

# SIMILITUD FENOTÍPICA ENTRE BACTERIAS HETERÓTROFAS AISLADAS DE DIFERENTES ZONAS DE LA PLATAFORMA SUR OCCIDENTAL DE CUBA.

Maria Elena Miravet \*, Yolaine Delgado y Raquel Núñez

Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Ave 1ra No. 18406, entre 184 y 186, Municipio Playa, Ciudad Habana, Cuba.

(\*) Autor correspondiente: E-mail: [memiravet@hotmail.com](mailto:memiravet@hotmail.com)

## RESUMEN

La comparación de cepas aisladas de diferentes regiones en base a sus características fenotípicas contribuye al conocimiento de la dispersión y capacidad de sobrevivencia de las bacterias en el ecosistema marino. El presente trabajo tiene como objetivo determinar si existe similitud fenotípica entre las bacterias marinas heterótrofas aerobias aisladas de diferentes zonas de la plataforma suroccidental de Cuba. Se aislaron 78 cepas: 31 de biotopos de fondos blandos y 47 de arrecifes. Para la caracterización fenotípica se realizaron 52 pruebas y los resultados se procesaron con el Programa de Taxonomía Numérica NTSYS, versión 1.7 (1992). Las cepas aisladas de los fondos blandos presentaron niveles de similitud entre 29.4 y 88.2% y las de arrecifes entre 39.0 y 94.0%. Entre los aislados procedentes de los fondos blandos se encontró mayor diversidad fenotípica, lo que puede relacionarse con una mayor disponibilidad de materia orgánica asequible en la macrolaguna que en los arrecifes, los cuales se encuentran más influenciados por las aguas oceánicas oligotróficas adyacentes. Entre las cepas procedentes del SE y del SW de la macrolaguna, se encontraron coeficientes de similitud entre 50.0 y 78.5% lo que indica que aún cuando las condiciones ambientales son diferentes, existe una amplia versatilidad metabólica entre los aislados. En el caso de las cepas aisladas de los arrecifes, se pueden reconocer dos grupos: uno procedente del arrecife de Juan García y otro formado por aislados de los arrecifes Punta del Este -Cantiles-Rosario-Los Ballenatos-Hijo de Los Ballenatos.

Palabras clave: similitud fenotípica; bacterias heterótrofas; ASW, Cuba.

## ABSTRACT

The comparison between isolates from different regions taking into account the phenotypic characteristics contribute to the bacteria dispersion and survival understanding in the marine ecosystem. The aim of this work is determine the phenotypic similarity between heterotrophic marine bacteria isolates from different regions of the southwest Cuban shelf. 78 strains were isolates: 31 from muds biotopes and 47 from coral reefs. The results obtained from 52 physiological and biochemical tests were procesed with the Numerical Taxonomy Programa NTSYS. pc, versión 1.7 (1992). The isolates from muds showed a similarity level between 29.4 and 88.2% and from coral reefs between 39.0 and 94 %. A higher phenotypical diversity was found between strains isolated from muds than those isolated from coral reefs. The obtained results can be relationship with a higher organic matter sources disponibility in the macrolagune than coral reefs, wich are more influenced by the oligotrophics oceanic waters. Isolates from the SE and SW macrolagune zones showed similarity levels between 50.0 y 78.5% indicating that even in differents environmental conditions there are una amplia versatilidad metabólica entre los aislados. The coral reefs isolates formed two groups: one from Juan García and another from Punta del Este -Cantiles-Rosario-Los Ballenatos- Hijo de Los Ballenatos.

Key words: phenotypic similarity; heterotrophic bacteria; ASW, Cuba.

Son numerosos los factores abióticos que influyen en la distribución de las bacterias heterótrofas aerobias en el medio marino, entre estos se encuentran: la abundancia y complejidad de la materia orgánica asequible como fuente de carbono, la disponibilidad de oxígeno disuelto, la temperatura y la dinámica de las aguas. Las bacterias que presentan mayor versatilidad fisiológica son capaces de sobrevivir en una mayor variedad de ambientes, mientras que aquellas con requerimientos nutricionales y/o energéticos

especializados muestran una distribución geográfica restringida (Madigan *et al.*, 2000; Pennisi, 2006).

