



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

***Análisis microbiológico y geoquímico de espeleotemas  
en cavernas kársticas de la provincia de Napo, Ecuador.***

Autor: Karla Marilyn Suquillo Morales

Tutor: Roldán Torres Gutiérrez, PhD.

Co-tutor: Oswaldo Guzmán, PhD.

Napo-Ecuador

2022

## DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Karla Marilyn Suquillo Morales con documento de identidad N° 1726794777, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:



---

Karla Marilyn Suquillo Morales

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Análisis microbiológico y geoquímico de espeleotemas en cavernas kársticas de la provincia de Napo, Ecuador.”, en la modalidad de: proyecto de integración de investigación en formato tesis, fue realizado por: Karla Marilyn Suquillo Morales, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 29 de marzo de 2022

Firma:



Roldán Torres Gutiérrez, Ph.D.

C.I: 0151345121



Oswaldo José Guzmán, Ph.D.

C.I: 1759458613

## Agradecimientos

Agradezco infinitamente a:

Mi familia, quienes apoyaron incondicionalmente mi decisión de estudiar lejos de casa y estuvieron pendientes de mí cada día.

La Universidad Regional Amazónica Ikiam por dar me la oportunidad de ser parte de su comunidad y a sus increíbles docentes por guiarme hacia el camino de la ciencia.

Al profesor Roldán Torres, quién desde el primer día que le propuse el presente tema de investigación me apoyó y guió hasta su realización. Por su incondicionalidad y profesionalismo en cada actividad realizada hasta el final.

Al profesor Oswaldo Guzmán, quien me apoyó en el entendimiento de la parte geoquímica del presente trabajo.

Al Ingeniero Anderson Ocampos, quien me acompañó incondicionalmente a las salidas de campo hacia las cavernas, me escuchó y me ayudó en cada peripecia que se presentó a lo largo de la carrera universitaria.

A Evelyn Oña, Sonia Sislema y Andrea Carrera, por su apoyo incondicionalidad en los ensayos experimentales realizados en el laboratorio, por compartirme su experiencia y conocimiento.

A mis amigas y amigos, quienes nunca se marcharon a pesar de las circunstancias y supimos conservar la amistad.

A mí, por resistir, persistir y mejorar cada día.

## Dedicatoria

*A mi madre Fanny,  
a mis hermanas Aramiz y Norberta,  
a mi padre Carlos,  
a mi novio Anderson y,  
a mi fiel amigo perruno Malyk,  
por encender en mí la  
llama de la constancia y  
acompañarme siempre  
a pesar de la distancia.*

*A todas las niñas y mujeres  
que desean ser científicas,  
para que encuentren  
en la Ciencia su oportunidad  
para brillar, mejorar el mundo,  
ser exitosas y reconocidas.*

*A la Ciencia, por enseñarme claridad,  
sencillez, realidad y objetividad.*

*A la naturaleza, por mostrarme  
la magia de la vida.*

## ÍNDICE GENERAL

DECLARACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD .....	ii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Dedicatoria.....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
Resumen.....	1
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	3
1.1.    Antecedentes .....	3
1.2.    Planteamiento del problema .....	5
1.3.    Justificación de la investigación .....	6
1.3.1.    Pregunta de investigación.....	7
1.4.    Objetivos de la investigación .....	8
1.4.1.    General.....	8
1.4.2.    Específicos.....	8
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO .....	8
2.1.    Georreferenciación .....	8
2.2.    Muestreo de espeleotemas de cavernas kársticas .....	9
2.3.    Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en espeleotemas .....	10
2.4.    Análisis morfológicos y diversidad de colonias microbianas .....	12
2.5.    Identificación molecular de las colonias microbianas .....	13
2.5.1.    Extracción de ADN genómico de colonias de bacterias y hongos.....	13
2.5.2.    Secuenciación de aislados bacterianos y fúngicos.....	14
2.6.    Análisis químico de espeleotemas.....	14
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS.....	15
3.1.    Análisis microbiológico de espeleotemas .....	15
3.1.1.    Cuantificación y cinética de crecimiento microbiano .....	15
3.1.2.    Análisis morfológico y diversidad microbiana.....	18
3.1.3.    Identificación molecular de las cepas microbianas.....	20
3.2.    Análisis geoquímicos de espeleotemas.....	23
3.3.    Relación entre las comunidades microbianas y geoquímica de los espeleotemas ....	26
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN .....	28
4.1.    Análisis Microbiológico de espeleotemas.....	28
4.1.1.    Cuantificación y cinética de crecimiento microbiano .....	28
4.1.2.    Morfología y diversidad microbiana .....	30
4.1.3.    Identificación molecular.....	31

4.2.	Análisis geoquímicos de espeleotemas.....	33
4.3.	Relación entre la microbiología y geoquímica de espeleotemas.....	34
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....		36
REFERENCIAS.....		38

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Georreferenciación de las tres cavernas seleccionadas para el muestreo. ....	9
<b>Figura 2.</b> Espeleotemas muestreados en los tres puntos de las tres cavernas. La mayoría de espeleotemas muestreados son estalactitas, a excepción del Punto 2 y 3 de la caverna 2 que son espeleotemas banderas. ....	10
<b>Figura 3.</b> Método de diluciones seriadas y siembra en placas Petri. ....	11
<b>Figura 4.</b> Cuantificación UFC promedio de bacterias y hongos en las cavernas muestreadas. Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. ....	16
<b>Figura 5.</b> Abundancia de bacterias y hongos (UFC g de espeleotemas <sup>-1</sup> ) en los puntos 1 (P1), 2 (P2) y 3 (P3) de la Caverna 1 (C1), Caverna 2 (C2) y Caverna 3 (C3). Cada punto representa un grupo de 3 espeleotemas muestreados. ....	17
<b>Figura 6.</b> Cinética del crecimiento bacterias asociadas a espeleotemas de cavernas muestreadas. No se obtienen diferencias significativas por Tukey HSD $p < 0.05$ . ....	18
<b>Figura 7.</b> Cinética del crecimiento hongos asociados a espeleotemas de cavernas muestreadas. No se obtienen diferencias significativas por Tukey HSD $p < 0.05$ . ....	18
<b>Figura 8.</b> Características morfológicas de los aislados bacterianos de la superficie de espeleotemas ....	19
<b>Figura 9.</b> Características morfológicas de los aislados fúngicos de la superficie de espeleotemas. ....	199
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético bacteriano de vecinos cercanos. Se observan 2 clados importantes. <i>Halorubrum tibetense</i> se usó como outgroup. ....	22
<b>Figura 11.</b> Árbol filogenético fúngico de vecinos cercanos. Se observan 3 clados importantes. <i>Arthrospira platensis</i> se usó como outgroup. ....	23
<b>Figura 12.</b> Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 1. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3. ....	25
<b>Figura 13.</b> Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 2. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3. ....	25
<b>Figura 14.</b> Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 3. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3. ....	26
<b>Figura 15.</b> Análisis de componentes principales de los elementos químicos detectados en los espeleotemas muestreados. P1=puntos 1, P2= puntos 2, P3= puntos 3. Las fechas representan los elementos químicos por los cuales están más relacionados o regidos cada punto. ....	27



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Ubicación de las tres cavernas escogidas como zona de estudio. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Cantidades de medio de cultivo empleado para la siembra de bacterias y hongos.....	11
<b>Tabla 3.</b> Cantidades de medio líquido empleados para la siembra de colonias microbianas.....	13
<b>Tabla 4.</b> Puntuaciones de índices de diversidad basadas en el análisis morfológico ....	20
<b>Tabla 5.</b> Identificación genética de aislados bacterianos de la superficie de espeleotemas.....	20
<b>Tabla 6.</b> Identificación genética de aislados fúngicos de la superficie de espeleotemas .....	21
<b>Tabla 7.</b> Morfotipos microbianos aislados de espeleotemas en cavernas kársticas agrupados por puntos: P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3. Las especies marcadas en negro se asocian con la precipitación de carbonato de calcio.....	28
<b>Tabla 8.</b> Cuadro comparativo de los resultados obtenidos sobre UFC microbianas asociadas a superficies de espeleotemas con estudios anteriores....	29

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Análisis morfológico de las colonias bacterianas aisladas de las superficies de espeleotemas de cavernas kársticas. C=caverna, A= aislado, B=bacteria.....	44
<b>Anexo 2.</b> Análisis morfológico de colonias fúngicas aisladas de la superficie de espeleotemas de cavernas kársticas. C=caverna, A= aislado, H= hongo. ....	45

## Resumen

Los microorganismos colonizan y prosperan en la mayoría de ecosistemas a nivel global, incluso aquellos en condiciones extremas como las cavernas. Modificar internamente estos ambientes subterráneos es su función geomicrobiológica principal, porque favorecen la formación de espeleotemas al promover la precipitación de carbonato de calcio. En esta investigación se describe por primera vez las comunidades bacterianas y fúngicas cultivables asociadas a espeleotemas de tres cavernas kársticas de la Amazonía ecuatoriana; con el fin de comprender su relación con la composición química de los espeleotemas. Para ello, se aisló bacterias y hongos cultivables y se secuenció su ADN genómico; además se determinó la composición elemental de los espeleotemas empleando fluorescencia de rayos X. En el contexto microbiológico, los resultados mostraron la prevalencia de los filos bacterianos Firmicutes (75%) y Proteobacteria (25%) y de los filos fúngicos Ascomycota (66.7%) y Basidiomycota (33.3%). Se aisló 3 especies bacterianas asociadas a la precipitación de carbonato de calcio: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus fusiformis*. En el contexto geoquímico, se cuantificaron hasta 24 elementos químicos en todos los espeleotemas, los cuales están dominados por el mineral calcita, aragonita y alto contenido de minerales arcillosos y oxihidróxidos; deducido a través de su concentración elemental. En el contexto geomicrobiológico, la similitud de la composición química de los espeleotemas del punto 3 de todas las cavernas sería clave para el desarrollo de bacterias biomineralizantes que influenciarían la formación de los minerales presentes en los espeleotemas. Con estos resultados, se contribuye a la comprensión de las interacciones microorganismo-espeleotema e imitación de rutas metabólicas específicas para desarrollar tecnologías de alto impacto como biocemento producido a través de la precipitación de carbonato microbiano.

**Palabras clave:** bacterias, hongos, geoquímica, espeleotemas, cavernas kársticas.

## Abstract

Microorganisms colonize most ecosystems globally, even those in extreme conditions such as caves. Internally, microorganism modifying subterranean environments as the main geomicrobiological function, because favor the formation of speleothems by promoting the precipitation of calcium carbonate. This research describes for the first time, the cultivable bacterial and fungal communities associated with speleothems from three karst caves in the Ecuadorian Amazon; in order to understand its relationship with the chemical composition of speleothems. To do this, the genomic DNA of bacteria and fungi was isolated and sequenced; in addition, the elemental composition of the speleothems was determined using X-ray fluorescence. In the microbiological context, the results showed the prevalence of the bacterial phyla Firmicutes (75%) and Proteobacteria (25%) and the fungal phyla Ascomycota (66.7%) and Basidiomycota (33.3%). Three bacterial species associated with calcium carbonate precipitation were isolated: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* and *Lysinibacillus fusiformis*. In the geochemical context, up to 24 chemical elements were quantified in all the speleothems, which are dominated by the mineral calcite, aragonite, clay minerals and oxyhydroxides; deduced through its elemental concentration. In the geomicrobiological context, the similarity of the chemical composition of the speleothems of point 3 of all the caves would be key for the development of biomineralizing bacteria that would influence the formation of the minerals present in the speleothems. These results contribute to the understanding microorganism-speleothem interactions and imitation of specific metabolic pathways to develop high-impact technologies such as biocement produced through microbial carbonate precipitation

**Key words:** bacteria, fungi, geochemistry, speleothems, karstics caves

## CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Antecedentes

La Geomicrobiología examina el rol de los microorganismos en los procesos geológicos [1]. Algunos microorganismos como bacterias, hongos, algas y protozoos actúan como agentes geoquímicos al favorecer la disolución y formación de rocas, la transformación de suelo y sedimentos, la acumulación de combustibles fósiles, la génesis y la biomineralización [1,2]. La biomineralización consiste en la formación de minerales por precipitación y nucleación de cristales, sea intra o extracelular. Un ejemplo relevante de este proceso es la precipitación de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) impulsada por microorganismos, sean bacterias u hongos, en ambientes naturales subterráneos como las cavernas [2,3].

Estudios demuestran que los microorganismos quimiolitótrofos de cavernas participan en los ciclos biogeoquímicos al fijar dióxido de carbono, nitrógeno o transformar azufre[4–6]. Sin embargo, su función geomicrobiológica principal en estos ambientes subterráneos es modificar las superficies rocosas internas al provocar el depósito de ferromanganeso en las paredes a través de la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  o la formación de espeleotemas al promover la precipitación de  $\text{CaCO}_3$  [7,8]. Durante la precipitación, pueden ocurrir varias vías metabólicas microbianas que incluye ureólisis, desnitrificación, amonificación, oxidación del metano y reducción de sulfato. Por ejemplo, bacterias ureolíticas o reductoras de sulfuro secretan productos metabólicos como iones carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) que al reaccionar con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio ambiente, precipita en forma de  $\text{CaCO}_3$  [3,9]. Un segundo mecanismo que induce la formación de  $\text{CaCO}_3$ , es la regulación de entrada y salida de calcio, en las bacterias, a través de los canales de proteínas y bombas dependientes de ATP antiportador de calcio. Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  provenientes de las bacterias en presencia de  $\text{CO}_3^{2-}$  inducen la formación de  $\text{CaCO}_3$  (calcita) [10].

Se ha demostrado que las células microbianas precipitan minerales polimorfos de carbonato como la calcita, aragonito o vaterita al actuar como sitios de nucleación; siendo este un tercer mecanismo de formación de minerales carbonáticos. [3,11]. Esto ocurre porque las superficies o paredes celulares de los microorganismos albergan

grupos exopoliméricos o sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Los Grupos funcionales exopoliméricos (carboxilo, hidroxilo, aminas, amidas y fosfonatos) generalmente se cargan negativamente y actúan enlazando cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), resultando en sitios de nucleación ideales [12]. En las bacterias, por ejemplo, después de la unión del catión, este reacciona con aniones como el carbonato para formar carbonato de calcio en forma insoluble [9]. Los hongos por su parte, favorecen la deposición de minerales calcínicos debido a que la quitina, un polímero abundante de sus paredes celulares, adsorben cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  [13]

Minerales como el carbonato de calcio, son abundantes dentro de cavernas y dan lugar a morfologías kársticas como los espeleotemas. Los espeleotemas son depósitos de  $\text{CaCO}_3$  en forma de estalactitas, estalagmitas, leches de luna, banderas, coladas y otros provenientes de la disolución de las rocas calizas al contacto con agua acidificada [14]. Aunque la formación de espeleotemas se ha considerado como un proceso abiogénico durante mucho tiempo, se ha reportado que los microorganismos desempeñan un papel importante durante su crecimiento [15]. Estos depósitos carbonáticos albergan un diverso microbioma, haciéndoles atractivos para la biospección.

Bacterias y hongos son algunos de los organismos más dominantes en las cavernas. Varios estudios reportan a Actinobacterias, Proteobacterias, Firmicutes y *Streptomyces* como las comunidades bacterianas más frecuentes en espeleotemas [10,16,17]. *Streptomyces*, junto con Actinobacterias, promueven la formación de redes de filamentos en la estructura interna del espeleotema leche de luna [18]. [17] aislaron de este espeleotema una nueva especie de *Streptomyces*; considerada como fuente valiosa de compuestos bioactivos debido a su prolífico metabolismo secundario. A la vez, se aislaron Actinobacterias productoras de antibióticos [15] y nuevas cepas con potencial para la producción de compuestos naturales [19]. En cuevas alrededor del mundo se han registrado 1029 especies (518 géneros) de hongos, mohos y levaduras pertenecientes a la división Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota [20]. Estudios reportan al género *Aspergillus* y *Penicillium* como las comunidades fúngicas más dominantes en las superficies de espeleotemas [21,22].

Además de la diversidad microbiana en depósitos minerales de cavernas, su composición química juega un determinante papel. Estos depósitos carbonáticos como los espeleotemas, pueden ser caracterizados geoquímicamente empleando espectroscopia de fluorescencia de rayos X como una alternativa no destructiva, económica y rápida a las técnicas convencionales de espectrometría de masas; obteniéndose resultados satisfactorios [23]. Conocer la geoquímica de los espeleotemas facilita la comprensión de su composición mineral para encontrar relaciones geomicrobiológicas y biogeoquímicas.

