

DOI: 10.24850/j-tyca-2021-03-03

Artículos

Impacto de la calidad química y microbiológica del agua sobre la estructura de la comunidad bacteriana del río San Juan (Sierra del Rosario, Reserva de la Biosfera, Cuba)

Impact of chemical and microbiological water quality on bacterial community assemblage of San Juan River (Sierra del Rosario, Biosphere Reserve, Cuba)

Jeny A. Larrea-Murrell¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6067-6331>

Tristano Bacchetti-De-Gregoris²

Mayra Heydrich-Pérez³, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1849-1333>

Daysi Lugo-Moya⁴, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8401-1430>

Abraham Estéve-Núñez⁵, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4857-9616>

Karina Boltres-Espínola⁶, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9686-7730>

Marcia M. Rojas-Badía⁷ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4958-1873>

¹Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, adina@fbio.uh.cu / Instituto Madrileño de Estudios Avanzados

Agua (IMDEA Agua), Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España

²Instituto Madrileño de Estudios Avanzados Agua (IMDEA Agua), Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España, tristanoontravel@gmail.com

³Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, mayra@fbio.uh.cu

⁴Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, daysi@fbio.uh.cu

⁵Instituto Madrileño de Estudios Avanzados Agua (IMDEA Agua), Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España, abraham.esteve@uah.es

⁶Instituto Madrileño de Estudios Avanzados Agua (IMDEA Agua), Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España, karina.boltes@uah.es

⁷Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología y Virología, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, marcia@fbio.uh.cu

Autora para correspondencia: Marcia María Rojas-Badía, marcia@fbio.uh.cu

Resumen

El objetivo del presente estudio fue analizar la influencia de diferentes indicadores fisicoquímicos y microbiológicos de estructuras de la comunidad bacteriana en un ecosistema de agua dulce ubicado en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario. La composición de las comunidades de bacterioplancton se determinó por electroforesis en gradiente desnaturizante (DGGE) del 16S rDNA durante tres campañas en tres estaciones de muestreo en el río San Juan. Se realizaron análisis estadísticos multivariados de los patrones de la electroforesis en relación con parámetros químicos, biológicos y físicos. Los análisis mostraron la variación estacional de la comunidad bacteriana en las estaciones de muestreo menos contaminadas. Además, los sólidos disueltos totales (TDS), la concentración de *E. coli* y el oxígeno disuelto influyeron significativamente en los perfiles de DGGE en el río San Juan, lo que indica que al menos dos de las tres estaciones de muestreo analizadas tuvieron una buena calidad del agua. Con la combinación de variables ambientales y la DGGE es posible analizar la influencia de la contaminación química y microbiana en la comunidad bacteriana del río San Juan. En los sitios menos contaminados, las bajas concentraciones de TDS y los indicadores bacterianos de contaminación se relacionaron con la diversidad bacteriana. La presente investigación constituye el primer análisis independiente de cultivo de las comunidades bacterianas de ecosistemas dulceacuícolas en una reserva de la biosfera en las islas del Caribe.

Palabras clave: electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), ecosistema de agua dulce, país tropical, análisis multivariado, reserva de la biosfera.

Abstract

The objective of the present study was to analyze the influence of different physicochemical and microbiological indicators on bacterial assemblages in a freshwater ecosystem located in a Biosphere Reserve. The bacterioplankton communities composition was determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA during three sampling campaigns in three sampling stations of San Juan River. Multivariate statistical analyses of gel patterns, in relation to chemical, biological and physical parameters were performed. The analyses showed a seasonal variation of bacterial community at the less polluted stations. The correspondence canonical analysis showed that total dissolved solids (TDS), *E. coli* concentration and dissolved oxygen were significantly influencing the DGGE profiles at San Juan River, indicating that at least two of the three sampling stations analyzed possessed good water quality. With the combination of environmental variables and the DGGE molecular data it could be appreciated the influence of chemical and microbial contamination on the bacterial community of San Juan River. At the less polluted stations low concentrations of TDS and bacterial indicators of fecal contamination were related with bacterial diversity. The present investigation constitutes the first culture-independent analysis of freshwater bacterial communities in a Biosphere Reserve of the Caribbean islands.

Keywords: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), freshwater ecosystem, tropical country, multivariate analysis, Biosphere Reserve.

Recibido: 17/07/2019

Aceptado: 10/08/2020

Introducción

Las comunidades bacterianas son muy sensibles a los cambios ambientales, así como a los cambios persistentes en los ecosistemas debido a la contaminación de la actividad humana o al cambio climático global (Lear, Anderson, Smith, Boxen, & Lewis, 2008; Washington, Lear, Neale, & Lewis, 2013). Investigaciones recientes sobre comunidades bacterianas sugieren que pueden ofrecer una herramienta adicional para evaluar la calidad ecológica de los cursos de agua (Lear *et al.*, 2012; Washington *et al.*, 2013; Newton & McLellan, 2015; Wang, Chen, Yuan, Li, & Li, 2016). Esto se debe a las ventajas que ofrecen las comunidades bacterianas como indicadores, ya que pueden experimentar cambios en su composición en respuesta a perturbaciones ambientales, siendo detectados los efectos de estos cambios antes de que se transmitan a niveles superiores de las cadenas tróficas en los ecosistemas acuáticos

(Lewis *et al.*, 2010). Además, pueden muestrearse en sitios donde no están presentes otros bioindicadores, como invertebrados bentónicos y peces (Lear *et al.*, 2012).

Los métodos independientes del cultivo contribuyen a reducir el sesgo en el análisis de la riqueza de las comunidades bacterianas en comparación con los métodos dependientes del cultivo debido a la presión selectiva que imponen estos últimos para crecer en un medio de cultivo sólido, favoreciendo el crecimiento de aquellas poblaciones dentro la comunidad bacteriana capaz de formar colonias. Es por esta razón que los métodos dependientes del cultivo subestiman la riqueza de especies en una muestra, que se estima mejor a través de métodos independientes del cultivo que pueden detectar bacterias viables, pero no cultivables (Burtscher, Zibuschka, Mach, Lindner, & Farnleitner, 2009; Vaz-Moreira, Egas, Nunes, & Manaia, 2011).

Los métodos moleculares como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), el polimorfismo de longitud del fragmento de restricción terminal (T-RFLP) y el análisis de espaciador intergénico ribosómico automatizado (ARISA) permiten establecer perfiles comunitarios y afiliaciones filogenéticas de las especies detectadas en caso de que los fragmentos de ADN se puedan secuenciar. Particularmente, la DGGE permite obtener información taxonómica, ya que las bandas obtenidas se pueden cortar, reamplificar y secuenciar. Así, esta técnica combina las ventajas de la clonación, secuenciación y T-RFLP, y puede utilizarse para el análisis de comunidades bacterianas de diferentes ecosistemas (Duarte, Cassio, & Pascoal, 2012; Liu, Huang, Sun, Xu, & Xu, 2012).