Los estudios realizados sobre distribución de bacterias heterótrofas en las aguas de la plataforma suroccidental de Cuba han informado que las mayores concentraciones de estas bacterias se encuentran hacia la zona oeste, lo que ha sido relacionado con la dinámica de las aguas y la disponibilidad de materia orgánica en esta

región (Miravet, 2003), sin embargo, no se conoce el grado de similitud fenotípica que existe entre los aislados procedentes de los diferentes biotopos que conforman esta plataforma.

Aunque es sabido que las características fenotípicas no expresan toda la información genética que puede contener un genoma (Roselló-Mora y Amann, 2001), se reconoce que la comparación de cepas aisladas de diferentes regiones en base a sus características fenotípicas contribuye al conocimiento de la dispersión y capacidad de sobrevivencia de las bacterias en el ecosistema marino (Staley and Gosink, 1999).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si existe similitud fenotípica entre las bacterias marinas heterótrofas aerobias aisladas de diferentes zonas de la plataforma suroccidental de Cuba.

## MATERIALES Y METODOS

La plataforma suroccidental de Cuba presenta una anchura entre 90 y 140 km y un área de 20 870 km<sup>2</sup> y se encuentra localizada entre los 21° 25' y los 22 ° 41' latitud N y los 80° 52' y 84° 00' longitud W (Fig.1). Los fondos predominantes son los pastos marinos o praderas de *Thalassia testudinum* con densidad de vegetación variable y casi la totalidad de la frontera con el océano está formada por arrecifes coralinos.

En cuanto a la circulación, la escasa profundidad de la zona (promedio 6 m) permite que el viento determine un desplazamiento de la masa de agua hacia el oeste, con una velocidad promedio de 1.0 a 4.7 cm.seg<sup>-1</sup> (Arriaza *et al.*, 2006).

Las muestras de agua para el aislamiento de las cepas se tomaron a 1 m por debajo de la superficie y se procesaron asépticamente inmediatamente después de la colecta. Se empleó como medio de cultivo para el aislamiento y el mantenimiento de los aislados Agar Marino 2216E (Oppenheimer and ZoBell, 1952).

El presente estudio se realizó con 78 cepas de bacterias: 31 aisladas de 10 estaciones situadas en diferentes zonas de la macrolaguna que presentan fondos blandos y 47 procedentes de las estaciones ubicadas en los arrecifes Juan García, Punta del Este, Cantiles, Rosario, Los Ballenatos e Hijo de los Ballenatos (Fig.1).

A todos los aislados se les determinaron las siguientes características fenotípicas: reacción

Gram por el método del KOH (Buck, 1982), morfología de las células, producción de pigmento, presencia de catalasa y de citocromo oxidasa, tipo de metabolismo (fermentativo u oxidativo), motilidad y producción de indol en Medio SIM (Difco), capacidad de reducir nitratos a nitritos, producción de SH<sub>2</sub> de tiosulfato, Voges Proskauer, hidrólisis del almidón, Tween 80, caseína, lecitina, alginato de sodio, licuefacción de la gelatina, crecimiento a 4, 37 y 40 °C, tolerancia al NaCl (0, 6, 8, y 20%, pH:7.2) (Colwell and Grigorova, 1987), y uso de las siguientes fuentes de carbono en Medio Basal (Baumman and Baumman, 1981): D-ribosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa, maltosa, celobiosa, sucrosa, lactosa, melibiosa, D-gluconato, glicerol, D-manitol, citrato, succinato, fumarato, acetato, p-hidroxibenzoato, glicina, L-leucina, L-serina, L-arginina, L-glutamato, L-alanina y L-ornitina.

Se confeccionó una matriz con los valores del índice de similitud de Jacard (Sj) obtenidos a partir de la codificación 1 o 0 (presencia/ positivo o ausencia/negativo) de los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cada cepa y a partir de ésta se realizó el agrupamiento entre cepas empleando el algoritmo pares de grupos no ponderados con la media aritmética (UPGMA), que facilita la conversión de los resultados en dendograma. Todo este procesamiento se hizo mediante el Programa de Taxonomía Numérica NTSYS. pc, versión 1.7 (1992).