Las formaciones geológicas como las cavernas representan laboratorios geomicrobiológicos naturales para estudiar procesos de biomineralización, y son de diversos tipos: volcánicas, glaciares, de clastos, estructurales o kársticas, cada una con distintas condiciones ambientales y químicas [14]. En Ecuador, se destacan las cavernas kársticas formadas por roca caliza o carbonática [24]. Depósitos significativos de caliza se localizan en las provincias de Guayas y Manabí y varias franjas de carbonatos se encuentran en las provincias de Carchi y Esmeraldas. Sin embargo, es en la cuenca Oriente de Ecuador donde se encuentran los afloramientos más extensos de roca caliza o carbonática; ubicadas específicamente al este de los Andes, en las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago [24]. Esto provoca que las cavernas kársticas sean el tipo más común en la provincia de Napo [14]. Según la Guía Espeleológica de la Provincia de Napo, se han inventariado 35 cavernas kársticas presentes hacia el oeste de la provincia, principalmente en los cantones de Archidona, Tena y parte del cantón Arosemena Tola [14].

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que las cavernas de la provincia de Napo constituyen ecosistemas inexplorados respecto a las comunidades microbianas presentes en ellas, así como su relación con la formación de espeleotemas y su geoquímica, nuestra propuesta investigativa -la primera sobre diversidad microbiana y geoanálisis en cavernas amazónicas- se enfoca en conocer las comunidades microbianas y su relación con la composición química de los espeleotemas.

## 1.2. Planteamiento del problema

Las cavernas albergan una gran diversidad de comunidades microbianas. Estas

comprenden aproximadamente una amplia gama de los filos bacterianos reconocidos, la mitad de los filos de arqueas y eucariotas microbianos. Estos microorganismos desempeñan un rol clave en los ciclos biogeoquímicos e influyen en la formación y acumulación de carbonatos, minerales de rocas sedimentarias y espeleotemas [25].

Las comunidades microbianas no colonizan simplemente de forma pasiva los hábitats extremófilos del subsuelo, como los espeleotemas, sino que ejercen un efecto significativo sobre su litología y geoquímica, convirtiéndose en responsables de las propiedades físicas y químicas de sus hábitats. Sin embargo, las funciones geomicrobianas y biogeoquímicas de los microorganismos en cavernas kársticas es poco conocida, incluso nula en ecosistemas kársticos amazónicos ecuatorianos [26–28]. Esto provoca que el avance de las ciencias Bioespeleológicas en el Ecuador sea muy lento. La presente investigación busca aportar al progreso de la Espeleología en la provincia de Napo al revelar la diversidad microbiana cultivable del hábitat kárstico amazónico para comprender su rol biogeoquímico en este tipo de ecosistemas, basados en sus características funcionales y la bioprospección de las comunidades microbianas.

### 1.3. Justificación de la investigación

En Ecuador, la zona kárstica está alojada casi exclusivamente dentro de la secuencia carbonática de la Formación Napo, la cual consiste en secuencias cíclicas de rocas calizas, lodolitas y areniscas, depositadas en una plataforma marina entre el Albiano y el Campaniano [24]. Los depósitos de roca carbonática más extensos se encuentran en la Cuenca del Oriente alrededor de las localidades de Loreto, Archidona, y Tena; esto permite que las cavernas kársticas sean las más comunes en la provincia de Napo [14].

Las cavernas amazónicas kársticas, prácticamente inexploradas, representan una fuente ideal para descubrir y estudiar la diversidad microbiana asociada a espeleotemas y su metabolismo en condiciones oligotróficas no fotosintéticas; apuntando a revelar nuevo conocimiento en sus rutas metabólicas y en los ciclos biogeoquímicos. Conociendo el rol ecológico de las bacterias y hongos en estos ambientes inhóspitos, nos acercamos más a comprender las interacciones microorganismo-formación mineral, teniendo en cuenta sus funcionalidades (meteorización, ureólisis o reducción de

sulfato), para desarrollar tecnologías de alto impacto, en especial, biocemento producido a través de la precipitación de carbonato de calcio inducida por microorganismos (MICP) [29–31]. Actualmente, la tecnología MICP se aplica en: (I) remediación de suelos y agua contaminada por metales pesados, metaloides y cationes; por ejemplo, *Kocuria flava* ha eliminado exitosamente hasta el 97% de cobre con una concentración inicial de 1000mg/L [32]; mientras que *Lysinibacillus sphaericus* eliminó el 99.95% de cadmio [33], (II) bioconsolidación de suelos; por ejemplo, la bacteria ureolítica biomineralizante *Sporosarcina pasteurii* ha mejorado las propiedades mecánicas (rigidez y resistencia al corte), de tres tipos de suelos de grano fino (arcillas y laterita) [34] y ha aumentado significativamente la resistencia [35]. A su vez, MICP se ha empleado como una técnica de refuerzo del suelo en arena de grano fino [36,37], (III) secuestro de CO<sub>2</sub>; por ejemplo, empleando cianobacterias en biorreactores microbianos fotosintéticos es posible secuestrar CO<sub>2</sub> a razón de 33 ton de C/ha/año [38], hasta (IV) hormigón autocurativo; por ejemplo, empleando esporas de *Bacillus sp.* y nutrientes de lactato de calcio se ha desarrollado un concreto de reparación autónomo. Además, MICP ha aumentado significativamente la resistencia a la compresión; uno de los parámetros más importantes que evalúan la calidad del hormigón. [8,39].

Teniendo como base estos argumentos, desentrañar el microbioma cultivable de cavernas kársticas, no solo contribuye al conocimiento de microorganismos asociados a estos ecosistemas vulnerables, a la vez, permite determinar la relación existente entre los patrones microbiológicos que se llevan a cabo en estas condiciones de conjunto con su potencial bioquímico y fisiológico. De esta forma, se sientan las bases para el uso de la funcionalidad microbiana y su bioprospección biotecnológica para establecer procesos sostenibles, tales como biocemento.

#### 1.3.1. Pregunta de investigación

¿Cuáles son las principales comunidades microbianas asociadas a espeleotemas y su relación con la composición química de los mismos?

#### 1.3.2. Hipótesis

La diversidad microbiana encontrada en espeleotemas de caverna en la provincia de Napo influyen en su estructura y composición química, basado en el aporte de los



grupos funcionales presentes en estos ecosistemas.

#### 1.4. Objetivos de la investigación

##### 1.4.1. General

- Determinar las comunidades microbianas en los espeleotemas de cavernas en la provincia de Napo-Ecuador y su relación con la composición química de los mismos.

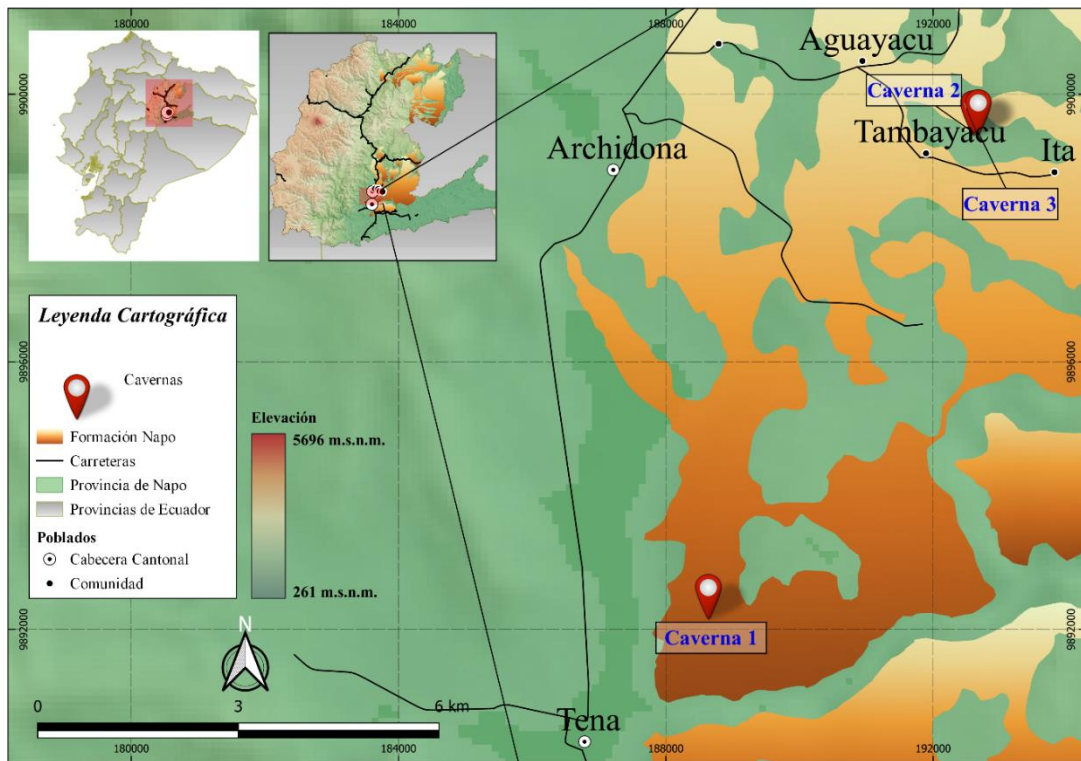
##### 1.4.2. Específicos

- Cuantificar comunidades de bacterias y hongos presentes en muestras de espeleotemas de cavernas de la provincia de Napo-Ecuador.
- Caracterizar morfológicamente e identificar genéticamente las colonias de bacterias y hongos más diversas presentes en muestras de espeleotemas de cavernas de la provincia de Napo-Ecuador.
- Determinar la composición química de espeleotemas muestreados y su relación con los grupos funcionales microbianos hallados en las zonas de estudio.

## **CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO**

### 2.1. Georreferenciación

Se seleccionaron tres cavernas de la cuenca Oriente Amazónica ecuatoriana ubicadas en los cantones de Archidona y Tena, provincia de Napo (Figura 1). La georreferenciación de cada caverna se muestra en la Tabla 1. Los criterios de selección de las cavernas fueron geología, litología, abundancia y diversidad de espeleotemas, buen estado de conservación y ubicación geográfica.



**Figura 1.** Mapa de ubicación de las tres cavernas seleccionadas para el muestreo.

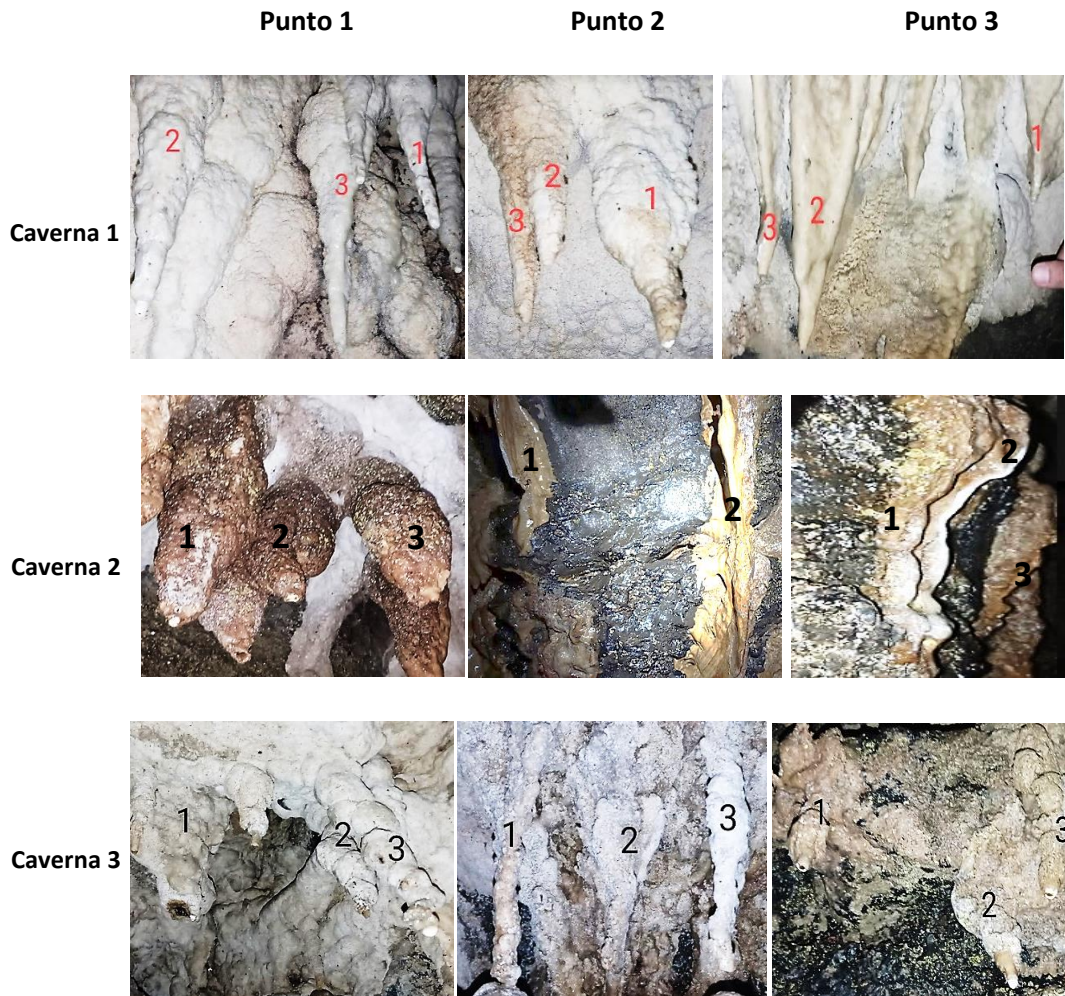
**Tabla 1.** Ubicación de las tres cavernas escogidas como zona de estudio.

<b>Caverna</b>	<b>Coordenadas en UTM</b>	<b>Longitud (m)</b>	<b>Cantón de ubicación</b>
1 (C1)	18 M 188635 9892751	~1000	Tena
2 (C2)	18 M 192599 9899981	~25	Archidona
3 (C3)	18 M 192674 9899996	~500	Archidona

## 2.2. Muestreo de espeleotemas de cavernas kársticas

A lo largo de cada caverna se seleccionó tres puntos de muestreos al azar y en cada punto se escogió tres muestras individuales de estalactitas o banderas que constituyeron una muestra compuesta (Figura 2). Las muestras se tomaron siguiendo la metodología propuesta en [4]. Para la toma de muestra, se raspó directamente sobre el espeleotema con ayuda de un bisturí estéril hasta obtener 1 g. y se depositó en tubos Eppendorf de 2 mL previamente etiquetados. Todas las muestras se recolectaron asépticamente, se conservaron a 4°C durante su transporte hasta el laboratorio de Biología de la Universidad Regional Amazónica Ikiam y se procesaron antes de las 24

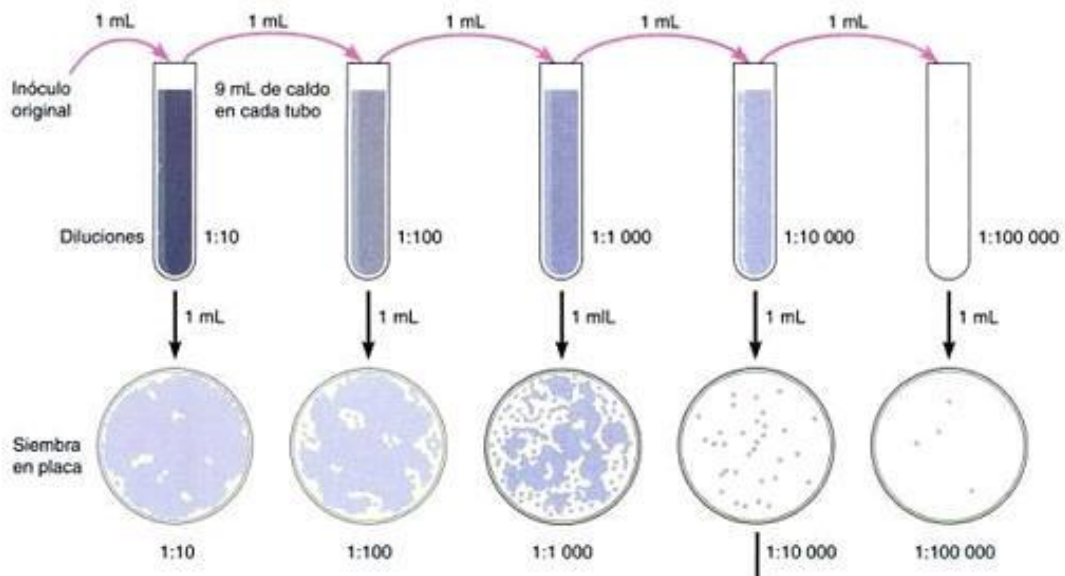
horas de tomadas las muestras. Además, en cada punto de cada caverna se extrajo una muestra de espeleotema para los análisis geoquímicos.