El sector hidromineral "Las Terrazas" está ubicado en el municipio de La Palma, provincia de Artemisa, a orillas del río San Juan, dentro del área de desarrollo del Complejo Las Terrazas, en la parte noreste de la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, Cuba. 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, Fagundo, Delgado, & Orbera, 2001). Teniendo en cuenta la mineralización global, las aguas se consideran mineromedicinales, y según su uso se clasifican como aguas de uso balneológico y terapéutico (Peña *et al.*, 2001). Si bien la evaluación de la calidad química y microbiológica del río San Juan (Arpajón, Larrea, Rojas, Heydrich, & Lugo, 2012; Larrea, Rojas, Lugo, & Heydrich, 2013; Romeu, Quintero, Larrea, Rojas, & Heydrich, 2015) se ha realizado antes, nunca se han implementado métodos independientes del cultivo para evaluar la comunidad bacteriana de dicho ecosistema. Este tipo de investigación podría ser beneficioso para conocer desde el punto de vista sinérgico la influencia de diferentes variables fisicoquímicas en la estructura de las comunidades bacterianas, las cuales pueden contribuir a la mejora de la gestión de tal ecosistema de agua dulce, de gran importancia para el turismo y el medio ambiente. Este estudio tiene como objetivo analizar la influencia de diferentes indicadores fisicoquímicos y microbiológicos sobre las comunidades bacterianas en un ecosistema de agua dulce ubicado en una reserva de la biosfera.

Materiales y métodos

Muestreo y datos ambientales

Para analizar la estructura de la comunidad de bacterioplancton en el río San Juan se realizaron muestreos en tres ocasiones (noviembre de 2011; febrero de 2012, y abril de 2012) en tres estaciones de muestreo: presa El Palmar (S-1) ($22^{\circ} 50' 42.35''$ N y $82^{\circ} 56' 23.33''$ W); presa San Juan (S-2) ($22^{\circ} 50' 46.01''$ N y $82^{\circ} 56' 27.09''$ W), y Baños del San Juan (S-3) ($22^{\circ} 49' 24.02''$ N y $82^{\circ} 55' 35.08''$ W).

Para la toma de muestras se utilizaron frascos de muestreo de plástico estériles (1 l) (APHA, 2012). Todas las muestras fueron recolectadas por triplicado. Se tomaron muestras de agua a un metro de la orilla y 15 cm de profundidad. Los parámetros de campo que consisten en conductividad eléctrica, pH, temperatura, sólidos totales disueltos (TDS) y oxígeno disuelto (DO) se midieron en cada ubicación de muestra con el uso de un multímetro (Mettler Toledo). Todas las muestras de agua se transportaron en hielo al laboratorio y se analizaron en 12 horas.

Las submuestras de agua utilizadas para el análisis de nutrientes ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{NO}_2^-\text{-N}$ y $\text{NO}_3^-\text{-N}$) y la demanda química de oxígeno (DQO) se filtraron con filtros GF/F secados al horno (Whatman

International Ltd., Maidstone, Reino Unido) según los protocolos estándar franceses AFNOR (2009). La determinación de nutrientes inorgánicos y DQO se hizo mediante métodos colorimétricos. En específico, la DQO se determinó mediante el método de digestión en reactor de dicromato, para lo cual se utilizó la cubeta de ensayo de DQO (Spectroquant 1 152 0001, rango 0-1500 mg.l⁻¹ DQO). Para la determinación de amoníaco se utilizó el método de Nessler y para el fosfato se utilizó el método del ácido ascórbico azul. Todos estos métodos se describen en la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA) (APHA, 2012). Los datos de precipitación se obtuvieron de la estación Ecológica en la provincia de Artemisa, Cuba.

Determinación de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos

Los coliformes termotolerantes (TtC) se cuantificaron mediante filtración por membrana (filtros de nitrato de celulosa estériles de 0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, Sartorius) en agar lactosa con Tergitol (concentración final de 0.095 ‰ peso/volumen) y trifenilo 2,3,5-cloruro de tetrazolio (TTC) (concentración final de 0.024 ‰ p/vol) (AFNOR, 2009), *Escherichia coli* (EC) y enterococos (Ent) se cuantificaron por el mismo método en agar *Coliform Chromocult* y agar

Enterococci Chromocult, respectivamente de acuerdo con Ouattara, Garcia-Armisen, Anzil, Brion y Servais (2014). Las bacterias se cultivaron por 24 h a 37 °C para EC y Ent, y por 24 h a 44 °C para TtC. Las colonias naranjas que producían un halo amarillo debajo de la membrana después de la incubación se consideraron colonias de coliformes termotolerantes; las colonias de color azul oscuro se consideraron colonias de *E. coli* y las colonias rojas se consideraron enterococos. Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml de muestra.

Análisis de las comunidades bacterianas del río San Juan

Extracción de ADN y amplificación de los fragmentos de ADNr 16S

La biomasa microbiana se colectó a partir de la columna de agua y se concentró por filtración. Se filtraron alícuotas de cada muestra (1 l) por triplicado a través de filtros de nitrato de celulosa de 5 μm y posteriormente a través de filtros de nitrato de celulosa de 0.22 μm . A partir de filtros de 0.22 μm , la extracción de ADN se realizó mediante el

método SDS-fenol-cloroformo (Oh *et al.*, 2011). Todas las muestras de ADN se purificaron con *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen).

Para aumentar la sensibilidad y facilitar el análisis de DGGE, se realizó una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada. Durante la primera amplificación, el tubo de PCR contenía 25 μ l de la mezcla de reacción que consiste en una concentración de 1 X de *OneTaq Quick-Load 2 X Master Mix* mezclado con tampón estándar (BioLabs, Nueva Inglaterra), una concentración final de 0.2 μ M de los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') para amplificar el gen ADNr 16S (Zhou *et al.*, 2009); 1 μ l de ADN molde (\sim 70 ng), y agua MilliQ estéril. Después de un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 90 s a 72 °C, y un paso de extensión final de 5 min a 72 °C.

A partir de los productos de la primera reacción de amplificación se realizaron dos reacciones de amplificación independientes: una con los cebadores 341FGC clamp (5'-GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGG

GGCACGGGGGGCCTACGGGAGG-3') y 534R (5'-ATGTACGAGG-3') que amplifican la región variable V3 del ADNr 16S del dominio Bacteria (Muyzer, De-Waal, & Uitterlinden, 1993); y el otro con los cebadores 517FGC (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3') (Gich, Schubert, Bruns, Hoffelner, & Overmann, 2005) y 1061R (5'-CACGACACGAGCTGACGAC-3') (Degnan & Ochman, 2012), que amplifican las regiones variables V4-V6 del ADNr 16S del dominio de Bacteria. Ambas reacciones se realizaron en un volumen final de 50 μ l de la mezcla de reacción que

contiene una concentración de 1 X *Quick-OneTaq* de *Load Master Mix* con 2 X tampón estándar (BioLabs, Nueva Inglaterra), 0.2 μM de los cebadores, 1 μl del producto amplificado y agua MilliQ estéril. Después de un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, las muestras se amplificaron durante 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 53 °C y 2 min a 72 °C, y un paso de extensión final de 7 min a 72 °C. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (ThermalCycler C 1000 TM BIO-RAD).