Siguiendo el criterio de Torsvik *et al.*, (1990) los agrupamientos que mostraron una similitud mayor del 80% se definieron como un "biotipo", lo cual significa que en este trabajo, 10 caracteres diferentes separan cada biotipo.

Se aplicó la prueba no paramétrica de los rangos para muestras pareadas de Wilcoxon (T) para comparar los resultados de las actividades de descomposición de proteínas, carbohidratos y lípidos, respectivamente, entre los aislados de fondos blandos y los de arrecifes, así como para los resultados de la prueba de reducción de nitratos a nitritos.

## RESULTADOS

Los dendogramas obtenidos muestran que tanto las cepas aisladas de los fondos blandos como de los arrecifes, presentaron en general, bajos niveles de similitud: entre 29.4 y 88.2% y entre 39.0 y 94% respectivamente, y que entre los aislados procedentes de los fondos blandos hay mayor diversidad fenotípica que entre los de arrecifes (Figs. 2 y 3).

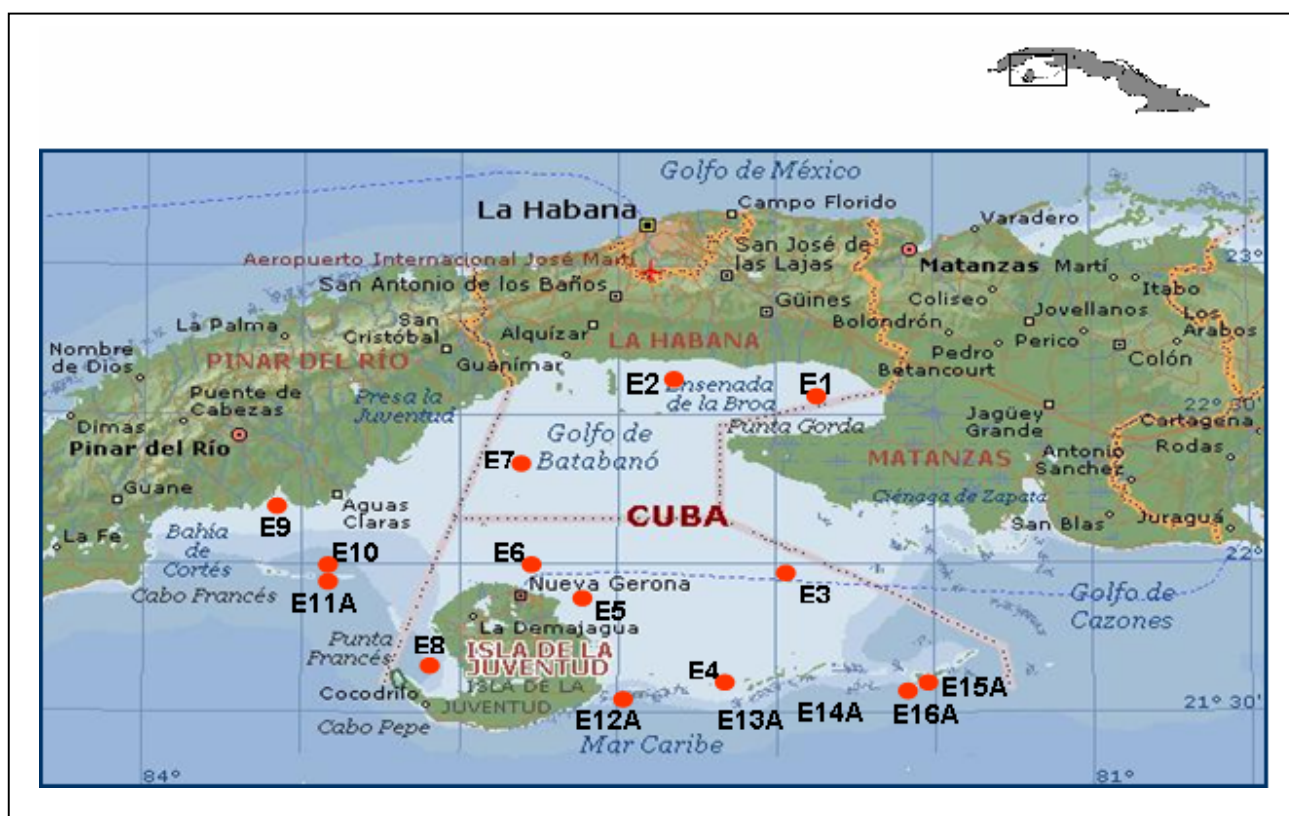


Fig. 1. Situación geográfica de la zona de estudio y ubicación de las estaciones de muestreo.

Entre las bacterias aisladas de los fondos blandos, se detectaron ocho grupos de homología a un nivel de similitud entre 29 y 80% y con más de 80 % de similitud se definieron un total de dos biotipos en los cuales quedaron incluidas el 22.6% de las cepas (Tabla 1).

Entre los aislados procedentes de los arrecifes, aparecieron 12 grupos de homología y se encontró un total de siete biotipos con más del 80% de similitud donde quedaron incluidas el 38.9% de las cepas estudiadas.

