *Annual Review Maritime Science, 4*, 449−466.

275. **Peña,** B., Fagundo, J. R., Delgado, F. R. y Orbera, L. (2001). Caracterización de fuentes minerales en el Distrito Físico Geográfico Pinar del Río, Cuba. *IV Congreso de Geología y Minería, Ingeniería Geológica e Hidrogeología, Memorias GEOMIN 2001, ISBN 959-7117-10-X* (pp. 9).
276. **Pérez,** R. y Valdés, H.(2011). Recursos Hídricos Cuba 2011. In García, M. J.y Pérez, R. (Eds.), Instituto Nacional de Recursos Hidraúlicos (pp. 42): Fundación FENSA y BID.
277. **Peter,** H. (2011). *Diversity and ecosystem functioning: redundancy and resilience in freshwater bacterial communities*. Acta Universitatis Upsaliensis. Digital comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of Science and Technology (882, ISBN 978-91-554-8223-7). Uppsala.
278. **Piccini,** C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R. y Pernthaler, J. l. (2006). Blooms of single bacterial species in a coastal lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology, 72*, 6560-6568.
279. **Pollet,** T., Tadonléké, R. D. y Humbert, J. F. (2011). Spatiotemporal changes in the structure and composition of a less-abundant bacterial phylum (Planctomycetes) in two perialpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology, 77*(14), 4811-4821.
280. **Ponce-Terashima,** R., Koskey, A. M., Reis, M. G., McLellan, S. L. y Blanton, R. E. (2014). Sources and distribution of surface water fecal contamination and prevalence of schistosomiasis in a brazilian village. *PLoS Neglected Tropical Disease, 8*(10), 1-10.
281. **Purnima,** D., Anil, K., Abha, J., Tushya, K., Saxsena, A., Manoharan, S., Dayal, M. y Kumar, R. (2008). Quick and reliable estimation of BOD load of beverage industrial wastewater by developing BOD biosensor. *Sensors and Actuators B. Chemical, 133*(2), 478-483.
282. **Ramette,** A. (2009). Quantitative community fingerprinting methods for estimating the abundance of operational taxonomic units in natural microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology, 75*, 2495-2505.
283. **Ramkumar,** V. S., Kannapiran, E. y Palanisamy, M. (2011). Prevalence and distribution of total heterotrophic bacteria from Kottaipattinam coast, Palk Strait, Southeast coast of India. *Archives of Applied Science Research, 3*(5), 593-598.
284. **Rapala,** J., K.A. Berg, Lyra, C., Niemi, R. M., Manz, W., Suomalainen, S., Paulin, L. y Lahti, K. (2005). *Paucibacter toxinivorans* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades cyclic cyanobacterial hepatotoxins microcystins and nodularin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55*, 1563-1568.
285. **Rashed,** M. N. y Younis, M. (2012). Physico-chemical and bacterial characteristics of water quality in three villages west of Lake Nasser, Egypt. *Clean – Soil, Air, Water, 40*(11), 1229-1235.
286. **Read,** D. S., Gweon, H. S., Bowes, M. J., Newbold, L. K., Field, D., Bailey M.J. y Griffiths, R. I. (2015). Catchment-scale biogeography of riverine bacterioplankton. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 9*, 516-526.
287. **Reche,** M. H. y Fiuza, L. M. (2005). Distribution and density of bacteria in subtropical flooded rice growing areas in Brazil. *Brazilian Journal of Biology, 65*(3), 503-511.
288. **Ribeiro,** D. N., Aparecido, A., Lajarim, R. y Sergio, P. (2014). Electrical conductivity and emerging contaminant as markers of surface freshwater contamination by wastewater. *Science of The Total Environment, 484*, 19-26.
289. **Roh,** S. W., Abell, G. C. J., Kim, K.-H., Nam Y-D. y J-W., B. (2010). Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends in Biotechnology, 28*(6), 291-299.
290. **Romeu,** B., Lugo, D. y Rojas, N. M. (2011). Riesgo asociado a aguas contaminadas del río Almendares en La Habana (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental, 11*, 715-724
291. **Romeu,** B., Quintero, H., Larrea, J. A., Lugo, D., Rojas, N. y Heydrich, M. (2015). Experiencias en el monitoreo ambiental: contaminación de ecosistemas dulceacuícolas de La Habana (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental, 15*(3), 1325-1335.
292. **Rossen,** A., Rodríguez, M. I., Ruibal, A. L., Fortunato, M. S., Bustamante, A., Ruiz, M., Angelaccio, C. y Korol, S. (2008). Indicadores bacterianos de contaminación fecal en el embalse San Roque (Córdoba, Argentina). *Higiene y Sanidad Ambiental, 8*(325-330).