DGGE

La DGGE se realizó mediante el sistema *Ingenyphor U* (Rafer, España). Los productos de PCR obtenidos de la reacción con los cebadores 341FGC y 534R se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10 % (p/v) en tampón TAE 1X (Tris 20 mM, acetato 10 mM, EDTA 0.5 mM pH 8); mientras que los productos obtenidos de la reacción con los cebadores 517FGC y 1061R se cargaron en un gel de poliacrilamida al 7 %. Se prepararon geles de poliacrilamida con un gradiente desnaturalizante de 30 a 60 % (donde 100 % desnaturalizante contenía urea 7 M y 40 % formamida). Toda la electroforesis se realizó a un voltaje de 200 V durante 4 h y 30 min a 60 °C. Los geles se tiñeron con SYBR Gold (dilución 1:10 000) durante 30 min. Los geles teñidos se fotografiaron en un gabinete transiluminador UV, con una cámara de video (filtro de posiciones de gabinete de luz Alpha Innotech Multimage).

Análisis estadísticos

Basado en la presencia (1) o ausencia (0) de bandas individuales en cada carril, se construyó una matriz binaria utilizando el programa *PyElph 1.4* (Pavel & Vasile, 2012), y se hizo un análisis comparativo de los perfiles DGGE con el *software PRIMER 6* (PRIMER-E, Ltd., Reino Unido) (Clarke & Gorley, 2006). Se realizó un análisis de conglomerados utilizando el coeficiente de similitud de Sorensen y la técnica de vinculación promedio mediante el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA, siglas en inglés).

Para investigar las relaciones entre la comunidad de bacterioplancton y las variables ambientales en el río San Juan, se usó una aproximación de gradiente directo, es decir, un análisis de correspondencia canónica (CCA) utilizando el *software CANOCO*, versión 4.5 para Windows (Ter-Braak & Šmilauer, 2002). Este método fue elegido después de un análisis inicial por análisis de correspondencia sin tendencia (DCA), que reveló que los datos exhibían una respuesta unimodal a las variables ambientales. Los datos se importaron utilizando el programa *WCanoImp* dentro del paquete *CANOCO*. Luego se utilizó el programa *CANOCO* para realizar CCA con escalado de especies en distancias entre muestras para que las muestras y las variables

ambientales formaran un *biplot*. Se agregaron variables explicativas hasta que la adición de otras variables no contribuyó significativamente ($p < 0.05$) a una mejora sustancial del poder explicativo del modelo. Para evaluar estadísticamente la importancia del primer eje canónico y de todos los ejes canónicos juntos, se usó una prueba de permutación de Monte Carlo con 999 permutaciones no restringidas bajo el modelo reducido.

Finalmente, para representar *biplots*, se utilizó el programa *CANODRAW* dentro del paquete *CANOCO*. Las correlaciones por pares de rango de Spearman entre los diferentes conjuntos de variables ambientales probadas mencionadas anteriormente se realizaron antes de la CCA para eliminar las variables covariantes.

Cálculo del índice de calidad de agua

El índice de calidad del agua (WQI, por sus siglas en inglés) se calculó de acuerdo con Yisa y Jimoh (2010). Primero se calculó la escala de calificación de calidad para cada parámetro q_i utilizando esta expresión:

$$q_i = (C_i/S_i) \times 100$$

donde (C_i) es la concentración de cada parámetro en cada muestra de agua y (S_i) es el valor estándar permisible para cada indicador dado por WHO (WHO, 2003). Luego, el peso relativo (W_i) se calculó mediante un valor inversamente proporcional al estándar recomendado (S_i) del parámetro correspondiente:

$$W_i = 1/S_i$$

Finalmente, se calcula el WQI general:

$$\text{WQI general} = \sum q_i W_i / \sum W_i$$

Según Ramakrishnaiah, Sadashivaiah y Ranganna (2009) hay cinco categorías para la calidad del agua: excelente calidad del agua (< 50); buena calidad del agua (50-100); mala calidad del agua (100-200); muy mala calidad del agua (200-300), e inadecuada (> 300).

Resultados

Calidad fisicoquímica y microbiológica del agua

La calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del río San Juan en el periodo 2011-2012 se muestra en la Tabla 1. Basado en su conductividad eléctrica, concentraciones de fosfato y nitrato, las estaciones de muestreo del río San Juan pueden considerarse mesotróficas, según la clasificación de Sigeo (2005). Todas las estaciones de muestreo tuvieron buena calidad microbiológica de agua de acuerdo con las normas cubanas (Norma Cubana 22, 1999). Sin embargo, la estación Baños del San Juan (S-3) tuvo altos valores de concentraciones de nitrato y fosfato en comparación con las otras dos estaciones. Según el WQI, el agua de las estaciones S-1 y S-2 se puede clasificar como agua de excelente calidad (Tabla 2). Sin embargo, el agua de la estación S-3 está clasificada como inadecuada. La temperatura correlacionó negativamente con los TDS ($r = -0.71, p < 0.05$) y el amonio ($r = -0.85, p < 0.01$). El pH correlacionó positivamente con el nitrato ($r = 0.72, p < 0.05$) y negativamente con la DQO ($r = -0.84, p < 0.01$). La conductividad eléctrica mostró una correlación positiva con los TDS ($r = 0.97, p < 0.01$) y una correlación negativa con las precipitaciones ($r = -0.77, p < 0.05$). El oxígeno disuelto correlacionó negativamente con las precipitaciones ($r = -0.82, p < 0.01$), y la concentración de nitrito correlacionó positivamente con la concentración de fosfatos ($r = 0.81, p < 0.01$).

Tabla 1. Datos ambientales registrados de las estaciones de muestreo del río San Juan.

Datos ambientales	S-1			S-2			S-3		
	Noviembre 2011	Febrero 2012	Abril 2012	Noviembre 2011	Febrero 2012	Abril 2012	Noviembre 2011	Febrero 2012	Abril 2012
Temperatura (°C)	25.2	24.9	28.4	24.9	24.6	27.9	25.0	22.6	25.0
pH	8.39	8.38	8.63	8.60	8.38	8.81	8.90	8.27	8.63
Conductividad ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$)	450	360	300	450	360	350	480	430	406
TDS ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	310	240	200	300	240	230	320	310	301
DO($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	11.32	6.97	7.15	9.60	4.37	6.96	9.36	6.82	6.47
DQO ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	80.0	115.0	90.0	53.3	148.3	60.0	45.0	125.0	61.7
NO ₃ -N ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	2.73	5.84	9.45	15.65	6.87	10.16	14.60	2.20	28.07
NO ₂ -N ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.02	0.02	0.03	0.04	0.03	0.02	0.06	0.04	0.04
NH ₄ -N ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.34	0.31	0.003	0.25	0.55	0.003	0.48	0.61	0.09
PO ₄ -P ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	0.02	0.03	0.03	0.05	0.02	0.02	1.27	0.13	0.13
TtC.100	4.0 x	2.6 x	9.3 x	1.3 x	3.3 x	5.0 x	1.1 x	6.0 x	5.0 x

ml ⁻¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ²	10 ¹	10 ²
EC.100 ml ⁻¹	0	4.3 x 10 ¹	6.7 x 10 ⁰	0	0	1.0 x 10 ¹	1.1 x 10 ²	3.3 x 10 ¹	6.3 x 10 ¹
Ent.100 ml ⁻¹	3.3 x 10 ¹	6.7 x 10 ⁰	4.5 x 10 ³	5.9 x 10 ²	7.7 x 10 ¹	3.0 x 10 ¹	2.8 x 10 ²	1.1 x 10 ²	4.1 x 10 ²
Precipita- ciones [§] (mm)	0.0	86.2	124.9	0.0	86.2	124.9	0.0	86.2	124.9

[§] Los datos se obtuvieron de la Estación Ecológica Sierra del Rosario, Artemisa. Se tuvieron en cuenta las precipitaciones de 10 días antes de la fecha de muestreo.

