

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Antagonismo de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a
bacterias entéricas multirresistentes**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA**

JERRAM STEVE POZO GANCINO

Quito, 2023

Certifico que la disertación de la Licenciatura en Microbiología de Jerram Steve Pozo Gancino, ha sido concluida con conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer Negrete
Directora de la disertación
Quito, 16 de junio de 2023

A mis padres, mi hermana, amigos y a todas las personas que me apoyaron a lo largo de la Carrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Iliana Alcocer, por abrirme las puertas a su laboratorio, por la confianza puesta en mí, por su gestión, por autorizarme el uso de los materiales y equipos necesarios para el estudio, y, sobre todo, por permitirme desarrollar este tema de investigación tan apasionante como interesante.

Agradezco a la M. Sc. María Fernanda Yauri por orientarme en los procesos llevados a cabo en el trabajo experimental, al Mgtr. Bolívar Salas por facilitar algunos de los reactivos utilizados en la metodología, y al Dr. Wilmer E. Pozo-Rivera por orientarme en la parte estadística del estudio.

Doy las gracias a los profesores de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por sus conocimientos compartidos, ya que, sin ellos, este trabajo no hubiera sido posible.

Doy las gracias a toda mi familia, que me dieron todo su apoyo y confianza durante toda la Carrera.

Agradezco a mis amigos y compañeros por brindarme compañía, apoyo y darme momentos inolvidables a lo largo de mi preparación como Microbiólogo.

Doy gracias a la Dirección General Financiera de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, al Decanato de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y a los Coordinadores de la Carrera de Microbiología por financiar este estudio mediante los fondos para Trabajos de Titulación.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	7
4.2. REACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS	7
4.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS	8
4.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS ENTÉRICAS	8
4.5. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	8
4.6. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE β - LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS <i>IN VITRO</i>	9
4.7. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	9
4.8. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS	10
4.9. PRUEBAS DE ANTAGONISMO	10
4.10. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	10
4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
5. RESULTADOS	12
5.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS AISLADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS	12
5.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS ENTÉRICAS.....	13
5.3. REIDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS.....	14
5.4. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)	15

5.5. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS	16
5.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO	19
6. DISCUSIÓN	26
6.1. IDENTIDAD DE BACTERIAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS Y BACTERIAS ENTÉRICAS	26
6.2. BACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS	27
6.3. ANTAGONISMO DE BACTERIAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS SOBRE BACTERIAS ENTERICAS MULTIRRESISTENTES Y SENSIBLES	29
7. CONCLUSIONES.....	34
8. REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS	35
9. ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Antibiogramas para detección fenotípica de producción de BLEE.....	16
Figura 2. Antibiogramas para detección fenotípica de producción de carbapenemasas.....	18
Figura 3. Pruebas de antagonismo de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
Figura 4. Variación de las respuestas antagónicas de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a <i>Escherichia coli</i>	21
Figura 5. Antagonismo de <i>Bacillus licheniformis</i> sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm	23
Figura 6. Antagonismo de <i>Brevibacillus parabrevis</i> sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm.....	23
Figura 7. Antagonismo de <i>Bacillus pumilus</i> sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm.	24
Figura 8. Antagonismo de <i>Lysinibacillus xynaliticus</i> sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm.....	24
Figura 9. Comparación de la respuesta antagónica entre las bacterias de la Cueva de los Tayos sobre bacterias entéricas.	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución normal de la variable de respuesta.....	11
Tabla 2. Identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias del género <i>Bacillus</i> provenientes de la Cueva de los Tayos	12
Tabla 3. Identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias del género <i>Acinetobacter</i> provenientes de la Cueva de los Tayos.....	13
Tabla 4. Identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias entéricas empleadas.....	13
Tabla 5. Reidentificación de las especies bacterianas de la Cueva de los Tayos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	14
Tabla 6. Detección fenotípica de producción de BLEE en <i>E. coli</i> BLEE 4156 HVZ 545.....	15
Tabla 7. Detección fenotípica de producción de BLEE en <i>E. coli</i> ATCC 25922.	16
Tabla 8. Detección fenotípica de producción de carbapenemasas en <i>K. pneumoniae</i> ATCC KPC	17
Tabla 9. Detección fenotípica de producción de carbapenemasas en <i>K. pneumoniae</i> BAA 1706	18
Tabla 10. Pruebas de Fisher (ADEVA) y comparación de medias LSD (\pm error estándar) del antagonismo de las bacterias de la Cueva de los Tayos frente a las bacterias entéricas.	22

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Medidas de tendencia central de las pruebas de antagonismo expresadas como diámetros de los halos de inhibición.	42
Anexo 2. Análisis de la varianza de InfoStat vinculado a R.....	43

1. RESUMEN

Las bacterias entéricas resistentes a antimicrobianos representan uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, por ello se ha planteado a los mecanismos antagónicos de bacterias provenientes de cuevas como una posible solución a la creciente aparición de especies entéricas multirresistentes. Por lo anteriormente mencionado, en este estudio, se evaluó la potencial actividad antagónica de cepas bacterianas aisladas de la Cueva de los Tayos frente a bacterias entéricas, como posible solución a la creciente aparición de especies multirresistentes. Se utilizaron pruebas bioquímicas y espectrometría de masas MALDI-TOF para revelar la identidad de las bacterias utilizadas en el estudio. Se emplearon métodos de difusión de disco e inactivación de disco para comprobar la resistencia y sensibilidad de bacterias entéricas. La evaluación de respuestas antagónicas se llevó a cabo mediante métodos de difusión en agar, donde se inocularon 100 µl de suspensiones bacterianas de la Cueva de los Tayos en pocillos formados en el medio sólido, donde se sembraron las bacterias entéricas, se contó con 4 repeticiones para evaluar la respuesta antagónica sobre cada bacteria entérica y se tomó como variable de respuesta a los halos de inhibición observados a las 72 horas de la incubación. Se identificaron 6 bacterias de la Cueva de los Tayos: *Bacillus pumilus*, *Bacillus lincheniformis*, *Lisinibacillus xylaniticus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter vivianii* y *Brevibacillus parabrevis*. Se comprobó la resistencia a antimicrobianos de *Escherichia coli* BLEE 4156 HVZ 545 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC KPC, y la sensibilidad de *E. coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* BAA 1706. La bacteria con mejor respuesta antagónica fue *B. parabrevis* y la bacteria más susceptible a dichas actividades antagónicas fue *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545. Este estudio demostró por primera vez que las bacterias del género *Bacillus* provenientes de la Cueva de los Tayos poseen mecanismos antagónicos efectivos sobre cepas de *E. coli* resistente a antimicrobianos.

Palabras clave: bacterias antagónicas, bacterias entéricas, Cueva de los Tayos, respuesta antagónica, resistencia antimicrobiana.

2. ABSTRACT

Enteric bacteria resistant to antimicrobials represent one of the major global health problems, therefore, it has been suggested that antagonistic mechanisms of bacteria from caves could be a possible solution to the growing emergence of multidrug-resistant enteric species. In this study, the potential antagonistic activity of bacterial strains isolated from the Tayos Cave against enteric bacteria was evaluated as a possible solution to the increasing occurrence of multidrug resistant species. Biochemical tests and MALDI-TOF mass spectrometry were used to reveal the identity of the bacteria used in the study. Disk diffusion and disk inactivation methods were employed to test the resistance and sensitivity of enteric bacteria. The evaluation of antagonistic responses was carried out through agar diffusion methods, where 100 µl of bacterial suspensions from the Tayos Cave were inoculated into wells made in the solid medium containing the enteric bacteria, four repetitions were used to assess the antagonistic response on each enteric bacteria, and the inhibitory halos observed after 72 hour of incubation were taken as the response variable. Six bacteria were identified from the Tayos Cave: *Bacillus pumilus*, *Bacillus lincheniformis*, *Lysinibacillus xylaniticus*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter vivianii* and *Brevibacillus parabrevis*. The antimicrobial resistance of *Escherichia coli* BLEE 4156 HVZ 545 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC KPC was confirmed, as well as the sensitivity of *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* BAA 1706. The bacteria with the best antagonistic response was *B. parabrevis*, and the most susceptible bacteria to these antagonistic activities was *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545. This study demonstrated for the first time that *Bacillus* bacteria from the Tayos Cave have effective antagonistic mechanisms against antimicrobial resistant strains of *E. coli*.