**Figura 2.** Espeleotemas muestreados en los tres puntos de las tres cavernas. La mayoría de espeleotemas muestreados son estalactitas, a excepción del Punto 2 y 3 de la caverna 2 que son espeleotemas banderas.

### 2.3. Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en espeleotemas

Para la cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo de espeleotema de las cavernas muestreadas, se siguió la metodología propuesta por [40], la cual consistió en el método de diluciones seriadas y siembra en placas Petri (Figura 3).



**Figura 3.** Método de diluciones seriadas y siembra en placas Petri.

Para la siembra, por triplicado, se empleó el método de fondo de placa, que consistió en extraer 1 mL de la dilución respectiva ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  para bacterias y  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  para hongos) y depositarlo en la placa Petri, seguido se agregó aproximadamente 20 mL de medio de cultivo (agar nutritivo para bacterias y rosa bengala para hongos). La cantidad empleada de cada medio de cultivo se calculó siguiendo las recomendaciones del fabricante como se muestran en la Tabla 2. Luego de la siembra de las diluciones en placas Petri, estas se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  para bacterias y  $28^{\circ}\text{C}$  para hongos por 7 días.

**Tabla 2.** Cantidades de medio de cultivo empleado para la siembra de bacterias y hongos.

Colonias	Medio de cultivo	Cantidad (g)	Volumen de agua destilada (mL)
Fúngicas	Agar Rosa Bengala	20.48	650
Bacterianas	Agar Nutritivo	18.2	650

Las colonias microbianas fueron contabilizadas durante cuatro intervalos de tiempo de incubación: 24, 48, 72 horas y 7 días. Se construyó una matriz de datos que posteriormente fue utilizada para la cuantificación y cinética de crecimiento microbiano. Para la cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$UFC \text{ g espeleotema} = \frac{\sum N^{\circ} CpP}{\frac{N^{\circ}P}{V}} \times FD$$

Donde:

$N^{\circ}CpP$ : número de colonias por cada placa Petri.

$N^{\circ}P$ : número de placa Petri.

$V$ : volumen inoculado en la placa Petri.

$FD$ : factor de dilución.

Se determinó las diferencias estadísticas de UFC para la cinética y grupos microbianos por cavernas usando el programa IBM SPSS Statistics v.27, utilizándose el análisis de varianza ANOVA y la prueba Tukey con nivel de significación  $p < 0.05$ . En todos los casos se realizaron análisis de homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos empleados.

#### 2.4. Análisis morfológicos y diversidad de colonias microbianas

Los análisis morfológicos de colonias microbianas se evaluaron siguiendo la metodología propuesta por [41] para bacterias y [42] para hongos. Las características morfológicas evaluadas para las colonias bacterianas fueron: color, apariencia, densidad, bordes, elevación y tinción de Gram. Para las colonias de hongos fueron: color, tipo de micelio aéreo y densidad. Los parámetros morfológicos de las colonias, tanto para bacterias como hongos, fueron la base para el cálculo de los índices de diversidad de Simpson (1-D) y Shannon ( $H'$ ) presentes en las muestras de espeleotemas de las cavernas muestreadas.

*Índice de diversidad de Simpson [43]:*

$$1 - D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde:

$p_i$ : proporción de individuos de la especie  $i$ ; representa la probabilidad de que un individuo de la especie  $i$  esté presente en la muestra, siendo entonces la sumatoria de  $p_i$  igual a 1.

$$P_i = \frac{n_i}{N}$$

$n_i$ : número de individuos de la especie  $i$

$N$ : número total de individuos para todas las especies en la comunidad

*Índice de Shannon [44]:*

$$H' = - \sum_{i=1}^S (p_i \cdot \ln p_i)$$

$p_i$ : abundancia proporcional de la  $i$ ésima especie

## 2.5. Identificación molecular de las colonias microbianas

### 2.5.1. Extracción de ADN genómico de colonias de bacterias y hongos

Para la extracción de ADN genómico, primero se aisló las colonias bacterianas y fúngicas en medios de cultivos específicos (ver Tabla 2). Posterior al aislamiento, se obtuvo un total de 17 cepas aisladas de bacterias y 16 aislados de hongos. Todos los aislados microbianos se cultivaron en medio líquido para obtener mayor número celular. La Tabla 3 muestra los medios utilizados para cada grupo microbiano. Luego de la siembra, se incubó las bacterias a 30°C con agitación de 150 rpm y para los hongos a 28°C; ambas durante 7 días. Adicional, de las 16 cepas fúngicas, a 11 cepas se las resembró en 100 mL del mismo medio líquido durante 7 días a 28°C y 250rpm para conseguir mayor masa micelial.

**Tabla 3.** Cantidades de medio líquido empleados para la siembra de colonias microbianas.

Colonias	Medio de cultivo	Cantidad (g)	Volumen de agua destilada (mL)
Fúngicas	Caldo papa dextrosa	10.58	335
Bacterianas	Caldo nutritivo	2.05	85

La extracción de ADN genómico de los 17 aislados bacterianas se realizó empleando el protocolo de aislamiento de ADN genómico para bacterias Gram-negativas del kit de purificación de ADN genómico Wizard de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células bacterias se obtuvieron por centrifugación a 10 000 rpm, las cuales fueron cultivadas para establecer el protocolo de extracción. Posterior a la elución del ADN genómico, este se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop de microvolumen, empleando 2  $\mu$ L por muestra. Además de la cuantificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (0.8 g de agarosa en 50 mL de TBE 1X). Una vez cargados los pocillos del gel de agarosa con 9  $\mu$ L de ADN bacteriano y 1  $\mu$ L de loading dye, se realizó la corrida a 80 V por 20 min y después a 120V por 15 min para la visualización del ADN. El marcador molecular empleado fue de 100 pb.

Para los hongos, los cultivos líquidos se filtraron con gasa estéril en cámara de flujo laminar, de los cuales se pesaron 100 mg de micelio. Posteriormente se maceraron los micelios empleando morteros con nitrógeno líquido y pistilos. El proceso descrito se realizó con 5 cepas fúngicas. Mientras que los 100 mg de micelio requeridos para las 11 cepas restantes fueron filtrados del medio líquido, lavados con 100 mL de NaCl al 0.9% y almacenados en el ultracongelador a -80°C. Finalmente, se liofilizó el micelio durante 7 días para proceder a la extracción y cuantificación de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó empleando el protocolo de aislamiento de ADN fúngico E.Z.N.A de Omega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posterior a la elución del ADN genómico, este se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop de microvolumen, empleando 2 µL por muestra. No se realizó el proceso de electroforesis debido a la falta de insumos.

#### 2.5.2. Secuenciación de aislados bacterianos y fúngicos

Para la secuenciación de los aislados, se envió las muestras de ADN genómico de bacterias y hongos a la empresa GenWiz/AZENTA. En total se secuenciaron 13 y 15 aislados bacterianos y fúngicos, respectivamente. Los primers amplificaron la región V1-V9 del gen bacteriano 16S rRNA para bacterias y la región altamente variable ITS1 e ITS2 para los hongos. Obtenidos los archivos FASTA de las secuencias genómicas, se ensambló las secuencias de los cebadores forward y reserve para obtener secuencias consenso mediante el programa SnapGene.

Para la identificación filogenética de los aislados, se comparó las secuencias consenso con las bases de datos depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), empleando el algoritmo BLASTn. Además, se utilizó el software Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 y Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA versión 7) para los análisis filogenéticos. El método de unión de vecinos cercados disponible en MEGA se empleó para construir los árboles filogenéticos de bacterias y hongos [45,46]

#### 2.6. Análisis químico de espeleotemas

Para la caracterización química composicional de los espeleotemas se empleó el espectrofotómetro portátil de fluorescencia de rayos X marca Bruker-modelo S1 Titan

600 [47]. El equipo, con una resolución de 150 eV, detectó hasta 24 elementos químicos presentes en cada espeleotema, con lo cual se cuantificó los elementos mayoritarios (>1000) y minoritarios (<1000) en parte por millón (ppm). En cada espeleotema se realizó tres mediciones, específicamente sobre el área donde se tomó la muestra para el análisis microbiológico. Para representar los datos, se calculó la media y la desviación estándar de los datos y se empleó el programa R versión 4.1.2.

## 2.7. Análisis de relación entre la microbiología y geoquímica

Para conocer la similitud entre puntos 1, 2 y 3 de las tres cavernas en base a sus concentraciones elementales y relacionar con las cepas asociados a la precipitación de carbonato de calcio aislados en estos puntos, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) empleando el software R. Las concentraciones de elementos químicos que no fueron detectadas por el equipo en todos los puntos o espeleotemas de las tres cavernas, se rellenó con valores iguales a cero. Un valor “cero” no significa que el elemento no esté presente, sino que el elemento se encuentra fuera del límite de detección del equipo empleado.

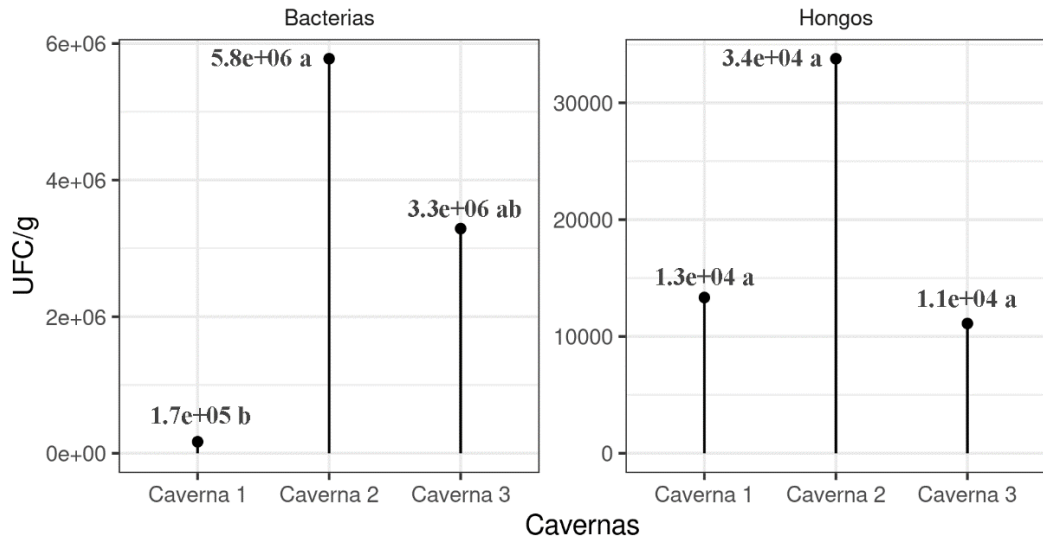
## **CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS**

### 3.1. Análisis microbiológico de espeleotemas

#### 3.1.1. Cuantificación y cinética de crecimiento microbiano

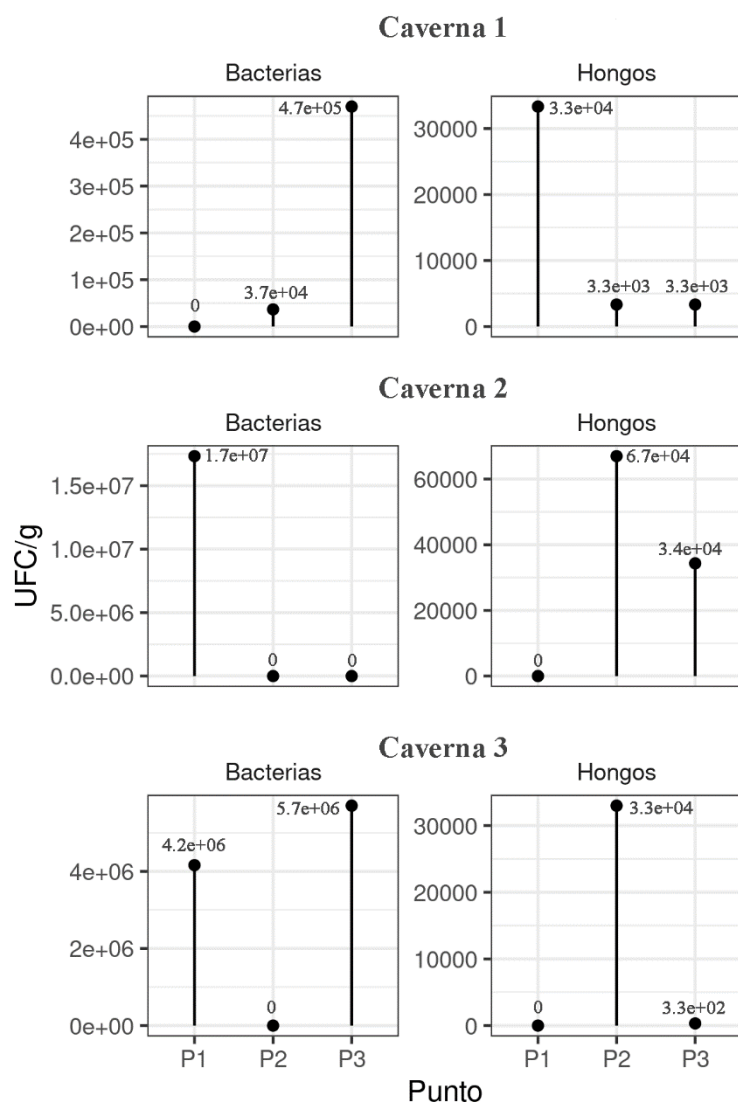
La cuantificación de bacterias y hongos cultivables en los espeleotemas muestreados por cada una de las cavernas, evidenció la presencia de ambos grupos microbianos en estos ecosistemas de la provincia de Napo. La Figura 4 muestra como las UFC promedio de bacterias son más abundantes en la caverna 2 ( $5.8 \times 10^6$ ) en comparación con la caverna 3 y 1 con diferencias significativas. Para hongos, se observa un patrón similar, pero no se evidenció diferencias significativas. Además, se encuentra una diferencia mayor al 92% de incremento de bacterias con respecto a hongos en las tres cavernas; es decir, el promedio de UFC de bacterias en todas las cavernas evaluadas supera significativamente la cantidad de hongos encontrados.





**Figura 4.** Cuantificación UFC promedio de bacterias y hongos en las cavernas muestreadas. Letras desiguales en las columnas difieren para  $p < 0.05$  por Tukey HSD.

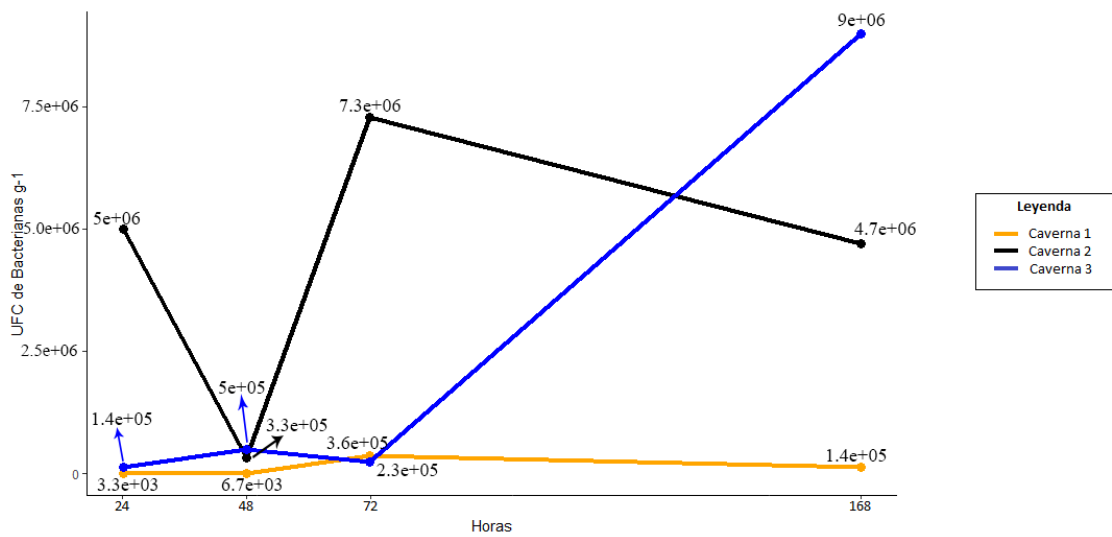
Curiosamente, cuando se cuantificó las UFC g de espeleotemas<sup>-1</sup> de un mismo punto de cada caverna, se descubrió una alta abundancia de comunidades bacterianas, contrastante con una baja o nula abundancia de comunidades fúngicas en ese mismo punto y viceversa. Cuando coexisten ambos grupos microbianos en los espeleotemas de un mismo punto, las UFC son bajas (Figura 5).