TtC: coliformes termotolerantes; EC: *Escherichia coli*; Ent: enterococos; TDS: sólidos totales disueltos; DQO: demanda química de oxígeno; DO: oxígeno disuelto; S-1: Estación Presa El Palmar; S-2: Estación Presa San Juan; S-3: Estación Baños del San Juan.

Tabla 2. Valores de WQI calculados para el río San Juan.

Datos ambientales	Valores estándar (Si)	Wi	qi			qiWi			WQI general		
			S-1	S-2	S-3	S-1	S-2	S-3	S-1	S-2	S-3
pH	6.50-8.50	0.13	113.33	114.67	114.67	14.73	14.91	14.91	34.57	44.12	502.37
Conductividad (µS.cm ⁻¹)	20.00-500.00	0.00	49.30	52.60	58.30	0.00	0.00	0.00			
TDS (mg.L ⁻¹)	500.00	0.00	51.00	53.00	62.10	0.00	0.00	0.00			
DO (mg.L ⁻¹)	4.00	0.25	228.60	174.60	197.90	57.15	43.65	49.48			

DQO (mg.L ⁻¹)	10.00	0.10	975.00	1008.00	850.00	97.50	100.80	85.00			
NO ₃ -N (mg.L ⁻¹)	10.00	0.10	60.90	112.60	151.35	6.09	11.26	15.14			
NO ₂ -N (mg.L ⁻¹)	0.50	2.00	5.00	6.00	10.00	10.00	12.00	20.00			
NH ₄ -N (mg.L ⁻¹)	0.50	2.00	34.30	55.30	70.00	68.60	110.60	140.00			
PO ₄ -P (mg.L ⁻¹)	0.10	10.00	25.00	35.00	700.00	250.00	350.00	7000.00			

TDS: sólidos totales disueltos; DQO: demanda química de oxígeno; DO: oxígeno disuelto; S-1: Estación Presa El Palmar; S-2: Estación Presa San Juan; S-3: Estación Baños del San Juan.

Análisis de las comunidades bacterianas del río San Juan mediante DGGE

La Figura 1a muestra el patrón de bandas obtenido por la DGGE de las muestras del río San Juan. El número de bandas por muestra varió entre 15 (S-3 noviembre de 2011) y 26 (S-2 abril de 2012); además, es posible observar diferencias en los perfiles de bandas de cada estación de muestreo en cada uno de los meses analizados, así como diferencias en la intensidad de las bandas.

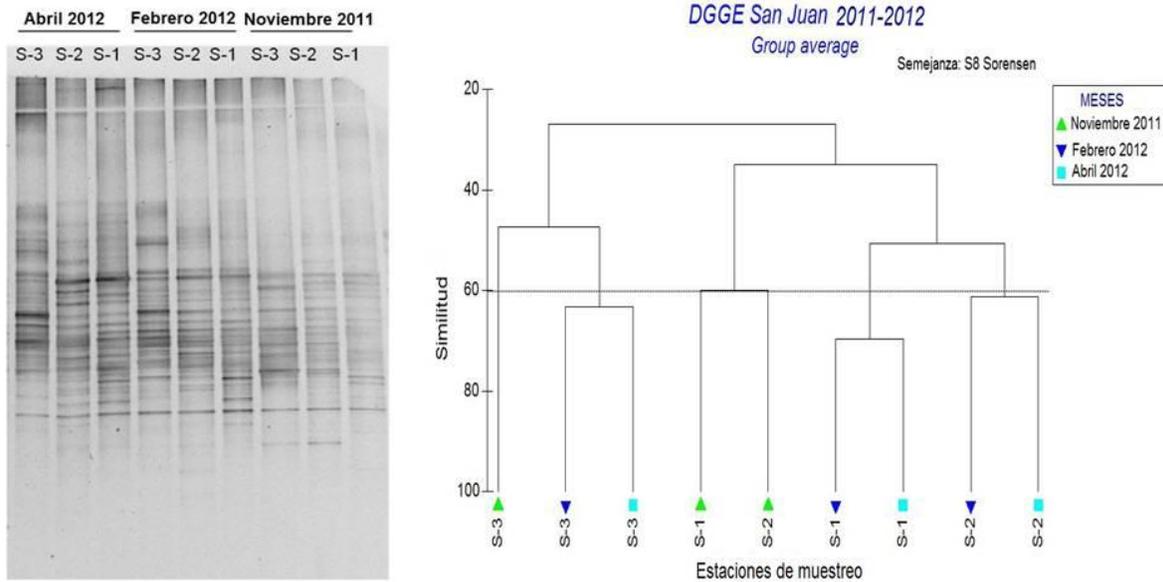


Figura 1. Análisis DGGE de fragmentos de ADNr 16S amplificados por PCR con los cebadores 341FGC y 534R. (A) Imagen del gel obtenida de muestras del río San Juan recolectadas en el periodo noviembre 2011-abril 2012. Gradiente desnaturalizante utilizado: 30-60 %. (B) Análisis de conglomerados por método UPGMA basado en patrones de bandas de muestras del río San Juan. La similitud se expresó como porcentaje del índice de Sorensen. Estaciones de muestreo del río San Juan: S-3: Baños del San Juan; S-2: Presa San Juan; S-1: Presa El Palmar.

Teniendo en cuenta los perfiles de bandas obtenidos por DGGE, se realizó un análisis de agrupamiento (Figura 1b), donde se observó la formación de tres grupos con 60 % de similitud. El primer grupo compuesto por muestras de la estación S-3 recolectadas en febrero y abril de 2012; el segundo grupo incluye muestras de la estación de

muestreo S-1 recolectadas en los meses de febrero y abril de 2012, y el tercero agrupa las muestras de la estación S-2 recolectadas en febrero y abril de 2012. Se separaron las muestras del mes de noviembre de cada una de las estaciones analizadas. El análisis de permutación de varianzas (PERMANOVA) indicó diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de las diferentes estaciones de muestreo ($p = 0.001$), así como entre los diferentes meses muestreados ($p = 0.001$). Este resultado se puede ver en el análisis de conglomerados donde cada grupo formado está representado por una estación en particular; además, existe una separación entre las muestras recolectadas en los meses de febrero y abril de 2012, y las muestras obtenidas en noviembre de 2011.