Keywords: antagonistic bacteria, antagonistic response, antimicrobial resistance, enteric bacteria, Tayos Cave.

3. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antimicrobianos es una de las mayores amenazas para la salud mundial (Wallace, Fishbein, y Dantas, 2020). Esta resistencia antimicrobiana ocurre cuando los microorganismos desarrollan la capacidad de resistir tratamientos diseñados para su inhibición, por lo tanto, infecciones por parte de estos microorganismos pueden ser difíciles y hasta imposibles de tratar (Centers for Disease Control and Prevention, 2022). En la última década, se ha evidenciado un aumento importante de la aparición de especies microbianas multirresistentes a nivel global (Nájera y Fierro, 2019). El sobreuso de terapias antimicrobianas estándar (Ortega, 2010), la síntesis masiva de antibióticos, y la capacidad adaptativa de las bacterias debido a cambios cromosómicos o intercambios genéticos a través de plásmidos y transposones (Neu, 1992), dan lugar a la aparición de especies multirresistentes (Kebede, Aragie, y Shimelis, 2017). En Ecuador, este hecho es sumamente preocupante, sobre todo luego de demostrar la presencia de *E. coli* multirresistentes en el río Machángara de Quito (Ortega et al., 2020), y en granjas y canales de pollos (Ortega et al., 2020), esto implica que los múltiples reservorios ambientales facilitan su evolución y transmisión de la resistencia (Wallace, Fishbein, y Dantas, 2020). Por lo anteriormente expuesto, métodos alternativos para el control de bacterias multirresistentes deben desarrollarse de manera prioritaria, puesto que las estimaciones indican que para el año 2050 no habrá antibióticos efectivos disponibles contra estos patógenos (Vivas, Teixeira, Santana, y Jain, 2019).

Las interacciones antagónicas son abundantes en las comunidades microbianas, y contribuyen tanto a la composición, proporciones relativas de sus miembros como la estabilidad a largo plazo de una comunidad (García y Comstock, 2018). La estrategia evolutiva ha permitido que las bacterias cuenten con mecanismos que limiten el crecimiento de sus competidores para mejorar su disponibilidad de recursos (Russel, Roder, Madsen, y Sorensen, 2017). Uno de los enfoques que ha tomado el desarrollo de métodos alternativos ha sido el estudio de mecanismos antagónicos de bacterias que intervienen en la propagación y supervivencia de patógenos, generalmente mediados por el uso de una amplia

variedad de antimicrobianos, tales como metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (Feichtmayer, Deng, y Griebler, 2017).

Algunos mecanismos antagónicos que presentan las bacterias son las quinasas bacterianas, las cuales presentan actividades antimicrobianas (Bhattacharya, Nagpure, y Gupta, 2007), otros mecanismos estudiados son los probióticos de unión a toxinas, que bloquean interacciones entre el patógeno y el receptor (Paton, Morona, y Paton, 2009). Con el creciente interés y la llegada de estudios a nivel genómico, la tasa de descubrimientos de mecanismos de antagonismo interbacteriano ha aumentado de manera considerable, dado que se ha demostrado que todos los principales filos bacterianos poseen vías antagónicas, incluidos mecanismos dependientes o independientes de contacto interbacteriano (Peterson, Bertolli, y Mougous, 2020).

Los organismos que habitan la Cueva de los Tayos han desarrollado adaptaciones especiales para vivir en condiciones de oscuridad, humedad y variaciones de temperatura (Suárez, 2020). Los reportes científicos enfocados a los análisis microbiológicos de la Cueva de los Tayos han sido escasos, esto se debe a su acceso limitado por su ubicación geográfica, condiciones de su entorno y por el control gubernamental para su acceso (Constantin, Toulkeridis, Moldovan, Villacís, y Addison, 2019).

La expedición científica a la Cueva de los Tayos, realizada en 1976, permitió dilucidar que los futuros estudios interdisciplinarios en la cueva, serán de mucha importancia para el Ecuador y el mundo por los potenciales descubrimientos arqueológicos, ecológicos y microbiológicos (Sampedro, 1977). Sin embargo, el estado del arte y perspectivas de investigación sobre estudios espeleológicos, advierten que aún existen desafíos relacionados con la investigación de cuevas en el Ecuador (Constantin, Toulkeridis, Moldovan, Villacís, y Addison, 2019). Inclusive a día de hoy existen diversas limitaciones que impiden un progreso continuo del conocimiento de la cueva; en otros países, las investigaciones científicas dirigidas al estudio de la diversidad y actividad microbiana de las cuevas, han permitido generar una importancia ambiental, ecológica y turística a la conformación microbiológica de las cuevas (Adetutu y Ball, 2014).

Zada *et al.* (2021) describen a los microorganismos de cuevas como potenciales fuentes de desarrollo de fármacos. En la última exploración científica de la Cueva de los Tayos conformada por el Laboratorio de Microbiológica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE, los aislados bacterianos recolectados del nicho ecológico fueron aprovechados para investigaciones *in vitro* con el objetivo de encontrar controladores biológicos frente a fitopatógenos, encontrándose que los aislados de *Bacillus lincheniformis* y *Brevibacillus parabrevis* son efectivos para el control de *Botrytis cinérea* y *Fusarium oxysporum* respectivamente (Suárez, 2020). *Bacillus* spp. es el género mayormente implicado en el control fitopatológico, estas bacterias tienen actividades antagónicas de amplio espectro frente a bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas, tales como *Vibrio cholera*, *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* (Kumar y Rana, 2017).

Debido al alarmante aumento de la multirresistencia encontrada en bacterias patógenas (Yang, Ye, Qi, Ying, y Xia, 2021), se hace necesario buscar fuentes naturales y efectivas de alternativas al uso de antibióticos convencionales. Dado que, los ecosistemas de cuevas, por sus condiciones oligotróficas, aumentan la competencia entre sus comunidades microbianas, y son consideradas fuentes únicas de agentes antimicrobianos (Zada et al., 2022), surge la necesidad de estudiar si es posible que los aislados bacterianos de la Cueva de los Tayos puedan presentar efectos antagónicos sobre bacterias entéricas multirresistentes.

El presente trabajo investigativo apuntó a ser uno de los primeros estudios científicos sobre el análisis microbiológico de la Cueva de los Tayos enfocado en su aplicación biomédica en la resolución de problemas clínicos. Además, se evaluó el efecto antagónico de bacterias provenientes de esta Cueva sobre bacterias entéricas multirresistentes. Por ello en la presente disertación se evaluó la potencial actividad antagónica de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a bacterias entéricas, como posible solución a la creciente aparición de especies multirresistentes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la potencial actividad antagónica de cepas bacterianas aisladas de la Cueva de los Tayos frente a bacterias entéricas, como posible solución a la creciente aparición de especies multirresistentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comprobar la identificación de las bacterias provenientes de la Cueva de los Tayos y de las bacterias entéricas.
- Comprobar la resistencia de las bacterias entéricas investigadas frente a antibióticos.
- Medir el potencial antagónico de los aislados bacterianos de la Cueva de los Tayos frente a las bacterias entéricas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Las especies bacterianas reactivadas de los géneros *Bacillus* y *Acinetobacter*, provenientes de la última exploración a la Cueva de los Tayos fueron utilizadas en la investigación. Según la base de datos del Laboratorio de Microbiología, estos aislados bacterianos correspondían a las especies *Bacillus pumilus*, *Bacillus lincheniformis*, *Lysinbacillus fusiformis*, *Brevibacillus parabrevis*, *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter haemolyticus*.

