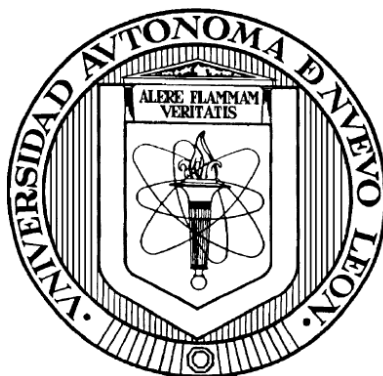


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR
MICROORGANISMOS AISLADOS DE MICROBIOMAS DE LA
CUEVA SAN BARTOLO, SANTA CATARINA, NUEVO LEÓN.**

Por

LAURA ELENA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Microbiología Aplicada**

Julio, 2024

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR
MICROORGANISMOS AISLADOS DE MICROBIOMAS DE LA
CUEVA SAN BARTOLO, SANTA CATARINA, NUEVO LEÓN**

Aprobación de Tesis:



DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUCKEN
Director

DR. SOUMYA GHOSH
Asesor externo

DRA. MARIA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Comité de tesis

DRA. ALMA ELIZABETH GÓMEZ LOREDO
Comité de tesis

DRA. MELISSA MARLENE RODRÍGUEZ DELGADO
Comité de tesis

DRA. MARIA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Subdirectora de Estudios de Posgrado

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
— Carl Sagan

PRÓLOGO

Laura Elena González Hernández
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio:

**Estudio de la actividad antimicrobiana por microorganismos aislados de
microbiomas de la Cueva San Bartolo, Santa Catarina, Nuevo León.**

Área de estudio:

Número de páginas: 73 Candidato para el grado de **Maestro en Ciencias
con orientación en Microbiología Aplicada**

Fecha de Graduación: **Julio, 2024**

Propósito: Determinar la actividad antimicrobiana de actinobacterias aisladas directamente de biopelículas creciendo dentro de la Cueva San Bartolo (Santa Catarina, Nuevo León) contra ocho organismos de importancia médica para el hombre través de tres técnicas de laboratorio.

RESUMEN

Este trabajo consiste en un estudio de la actividad antimicrobiana de trece actinobacterias aisladas de dos diferentes microbiomas presentes dentro de la Cueva San Bartolo (región de la Huasteca en Santa Catarina, Nuevo León) contra un panel de siete bacterias y una levadura. Se realizaron tres diferentes pruebas de antagonismo microbiano. En la prueba de cribado se utilizó el método de raya cruzada y solamente siete mostraron actividad antimicrobiana. Estos aislados fueron utilizadas en las siguientes dos pruebas. En la prueba del cribado solamente dos aislados mostraron actividad contra patógenos Gram negativos y siete contra Gram positivos, siendo *B. cereus* la más afectada. Ninguna mostró actividad contra *C. albicans*. En la prueba con el sobrenadante celular se mostró actividad solamente contra *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *E. faecalis*. Igual que en la prueba anterior, ninguna mostró actividad contra *C. albicans*. En la prueba del sobrenadante celular tres actinobacterias mostraron actividad contra *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*. En esta última prueba sí hubo inhibición de *C. albicans* por tres de los aislados. En ninguna de las dos últimas pruebas se observó actividad contra las cepas Gram negativas *E. coli* y *S. typhimurium*. Las diferencias observadas entre los resultados de estos dos ensayos son causadas por la síntesis exocelular e intracelular de compuestos y sus características físicas y químicas. En conclusión, el 53.8% de las actinobacterias de la Cueva San Bartolo sí produjeron antibióticos capaces de inhibir al 87.5% de los microorganismos patógenos de importancia médica para el hombre utilizados en este trabajo. Se tuvo un mayor efecto sobre bacterias Gram positivas que Gram negativas. No obstante, estos antibióticos y probablemente otros metabolitos secundarios producidos durante los experimentos merecen una investigación más detallada para determinar su naturaleza y poder aplicarlos en estudios posteriores.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por la beca otorgada y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo hacia el proyecto con todo el material y equipo necesario para su realización.

Este proyecto fue desarrollado en un periodo que abarcó etapas de mi vida sumamente diferentes. Es por esto que expreso mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de cierta manera, me ayudaron a culminar esta investigación. A mi director principal, el Dr. Ulrico López y a mi asesor externo, al Dr. Soumya Ghosh por todos los consejos y conocimientos que me proporcionaron. Agradezco a los miembros del comité de tesis, la Dra. María Elena Cantú, Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó y a la Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado por sus comentarios, correcciones y sugerencias; a la Dra. Pilar del Carmen Morales, por permitirme utilizar las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L., por apoyarme en las descripciones realizadas y compartirme sus conocimientos en su área de investigación. Al Dr. Raúl Reyna. Al laboratorio de Inmunología de la FCB por su gran apoyo en este proyecto. Dr. Alonso, Servando, Ricardo y Lalo. A la Dra. Laura Rosales y al Dr. Hugo Beraldi. Al Grupo de Espeleología del Tecnológico de Monterrey, con el cual las aventuras nunca se terminan. A las personas que con su ejemplo y abrazo paterno nunca me permiten sentirme sola, mi Maestro Luis Alberto Pérez y a Oscar Flores. A mi familia y amigos por su larga paciencia, alentarme siempre y apoyarme en todo, estando siempre presentes sin importar la distancia, todos ustedes me hacen más fuerte y llenan mi vida de cariño y alegría.

Por último me gustaría hacer una mención especial al Dr. Alberto Blanco Piñón por toda su asesoría y consejos durante las distintas etapas de la investigación, y por motivarme de todas las maneras posibles a terminar este proyecto. Su ayuda contra la *resistenza*, al igual que su amistad, será invaluable por siempre.

DEDICATORIA

A mi mamá

A mi Javi

A mi Aurelio

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2	3
ANTECEDENTES	3
2.1 Marco Histórico de los Antibióticos	3
2.2 La Resistencia Microbiana como Problema de Salud Pública Mundial	5
2.3 Las Cuevas como Fuente de Nuevos Antimicrobianos.....	6
2.4 Microorganismos en Cuevas: Las Biopelículas	8
2.5 Las Actinobacterias como Fuente de Nuevos Compuestos Bioactivos	10
2.6 Actinobacterias Encontradas en Cuevas	11
CAPÍTULO 3	16
ÁREA DE ESTUDIO.....	16
3.1 Descripción del Área de Estudio	16
3.2 Descripción de la Cueva.....	17
CAPÍTULO 4	20
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	20
CAPÍTULO 5	21
MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Materiales y Reactivos.....	21
5.1.1. Material para Salida a Campo y Colecta	21
5.1.2. Medios de Cultivo para Colecta de Microorganismos.....	22
5.1.3. Medios de Cultivo para Cultivo de Microorganismos en Laboratorio	24
5.1.4. Material para las Pruebas de Actividad Antimicrobiana.....	25
5.2 Metodología	26
5.2.1. Colecta de Muestras.....	26
5.2.2. Cultivo de Microorganismos	30
5.2.3. Descripción Morfológica	30

5.2.4. Pruebas de Actividad Antimicrobiana	30
5.2.4.1 Prueba de Inhibición	31
5.2.4.2 Prueba de Sobrenadante de Cultivos	32
5.2.4.2.1 Obtención de Sobrenadante	32
5.2.4.2.2 Evaluación de Sobrenadante contra Cepas Patógenas	33
5.2.4.3 Prueba de los Extractos Metanólicos.....	33
5.2.4.3. 1 Obtención de Extracto Metanólico	33
5.2.4.5 Evaluación de Extractos Metanólicos contra Cepas Patógenas	34
CAPÍTULO 6	35
RESULTADOS	35
6.1 Aislamiento de Microorganismos	35
6.2 Aislamiento de Actinobacterias.....	40
6.3 Actividad Antimicrobiana.....	48
6.3.1 Cribado Inicial.....	48
6.3.2 Prueba con Sobrenadante Celular	50
6.3.3 Prueba con Extracto Metanólico.....	51
CAPÍTULO 7	52
DISCUSIÓN	52
CAPÍTULO 8	62
CONCLUSIONES.....	62
CAPÍTULO 9	64
PERSPECTIVAS	64
CAPÍTULO 10	65
DISPOSICIÓN DE RESIDUOS.....	65
CAPÍTULO 11	66
LITERATURA CITADA	66

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 5.1. Características de los sitios de muestreo dentro de la cueva.	27
Tabla 5.2. Código de identificación de las placas Petri inoculadas dentro de la cueva con respecto al sitio de muestreo y al tipo de medio de cultivo.	29
Tabla 6.1 Información de colecta sobre las actinobacterias recuperadas de la Cueva San Bartolo.	41
Tabla 6.2 Caracterización morfológica de las cepas aisladas de actinobacterias.	46
Tabla 6.3 Cribado inicial de aislamientos activos de actinobacterias mediante el método de rayas cruzadas contra diferentes patógenos microbianos.	51
Tabla 6.4 Actividades antimicrobianas (en mm) del sobrenadante celular de los aislados de actinobacterias.	52
Tabla 6.5 Actividades antimicrobianas (en mm) del extracto crudo de metanol intracelular de los aislados de actinobacterias.	53

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 3.1.	Cañón de La Huasteca, Santa Catarina, Nuevo León.	18
Figura 3.2.	Mapa de la Cueva San Bartolo. Modificado de C. Westmoreland y T. Raines (1966).	20
Figura 5.1.	Mapa de la Cueva San Bartolo donde se indican los sitios de muestreo. Modificado de C. Westmoreland y T. Raines (1966).	28
Figura 5.2.	Figura 5.2. A. Toma de muestras en una de las paredes de la cueva con presencia de biopelícula. B. Biopelícula del Sitio 1. C. Detalles de la biopelícula del Sitio 1 donde se muestran las formaciones de espeleotemas. D. Formaciones tipo popotes de espeleotemas encontradas en el techo de la cueva, en el Sitio 5.	30
Figura 5.3.	Ilustración que muestra cómo se inocularon los microorganismos para la determinación de actividad antimicrobiana.	33
Figura 6.1	Figura que muestra el crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo de acuerdo a las características de cada sitio de muestreo dentro de la Cueva San Bartolo.	37
Figura 6.2	Crecimiento de microorganismos en los medios AIA y R2a de la Cueva San Bartolo mostrado en porcentajes.	38
Figura 6.3	Crecimiento bacteriano de las placas inoculadas en la Cueva San Bartolo. A. Corresponde al crecimiento del Sitio 2 en medio R2A. B. Corresponde al crecimiento de microorganismos del Sitio 3 en medio R2A.	39
Figura 6.4	Crecimiento bacteriano de las placas inoculadas en la Cueva San Bartolo. A. Corresponde al crecimiento del Sitio 2 en medio R2A. B. Corresponde al crecimiento de microorganismos del Sitio 3 en medio R2A.	40
Figura 6.5	Porcentaje de colonias de actinobacterias cultivables aisladas de la cueva San Bartolo.	42
Figura 6.6.	Cantidad de colonias de actinobacterias cultivables aisladas por sitio de muestreo.	43

Figura 6.7.	Tamaño de las colonias de actinobacterias. Colonias mayores a 10 mm, A. Aislados M70 y M78. B. Aislado M78. Colonias menores a 10 mm, C. Aislado M22 y D. Aislado M55.	47
Figura 6.8	Características morfológicas y texturales de la colonia M63 en donde se pueden observar el margen filamentos del micelio, la textura rugosa, el aspecto seco y la consistencia dura.	48
Figura 6.9	Fotografías microscópicas del micelio de dos actinobacterias aisladas de la Cueva San Bartolo después de teñirlas con cristal violeta. A. Aislado M10. B. Aislado M22.	48
Figura 6.10	Características morfológicas macroscópicas y pigmentos producidos en agar ISP2 por las actinobacterias aisladas de la cueva San Bartolo. A. Colonias circulares de M10, micelio aéreo color blanco y pigmentación verde de agar. B. Colonias circulares con hueco en centro de M15, color anaranjado de micelio de sustrato y agar sin pigmentación. C. Colonias circulares de M21, micelio de color banco-grisáceo sin pigmentación en agar. D. Colonias circulares de M22, micelio aéreo color negro y pigmentación soluble violeta. E. Colonias circulares de M31, color de micelio aéreo blanco con gris sin pigmentación en agar. F. Colonias circulares de M36, color de micelio aéreo blanco sin pigmentación en agar. G. Colonias circulares de M45, micelio de color café-beige con esporulación blanca y sin pigmentación del agar. H. Colonias circulares de M49, micelio aéreo ramificado en filamentos de color blanco. I. Colonias circulares de M50, micelio aéreo color café y pigmentación soluble café. J. Colonias circulares de M55, micelio aéreo color amarillo sin pigmentación en agar. K. Colonias circulares de M69, micelio aéreo blanco-grisáceo y pigmentación café en agar. L. Colonias irregulares de M70, micelio aéreo color blanco, micelio de sustrato color anaranjado, sin pigmentación en el agar. M. Colonias irregulares con un hueco al centro de M78, micelio aéreo de color blanco sin pigmentación en el agar.	49
Figura 6.11	Prueba de cribado de M21 donde se observa la fuerte inhibición contra <i>Bacillus cereus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> .	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
AIA	agar para aislamiento de actinobacterias
AMCS	Association for Mexican Cave Studies
com. pers.	Comunicación personal
cm	centímetro
EE.UU.	Estados Unidos
g	gravedades
h	horas
km	kilómetro
m	metro
mm	milímetro
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
SPE	sustancias poliméricas extracelulares
VRE	<i>Enterobacter faecium</i> resistente a vancomicina
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase (betalactamasas de espectro extendido).

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son ampliamente utilizados para el control médico de las enfermedades bacterianas en humanos y otros seres vivos, y en los últimos años se han implementado para promover el crecimiento y mejorar la eficiencia alimentaria de animales y plantas (Allen *et al.*, 2010).

Sin embargo, el extenso consumo de estas sustancias por diferentes sectores de la sociedad ha provocado un manejo ineficiente de sus residuos, los cuales son indiscriminadamente desechados llegando a contaminar lagos, ríos y mantos freáticos. Estas sustancias no son fácilmente eliminadas en los procesos de tratamiento de aguas residuales y entran en las cadenas tróficas alterando las comunidades microbianas. La distribución de estas sustancias en ambientes naturales causa que ciertos microorganismos desarrollen resistencia a través de la producción de enzimas especializadas capaces de romper la estructura de los antibióticos, impidiendo su muerte.

El actual fenómeno de la resistencia a los antibióticos en bacterias es un proceso alarmante que cada día va en aumento, esto se demuestra con el registro con la creciente cantidad de antibióticos que han fracasado en su actividad inhibitoria a diferentes tipos de patógenos. Por lo tanto, se necesita

encontrar nuevos microorganismos que puedan producir nuevos compuestos bioactivos para combatir los agentes infecciosos resistentes modernos. la búsqueda se ha dirigido a ambientes poco explorados y/o extremos como las cuevas (Maciejewska *et al.*, 2017; Ghosh *et al.*, 2016; 2017), en donde las características únicas de estos hábitats subterráneos (bajas cantidades de luz y de nutrientes orgánicos, una mayor humedad y una alta concentración de minerales) permiten el desarrollo de microambientes oligotróficos donde los microorganismos prosperan debido a la utilización de vías metabólicas especializadas que impulsan estrategias que permiten la vida en entornos hostiles (Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Adam *et al.*, 2018), siendo excelentes candidatos para el descubrimiento de nuevos antibióticos y enzimas (Montano y Henderson, 2013; Ghosh *et al.*, 2016; Gosse *et al.*, 2019).

El presente trabajo pretende continuar la línea de investigación enfocada en el estudio de las microbiotas en cuevas para fortalecer la búsqueda de compuestos bioactivos que puedan tener importancia en las ciencias de la salud.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Marco Histórico de los Antibióticos

Desde la antigüedad el ser humano se ha beneficiado de los recursos que provee la naturaleza. Una de sus aplicaciones más importantes fue dirigida hacia el cuidado de la salud. A lo largo de la historia existen registros del uso de diversos tratamientos naturales para combatir infecciones, desde la miel y azúcar como antiséptico por los egipcios (Davis, 2005), hasta el del pan mohoso en la antigua China, Grecia y Roma. Más adelante, durante la edad media, una sustancia blanca y cremosa conocida ahora como leche de luna (del inglés *moonmilk*) extraída de cuevas era muy utilizada para el tratamiento de úlceras en la piel. Sin embargo, fue años después con el nacimiento de la microbiología que Louis Pasteur y Robert Koch determinaron el origen microbiano de las infecciones, estableciendo la asociación entre enfermedades y bacterias, lo cual supuso un mejoramiento en los tratamientos contra las enfermedades bacterianas (Gould, 2016).

En 1889 fue utilizado el primer subproducto microbiano que demostró tener actividad antimicrobiana. Rudolph Emmerich y Oscar Löw, dos médicos

alemanes fueron los primeros en desarrollar un medicamento efectivo a partir de microbios. A partir de vendajes infectados lograron aislar un pigmento de fenazina verde-azul característico producido por una bacteria entonces llamada *Bacillus pycyaneus*, ahora conocida como *Pseudomonas aeruginosa* (Gould, 2016). Los científicos también observaron que este compuesto se podía usar para combatir otras cepas de bacterias. A partir de estos experimentos, Emmerich y Löw crearon un medicamento a base de extractos de *Bacillus pycyaneus* al que llamaron piocianasa, la cual se empleó para combatir organismos que causaban el cólera, la fiebre tifoidea, la difteria y el ántrax. Fue el primer antibiótico que se utilizó en los hospitales, y el primero en ser producido industrialmente y aplicado a seres humanos, décadas antes del descubrimiento de la penicilina y la era moderna de la quimioterapia antimicrobiana (Gonçalves y Vasconcelos, 2021).