293. **Roy,** K., Chari, M. S., Gaur, S. R. y Thakur, A. (2014). Ecological dynamics and hydrobiological correlations in freshwater ponds– recent researches and application. *International Journal of Environmental Biology, 4*(2), 112-118.
294. **Ruiz-González,** C., Proia, L., Ferrera, I., Gasol, J. M. y Sabater, S. (2013). Effects of large river dam regulation on bacterioplankton community structure. *FEMS Microbiology Ecology, 84*, 316-331.
295. **Ryder,** D. S. y Miller, W. (2005). Setting goals and measuring success: linking patters and processes in stream restoration. *Hydrobiologia, 552*, 147-158.
296. **Sakami,** T. (2008). Seasonal and spatial variation of bacterial community structure in river-mouth areas of Gokasho Bay, Japan. *Microbes and Environments, 23*(4), 277-284. doi: 10.1264/jsme2.ME08513
297. **Salgado,** I. (2012). *Diversidad de las bacterias rizosféricas asociadas a plantas de Typha dominguesis en humedales del río Almendares.* Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Cuba.
298. **Santana,** M. A., Moccia-V, C. C. y Gillis, A. E. (2008). *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *Journal of Microbiological Methods, 75*(2), 357-358. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2008.06.008
299. **Santiago-Rodriguez,** T. M., Tremblay, R. L., Toledo-Hernandez, C., Gonzalez-Nieves, J. E., Ryu, H., Santo Domingo, J. W. y Toranzos, G. A. (2012). Microbial quality of tropical inland waters and effects of rainfall events. *Applied and Environmental Microbiology, 78*(15), 5160-5169.
300. **Schauer,** M., Kamenik, C. y Hahn, M. W. (2005). Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). *Applied and Environmental Microbiology, 71*, 5900-5907.
301. **Schmitz,** M. L. y Abreu, P. C. (2009). Spatiotemporal variation of bacterial assemblages in a shallow subtropical coastal lagoon in southern Brazil. *Microbial Ecology, 58*, 140-152.
302. **Schultz,** G. E., Kovatch, J. J. y Anneken, E. M. (2013). Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing. *Aquatic Microbial Ecology, 70*, 169-179.
303. **Sharma,** A. K., Sommerfeld, K., Bullerjahn, G. S., Matteson, A. R., Wilhelm, S. W., Jezbera, J., Brandt, U., Doolittle, W. F. y Hahn, M. W. (2009). Actinorhodopsin genes discovered in diverse freshwater habitats and among cultivated freshwater *Actinobacteria*. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 3*, 726-737.
304. **Shashidhar,** R. y Bandekar, J. R. (2009). *Deinococcus piscis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a marine fish. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 59*, 2714-2717.
305. **Shimao,** M. (2001). Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology, 12* (3), 242−247.
306. **Shishir,** A., Roy, A., Islam, N., Rahman, A., Khan, S. N. y Hoq, M. (2014). Abundance and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Bangladesh and their cry genes profile. *Frontiers in Environmental Science, 2*, 1-10.
307. **Sho,** M., Hamel, C. y Greer, C. W. (2004). Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp strain S65. *FEMS Microbiology Ecology, 48*(2), 209-220.
308. **Sigee,** D. (Ed.). (2005). *Freshwater Microbiology: Biodiversity and Dynamic Interactions of Microorganisms in the Aquatic Environment*. England: John Wiley & Sons Ltd.
309. **Sikora,** A., Wojtowicz-Sienko, J., Piela, P., Zielenkiewicz, U., Tomczyk-Zak, K., Chojnacka, A., Sikora, R., Kowalczyk, P., Grzesiuk, E. y Blaszczyk, M. (2011). Selection of bacteria capable of dissimilatory reduction of Fe(III) from a long- term continuous culture on molasses and their use in a microbial fuel cell. *Journal of Microbiology Biotechnology, 21*(3), 305-316.
310. **Siqueira,** J. F., Fouad, A. F. y Rôças, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology, 4*, 1-15. doi: 10.3402/jom.v4i0.10743
311. **Slade,** D. y Radman, M. (2011). Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75*(1), 133-191.

312. **Smith,** D. J., Timonen, H. J., Jaffe, D. A., Griffin, D. W., Birmele, M. N., Perry, K. D., Ward, P. D. y Roberts, M. S. (2013). Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds. *Applied and Environmental Microbiology, 79*, 1134-1139.
313. **Smith,** D. M., Snow, D. E., Rees, E., Zischkau, A. M. y Hanson, J. D. (2010). Evaluation of the bacterial diversity of pressure ulcers using bTEFAP pyrosequencing. *BMC Medical Genomics, 3*, 41.
314. **Sogin,** M. L., Morrison, H. G., Huber, J. A., Mark, W. D., Huse, S. M. y Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored ‘‘rare biosphere’’. *Proceedings of the National Academy of Science USA, 103*, 12115-12120.
315. **Song,** G. C., Yasir, M., Bibi, F., Chung, E. J., Jeon, C. O. y Chung, Y. R. (2011). *Nocardioides caricicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from a halophyte, *Carex scabrifolia* Steud. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61*, 105-109.
316. **Sorokin,** D. Y., Lücker, S., Vejmelkova, D., Kostrikina, N. A., Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., Damste, J. S. S., Paslier, D. L., Muyzer, G., Wagner, M., van Loosdrecht, M. C. M. V. y Daims, H. (2012). Nitrification expanded : discovery , physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum *Chloroflexi*. *The International Society for Microbial Ecology Journal, 6*, 2245–2256.
317. **Soufiane,** B. y Côté, J.-C. (2009). Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek, 95*, 33-45.
318. **Spietz,** R. L., Williams, C. M., Rocap, G. y Horner-Devine, M. C. (2015). A dissolved oxygen threshold for shifts in bacterial community structure in a seasonally hypoxic estuary. *PLoS ONE, 10*(8), 1-18.
319. **Srinivasan,** S., Kim, M. K., Lim, S., Joe, M. y Lee, M. (2012). *Deinococcus daejeonensis* sp. nov., isolated from sludge in a sewage disposal plant. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 62*, 1265-1270.
320. **Staley,** C., Unno, T., Gould, T. J., Jarvis, B., Phillips, J., Cotner, J. B. y Sadowsky, M. J. (2013). Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River. *Journal of Applied Microbiology, 115*, 1147--1158.
321. **StatSoft**. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0, from www. statsoft.com
322. **Steenbergh,** A. K., Bodelier, P. L. E., Slomp, C. P. y Laanbroek, H. J. (2014). Effect of redox conditions on bacterial community structure in Baltic Sea sediments with contrasting phosphorus fluxes. *PLoS ONE, 9*(3), e92401. doi: 10.1371/journal.pone.0092401
323. **Stockner,** J., Callieri, C. y Cronberg, G.(2000). Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes. In Whitton, B. A.y Potts, M. (Eds.), The Ecology of *Cyanobacteria*. Their diversity in time and space (Vol. I, pp. 195-238). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
324. **Swiecicka,** I., Bideshi, D. K. y Federici, D. A. (2008). Novel Isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. thuringiensis that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology, 74*(4), 923-930.
325. **Tang,** X., Gao, G., Qin, B., Zhu, L., Chao, J., Wang, J. y Yang, G. (2009). Characterization of bacterial communities associated with organic aggregates in a large, shallow, eutrophic freshwater lake (Lake Taihu, China). *Microbial Ecology, 58*, 307-322.
326. **Tang,** Y., Tao, P., Tan, J., Mu, H., Peng, L., Yang, D., Tong, S. y Chen, L. (2014). Identification of bacterial community composition in freshwater aquaculture system farming of *Litopenaeus vannamei* reveals distinct temperature-driven patterns. *International Journal of Molecular Sciences, 15*, 13663-13680.
327. **Tanner,** C. C., Kadlec, R. H., Gibbs, M. M., Sukias, J. P. S. y Nguyen, M. L. (2002). Nitrogen processing gradients in subsurface-flow treatment wetlands-influence of wastewater characteristics. *Ecological Engineering, 18*, 499-520.
328. **Tanor,** E. B., Ts’enoli, S. y George, M. J. (2014). Physico-chemical assessment of pollution in the Caledon River around Maseru city, Lesotho. *Eurasian Chemical Bulletin, 3*(8), 776-782.