Para probar el efecto antagónico de las bacterias anteriormente mencionadas, se escogieron tres especies bacterianas con distintos tipos de resistencia, estas son: *Escherichia coli* productora de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) y *Escherichia coli* resistente a colistina. Además, se utilizaron dos especies American Type Culture Collection (ATCC) como controles, estas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* BAA 1706.

4.2. REACTIVACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las poblaciones bacterianas utilizadas en este estudio permanecían almacenadas y conservadas en la Colección Bacteriana Quito Católica de la PUCE, por lo que en primera instancia se ejecutó un proceso de reactivación de dichas bacterias. En este proceso, se transfirieron asépticamente 200 μ m de las conservas almacenadas por congelación en 5 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), luego se los incubó a 37 °C por 24 horas. Posteriormente las bacterias fueron sembradas por estría discontinua, en Agar Nutriente para las bacterias provenientes de los Tayos y Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) para las bacterias entéricas, e incubadas nuevamente bajo las condiciones anteriormente descritas. Luego de las 24 horas de siembra, algunos de los cultivos presentaron más de una colonia diferente, cada una de esas colonias fueron sembradas nuevamente en Agar Nutriente a fin de obtener cultivos puros.

4.3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS AISLADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS

Se realizaron pruebas bioquímicas para la identificación preliminar de cada especie bacteriana proveniente de la Cueva de los Tayos, de esta manera se comprobó su identidad específica.

Para las bacterias del género *Bacillus* se aplicaron las siguientes pruebas: Tinción Gram, prueba de reducción de nitratos, prueba de Voges-Proskauer (VP), prueba de catalasa, prueba de oxidasa y prueba de hidrolisis de almidón (Calvo y Zúñiga, 2010). Para la identificación a nivel de especie, se compararon los resultados obtenidos, con resultados de los estudios de Parvathi et al. (2009), Banoon y Ali (2018), Hamzah (2019) y Nehra, Saharan y Choudhary (2016).

Para el género *Acinetobacter* se utilizaron las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de Citrato de Simmons y prueba de oxidación-fermentación (Constantiniu, Romaniuc, Iancu, Filimon, y Tarasi, 2004). La identificación a nivel de especie se llevó a cabo mediante la comparación de los estudios de Constantiniu et al. (2004), y de Gupta, Gandham, Jadhav y Mishra (2015).

4.4. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS BACTERIAS ENTÉRICAS

La identificación bioquímica de las especies bacterianas entéricas multirresistentes y sensibles, se definió con las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de citrato de Simmons, prueba de Hierro Triple Azúcar (TSI), prueba de Motilidad Indol Sulfuro (SIM), prueba de Rojo Metilo (RM), prueba de Voges-Proskauer (VP), prueba de urea, prueba de fenilalanina y prueba de lisina.

4.5. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

A fin de complementar las pruebas bioquímicas para identificar las especies de las bacterias utilizadas en esta investigación, cada bacteria fue nuevamente

reaislada en Agar Nutriente para su respectiva confirmación por el método de espectrometría de masas por Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz acoplado al analizador TOF (MALDI-TOF). Este procedimiento fue llevado a cabo en el Centro de Investigación Microbiológica (CIM).

4.6. CONFIRMACIÓN FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) Y PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS *IN VITRO*

A fin de comprobar la producción de BLEE en *E. coli* se utilizó el método de difusión por disco basado en el procedimiento del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) del 2023. Para ello se emplearon los discos de ceftazidime (CAZ) de 30 μ g; ceftazidime/clavulanato (CAZ/CLA) de 30/10 μ g, cefotaxime (CTX) de 30 μ g y cefotaxime/clavulanato (CTX/CLA) de 30/10 μ g. En base a los protocolos impuestos por el CLSI, aquellos aislados que presentaron un aumento de ≤ 5 mm de halo de inhibición de la cefalosporina de tercera generación (CG3) en combinación con clavulanato, fueron considerados positivos para la producción de BLEE (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023).

4.7. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

Para la detección fenotípica de carbapenemasas se empleó el método de inactivación de disco de Meropenem del CLSI (2023), que detecta la producción de carbapenemasas en aislados de enterobacterias (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023). Para ello, se preparó una dilución 0,5 en la escala de Mc Farland de una cepa *E. coli* ATCC 25922 en 5ml de caldo Müeller Hinton (MHB), dicha cepa sirvió como indicador de susceptibilidad. Se utilizaron discos de Meropenem de 10 μ g, y asas de siembra desechables de 1 μ l para tomar dicha cantidad de los aislados entéricos objetos de este análisis. Un resultado positivo se evidenció por la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco de Meropenem de ≤ 15 mm de diámetro (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023).

4.8. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

Siguiendo el protocolo interno del Laboratorio de Microbiología de la PUCE; las cepas fueron conservadas a través del método de congelación, para lo cual se realizaron suspensiones de las bacterias utilizadas en BHI, para luego de ser incubadas a 37 °C por 18 horas, añadir glicerol estéril. Mediante el proceso anterior se obtuvieron alícuotas que fueron transferidas en copias a microtubos estériles para ser congeladas y mantenidas a -20 °C.

4.9. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

La prueba antagónica consistió en una difusión en agar de las suspensiones en BHI (200 µl/ 5ml) de las bacterias provenientes de la Cueva de los Tayos. Cada una de las especies bacterianas entéricas multirresistentes y sensibles fueron cultivados en Agar Müeller Hinton en placas de antibiogramas, con una concentración de bacterias ajustada a $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml. En cada sección de la placa se realizaron perforaciones para formar pocillos de $8,28 \pm 0,46$ mm en los que se colocaron respectivamente 100 µl de la suspensión de las seis especies de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos. Todos los cultivos fueron incubados a 37 °C durante 72 horas, cada placa contó con cuatro repeticiones.

4.10. DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento fue diseñado en Parcelas Divididas con tres bacterias entéricas resistentes, tres bacterias entéricas sensibles, seis tratamientos (bacterias de la Cueva de los Tayos), y cuatro repeticiones (González, 1986). Las parcelas o plots correspondieron a las seis placas de antibiograma en las que se sembraron las seis especies de bacterias entéricas. Las subparcelas correspondieron a los pocillos en los que se añadió las suspensiones. La variable de respuesta consistió en el diámetro de los halos de inhibición, los cuales fueron medidos con un calibrador digital de precisión ± 0.01 mm. El conjunto de datos analizados fueron 144 (seis bacterias entéricas*seis bacterias de la Cueva de los tayos*cuatro repeticiones).

4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados para las pruebas de antagonismo, se consideró tratamientos a las Bacterias de las Cuevas de los Tayos porque estas generaron resistencia de crecimiento sobre las bacterias entéricas multirresistentes y sensibles. Según la prueba de Saphiro-Wilks, los residuos de la variable de respuesta (halos de inhibición) presentaron distribución normal (Tabla 1), por lo que se realizó un análisis de varianza paramétrico (Prueba de Fisher) y una prueba de comparación de medias *a posteriori* mediante el método de diferencia mínima significativa (LSD, por sus siglas en inglés) (Balzarini, y otros, 2020).

Tabla 1. Distribución normal de la variable de respuesta

Bacterias de la Cueva de los Tayos	W*	P (Unilateral D)
<i>Bacillus lincheniformis</i>	0,95	0,71
<i>Bacillus pumilus</i>	0,90	0,15
<i>Lysinibacillus xylaniticus</i>	0,91	0,23
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	0,96	0,76

W*, estadístico de Saphiro-Wilks. Los valores de $p > 0,05$ demuestran que la distribución de la variable es normal.

En todos los casos, el nivel de decisión α fue de 0,05 y el software utilizado para los análisis estadísticos fue InfoStat ® 2020 con interfase en R (Di Rienzo et al., 2020).

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS AISLADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS

Las pruebas bioquímicas a las que fueron sometidas las bacterias de la Cueva de los Tayos permitieron corroborar la identidad específica de la mayoría de las bacterias utilizadas en este estudio.