Entre los aislados de fondos blandos, las cepas más cercanas en similitud (No.60 y No. 267) presentaron un 88.2% de homología (Fig. 2) y fueron aisladas de las estaciones E8 (Ensenada de Sigüanea) y E10 (Juan García), respectivamente. También, de las aguas de las estaciones E4, (Tablones) E8 (Ensenada de Sigüanea) y E5 (NE Isla Juventud) se aislaron otras tres cepas (No. 68, No. 178 y No.268) con igual porcentaje de similitud entre sí (88.2%), las cuales se unen al grupo anterior a un nivel de homología de 80.3 % (Fig. 2).

Por otra parte, cepas aisladas de las aguas de la estación E3, situada al extremo E del golfo

(arenazo), se asemejan a las aisladas de las aguas de la estación E9, situada en el extremo W de la macrolaguna (Coloma) en un biotopo con fondo fangoso desprovisto de vegetación.

La cepa (No. 172) cuyas características fenotípicas alcanzaron el menor valor de similitud (29.4%) fue aislada de la estación E15 (arenazo).

En los arrecifes, la cepa más diferente de todas (No.15cl) se aisló del agua de la meseta del arrecife Cantiles (Fig. 3). De este mismo arrecife se aislaron las cepas fenotípicamente más semejantes (94%) y procedieron específicamente, de muestras de agua de la meseta arrecifal y de 12 m de profundidad en la zona frontal, respectivamente. Estos aislados del arrecife de Cantiles, se asemejan un 85 % a una cepa de Punta del Este (No.19) y a otra de Los Ballenatos en un 87 % (No. 6cl) formando estas 4 cepas un biotipo (Fig. 3).

Otras 3 cepas procedentes del arrecife Los Ballenatos formaron un biotipo (No. 11cl, No.14cl y No. 12cl), y otros 3 aislados de los arrecifes Cantiles, Hijo de los Ballenatos y Los Ballenatos formaron otro biotipo (No. 10-0, No. 20cl y No. 37).