Análisis de la relación entre la estructura de la comunidad bacteriana, y los indicadores fisicoquímicos y de contaminación fecal

Los sólidos totales disueltos ($p = 0.015$) y la concentración de *E. coli* ($p = 0.045$) fueron los principales factores que influyeron en la variabilidad de la estructura de las comunidades bacterianas en el río San Juan (Figura 2, Tabla 3). La prueba de Monte Carlo para todos los ejes canónicos ($p = 0.002$) fue significativa, lo cual indica que las variables

seleccionadas pueden explicar la variabilidad de la estructura de la comunidad bacteriana en las estaciones del río San Juan. Los sólidos totales disueltos, la concentración de *E. coli* y el oxígeno disuelto explicaron el 21.2, 19.4 y 17.3 %, respectivamente, de la variabilidad del bacterioplancton en el río San Juan. De acuerdo con el análisis de correspondencia canónica, el porcentaje acumulado de varianza explicado por las especies-variables ambientales indicó que el primer y segundo eje canónico describen el 76.8 % de la varianza. Las correlaciones especie-ambiente de cada eje fueron 0.93 y 0.98 para el primer y segundo eje, respectivamente. El oxígeno disuelto y los TDS fueron los dos componentes principales del primer eje, y la concentración de *E. coli* fue el componente principal del segundo eje. Basado en el patrón en el *biplot*, dividimos las muestras en tres grupos: Grupo 1, la mayoría de las muestras de las estaciones S-1 y S-2 (sin incluir noviembre de 2011) se caracterizaron por los valores más bajos de TDS y concentración de *E. coli*; Grupo 2, muestras de la estación S-3 (de noviembre de 2011 a abril de 2012) se caracterizaron por los valores más altos de concentración de TDS y *E. coli*, y Grupo 3, que incluyó muestras de las estaciones S-1 y S-2 (noviembre de 2011), caracterizadas por los valores más altos de oxígeno disuelto.

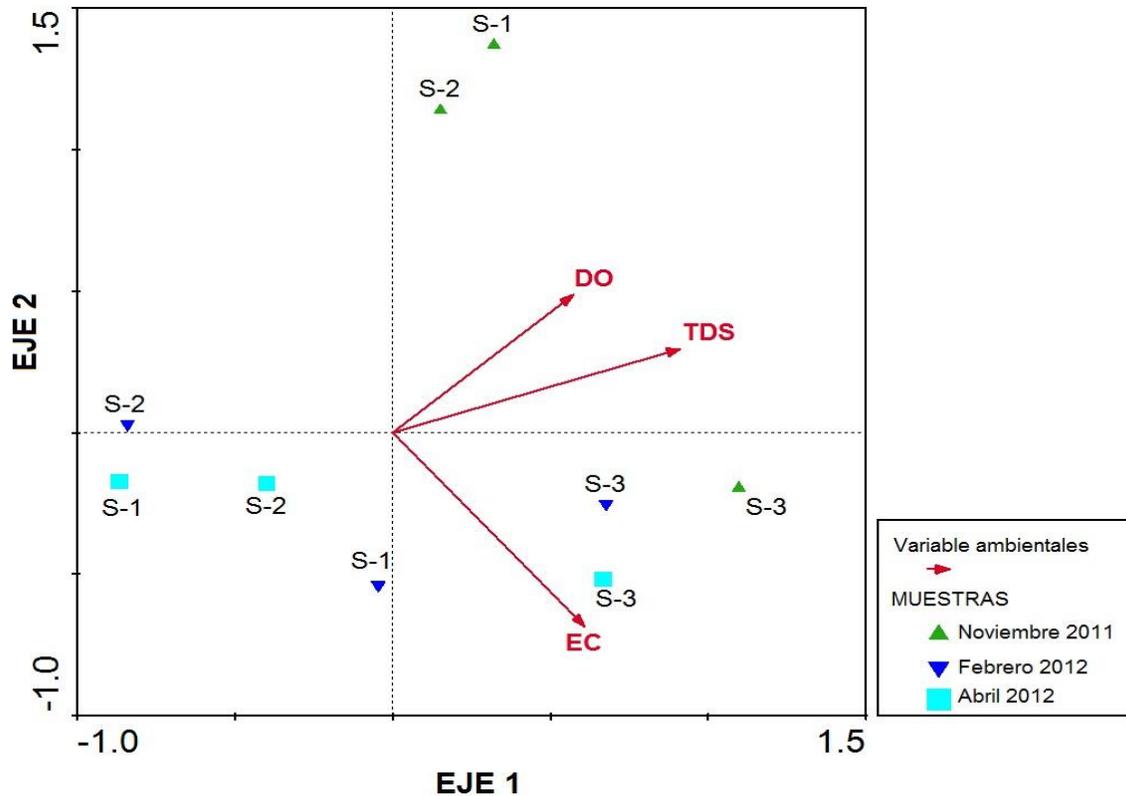


Figura 2. Biplot de análisis de correspondencia canónica (CCA) de la estructura de las comunidades bacterianas del río San Juan en el periodo noviembre 2011-abril 2012 utilizando indicadores fisicoquímicos y microbiológicos. Las flechas rojas indican la dirección en la que aumenta el valor de cada indicador de calidad del agua. La longitud de las flechas indica el grado de correlación con el eje mostrado. La posición de las estaciones de muestreo en las flechas se interpreta mediante la proyección de los símbolos en las flechas e indica el grado de influencia del indicador de calidad del agua representado por la flecha roja en la estructura de la comunidad bacteriana de la estación de muestreo. DO: oxígeno disuelto; TDS: sólidos totales disueltos; EC:

Escherichia coli; S-1: Estación Presa El Palmar; S-2: Estación Presa San Juan; S-3: Estación Baños del San Juan.

Tabla 3. Resumen de los resultados de los análisis de correspondencia canónica (CCA) de los datos de la estructura de la comunidad de bacterioplancton cuando están limitados por los indicadores de calidad del agua en el río San Juan.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3	Varianza Total
Valores propios	0.44	0.35	0.24	1.92
Correlaciones especies-ambiente	0.93	0.98	0.99	
Porcentaje de varianza acumulada:				
de los datos de especies	22.70	41.00	53.30	
de la relación especies-ambiente	42.60	76.80	100.00	
Suma de todos los valores propios				1.92
Suma de todos los valores propios canónicos				1.02
Correlaciones con los ejes				

Oxígeno disuelto (DO)	0.56	0.53	-0.63	
Sólidos totales disueltos (TDS)	0.89	0.32	0.31	
Concentración de <i>Escherichia coli</i>	0.60	-0.75	-0.29	

Las letras en negrita indican los factores fuertemente correlacionados con los dos primeros ejes de ordenación de CCA ($r > 0.70$ o $r > -0.70$).

Discusión

Calidad fisicoquímica y microbiológica del río San Juan

En el contexto de la evaluación del impacto de los contaminantes en la diversidad de comunidades microbianas en los ecosistemas de agua dulce, la diferencia entre los efectos relativos de la presión selectiva debido a la contaminación, y los que resultan de los factores y procesos ambientales naturales es muy importante. Se pueden encontrar variaciones naturales en la estructura y función de las comunidades no impactadas cuando se comparan diferentes ecosistemas, o diferentes estaciones de muestreo dentro del mismo ecosistema, como refieren

Dorigo, Lefranc, Leboulanger, Montuelle y Humbert (2009). Por esta razón, en el presente estudio se evalúan estaciones contaminadas y no contaminadas en el río San Juan, para analizar la influencia de los parámetros ambientales en la estructura de la comunidad bacteriana.