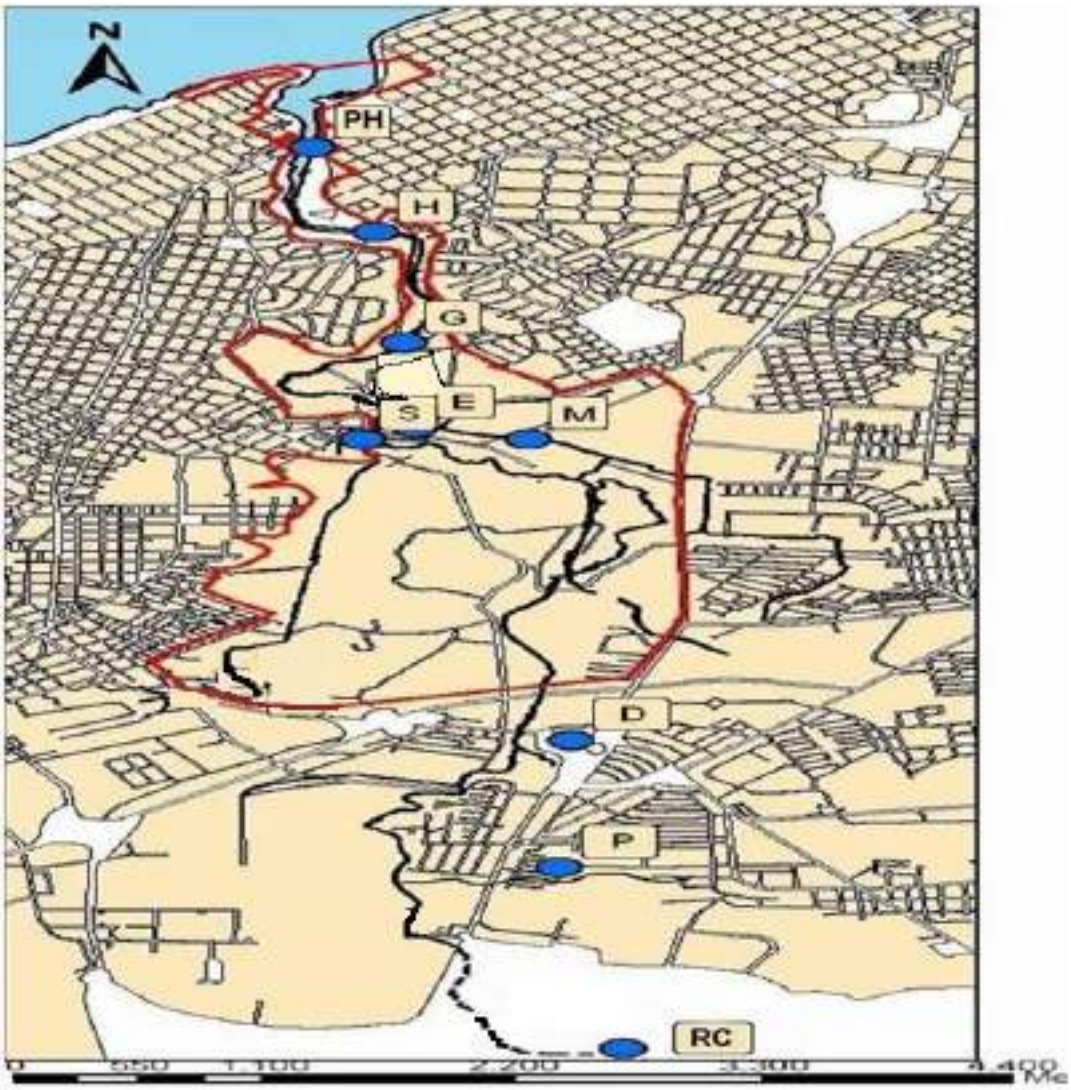
329. **Teitzel,** G. M. y Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 2313-2320.
330. **ter Braak,** C. J. F. y Šmilauer, P. (2002). CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Power, M. (Ed.)
331. **Thompson,** M. Y., Brandes, D. y Kney, A. D. (2012). Using electronic conductivity and hardness data for rapid assessment of stream water quality. *Journal of Environmental Management, 104*, 152-157.
332. **Tiquia,** S. M. (2011). Extracellular hydrolytic enzyme activities of the heterotrophic microbial communities of the Rouge River: an approach to evaluate ecosystem response to urbanization. *Microbial Ecology, 62*, 679-689.
333. **Torres,** G. (2004). *Detección y cuantificación de bacterias coliformes en las aguas del río Almendares.* Trabajo de diploma. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana.
334. **Tóth,** E. M., Kéki, Z., Homonnay, Z. G., Borsodi, A. K., Márialigeti, K. y Schumann, P. (2008). *Nocardioides daphniae* sp. nov., isolated from *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58*, 78-83.
335. **Tourasse,** N. J., Helgason, E., Okstad, O. A., Hegna, I. K. y Kolsto, A. B. (2006). The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology, 101*, 579-593.
336. **Tsegaye,** T., Sheppard, D., Islam, K. R., Johnson, A., Tadesse, W., Atalay, A. y Marzen, L. (2006). Development of a chemicla index as a measure of in-stream water quality in response to land-use cover changes. *Water Air and Soil Pollution, 174*, 161-179.
337. **Tsuboi,** S., Yamamura, S., Imai, A., Satou, T. y Iwasaki, K. (2014). Linking temporal changes in bacterial community structures with the detection and phylogenetic analysis of neutral metalloprotease genes in the sediments of a hypereutrophic lake. *Microbes and Environments, 29*(3), 314-321.
338. **USEPA**. (2002). Implementation guidance for ambient water quality criteria for bacteria (draft). EPA-823-B-003, Office of Water, Washington, DC.
339. **Valenzuela,** A. y Bacaicoa, S. M. (1994). Curas balnearias y climáticas. Talasoterapia y Helioterapia. In Complutense (Ed.), (pp. 688). Madrid.
340. **Varol,** M., Gökot, B., Bekleyen, A. y Şen, B. (2012). Water quality assessment and apportionment of pollution sources of Tigris River (Turkey) using multivariate statistical techniques—a case study. *River research and applications, 28*, 1428–1438.
341. **Vaz-Moreira,** I., Egas, C., Nunes, O. C. y Manaia, C. M. (2011). Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie van Leeuwenhoek, 100*, 245-257.
342. **Vaz-Moreira,** I., Nunes, O. C. y Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews, 38*, 761-778.
343. **Vergaray,** G., Méndez, C. R., Morante, H. Y., Heredia, V. I. y Béjar, V. R. (2007). *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, 10*(20), 6-82.
344. **Vermelho,** A. B., Ferreira, E., Ximenes, E., Ferrara, M. A. y Bon, S.(2013). Diversity and Biotechnological Applications of Prokaryotic Enzymes. In Rosenberg, E. (Ed.), The Prokaryotes. Applied Bacteriology and Biotechnology (pp. 214-240): Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-31331-8_112.
345. **Vernberg,** W. B., Scott, G. I., Strozier, S. H., Bemiss, J. y Daugomah, J. W.(1996). The effects of urbanization on human and ecosystem health. In Vernberg, F. J., Vernberg, W. B.y Siewicki, T. (Eds.), Sustainable Development in the Southeastern Coastal Zone, Columbia (pp. 221-239): SC University of South Carolina Press.
346. **Vishnivetskaya,** T. A., Kathariou, S. y Tiedje, J. M. (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles, 13*, 541-555.
347. **W.H.O**. (2003). Guidelines for safe recreational water environments. *Coastal and fresh waters* (Vol. 1). Geneva.