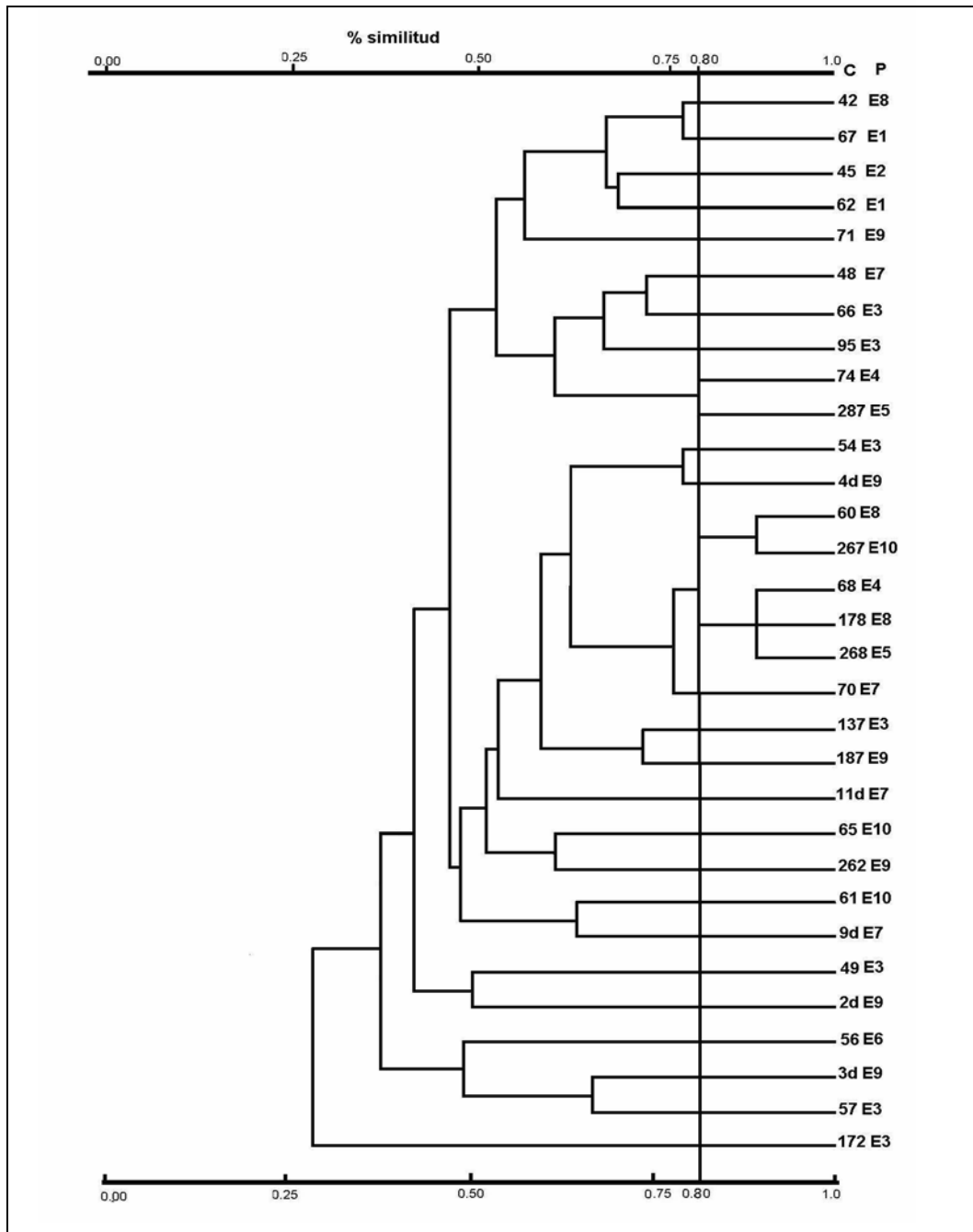


Fig. 2. Dendrograma de similitud confeccionado en base a las características morfológicas y fisiológicas de las cepas aisladas de fondos blandos (C: código de la cepa, P: estación de procedencia).

En general, entre los aislados de los arrecifes Punta del Este, Cantiles, Rosario, Los Ballenatos e Hijo de Los Ballenatos se encontraron varios grupos de homología, mientras que las cepas procedentes del arrecife de Juan García (E17A) resultan muy similares entre sí y se encuentran a

mayor distancia de similitud del resto de las cepas aisladas de los otros arrecifes (Fig. 3).

La capacidad fisiológica de los aislados para descomponer macromoléculas orgánicas, fue ligeramente superior en las cepas procedentes de las estaciones de fondos blandos que en los aislados de los

Tabla 1. Número de biotipos que se encontraron en el análisis de agrupamiento y procedencia de las cepas que conforman cada biotipo (A: aislamientos procedentes de fondos blandos, B: aislamientos de arrecifes).