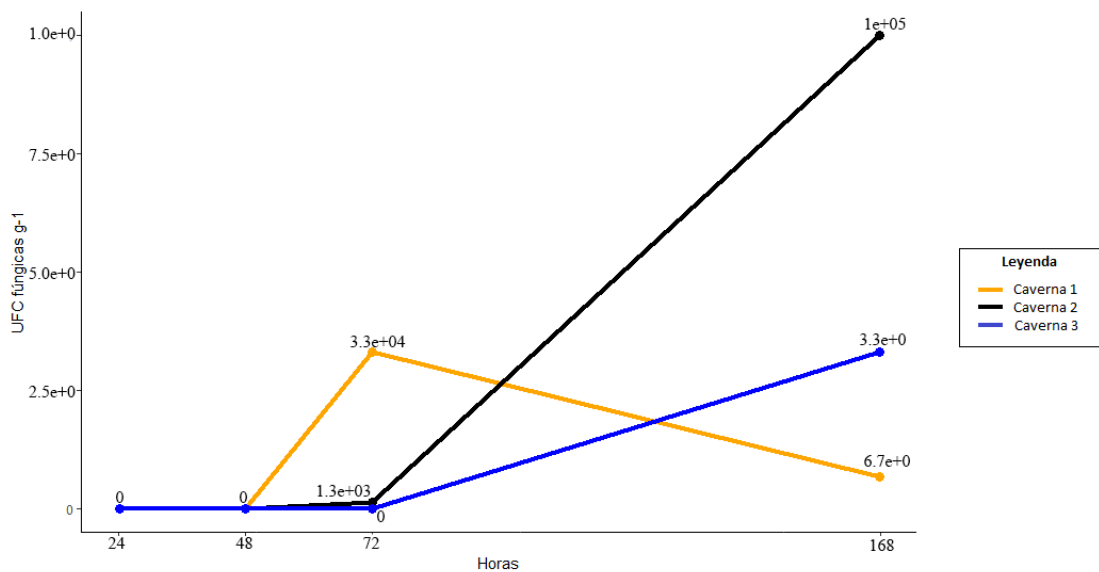
**Figura 5.** Abundancia de bacterias y hongos (UFC g de espeleotemas<sup>-1</sup>) en los puntos 1 (P1), 2 (P2) y 3 (P3) de la Caverna 1 (C1), Caverna 2 (C2) y Caverna 3 (C3). Cada punto representa un grupo de 3 espeleotemas muestreados.

Las Figuras 6 y 7 muestran la cinética del crecimiento de bacterias y hongos en los tiempos evaluados. Aunque la diferencia de las UFC a las 24 horas, 72 horas y 7 días para bacterias fue marcada, no existieron diferencias significativas entre las cavernas (Figura 6). De igual forma se observa a las 72 horas y 7 días para la cinética de crecimiento de los hongos (Figura 7). Adicionalmente, se destaca la variabilidad del comportamiento de las colonias entre cavernas respecto a la curva de crecimiento en el tiempo. El número de colonias obtenidas en la Caverna 1 fue homogénea, siendo la de menores valores en comparación con la Caverna 2 (máximos valores) y la 3, destacándose esta última como la mayor cantidad de UFC a los 7 días de cultivo (Figura 6). Para los hongos se observa

un lento crecimiento de las colonias, así como la diferencia en los patrones de crecimiento entre cavernas.



**Figura 6.** Cinética del crecimiento bacterias asociadas a espeleotemas de cavernas muestreadas. No se obtienen diferencias significativas por Tukey HSD  $p < 0.05$ .



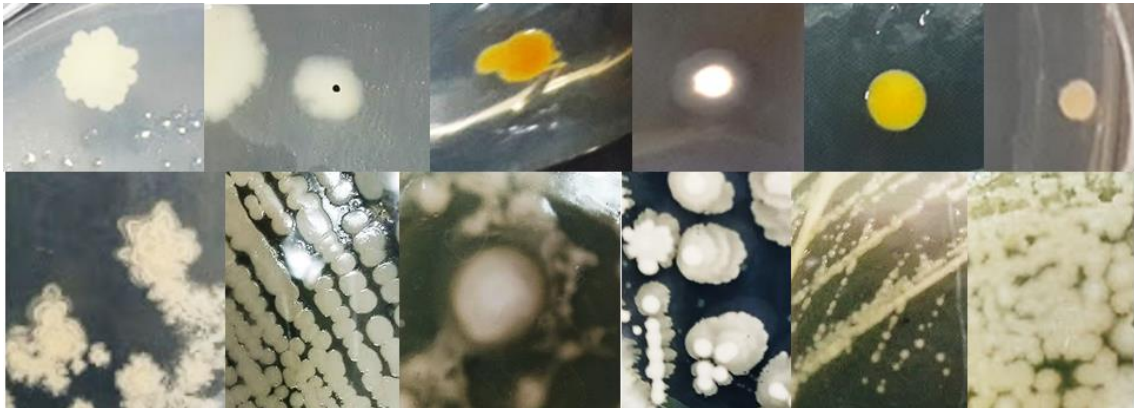
**Figura 7.** Cinética del crecimiento hongos asociados a espeleotemas de cavernas muestreadas. No se obtienen diferencias significativas por Tukey HSD  $p < 0.05$ .

### 3.1.2. Análisis morfológico y diversidad microbiana

El análisis morfológico reveló que las colonias bacterianas se agrupan principalmente en dos tipos de apariencia: irregulares de color beige y circulares de diversos colores (Anexo 1). Se encontró que la mayoría de colonias bacterianas (82.4%) son gram-positivas (Anexo 1). Por su parte, las colonias fúngicas se agrupan en dos tipos

de micelio: floculoso y algodonoso de diversos colores (Anexo 2). Algunos aislados bacterianos y fúngicos cultivables de espeleotemas provenientes de cavernas kársticas se muestran en la Figura 8 y 9.

Las características morfológicas de los aislados de bacterias y hongos descritas previamente, fueron la base para el cálculo del índice de diversidad de Simpson (1-D) y Shannon (H'). Estos índices mostraron que los espeleotemas de la caverna 3 albergan las comunidades bacterianas más diversas (1-D= 0.74 y H'= 2.51), seguidas por los espeleotemas de la caverna 1 y caverna 2 (Tabla 4). En cuanto a las comunidades fúngicas, la mayor diversidad se encuentra en los espeleotemas de la caverna 1, seguida de la caverna 2 y la 3 (Tabla 4).



**Figura 8.** Características morfológicas de los aislados bacterianos de la superficie de espeleotemas



**Figura 9.** Características morfológicas de los aislados fúngicos de la superficie de espeleotemas.

**Tabla 4.** Puntuaciones de índices de diversidad basadas en el análisis morfológico

	Índices	Caverna-1	Caverna-2	Caverna-3
Bacterias	Simpson (1-D)	0.61	0.46	<b>0.74</b>
	Shannon (H')	1.75	0.95	<b>2.51</b>
Hongos	Simpson (1-D)	<b>0.75</b>	0.65	0.82
	Shannon (H')	<b>2</b>	1.89	1.27

### 3.1.3. Identificación molecular de las cepas microbianas

Se obtuvieron 24 secuencias consenso de un total de 28 cepas secuenciadas. Tres secuencias (una de bacterias y tres de hongos) no pudieron ser ensambladas con los primers forward y reverse. El uso de la herramienta BLASTn para conocer la identidad de los aislados bacterianos y fúngicos arrojó porcentajes de identidad mayores al 98% en la mayoría de las secuencias analizadas (Tabla 5 y Tabla 6). Para los aislados bacterianos, 75% pertenecen al filo Firmutes y el resto (25%) al filo Proteobacteria. De los 12 aislados secuenciados, ocho pertenecen al género *Bacillus* y uno a los géneros *Lysinbacillus*, *Caulobacter*, *Aminobacter* y *Lysobacter*, respectivamente. Las especies de cepas bacterianas identificadas se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Identificación genética de aislados bacterianos de la superficie de espeleotemas

Código	Identificación	Filo	% identidad	N° Acceso
C1P2B1	<i>Bacillus xiamenensis</i>	Firmicutes	100	<a href="#">MK129312.1</a>
C1P3B1	<i>Lysinbacillus fusiformis</i>	Firmicutes	99.91	<a href="#">MF784478.1</a>
C1P3B2	<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	99.15	<a href="#">MK564699.1</a>
C1P3B3	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	99.43	<a href="#">MT378166.1</a>
C2P1B1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Firmicutes	99.75	<a href="#">CP042252.1</a>
C3P1B1	<i>Bacillus xiamenensis</i>	Firmicutes	99.92	<a href="#">MK129312.1</a>
C3P3B1	<i>Caulobacter sp.</i>	Proteobacteria	99.83	<a href="#">JN609445.2</a>
C3P3B2	<i>Bacillus altitudinis</i>	Firmicutes	99.91	<a href="#">MK521064.1</a>
C3P3B3	<i>Aminobacter carboxidus</i>	Proteobacteria	99.92	<a href="#">MT525237.1</a>
C3P3B4	<i>Bacillus xiamenensis</i>	Firmicutes	99.85	<a href="#">MT186232.1</a>

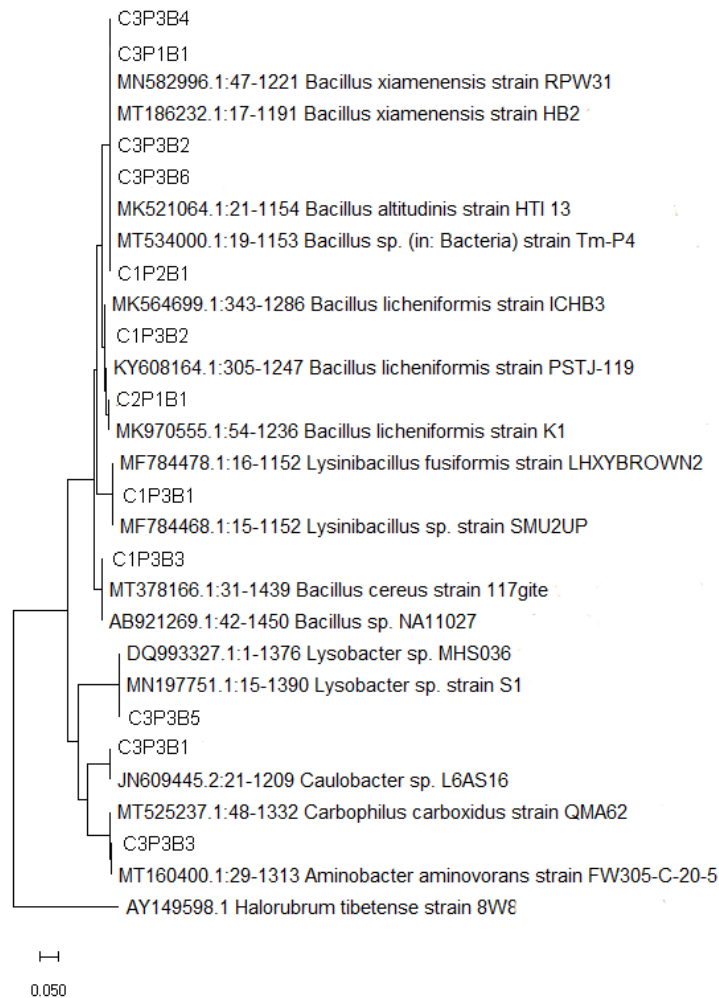
C3P3B5	<i>Lysobacter sp.</i>	Proteobacteria	99.49	<a href="#">DQ993327.1</a>
C3P3B6	<i>Bacillus xiamenensis</i>	Firmicutes	99.91	<a href="#">MT186232.1</a>

Para los aislados fúngicos, el 66.7% forman parte del filo Ascomycota y 33.3% del filo Basidiomycota. De los doce aislados fúngicos secuenciados tres pertenecen al género *Cladosporium* y *Aspergillus* y uno a los géneros *Penicillium*, *Coprenillus*, *Eutipa*, *Tinctoporellus*, *Nemania* y *Scopuloides*, respectivamente. Dos de los aislados correspondientes a los dos últimos géneros mencionados (C3P1H1 y C3P3H2), presentan porcentajes de identidad menores al 97%, por lo que podrían corresponder a dos nuevas especies. Las especies de cepas fúngicas identificadas se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Identificación genética de aislados fúngicos de la superficie de espeleotemas

Código	Identificación	Filo	% identidad	N° Acceso
C1P1H1	<i>Penicillium brevisimum</i>	Ascomycota	100	<a href="#">JX841249.1</a>
C1P1H2	<i>Aspergillus austrafricanus</i>	Ascomycota	100	<a href="#">OL711848.1</a>
C2P2H1	<i>Cladosporium halotolerans</i>	Ascomycota	100	<a href="#">MT875274. 1</a>
C2P2H2	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	Basidiomycota	99.50	<a href="#">KY948721.1</a>
C2P2H3	<i>Cladosporium halotolerans</i>	Ascomycota	100	<a href="#">MT529175. 1</a>
C2P3H1	<i>Aspergillus austrafricanus</i>	Ascomycota	98.95	<a href="#">OL711848.1</a>
C2P3H2	<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycota	100	<a href="#">MT588793. 1</a>
C3P1H1	<i>Nemania abortive</i>	Ascomycota	96.40	<a href="#">NR_121350. 1</a>
C3P1H2	<i>Cladosporium halotolerans</i>	Ascomycota	100	<a href="#">MT875274. 1</a>
C3P2H1	<i>Eutipa scoparia</i>	Basidiomycota	98.49	<a href="#">MW132061 .1</a>
C3P3H1	<i>Coprenillus disseminates</i>	Basidiomycota	99.70	<a href="#">MK843946. 1</a>
C3P3H2	<i>Scopuloides dimorpha</i>	Basidiomycota	96.69	<a href="#">MZ637083. 1</a>

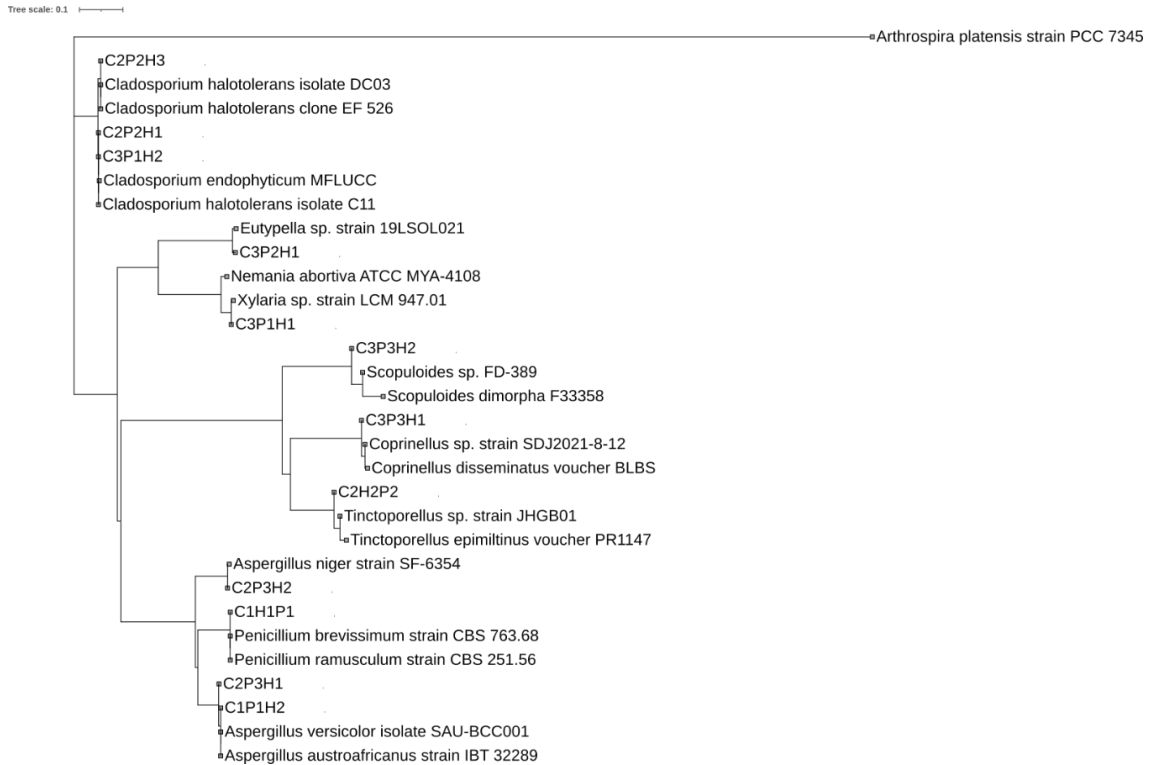
El análisis filogenético de las cepas bacterianas aisladas de cavernas kársticas amazónica reveló que se agrupan en 2 grandes clados. El clado 1 abarca las cepas C3P3B4, C3P1B1, C3P3B2, C3P3B6, C1P2B1, C1P3B2, C2P1B1, C2P1B1 y C1P3B3 y confirma su parentesco con los géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus*. Las cepas restantes C3P3B5, C3P3B1 y C3P3B3 se emparentan con los géneros *Lysobacter*, *Caulobacter* y *Aminobacter* (Figura 10).