348. **Wagner,** M. y Loy, A. (2002). Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Microbiology, 13*, 218-227.
349. **Wang,** W., Mao, J., Zhang, Z. D., Tang, Q. Y., Xie, Y. Q., Zhu, J., Zhang, L. X., Liu, Z. H., Shi, Y. H. y Goodfellow, M. (2010). *Deinococcus wulumuqiensis* sp. nov., and *Deinococcus xibeiensis* sp. nov., isolated from radiation-polluted soil. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 60*, 2006- 2010.
350. **Wang,** Y., Yang, J., Liu, L. y Yu, Z. (2015). Quantifying the effects of geographical and environmental factors on distribution of stream bacterioplankton within nature reserves of Fujian, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13. doi: 10.1007/s11356-015-4308-y
351. **Warnecke,** F. y Hugenholtz, P. (2007). Building on basic metage- nomics with complementary technologies. *Genome Biology, 8*(12), 231-235.
352. **Warnecke,** F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J. S. y Pernthaler, J. (2005). Abundances, identity and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology, 71*, 5551-5559.
353. **Washington,** V. J., Lear, G., Neale, M. W. y Lewis, G. D. (2013). Environmental effects on biofilm bacterial communities: a comparison of natural and anthropogenic factors in New Zealand streams. *Freshwater Biology, 58*, 2277-2286.
354. **Watanabe,** K., Komatsu, N., Ishii, Y. y Negishi, M. (2009). Effective isolation of bacterioplankton genus *Polynucleobacter* from fresh- water environments grown on photochemically degraded dissolved organic matter. *FEMS Microbiology Ecology, 67*, 57-68.
355. **Wondie,** A., Mengistu, S., Vijverberg, J. y Dejen, E. (2007). Seasonal variation in primary production of a large high altitude tropical lake (Lake Tana, Ethiopia): effects of nutritient availability and water transparency. *Aquatic Ecology, 41*(2), 195 - 207.
356. **Wu,** P., Wang, Y.-S., Sun, F.-L., Wu, M.-L. y P, Y.-l. (2014). Bacterial polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenases in the sediments from the Pearl River estuary, China. *Applied Microbiology and Biotechnology, 98*, 875-884.
357. **Wu,** Q. L. y Hahn, M. W. (2006). Differences in structure and dynamics of *Polynucleobacter* communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiology Ecology, 57*, 67-79.
358. **Xia,** N., Xia, X., Liu, T., Hu, L., Zhu, B., Zhang, X. y Dong, J. (2014). Characteristics of bacterial community in the water and surface sediment of the Yellow River, China, the largest turbid river in the world. *Journal of Soil and Sediments, 14*, 1894-1904.
359. **Yamahara,** K. M., Walters, S. P. y Boehm, A. B. (2009). Growth of enterococci in unaltered, unseeded beach sands subjected to tidal wetting. *Applied and Environmental Microbiology, 75*, 1517-1524.
360. **Yannarell,** A. C. y Kent, A. D. (2009). Bacteria, distribution and community structure. *Encyclopedia of Inland Waters, 3*, 201-210
361. **Yi,** N., Gao, Y., Long, X.-H., Zhang, Z.-Y., Guo, J.-Y., Shao, H.-B., Zhang, Z.-H. y Yan, S.-H. (2013). *Eichhornia crassipes* cleans wetlands by enhancing the nitrogen removal and modulating denitrifying bacteria community. *Clean – Soil, Air, Water, 41*(9999), 1-10.
362. **Yoo,** S. H., Weon, H. Y., Kim, S. J., Kim, Y. S., Kim, B. Y. y Kwon, S. W. (2010). *Deinococcus aerolatus* sp. nov. and *Deinococcus aerophilus* sp. nov., isolated from air samples. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 60*, 1191- 1195.
363. **Yuan,** M., Zhang, W., Dai, S., Wu, J., Wang, Y., Tao, T., Chen, M. y Lin, M. (2009). *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation- resistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 59*, 1513-1517.
364. **Zhang,** L., Wang, S. y Wu, Z. (2014). Coupling effect of pH and dissolved oxygen in water column on nitrogen release at water–sediment interface of Erhai Lake, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, 149*(0), 178-186. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2014.08.009
365. **Zhang,** S. Y., Zhou, Q. H., Xu, D., Lin, J. D., Cheng, S. P. y Wu, Z. B. (2010). Effects of sediment dredging on water quality and zooplankton community structure in a shallow of eutrophic lake. *Journal of Environmental Science in China, 22*, 218-224.