En el caso de las bacterias del género *Bacillus*, las pruebas bioquímicas permitieron corroborar la identidad específica en un 75% (Tabla 2). Las respuestas bioquímicas de *Lisinibacillus fusiformis*, no correspondió a las características metabólicas de las especies.

Tabla 2. Tinción Gram e identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias del género *Bacillus* provenientes de la Cueva de los Tayos

Codificación interna/especie	Tinción Gram	Reducción de nitratos	Voges Proskauer	Catalasa	Oxidasa	Hidrolisis de almidón	Identificación
5588/ <i>Bacillus pumilus</i>	bacilos Gram +	+	+	+	+	-	<i>Bacillus pumilus</i>
5589/ <i>Bacillus lincheniformis</i>	bacilos Gram +	+	+	+	-	+	<i>Bacillus lincheniformis</i>
5599/ <i>Lisinibacillus fusiformis</i>	bacilos Gram +	+	-	+	-	-	<i>Lisinibacillus</i> sp.
5613/ <i>Brevibacillus parabrevis</i>	bacilos Gram +	+	-	+	-	-	<i>Brevibacillus parabrevis</i>

+, reacción positiva; - reacción negativa.

Las pruebas bioquímicas aplicadas a las especies del género *Acinetobacter* permitieron verificar la identidad específica de *Acinetobacter baumannii*; por otra parte, la bacteria identificada previamente como *Acinetobacter haemolyticus* presentó las características morfológicas de la especie, pero las características bioquímicas fueron diferentes (Tabla 3).

Tabla 3. Tinción Gram e identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias del género *Acinetobacter* provenientes de la Cueva de los Tayos

Codificación interna/especie	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	Citrato de Simmons	Oxidación-Fermentación		Identificación
					Aerobio	Anaerobio	
5603B/ <i>Acinetobacter baumannii</i>	Bacilos cortos Gram -	+	-	+	Vía oxidativa	Vía Oxidativa	<i>Acinetobacter baumannii</i> .
5611B/ <i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Bacilos cortos Gram +	+	-	-	Vía oxidativa	Vía Oxidativa	<i>Acinetobacter</i> sp.

+, reacción positiva; - reacción negativa; Aerobio, reacción en aerobiosis; Anaerobio, reacción en anaerobiosis.

5.2. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE BACTERIAS ENTÉRICAS

Mediante las pruebas bioquímicas utilizadas, se ratificaron el 100 % de las especies de las bacterias entéricas utilizadas en el presente estudio (tabla 4).

Tabla 4. Identificación bioquímica a nivel de especie de bacterias entéricas empleadas

Bacterias	C i	TSI			SIM			R M	V P	Ur	Fn	Li	Re identificación
		N/N	H2S	Gas	Mt	H2S	Indol						
<i>E. coli</i> BLEE	-	A/A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella</i> KPC	+	A/A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>E. coli</i> resistente a colistina	-	A/A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	A/A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella</i> sensible	+	A/A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	A/A	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>

+, reacción positiva; - reacción negativa; Ci, prueba de Citrato de Simmons; TSI, prueba de Hierro Triple Azúcar; N/N, lectura de la base y el ápice; H2S, producción de ácido sulfhídrico; Gas; producción de gas; Mt, Motilidad; Indol; producción de Indol; RM, prueba de Rojo Metilo; VP, Prueba

de Voges-Proskauer; Ur, prueba de urea; prueba de Fenilalanina; Li, prueba de Lisina; BLEE, bacteria productora de β -Lactamasas de Espectro Extendido; KPC, *Klebsiella* Productora de Carbapenemasas; ATCC, American Type Culture Collection.

5.3. REIDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ASILADAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS

El espectrómetro de masas MALDI-TOF permitió corroborar la identidad de tres bacterias del género *Bacillus*. Además, asignó las especies *Lisinibacillus xynaliticus*, *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter vivianii* para las bacterias que con las pruebas bioquímicas fueron identificadas como *Lisinibacillus* sp., *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter* sp. respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Reidentificación de las especies bacterianas de la Cueva de los Tayos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Código	Identificación de estudios previos	Identificación bioquímica	Identificación con MALDI-TOF
5588	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>pumilus</i>	<i>pumilus</i>	<i>pumilus</i>
5589	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>lincheniformis</i>	<i>lincheniformis</i>	<i>lincheniformis</i>
5599	<i>Lisinibacillus</i>	<i>Lisinibacillus</i> sp.	<i>Lisinibacillus</i>
	<i>fusiformis</i>		<i>xynaliticus</i>
5603B	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Proteus</i>
	<i>baumannii</i>	<i>baumannii</i>	<i>mirabilis</i>
5611B	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i>
	<i>haemolyticus</i>		<i>vivianii</i>
5613	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i>
	<i>parabrevis</i>	<i>parabrevis</i>	<i>parabrevis</i>

5.4. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE)

Las tablas 6 y 7 muestran el proceso de interpretación de los antibiogramas para determinar fenotípicamente la producción de BLEE de las especies de *E. coli* utilizadas para los ensayos (Figura 1).

Se comprobó que la cepa *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545 es en efecto productora de BLEE (Tabla 6). Los antibiogramas también corroboraron fenotípicamente que *E. coli* ATCC 25922 no es productora de BLEE (Figura 1).

Tabla 6. Detección fenotípica de producción de BLEE en *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545

Clase de β -Lactámicos	Antibiótico	Sigla	Criterios en base al halo de inhibición (CLSI, 2023)	Halos de inhibición	Interpretación
Cefalosporina de tercera generación	Ceftadime	CAZ	≤ 22 mm	27,11 mm	-
Cefalosporina de tercera generación	Ceftazidime/clavulanato	CAZ/CLA	Aumento ≥ 5 mm	30,96 mm	-
Cefalosporina de tercera generación	Cefotaxime	CTX	≤ 27 mm	17,3 mm	+
Cefalosporina de tercera generación	Cefotaxime/clavulanato	CTX/CLA	Aumento ≥ 5 mm	33,22 mm	+

+, reacción positiva; - reacción negativa; \leq , menor o igual; \geq mayor o igual.

Tabla 7. Detección fenotípica de producción de BLEE en *E. coli* ATCC 25922

Clase de β -Lactámicos	Antibiótico	Sigla	Criterios en base al halo de inhibición (CLSI, 2023)	Halos de inhibición	Interpretación
Cefalosporina de tercera generación	Ceftzadime	CAZ	≤ 22 mm	31,34 mm	-
Cefalosporina de tercera generación	Ceftazidime/clavulanato	CAZ/CLA	Aumento ≥ 5 mm	31,09 mm	-
Cefalosporina de tercera generación	Cefotaxime	CTX	≤ 27 mm	33,07 mm	-
Cefalosporina de tercera generación	Cefotaxime/clavulanato	CTX/CLA	Aumento ≥ 5 mm	33,30 mm	-

+, reacción positiva; - reacción negativa; \leq , menor o igual; \geq mayor o igual.