Casi veinte años después, en 1908 Paul Ehrlich, médico y bacteriólogo alemán, fue el primero en desarrollar y utilizar una sustancia química (asfernamina) para tratar la infección de sífilis producida por la bacteria *Treponema pallidum*. Más adelante, en 1920, Alexander Fleming descubrió por accidente la penicilina, una sustancia secretada por un hongo que inhibe el crecimiento de otros organismos y al que se le conoce como el primer antibiótico natural. En los años siguientes se realizaron esfuerzos importantes para encontrar nuevos antimicrobianos y hasta la fecha se han descubierto, desarrollado y perfeccionado muchas clases de antibióticos que son útiles en el control médico de las enfermedades bacterianas tanto en humanos como en animales y plantas (Ashraf *et al.*, 2019).

2.2 La Resistencia Microbiana como Problema de Salud Pública Mundial

Sin embargo, poco tiempo después del comienzo del uso clínico de los antibióticos se observó que ciertas bacterias ya no mostraban la misma sensibilidad, y sobrevivían a los tratamientos en los que debían ser erradicadas (Chambers, 2001; Sengupta *et al.*, 2013; Spellberg y Gilbert, 2014). Este fenómeno se dio por un mecanismo conocido como *resistencia*, el cual se presenta para promover la supervivencia de los microorganismos que se encuentran en entornos desfavorables y en peligro de muerte (Gould, 2016). La resistencia bacteriana puede darse por dos vías. Una de ellas es de naturaleza intrínseca, la cual se expresa a través de genes en su ADN heredados por transferencia vertical, y la adquirida cuando se obtienen los genes de otros organismos mediante transferencia horizontal (Ashraf *et al.*, 2019). Aun así, en algunas especies de microorganismos la resistencia es considerado un carácter ancestral ya que de manera natural secretan antibióticos en el ambiente como defensa, inhibiendo el crecimiento de otros que puedan competir en el mismo nicho (Sköld, 2011; Bhullar *et al.*, 2012; Ashraf *et al.*, 2019).

El fenómeno de la resistencia bacteriana a los antibióticos cada día va en aumento, y actualmente se encuentra entre las diez principales amenazas mundiales relacionadas con la seguridad alimentaria y con la salud humana y animal, las cuales afectan a todo el desarrollo social (OMS 2020). Esta situación hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad porque las infecciones se vuelven cada

vez más difíciles de tratar. A demás, los antimicrobianos están siendo utilizados por las industrias agrícolas y ganaderas para promover el crecimiento y mejorar la eficiencia alimentaria (Allen *et al.*, 2010). Debido al mal uso y consumo desmedido de los antibióticos por el hombre, cada año se desechan millones de toneladas de estas sustancias en los ambientes naturales, las cuales son transportadas y depositadas en distintos medios acuáticos y terrestres donde la resistencia no existía con anterioridad (Oskay *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2010; Sköld, 2011; Agga *et al.*, 2015).

2.3 Las Cuevas como Fuente de Nuevos Antimicrobianos

Como consecuencia al fenómeno de resistencia, una gran cantidad de antibióticos han mitigado su actividad inhibitoria. Es por esto que se necesitan encontrar e identificar microorganismos que puedan producir nuevos compuestos bioactivos para combatir los recientes agentes infecciosos resistentes, y se sugieren las cuevas como una alternativa para encontrarlos.

Estudios recientes realizados en cuevas (Maciejewska *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2016; 2017) se han enfocado en la obtención de nuevos compuestos bioactivos procedentes de microorganismos que viven en ambientes poco explorados y/o extremos como las cuevas, ya que son un nicho único para estudiar interacciones microbianas y adaptaciones a la oligotrofia extrema. Por otro lado, Bhullar *et al* (2012) descubrieron bacterias con una resistencia innata no relacionada con el uso de antibióticos. Esto sugiere que hay potencialmente

muchos más antibióticos sin encontrar en el medio ambiente de lo que se había estimado previamente.

Aunque las cuevas han sido clasificadas en función de diferentes criterios, todas ofrecen una oportunidad para encontrar organismos con nuevos compuestos que pueden ser de importancia médica. Esto es debido a que indistintamente de su clasificación, las cuevas son hábitats que presentan bajas cantidades de luz y de nutrientes orgánicos, una mayor humedad y una alta concentración de minerales (Cheeptham, 2013). Estas características permiten el desarrollo de microambientes oligotróficos que sostienen una diversa vida microbiana asociada e influenciada por la química de la roca hospedera. Los microorganismos aquí presentes prosperan debido a la utilización de vías metabólicas especializadas que impulsan estrategias que permiten la vida en entornos hostiles (Adam *et al.*, 2018) a través de la producción de metabolitos primarios y secundarios únicos que difieren de los encontrados en otros hábitats extremos (Barton y Northup, 2007; Montano y Henderson, 2013; Boston *et al.*, 2001; Barton, 2006, 2015; Northup *et al.*, 2011; Cheeptham *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2016; 2017). Estos organismos son excelentes candidatos para el descubrimiento de nuevos antibióticos y enzimas para el potencial desarrollo industrial (Montano y Henderson, 2013; Ghosh *et al.*, 2016; Gosse *et al.*, 2019).

Se han realizado numerosos estudios de diversidad microbiana de cuevas y se han reportado que los grupos más representativos de bacterias son Proteobacteria y Actinobacteria (Mulec *et al.*, 2015). Este resultado es importante porque las actinobacterias es un grupo del cual dos tercios de los antibióticos

naturales se originan (Groth *et al.*, 1999; Kieser *et al.*, 2000; Northup *et al.*, 2003, 2011; Okami y Hotta, 1988; Baltz, 2007; Atta *et al.*, 2012). Adicionalmente se ha demostrado que las actinobacterias siguen siendo una fuente confiable y prolífica de nuevos compuestos bioactivos (Lazzarini *et al.*, 2009; Nakaew *et al.*, 2009a).

El hecho de que las cuevas sean un entorno único y todavía poco explorado aumenta las posibilidades de encontrar nuevos organismos y, en consecuencia, nuevos compuestos bioactivos que podrían ser útiles en el contexto del problema de salud global de la resistencia a los antibióticos (Maciejewska *et al.*, 2016).

Los estudios de microbiotas de cuevas tienen varias implicaciones importantes en otros campos de estudio, tales como el descubrimiento de fármacos (de Lurdes y Dapkevicius, 2013), la conservación de las cuevas (Saiz-Jimenez, 2012) e incluso para la Astrobiología (Northup *et al.*, 2011).

2.4 Microorganismos en Cuevas: Las Biopelículas

Aunque poco se sabe sobre la ecología microbiana en cuevas, la supervivencia de las comunidades sugiere capacidades de adaptación especializadas que están directamente relacionadas con su metabolismo secundario. Una de las evidencias de actividad microbiológica en estos entornos es la presencia de biopelículas (Barton, 2006), las cuales se componen de agregados de comunidades microbianas y de partículas orgánicas e inorgánicas que coexisten embebidas en una matriz de SPE adheridas unas a otras, y a una superficie (Popović *et al.*, 2020). Las biopelículas son estructuras laminares que pueden estar compuestas por diferentes grupos de microorganismos (bacterias,

hongos, algas, musgos, líquenes) pudiendo presentar una gran diversidad en morfología general, fisiología, química y ecología (Roeselers, 2007; Borderie *et al.*, 2015; Karwautz *et al.*, 2018).

Las biopelículas brindan un modo de vida diferente al de las bacterias de vida libre. Las SPE benefician la interacción microbiana entre comunidades ya que cumplen con las diversas funciones como la adhesión y cohesión celular, protección contra el estrés ambiental (escasez de agua, radiación UV, contaminantes) y permiten la unión de diferentes partículas que permiten la concentración y circulación de nutrientes (Albertano, 2012; Borderie *et al.*, 2015; Roldán y Hernández-Mariné, 2009). Debido a todas estas razones son consideradas como un sistema único, complejo y altamente organizado (Davey y O'Toole, 2000).

Especialmente en las cuevas kársticas, las biopelículas se observan en lugares relacionados con una intensa condensación de agua o filtraciones, y en las proximidades de ríos subterráneos y entradas de cuevas, siendo los grupos dominantes las Proteobacterias y Actinobacterias (Portillo *et al.*, 2008; 2009; Pašić *et al.*, 2010).

El metabolismo secundario altamente productivo y diversificado podría ser la razón de la presencia de estas especies en entornos oligotróficos, formando microbiomas gracias a sus metabolitos especializados. Diversos autores han descrito especies de Actinobacteria en cuevas (Groth *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Jurado *et al.*, 2005a, b; Lee, 2006), y se ha sugerido que el hallazgo de especies nuevas en estos ambientes permitiría encontrar compuestos únicos, lo

que reduce el redescubrimiento del mismo grupo de metabolitos secundarios conocidos (Goodfellow y Fiedler, 2010).

2.5 Las Actinobacterias como Fuente de Nuevos Compuestos Bioactivos

El phylum Actinobacteria es uno de los grupos taxonómicos más grande dentro del dominio Bacteria (Barka *et al.*, 2015) con 5 subclases, 6 órdenes y 14 subórdenes (Ludwig *et al.*, 2012). Son microorganismos unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en casi todos los ecosistemas del mundo. Son bacterias Gram positivas con un alto contenido de guanina y citosina (G+C) en su ADN, y exhiben gran cantidad de características morfológicas, fisiológicas y capacidades metabólicas. Anteriormente eran relacionadas con el reino Fungi debido a que usualmente se presentan con una estructura de tipo filamentoso formando un micelio ramificado aéreo y de sustrato (Goodfellow y Williams, 1983). Las actinobacterias se pueden reproducir por esporulación y por alargamiento y ramificación de las hifas. Constituyen gran parte de la población microbiana del suelo donde forman parte importante en el ciclo del carbono como degradadores de materia orgánica (Barka *et al.*, 2015; Zothanpuia *et al.*, 2018). Sin embargo, el phylum se ha adaptado a una amplia gama de entornos ecológicos, siendo reportadas en todo tipo de ambientes extremos, como las cuevas (Yücel y Yamaç, 2010; Bhullar *et al.*, 2012; Cheeptham *et al.*, 2013; Maciejewska *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2017; 2020).

Las actinobacterias son un grupo muy estudiado principalmente por su importancia clínica e industrial. Son consideradas como las productoras más

abundantes de metabolitos secundarios biológicamente activos, como antibióticos, herbicidas, pesticidas, antiparasitarios y enzimas (Oskay *et al.*, 2004, Selim *et al.*, 2021). Por ejemplo las bacterias del género *Streptomyces* son los productores más prolíficos de metabolitos secundarios, muchos de los cuales tienen un potencial antimicrobiano muy importante (Cheeptham *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Nimaichand *et al.*, 2015; Axenov-Gibanov *et al.*, 2016; Hamm *et al.*, 2017; Parada *et al.*, 2017; Maciejewska *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2018; Gosse *et al.*, 2019). Debido a su importancia económica, estudios recientes se han enfocado en estudiar la diversidad microbiana en ambientes extremos ya que pueden ser una fuente potencial de nuevas moléculas de interés (Cheeptham *et al.*, 2013; Maciejewska *et al.*, 2016; Zothanpuia *et al.*, 2018).

2.6 Actinobacterias Encontradas en Cuevas

Yücel y Yamaç (2010) trabajaron con muestras de actinobacterias aisladas de 19 cuevas kársticas en Turquía para realizar ensayos antimicrobianos contra microorganismos resistentes a los antibióticos. Del total, 180 aislamientos (62%) exhibieron actividad antimicrobiana contra un panel de cuatro bacterias, dos levaduras y cuatro hongos filamentosos. En uno de ellos, *Streptomyces sp. 1492*, se examinó la producción de antibióticos en cultivo discontinuo. La actividad antimicrobiana del compuesto activo extraído se registró como bacteriostático o bactericida dependiente de forma dosis-dependiente a cepas de bacterias clínicas resistentes a los antibióticos; MRSA, VRE y *Acinetobacter baumannii*.

Cheeptham *et al.*, (2013) presentan el primer estudio de microbiología de la cueva volcánica Helmcken Falls en Columbia Británica, Canadá, y sugieren es

un hábitat con gran potencial para el aislamiento de nuevas sustancias bioactivas. Se colectaron un total de 15 muestras que incluyeron rocas, muestras de la pared de la cueva, sedimento y espeleotemas tipo *popcorns*, obteniéndose más de 400 aislados bacterianos. Los ensayos antimicrobianos demostraron un patrón de inhibición único para la mayoría de las actinobacterias colectadas contra las bacterias patógenas. De manera general, el 10.25% mostró actividad inhibidora contra *Micrococcus luteus*, el 2% contra *Staphylococcus aureus*, el 9.25% contra *Mycobacterium smegmatis*, el 1.75% contra *Escherichia coli*, el 1% contra ESBL *E. coli*, el 2.25% contra *Acinetobacter baumannii*, el 26.5% contra *Klebsiella pneumoniae*, 6.25% contra *Pseudomonas aeruginosa* y 7.5% contra *Candida albicans*. Los autores precisan que estos resultados dan la confianza de que las bacterias de cuevas pueden ser la fuente de nuevos compuestos que proporcionan nuevos fármacos para combatir las bacterias Gram negativas resistentes a los antibióticos. De las bacterias analizadas, el (79.3%) de las cepas pertenecieron al género *Streptomyces*.

Maciejewska *et al.*, (2016) analizaron depósitos de leche de luna (*moonmilk*) de la cueva “Grotte des Collemboles” localizada en Bélgica, con el fin de aislar Actinobacterias (*Streptomyces*) cultivables para evaluar su potencial en la biosíntesis de antimicrobianos. Los ensayos mostraron una fuerte actividad contra una gran cantidad de microorganismos de referencia inhibiendo el crecimiento en un 94% de bacterias Gram positivas, un 71% de Gram negativas y un 94% en hongos utilizados. Además, se registra que el 90% de las cepas aisladas de la cueva indujeron una fuerte supresión del crecimiento del hongo multi-resistente a fármacos *Rasamsonia argillacea*, causante principal de micosis

invasiva en fibrosis quística y enfermedades granulomatosas crónicas. Los autores concluyen que la leche de luna puede constituir una reserva potencial de nuevos compuestos naturales activos que traten eficazmente diversas enfermedades infecciosas por efecto de la presencia de una población muy diversa de *Streptomyces* prolíficos productores de antimicrobianos.

Ghosh *et al.*, (2017) fueron los primeros en examinar la diversidad bacteriana cultivable de la cueva Iron Curtain Cave (British Columbia, Canadá) con el fin de buscar microorganismos con propiedades antimicrobianas que pudieran ser efectivos contra bacterias multirresistentes. Se obtuvieron 65 aislamientos de la cueva, en los cuales se identificaron cuatro grupos importantes por medio del análisis del 16S ARNr, siendo Actinobacteria el más abundante (44.61%), siguiendo Proteobacteria (27.69%), Firmicutes (20%) y Bacteroidetes (7.69%). De los aislados evaluados para actividad antimicrobiana, dos especies del género *Streptomyces* exhibieron un amplio rango de actividad antimicrobiana en cuatro medios de fermentación diferentes: R2A, V8, HT y caldo Actinomyces HiVeg™ contra cepas MDR de *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*, y las cepas no resistentes de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, esto en condiciones de incubación de baja temperatura (8 °C). Las bacterias identificadas con propiedades antimicrobianas demuestran que la cueva Iron Curtain Cave puede ser considerada como un hábitat potencial para encontrar nuevas sustancias antimicrobianas.

Teniendo en cuenta el hecho de que las cuevas albergan una amplia diversidad microbiana, Adam *et al.* (2018) trabajaron con muestras de leche de luna de la cueva “Grotte des Collemboles” utilizadas en un estudio anterior

(Maciejewska *et al.*, 2016). Probaron una serie de estrategias con el fin de disminuir la aparición de especies filamentosas y lograr aislar Actinobacterias raras y difíciles de cultivar. Los análisis taxonómicos del gen 16S ARNr de 40 aislamientos revelaron el hallazgo de representantes de los géneros *Agromyces* (0.2%), *Amycolatopsis* (0.03%), *Kocuria* (0.1%), *Nocardia* (0.5%) y *Micromonospora*, que corresponden a taxones menos abundantes demostrando la eficiencia de las estrategias de recuperación. También se reportó la presencia esperada de miembros del género *Rhodococcus* y *Streptomyces*, siendo éste el que mostró la mayor diversidad. En este estudio también se evaluó el potencial de las cepas obtenidas para producir compuestos antibacterianos mediante el ensayo de raya cruzada (*cross-streak assays*). La actividad inhibitoria más fuerte se registró contra bacterias Gram positivas (87% de las cepas) en comparación con aquellas contra bacterias Gram negativas (59% de las cepas), siendo las cepas MMun160 (*Kocuria*) y MMun171 (*Amycolatopsis*) particularmente activas contra las bacterias Gram negativas probadas: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* y *P. aeruginosa*.