366. **Zhong,** F., Wu, J., Dai, Y., Yang, L., Zhang, Z., Cheng, S. y Zhang, Q. (2015). Bacterial community analysis by PCR-DGGE and 454-pyrosequencing of horizontal subsurface flow constructed wetlands with front aeration. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*, 1499-1512.
367. **Zhong,** J., Fan, C., Zhang, L., Hall, E., Ding, S., Li, B. y Liu, G. (2010). Significance of dredging on sediment denitrification in Meiliang Bay, China: a yearlong simulation study. *Journal of Environmental Science in China, 22*, 68-75.
368. **Zhou,** H. W., Guo, C. L., Wong, Y. S. y Tam, N. F. Y. (2006). Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiology Letters, 262*(2), 148-157.
369. **Zhou,** M. Y., Chen, X. L., Zhao, H. L., Dang, H. Y., Luan, X. W., Zhang, X. Y., He, H. L., Zhou, B. C. y Zhang, Y. Z. (2009). Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea. *Microbial Ecology, 58*, 582-590.
370. **Zhu,** D., Tanabe, S.-H., Yang, C., Zhang, W. y Sun, J. (2013). Bacterial Community Composition of South China Sea Sediments through Pyrosequencing-Based Analysis of 16S rRNA Genes. *PLoS ONE, 8*(10), e78501. doi: 10.1371/journal.pone.0078501
371. **Zumdahl,** S. S. (1993). Chemistry 3rd Edition. D.C. Heath & Co. (pp. 645).
372. **Zwart,** G., Crump, B. C., Agterveld, M., Hagen, F. y Han, S. K. (2002). Typical freshwater bacteria: An analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology, 28*, 141-155.

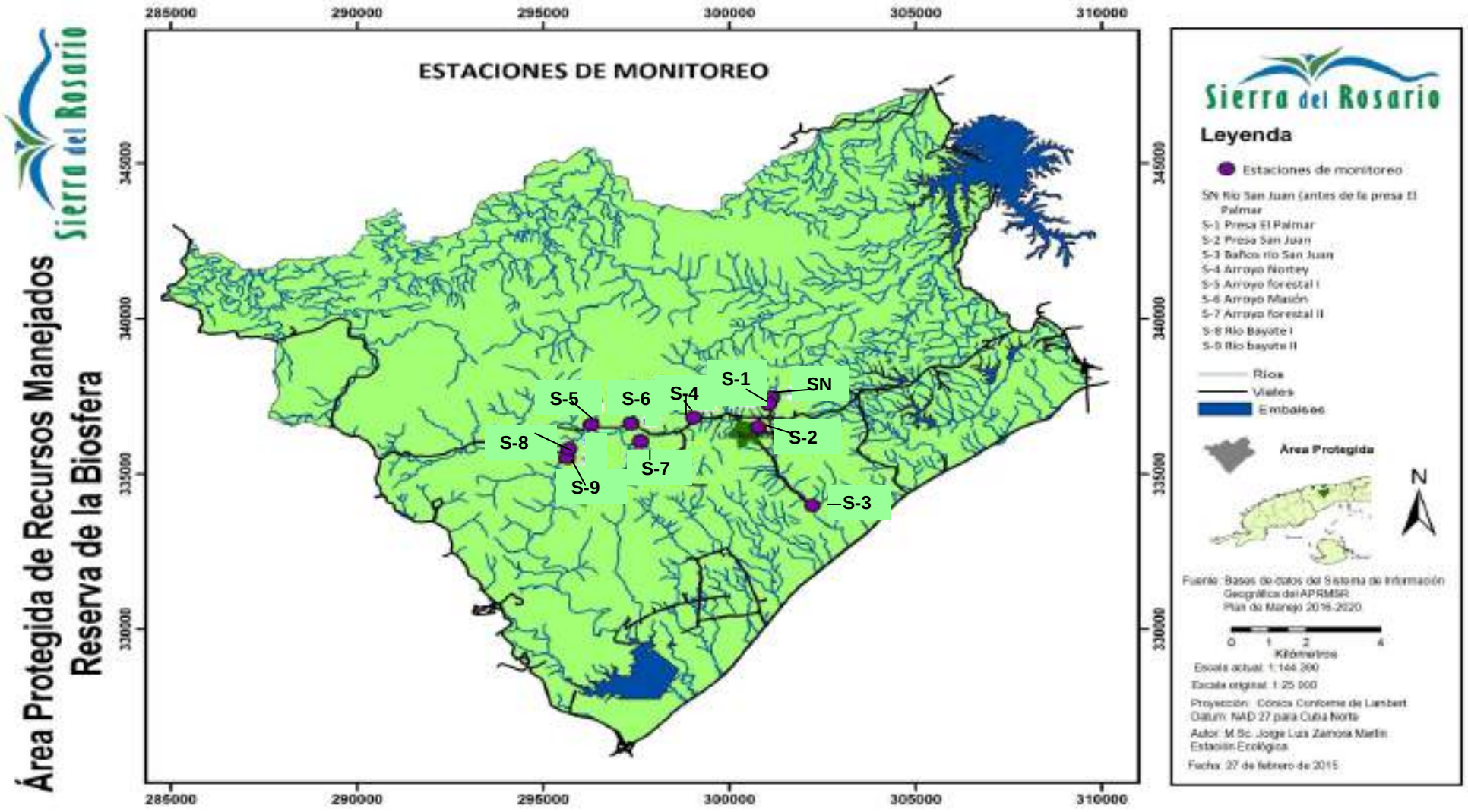
Anexos

ANEXO 1. Mapas de las estaciones de muestreo en los ríos Almendares y San Juan



Estaciones de muestreo en el río Almendares

RC: Río Cristal; **P:** arroyo Paila; **D:** Elevados 100 y Boyeros; **S:** arroyo Santoyo; **E:** Puentes Grandes avenida 51; **M:** arroyo Mordazo; **G:** Puente de Piedra; **H:** Puente Almendares calle 23; **PH:** Puente de Hierro.