**Figura 10.** Árbol filogenético bacteriano de vecinos cercanos. Se observan 2 clados importantes. *Halorubrum tibetense* se usó como outgroup.

Por su parte, el análisis filogenético de las cepas fúngicas aisladas de cavernas kársticas amazónica reveló que se agrupan en 3 grandes clados. El clado 1 abarca las cepas: C2H2P3, C2P2H1, C3P1H2 relacionadas con el género *Cladosporium*. El clado 2

abarca las cepas C3P2H1, C3P1H1 emparentadas con los géneros *Eutypella* y *Nemania*. En el último clado se agrupan (en dos subclados) las cepas C3P3H2, C3H3P1, C2P2H2, C2P3H2, C1P1H1, C2P3H1 y C1P1H2 con los géneros *Scopuloides*, *Coprinellus*, *Tinctoporellus* y *Penicillium*. (Figura 11).



**Figura 11.** Árbol filogenético fúngico de vecinos cercanos. Se observan 3 clados importantes. *Arthrospira platensis* se usó como outgroup.

### 3.2. Análisis geoquímicos de espeleotemas

Los resultados de la cuantificación de elementos mayoritarios y minoritarios o trazas están basados en la repetitividad de la medición. La medida de concentración elemental se realizó por triplicado en el área de cada espeleotema muestreado. El análisis estadístico de los datos refleja una baja variabilidad y dispersión en las mediciones de cada espeleotema; por lo tanto, los valores bajos de la desviación estándar obtenidos demuestran que los resultados son representativos. Para los elementos mayoritarios el valor promedio de la desviación estándar constituye entre el 4-10% del total de la muestra. Se exceptuaron metales como Ba, Pb o Sb donde la desviación estándar es alta (50-70%), pudiendo estar relacionada a la sensibilidad del equipo para detectar estos metales en las concentraciones que se encuentran. A su vez, la caracterización geoquímica de los espeleotemas revela una similitud en sus

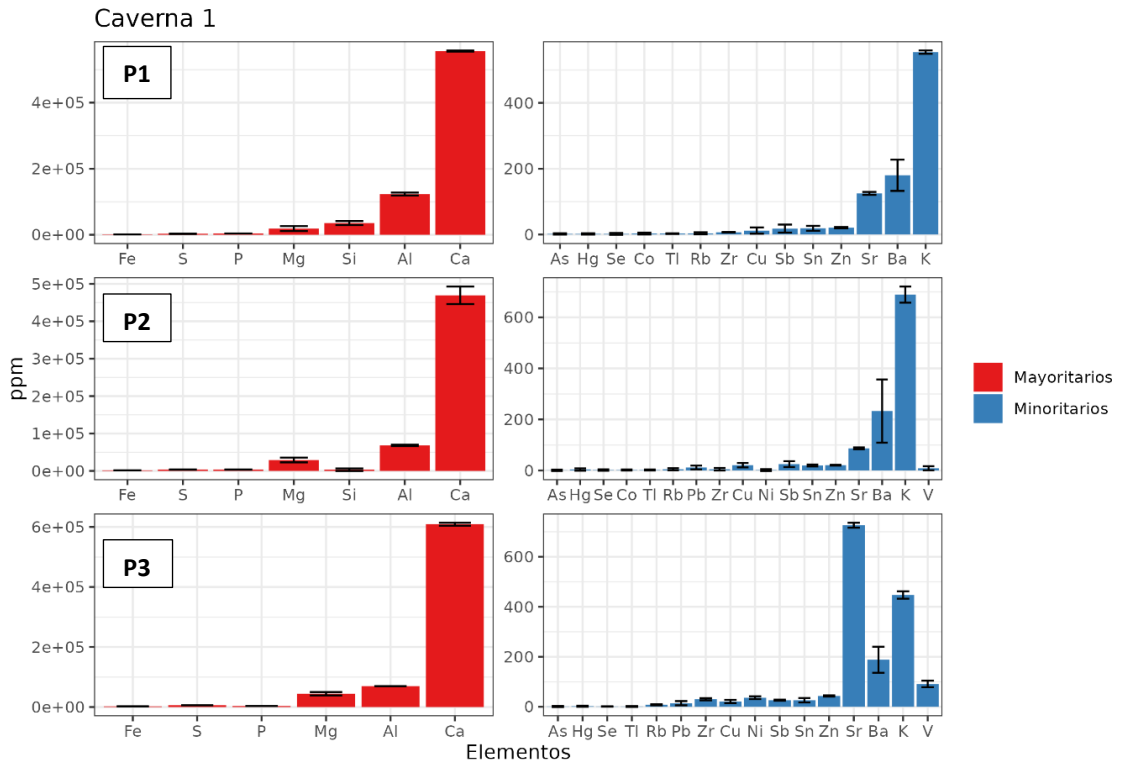


concentraciones elementales, donde la proporción relativa de concentración entre espeleotemas de las 3 cavernas parece ser siempre la misma en los elementos mayoritarios. Como se esperaba, el Calcio (Ca) es el elemento más abundante. Por otro lado, la proporción relativa de los elementos minoritarios no es conservada, pero se puede distinguir un patrón de concentración.

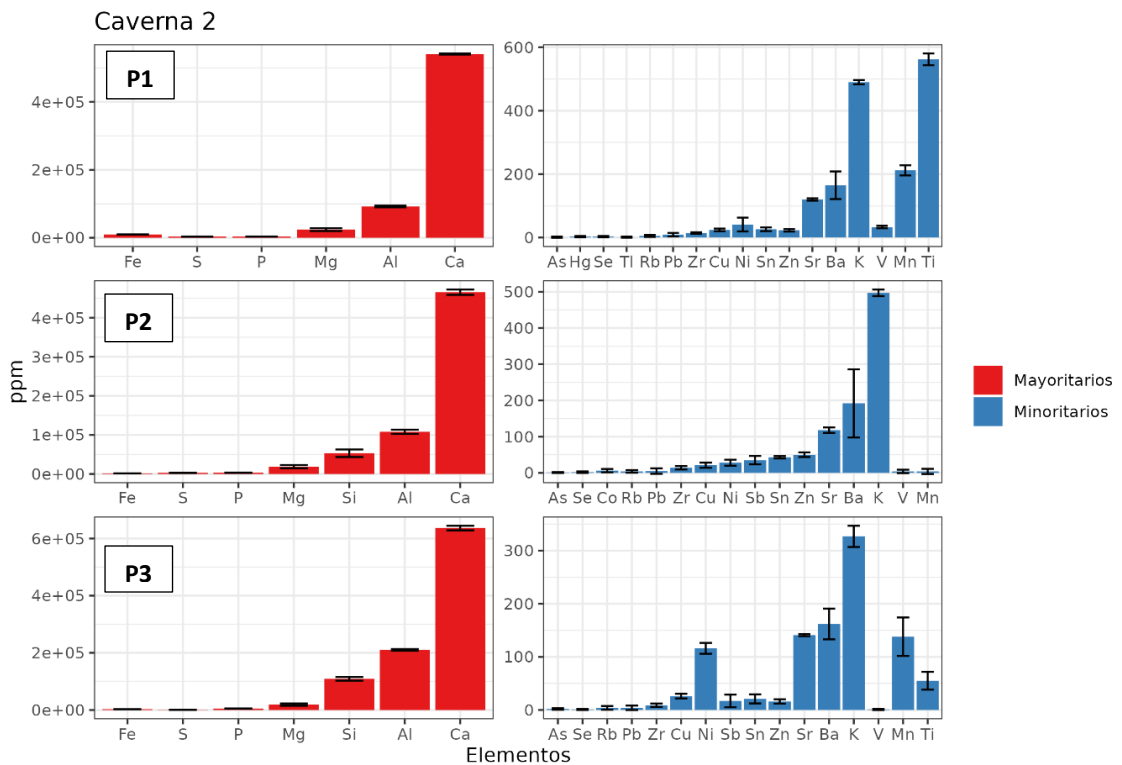
Mediante el análisis por espectrometría de fluorescencia de rayos X se logró cuantificar hasta 24 elementos químicos, de los cuales siete (Ca, Al, Mg, P, S, Si, Fe) se presentan en concentraciones mayoritarias (>1000ppm) y representan ~99.74% de toda la muestra. Los 15-17 elementos restantes (K, Ba, Sr, Sb, Cu, Zn, Sn, Pb, V, Rb, Zr, Hg, Co, Ni, Se, Tl, As) se presentan en concentraciones minoritarias o trazas (<1000ppm) y representan ~0.26% del total. Las concentraciones de elementos metálicos en los tres puntos (P1, P2, P3) de cada caverna se muestran en las Figuras 12, 13 y 14.

La jerarquía de concentración de elementos mayoritarios en los diferentes espeleotemas de las 3 cavernas tiende a ser: Ca>Al>Si>Mg>P>S>Fe; mientras que la jerarquía de concentración de elementos minoritarios o trazas en los espeleotemas de las 3 cavernas tiende a ser: K>Ba>Sr>Zn>Sn>Sb>Ni>Cu>Zr>Pb>Rb>Se>Hg>As con variaciones en los elementos Sr, Ti, Mn, K.

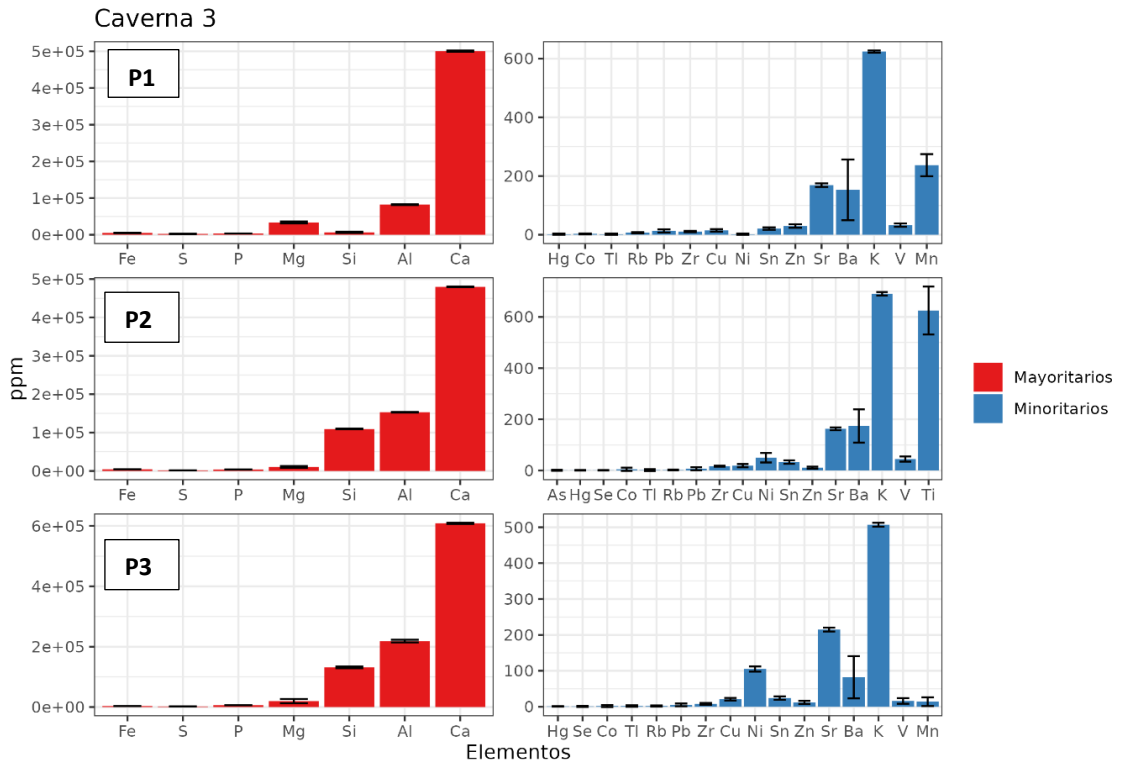
Es importante mencionar que metales pesados como Hg o As no fueron detectados en al menos 2 puntos de muestreo de la caverna 2 (P2 y P3) y de la caverna 3 (P1 y P3). Se destaca la mayor concentración de Sr en comparación con K en el P3 la caverna 1 (Figura 12) mientras que las concentraciones de Sr o Ba se ven superadas por Ti y Mn en el P1 de las cavernas 2 y 3 (Figura 13 y Figura 14), incluso la concentración de Ti es mayor al K en el P1 de la caverna 2 (Figura 13). Curiosamente, sólo la caverna 1 no presenta niveles detectables de Ti o Mn (Figura 12).



**Figura 12.** Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 1. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3.



**Figura 13.** Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 2. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3.

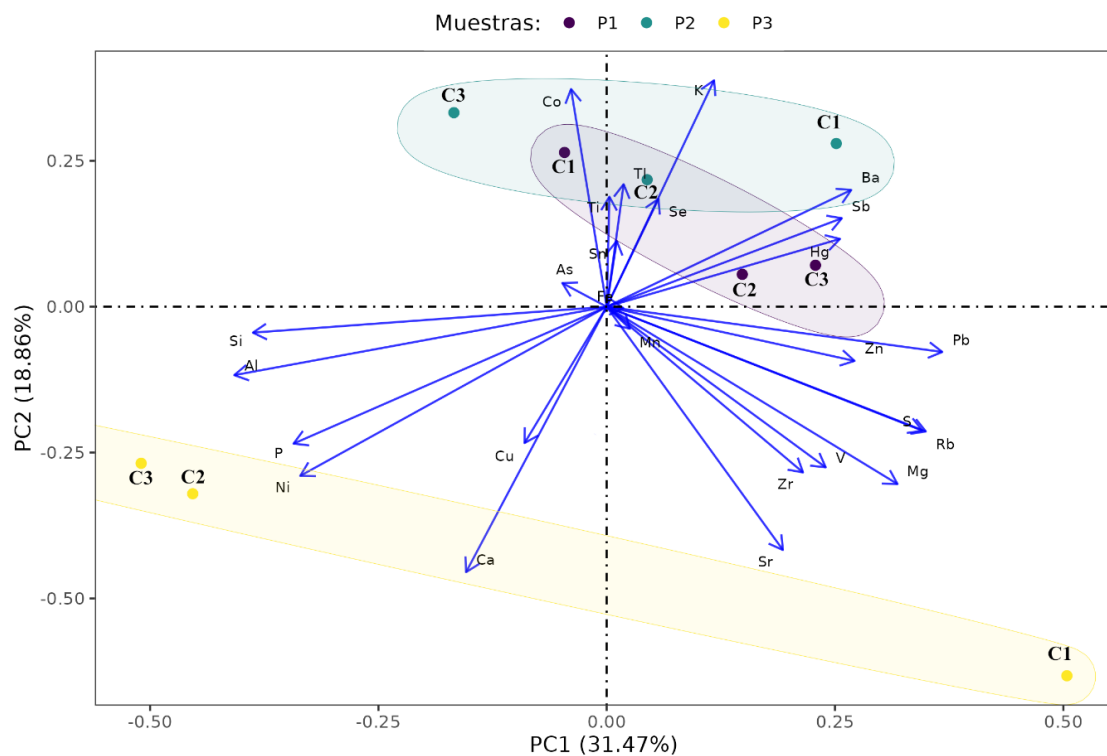


**Figura 14.** Concentración en partes por millón (ppm) de elementos mayoritarios y minoritarios en los 3 puntos de la caverna 3. P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3.