A. Cepas aisladas de fondos blandos		
No. de biotipos	No. de cepas por biotipo	Estación de procedencia de las cepas que forman el biotipo
1	2	E4-E5
1	5	E8-E10-E4-E8-E5
B. Cepas aisladas de arrecifes		
No. de biotipos	No. de cepas por biotipo	Estación de procedencia de las cepas que forman el biotipo
2	3	E15A-E15A-E15A E13A-E10A-E15A
1	4	E12A-E15A-E16A-E16A
4	2	E11A-E11A E14A-E15A E11A-E14A E11A-E11A

arrecifes, aunque no fue significativa la diferencia ( $T = 0.24$ ,  $p=0.70$ ). También, se detectó que en general, la actividad proteolítica “*in vitro*” fue mas frecuente entre las cepas que la capacidad de descomponer lípidos y carbohidratos (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de cepas que mostraron actividad proteolítica, lipolítica y amilolítica “*in vitro*” (FB: aislados procedentes de fondos blandos, A: aislados de arrecifes).

Prueba	% Positivas (FB)	% Positivas (A)
Proteolisis (descomposición de la gelatina)	68.9	61.7
Lipolisis (crecimiento en Tween 80)	44.8	26.5
Amilolisis (formación de ácido de almidón)	34.5	29.4
Reducción de nitratos a nitritos	68.9	55.8

Por otra parte, entre las bacterias aisladas de los fondos blandos se encontró un mayor porcentaje de cepas capaces de reducir nitratos a nitritos que entre los aislamientos procedentes de los arrecifes (Tabla 2).

## DISCUSIÓN

La mayor diversidad fenotípica que se encontró entre las cepas aisladas de fondos blandos puede estar relacionada con la existencia de una mayor abundancia y disponibilidad de materia orgánica en la macrolaguna que en las aguas de los

arrecifes (Miravet, 2003), los cuales se encuentran más influenciados por las aguas oceánicas oligotróficas adyacentes. Según Pennisi (2006), la disponibilidad de materia orgánica lábil y oxígeno disuelto en el medio, determinan, en primera instancia, el desarrollo de la microbiota aerobia heterotrófica.

En la macrolaguna que conforma la plataforma suroccidental de Cuba predominan los fondos areno-fangosos carbonatados (Ionin *et al.*, 1977) con densidad de vegetación variable (Alcolado *et al.*, 1990) y los niveles de oxígeno disuelto en las aguas varían entre 2.50 y 7.98 mg.L<sup>-1</sup> (Perigó *et al.*, 2003). La vegetación marina constituye una fuente de materia orgánica y oxígeno que utilizan las bacterias heterótrofas aerobias para llevar a cabo el proceso de mineralización, el cual da lugar a nutrientes y la consiguiente formación de biomasa bacteriana.

El hecho de encontrar cepas fenotípicamente muy semejantes procedentes de estaciones distantes situadas en biotopos de fondos blandos con características diferentes, indica la existencia de una amplia dispersión y versatilidad metabólica entre los aislados de la macroalga, condición que se le atribuye a las especies cosmopolitas. Muchos microorganismos viven libres o asociados a los organismos del plancton o a partículas de detritus, por lo que su traslado está sujeto a la dinámica de las aguas, otros viven en simbiosis con algunos organismos como los invertebrados y