Estaciones del Complejo Turístico "Las Terrazas" localizado en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario

Producción Científica del Autor

Producción Científica del Autor sobre el Tema de la Tesis

Publicaciones

1. J. Prats, T. García-Armisen, **J. Larrea** and P. Servais (2008): Comparison of culture-based methods to enumerate *Escherichia coli* in tropical and temperate freshwaters. Letters in Applied Microbiology 46 (2), 243-248.

2. **J.A. Larrea,** M.M Rojas, D. Lugo, M. Heydrich. (2013): Behaviour of fecal contamination indicators in waters of the Tourist Complex “Las Terrazas”, Pinar del Río, Cuba. In: Farfán H., Corvea JL, Bustamante ID, LaMoreaus JW, editors. Management of Water Resources in Protected Areas. 1st Ed. New York/ Heidelberg. p. 263-270. ISBN: 978-3-642-16330-2.

3. **J.A. Larrea**, M.M Rojas, T. Bacchetti, D. Lugo, M. Heydrich, A. Estéve, K. Boltes. (2014): Influencia de la contaminación química y fecal sobre la estructura de las comunidades bacterianas del río Almendares, La Habana, Cuba. Investigación y Saberes, 3 (3): 1-11. (Indexada en Latindex)

4. **J. Larrea**, M. Rojas, M. Heydrich, B. Romeu, N. Rojas y D. Lugo. (2009): Evaluación de la calidad microbiológica de las aguas del Complejo Turístico “Las Terrazas”, Pinar del Río (Cuba). Revista Higiene y Sanidad Ambiental, 9: 492-504. (Revista de la Universidad de Granada, España)

5. **J. Larrea**, M. Rojas, M. Heydrich, B. Romeu, N. Rojas y D. Lugo. (2010): Empleo del medio agar Chromocult en la evaluación de la calidad microbiológica en ecosistemas acuáticos tropicales. Revista Higiene y Sanidad Ambiental, 10: 535-543. (Revista de la Universidad de Granada, España)

6. M. E. Carballo, M. Heydrich, N. Rojas, I. Salgado, B. Romeu, A. M. Manzano, **J. Larrea**, O. Domínguez, A. Martínez, M.I. Sánchez, M. Cruz, G. Guerra, M. Rojas, M. Ramos. (2011): Impact of microbial and chemical pollution in Cuban freshwater ecosystems: strategies for environmental recovery. Biotecnología Aplicada 28(4): 276-279.

7. **J**. **Larrea**, M. Rojas, B. Romeu, N. Rojas, M. Heydrich. (2013): Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: Revisión de la literatura. Revista CNIC Ciencias Biológicas; Vol 44, No. 3, Septiembre-diciembre, pp: 24-34.

8. **J. Larrea**, M. Rojas, M. Heydrich y D. Lugo. (2010): Aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana cultivable en el río Almendares. Revista CNIC Ciencias Biológicas, Vol 41 Número Especial. ISSN: 0253-5688.

Publicaciones en GenBank (simultáneamente disponibles en EMBL, Europa y DNA Data Bank, Japón):

1. **Larrea Murrell, J.A.**, Rojas Badia, M.M., Bacchetti de Gregoris, T., Boltes Espinola, A.K., Heydrich Perez, M., Lugo Moya, D., Garcia Soto, I. and Esteve Nunez, A. Characterization of extracellular enzymes producing bacteria from a polluted freshwater ecosystem: Almendares River, Havana, Cuba. Sequences of 16SrDNA of *Bacillus subtilis*, PaP32, Pa57 strains (670 bp). Genbank Accession number: KF910733, KF910754

2. **Larrea Murrell, J.A.**, Rojas Badia, M.M., Bacchetti de Gregoris, T., Boltes Espinola, A.K., Heydrich Perez, M., Lugo Moya, D., Garcia Soto, I. and Esteve Nunez, A. Characterization of extracellular enzymes producing bacteria from a polluted freshwater ecosystem: Almendares River, Havana, Cuba. Sequences of 16SrDNA of *Bacillus megaterium*, PailaP1b, PailaP1c strains (670 bp). Genbank Accession number: KF910744-KF910745

3. **Larrea Murrell, J.A.**, Rojas Badia, M.M., Bacchetti de Gregoris, T., Boltes Espinola, A.K., Heydrich Perez, M., Lugo Moya, D., Garcia Soto, I. and Esteve Nunez, A. Characterization of extracellular enzymes producing bacteria from a polluted freshwater ecosystem: Almendares River, Havana, Cuba. Sequences of 16SrDNA of *Bacillus pumilus*, PHP4c strain (670 bp). Genbank Accession number: KF910748

4. **Larrea Murrell, J.A.**, Rojas Badia, M.M., Bacchetti de Gregoris, T., Boltes Espinola, A.K., Heydrich Perez, M., Lugo Moya, D., Garcia Soto, I. and Esteve Nunez, A. Characterization of extracellular enzymes producing bacteria from a polluted freshwater ecosystem: Almendares River, Havana, Cuba. Sequences of 16SrDNA of *Bacillus* sp., Pa57, 3PHP76, 3RCP37b, 3RCP141, 4PaP18, 4PHP510a, PH2, PH21, PH22, PH52, RC9 strains (670 bp). Genbank Accession number: KF910754-KF910764

Publicación en NCBI-SRA:

Larrea Murrell, J.A., Rojas Badía, M.M., Henriet, O., Gillis, A., Heydrich, M., Mahillon, J. Metagenome analysis of bacterial community of polluted and non-polluted rivers. Submitted (28-SEP-2015). NCBI-SRA Accesion No. SRP063983. (total de secuencias: 83 177)

Participación en Eventos

Internacionales

1. **World Wide Workshop for Young Environmental Scientists (WWW-YES) Urban waters: resource or risk?** Microbiological water quality of the Almendares river: an urban river in the Havana (Cuba) area. J. Prats, T. Garcia–Armisen, A. Rodriguez, D. Lugo, N. Rojas, **J. Larrea**, M. Heydrich and P. Servais. **10-13 May 2005, Domaine de Chérioux, Vitry sur Seine, Paris, France.**

2. **EXPOAGUA 2006. VI SALON INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS Y PRODUCTOS DEL AGUA Y II SIMPOSIO CIENTIFICO TECNICO.** J. Prats, J. Larrea, D. Lugo, M. Heydrich and P. Servais. Empleo de nuevos medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos en la determinación de la contaminación microbiana en ecosistemas fluviales. Del 13 al 16 de diciembre, 2006, La Habana, Cuba. Palacio de las Convenciones.