3.3. Relación entre las comunidades microbianas y geoquímica de los espeleotemas

En esta sección hacemos un análisis exploratorio de componentes principales (ACP) para identificar las relaciones entre las concentraciones elementales de los espeleotemas analizados y las cepas bacterianas aisladas que previamente se han informado como biomineralizantes de carbonato de calcio. No exploramos información sobre las cepas fúngicas aisladas en esta investigación porque hasta donde se conoce no se han informado previamente como biomineralizantes de carbonato de calcio. Las dos primeras componentes del ACP (PC1 y PC2) explican el 50,33% de la variación de los datos, por lo que se han utilizado solo estas dos para buscar agrupaciones o clúster. A través de estos componentes, se logra distinguir patrones que diferencian los puntos 1,2 y 3 de las cavernas muestreadas. Estos patrones revelan que los puntos (o espeleotemas) 1 y 2 de las tres cavernas presentan similitudes en la composición química de elementos minoritarios, tales como: Co, Ba, Sb y Hg, los cuales son los mayores contribuidores de los componentes principales 1 y 2 en los espeleotemas analizados (Figura 15). En estos espeleotemas se logró aislar 1 especie bacteriana

biomineralizante. Los puntos 3 muestran otro agrupamiento, evidenciando diferencias significativas en las composicionales elementales con respecto a los puntos 1 y 2. En este caso, los puntos 3 de la caverna tres (C3) y dos (C2), muestran similitudes en la composición química de elementos mayoritarios, tales como: P, Ca, Al y Si y en elementos minoritarios, tales como: Ni y Cu, siendo todos estos los principales contribuidores de los componentes principales 1 y 2 (Figura 15). Finalmente, el punto 3 de la caverna 1 (C1) se muestra separado de los agrupamientos antes descritos y pareciera que los contribuidores principales de este agrupamiento son el Sr, Mg, Rb y Pb (Figura 15). De hecho, este agrupamiento aislado puede estar correlacionado con la presencia del mineral aragonito identificado solo en este punto. En todos los puntos 3 de las tres cavernas fueron aisladas tres cepas bacterianas biomineralizantes. Las especies asociadas a la precipitación de carbonato de calcio en estos puntos se describen en la Tabla 7.



**Figura 15.** Análisis de componentes principales de los elementos químicos detectados en los espeleotemas muestreados. P1=puntos 1, P2= puntos 2, P3= puntos 3. Las flechas representan los elementos químicos por los cuales están más relacionados o regidos cada punto.

**Tabla 7.** Morfotipos microbianos aislados de espeleotemas en cavernas kársticas agrupados por puntos: P1=punto 1, P2= punto 2, P3= punto 3. Las especies marcadas en negro se asocian con la precipitación de carbonato de calcio.

<b>Puntos</b>	<b>Taxones bacterianos</b>	<b>Puntos</b>	<b>Taxones fúngicos</b>
C2P1B1	<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>	C1P1H1	<i>Penicillium brevissimum</i>
C3P1B1	<i>Bacillus xiamenensis</i>	C1P1H2	<i>Aspergillus austrafricanus</i>
		C3P1H1	<i>Nemania sp</i>
		C3P1H2	<i>Cladosporium halotolerans</i>
C1P2B1	<i>Bacillus xiamenensis</i>	C2P2H1	<i>Cladosporium halotolerans</i>
		C2P2H2	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>
		C3P2H1	<i>Eutipa scoparia</i>
C1P3B1	<b><i>Lysinbacillus fusiformis</i></b>	C2P3H1	<i>“Aspergillus austrafricanus”</i>
C1P3B2	<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>	C2P3H2	<i>Aspergillus niger</i>
C1P3B3	<b><i>Bacillus cereus</i></b>	C3P3H1	<i>Coprenillus disseminates</i>
C3P3B1	<i>Caulobacter sp.</i>	C3P3H2	<i>Scopuloides sp</i>
C3P3B2	<i>Bacillus altitudinis</i>		
C3P3B3	<i>Aminobacter carboxidus</i>		
C3P3B4	<i>Bacillus xiamenensis</i>		
C3P3B5	<i>Lysobacter sp.</i>		

#### **CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN**

##### 4.1. Análisis Microbiológico de espeleotemas

##### 4.1.1. Cuantificación y cinética de crecimiento microbiano

El análisis de las UFC por caverna para cada grupo microbiano demostró la abundancia de bacterias y hongos en los ecosistemas de cavernas de la provincia de Napo comparado con otras investigaciones. En este estudio se encontró que el mayor crecimiento bacteriano y fúngico se derivó de estalactitas y banderas de la caverna 2 con mayores títulos en comparación con investigaciones previas (Tabla 8). Las bacterias son los microorganismos más abundantes en las tres cavernas muestreadas, lo que pone de manifiesto la abundancia de procariotas en espeleotemas de cavernas.

**Tabla 8.** Cuadro comparativo de los resultados obtenidos sobre UFC microbianas asociadas a superficies de espeleotemas con estudios anteriores.

Microorganismo	Espeleotema	UFCg <sup>-1</sup>	Zona geográfica	Referencia
Bacterias	Estalactita	5.8x10 <sup>6</sup>	Ecuador	En este estudio
	Estalactita	8.5x10 <sup>2</sup>	Alemania	[19]
	Estalactita	3.9x10 <sup>5</sup>	India	[11]
	Leche de luna	5x10 <sup>5</sup>	Bélgica	[48]
Hongos	Banderas	3.4X10 <sup>4</sup>	Ecuador	En este estudio
	-----	2.9x10 <sup>2</sup>	Malasia	[21]

La abundancia microbiana en espeleotemas de la caverna 2 pudo estar asociado a que ésta es una caverna de aproximadamente 20 metros; por lo que las corrientes de agua, aire y animales como los murciélagos pueden fluir con facilidad dentro de la caverna, provocando el flujo de hongos y bacterias que se encuentran en el exterior hacia el interior de la caverna [21,49,50]. La caverna 1 presenta la segunda mayor abundancia de hongos, pero menor abundancia de bacterias, esto puede explicarse porque al ser una caverna abierta al turismo, la acción antropogénica se puede correlacionar con la dispersión aerotransportada de esporas de hongos y su consecuente proliferación al interior de la caverna [51] y una menor proporción de títulos de bacterias en el aire [49]. Cabe mencionar que los murciélagos habitantes de cavernas son considerados vectores importantes en la dispersión de hongos en cuevas; por lo tanto, también ejercerían influencia en la diversidad y abundancia fúngica en estos ambientes subterráneos [50]. En la caverna 3, al ser una caverna con mínima afluencia de visitas (buen estado de conservación), se observa un patrón inverso a la caverna 1. Aunque no existen datos precisos respecto a la antropización, al estado de conservación y la fauna de cavernas, estos resultados pudieran estar asociados con estos tres factores.

Si bien el crecimiento de colonias microbianas ocurrió en todas las muestras de espeleotemas procesadas, en su mayoría albergaban sólo 1 tipo de microorganismo, sea bacteria u hongo, pero rara vez a ambos. La inhibición del crecimiento de bacterias por hongos o viceversa en los espeleotemas muestreados sugiere que los microorganismos estarían secretando agentes antibacterianos o antifúngicos bioactivos. Se ha

documentado que las bacterias producen metabolitos secundarios que inhibe el crecimiento de hongos a sus alrededores [52]. Por ejemplo, *Lysinibacillus sp*, exhibe un comportamiento antagónico frente a *Aspergillus sp* [53].

Con respecto a la cinética de crecimiento de las comunidades microbiana, se manifiesta la diferencia en el patrón de crecimiento de las colonias bacterianas respecto a los hongos, así como la adaptabilidad de las bacterias y su rápido crecimiento en comparación con los hongos, ya que a las 24 y 48 horas de incubación se cuantificaron colonias bacterianas, no siendo así para hongos. Con este parámetro se puede determinar la adaptabilidad y patrones de crecimiento de microorganismos cultivables en condiciones estándares de temperatura, pH y nutrientes. Diversos estudios han reportado un intervalo de 7 a 69 días de incubación para favorecer el crecimiento de bacterias y hongos aislados de espeleotemas o cavernas de roca caliza [3,10,19,21,45].

#### 4.1.2. Morfología y diversidad microbiana

El análisis morfológico reveló una variedad de colores y apariencia en las comunidades bacterianas y fúngicas. Las comunidades microbianas de las cavernas son variables dependiendo de los microhábitats o sustratos [6]. En este estudio, la morfología de las comunidades bacterianas aisladas de superficies de espeleotemas muestra una distinción. Las dos principales apariencias de las comunidades bacterianas se relacionan con el filo al que pertenecen: irregulares de color beige distinguen a los Firmicutes y circular de diversos colores a las Proteobacterias. Por el contrario, las comunidades fúngicas que se agrupan de acuerdo a su tipo micelio algodonoso y floculoso con diversos colores de micelio aéreo (verde, blanco y negro) sin alguna distinción relacionada con el filo al que pertenecen.

La diversidad microbiana de los espeleotemas estalactitas y banderas muestreados presenta altas y medias diversidades, medidas a través de los índices de Simpson ( $1-D= 0.74$ , valor cercano a 1 que representa alta diversidad) y Shannon ( $H' = 2.51$  valor entre el rango de 2 a 3.5 que representa diversidad media); en concordancia con diversos estudios que reportan una mayor diversidad de bacterias y hongos en sustratos cómo los espeleotemas comparados con el agua de goteo, agua, guano y paredes dentro de cavernas [21,54]. Se ha sugerido que los aportes nutricionales, las perturbaciones naturales o antropogénicas y la geoquímica de la roca pueden

determinar la diversidad microbiana de las cuevas; sin embargo, el mecanismo de diversidad microbiana en estos ambientes subterráneos aún no es bien conocido [6].

#### 4.1.3. Identificación molecular

Las 24 secuencias obtenidas se alinearon con la base de datos de referencia del NCBI para derivar los perfiles taxonómicos. Los filos bacterianos representados en nuestro estudio (Firmicutes y Proteobacteria) son similares a otros estudios donde reportan que los Firmicutes, pertenecientes al género *Bacillus*, y Proteobacteria son los filo más dominantes en sistemas de cavernas [3,10,54]. Se aisló de los espeleotemas estalactita, dos de las bacterias ureolíticas más importantes involucradas en la biomineralización de carbonato de calcio: *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus fusiformis*; ambas especies con potencial para auto reparar hormigón [55,56]. Otras de las especies aisladas que se asocian con la producción *in vitro* de carbonato de calcio (calcita) es *Bacillus licheniformis* [57]. Esta especie es industrial y biotecnológicamente importante debido a su uso para fabricar bioquímicos, enzimas, antibióticos y aminopeptidasa [58]. La secuenciación del genoma completo de las tres especies mencionadas anteriormente constituye un apartado investigativo de relevancia para contribuir a su funcionalidad genética e identificar características únicas de estos microorganismos que ayuden a comprender su especificidad.

Si bien los aislados *Bacillus altitudinis* y *Bacillus xiamenensis* no se reportan como especies biomineralizantes de carbonato de calcio, se las encuentran dentro de cavernas por ser bacterias aerotransportadas [49,59]. Se ha informado que *B. altitudinis* y *B. xiamenensis*, al ser aisladas de suelos, actúan como bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) [60,61]; otorgándoles aplicaciones prometedoras en los sistemas agrícolas.

La colonización de Proteobacteria en varios entornos de cuevas puede atribuirse a su naturaleza quimioheterótrofa y a su capacidad para degradar una amplia gama de compuestos orgánicos, fijar carbón atmosférico y transformar nitrógeno [3]. Se logró aislar *Lysobacter sp.*, *Aminobacter carboxidus* y *Caulobacter sp.* pertenecientes a la subclase gammaproteobacteria y alfa proteobacteria, en concordancia con [62,63] que han informado una abundancia de la subclase alfa, beta, delta y gammaproteobacterias en cuevas kársticas de España y Alemania.



Por otro lado, se encontró que los filos fúngicos principales en los espeleotemas de cavernas kársticas amazónicas son Ascomycota y Basidiomycota en concordancia con [20,21]. Se ha determinado que la mayoría de los taxones fúngicos comúnmente reportados de cavernas son oportunistas y cosmopolitas asociados con suelos, material vegetal o insectos [20]. Los géneros más comunes del filo Ascomycota representados en nuestra investigación (*Cladosporium* y *Aspergillus*), son similares a los encontrados en otros estudios de sistemas de cuevas [21,49,59,64]. El género *Cladosporium* es de los más frecuentes en ambientes al aire libre, por lo que su presencia en el interior de cavernas se le atribuye al transporte a través de las corrientes de aire [49,59] [51,52]. La especie *Aspergillus niger* reportada en este estudio es similar a otra investigación donde se identificó a esta especie en superficies rocosas de una mina en Polonia [65]. [20] mencionan a esta especie como proveniente de cavernas. *Aspergillus niger* es una especie potencialmente valiosa porque posee un complejo enzimático celulolítico eficiente en procesos de fermentación o sacarificación [66]. A su vez, es un microorganismo ideal para biorremediación ya que puede lixiviar metales como Cd, Mn, Pb, Zn, Cr y Fe [67]. Esta especie, junto con *Cladosporium halotolerans*, podrían ser usados como biorremediadores de agua residuales con altas concentraciones de manganeso (Mn) provenientes de la minería [68].

Con respecto a las cepas aisladas pertenecientes al filo Basidiomycota: *Tinctoporellus epimiltinus*, *Coprinellus disseminatus*, *Eutypella scoparia* y *Scopuloides* sp, todos estos géneros han sido aislados previamente de muestras de cavernas, pero en menor frecuencia [20,46]. Hasta donde se conoce, estas especies no están asociadas a la biomineralización de carbonato de calcio, siendo necesarios estudios más a detalle para validar posibles aplicaciones MICP. En base a una explotación bibliográfica, nuestro estudio sugiere que *C. disseminatus* es la primera especie reportada en cavernas kársticas.

Las dos cepas identificadas como *Scopuloides dimorpha*, y *Nemania abortiva*, podrían ser dos nuevas especies potenciales asociadas a estos dos géneros, debido a que su similitud es del 97 %. Sin embargo, para afirmarlo con mayor confianza, es necesario realizar análisis polifásicos y filogenéticos de múltiples locus amplificando regiones distintas al ITS como regiones parciales 28S de la subunidad larga del nrRNA

(LSU), la tubulina  $\beta$  (TUB2), el factor de alargamiento  $1\alpha$  (EF-1  $\alpha$ ) y la segunda subunidad más grande la ARN polimerasa II (RPB2)[46,69]. [20] y [46] han reportado a estos géneros como habitante de cavernas, a pesar que son hongos endófitos .

#### 4.2. Análisis geoquímicos de espeleotemas

El análisis químico de los espeleotemas muestreados nos proporciona un contexto importante para evaluar su variación de la concentración elemental. Dicha variación puede expresarse de diferentes formas dependiendo de su entorno geológico-hidroclimático [70]; por lo tanto: **(I)** la variación química y disponibilidad del agua de goteo de los espeleotemas, asociada a la cantidad de precipitación meteorológica anual, influencia la incorporación de elementos químicos al espeleotema. Por ejemplo, el contenido de Mg -elemento derivado del lecho rocoso, así como el Sr y Ba- es directamente proporcional al Mg/Ca de la solución, siendo la temperatura la principal variable que afecta la partición [23]; si la temperatura es de 25°C y la relación  $1:4 \pm 0,1$  se formará calcita. En base a las concentraciones obtenidas de Mg y Ca se sugiere que todos los espeleotemas están constituidos por minerales carbonáticos como calcita, indicado por el predominio de Ca (81-82% del total) en todas las muestras. Las trazas detectadas de Sr y Ba también nos dan un indicio que los espeleotemas contienen aragonito porque este mineral se caracteriza por asociatividad y altas concentraciones de Sr (y Ba) [23], por lo que el espeleotema del punto 3 de la caverna 1 también estaría formado por cristales de aragonito.