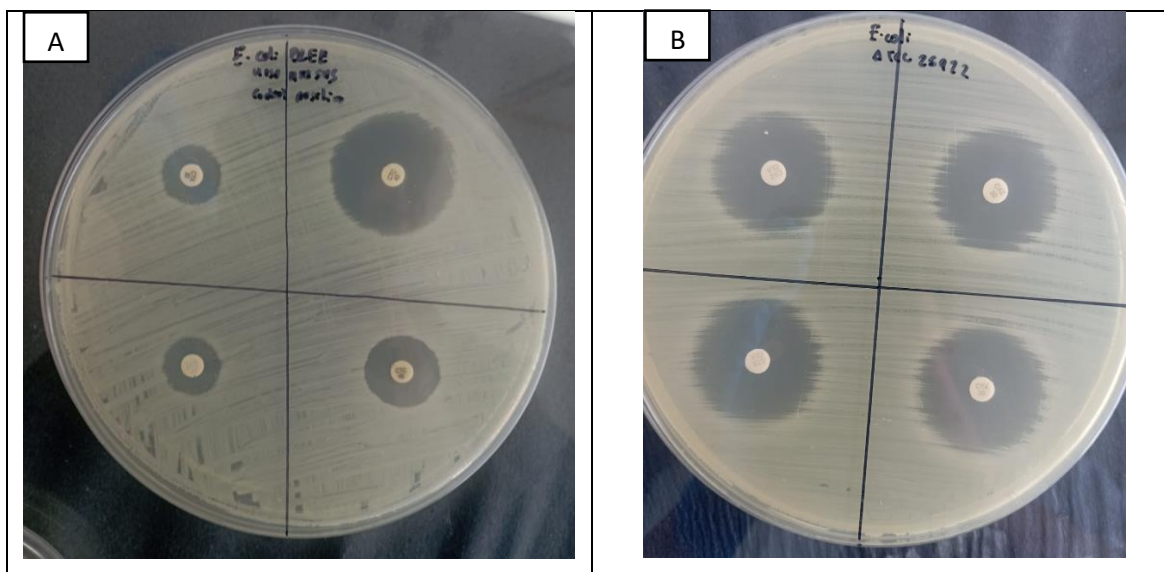


Figura 1. Antibiogramas para detección fenotípica de producción de BLEE. A, en *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545; B, en *E. coli* ATCC 25922.

5.5. DETECCIÓN FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASAS

En primera instancia, se corroboró fenotípicamente que *Klebsiella pneumoniae* ATCC KPC es productora de carbapenemasas (Tabla 8); sin embargo,

en base a los criterios del CLSI, dicha corroboración fue reportada como indeterminada. Aun así, debido a pruebas anteriormente registradas en la base de datos del Laboratorio de Microbiología, que involucraron métodos moleculares, se aceptó que dicha bacteria cuenta con el gen *bla*_{KPC}.

De manera similar, en base a los criterios del CLSI, la detección fenotípica de carbapenemasas en *K. pneumoniae* BAA 1706 fue reportada como indeterminada (Tabla 9), debido a la presencia de un crecimiento alrededor del disco de meropenem en el antibiograma (Figura 2). Contrariamente al caso de *Klebsiella pneumoniae* ATCC KPC, los métodos moleculares registrados en la base de datos del Laboratorio de Microbiología no han determinado la presencia del gen *bla*_{KPC} en dicha especie.

Tabla 8. Detección fenotípica de producción de carbapenemasas en *K. pneumoniae* ATCC KPC

Clase de carpememico	Antibiótico	Sigla	Criterios en base al halo de inhibición (CLSI, 2023)	Halos de inhibición	Interpretación
Carbapenem semisintético	Meropenem	MEM	6-15 mm = carbapenemasa positivo ≥ 19 mm = carbapenemasa negativo 16-18 mm = carbapenemasa indeterminada	17,6 mm	Indeterminado

+, reacción positiva; - reacción negativa; ≤, menor o igual; ≥ mayor o igual.

Tabla 9. Detección fenotípica de producción de carbapenemasas en *K. pneumoniae* BAA 1706

Clase de carpenémico	Antibiótico	Sigla	Criterios en base al halo de inhibición (CLSI, 2023)	Halos de inhibición	Interpretación
Carbapenem semisintético	Meropenem	MEM	6-15 mm = carbapenemasa positivo ≥ 19 mm = carbapenemasa negativo 16-18 mm = carbapenemasa indeterminada	20 mm (Crecimiento alrededor del disco)	Indeterminado

+, reacción positiva; - reacción negativa; ≤, menor o igual; ≥ mayor o igual.

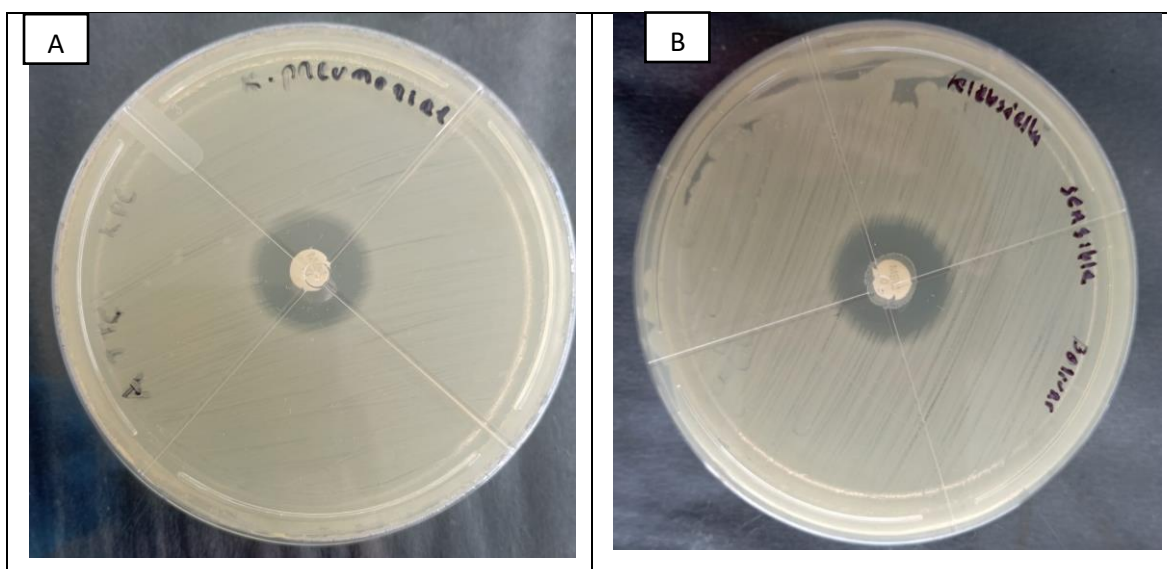


Figura 2. Antibiógramas para detección fenotípica de producción de carbapenemasas. A, en *K. pneumoniae* ATCC KPC; B, en *K. pneumoniae* BAA 1706.

5.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

Los ensayos antagónicos fueron observados a las 24 y 72 horas. A las 24 horas no se observaron halos de inhibición que afecten el crecimiento de las bacterias entéricas. Las relaciones antagónicas entre las bacterias de la Cueva de los Tayos y las bacterias entéricas se observaron a las 72 horas, con ciertas peculiaridades en cada ensayo.

A pesar del crecimiento bacteriano observado alrededor de los pocillos, ninguna de las bacterias de la Cueva de los Tayos presentó fenotípicamente actividad antagónica frente a las bacterias del género *Klebsiella*, independientemente si las cepas utilizadas fueron resistentes o sensibles (Figura 3).

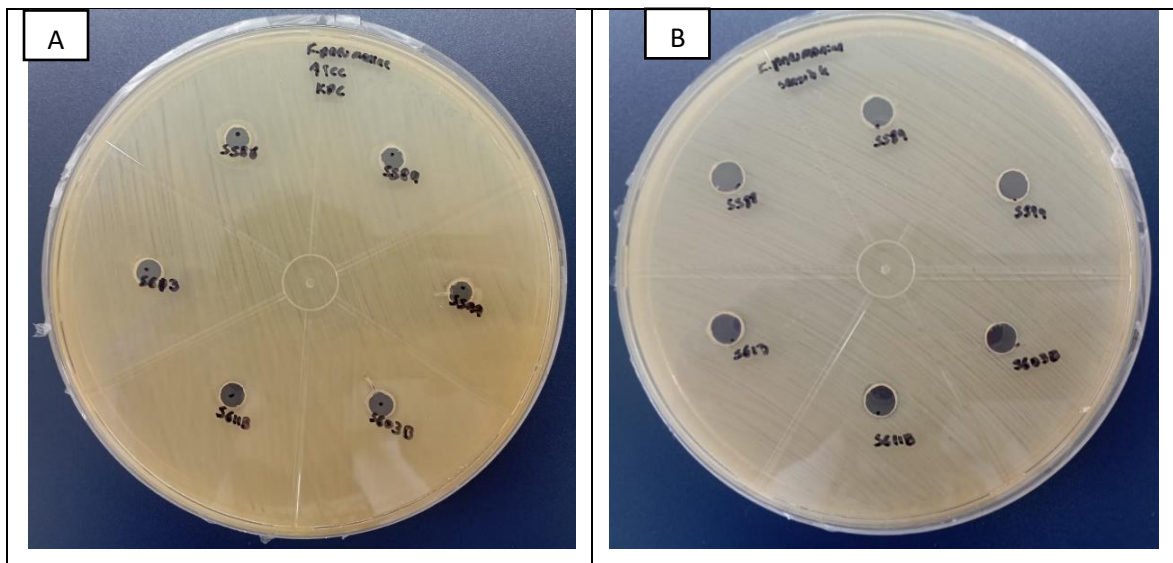


Figura 3. Pruebas de antagonismo de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a *Klebsiella pneumoniae*. A, frente a *K. pneumoniae* ATCC KPC (cepa resistente a carbapenémicos); B, frente a *K. pneumoniae* BAA 1706 (cepa sensible a carbapenémicos).