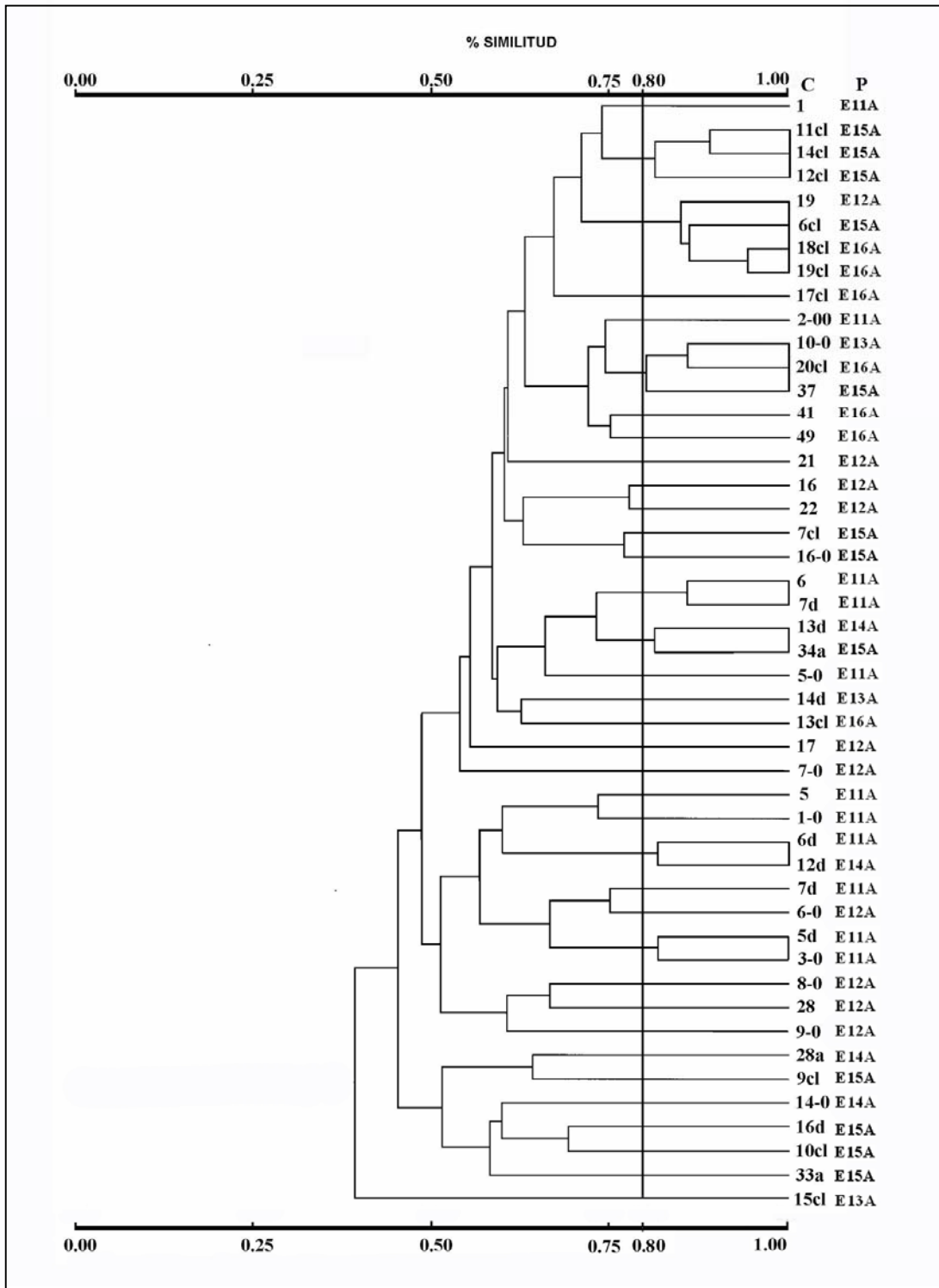


Fig. 3. Dendrograma de similitud confeccionado en base a las características morfológicas y fisiológicas de las cepas aisladas de los arrecifes (C: código de la cepa, P: estación de procedencia).

peces, por tanto, las migraciones de estos últimos, se considera otra vía de traslado de especies microbianas de un lugar a otro (Staley y Gosink, 1999).

En el caso de las bacterias aisladas de los arrecifes, se encontraron cinco biotipos formados por cepas aisladas indistintamente de Punta del Este, Cantiles, Rosario, Los Ballenatos e Hijo de Los Ballenatos, y dos biotipos formados sólo por cepas del arrecife Juan García. Las cepas procedentes del arrecife Juan García presentan diferencias fenotípicas con relación a los aislados del resto de los arrecifes, quizás debido a las particularidades determinadas por su situación geográfica.