Ghosh *et al.* (2020) analizaron sedimentos y muestras de la pared de siete sitios diferentes dentro de la cueva Raspberry Rising ubicada en la Cordillera de Columbia en Canadá, con el fin de caracterizar la diversidad microbiana y evaluar su actividad antimicrobiana contra las cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos. Un total de 103 aislamientos fueron recuperados en tres tipos de medios de cultivo: R2A, Hickey-Tresner y el Agar de Aislamiento de Actinobacterias. Los análisis filogenéticos del gen de ARNr 16S identificaron tres filos principales: Proteobacteria (51.45%), Actinobacteria (43.68%) y

Bacteroidetes (3.88%). Para los ensayos antimicrobianos emplearon dos técnicas. La primera, conocida como “*agar plug*”, consistió en cortar de manera aseptica pequeños cilindros de 0.5 cm de cada una de las placas inoculadas en la cueva, y la segunda, “*palillo de dientes*”, en la cual se tomaron muestras de las colonias bacterianas de la cueva utilizando palillos de dientes estériles. En las dos pruebas, las muestras fueron colocadas sobre las placas preparadas con las siembras de organismos patógenos. Las placas se prepararon por duplicado y se incubaron a 8 °C durante un período de 2 a 3 días, y la actividad antimicrobiana se determinó con un vernier eléctrico que evaluó el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada colonia bacteriana. Dos cepas bacterianas (RRC23, RRC75) mostraron actividad contra *Escherichia coli* nº 15-318 multidrogo resistente (MDR), mientras que RRC48 exhibió actividad contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Las propiedades antimicrobianas exhibidas por algunos de los aislados bacterianos sugieren que este sistema de cuevas podría ser un recurso para posibles antibióticos, fármacos o nuevos productos biológicos de relevancia clínica.

CAPÍTULO 3

ÁREA DE ESTUDIO

3.1 Descripción del Área de Estudio

La Cueva San Bartolo está localizada dentro del Cañón de la Huasteca (en el noreste de México, ubicado en la parte occidental del estado de Nuevo León, al suroeste de la ciudad de Monterrey) en el municipio de Santa Catarina, entre las coordenadas 25.576369 y -100.418520. Esta región, así como la mayor parte de la cobertura del noreste de México, consiste principalmente en rocas marinas del Jurásico Superior al Cretácico Inferior que afloran a lo largo de los cinturones plegados de la Sierra Madre Oriental (Barragán y Maurrasse, 2008), siendo la geología predominante lechos intermitentes de rocas caliza y lutitas (Chávez-Cabello, 2016) (Figura 3.1).

La cueva se encuentra ubicada en un cañón lateral del cañón principal de la Huasteca. Para llegar se tiene que seguir un lecho de río intermitente que proviene de la Sierra y que desemboca en el Río Santa Catarina. Este lecho se encuentra mayormente seco durante el año, pudiendo tener importantes crecidas durante las temporadas de lluvias de la región, iniciando en mayo e intensificándose para septiembre, donde se vuelve inseguro el paso. La ruta que lleva hacia la cueva es frecuentada por personas pero la mayoría no acceden

debido a que la entrada se encuentra muy cubierta por la vegetación y por la presencia de murciélagos. Sin embargo, actualmente no existe un acceso limitado a la cueva. También hay indicios de que el guano fue minado en el pasado de forma intermitente.



Figura 3.1. Cañón de La Huasteca, Santa Catarina, Nuevo León.

3.2 Descripción de la Cueva

La Cueva San Bartolo tiene una longitud aproximada de 250 m formada por pasajes explorados y bien documentados en su mayoría, excepto por la cámara final de un corredor hacia el norte, la cual podría conducir a otros pasajes horizontales a un nivel más alto (Russel y Raines, 1967).

La entrada y la parte inicial de la cueva se inclinan hacia arriba, y dan lugar a cámaras y pasajes amplios los cuales se encuentran cubiertos en su mayoría

por una capa de guano seco de aproximadamente 20 cm. En zonas más internas de la cueva, este espesor varía y puede llegar a medir entre uno y más de 30 cm.

Se identificaron diversos elementos entre los que se destacan los siguientes: 1) biopelículas negras de superficie brillante y consistencia dura creciendo en sitios puntuales dentro de la cueva, principalmente en las paredes; 2) depósitos de calcita en el techo, lo que indica una filtración antigua (o muy lenta) de agua; 3) en otras zonas se observa una gran cantidad de depósitos de diversos minerales con la presencia de elementos rojos característicos de los óxidos de hierro; 4) espeleotemas de tipo *popote* de corto tamaño (menores a los 5 cm) y en baja cantidad.

La cueva se encuentra habitada por una población importante de murciélagos, en menor proporción insectos y arácnidos, y pudiera ser el refugio temporal de algunos mamíferos.

El mapa de la cueva fue descrito y dibujado por C. Westmoreland y T. Raines para la AMCS en 1966 (Figura 3.2).

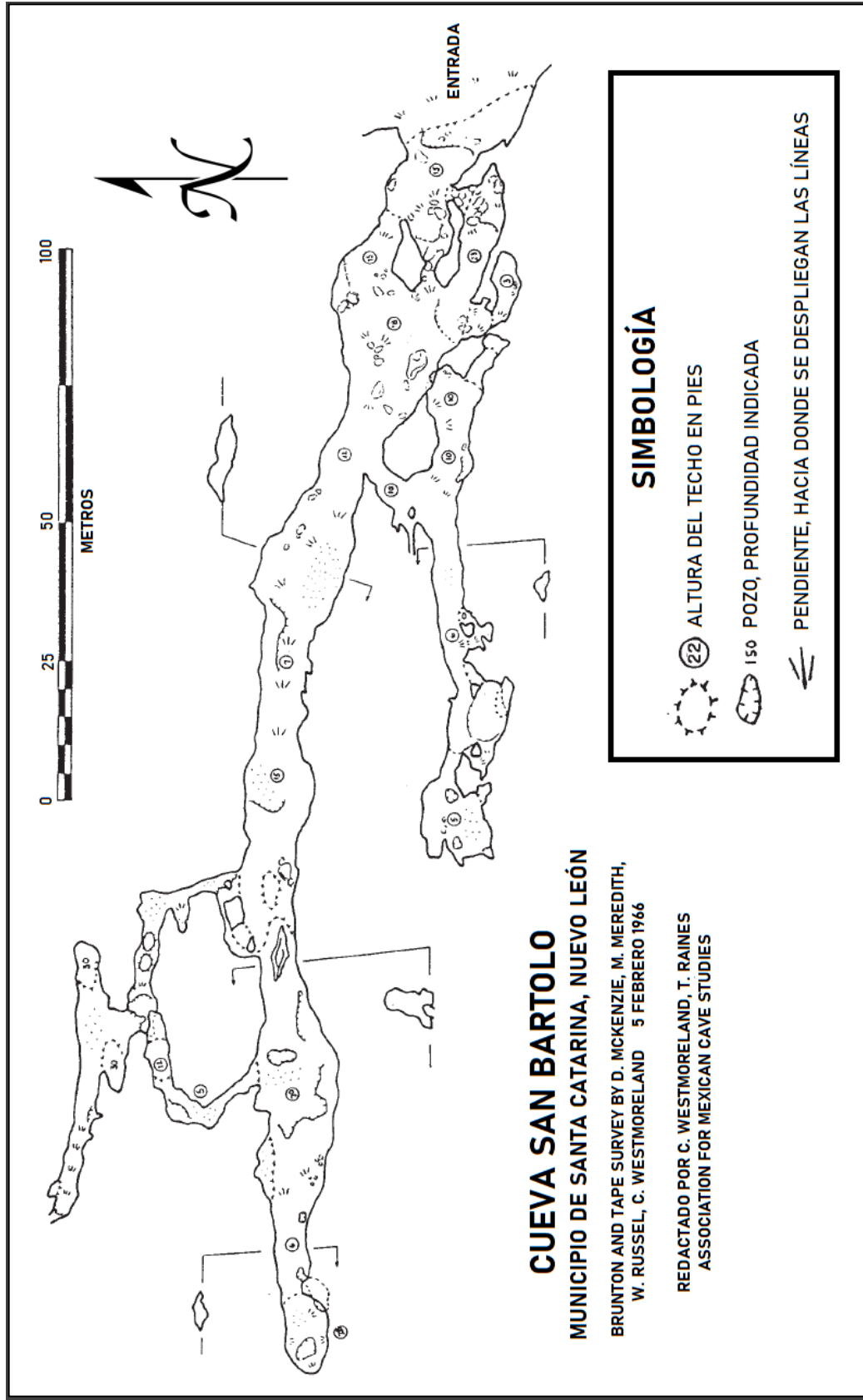


Figura 3.2. Mapa de la Cueva San Bartolo. Modificado de C. Westmoreland y T. Raines (1966).

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las actinobacterias aisladas de la Cueva San Bartolo (Santa Catarina, Nuevo León) son capaces de presentar actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos comunes.

Objetivo General

Determinar la presencia de actividad antimicrobiana en actinobacterias aisladas de muestras colectadas en la Cueva San Bartolo contra microorganismos patógenos comunes.

Objetivos Específicos

1. Aislar colonias/grupos cultivables de actinobacterias presentes en las muestras colectadas de la Cueva San Bartolo.
2. Distinguir la diversidad de las colonias de actinobacterias presentes basado en características morfológicas (tamaño, consistencia, presencia de micelio aéreo y de sustrato, color, olor).
3. Determinar si los aislados de actinobacterias presentan o no actividad antagónica o antifúngica.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales y Reactivos

5.1.1. Material para Salida a Campo y Colecta

- Equipo de seguridad: casco, linternas, lentes de seguridad, cubre bocas, guantes, rodilleras, botas.
- Cajas Petri con medios de cultivo estériles para la colecta de muestras.
- Hisopos estériles suspendidos en solución salina.
- Linterna de mano.
- Martillo geológico (pica) y cincel.
- Sistema de Posicionamiento Global (GPS).
- Libreta de campo.
- Hielera (para el transporte de muestras).
- Cámara fotográfica.
- Lápices y marcadores.

5.1.2. Medios de Cultivo para Colecta de Microorganismos

1) Agar para aislamiento de Actinobacterias (AIA)

El agar de aislamiento de actinobacterias contiene caseinato de sodio y asparagina como fuente de nitrógeno, el propionato de sodio se usa como sustrato en la fermentación anaerobia. El fosfato dipotásico proporciona el sistema de amortiguación y el glicerol sirve como fuente adicional de carbono.

Fórmula:

- Caseinato de sodio 2 g/L
- L-Asparagina 0.1 g/L
- Propanoato de sodio 4 g/L
- Fosfato di potásico 0.5 g/L
- Sulfato de magnesio 0.1 g/L
- Sulfato férrico 0.001 g/L
- Agar 15 g/L

pH final (a 25°C): 8.1 ± 0.2

2) Agar 2A de Reasoner (R2A)

Por su bajo contenido nutricional estimula el crecimiento de bacterias estresadas, de crecimiento lento. En el medio de cultivo, el extracto de levadura, la proteosa peptona No. 3, la peptona ácida de caseína y la glucosa, aportan nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. El almidón y el piruvato de sodio favorecen la recuperación de células dañadas. El fosfato es la fuente de fósforo y regula el pH, mientras que el sulfato de magnesio aporta los correspondientes iones.

Fórmula:

- Extracto de levadura 0.5 g/L
- Proteosa peptona No.3 0.5 g/L
- Peptona ácida de caseína 0.5 g/L
- Glucosa 0.5 g/L
- Almidón soluble 0.5 g/L
- Piruvato de sodio 0.3 g/L
- Fosfato dipotásico 0.3 g/L
- Sulfato de magnesio 0.05 g/L
- Agar 15.0 g/L

pH final: 7.2 ± 0.2

5.1.3. Medios de Cultivo para Cultivo de Microorganismos en Laboratorio

Para obtener un mejor crecimiento, describir las características morfológicas y realizar las pruebas antimicrobianas de las actinobacterias colectadas se utilizó el medio de cultivo descrito a continuación:

1) Agar extracto de malta- extracto de levadura (ISP2).

Desarrollado por los laboratorios Difco para el Proyecto Internacional *Streptomyces*, este medio es utilizado para caracterizar especies de *Streptomyces* con el fin de seleccionar propiedades estables y procedimientos reproducibles para la caracterización de las especies de este género. El medio ISP2 también se conoce como Agar de extracto de Levadura-Malta, el cual provee nitrógeno, vitaminas y aminoácidos; la dextrosa es la fuente de carbono.

Fórmula:

- | | |
|------------------------|----------|
| • Extracto de levadura | 4.0 g/L |
| • Extracto de malta | 10 g/L |
| • Dextrosa | 4.0 g/L |
| • Agar | 20.0 g/L |

5.1.4. Material para las Pruebas de Actividad Antimicrobiana

Placas de Petri (15x100 cm), caldo nutritivo para bacterias, discos de papel de 20 mm, cultivos de microorganismos patógenos, microscopio binocular (Carl Zeiss/Standard 25), balanza analítica (AND/HR-200), incubadora con agitación (Lab. companion), incubadora estática (Lab companion), microcentrífuga (Ohaus), horno de secado (Shield Lab), campana de flujo laminar (Labconco), refrigerador 4°C/Congelador -20°C (Norlake Scientific), balanza analítica (AND/HR-200), microcentrífuga (Eppendorf/5415D), rotovapor Speed Vac (Milford.MA), incubadora con agitación (SHEL-LAB/1575), autoclave automática (Tuttnauer/2540M) y material de vidrio (Pyrex/Kimax) como matraces Erlenmeyer de vidrio 125, 250, 500 y 1000 mL (Kimax). Las bacterias patógenas fueron facilitadas por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

1. *Escherichia coli* O157 OPS-OMS
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
3. *Candida albicans* ATCC 14053
4. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644™
5. *Bacillus cereus* ATCC 14579™
6. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228™
7. *Enterococcus faecalis*
8. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

5.2 Metodología

5.2.1. Colecta de Muestras

Se escogieron cinco puntos de muestreo dentro de la cueva a diferentes distancias de la entrada (Figura 6.1) bajo los siguientes criterios: los primeros cuatro sitios fueron seleccionados por la presencia de biopelículas, y el quinto sitio por la presencia de una pequeña gotera de agua que se filtraba a través del techo de la cueva (Tabla 6.1).

Tabla 5.1. Características de los sitios de muestreo dentro de la cueva.

SITIO	CLAVE	DISTANCIA DE LA ENTRADA	TIPO DE SUSTRATO
1	S1	35 m	Biopelícula negra
2	S2	68 m	Biopelícula negra
3	S3	110 m	Biopelícula negra
4	S4	168 m	Biopelícula negra
5	S5	77 m	Gotera de agua filtrada a través de la pared

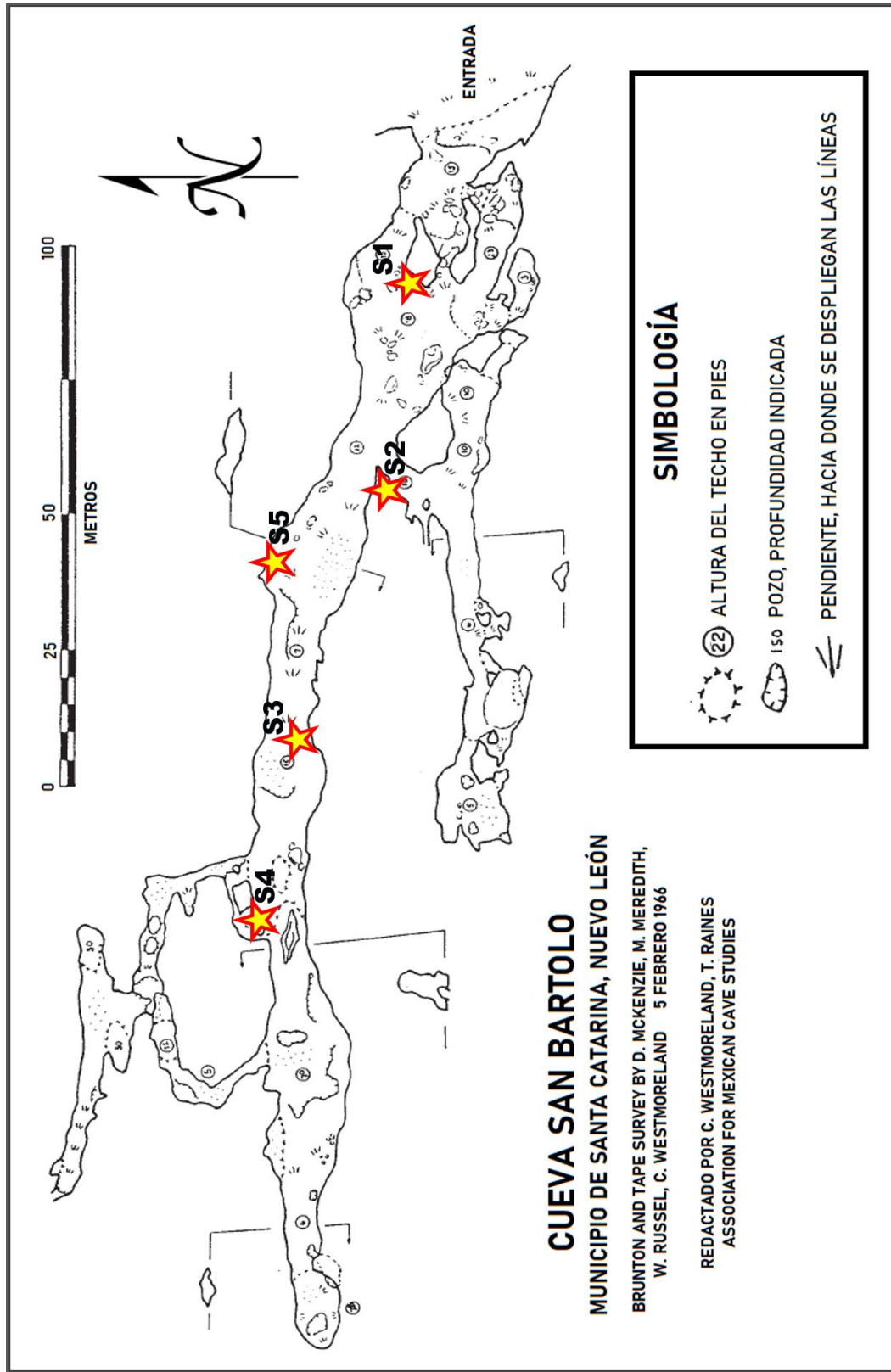


Figura 6.1. Mapa de la Cueva San Bartolo donde se indican los sitios de muestreo. Modificado de C. Westmoreland y T. Raines (1966).