Por otro lado, las bacterias de la Cueva de los Tayos si presentaron antagonismo frente a las especies de *E. coli*. El efecto antagónico se observó 72 horas después de la inoculación de los pocillos con las suspensiones de las

especies bacterianas de la Cueva de los Tayos, lo que generó que los halos de inhibición varíen entre los ensayos, tanto en tamaño como en translucidez.

Los halos de inhibición observados en el ensayo antagónico frente a *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545 (cepa multirresistente) presentaron mayor translucidez que los halos de los otros ensayos en *E. coli* ATCC 25922 y *E. coli* resistente a colistina.

Los halos de inhibición de los ensayos antagónicos frente a *E. coli* resistente a colistina fueron menos translucidos con respecto a los halos del ensayo anteriormente descrito y presentaron variaciones en el tamaño de los mismos.

Los halos de inhibición de los ensayos antagónicos frente a *E. coli* ATCC 25922, también contaron con una translucidez menor y con variaciones de los diámetros de los halos (Figura 4).

Bacillus pumilus, *B. lincheniformis*, *Lisinibacillus xylaniticus* y *Brevibacillus parabrevis* presentaron actividad antagónica sobre todas las variantes de *E. coli* evaluadas en esta tesis. Durante estos ensayos, también se demostró que *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter vivianii* no presentaron ninguna actividad antagónica sobre *E. coli*, debido a la ausencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos de inoculación (Figura 4).

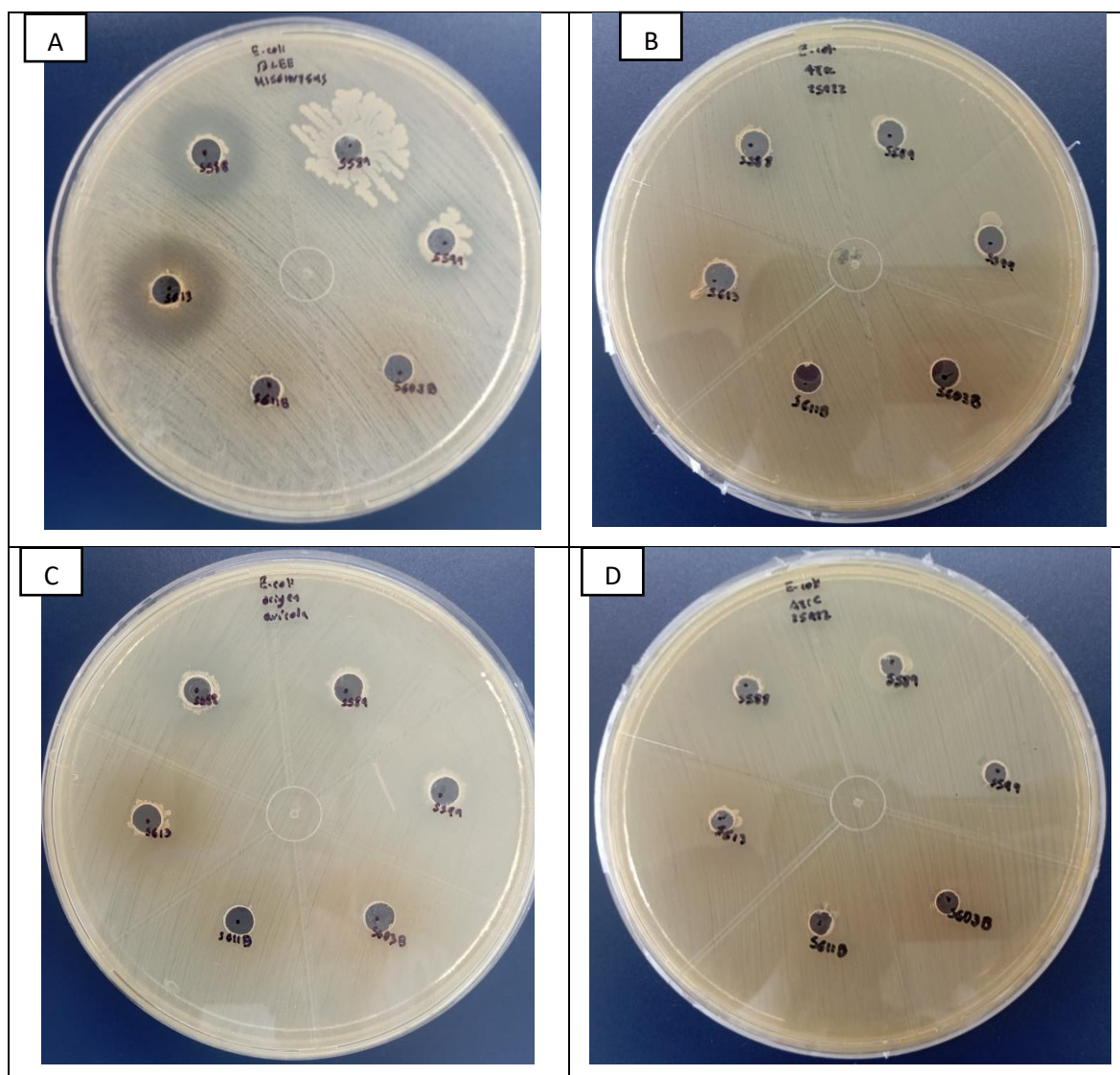


Figura 4. Variación de las respuestas antagonicas de bacterias aisladas de la Cueva de los Tayos frente a *Escherichia coli*. A, frente a *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545 (cepa resistente a betalactámicos); B, frente a *E. coli* ATCC 25922 (cepa sensible a betalactámicos); C, frente a *E. coli* resistente a colistina; D, frente a *E. coli* ATCC 25922.

En la tabla 10 se presenta un resumen del análisis de la varianza y de la prueba de comparación de medias *a posteriori* LSD de comparación de medias de los ensayos antagonicos ejecutados en este estudio.

Tabla 10. Pruebas de Fisher (ADEVA) y comparación de medias LSD (\pm error estándar) del antagonismo de las bacterias de la Cueva de los Tayos frente a las bacterias entéricas.

Bacterias de la Cueva de los Tayos	ADEVA	Bacterias entéricas		
		E. c. COL	E. c. BLEE	E. c. ATCC
<i>Bacillus lincheniformis</i>	$F_{2,13} = 0,85$; $p = 0.448$	25,23 ($\pm 1,25$) A	26,61 ($\pm 0,37$) A	29,12 ($\pm 2,4$) A
<i>Bacillus pumillus</i>	$F_{2,13} = 7,12$; $p = 0.008$	19,36 ($\pm 1,07$) A	27,73 ($\pm 2,93$) B	20,89 ($\pm 0,81$) A
<i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	$F_{2,13} = 25,53$; $p < 0.001$	16 ($\pm 0,8$) A	24,2 ($\pm 1,95$) B	12,9 ($\pm 0,78$) A
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	$F_{2,13} = 1,35$; $p = 0.292$	28,77 ($\pm 1,64$) A	34,63 ($\pm 2,28$) A	33,31 ($\pm 2,26$) A

ADEVA, Análisis de la varianza; E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection; F, valor de la prueba de Fisher (los subíndices representan a los grados de libertad); p, valor de la probabilidad. Letras distintas entre filas representan diferencias significativas al 5 %.