Las concentraciones de Al y Si proporcionan evidencia de la impureza de los espeleotemas muestreados; es decir, no son totalmente calcíticos. Los metales Al, Si y K están asociados con la presencia de minerales de arcilla, siendo los principales responsables de los colores marrones en los espeleotemas (Figura 2) [71]. La presencia de Mn en espeleotemas también se deriva de minerales arcillosos y oxihidróxidos [71]; por lo tanto, se sugiere que los espeleotemas de las cavernas 2 y 3 también estarían formados por este tipo de minerales. [72] señala que espeleotemas endokársticos, como las leches de luna, están compuestas por diferentes especies mineralógicas: en su mayoría carbonáticas (calcita-aragonita) y, en ocasiones, minerales de arcilla. Además, estos minerales arcillosos y oxihidróxidos contienen en su estructura cristalina metales

como Fe, S o P [71]. Es importante mencionar que la incorporación de P –elemento derivado principalmente del suelo, así como el Zn o Pb- también es sensible a la concentración de fosfatos en la solución [23,70]; porque el P y diversos grupos de elementos se unen libremente a especies orgánicas y son transportados libremente a los sitios de goteo de los espeleotemas; en contraste, el transporte de elementos como el Cu, Pb, o Zn depende específicamente de periodos más cortos de infiltración intensa a través de flujos rápidos del acuífero kárstico hasta estos sitios [73]. En síntesis, elementos electronegativos como P y metales pesados como Zn, Cu, o Pb, muestran un fuerte comportamiento de sorción en los suelos y, el cambio de sus concentraciones en los espeleotemas se relaciona con los cambios en la composición del agua de goteo y el flujo de infiltración al endokarst. **(II)** los cambios cristalográficos que dependen de la fábrica del cristal, provocan variaciones en la composición química [73]. Varios son los minerales presentes en los espeleotemas (calcita, aragonita, vaterita), así como diferentes los tipos de fábrica (columnar, fibrosa y microcristalina) y hábito del cristal (romboédrica, ortorrómbica), lo que da lugar a una matriz altamente cristalina [74]. [75] manifiestan que, cuando se emplean métodos espectroscópicos directos (como FRX) los espectros obtenidos contienen información de la composición química y la cristalinidad de la matriz, produciendo variaciones; por lo tanto, la composición química de los espeleotemas varía en función del tipo de fábrica del cristal [74,75]. En resumen, nuestro estudio pudo determinar que todos los espeleotemas muestreados de cavernas kársticas están dominados por el mineral calcita, uno de ellos por aragonito (caverna1-punto3), y alto contenido de minerales arcillosos; deducido a través de su concentración elemental que puede estar controlada por la composición del agua de goteo, las tasas de infiltración y los factores cristalográficos.

#### 4.3. Relación entre la microbiología y geoquímica de espeleotemas

Un total de 24 elementos químicos fueron cuantificados en los espeleotemas muestreados. Varios de los elementos detectados (Ca, Al, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Se, Sn, V, Zn) son esenciales y requeridos por los microorganismos (eucariotas y procariotas) para sus funciones estructurales o catalíticas [12,76]. Algunos procariotas emplean metales como el Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As y Se como donadores o aceptores de electrones en su metabolismo energético. Otros metales que reducen es  $Hg^{2+}$  y  $Ag^+$  pero sin la

conservación de energía en estas reacciones [76]. El Ca, por ejemplo, actúa de manera intracelular como una molécula de señalización, regulado estrictamente por el gradiente de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  inter y extracelular [77]. Otras funciones específicas son las proteínas de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , la motilidad, la germinación de esporas, la detección de quorum sensing, producción de exopolisacáridos (EPS) y la formación de biopelículas [77].

Elementos como Hg, Pb, As, Ni pueden ser tóxicos para las células microbianas. El Hg y Pb, por ejemplo, dañan el ADN, inhiben la actividad enzimática y la división celular o desnaturalizan las proteínas [12]. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia para protegerse de la toxicidad metálica. La producción de una capa extracelular que rodea las células bacterianas es un mecanismo de defensa para evitar el ingreso de metales a las células; además les ayuda en procesos de adhesión superficial [12].

Se ha caracterizado anteriormente que *Bacillus licheniformis*, cepa aislada de los puntos 1 y 3 donde sus composiciones químicas no son similares, alberga en su pared celular gram-positiva, componentes glicopolímeros aniónicos como el ácido teicurónico y ácido teicoico siendo los sitios principales del blindaje con elementos como Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe(III), y Ni; promoviendo que su pared sea un sistema abierto de intercambio de iones [78]. [79] reporta que la unión de Fe con la capa bacteriana da como resultado el desarrollo del mineral ferrihidrita; lo que sugiere que espeleotemas de los puntos 1 y 3 (de las cavernas 1 y 3, respectivamente), donde se aisló esta bacteria, también estarían formados por este mineral. La ferrihidrita es un mineral oxihidróxido de hierro abundante en suelos, rocas, fondo marino y organismos. Posee una reactividad superficial alta hacia la adsorción de cationes de importancia ambiental como el Cr o Cd; por tal razón es ampliamente estudiado en aplicaciones ambientales e industriales [80]. Otras investigaciones han demostrado que en *Bacillus cereus*, cepa aislada del punto 3-caverna1, la interacción con metales presentes en el medio ambiente como  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ , resulta en el estímulo y activación de la esfingomielinasa, una fosfolipasa C de esta especie [81]

*Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus fusiformis* se aislaron del Punto 3-caverna 3 espeleotemas donde se sugiere que los espeleotemas están formados

por minerales de calcita, aragonita y minerales arcillosos y oxihidróxidos. Presumiblemente, estos tres morfotipos podrían influenciar la formación de los minerales presentes en estos espeleotemas.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

Los resultados obtenidos en nuestra investigación permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Es la primera investigación realizada con el objetivo de determinar las comunidades microbianas asociadas a espeleotemas de cavernas kársticas amazónicas.
- En el contexto microbiológico, existe una alta cantidad de bacterias y hongos presentes en los espeleotemas de cavernas kársticas, predominando las comunidades bacterianas en comparación con los hongos.
- Los índices de Shannon y Simpson demostraron que no existe una marcada influencia respecto a la diversidad de bacterias y hongos en las cavernas evaluadas. La diversidad podría estar influenciada por el efecto de las corrientes de aire, por la fauna cavernícola (murciélagos) y por la actividad antropogénica dentro de la caverna y su longitud.
- Los análisis moleculares determinaron que los filos cultivables presentes en espeleotemas son Firmicutes y Proteobacteria y los phylum fúngicos son Ascomycota y Basidiomycota. El género bacteriano más frecuentemente aislado fue *Bacillus* con los tres morfotipos bacterianos mineralizantes asociados a la precipitación de carbonatos de calcio (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus fusiformis*) y el género fúngico fue *Cladosporium*. No se aislaron morfotipos fúngicos biomineralizantes.
- En el contexto geoquímico, a partir de la cuantificación de 24 elementos químicos en los espeleotemas y el análisis bibliográfico, se evidenció la preponderancia del mineral calcita y en uno de ellos aragonito (caverna1-punto3). De igual manera, a través de la concentración de Al, se deduce la presencia de minerales arcillosos y oxihidróxidos. La presencia de estos minerales puede estar controlada por la composición del agua de goteo, las tasas de infiltración y los factores cristalográficos.

- En el contexto geomicrobiológico, se determina que la similitud de la composición química de los espeleotemas del punto 3 de todas las cavernas sería clave para el desarrollo de bacterias biomineralizantes de calcita, aragonita y minerales arcillosos y oxihidróxidos (ferrihidrita) en los espeleotemas muestreados; deducido a través de la funcionalidad y patrones bioquímicos de los aislados bacterianos identificados.

Se recomienda:

- Realizar análisis metagenómicos en otras cavernas de la región amazónica para determinar microorganismos cultivables, no cultivables y nuevas especies valiosas presentes en estos ecosistemas.
- Secuenciar el genoma completo de los aislados pertenecientes a los géneros *Nemania* y *Scopuloides* para determinar si pertenecen a nuevas especies de microorganismos en estas condiciones extremófilas. De ser el caso, las secuencias permitirán revelar características genéticas y expresiones génicas que dan lugar a enzimas, metabolitos o genes, posiblemente, no conocidos y con ello, evaluar el valor biotecnológico de estos microorganismos para aprovechar completamente su potencial industrial, comercial y ambiental; dando paso a la necesidad de mayores investigaciones en torno a estas cepas aisladas. El trabajo futuro sobre estos aspectos ayudará al desarrollo de nuevas cepas microbianas mediante Ingeniería Genética.
- Validar los datos de concentraciones elementales obtenidas por espectrometría de fluorescencia de Rayos X con otras técnicas analíticas de elementos como ICP-MS, ICP-OES, AAS.
- Evaluar la mineralogía de los espeleotemas muestreados con técnicas como sección delgada, SEM, TEM, XRD, fotomicrografías o análisis TIMA para una interpretación cruzada de los resultados químicos y las relaciones geomicrobiológicas.

## REFERENCIAS

1. Ehrlich HL. Geomicrobiology: Its significance for geology. *Earth Sci Rev.* 1998;45: 45–60. doi:10.1016/S0012-8252(98)00034-8
2. Ercole C, Cacchio P, Cappuccio G, Lepidi A. Deposition of calcium carbonate in karst caves: role of bacteria in Stiffe's Cave. *Int J Speleol.* 2001;30A: 69–79. doi:10.5038/1827-806x.30.1.6
3. Dhama NK, Mukherjee A, Watkin ELJ. Microbial diversity and mineralogical-mechanical properties of calcitic cave speleothems in natural and in vitro biomineralization conditions. *Front Microbiol.* 2018;9. doi:10.3389/FMICB.2018.00040/FULL
4. Chen Y, Wu L, Boden R, Hillebrand A, Kumaresan D, Moussard H, et al. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J.* 2009;3: 1093–1104. doi:10.1038/ISMEJ.2009.57
5. Desai MS, Assig K, Dattagupta S. Nitrogen fixation in distinct microbial niches within a chemoautotrophy-driven cave ecosystem. *ISME J* 2013 712. 2013;7: 2411–2423. doi:10.1038/ismej.2013.126
6. Wu Y, Tan L, Liu W, Wang B, Wang J, Cai Y, et al. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Front Microbiol.* 2015;6. doi:10.3389/FMICB.2015.00244/ABSTRACT
7. Carmichael MJ, Carmichael SK, Santelli CM, Strom A, Bräuer SL. Mn(II)-oxidizing Bacteria are Abundant and Environmentally Relevant Members of Ferromanganese Deposits in Caves of the Upper Tennessee River Basin. <http://dx.doi.org/101080/014904512013769651>. 2013;30: 779–800. doi:10.1080/01490451.2013.769651
8. Zhu T, Dittrich M. Carbonate precipitation through microbial activities in natural environment, and their potential in biotechnology: A review. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4: 4. doi:10.3389/FBIOE.2016.00004/BIBTEX
9. Anbu P, Kang C-H, Shin Y-J, So J-S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. 2016. doi:10.1186/s40064-016-1869-2
10. García G. M, Márquez G. MA, Moreno HCX. Characterization of bacterial diversity associated with calcareous deposits and drip-waters, and isolation of calcifying bacteria from two Colombian mines. *Microbiol Res.* 2016;182: 21–30. doi:10.1016/J.MICRES.2015.09.006
11. Baskar S, Routh J, Baskar R, Kumar A, Miettinen H, Itävaara M. Evidences for Microbial Precipitation of Calcite in Speleothems from Krem Syndai in Jaintia Hills, Meghalaya, India. *Geomicrobiol J.* 2016;33: 906–933. doi:10.1080/01490451.2015.1127447
12. Roane TM, Pepper IL, Gentry TJ. Microorganisms and Metal Pollutants. *Environ Microbiol Third Ed.* 2015; 415–439. doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00018-1
13. Manoli F, Koutsopoulos S, Dalas E. Crystallization of calcite on chitin. *J Cryst Growth.* 1997;182: 116–124. doi:10.1016/S0022-0248(97)00318-7
14. Sánchez Cortez JL. Guía Espeleológica de Napo. 2017; 106.
15. Maciejewska M, Całusińska M, Cornet L, Adam D, Pessi I, Malchair S, et al. High-Throughput Sequencing Analysis of the Actinobacterial Spatial Diversity in Moonmilk Deposits. *Antibiotics.* 2018;7: 27. doi:10.3390/antibiotics7020027
16. Ortiz M, Neilson JW, Nelson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, et al. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. *Microb Ecol.* 2013;65: 371–383. doi:10.1007/S00248-012-0143-6

17. Maciejewska M, Pessi IS, Arguelles-Arias A, Noifalisse P, Luis G, Ongena M, et al. *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel feroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2015;107: 519–531. doi:10.1007/s10482-014-0348-4
18. Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Porca E, Pašić L, Jurado V, Hernandez-Marine M, et al. The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012;81: 281–290. doi:10.1111/J.1574-6941.2012.01391.X
19. Adam D, Maciejewska M, Naômé A, Martinet L, Coppieters W, Karim L, et al. Isolation, Characterization, and Antibacterial Activity of Hard-to-Culture Actinobacteria from Cave Moonmilk Deposits. *Antibiot (Basel, Switzerland).* 2018;7. doi:10.3390/ANTIBIOTICS7020028
20. Vanderwolf KJ, Malloch D, McAlpine DF, Forbes GJ. A world review of fungi, yeasts, and slime molds in caves. *Int J Speleol.* 2013;42: 9. doi:http://dx.doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.9
21. Wasti IG, Khan FAA, Bernard H, Hassan NH, Fayle T, Sathiya Seelan JS. Fungal communities in bat guano, speleothem surfaces, and cavern water in Madai cave, Northern Borneo (Malaysia). <http://mc.manuscriptcentral.com/tmyc>. 2021;12: 188–202. doi:10.1080/21501203.2021.1877204
22. Vaughan MJ, Maier RM, Pryor BM. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner caverns, Arizona, USA. *Int J Speleol.* 2011;40: 65–77. doi:10.5038/1827-806X.40.1.8
23. Vansteenberge S, de Winter NJ, Sinnesael M, Xueqin Z, Verheyden S, Claeys P. Benchtop  $\mu$ XRF as a tool for speleothem trace elemental analysis: Validation, limitations and application on an Eemian to early Weichselian (125–97 ka) stalagmite from Belgium. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.* 2020;538. doi:10.1016/J.PALAEO.2019.109460
24. Constantin S, Toulkeridis T, Moldovan OT, Villacís M, Addison A. Caves and karst of Ecuador—state-of-the-art and research perspectives. *Phys Geogr.* 2019;40: 28–51. doi:10.1080/02723646.2018.1461496
25. Wischart A, Pootanakit K. Metagenomic-based approach to a comprehensive understanding of cave microbial diversity. *Recent Advancements in Microbial Diversity.* Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/b978-0-12-821265-3.00023-2
26. Douglas S, Douglas DD. Structural and geomicrobiological characteristics of a microbial community from a cold sulfide spring. *Geomicrobiol J.* 2001;18: 401–422. doi:10.1080/014904501753210567
27. Itävaara M, Salavirta H, Marjamaa K, Ruskeeniemi T. Geomicrobiology and Metagenomics of Terrestrial Deep Subsurface Microbiomes. *Adv Appl Microbiol.* 2016;94: 1–77. doi:10.1016/bs.aambs.2015.12.001
28. De Mandal S, Chatterjee R, Kumar NS. Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiol.* 2017;17. doi:10.1186/S12866-017-1002-X
29. Ahmed E, Hugerth LW, Logue JB, Brüchert V, Andersson AF, Holmström SJM. Mineral Type Structures Soil Microbial Communities. <http://dx.doi.org/101080/0149045120161225868>. 2016;34: 538–545. doi:10.1080/01490451.2016.1225868
30. Marín S, Cabestrero O, Demergasso C, Olivares S, Zetola V, Vera M. An indigenous bacterium with enhanced performance of microbially-induced Ca-carbonate biomineralization under extreme alkaline conditions for concrete and soil-improvement industries. *Acta Biomater.* 2021;120: 304–317. doi:10.1016/J.ACTBIO.2020.11.016
31. Lee C, Lee H, Kim O Bin. Biocement Fabrication and Design Application for a Sustainable Urban Area. *Sustain* 2018, Vol 10, Page 4079. 2018;10: 4079. doi:10.3390/SU10114079