Las muestras fueron colectadas con hisopos estériles suspendidos en solución salina. Todas las muestras se inocularon *in situ* directamente en las cajas Petri en dos diferentes medios de cultivo: AIA y R2A (Tabla 5.2). En los sitios 1 a 4 las muestras se tomaron frotando suavemente la superficie de la biopelícula (Figura 5.2.A.), y en el quinto sitio se tomó una gota de agua que caía del techo de la cueva con el hisopo estéril. Para un mejor control de las muestras, a cada caja se le asignó una clave para poder identificarla más fácilmente (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Código de identificación de las placas de Petri inoculadas dentro de la cueva con respecto al sitio de muestreo y al tipo de medio de cultivo.

Sitio de muestreo	Medio de cultivo AIA	Medio de cultivo R2A
1	Placa No. 1	Placa No. 2
2	Placa No. 3	Placa No. 4
3	Placa No. 5	Placa No. 6
4	Placa No. 7	Placa No. 8
5	Placa No. 9	Placa No. 10

Un total de 10 placas inoculadas en los distintos sitios de muestreo se almacenaron en una hielera y se transportaron hasta el laboratorio.

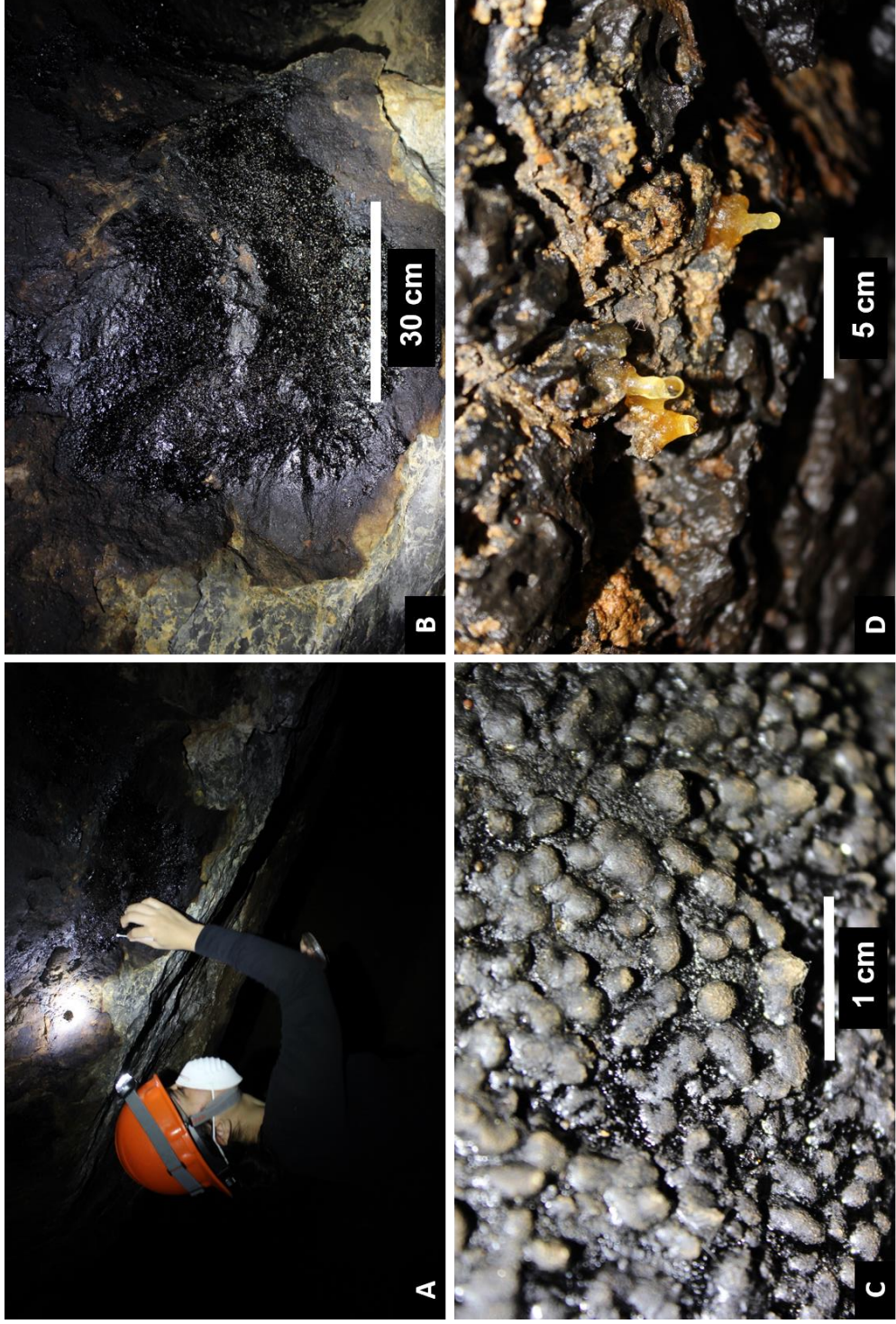


Figura 5.2. A. Toma de muestras en una de las paredes de la cueva con presencia de biopelícula. B. Biopelícula del Sitio 1. C. Detalles de la biopelícula del Sitio 1 donde se muestran las formaciones de espeleotemas. D. Formaciones tipo popotes de espeleotemas encontradas en el techo de la cueva, en el Sitio 5.

5.2.2. Cultivo de Microorganismos

Una vez en el laboratorio, las placas se incubaron a 28°C en oscuridad y se realizaron observaciones de crecimiento cada tercer día. Cada 14 días se realizaron subcultivos a partir de colonias aisladas que mostraban características diferentes entre ellas para obtener los cultivos puros. Posteriormente, sólo los cultivos reconocidos como actinobacterias en función de particularidades distintivas del grupo fueron cultivados en agar ISP2 con la finalidad de aumentar la producción de biomasa para las pruebas antagónicas, un procedimiento realizado y reportado por Pipite *et al* (2022). Además, Adam *et al.* (2018) evidenciaron que este medio, entre algunos otros, permitió la secreción de antibióticos por parte de actinobacterias colectadas en su estudio.

5.2.3. Descripción Morfológica

La descripción morfológica de las colonias de actinobacterias fue realizada en el medio ISP2, en el cual se observó la forma, tamaño, margen, aspecto, elevación, consistencia, textura, olor, y presencia de micelio aéreo y de sustrato, su color y la producción de pigmento soluble.

Para el análisis de la morfología microscópica se realizó tinción de Gram y la observación se realizó con un microscopio óptico (Zeiss Standard 25 ICS).

5.2.4. Pruebas de Actividad Antimicrobiana

Se realizaron tres pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana de los aislados de cueva: un cribado inicial (de acuerdo con Yücel y Yamaç, 2010;

Axenov-Gibanov *et al*, 2016; Ganesan *et al.*, 2017 y Adam *et al.*, 2018) la prueba de sobrenadante de los cultivos (Parada *et al.*, 2017) y la de los extractos metanólicos (Gómez-Flores *et al.*, 2016).

Las actinobacterias seleccionadas fueron probadas contra siete bacterias patógenas que incluyeron *Escherichia coli* 0157 OPS-OMS, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644™, *Bacillus cereus* ATCC 14579™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228™, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y el hongo *Candida albicans* ATCC 14053, facilitadas por el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2.4.1 Prueba de Inhibición

Para determinar cuáles colonias presentan actividad antimicrobiana general, Yücel y Yamaç (2010), Axenov-Gibanov *et al* (2016), Ganesan *et al.*, (2017) y Adam *et al.* (2018) mencionan que se puede llevar a cabo una selección inicial para evidenciar la actividad general de las actinobacterias sobre los patógenos de prueba. Esta selección inicial (prueba de cribado) se realizó con cada cepa de actinobacteria aislada de la cueva.

Cada aislado de cueva fue trabajado en una caja Petri individual. Siguiendo la metodología de Rahman *et al.*, (2011), estos aislados fueron inoculados en agar ISP2 a lo largo del diámetro de la placa de Petri. Posteriormente fueron incubadas a 27 ° C durante 7 días. Una vez transcurrido este tiempo, los ocho patógenos se inocularon en cada placa de manera perpendicular con respecto a las cepas de actinobacterias dejando 2 cm de separación con el propósito de

evitar la contaminación accidental de actinobacterias en las líneas de patógenos durante la inoculación (Figura 5.3). La longitud de estas líneas está determinada en función de las dimensiones de la caja Petri para aprovechar el máximo espacio disponible. Se dejaron en incubación 24 h y la actividad se midió por la zona de inhibición mostrada por la ausencia de crecimiento utilizando una escala milimétrica. Se realizaron duplicados para cada uno de los microorganismos evaluados.

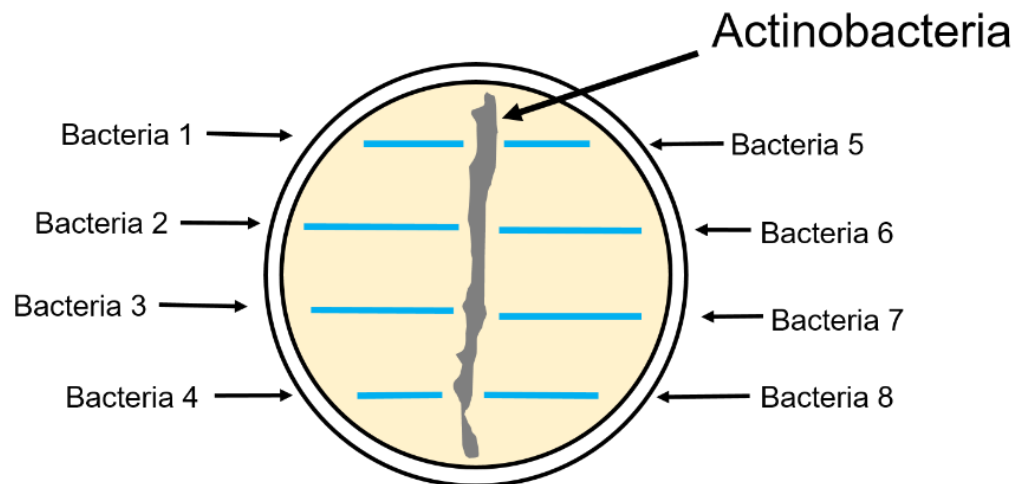


Figura 5.3. Ilustración que muestra cómo se inocularon los microorganismos para la determinación de actividad antimicrobiana.

5.2.4.2 Prueba de Sobrenadante de Cultivos

5.2.4.2.1 Obtención de Sobrenadante

Las actinobacterias se cultivaron por separado en matraces de 500 mL conteniendo 300 mL de medio ISP2 a 26°C, 160 rpm durante 30 días. Se tomaron 15 mL de cada matraz y se centrifugaron a 9500 g durante 10 minutos a 8 °C para separar la biomasa. La biomasa se desechó y el sobrenadante se resguardó en refrigeración a 4 °C para las pruebas antagónicas.

5.2.4.2.2 Evaluación de Sobrenadante contra Cepas Patógenas

Se evaluó la actividad de los aislados de cueva, previamente preseleccionados como se indica en el apartado 5.2.4.1, mediante el método de difusión en disco. Las 8 cepas patógenas se activaron en 10 ml de caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 h. Las suspensiones de microorganismos crecidas durante la noche se estandarizaron a 10⁸ CFU/ml utilizando la escala de McFarland 0.5 para soluciones estándar (Yasir, 2017; Belyagoubi *et al.*, 2018) y se sembraron por separado en placas Petri con Agar Nutritivo. Se utilizaron siete discos de papel estériles de 20 mm, a los cuales se les añadió por separado 300 µL del sobrenadante de cada aislado de actinobacteria seleccionada y se colocaron en las placas previamente inoculadas con los patógenos microbianos. Se dejaron en incubación 24 h y se midió su halo de inhibición con una escala milimétrica. De este procedimiento se realizó una repetición más.

5.2.4.3 Prueba de los Extractos Metanólicos

5.2.4.3. 1 Obtención de Extracto Metanólico

En esta prueba se utilizaron tubos de 15 mL para extraer muestras de 10 mL de cada cultivo de actinobacterias descritos en el apartado anterior, y se centrifugaron a 9000 g por 5 minutos para separar la biomasa. El sobrenadante fue retirado y se utilizó la biomasa, a la cual se le añadió metanol (1:4 peso/vol). Los tubos se dejaron en agitación a 150 rpm por 48 h a 28 °C envueltos en aluminio, y posteriormente se centrifugaron en las condiciones anteriores para separar la biomasa, la cual se desechó y el extracto metanólico se pasó a tubos

de 1.5 ml. Para determinar el peso seco y el porcentaje de humedad de cada extracto metanólico, se utilizó una balanza infrarroja de determinación. Se secaron en un rotovapor (Speed Vac Milford MA) a 45°C aplicando vacío para evaporar el metanol, quedando el extracto en el fondo del tubo. Este residuo se diluyó a una concentración de 1mg/ml de agua destilada y se utilizó para las pruebas antagónicas.

5.2.4.5 Evaluación de Extractos Metanólicos contra Cepas Patógenas

Los cultivos bacterianos patógenos fueron preparados e inoculados en las placas Petri siguiendo la misma metodología que en la prueba con sobrenadante celular. Del mismo modo, se utilizaron siete discos de papel estériles de 20 mm que fueron impregnados con la concentración de extractos metanólicos de cada aislado de actinobacteria seleccionada y se colocaron en las placas previamente inoculadas. Se dejaron en incubación 24 h y se midió su halo de inhibición con una escala milimétrica. De este procedimiento se realizó una repetición más.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Aislamiento de Microorganismos

Las muestras colectadas de la Cueva San Bartolo se inocularon en 10 placas con dos diferentes medios de cultivo para observar su crecimiento (Figura 6.1). El crecimiento de las primeras colonias se observó dos semanas después de la inoculación en la cueva. De la inoculación inicial de las 10 placas, se obtuvieron 78 colonias de diferentes microorganismos, los cuales fueron identificados a través de características morfológicas distintivas (Li *et al.*, 2016) como la adherencia al agar y presencia de micelio aéreo y de sustrato para las actinobacterias; el color, textura y morfología microscópica para otro tipo de bacterias no identificadas y levaduras y el tamaño de las células (hifas) en el caso de hongos no determinados (Figura 6.2). No obstante, se requieren estudios moleculares más precisos para la identificación taxonómica de cada grupo. De los medios de cultivo utilizados, el Agar R2A fue el que mostró mejor crecimiento representando el 77% del total de las colonias obtenidas, mientras que el Agar AIA representó el 23% restante (Figura 6.3).

Figura 6.1. Figura que muestra el crecimiento bacteriano en diferentes medios de cultivo de acuerdo a las características de cada sitio de muestreo dentro de la Cueva San Bartolo. .