Bacillus lincheniformis y *Brevibacillus parabrevis* no mostraron diferencias significativas en los diámetros de inhibición medios provocados sobre las bacterias entéricas evaluadas (Tabla 10). *Bacillus lincheniformis* generó el tamaño medio más alto del halo de inhibición sobre *E. coli* ATCC (Figura 5); mientras que, *Brevibacillus parabrevis* generó el valor medio más alto del halo de inhibición sobre *E. coli* BLEE (Figura 6).

Bacillus pumilus y *Lysinibacillus xylaniliticus* presentaron diferencias significativas en los diámetros de inhibición medios generados a las tres cepas de *E. coli* evaluadas (Tabla 10). Estas dos especies del género *Bacillus* de la Cueva de los Tayos presentaron el tamaño medio más alto del halo de inhibición sobre *E. coli* BLEE (Figura 7 y Figura 8).

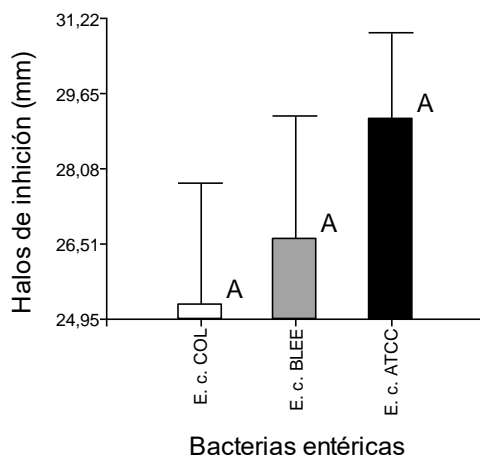


Figura 5. Antagonismo de *Bacillus lincheniformis* sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm. E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection. Letras similares de las barras del histograma indican que no hubo diferencias significativas en la prueba LSD al 5 %.

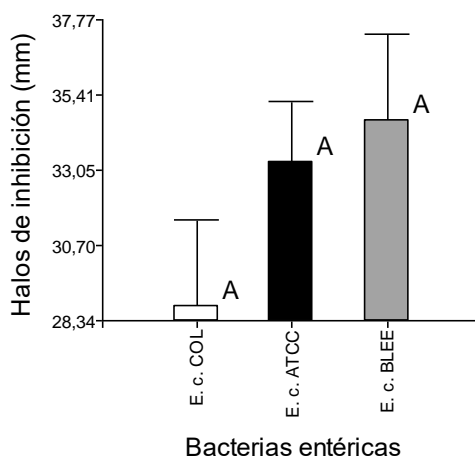


Figura 6. Antagonismo de *Brevibacillus parabrevis* sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm. E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection. Letras similares de las barras del histograma indican que no hubo diferencias significativas en la prueba LSD al 5 %.

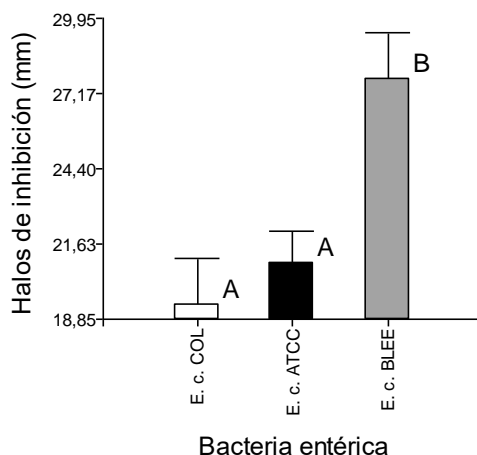


Figura 7. Antagonismo de *Bacillus pumilus* sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm. E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection. Letras diferentes de las barras del histograma indican que hubo diferencias significativas en la prueba LSD al 5 %.

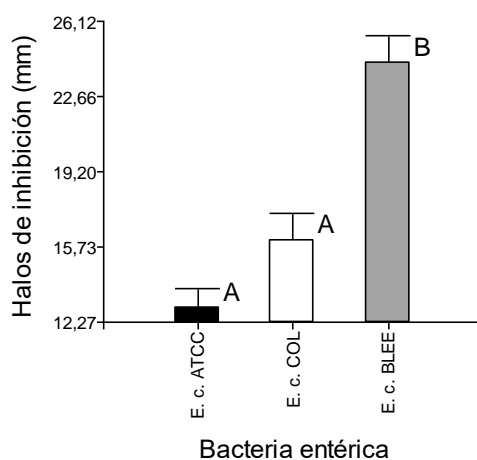


Figura 8. Antagonismo de *Lysinibacillus xynaliticus* sobre bacterias entéricas medido a través del halo de inhibición en mm. E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection. Letras diferentes de las barras del histograma indican que hubo diferencias significativas en la prueba LSD al 5 %.

Al comparar las respuestas antagónicas entre bacterias del género *Bacillus* se encontró que *Brevibacillus parabrevis* presentó los halos de inhibición de mayor

diámetro, seguida de *Bacillus lincheniformis*, *B. pumilus* y *Lysinibacillus xylanilyticus* respectivamente (Figura 9).

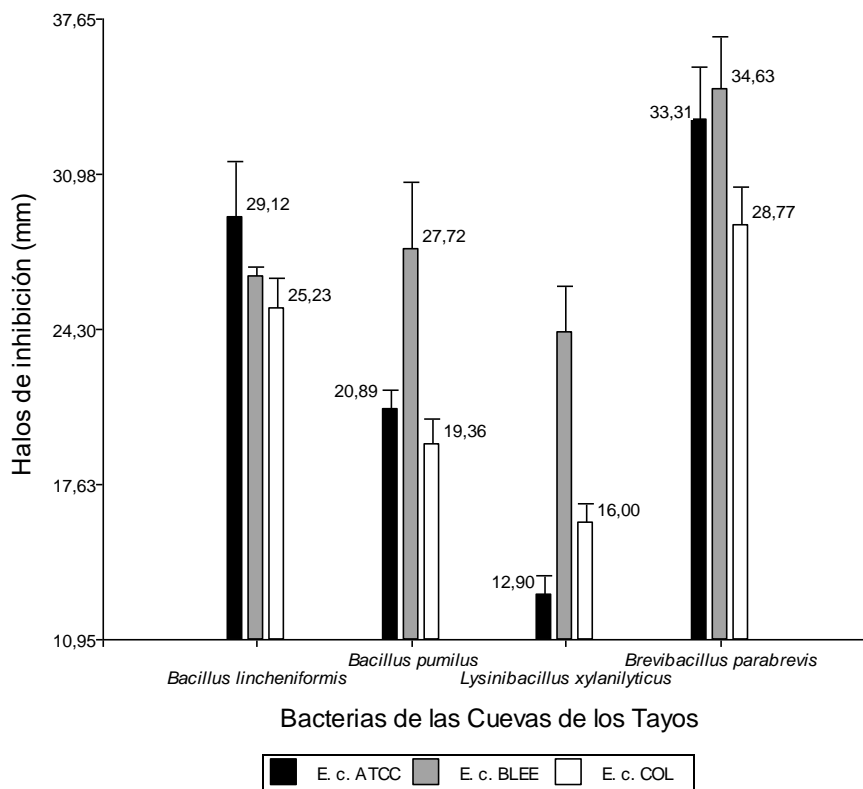


Figura 9. Comparación de la respuesta antagónica entre las bacterias de la Cueva de los Tayos sobre bacterias entéricas. E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection. Los números sobre las barras representan los promedios de los diámetros de los halos de inhibición.