El arrecife de Juan García está ubicado en el suroeste de la plataforma suroccidental, en la zona por donde salen las aguas que entran a la plataforma por el este procedentes del Golfo de Cazones, y en su paso hacia el oeste, se enriquecen con la materia orgánica proveniente de la isla principal y de los numerosos cayos y cayuelos que se encuentran en esta zona.

Independientemente del lugar de origen, las bacterias heterótrofas aisladas de la plataforma suroccidental de Cuba mostraron capacidad metabólica para descomponer macromoléculas orgánicas "in vitro", y reducir nitratos a nitritos cuando en el medio hay ausencia de oxígeno, lo que favorece las posibilidades de dispersión, sobrevivencia y colonización de nuevos hábitats.

## CONCLUSIONES

1. Se encontró una mayor diversidad fenotípica entre las cepas aisladas de los fondos blandos que entre aquellas procedentes de los arrecifes, lo que pudiera relacionarse con una mayor disponibilidad de materia orgánica en la macrolaguna que en las aguas arrecifales, las cuales, en general, se encuentran más influenciadas por las aguas oceánicas oligotróficas adyacentes.

2. Entre las cepas procedentes de las zonas este y oeste de la plataforma suroccidental se aislaron cepas que presentaron niveles de homología entre 50.0 y 78.5 % lo que indica una amplia dispersión y versatilidad metabólica entre los aislados procedentes de la macrolaguna.

3. Las cepas aisladas del arrecife de Juan García son muy similares entre sí y se encuentran a mayor distancia de homología del resto de las cepas procedentes de los arrecifes Punta del este,

Cantiles, Rosario, Los Ballenatos e Hijo de los Ballenatos.

## REFERENCIAS

Alcolado, P. (1990): *El Bentos de la Macrolaguna del Golfo de Batabanó*. Ed. Academia, La Habana, 161 pp.

Arriaza, L., D.E. Milian, Y. Simanca, L. Rodas y P.L. Romero (2006): SIMCO: Herramienta computacional operacional para la simulación de corrientes marinas en zonas de la plataforma marina cubana. Cuba, *II Conferencia Científica de la Universidad de las Ciencias Informáticas*, La Habana, 8 pp.

Buck, J.D. (1982): Non staining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:992-993

Baumman, P. and L. Baumman (1981): The marine gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckeia*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. En: *The Prokaryotes*, Vol.I, (M.P.Satarr, H. Stolp & H.G. Truper, eds.) Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, pp: 1302-1331.

Colwell, R. R. and R. Grigorova (1987): *Methods in Microbiology.. Current Methods for Classifications and Identification of Microorganisms*, Ed. Acad. Press, Vol.19, 518 pp.

Ionin, A.S., Y.A. Pablidis y O. Avello-Suárez (1977): Geología de la Plataforma cubana. /en Ruso/ Ed. Nauta, Moscú, 215 pp.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and J. Parker (2000): *Brock. Biología de los microorganismos*. 8va Ed. Print Hall Iberia, Madrid, 1064 pp.

Miravet, M.E. (2003): *Abundancia, actividad y diversidad de bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó*. Universidad de la Habana, *Tesis de Doctorado*, 98 pp.

Oppenheimer, C.H. and C.E. ZoBell (1952): The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Jour. Mar. Res.* 11: 10-18.

Pennisi, E. (2006): How a Marine Bacterium Adapts to Multiple Environments. *Science* 24. Vol. 311, No. 5768, p. 1697.

Perigó, E., Montalvo, J. F. y D. M. Pérez (2003): Valores más frecuentes y extremos de los parámetros químicos de calidad ambiental en ecosistemas costeros y aguas de la plataforma marina cubana. *Contribución a la Protección y Educación Ambiental*, Vol.4: 445-455.

Roselló-Mora, R. and R. Amann (2001): The species concept for procaryote. *FEMS Microbiol.Rev.* 25:39-69

Staley, J.T. and J.J. Gosink (1999): Poles Apart: Biodiversity and Biogeography of Sea Ice Bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 53:189-215

Torsvik , V., K. Salte, R. Sørheim and J. Goksoyr (1990): Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* Vol. 56 (1): 776-781.

Aceptado: 4 de septiembre de 2007