3. **Workshop on Treatment and Management of Solid Waste and Wastewater, Havana Verde.** Potencial risk due to the microbial pollution in the Almendares River, Havana, Cuba. J. Prats, **J. Larrea**, T. García-Armisen, D. Lugo, A. Rodríguez, P. Servais, N. Rojas, M. Heydrich. La Habana, Mayo 2006.

4. **IV Simposio Internacional de Química SIQ 2010**. Caracterización de la comunidad bacteriana cultivable del agua y la rizosfera de plantas que habitan en el afluente Paila del río Almendares. **J.A. Larrea,** M.M. Rojas, D. Lugo, C. Panfet y M. Heydrich. **Villa Clara, Mayo 2010.**

5. **6to Simposio Internacional de Aplicaciones del Ozono y V Simposio Internacional Medio Ambiente del XV Congreso Científico Internacional CNIC 2010**. Aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana cultivable en el río Almendares. **J.A. Larrea,** M.M. Rojas, D. Lugo y M. Heydrich. La Habana, Junio 2010.

6. **VII Congreso Internacional de Educación Superior Universidad 2010.** La contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas de nuestra ciudad: un enfoque desde la universidad. M. Heydrich, N. Rojas, A. Cheang, B. Romeu, **J. Larrea**, J. Prats, Y. Arpajón, D. Lugo.

7. **I Simposio sobre gestión del agua en Espacios Protegidos.** Análisis del comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en aguas del Complejo Turístico ¨Las Terrazas¨. **J.A. Larrea Murrell**, M.M. Rojas Badía, D. Lugo Moya, M. Heydrich Pérez. Viñales, Pinar del Río, noviembre 2010.

8. **VIII Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo. III Congreso sobre Manejo de Ecosistemas y Biodiversidad.** Diversidad de la comunidad bacteriana heterotrófica cultivable en el río Almendares. **J. Larrea**, M. rojas, D. Lugo, A. Puentes y M. Heydrich. La Habana, 4-8 julio, 2011.

9. **Convención Trópico 2012. III Congreso de Biodiversidad y Ecología Tropical.** Evaluación de la diversidad bacteriana heterotrófica cultivable en el río Almendares. **J.A. Larrea Murrell**, M.M. Rojas Badía, D. Lugo Moya, M. Heydrich Pérez. La Habana, 14-18 de Mayo.(Poster)

10. **VIII Congreso Internacional de Química, Ingeniería y Bioquímica. V Simposio Internacional de Bioquímica y Biología Molecular.** Characterization of *Bacilli* for biotechnolgical and environmental applications. M.M. Rojas, A. Gillis, **J.A. Larrea**, J. Mahillon, M. El Haziri and M. Heydrich. Hotel Meliá Habana, La Habana, Cuba, 9- 12 Octubre, 2012,

11. **5to Simposio Internacional de Química SIQ 2013**. Evaluación de la calidad microbiológica y química de las aguas del río Almendares, La Habana, Cuba. Jeny Larrea, Marcia Rojas, Beatriz Romeu, Yunier Arpajón, Daysi Lugo, Mayra Heydrich. Villa Clara, Junio 2013 (Poster electrónico)

12. **1er Taller de Integración para el Desarrollo.** Influencia de la contaminación química y fecal sobre la estructura de las comunidades bacterianas del río Almendares, La Habana, Cuba. **J.A. Larrea**, M.M Rojas, T. Bacchetti, D. Lugo, M. Heydrich, A. Estéve, K. Boltes. Santiago de Cuba, Universidad de Oriente, Junio 2014.

13. **20th National Symposium for Applied Biological Science.** Antibiotic susceptibility patterns and presence of genetic virulence determinants in *Bacillus cereus* group isolates from a Cuban polluted river. **J. Larrea**, M. Rojas, I. García, A. Gillis, M. Heydrich, J. Mahillon. Louvain-la-Neuve, Bélgica. Enero 2015. (Póster).

14. **XVI Congreso Científico Internacional CNIC 2015**. Influencia de contaminantes químicos y microbiológicos sobre la composición de las comunidades bacterianas del río Almendares, La Habana, Cuba. **J.A. Larrea Murrell**, M.M. Rojas Badía, M. Heydrich Pérez, O. Henriet, J. Mahillon. La Habana. Junio 2015 (Póster).

15. **X Convención Internacional sobre Medio Ambiente y Desarrollo. V Congreso sobre Manejo de Ecosistemas y Biodiversidad.** Diversidad estructural de las comunidades bacterianas de dos ecosistemas del occidente de Cuba. **J.A. Larrea** Murrell, M.M. Rojas Badía, M. Heydrich Pérez, O. Henriet, J. Mahillon. La Habana. (Julio 2015).

Nacionales

1. **XI TALLER DE LA CÁTEDRA DE MEDIO AMBIENTE.** Determinación de la contaminación química y microbiológica del río San Juan, San Diego de los Baños, Pinar del Río, Cuba. **J. Larrea**, Y. Arpajón, A.J. Rodríguez, J. Prats. Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas, La Habana, Junio 2005.

2. **XIII Taller de la Cátedra de Medio Ambiente. Instituto Superior de Tecnologías y Ciencias Aplicadas**. Evaluación de la contaminación microbiana en ecosistemas acuáticos tropicales mediante el empleo del medio Agar Chromocult. **J. Larrea**, T. García-Armisen, M. Rojas, N. Rojas, M. Heydrich. La Habana, Mayo 2008.

3. **Universidad 2010. Taller Provincial Medio Ambiente**. M. Heydrich, N. Rojas, B. Romeu, **J. Larrea**, Y. Arpajón, D. Lugo, R. Marzán. La contaminación de los ecosistemas dulceacuícolas de nuestra ciudad: un enfoque desde la universidad (Mayo 2009). (Premio Relevante).