32. Achal V, Pan X, Zhang D. Remediation of copper-contaminated soil by *Kocuria flava* CR1, based on microbially induced calcite precipitation. *Ecol Eng.* 2011;37: 1601–1605. doi:10.1016/J.ECOLENG.2011.06.008
33. Kang CH, Han SH, Shin Y, Oh SJ, So JS. Bioremediation of Cd by Microbially Induced Calcite Precipitation. *Appl Biochem Biotechnol* 2014 1726. 2014;172: 2907–2915. doi:10.1007/S12010-014-0737-1
34. Arpajirakul S, Pungrasmi W, Likitlersuang S. Efficiency of microbially-induced calcite precipitation in natural clays for ground improvement. *Constr Build Mater.* 2021;282: 122722. doi:10.1016/J.CONBUILDMAT.2021.122722
35. DeJong JT, Mortensen BM, Martinez BC, Nelson DC. Bio-mediated soil improvement. *Ecol Eng.* 2010;36: 197–210. doi:10.1016/J.ECOLENG.2008.12.029
36. Harkes MP, van Paassen LA, Booster JL, Whiffin VS, van Loosdrecht MCM. Fixation and distribution of bacterial activity in sand to induce carbonate precipitation for ground reinforcement. *Ecol Eng.* 2010;36: 112–117. doi:10.1016/J.ECOLENG.2009.01.004
37. DeJong JT, Fritzes MB, Nüsslein K. Microbially Induced Cementation to Control Sand Response to Undrained Shear. *J Geotech Geoenvironmental Eng.* 2006;132: 1381–1392. doi:10.1061/(ASCE)1090-0241(2006)132:11(1381)
38. McCutcheon J, Power IM, Harrison AL, Dipple GM, Southam G. A greenhouse-scale photosynthetic microbial bioreactor for carbon sequestration in magnesium carbonate minerals. *Environ Sci Technol.* 2014;48: 9142–9151. doi:10.1021/ES500344S/SUPPL\_FILE/ES500344S\_SI\_001.PDF
39. Castro-Alonso MJ, Montañez-Hernandez LE, Sanchez-Muñoz MA, Macias Franco MR, Narayanasamy R, Balagurusamy N. Microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and its potential in bioconcrete: Microbiological and molecular concepts. *Front Mater.* 2019;6: 126. doi:10.3389/FMATS.2019.00126/BIBTEX
40. Ben-David A, Davidson CE. Estimation method for serial dilution experiments. *J Microbiol Methods.* 2014;107: 214–221. doi:10.1016/J.MIMET.2014.08.023
41. Sousa AM, Machado I, Nicolau A, Pereira MO. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *J Microbiol Methods.* 2013;95: 327–335. doi:10.1016/J.MIMET.2013.09.020
42. Sobal M, Martínez-carrera D, Morales P, Roussos S. CLASSICAL CHARACTERIZATION OF MUSHROOM GENETIC RESOURCES FROM TEMPERATE AND TROPICAL REGIONS OF MEXICO. *Charact MUSHROOM Genet Resour.* 2007;19: 15–23. Available: [www.micaplint.com](http://www.micaplint.com)
43. Simpson EH. Measurement of Diversity. *Nat* 1949 1634148. 1949;163: 688–688. doi:10.1038/163688a0
44. Shannon CE, Weaver W. THE MATHEMATICAL THEORY OF COMMUNICATION. 1949.
45. Mudgil D, Baskar S, Baskar R, Paul D, Shouche YS. Biomineralization Potential of *Bacillus subtilis*, *Rummeliibacillus Stabekisii* and *Staphylococcus Epidermidis* Strains In Vitro Isolated from Speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India. <https://doi.org/10.1080/0149045120181450461>. 2018;35: 675–694. doi:10.1080/01490451.2018.1450461
46. Zhang ZF, Liu F, Zhou X, Liu XZ, Liu SJ, Cai L. Culturable mycobiota from Karst caves in China, with descriptions of 20 new species. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi.* 2017;39: 1. doi:10.3767/PERSOONIA.2017.39.01
47. Dandurand G, Maire R, Ortega R, Devès G, Lans B, Morel L, et al. X-ray fluorescence microchemical analysis and autoradiography applied to cave deposits: speleothems, detrital rhythmites, ice and prehistoric paintings. <http://journals.openedition.org/geomorphologie>. 2011; 407–426. doi:10.4000/GEOMORPHOLOGIE.9623
48. Rusznyák A, Akob DM, Nietzsche S, Eusterhues K, Totsche KU, Neu TR, et al. Calcite

- biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic herrenberg cave. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78: 1157–1167.  
doi:10.1128/AEM.06568-11
49. Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Cañaveras JC, Porca E, Jurado V, et al. Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. *Environ Sci Pollut Res* 2011 186. 2011;18: 1037–1045. doi:10.1007/S11356-011-0513-5
  50. Cunha AOB, Bezerra JDP, Oliveira TGL, Barbier E, Bernard E, Machado AR, et al. Living in the dark: Bat caves as hotspots of fungal diversity. *PLoS One.* 2020;15: e0243494. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0243494
  51. Wang W, Ma X, Ma Y, Mao L, Wu F, Ma X, et al. Seasonal dynamics of airborne fungi in different caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2010;64: 461–466. doi:10.1016/J.IBIOD.2010.05.005
  52. Kosznik-kwaśnicka K, Golec P, Jaroszewicz W, Lubomska D, Piechowicz L. Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorg* 2022, Vol 10, Page 222. 2022;10: 222. doi:10.3390/MICROORGANISMS10020222
  53. Naureen Z, Ur Rehman N, Hussain H, Hussain J, Gilani SA, Al Housni SK, et al. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Front Microbiol.* 2017;8: 1477. doi:10.3389/FMICB.2017.01477/BIBTEX
  54. Zhu HZ, Zhang ZF, Zhou N, Jiang CY, Wang BJ, Cai L, et al. Diversity, distribution and co-occurrence patterns of bacterial communities in a karst cave system. *Front Microbiol.* 2019;10: 1726. doi:10.3389/FMICB.2019.01726/BIBTEX
  55. Kaur N, Reddy MS, Mukherjee A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. *J Microbiol Biotechnol.* 2013;23: 707–714. doi:10.4014/JMB.1212.11087
  56. Mendoza MLZ, Lundberg J, Ivarsson M, Campos P, Nylander JAA, Sallstedt T, et al. Metagenomic Analysis from the Interior of a Speleothem in Tjuv-Ante's Cave, Northern Sweden. *PLoS One.* 2016;11: e0151577. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0151577
  57. Tredici SM, Buccolieri A, Tanini L, Calcagnile M, Manno D, Alifano P. Calcite-forming *Bacillus licheniformis* Thriving on Underwater Speleothems of a Hydrothermal Cave. <https://doi.org/10.1080/0149045120181476626>. 2018;35: 804–817. doi:10.1080/01490451.2018.1476626
  58. Lee C, Kim JY, Song HS, Kim YB, Choi YE, Yoon C, et al. Genomic analysis of *bacillus licheniformis* CBA7126 isolated from a human fecal sample. *Front Pharmacol.* 2017;8. doi:10.3389/FPHAR.2017.00724/FULL
  59. Dominguez-Moñino I, Jurado V, Rogerio-Candelera MA, Hermosin B, Saiz-Jimenez C. Airborne bacteria in show caves from Southern Spain. *Microb Cell.* 2021;8: 247. doi:10.15698/MIC2021.10.762
  60. Amna, Xia Y, Farooq MA, Javed MT, Kamran MA, Mukhtar T, et al. Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM14 activating sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) red rot disease resistance. *Plant Physiol Biochem.* 2020;151: 640–649. doi:10.1016/J.PLAPHY.2020.04.016
  61. Pidlisnyuk V, Mamirova A, Pranaw K, Shapoval PY, Trögl J, Nurzhanova A. Potential role of plant growth-promoting bacteria in *Miscanthus x giganteus* phytotechnology applied to the trace elements contaminated soils. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2020;155: 105103. doi:10.1016/J.IBIOD.2020.105103
  62. Portillo MC, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *J Appl Microbiol.* 2008;104: 681–691. doi:10.1111/J.1365-2672.2007.03594.X
  63. Rusznyák A, Akob DM, Nietzsche S, Eusterhues K, Totsche KU, Neu TR, et al. Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic

- herrenberg cave. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78: 1157–1167.  
doi:10.1128/AEM.06568-11/SUPPL\_FILE/AEM6568-11\_TABLES1.DOC
64. Pusz W, Ogórek R, Knapik R, Kozak B, Bujak H. The Occurrence of Fungi in the Recently Discovered Jarkowicka Cave in the Karkonosze Mts. (Poland).  
<http://dx.doi.org/101080/014904512014925010>. 2014;32: 59–67.  
doi:10.1080/01490451.2014.925010
  65. Ogórek R, Pusz W, Zagożdżon PP, Kozak B, Bujak H. Abundance and Diversity of Psychrotolerant Cultivable Mycobiota in Winter of a Former Aluminous Shale Mine. *Geomicrobiol J.* 2017;34: 823–833. doi:10.1080/01490451.2017.1280860
  66. Paula CCPD, Montoya Q V., Meirelles LA, Farinas CS, Rodrigues A, Seleglim MHR. High cellulolytic activities in filamentous fungi isolated from an extreme oligotrophic subterranean environment (Catão cave) in Brazil. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91. doi:10.1590/0001-3765201920180583
  67. Wang Q, Yang J, Wang Q, Wu T. Effects of water-washing pretreatment on bioleaching of heavy metals from municipal solid waste incinerator fly ash. *J Hazard Mater.* 2009;162: 812–818. doi:10.1016/J.JHAZMAT.2008.05.125
  68. Mota EA, Felestrino ÉB, Leão VA, Guerra-Sá R. Manganese (II) removal from aqueous solutions by *Cladosporium halotolerans* and *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Reports.* 2020;25. doi:10.1016/J.BTRE.2020.E00431
  69. Jiang JR, Cai L, Liu F. Oligotrophic fungi from a carbonate cave, with three new species of *Cephalotrichum*. <http://mc.manuscriptcentral.com/tmyc>. 2017;8: 164–177. doi:10.1080/21501203.2017.1366370
  70. Fairchild IJ, Baker A, Borsato A, Frisia S, Hinton RW, McDermott F, et al. Annual to sub-annual resolution of multiple trace-element trends in speleothems. *J Geol Soc London.* 2001;158: 831–841. doi:10.1144/JGS.158.5.831
  71. Epure L, Meleg IN, Munteanu CM, Roban RD, Moldovan OT. Bacterial and Fungal Diversity of Quaternary Cave Sediment Deposits.  
<http://dx.doi.org/101080/014904512013815292>. 2013;31: 116–127.  
doi:10.1080/01490451.2013.815292
  72. El moonmilk, un depósito endokárstico singular. Presencia en cavidades españolas. [cited 29 Mar 2022]. Available: <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/9773>
  73. Borsato A, Frisia S, Fairchild IJ, Somogyi A, Susini J. Trace element distribution in annual stalagmite laminae mapped by micrometer-resolution X-ray fluorescence: Implications for incorporation of environmentally significant species. *Geochim Cosmochim Acta.* 2007;71: 1494–1512. doi:10.1016/J.GCA.2006.12.016
  74. Frisia S, Borsato A, Fairchild IJ, McDermott F. Calcite fabrics, growth mechanisms, and environments of formation in speleothems from the Italian Alps and Southwestern Ireland. *J Sediment Res.* 2000;70: 1183–1196. doi:10.1306/022900701183
  75. Sutton SR, Rivers ML, Smith J V. Synchrotron x-ray fluorescence: diffraction interference. *Anal Chem.* 2002;58: 2167–2171. doi:10.1021/AC00124A013
  76. Ehrlich HL. Microbes and metals. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;48: 687–692. doi:10.1007/S002530051116
  77. Lee YS, Park W. Enhanced calcium carbonate-biofilm complex formation by alkali-generating *Lysinibacillus boronitolerans* YS11 and alkaliphilic *Bacillus* sp. AK13. *AMB Express.* 2019;9: 1–17. doi:10.1186/S13568-019-0773-X/FIGURES/6
  78. Beveridge TJ, Forsberg CW, Doyle RJ. Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. *J Bacteriol.* 1982;150: 1438–1448. doi:10.1128/JB.150.3.1438-1448.1982
  79. McLean RJC, Beauchemin D, Clapham L, Beveridge TJ. Metal-Binding Characteristics of the Gamma-Glutamyl Capsular Polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56: 3671–3677. doi:10.1128/AEM.56.12.3671-3677.1990

80. Laboratory synthesis of goethite and ferrihydrite of controlled particle sizes. [cited 29 Mar 2022]. Available:  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-33222015000300007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-33222015000300007)
81. Ikezawa H, Matsushita M, Tomita M, Taguchi R. Effects of metal ions on sphingomyelinase activity of *Bacillus cereus*. *Arch Biochem Biophys*. 1986;249: 588–595. doi:10.1016/0003-9861(86)90037-8

## ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis morfológico de las colonias bacterianas aisladas de las superficies de espeleotemas de cavernas kársticas. C=caverna, A= aislado, B=bacteria.

Cepas	Color	Apariencia	n°	Densidad	Bordes	Elevación	gram
C1P3B1	beige	rizoide	1	++	lobulado	elevada	-
C1P3B2	beige	puntiforme	1	+	entero	convexa	+
C1P2B1	beige	fusiforme	3	+	ondulado	elevada	+
C1P2B4	beige	circular	8	++	entero	convexa	+
C1P3B3	beige	circular	1	+	entero	convexa	+
C2P1B1	beige	irregular	14	+++	erosionado	elevada	+
C2P1B2	beige	irregular	8	+++	lobulado	elevada	+
C3P3B1	amarilla	circular	1	+++	entero	elevada	-
C3P3B2	beige bordes blancos	circular	16	++	entero	elevada	+
C3P3B3	rosa	circular	1	++	entero	convexa	+
C3P3B4	beige	circular	1	++	regular	convexa	+
C3P3B5	café	circular	2	+++	entero	elevada	-
C3P3B7	beige	fusiforme	4	+++	lobulados	plana	+
C3P3B6	crema	irregular	2	+	erosionado	elevada	+
C3P3B8	beige	circular	1	+	entero	elevada	+
C3P3B9	blanca	irregular	1	+	erosionado	elevada	+
C3P1B1	blanca	irregular	6	+++	erosionado	plana	+

**Anexo 2.** Análisis morfológico de colonias fúngicas aisladas de la superficie de espeleotemas de cavernas kársticas. C=caverna, A= aislado, H= hongo.

<b>Cepas</b>	<b>Color</b>	<b>Micelio aereo</b>	<b>Densidad</b>	<b>n°</b>
C1P1H1	blanco	algodonoso	+++	1
C1P1H2	verde claro borde blanco	foculoso	++	1
C1P2H0	blanco	foculoso	++	1
C1P3H0	transparente	levaduriforme	++	1
C2P2H1	verde oscuro	foculoso	++	4
C2P2H0	transparente	levaduriforme	+	2
C2P3H0	transparente	levaduriforme	++	2
C2P2H2	blanco	algodonoso	++	1
C2P3H1	verde claro borde blanco	foculoso	++	21
C2P3H2	negro	algodonoso	+++	36
C2P2H3	verde oscuro	foculoso	++	5
C3P2H3	rosado	levaduriforme	+++	3
C3P2H4	rosado	levaduriforme	+++	3
C3P3H2	blanco	foculoso	+++	1
C3P2H1	blanco	algodonoso	+++	1
C3P1H5	verde oscuro	foculoso	++	5
C3P3H1	blanco	algodonoso	+++	1
C3P3H2	transparente	algodonoso	+++	1
C3P1H1	blanco	algodonoso	+++	4
C3P1H2	verde oscuro	foculoso	++	9