MEDIO A1A									
Placa: 1	Sitio: 1	Placa: 3	Sitio: 2	Placa: 5	Sitio: 3	Placa: 7	Sitio: 4	Placa: 9	Sitio: 5
	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>35 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>68 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>110 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>168 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>gotera de agua filtrada a través de la pared.</u> Distancia de la entrada: <u>77 m</u> 				
	Clave: P1-1A	Clave: P3-2A	Clave: P5-3A	Clave: P7-4A	Clave: P9-5A				
MEDIO R2A									
Placa: 2	Sitio: 1	Placa: 4	Sitio: 2	Placa: 6	Sitio: 3	Placa: 8	Sitio: 4	Placa: 10	Sitio: 5
	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>35 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>68 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>110 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>biopelícula</u> Distancia de la entrada: <u>168 m</u> 	<ul style="list-style-type: none"> Sustrato: <u>gotera de agua filtrada a través de la pared.</u> Distancia de la entrada: <u>77 m</u> 				
	Clave: P2-1B	Clave: P4-2B	Clave: P6-3B	Clave: P8-4B	Clave: P10-5B				

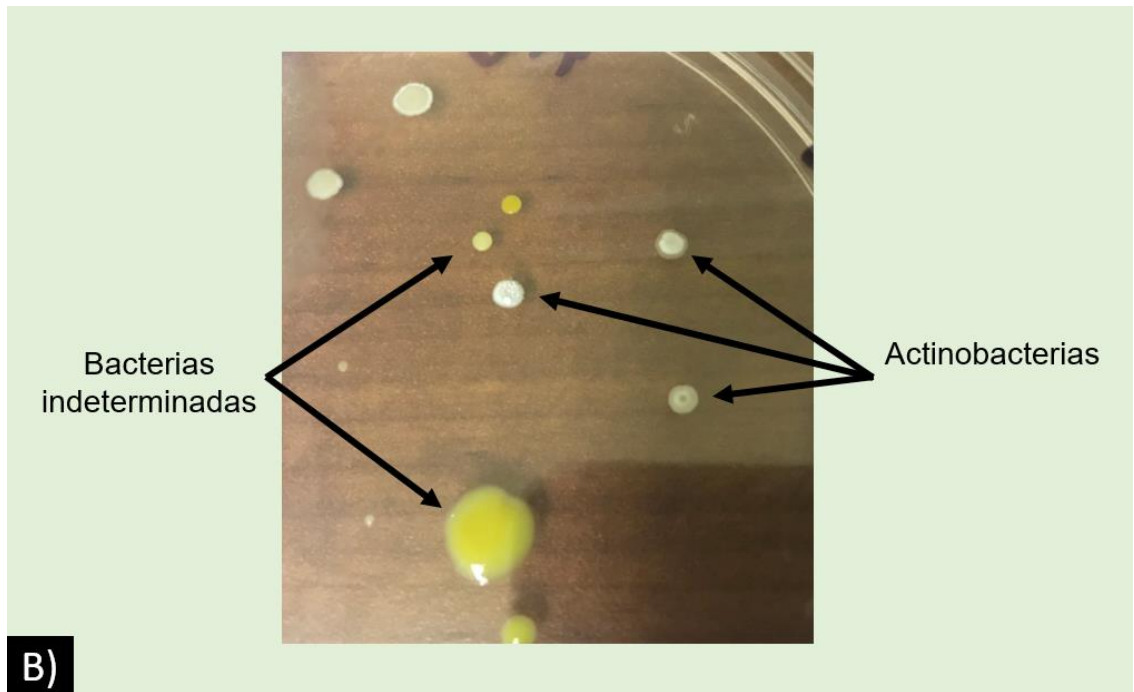
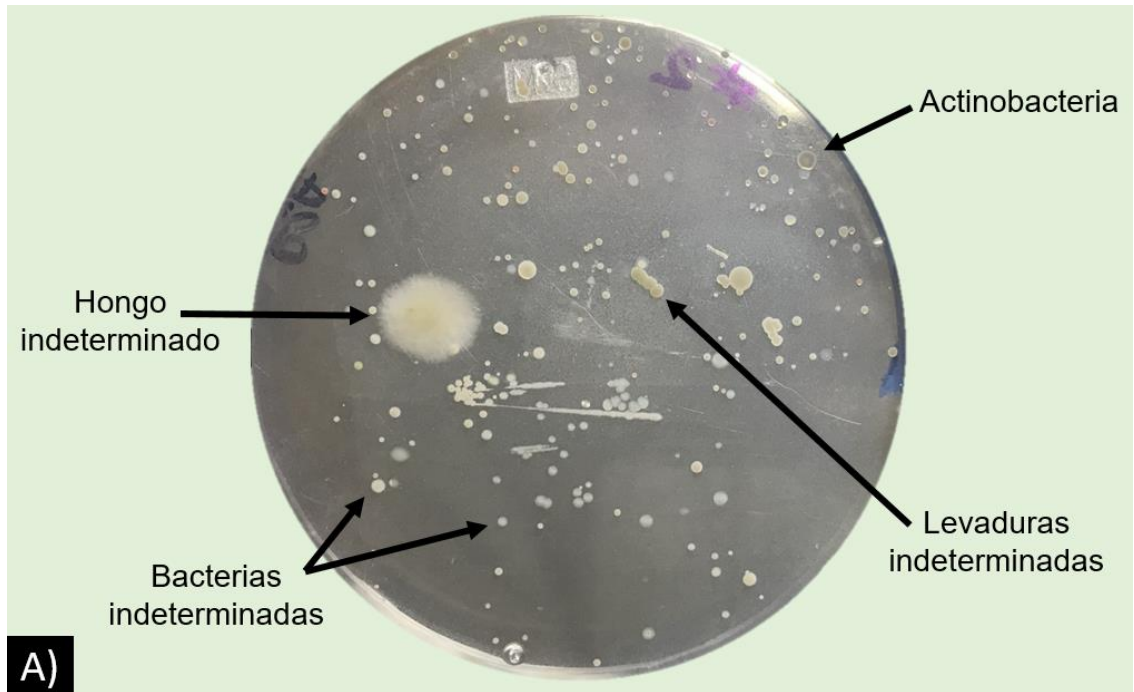


Figura 6.2. Crecimiento bacteriano de las placas inoculadas en la Cueva San Bartolo. A. Corresponde al crecimiento del Sitio 2 en medio R2A. B. Corresponde al crecimiento de microorganismos del Sitio 3 en medio R2A.

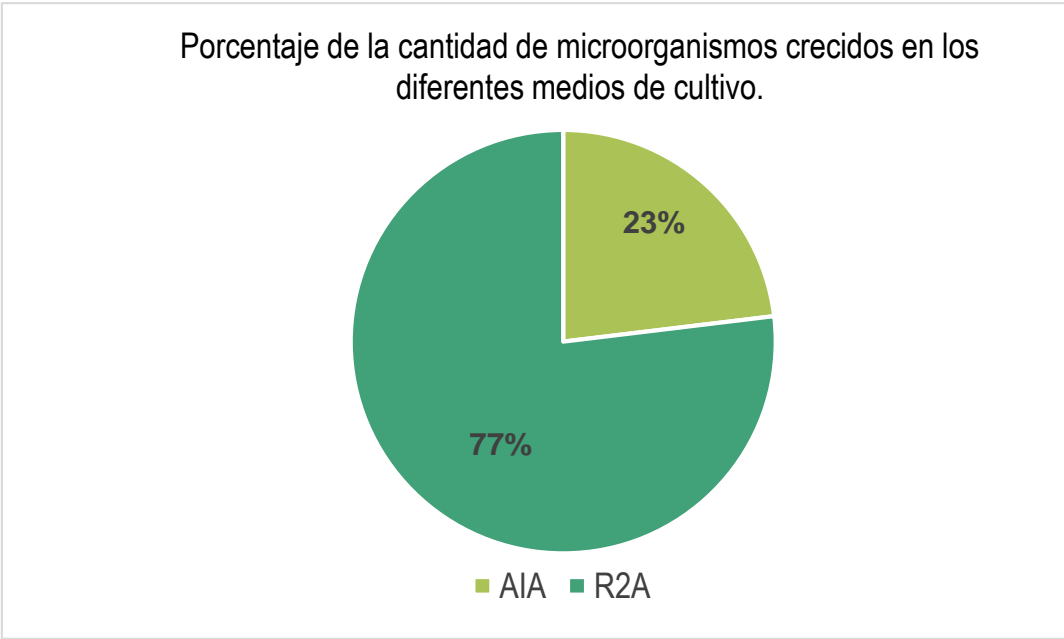


Figura 6.3. Crecimiento de microorganismos en los medios AIA y R2A de la Cueva San Bartolo mostrado en porcentajes.

Cabe señalar que la cantidad de colonias recuperadas de cada sitio de muestreo se mantuvo relativamente constante con algunas variaciones. Sin embargo, el sitio 4 (el más profundo) no mostró crecimiento para el medio AIA, mientras que en el medio R2A solamente se obtuvieron tres colonias. Estas, al igual que el resto de las muestras, fueron procesadas para la obtención de subcultivos que finalmente no pudieron ser recuperados debido a condiciones no favorables de cultivo, como pudieran ser falta de requerimientos nutricionales esenciales para crecimiento o debido a condiciones ambientales específicas como variación en pH, temperatura y/o concentración de oxígeno (Figura 6.4).

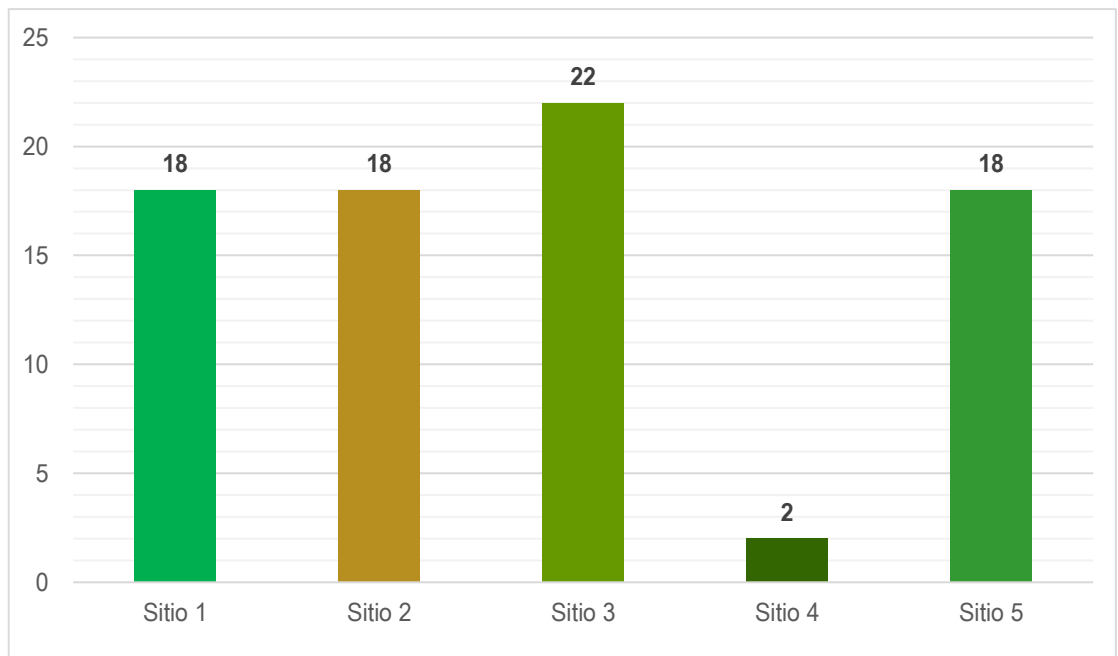


Figura 6.4. Cantidad de cultivos aislados por sitio de muestreo.

6.2 Aislamiento de Actinobacterias.

Una vez teniendo los cultivos aislados de la Cueva San Bartolo, se procedió a identificar cuáles de las colonias pertenecieron a actinobacterias. La Tabla 6.1 proporciona información acerca del sitio donde se recuperó cada actinobacteria colectada.

Tabla 6.1. Información de colecta sobre las actinobacterias recuperadas de la Cueva San Bartolo.

No.	Clave asignada al aislado	Sitio de colecta dentro de la cueva	Lugar de aislamiento	Medio de cultivo utilizado en la inoculación dentro de la cueva
1	M10	2	Biopelícula	AIA
2	M15	2	Biopelícula	R2A
3	M20	3	Biopelícula	R2A
4	M21	3	Biopelícula	R2A
5	M22	3	Biopelícula	R2A
6	M23	3	Biopelícula	R2A
7	M31	5	Gotera	AIA
8	M34	5	Gotera	R2A
9	M36	5	Gotera	R2A
10	M41	3	Biopelícula	R2A
11	M45	3	Biopelícula	R2A
12	M49	3	Biopelícula	R2A
13	M50	5	Gotera	R2A
14	M54	1	Biopelícula	R2A
15	M55	1	Biopelícula	R2A
16	M66	5	Gotera	R2A
17	M69	3	Biopelícula	R2A
18	M70	1	Biopelícula	R2A
19	M71	2	Biopelícula	AIA
20	M76	1	Biopelícula	R2A
21	M78	3	Biopelícula	R2A

La característica principal para identificar y seleccionar las colonias de actinobacterias del resto de bacterias y levaduras fue la presencia de micelio aéreo y de sustrato, mientras que para diferenciarlas de los hongos se tomó en cuenta el tamaño de las hifas, siendo considerablemente más grandes en los hongos ya que son células eucariotas.

En los medios de cultivo utilizados, el 27% de las colonias observadas correspondieron actinobacterias (Figura 6.5), las cuales fueron utilizadas en la siguiente fase del trabajo. Por otra parte, la cantidad de colonias de actinobacterias recuperadas de cada sitio de muestreo se mantuvo relativamente constante con algunas variaciones (Sitio 1, Sitio 2, Sitio 5). No obstante, el sitio 4, que fue el más profundo, no mostró crecimiento de actinobacterias, mientras que el Sitio 3 presentó el máximo número de colonias, que fueron 9 (Figura 6.6).

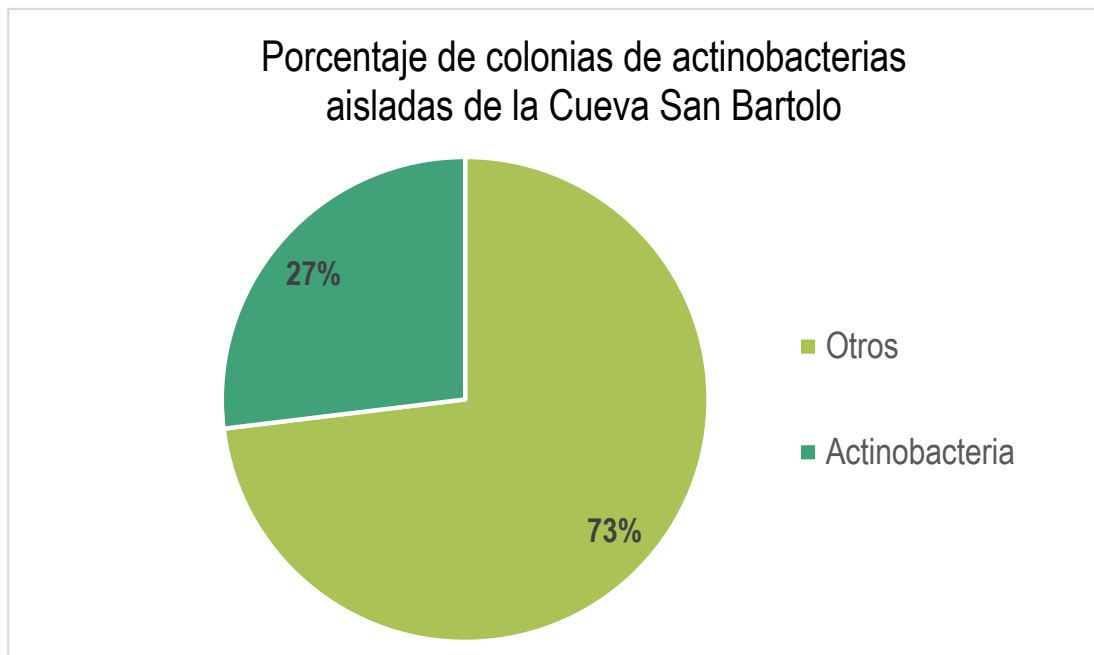


Figura 6.5. Porcentaje de colonias de actinobacterias cultivables aisladas de la cueva San Bartolo.

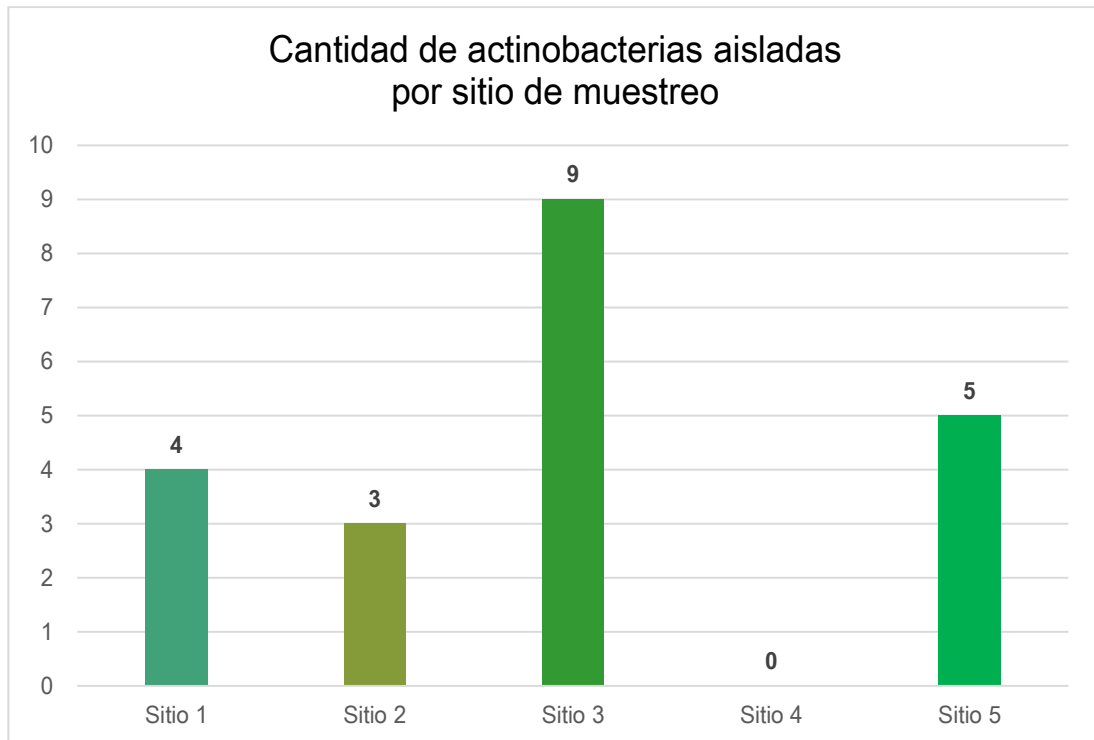


Figura 6.6. Cantidad de colonias de actinobacterias cultivables aisladas por sitio de muestreo.