El río San Juan está ubicado en una zona rural y particularmente en la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, donde un Programa de Desarrollo Sostenible activo contribuye a la protección del medio ambiente (Larrea *et al.*, 2013). Las aguas de este entorno son muy limpias, con abundantes peces, algunas macrófitas y buen olor, aunque la mayoría de los indicadores fisicoquímicos y microbianos no superan las normas cubanas para baños en cuerpos de agua costeros y continentales (Norma Cubana 22, 1999). La estación S-3 presentó los valores más altos de las variables microbianas y químicas, en comparación con las otras dos estaciones. Este hecho podría ser posible por el aporte antrópico que genera una gran afluencia de público a estas piscinas naturales y el efecto de la esorrentía de una laguna de oxidación, que se refleja en las concentraciones de amonio e indicadores fecales. Considerando el WQI en el periodo evaluado, las estaciones de muestreo S-1 y S-2 presentaron una excelente calidad de agua en comparación con la estación S-3, lo que está en correspondencia con estudios realizados previamente por Larrea *et al.* (2013). Para simplificar, informar e interpretar la información compleja obtenida de un cuerpo de agua, diferentes autores han calculado índices de calidad del agua (Yisa & Jimoh, 2010; Rubio-Arias, Contreras-Caraveo, Quintana, Saucedo-Teran, & Pinales-Munguia, 2012; Rubio-Arias *et al.*,

2016). Así, con un solo número se puede interpretar el nivel de contaminación que presenta un cuerpo de agua.

Basado en los coeficientes de correlación obtenidos en el presente estudio, la temperatura se relacionó negativamente con los sólidos totales disueltos y las concentraciones de amonio, lo que podría deberse a que el aumento de temperatura puede elevar la tasa metabólica de los microorganismos, lo que lleva a la degradación de la materia orgánica, que se utiliza como fuente de carbono y energía (Dinsmore, Billett, & Dyson, 2013). Esto provoca la reducción de materia orgánica en la columna de agua y por lo tanto del total de sólidos disueltos. Por otro lado, el aumento de temperatura puede favorecer la actividad de las bacterias nitrificantes, que pueden utilizar el amonio en el proceso de nitrificación, que consta de dos pasos: (1) la oxidación del amonio a nitrito por las arqueas y bacterias oxidantes del amonio, y (2) oxidación de nitrito a nitrato llevada a cabo por bacterias oxidantes de nitrito (Chen, Cao, Song, & Zhou, 2010). De esta forma, con el aumento de temperatura, disminuirían las concentraciones de amonio en las aguas en las condiciones del río San Juan en el periodo analizado.

En el caso de la conductividad eléctrica y los TDS, ambos son una medida indirecta de la salinidad de una solución (Niekerk, Silberbauer, & Maluleke, 2014), lo que explica la correlación positiva observada entre ambos indicadores en el río. La conductividad eléctrica se utiliza a menudo como un sustituto de los sólidos totales disueltos y es una medida de la capacidad de una solución para conducir corriente eléctrica entre dos puntos (Dunlop, McGregor, & Horrigan, 2005; Niekerk *et al.*, 2014). Por el contrario, los TDS proporcionan una indicación general del

nivel de sólidos disueltos de menos de dos micrómetros presentes en una corriente fluvial, que incluye todos los electrolitos disociados que aumentan la concentración de sales y otros compuestos, como la materia orgánica disuelta (Tanor, Ts'énoli, & George, 2014) Además, se observó una correlación negativa entre la conductividad eléctrica y la precipitación, lo que puede deberse a que la conductividad eléctrica tiende a cambiar en función de la recarga del ecosistema: durante los períodos lluviosos tiende a disminuir su valor debido a la dilución de las sales; mientras que durante los periodos secos ocurre lo contrario (Rashed & Younis, 2012).

La DQO se relacionó negativamente con el pH, lo que puede deberse a que a mayor cantidad de materia orgánica en el ecosistema, mayor cantidad de oxígeno disuelto se necesita para descomponerlo, proceso que contribuye a la liberación de dióxido de carbono, que disminuye el pH del agua. Varol, Gökot, Bekleyen y Şen (2012) argumentan que la descomposición de la materia orgánica conduce a la acidificación y por lo tanto a una disminución del pH.

En el río San Juan se observó una correlación negativa entre las concentraciones de oxígeno disuelto y las precipitaciones. Jung *et al.* (2014) obtuvieron resultados similares en el río Han, en Corea del Sur. Estos autores observaron que las precipitaciones se relacionaban negativamente con el oxígeno y positivamente con la concentración de sólidos en suspensión. Las precipitaciones pueden contribuir a aumentar la turbidez en los sistemas acuáticos porque provocan afloramientos de sedimentos a partir del fondo del río y arrastran los suelos adyacentes; esto disminuye la penetración de la luz solar, lo que afecta a la actividad

fitoplanctónica y por tanto al proceso de fotosíntesis, con la consiguiente disminución del oxígeno disuelto. Así, un aumento de la turbidez del agua puede provocar una disminución en el proceso de fotosíntesis, y con ello una disminución del pH y las concentraciones de oxígeno disuelto.

Por otro lado, hubo una correlación positiva entre las concentraciones de nitrito y fosfato, que fueron mayores en la estación S-3, en comparación con las estaciones S-1 y S-2. Una causa que podría contribuir a estas concentraciones de nutrientes son los escurrimientos de la laguna de oxidación aeróbica que se ubica entre las estaciones S-2 y S-3, que presenta roturas y recibe volúmenes de aguas residuales domésticas superiores a su capacidad de retención, como se observó durante el muestreo. 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, Wang y Wu (2014) en el lago Erhai en China. Estos autores sugieren que a pH 8 se favorece el crecimiento y metabolismo de las bacterias nitrificantes. Además, en condiciones aeróbicas, la liberación de amoníaco de los sedimentos disminuye y éste se convierte en nitrato por nitrificación. Tal fenómeno contribuye a la reducción de amonio y al aumento de nitratos en las aguas.

Relación entre la estructura de la comunidad bacteriana, y los indicadores fisicoquímicos y de contaminación fecal en el río San Juan

La combinación de DGGE con métodos multivariados permitió apreciar la variabilidad espacio-temporal en la estructura de las comunidades bacterianas durante el periodo de estudio, lo que se corresponde con resultados obtenidos por diferentes autores en distintos ecosistemas de agua dulce utilizando esta técnica molecular (Berdjeb, Ghiglione, & Jacquet, 2011a; Figueiredo *et al.*, 2012; Ibekwe, Leddy, Bold, & Graves, 2012; Tang *et al.*, 2014).

Basado en la estructura de las comunidades bacterianas, se observó que el mes de noviembre de 2011 se separa de los meses de febrero y abril de 2012 (Figura 1b). Además, las estaciones menos contaminadas (S-1 y S-2) se separan de la estación con mayor contaminación (S-3), lo cual apoya la idea de que las comunidades bacterianas pueden utilizarse como indicadores del estado ecológico de los ecosistemas acuáticos (Lear *et al.*, 2012; Washington *et al.*, 2013). Se argumenta que las comunidades bacterianas son muy sensibles a los cambios ambientales, así como a los cambios persistentes en los ecosistemas debido a la contaminación producto de la actividad humana o al cambio climático global (Lear *et al.*, 2008). Las modificaciones temporales y espaciales detectadas pueden estar relacionadas con factores abióticos, como temperatura, oxígeno disuelto, pH, conductividad eléctrica, transparencia del agua, concentración de materia orgánica y nutrientes, entre otros; así como con factores bióticos, como contenido de clorofila *a*, interacciones con fitoplancton y zooplancton, depredación, parasitismo y competencia, que regulan los

cambios comunitarios en los ecosistemas acuáticos (Lindström, Kamst-Van-Agterveld, & Zwart, 2005; Berdjeb *et al.*, 2011a; Berdjeb, Pollet, Domaizon, & Jacquet, 2011b; Lliros *et al.*, 2014).