4. **Taller Universitario por el Día Internacional del Medio Ambiente CEMA**. Contaminación microbiológica y química en sistemas de agua dulce y su amenaza a la diversidad microbiana y la salud humana. B. Romeu, **J. Larrea** e I. Salgado. (Junio 2009).

5. **EcoJoven 2009 (Eventos UH y Municipal).** Empleo del medio agar Chromocult en la evaluación de la calidad microbiológica en ecosistemas acuáticos tropicales. **J. Larrea**, T. García-Armisen, M. Rojas, N. Rojas, M. Heydrich. La Habana, (Febrero y Junio 2009 respectivamente).

6. **XVI Forum de Ciencia y Técnica (4ta etapa). Facultad de Biología, Universidad de La Habana y Evento Municipal de Plaza de la Revolución.** 2010. Los

microorganismos en el saneamiento ambiental y la recuperación de ecosistemas impactados. ME Carballo, G. Guerra, M. Heydrich, A. Hernández, N. Rojas, O. Coto, M. Rojas, M. Cruz, J. Marrero, M. Ramos, B. Romeu, AM. Manzano, I. Salgado, MI Sánchez, O. Domínguez, A. Martínez, **J. Larrea**, Y. Acebo, A. Díaz, D. Lugo y J. Arguelles. Premio Categoría Relevante.

7. **VIII Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. V Congreso Nacional de Medicina Tropical. V Seminario Internacional sobre la infección por el VIH y el SIDA en Cuba.** Patrones de susceptibilidad y presencia de genes de virulencia en cepas de *Bacillus cereus* aisladas del río Almendares. **J. Larrea**, M. Rojas, I. García, A. Gillis, M. Heydrich, J. Mahillon. La Habana (14-16 octubre 2014)(Póster electrónico).

Logros científicos

1. **PREMIO DE INVESTIGACIONES DE LA UH 2009** al resultado ya aplicado de mayor contribución a la protección del medio ambiente en Cuba: "Contaminación microbiológica y química en sistemas de agua dulce y su amenaza a la diversidad microbiana y la salud humana." M. Heydrich, N. Rojas, **J. Larrea**, B. Romeu, M. Rojas, Y. Arpajón, D.Lugo, I. Ymas, D. Prieto, R. Marsán.

2. **PREMIO DE INVESTIGACIONES DE LA UH 2010** al resultado ya aplicado de mayor contribución a la protección del medio ambiente en Cuba. "Impacto de la contaminación microbiana y química en sistemas dulceacuícolas cubanos: estrategias para el saneamiento ambiental y su recuperación". ME Carballo, N. Rojas, M. Cruz, O. Coto, G. Guerra, J. Marrero, B. Romeu, A. Martínez, AM Manzano, I. Salgado, **J. Larrea**, M. Rojas, M. Ramos, O. Domínguez, MI Sánchez, A. Díaz, I. Ymas, D. Prieto, Y. Arpajón, D. Lugo, J. Arguelles, I. Hernández, M. Heydrich.

3. **PREMIO NACIONAL (anual) al resultado de la investigación científica, Academia de Ciencias de Cuba. 2010**. "Impacto de la Contaminación Microbiana y Química en Sistemas Dulceacuícolas cubanos: Estrategias para el Saneamiento Ambiental y su Recuperación" Dra. C. María Elena Carballo Valdés, Dra. C. Mayra Heydrich Pérez, Dra. C. Nidia Rojas Hernández, Dr. C. Mario Cruz Arias, Dra. C Orquídea Coto Pérez, Dra. C. Gilda Guerra Rivera, Dra. C. Jeannette Marrero Coto, M. C. Beatriz Romeu Alvarez, M. C. Armando Martínez Sardiñas, M. C. Ana Margarita Manzano León, M. C. Irina Salgado Bernal, M. C. **Jeny Larrea Murrell**, M. C. María Isabel Sánchez López, Dra. C. Marcia Rojas Badía,Dr. C. Miguel Ramos Leal, M. C. Osmel Domínguez Guilarte, Lic. Arelys Díaz Valdivia.

4. **Premio Universidad de La Habana (a nivel universitario): "Impacto de la contaminación química y microbiológica en ecosistemas dulceacuícolas del occidente de cuba y su importancia para el saneamiento ambiental". 2015.** Beatriz Romeu Alvarez, **Jeny Larrea Murrell**, Mayra Heydrich Pérez, Marcia Rojas Badia, Nidia Rojas Hernández, Yunier Arpajón Peña, Ivette García Soto, Daysi Lugo Moya.

5. **Premio Medio Ambiente Universidad de La Habana (a nivel del MES):** "**Estrategias de uso de los microorganismos en la conservación del medio ambiente: ecosistemas terrestre, acuático y aéreo". 2015** Mayra Heydrich Pérez, Marcia M. Rojas Badía, Annia Hernández Rodríguez, Yanelis Acebo Guerrero, Beatriz Romeu Alvarez, Teresa Rojas Flores, Michel Almaguer Chávez, **Jeny Larrea Murrell**, Nidia Rojas Hernández, Yunier Arpajón Peña, Kenia Sánchez Espinosa, Marianela Pérez Colina, Daysi Lugo Moya.

Apoyo Financiero

1. **Beca MAE-AECID (2012)**

2. **Proyectos Nacionales e Internacionales**

- **"Constitución en la Universidad de La Habana de un polo de competencia para el estudio de los medios acuáticos y la contaminación del río Almendares"**, financiado por la Cooperación Universitaria para el Desarrollo, Bélgica. (CUD) (2004-2007).
- **"Acciones prioritarias para el saneamiento ambiental y el Manejo Integral del Gran Parque Metropolitano de la Habana".** Financiado por la región Wallona. Bélgica. (2008)
- **"Evaluación, efectos y riesgos biológicos de la contaminación de ecosistemas dulceacuícolas en la Ciudad de La Habana"**. (Proyecto CITMA-Medio Ambiente) (2009)
- Proyecto de cooperación internacional, región Wallonia: **"Utilización del género *Bacillus* en el desarrollo sostenible de ecosistemas de interés económico y social en Cuba"**