Una vez seleccionadas y aisladas, las actinobacterias se cultivaron en el medio ISP2 para la producción de biomasa suficiente para las pruebas antagónicas. Para este último punto se tomaron en cuenta otros criterios macroscópicos (Axenov-Gibanov *et al.*, 2016) para diferenciar las colonias de actinobacterias entre sí, como lo son la forma, tamaño, consistencia, margen, color de micelio aéreo y de sustrato, margen, aspecto, elevación, textura, pigmento soluble, así como la presencia de olor a tierra mojada y su morfología microscópica en forma de filamentos (Tabla 6.2).

Características de la Colonia

Las colonias de actinobacterias presentan predominantemente la forma circular. Sin embargo, algunas presentan un hueco en el centro (M15), o bien tienen forma irregular (M70 y M78). El tamaño mínimo observado es de 1 mm (M10, M15, M21, M22), aunque ocasionalmente hay formas que presentan tamaños menores (M55). Las colonias más grandes alcanzaron diámetros desde los 10 mm (M45, M50, M55, M69, M70) hasta 11 mm (M49). Tanto la forma como los tamaños de las colonias son ilustrados en la Figura 6.7. Todas las colonias presentan margen filamentososo con textura rugosa, aspecto seco y consistencia dura (no cremosa) (Figura 6.8). A nivel microscópico se observa que los filamentos están compuestos por cadenas de bacilos dispuestos en filas uno contiguo del siguiente (Figura 6.9). Se observaron colonias con micelio aéreo de color blanco (M10, M21, M36, M49, M69, M70, M78), amarillo (M55), anaranjado (M15), gris (M31), café (M45, M50) y negro (M22); micelio de sustrato de color verde (M10), anaranjado (M15), blanco (M21), negro (M22), café claro (M31), amarillento (M36, M55, M70, M78), café (M45, M50, M69); algunas de ellas con capacidad de producir pigmentos solubles en agar de color verde (M10), violeta (M22) y café (M45 y M69). Algunas características morfológicas macroscópicas como de pigmentación se muestran en la Figura 6.10.

Como otras características se identificó que algunas de estas colonias (M10, M15, M22, M49, M50, M70, M78) presentaron olor característico similar al petricor, con ligeras variaciones en cuanto a la intensidad.

Tabla 6.2. Caracterización morfológica de las cepas aisladas de actinobacterias.

Cepa	M10	M15	M21	M22	M31	M36	M45	M49	M50	M55	M69	M78	M70
Color micelio aéreo	blanco	anaranjado	gris-blanco	negro	gris	blanco	café	blanco	café oscuro	amarillo	blanco	blanco	blanco
Color micelio sustrato	verde	anaranjado	blanco	negro	beige	blanco-amarillo	café	café	café oscuro	amarillo	café-amarillo	anaranjado	blanco-amarillo
Color pigmento soluble	verde	no	no	violata	no	no	no	no	café oscuro	no	café	no	no
Forma	circular	circular con un hueco al centro	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	irregular	irregular
Margen	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso	filamentoso
Aspecto	seca	seca	seca	seca	seca	seca	seca	seco	seco	seco	seco	seco	seco
Elevación	convexa	cráteriforme	convexa	umbilicada/ cráteriforme	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa	convexa	umbilicada/ cráteriforme	convexa
Consistencia	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura	dura
Textura	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa	rugosa
Luz reflejada	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate	mate
Luz transmitida	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca
Olor	Sí	Sí	No	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí
Tamaño de colonias	1-8 mm	1-4 mm	1-8 mm	1-4 mm	>2 mm	2 mm	5-10 mm	4-11 mm	3-10 mm	>1-10 mm	6-10 mm	5-9 mm	2-10 mm
Morfología microscópica	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos	Bacilos en forma de filamentos

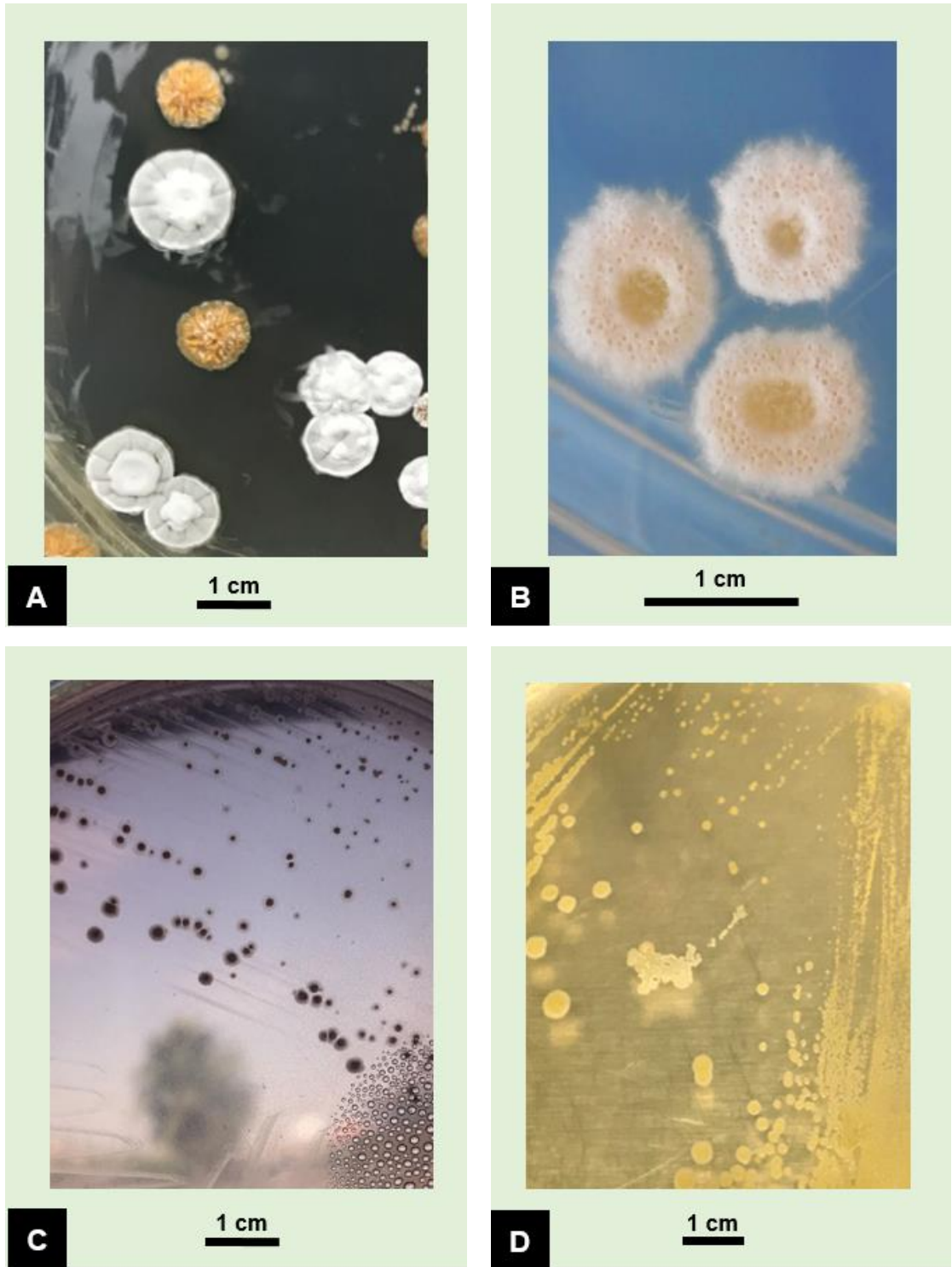


Figura 6.7. Tamaño de las colonias de actinobacterias. Colonias mayores a 10 mm, A. Aislados M70 y M78. B. Aislado M78. Colonias menores a 10 mm, C. Aislado M22 y D. Aislado M55.

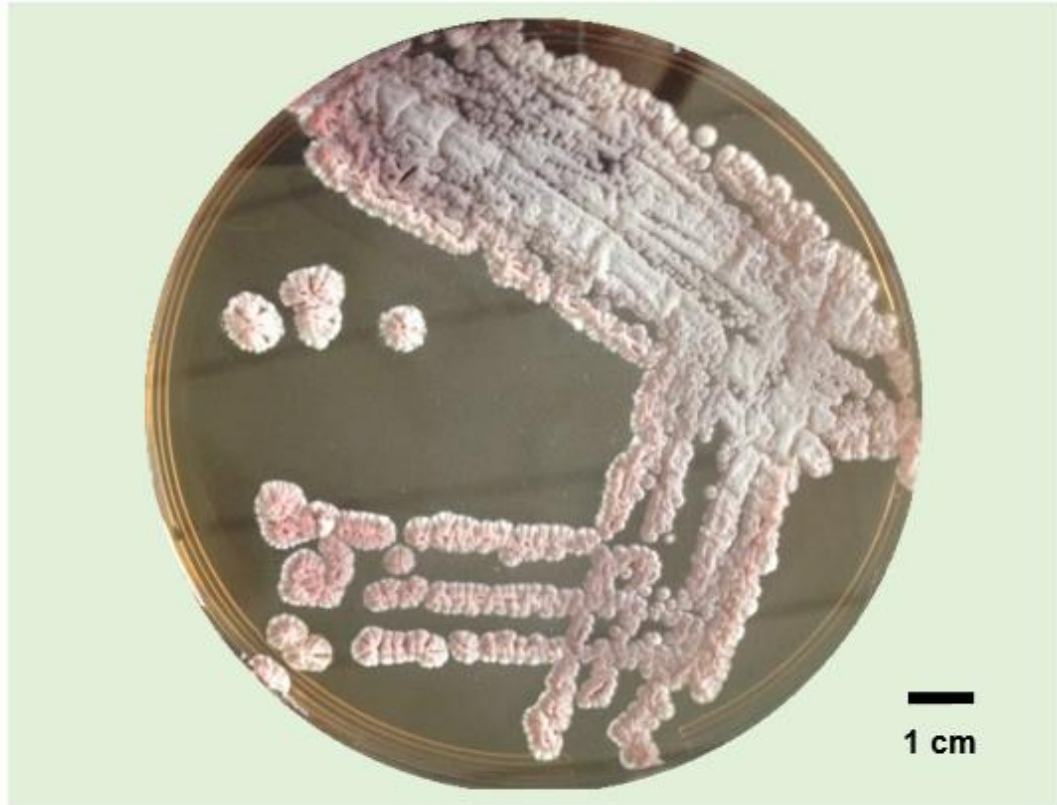


Figura 6.8. Características morfológicas y texturales de la colonia M63 en donde se pueden observar el margen filamentos del micelio, la textura rugosa, el aspecto seco y la consistencia dura.

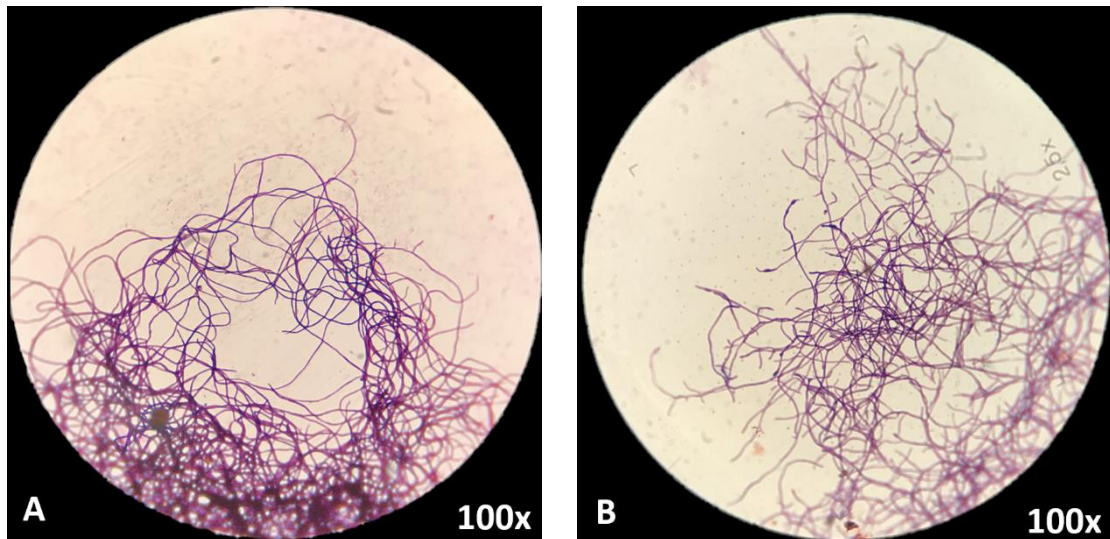


Figura 6.9. Fotografías microscópicas del micelio de dos actinobacterias aisladas de la Cueva San Bartolo después de teñirlas con cristal violeta. A. Aislado M10. B. Aislado M22.

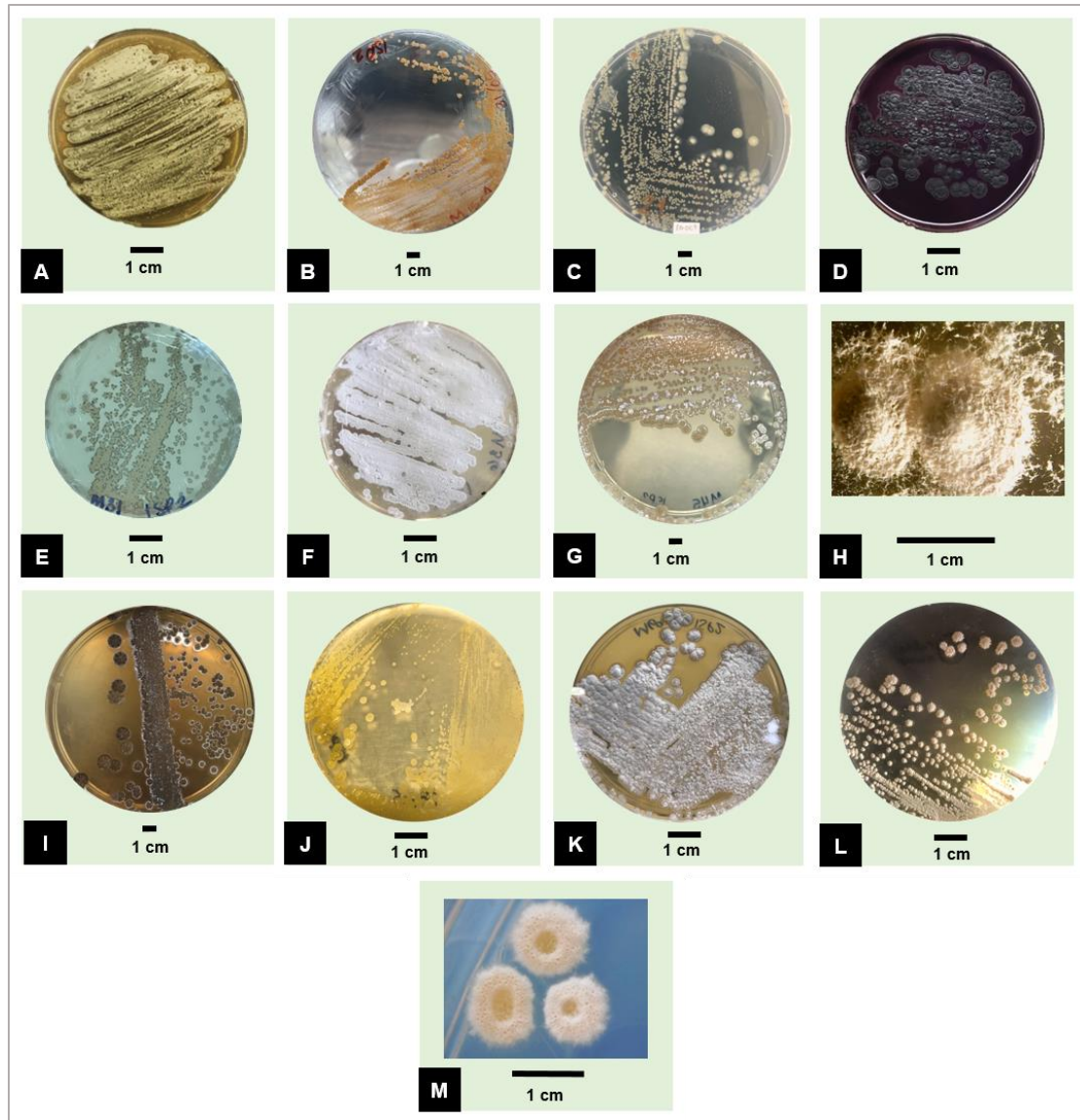


Figura 6.10. Características morfológicas macroscópicas y pigmentos producidos en agar ISP2 por las actinobacterias aisladas de la cueva San Bartolo. A. Colonias circulares de M10, micelio aéreo color blanco y pigmentación verde de agar. B. Colonias circulares con hueco en centro de M15, color anaranjado de micelio de sustrato y agar sin pigmentación. C. Colonias circulares de M21, micelio de color blanco-grisáceo sin pigmentación en agar. D. Colonias circulares de M22, micelio aéreo color negro y pigmentación soluble violeta. E. Colonias circulares de M31, color de micelio aéreo blanco con gris sin pigmentación en agar. F. Colonias circulares de M36, color de micelio aéreo blanco sin pigmentación en agar. G. Colonias circulares de M45, micelio de color café-beige con esporulación blanca y sin pigmentación del agar. H. Colonias circulares de M49, micelio aéreo ramificado en filamentos de color blanco. I. Colonias circulares de M50, micelio aéreo color café y pigmentación soluble café. J. Colonias circulares de M55, micelio aéreo color amarillo sin pigmentación en agar. K. Colonias circulares de M69, micelio aéreo blanco-grisáceo y pigmentación café en agar. L. Colonias irregulares de M70, micelio aéreo color blanco, micelio de sustrato color anaranjado, sin pigmentación en el agar. M. Colonias irregulares con un hueco al centro de M78, micelio aéreo de color blanco sin pigmentación en el agar.