Los factores que más influyeron sobre la estructura de las comunidades bacterianas del río San Juan en el periodo noviembre 2011-abril 2012 fueron los TDS y las concentraciones de *E. coli*; esta última utilizada como indicador de contaminación fecal. Ambas variables presentaron valores altos en la estación S-3, en comparación con las estaciones S-1 y S-2, lo que influye en los cambios en el bacterioplancton. La presencia de altas concentraciones de TDS denotan el aporte de los suelos a través de los procesos naturales de arrastre y drenaje, pero también la resuspensión del sedimento, que ocurre con mayor frecuencia durante los periodos lluviosos (Crim, Schoonover, & Lockaby, 2012), como sucedió durante los meses de febrero y abril de 2012, donde se reportaron 86.0 mm y 124.9 mm de precipitación, respectivamente. El aporte del suelo puede contribuir no sólo al ingreso de bacterias al agua del río sino también al ingreso de compuestos orgánicos e inorgánicos, todo lo cual promueve cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, como se observó en el río Brazos, Texas, EUA (Becker, Rodibaugh, Hahn, & Nowlin, 2016). Además, la resuspensión del sedimento en la columna de agua también contribuye a los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, pasando microorganismos sedimentarios y nutrientes a la columna de agua. Las altas concentraciones de TDS pueden contribuir a la disminución de la luz en la columna de agua y, por lo tanto, a la baja de la fotosíntesis. Esto provoca una merma en la producción de oxígeno disuelto, lo que

contribuye a cambios en la estructura de la comunidad bacteriana (Breton-Deval, Sanchez-Flores, Juárez, & Vera-Estrella, 2019). Por otro lado, altas concentraciones de TDS pueden provocar un aumento de la salinidad, lo que trae consigo cambios en las comunidades bióticas, una disminución de la diversidad y la exclusión de especies menos tolerantes a estas condiciones (Weber-Scannell & Duffy, 2007). En paisajes rurales, como la Sierra del Rosario, donde se ubica el río San Juan, las fuentes de contaminación fecal incluyen ganado, escorrentías agrícolas y filtraciones de estanques de oxidación; estos últimos utilizados en el tratamiento de aguas residuales (Crim *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2016). Goto y Yan (2011) argumentan que el suelo es un importante reservorio de bacterias indicadoras de contaminación fecal, y que el intercambio entre el suelo y el agua durante las precipitaciones abundantes constituye un medio de transporte de bacterias fecales. Estas bacterias pueden llegar al suelo a partir de las deposiciones de la vida silvestre (p. ej., aves, ciervos, cerdos salvajes, etc.), así como de animales domésticos. Las fuentes de contaminación mencionadas anteriormente tienen un impacto en la calidad de las aguas de la estación S-3 y, por ende, en los cambios que ocurren en las comunidades bacterianas de esa estación de muestreo.

Esta investigación es de gran importancia porque, por primera vez en Cuba, se realiza un análisis de la estructura de la comunidad bacteriana de las aguas de una reserva de la biosfera, como la Sierra del Rosario, y se relaciona con la calidad del agua, lo que contribuye a la conservación de dicho recurso y su entorno. Como parte de los esfuerzos ambientales requeridos para la preservación del agua como

recurso natural, es necesario contar con datos cuantitativos relacionados con la contaminación del agua (CITMA, 2009), por lo que el presente estudio constituye un aporte para la mejora del manejo de los ecosistemas acuáticos. El uso de comunidades bacterianas como indicadores de la calidad del agua es muy importante, pues permite la detección de cualquier alteración en el ecosistema en una etapa temprana antes de que se transmita a niveles superiores de la cadena trófica en los ecosistemas acuáticos (Lewis *et al.*, 2010).

Conclusiones

Con la combinación de variables ambientales y datos moleculares de la DGGE se pudo apreciar la influencia de la contaminación química y microbiana en la comunidad bacteriana del río San Juan. En las estaciones menos contaminadas, las bajas concentraciones de TDS e indicadores bacterianos de contaminación fecal se relacionaron con la diversidad bacteriana. Tales resultados contribuyen al diagnóstico de los ecosistemas acuáticos analizados y constituyen el primer paso para los planes de gestión del río. El análisis en este documento ha proporcionado información útil sobre el papel de ciertas variables ambientales que influyen sobre la estructura comunitaria en los ríos. Resultaría de gran interés estudios adicionales que incluyan una

identificación profunda de los taxones que componen la comunidad bacteriana en el ecosistema de agua dulce analizado.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CITMA-PNCB. Los autores agradecen al doctor Maickel Armenteros y al doctor José L. Ponce de León por su ayuda con las estadísticas. Asimismo, los autores agradecen a Fidel Hernández y Jorge Luis Zamora por la ayuda con el acceso a la Reserva de la Biosfera Sierra del Rosario, Artemisa, Cuba.

Referencias

- AAFNOR, Association Française de Normalisation. (2009). Qualité de l'eau. Analyses biochimiques et biologiques - Analyses microbiologiques. In: *Norme NF EN ISO 16061*. Paris, France: Association Française de Normalisation.
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard methods for the analysis of water and wastewater* (22nd ed.). Washington, DC, USA: American Public Health Association, AWWA, and Water Environment Federation.
- Arpajón, Y., Larrea, J., Rojas, N., Heydrich, M., & Lugo, D. (2012). *Efectividad de los programas de preservación de ecosistemas dulceacuícolas de la Sierra del Rosario, Pinar del Río*. Convención Internacional de Salud Pública, Cuba Salud, La Habana, Cuba.

- Becker, J. C., Rodibaugh, K. J., Hahn, D., & Nowlin, W. H. (2016). Bacterial community composition and carbon metabolism in a subtropical riverscape. *Hydrobiologia*. DOI: 10.1007/s10750-016-3058-2
- Berdjeb, L., Ghiglione, J. F., & 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.
- Berdjeb, L., Pollet, T., Domaizon, I., & Jacquet, S. (2011b). Effect of grazers and viruses on bacterial community structure and production in two contrasting trophic lakes. *BMC Microbiology*, 11, 88.
- Breton-Deval, L., Sanchez-Flores, A., Juárez, K., & Vera-Estrella, R. (2019). Integrative study of microbial community dynamics and water quality along The Apatlaco River. *Environmental Pollution*, 255, 113158.
- Burtscher, M. M., Zibuschka, F., Mach, R. L., Lindner, G., & 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.
- Chen, G., Cao, X., Song, C., & Zhou, Y. (2010). Adverse effects of ammonia on nitrification process: The case of Chinese shallow freshwater lakes. *Water Air Soil Pollution*, 210, 297-306.
- CITMA, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba. (2009). *IV Informe Nacional al Convenio sobre la*

Diversidad Biológica. La Habana, Cuba: Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la República de Cuba.

Clarke, K. R., & Gorley, R. N. (2006). *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. Plymouth, UK: PRIMER-E Ltd. Plymouth Marine Laboratory.

Crim, J. F., Schoonover, J. E., & Lockaby, B. G. (2012). Assessment of fecal coliform and *Escherichia coli* across a land cover gradient in west Georgia streams. *Water Quality, Exposure and Health*, 4, 143-158.

Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 6, 183-194.

Dinsmore, K. J., Billett, M. F., & 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.

Dorigo, U., Lefranc, M., Leboulanger, C., Montuelle, B., & Humbert, J. F. (2009). Spatial heterogeneity of periphytic microbial communities in a small pesticide-polluted river. *FEMS Microbiology Ecology*, 67, 491-501.

Duarte, S., Cassio, F., & 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. Recovered from <http://www.intechopen.com/books/gelectrophoresis-principles->

and-basics/denaturing-gradient-gel-electrophoresis-dgge-in-microbial-ecologyinsights-from-freshwaters

Dunlop, J., McGregor, G., & 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. Queensland, Australia: National Action Plan for Salinity and Water Quality Technical Report Series. The State of Queensland, Australia.

Figueiredo, D., Ferreira, R. V., Cerqueira, M., Condesso, T., Pereira, M. J., Castro, B. B., & Correia, A. (2012). Impact of water quality on bacterioplankton assemblage along Cértima River Basin (Central Western Portugal) assessed by PCR-DGGE and multivariate analysis. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 471-485.

Gich, F., Schubert, K., Bruns, A., Hoffelner, H., & 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.

Goto, D. K., & 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.

Ibekwe, A. M., Leddy, M. B., Bold, R. M., & Graves, A. K. (2012). Bacterial community composition in low-flowing river water with different sources of pollutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(1), 155-166.

- Jung, S. W., Kwon, O. Y., Yun, S. M., Joo, H. M., Kang, J.-H., & 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.
- Larrea, J. A., Rojas, M. M., Lugo, D., & Heydrich, M. (2013). Behavior of fecal contamination indicators in waters of the tourist complex "Las Terrazas", Pinar del Río, Cuba. In: Farfán, H., Corvea, J. L., Bustamante, I. D., & LaMoreaus, J. W. (eds.). *Management of water resources in protected areas* (pp. 263-270). New York, USA/ Heidelberg, Germany. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K., & Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 463-473.
- Lear, G., Dopheide, A., Ancion, P., Roberts, K., Washington, V., Smith, J., & Lewis, G. D. (2012). Biofilms in freshwater: Their importance for the maintenance and monitoring of freshwater health. In: Lear, G., & Lewis, G. D. (eds.). *Microbial biofilms: Current research and applications* (pp. 129-151) Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Lewis, G. D., Washington, V., Lear, G., Roberts, K., Curran J., Fan, V., & Neale, M. (2010). *A Bacterial Community Index (BCI) for New Zealand Streams - Year 1* (Technical Report 2010/068). Auckland, New Zealand: Auckland Regional Council.
- Lindström, E. S., Kamst-Van-Agterveld, M. P., & 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.

Liu, Z., Huang, S., Sun, G., Xu, Z., & Xu, M. (2012). Phylogenetic diversity, composition and distribution of bacterioplankton community in the Dongjiang River, China. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 30-44.

Llirós, M., Inceoglu, Ö., García-Armisen, T., Anzil, A., Leporcq, B., Pigneur, L.-M.,..., & Servais, P. (2014). Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. *PLoS ONE*, 9(12), 1-27.

Muyzer, G., De-Waal, E., & 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.

Newton, R. J., & 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

Niekerk, H. V., Silberbauer, M. J., & 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.

Norma Cubana 22. (1999). *NC 22: lugares de baño en costas y en masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios*. La Habana, Cuba: Oficina Nacional de Normalización.

- Oh, S., Caro-Quintero, A., Tsementzi, D., DeLeon-Rodriguez, N., Luo, C., Poretsky, R., & 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.
- Ouattara, N. K., Garcia-Armisen, T., Anzil, A., Brion, N., & 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.
- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(9), 1-6.
- Peña, B., Fagundo, J. R., Delgado, F. R., & Orbera, L. (2001). Caracterización de fuentes minerales en el Distrito Físico Geográfico Pinar del Río, Cuba. *Memorias GEOMIN*. IV Congreso de Geología y Minería, Ingeniería Geológica e Hidrogeología, La Habana, Cuba.
- Ramakrishnaiah, C., Sadashivaiah, C., & Ranganna, G. (2009). Assessment of water quality index for the groundwater in Tumkur Taluk, Karnataka State, India. *Journal of Chemistry*, 6, 523-530.
- Rashed, M. N., & 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.
- Romeu, B., Quintero, H., Larrea, J., Rojas, N., & Heydrich, M. (2015). Calidad química y microbiológica de las aguas del río San Juan, Artemisa (Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*, 15(4), 1367-1374.

- Rubio-Arias, H., Contreras-Caraveo, M., Quintana, R. M., Saucedo-Teran, R. A., & Pinales-Munguia, A. (2012). An overall water quality index (WQI) for a man-made aquatic reservoir in Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9, 1687-1698.
- Rubio-Arias, H., Rey-Burciaga, N. I., Quintana, R. M., Ochoa-Rivero, J. M., Saucedo-Teran, R. A., & Ortiz-Delgado, R. C. (2016) Recreational Water Quality Index (rwqi) for Colina Lake in Chihuahua, Mexico. *Acta Universitaria*, 26(3), 14-22. DOI: 10.15174/au.2016.901
- Sigee, D. (ed.). (2005). *Freshwater microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. The Atrium, Southern Gate, Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Sun, H., He, X., Ye, L., Zhang, X.-X., Wu, B., & Ren, H. (2016). Diversity, abundance, and possible sources of fecal bacteria in the Yangtze River. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s00253-016-7998-2
- Tang, Y., Tao, P., Tan, J., Mu, H., Peng, L., Yang, D., Tong, S., & 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.
- Tanor, E. B., Ts'enoli, S., & George, M. J. (2014). Physico-chemical assessment of pollution in the Caledon River around Maseru city, Lesotho. *Eurasian Chemical Bulletin*, 3(8), 776-782.

- Ter-Braak, C. J. F., & Šmilauer, P. (2002). *CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for canonical community ordination (version 4.5)*. Power, M. (ed.). Ithaca, USA: www.canoco.com. Recuperado de <https://edepot.wur.nl/405659>
- Varol, M., Gökot, B., Bekleyen, A., & 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.
- Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O. C., & 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.
- Wang, P., Chen, B., Yuan, R., Li, C., & Li, Y. (2016). Characteristics of aquatic bacterial community and the influencing factors in an urban river. *Science of The Total Environment*, 569-570, 382-389.
- Washington, V. J., Lear, G., Neale, M. W., & 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.
- Weber-Scannell, P. K., & Duffy, L. K. (2007). Effects of total dissolved solids on aquatic organisms: A review of literature and recommendation for salmonid species. *American Journal of Environmental Sciences*, 3 (1), 1-6.

WHO, World Health Organization. (2003). *Guidelines for safe recreational water environments. Coastal and fresh waters (vol. 1)*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Yisa, J., & Jimoh, T. (2010). Analytical studies on water quality index of River Landzu. *American Journal of Applied Sciences*, 7(4), 453-458.

Zhang, L., Wang, S., & 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, 178-186. DOI: 10.1016/j.ecss.2014.08.009

Zhou, M. Y., Chen, X. L., Zhao, H. L., Dang, H. Y., Luan, X. W., Zhang, X. Y., He, H. L., Zhou, B. C., & 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.