6.3 Actividad Antimicrobiana

6.3.1 Cribado Inicial

Se analizó la actividad de los 13 aislamientos de actinobacterias contra ocho patógenos microbianos: *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. typhimurium* y *C. albicans*. De los trece aislamientos de actinobacterias evaluadas, solamente siete (M15, M21, M22, M36, M45, M55 y M69), que representan el 54%, mostraron actividad antimicrobiana en contra de las especies patógenas antes mencionadas (Tabla 6.3).

En todos los cultivos, las bacterias patógenas que se vieron mayormente afectadas por la actividad antimicrobiana de los aislamientos fueron *B. cereus*, la cual tuvo una inhibición total (Figura 6.11) y *E. faecalis* la cual tuvo inhibición total o parcial.

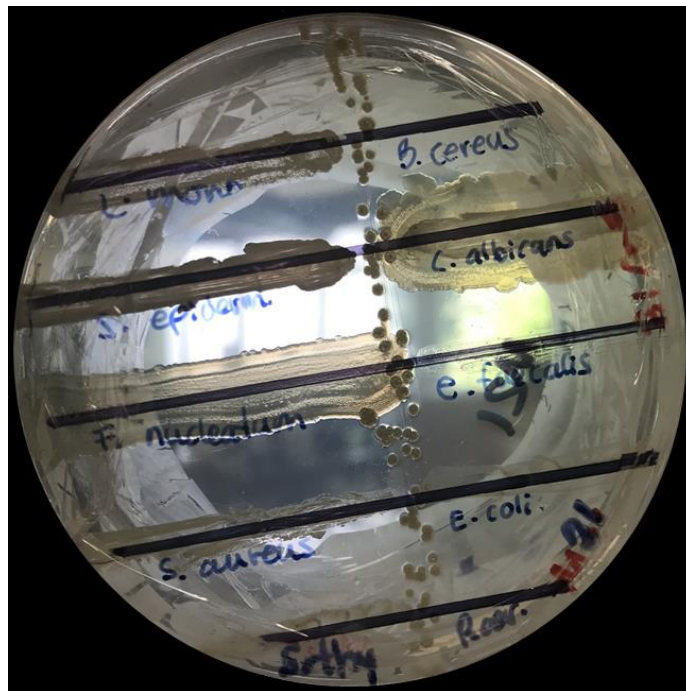


Figura 6.11. Prueba de cribado de M21 donde se observa la fuerte inhibición contra *Bacillus cereus* y *Enterococcus faecalis*.

Las actinobacterias tuvieron actividad parcial a casi nula contra *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli*, en las que la inhibición fue muy baja siendo afectadas únicamente por dos aislamientos. Ninguno de los aislamientos inhibió el crecimiento de *C. albicans*. El aislado M15 mostró actividad contra seis de los patógenos (Figura 6.14).

Tabla 6.3. Cribado inicial de aislamientos activos de actinobacterias mediante el método de rayas cruzadas contra diferentes patógenos microbianos. Números 1 y 2 indican repeticiones de la misma prueba.

Cepas de actinobacterias evaluadas	Patógenos														
	Gram negativas				Gram positivas								Levadura		
	<i>Escherichia coli</i> O157 OPS-OMS		<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644™		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579™		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228™		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i> ATCC 14053
1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
M10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M15	+	++	++	++	++	+	-	+	+++	+++	-	-	++	+++	-
M21	++	++	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	++	++	-
M22	-	-	-	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	++	-
M31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M36	-	-	-	-	-	-	+++	++	+++	++	+	+	+++	+++	-
M45	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	+	+	-
M49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M55	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
M69	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-
M70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M78	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : Buena actividad; ++ : Actividad moderada; + : Baja actividad; - : Sin actividad.

6.3.2 Prueba con Sobrenadante Celular

En esta prueba solamente se incluyeron aquellos aislamientos que mostraron actividad antimicrobiana positiva en la prueba inicial de cribado.

En esta prueba no se observó inhibición de bacterias Gram negativas (*E. coli* y *S. typhimurium*) ni de la levadura (*C. albicans*), mientras que todos los aislados mostraron actividad contra tres de cinco patógenos Gram positivos. De estos tres patógenos, *B. cereus* fue el que presentó mayor inhibición, siendo afectado por todos los aislamientos. Por el contrario, *L. monocytogenes* fue inhibido sólo por M21 y M45, siendo el menos afectado de la prueba. Los resultados se observan en la Tabla 7.4.

Tabla 6.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana del sobrenadante celular de los aislados de actinobacterias expresada por el halo de inhibición como el tamaño de las zonas de inhibición (mm) incluido el diámetro del disco de papel (20 mm). El número 1 indica la repetición de la prueba.

Cepas de actinobacterias evaluadas	Cepas activas							
	Gram negativas		Gram positivas					Levadura
	<i>Escherichia coli</i> O157 OPS-OMS	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644™	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579™	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228™	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053
	1	1	1	1	1	1	1	1
M15	0	0	0	0	23	0	0	0
M21	0	0	0	35	33	0	33	0
M22	0	0	0	0	22	0	36	0
M36	0	0	0	0	41	0	0	0
M45	0	0	0	30	38	0	32	0
M55	0	0	0	0	27	0	0	0
M69	0	0	0	0	39	0	0	0

6.3.3 Prueba con Extracto Metanólico

En esta prueba se observó que los aislados M21, M36 y M45 presentaron actividad positiva contra patógenos Gram positivos y levaduras. Por el contrario, ninguna actinobacteria presentó actividad contra patógenos Gram negativos.

Los patógenos Gram positivos afectados por los tres aislados fueron *L. monocytogenes* y *B. cereus*, mientras que *E. faecalis*, fue inhibido por M36 y M45, y *S. epidermidis* solamente fue afectado por M36, lo que indica diferente actividad patógena de los aislados sobre los patógenos Gram positivos. Por último *C. albicans* fue inhibida por los tres aislados M21, M36 y M45.

Tabla 6.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de los aislados de actinobacterias expresada por el halo de inhibición como el tamaño de las zonas de inhibición (mm) incluido el diámetro del disco de papel (20 mm). El número 1 indica la repetición de la prueba.

Cepas de actinobacterias evaluadas	Patógenos							
	Gram negativas		Gram positivas					Levadura
	<i>Escherichia coli</i> O157 OPS-OMS	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644™	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579™	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228™	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053
1	1	1	1	1	1	1	1	
M15	0	0	0	0	0	0	0	0
M21	0	0	0	26	24	0	0	25
M22	0	0	0	0	0	0	0	0
M36	0	0	0	39	32	38	33	31
M45	0	0	0	28	31	0	36	22
M55	0	0	0	0	0	0	0	0
M69	0	0	0	0	0	0	0	0

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer reporte del cultivo y aislamiento de actinobacterias procedentes de la Cueva San Bartolo (Santa Catarina, Nuevo León) así como de sus propiedades antimicrobianas. Las cuevas son hábitats poco estudiados en los cuales uno o más factores ambientales promueven la formación de microambientes donde la competencia de microorganismos produce metabolitos secundarios, como los antibióticos (Groth *et al.*, 1999; Yücel y Yamaç, 2010; Cheeptham, 2013; Ghosh *et al.*, 2017).

La evolución aislada de actinobacterias en ambientes kársticos aumenta la posibilidad de encontrar cepas con actividad antimicrobiana que produzcan nuevos compuestos biológicamente activos (Axenov *et al.*, 2016), lo que aumenta la expectativa de encontrar metabolitos bioactivos no conocidos (Yücel y Yamaç, 2010). Según Long *et al.* (2019) el filo Actinobacteria constituye uno de los grupos más grandes y antiguos dentro del dominio Bacteria. Algunos grupos de éstas tienen una naturaleza oligotrófica que les permite una alta capacidad para adaptarse en ambientes como las cuevas.

Tomando en cuenta los numerosos estudios que existen sobre la biodiversidad en cuevas (Jurado *et al.*, 2005), es importante destacar que

la cantidad de grupos en ellas varía considerablemente, ya que cada una presenta comunidades microbianas muy particulares. Sin embargo, el filo Actinobacteria se mantiene como uno de los grupos dominantes en estos ambientes kársticos (Cheeptham *et al.*, 2013).

En este estudio se obtuvieron 78 aislamientos de microorganismos de la Cueva San Bartolo. La cantidad de aislamientos obtenidos puede deberse a factores como el tipo de medio de cultivo y los métodos de colecta, hasta características propias de la cueva como la cantidad y distribución de nutrientes disponibles y el porcentaje de humedad. Del total colectado se obtuvieron 21 aislamientos de actinobacterias, los cuales fueron identificados con base en las características morfológicas descritas por Axenov-Gibanov *et al.* (2016). De los 21 aislamientos reconocidos como actinobacterias, solamente 13 sobrevivieron después de varias rondas de inoculación y cultivo para obtener cepas puras. Esta pérdida (38%) fue ocasionada probablemente durante el proceso de aislamiento.

La inculturabilidad bacteriana es uno de los grandes problemas en la microbiología actual (Adam *et al.*, 2018), y ésta es evidenciada en la dificultad que se observa en el laboratorio para el crecimiento de los cultivos. Es sabido que muchas especies están presentes en el ambiente en un estado viable pero no cultivable, posiblemente porque sólo en el ambiente natural se reúnen todas las condiciones que permiten al microorganismo realizar las reacciones necesarias para su crecimiento, lo que no ocurre en laboratorio (Barton y Jurado, 2007). Según Staley y Konopka (1985), no importa qué tipo de enfoque se aplique al aislamiento de microorganismos, solamente es posible cultivar alrededor del 1% de lo que está presente en una muestra.

Las poblaciones microbianas forman agregados colectivos como las biopelículas, en las que cooperan y establecen relaciones mutualistas. Esto explicaría por qué se dificulta su aislamiento, ya que el crecimiento depende de interacciones específicas con otras especies (Grotenhuis *et al.* 1991; Tomczyk-Żak y Zielenkiewicz, 2015). Por lo tanto, los aislados que lograron con éxito los pasos de aislamiento en este trabajo podrían representar bacterias capaces de alimentarse sólo de los nutrientes presentes en el medio sintético, mientras que las especies más adaptadas al crecimiento cooperativo y la vida en ambientes oligotróficos e inorgánicos constituirían una parte de los aislados perdidos (Maciejewska *et al.*, 2016). La presencia de microorganismos dentro de los sistemas de cuevas es comúnmente de naturaleza oligotrófica o quimiolitotrófica e impone nutrientes precisos para su crecimiento (Iquebal *et al.*, 2021). Por lo tanto, es muy difícil aislar algunas bacterias raras o específicas de estos ambientes.

La mayoría de los aislados de la Cueva San Bartolo se obtuvieron de biopelículas que crecen en las paredes (76%), y el resto se aisló de pequeñas goteras de agua que se filtraban por el techo de la cueva (24%). Se ha reportado la presencia de una gran diversidad de actinobacterias en biopelículas (Pfendler, *et al.* 2018) y otro tipo de sustratos dentro de las cuevas como la leche de luna (Axenov-Gibanov *et al.*, 2016), espeleotemas (Laiz *et al.*, 2000), directamente de la roca (Ghosh *et al.*, 2017) y otros sedimentos (Yasir, 2017; Belyagoubi *et al.*, 2018; Long *et al.*, 2019; Iquebal *et al.*, 2021).

De los dos medios de cultivo utilizados para el muestreo, el medio R2A fue el que mostró mejores resultados coincidiendo con lo reportado por Yasir (2018)

y en el cual se tuvo la mayor cantidad de colonias bacterianas (82%). Se registró crecimiento en todos los sitios de muestreo y se observó un aumento relativo en el número de colonias relacionado con la profundidad de la cueva, teniendo su máximo en el Sitio 3 (110 m). Sin embargo, muy pocas colonias se pudieron obtener del sitio más profundo (168 m), de donde no se pudo realizar ningún subcultivo. Esto podría sugerir una posible relación en la profundidad de la cueva y la cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento bacteriano. No obstante, diversos autores han reportado aislamiento de microorganismos en lugares mucho más profundos dentro cuevas (Bhullar *et al.*, 2012). La Cueva San Bartolo es utilizada por diversas especies de fauna responsables del ingreso y disponibilidad de nutrientes. Los organismos más importantes e indudablemente más influyentes son los murciélagos, quienes contribuyen con los grandes depósitos de guano que están presentes, el cual es rico en nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Barroso *et al.*, 2011). Entonces, esto pudiera estar relacionado con la cantidad de muestra que se tomó o con otras características intrínsecas de la cueva de origen, como la humedad o la temperatura.

Las actinobacterias son el grupo de microorganismos que exhibe la más grande diferenciación morfológica dentro del grupo de los microorganismos Gram positivos (Li *et al.*, 2016). Se identificaron 21 cepas pertenecientes al grupo Actinobacteria con base en una serie de características morfológicas clásicas entre las que se incluyen micelio aéreo y de sustrato que les permite adherirse firmemente al agar, consistencia dura, olor característico a tierra mojada y producción de pigmentos solubles, esto de acuerdo con los criterios de Dastager

et al. (2006), Rahman *et al.* (2011), Axenov-Gibanov *et al.* (2016) y Belyagoubi *et al.* (2018).

Los caracteres fenotípicos de los aislados fueron descritos en medio ISP2, entre los que se encuentran diferentes colores de micelio aéreo y de sustrato. Estas sustancias pueden presentarse de dos formas: excretarse al medio (exopigmentos), o estar unidos a ciertas estructuras celulares y ser retenidos por el micelio (endopigmentos) (Anandan *et al.*, 2016). Se observaron colonias con micelio aéreo de color blanco (M10, M21, M36, M49, M69, M70, M78), amarillo (M55), anaranjado (M15), gris (M31), café (M45, M50) y negro (M22); micelio de sustrato de color verde (M10), anaranjado (M15), blanco (M21), negro (M22), café claro (M31), amarillento (M36, M55, M70, M78), café (M45, M50, M69); algunas de ellas con capacidad de producir pigmentos solubles en agar de color verde (M10), violeta (M22) y café (M45 y M69). Li *et al.* (2016) afirman que el tipo de pigmento que es soluble en agua se filtra en el medio de cultivo y lo tiñe, mientras que el pigmento de tipo no soluble en agua (o soluble en grasa) hace que la colonia tenga el color correspondiente. La producción de estas sustancias está ligada a mecanismos de defensa, respiración, y protección, siendo influenciada por diferentes factores como el pH del medio, la aireación, la temperatura de crecimiento, y las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Anandan *et al.*, 2016). Las actinobacterias de la cueva que presentaron pigmentación fueron cuatro: los aislados M10, M22, M50 y M69. De estos, solamente dos, M22 y M69 sí mostraron actividad en las pruebas de actividad antimicrobiana.

Del total de 21 actinobacterias obtenidas de la cueva, 13 aislados (62%) sobrevivieron los procesos de aislamiento y se cultivaron en el medio líquido ISP2 para las pruebas antimicrobianas, ya que se ha reportado que este medio resulta efectivo para la producción de biomasa celular y compuestos antimicrobianos (Allan *et al.*, 2018). El potencial para producir compuestos con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas fue evaluado para cada aislado a través de tres pruebas: cribado inicial, la prueba con sobrenadante y la prueba con extractos metanólicos.

La prueba inicial de cribado permite filtrar y seleccionar solamente las cepas que presenten actividad (Yücel y Yamaç (2010), Axenov-Gibanov *et al* (2016), Ganesan *et al.*, (2017) y Adam *et al.* (2018). Esta prueba se realizó con los 13 aislados para evaluar su actividad antibacteriana general. De estos, solamente el 54% de las actinobacterias mostraron actividad contra al menos una cepa patógena, siendo *B. cereus* inhibida en todas las pruebas, *E. feacalis* inhibida total a parcialmente contra diferentes aislados, y una ocasional inhibición contra *E. coli* y *S. thyphimurium*. El resto de las actinobacterias tuvieron actividad parcial o nula, y en ningún caso se observó la inhibición de *C. albicans*. Resultados muy parecidos fueron obtenidos en la prueba del sobrenadante celular, con la diferencia que esta última las bacterias Gram negativas fueron inhibidas totalmente.

Estas pruebas demuestran que las actinobacterias de la Cueva de San Bartolo sí producen sustancias que funcionan como antibióticos contra algunas de las especies patógenas utilizadas en el presente estudio. Los antibióticos son metabolitos secundarios que producen algunas bacterias a través de procesos

complejos que pueden depender de varios factores. Numerosos estudios han demostrado que la disponibilidad de fuentes de carbono, fosfato y nitrógeno en los medios de cultivo puede influir en la producción de estas sustancias, ya que se ha observado que es en la fase estacionaria donde se presenta reducción en la tasa de crecimiento como consecuencia del agotamiento de los nutrientes (Demain *et al.* 1983; Bibb, 2005; Van Wezel y McDowall, 2011; Wohlleben *et al.*, 2017).

En las dos pruebas se registraron actividades inhibitoras más fuertes contra las bacterias Gram positivas en comparación con las bacterias Gram negativas, en la cual fue parcial (cribado inicial) o nula (prueba del sobrenadante). Esto se debe a que las bacterias Gram negativas contienen una serie de mecanismos intrínsecos que previenen la acción de muchos antimicrobianos. En primer lugar, presentan una estructura celular muy resistente que consiste en dos membranas citoplasmáticas, una interna y una externa, y entre ellas una delgada pared celular de peptidoglicano. La presencia de la membrana externa es la que permite distinguir las bacterias Gram negativas de las Gram positivas, y es la que expresa una potente respuesta inmune hacia el medio. Esta está formada por una bicapa fosfolipídica a la cual se encuentran unidas cadenas de lipopolisacáridos formadas por tres regiones: el polisacárido O (también llamado antígeno O), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (que es la endotoxina), siendo esta última la responsable de causar la actividad endotóxica (Tafur *et al.*, 2008; Troncoso *et al.*, 2017). Por ejemplo, una característica importante de las Enterobacteriaceae, un grupo importante de Gram negativas, es que difunden

sus plásmidos por conjugación, lo que fácilmente les confiere resistencia a casi todos los antibióticos existentes (Oliveira y Reygaert, 2022).

Existen numerosos estudios de pruebas de actividad antimicrobiana de actinobacterias contra microorganismos patógenos que presentan resultados similares y que, independientemente del método utilizado, reportan una actividad antibacteriana mucho más fuerte contra bacterias Gram positivas que contra bacterias Gram negativas (Maciejewska *et al.*, 2016; Ghosh *et al.*, 2017; Adam *et al.*, 2018; Belyaogoubi *et al.* 2018; Long *et al.*, 2019; Pipite *et al.*, 2022).

Adam *et al.*, (2018) presentan resultados similares de actividad antimicrobiana utilizando el ensayo de raya cruzada. Mencionan que a pesar de la presencia de actinobacterias que mostraron una importante actividad contra las cepas patógenas, los aislados exhibieron una actividad distinta dependiendo de las condiciones del cultivo; algunas sólo secretaron antibióticos cuando se cultivaron en medios específicos, como en el medio ISP2. Maciejewska *et al.* (2016) estudiaron cepas de *Streptomyces* aisladas de depósitos de leche de luna de cueva, las cuales mostraron actividad antibacteriana mucho más fuerte contra bacterias Gram-positivas (94%) que contra bacterias Gram-negativas (71%).

Belyaogoubi *et al.* (2018) utilizaron el método de los cilindros de agar como prueba inicial de selección de cepas activas, en el cual se observó una actividad antibacteriana más fuerte contra bacterias Gram positivas (61.70% de aislamientos tuvo inhibición hacia *S. aureus* y 29.79% para *L. monocytogenes*) que contra bacterias Gram negativas (21.28% fueron activos contra *E. coli*), y cinco de estos aislamientos mostraron una fuerte inhibición contra *Candida albicans*.

Igualmente, Long *et al.*, (2019) señalan que una evaluación de la actividad de actinobacterias de la cueva Shuanghe resultó en una mayor cantidad de aislamientos (12) con actividad contra cepas Gram-positivas (*S. aureus*), y una menor cantidad (ocho) contra bacterias Gram-negativas (*E. coli*). Estos autores mencionan que los aislados de la cueva Shuanghe exhibieron una actividad antibacteriana selectiva. Por ejemplo, algunas especies de actinobacterias son activas contra patógenos Gram negativos, pero no activos contra patógenos Gram positivos. Se necesitaron más estudios para analizar e identificar los metabolitos bioactivos obtenidos de los aislados de cuevas. Este tipo de actividad antibacteriana selectiva también ha sido encontrada en otras cuevas (Ghosh *et al.*, 2017).

Pipite *et al.* (2022) realizaron un trabajo similar y mencionan que el 62% de sus aislados de cueva mostraron actividad contra al menos un patógeno en la prueba de raya cruzada. En este trabajo, 50% de los aislados mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y 41% contra *Bacillus cereus*.

Por último, se llevó a cabo la prueba de extractos metanólicos, en la que se aíslan aquellos antibióticos que son solubles en metanol. Esta prueba también mostró nula actividad antibacteriana contra los patógenos Gram negativos, mientras que se presentó antagonismo contra los patógenos Gram positivos. Al igual que las pruebas anteriores, los organismos más afectados fueron *B. cereus* y *L. monocytogenes*, mientras que *E. faecalis* fue inhibido por dos cepas y *S. epidermidis* sólo por una. Como un resultado a destacar, las cepas de *C. albicans* que no fueron afectadas durante las dos primeras pruebas, sí

resultaron inhibidas por tres aislados. Esto puede ser por consecuencia de que alguna sustancia con actividad antibiótica no se expresó en el medio extracelular, y al ser aislado y captado por el metanol pudo tener efecto sobre la levadura.

Trabajos recientes indican que los microbiomas de cuevas se han considerado como recursos potenciales para nuevos medicamentos y antibióticos. En este trabajo se pudo demostrar que en ambientes kársticos de Nuevo León (como la Cueva de San Bartolo), sí existe este potencial para la producción de antibióticos a partir de actinobacterias. Esta investigación sirve como punto de partida a una serie de estudios más detallados que permita explorar más a detalle diferentes cuevas de Nuevo León con el fin de encontrar microorganismos productores de nuevas sustancias bioactivas de importancia médica.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. Se aislaron en el laboratorio 78 cepas de microorganismos de la Cueva San Bartolo, de los cuales 21 fueron actinobacterias.
2. De acuerdo con las características morfológicas descritas por Axenov-Gibanov *et al.* (2016), se identificaron 21 aislamientos diferentes de actinobacterias.
3. De los 21 aislamientos obtenidos de actinobacterias, únicamente 13 sobrevivieron después de varias series de inoculación y cultivo para obtener cepas puras.
4. La prueba de cribado inicial demostró que el 53.8 % de las actinobacterias aisladas de la Cueva de San Bartolo producen compuestos con actividad antimicrobiana, los cuales inhibieron el 87.5% de las bacterias patógenas evaluadas siendo más efectivas contra las Gram positivas. Las pruebas de sobrenadante y extractos metanólicos fueron consistentes con la primera prueba en cuanto a mostrar una mayor inhibición contra las bacterias Gram positivas respecto a las Gram negativas.

5. Los aislamientos de actinobacterias de la cueva de San Bartolo representan una alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos que presenten actividad antagónica contra microorganismos que afectan al humano.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

Son necesarios estudios futuros que permitan profundizar en la caracterización de estos compuestos, así como la identificación a nivel molecular de las cepas de la Cueva de San Bartolo productoras de compuestos antimicrobianos. Además, se podrá repetir el mismo estudio en otras cuevas de la región para futuras comparaciones.

CAPÍTULO 10

DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Los residuos generados durante la parte experimental de la investigación fueron desechados cumpliendo con el reglamento del Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas y de la Facultad de Ciencias Biológicas. Para ello se utilizaron contenedores correspondientes a cada tipo de residuo, los cuales fueron proporcionados por ambas facultades para posteriormente llevar a cabo el manejo pertinente de almacenaje y disposición final.

L.

CAPÍTULO 11

LITERATURA CITADA

- Adam, D., Maciejewska, M., Naômé, A., Martinet, L., Coppieters, W., Karim, L., Baurain, D., Rigali, S. (2018) Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiotics*, **7**(28).
- Agga, G.E., Arthur, T.M., Durso, L.M., Harhay, D.M., Schmidt, J.W. (2015). Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLoS ONE*, **10**(7).
- Allen, H., Donato, J., Wang, H., Cloud-Hansen, K., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* **8**, 251–259.
- Ashraf, M., Mustafa, B.E., Rehman, S.U., Bashir, M.K., and Ashraf, M.A. (2019). Emergence of Antimicrobial Resistance, Causes, Molecular Mechanisms, and Prevention Strategies. In: Sadashiv S. O. and S.J. Patil (Eds.), *A Bovine*

Perspective, Bovine Science - A Key to Sustainable Development. Intech Open.

- Axenov-Gibanov, D.V., Voytsekhovskaya, I.V., Tokovenko, B.T., Protasov, E.S., Gamaiunov, S.V., Rebets, Y.V., Luzhetskyy, A.N., Timofeyev, M.A. (2016). Actinobacteria Isolated from an Underground Lake and Moonmilk Speleothem from the Biggest Conglomeratic Karstic Cave in Siberia as Sources of Novel Biologically Active Compounds. *PLoS ONE* **11**(2).
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vallant, N., Jacquard, C., Meler-Kolthoff, J.P., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, G.P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, **80**(1):1-43.
- Barton, H.A. and Northup, D.E. (2007). Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, **69**(1): 163–178.
- Barton, H. A. (2006). Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*. **68**(2): 43–54.
- Barton, H. y Jurado, V. (2007). What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves Microorganisms in caves survive under nutrient-poor conditions and are metabolically versatile and unexpectedly diverse. *Microbe*. 2:132-8.
- Barroso-Grasa, R.; Chaveli-Chávez, P; Mendoza-Rodríguez, L. (2011). El guano de murciélago, un sustituto eficaz de los abonos convencionales. Resultados preliminares. *Agrisost*, **17**(1): 33-38.

- Bhullar, K.; Waglechner, N; Pawlowski, A; Koteva, K.; Banks, E.D.; Johnston, M.D.; Barton, H.A., Wright, G.D. (2012). Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE*, **7**(4): e34953.
- Chambers, H. F. (2001). The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging Infectious Diseases*. **7**(2): 178-182.
- Cheeptham, N.; Sadoway, T.; Rule, D.; Watson, K.; Moote, P.; Soliman, L.; Horne, D. (2013). Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, **42**(1): 35–47.
- Dastager, S.G., Wen-Jun Li, A., Shu-Kun, T., Xin-Peng, T., Xiao-Yang, Z., Li-Hua, X., Cheng-zin, J. (2006). Separation, identification and analysis of pigment (Melanin) production in *Streptomyces*. *Afr. J. Biotechnol.*, **5**(11):1131-1134.
- Davis, C. (2005). The Use of Australian Honey in Moist Wound Management. Project Report. Rural Industries Research and Development Corporation.
- Ganesan, P., Reegan, A. D., David, R. H. A., Gandhi, M. R., Paulraj, M. G., Al-Dhabi, N. A., & Ignacimuthu, S. (2017). Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria Journal of Medicine*, **53**(2), 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.03.004>
- Ghosh, S., Kuisiene, N., Cheeptham, N. (2016). The cave microbiome as a source for drug discovery: Reality or pipe dream? *Biochem Pharmacol*, **134**:18-34.
- Ghosh, S., Paine, E., Wall, R., Kam, G., Lauriente, T., Sangarmangkang, P., Horne, D., Cheeptham, N. (2017). In Situ Cultured Bacterial Diversity from Iron Curtain Cave, Chilliwack, British Columbia, Canada. *Diversity*, **9**(36).

- Ghosh, S., Kam, G., Nijjer, M., Stenner, C.; Cheeptham, N. (2020). Culture dependent analysis of bacterial diversity in Canada's Raspberry Rising Cave revealed antimicrobial properties. *Int. J. Speleol.* **49**(1): 43-53.
- Gonçalves, T. y Vasconcelos, U. (2021). Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules* **26**(4), 927.
- Gosse, J.T., Ghosh, S., Sproule, A., Overy, D., Cheeptham, N., Boddy, C.N. (2019). Whole Genome Sequencing and Metabolomic Study of Cave *Streptomyces* Isolates ICC1 and ICC4. *Frontiers in Microbiology*, 10:1020.
- Gould, Kate. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother*, **71**: 572 –575.
- Grotenhuis, J.T., Smit, M., Plugge, C.M., Xu, Y.S., Van Lammeren, A.A., Stams, A.J., Zehnder, A.J. (1991). Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl Environ Microbiol*, **57**:1942–1949.
- Groth, I. and Saiz-Jimenez, C. (1999). Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, **16**(1): 1–8.
- Iquebal, M.A., Passari, A.K., Jagannadham, J., Ahmad, F., Vineeth Leo, V., Singh, G., Jaiswal, S., Rai, A., Kumar, D., Singh, B.P. (2021). Microbiome of Pukzing Cave in India shows high antimicrobial activity against plant and animal pathogens. *Genomics*, **113**: 4098–4108
- Kieser, B.M., Buttner, M.J., Charter, K.F., Hopwood, D. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. (2016). Chapter 3: Morphological Identification of Actinobacteria. En Dhanasekaran, D., y Jiang, Y. (Eds.),

Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications (pp. 59-86).
IntechOpen.

Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Buss, H.J., Trujillo, M.E., Kämpfer, P., Whiteman, W.B. (2012). Road map of the phylum Actinobacteria. En: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 5. Springer-Verlag, New York, NY, págs 1–28.

Maciejewska, M., Adam, D., Naômé, A., Martinet, L., Tenconi, E., Całusinska, M., Delfosse, P., Hanikenne, M., Baurain, D., Compère, P., Carnol, M., Barton, H.A. and Rigali, S. (2017). Assessment of the Potential Role of *Streptomyces* in Cave Moonmilk Formation. *Front. Microbiol.* 8:1181.

Maciejewska, M., Adam, D., Martinet, L., Naômé, A., Całusinska, M., Delfosse, P., Carnol, M., Barton, H.A., Hayette, M-P., Smargiasso, N., De Pauw, E., Hanikenne, M., Baurain, D. and Rigali, S. (2016). A Phenotypic and Genotypic Analysis of the Antimicrobial Potential of Cultivable *Streptomyces* Isolated from Cave Moonmilk Deposits. *Front. Microbiol.* 7:1455.

Montano, E. T. y Henderson, L.O. (2013). Studies of Antibiotic Production by Cave Bacteria. In: N. Cheeptham (Ed.), *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery*. New York, USA, Springer.

Mulec, J., Oarga-Mulec, A., Tomazin, R., Matos, T. (2015). Characterization and fluorescence of yellow biofilms in karst caves, southwest Slovenia. *International Journal of Speleology*, **44**(2): 107-114.

- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O., Dahm, C.N. (2003). Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environmental Microbiology*, 5(11): 1071-1086.
- Northup, D.E., Melin, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E., and Riquelme, C. (2011). Lava cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: implications for life detection on other planets. *Astrobiology*, 11(7): 601-618.
- Oliveira, J. y Reygaert, W.C. (2022). Gram-Negative Bacteria. StatPearls Publishing.
- Oskay, A. M., Üsame, T., & Cem, A. (2004). Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, 3(9): 441-446.
- Parada, R.B., Marguet, E.R., Vallejo, M. (2017). Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Rev. Colomb. Biotechnol.*, 19(2): 15 – 23.
- Pfendler, S., Karimi, B., Maron, P.A., Ciadamidaro, L., Valot, B., Bousta, F., Alaoui-Sosse, L., Alaoui-Sosse, B., Aleya, B. (2018). Biofilm biodiversity in French and Swiss show caves using the metabarcoding approach: First data. *Science of the Total Environment*, 615: 1207–1217.
- Popović, S., Krizmanić, J., Vidaković, D., Karadžić, V., Milovanović, Ž. Pečić, M., & Subakov Simić, G. (2020). Biofilms in caves: easy method for the

- assessment of dominant phototrophic groups/taxa in situ. *Environmental Monitoring and Assessment*, **192**(11).
- Portillo, M.C., González, J.M., Saiz-Jiménez, C. (2008). Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira cave, Spain, *J. Appl. Microbiol.* **104**: 681–691.
- Rahman, M.A., Islam, M.Z. and Islam, M.A. (2011). Antibacterial activities of Actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. *Biotechnol. Res. Int.*, 2011: 857925.
- Selim, M.S.M., S.A. Abdelhamid and S.S. Mohamed. (2021). Secondary metabolites and biodiversity of actinomycetes. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 19(1):72
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M., Grossart, H.P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol.* 4:47.
- Sköld, Ola. (2011). Antibiotics and Antibiotic Resistance. Wiley, United States of America.
- Staley, J.T.; Konopka. (1985) A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, **39**: 321–346.
- Tafur, J. D.; Torres, J.A.; Villegas, M.V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología.* 12(3).
- Tomczyk-Żak, Karolina & Zielenkiewicz, Urszula. (2015): Microbial Diversity in Caves, *Geomicrobiology Journal*.

- Troncoso, C.; Pavez, M.; Santos, A.; Salazar, R. & Barrientos, L. (2017). Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *Int. J. Morphol.*, 35(4):1214-1223.
- Yasir, Muhammad. (2018). Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology*. Elsevier, 49(2): 248-257.
- Zothanpuia, Passari, A.K., Leo, V.V., Singh, B.P. (2018). Chapter 4, Freshwater Actinobacteria: Potential Source for Natural Product Search and Discovery. In: B.P. Singh, V.K. Gupta, A.K. Passari (Eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: Actinobacteria: diversity and biotechnological applications*. Elsevier.