6. DISCUSIÓN

6.1. IDENTIDAD DE BACTERIAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS Y BACTERIAS ENTÉRICAS

A pesar de las cuevas sean ambientes extremos y oligotróficos, diversos estudios han demostrado que una gran diversidad de microorganismos es capaz de habitar y prosperar en hábitats de las cuevas (Kosznik-Kwasnicka, Golec, Jaroszewicz, Lubomska, y Piechowicz, 2022). Debido al creciente interés en el estudio espeleológico, varias investigaciones han sido enfocadas al estudio de la diversidad microbiana de las cuevas. Mediante el uso de técnicas metagenómicas, como la secuenciación de genes ARNr 16S y secuenciación shotgun, se ha demostrado que los ambientes de las cuevas son habitados por varios phyla bacterianos tales como: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Acidobacteria (Turrini et al., 2020).

Las bacterias provenientes de la Cueva de los Tayos, sujeto de estudio de la presente disertación, pertenecen a los phyla Firmicutes y Proteobacteria, la identidad específica a la que pertenecen las bacterias antagónicas son *Bacillus pumilus*, *Bacillus lincheniformis*, *Lisinibacillus xylaniticus*, *Brevibacillus parabrevis* (phylum Firmicutes), *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter viviani* (phylum Proteobacteria). Esta identificación permite demostrar que la composición microbiana de la Cueva de los Tayos incluye a bacterias pertenecientes al filo Proteobacteria y Firmicutes.

La identificación bioquímica de las bacterias empeladas en el estudio fue utilizada como un método fenotípico de identificación preliminar, basadas en las características observables de las bacterias, como morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas o metabólicas (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, y Valdezate, 2011). Sin embargo, estas pruebas suelen ser limitadas y no revelan con precisión la diferencia entre microorganismos (Tsang, 2020). En el presente estudio, tres de las seis especies bacterianas previamente identificadas en la Colección Bacteriana Quito Católica de la PUCE fueron reidentificadas con

métodos más precisos que permitieron una mayor discriminación para la identificación de las bacterias.

Específicamente, la espectrometría de masas MALDI-TOF, es un método basado en la proteómica, es decir, es un estudio basado en la caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, y Valdezate, 2011). La espectrometría de masas MALDI-TOF, elaborada por el Centro de Investigación Microbiológica de Guayaquil, permitió obtener un resultado más exacto en cuanto a la identificación específica de las bacterianas de la Cueva de los Tayos, cabe recalcar que MALDI-TOF es un análisis preciso de los elementos químicos propios de cada especie bacteriana basado en la medición de iones derivados de moléculas, separándolos en función de su relación masa/carga (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, y Valdezate, 2011). Por ende, debido al mayor poder discriminativo de MALDI-TIF, se aceptó la idoneidad de las identificaciones de especies bacterianas a partir de este método de espectrometría de masas.

6.2. BACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y CARBAPENEMASAS

El método de difusión de disco confirmó de manera observable y medible la producción de BLEE por parte de *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545. A pesar de que el diámetro del halo de inhibición provocado por la difusión del disco de ceftazidime es ligeramente superior a los criterios del CLSI (Figura 1) se confirma la producción de BLEE, pues el mismo CLSI sugiere que un resultado ligeramente por encima de sus criterios podría también indicar la producción de esta enzima (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

Así mismo, se observaron las carencias fenotípicas de resistencia por parte de *E. coli* ATCC 25922, en este caso cumpliendo todos los criterios establecidos por el CLSI (Tabla 7). Adicional a la comprobación fenotípica, estas 2 cepas de *E. coli* han sido analizadas molecularmente en otros estudios del Laboratorio de Microbiología (Ortega, 2010), confirmando la presencia de genes involucrados en la producción de BLEE en *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545, y la ausencia de los mismos

genes en *E. coli* ATCC 25922. Los genes que codifican BLEE se encuentran en elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, transposones, secuencias de inserción e integrones, lo que facilita su diseminación (Castanheira, Simner, y Bradford, 2021).

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan antibióticos betalactámicos (Rivera-Jacinto, Rodríguez-Ulloa, Flores, Serquén, y Arce, 2015), lo que confiere resistencia a las bacterias capaces de codificar dichas enzimas, tal como es el caso de *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545. Las BLEE más relevantes incluyen 3 tipos principales: TEM, SHV y CTX-M (Rivera, Larrosa, Mirelis, y Navarro, 2014). La difusión de disco evidenció que *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545 produce BLEE de tipo CTM-X, dado que estas confieren principalmente resistencia a cefotaxime y ceftriaxone (Rossolini, D'Andrea, y Mugnaioli, 2008). Durante la década de los años 2000, este tipo de BLEE ha sido reconocido como el tipo más común, y en base a la agrupación -según las homologías de secuencia- el grupo de CTX-M más dominante es el CTX-M-15 (Castanheira, Simner, y Bradford, 2021). De manera general, las BLEE representan el mecanismo más importante para la resistencia de cefalosporinas de tercera generación en enterobacterias (Gonzales et al., 2019). Por otro lado, *E. coli* ATCC 25922 es una cepa control recomendada por el CLSI, utilizada como control negativo para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (American Type Culture Collection, 2023).

La detección fenotípica de KPC presentó ciertas dificultades debido a que, en base a los criterios de CLSI, ninguna de las dos especies de *Klebsiella* fue determinada como sensible o resistente. Ciertos reportes han informado que los sistemas utilizados para la detección de organismos productores de KPC, identifican del 7 al 87 % de *K. pneumoniae* productoras de KPC como sensibles a imipenem o al meropenem; por ello se ha recomendado la consideración de diferentes factores adicionales como la reducción de permeabilidad de membrana externa, para que el organismo productor de KPC exprese con mayor claridad la resistencia total a los carbapenémicos, y así facilitar su detección (Arnold et al., 2011). A pesar de ello estudios anteriores del Laboratorio de Microbiología, han encontrado que *K. pneumoniae* ATCC KPC posee genes involucrados en la producción de carbapenemasas, mientras que *K. pneumoniae* BAA 1706 no cuenta

con dichos genes. En el caso de *K. pneumoniae* ATCC KPC, la enzima KPC se encuentra codificada por el gen *bla_{KPC}* localizado en el trasposón Tn4401, el cual es portado principalmente en plásmidos y es la principal plataforma de diseminación del *bla_{KPC}* (Vera et al., 2017). *Klebsiella* BAA 1706, es comercializada como un control negativo, debido a que ha sido confirmada mediante PCR como negativo para el gen *bla_{KPC}* (American Type Culture Collection, 2023).

6.3. ANTAGONISMO DE BACTERIAS DE LA CUEVA DE LOS TAYOS SOBRE BACTERIAS ENTERICAS MULTIRRESISTENTES Y SENSIBLES

Ciertos estudios han señalado que las características de los ambientes de las cuevas, como la oscuridad total, alta humedad, temperatura y la falta de nutrientes, pueden promover la producción de compuestos antimicrobianos (Zada et al., 2022). La Cueva de los Tayos consiste en una formación geológica que ha dado lugar a varias cavernas conectadas entre sí a través de galerías y pasadizos de diferentes alturas y dimensiones, formado cavernas oscuras en ciertos puntos (Almeida, 2023), a su vez, cuenta con una profundidad de 201 m y 4 800 m de largo (Suárez, 2020), su temperatura varía entre los 19 °C y 30 °C y la media de humedad es del 83% (The Weather Company, 2023). Todas estas condiciones influyen de manera significativa en la actividad antagónica presentada por los microorganismos. Para generalizar, las condiciones oligotróficas estimulan las respuestas antagónicas de los microorganismos que habitan la Cueva de los Tayos. El ensayo realizado a nivel de laboratorio simuló algunas de las condiciones de la cueva, tales como la incubación prolongada, en oscuridad y a una temperatura constante de 35 ± 2 °C, lo que estimuló que la respuesta antagónica de las bacterias de la Cueva de los Tayos ocurra a las 72 h.

En este estudio, se demostró fenotípicamente que las bacterias de la Cueva de los Tayos no producen respuestas antagónicas sobre *K. pneumoniae* (Figura 3). Dado que, en ninguna de las 2 bacterias utilizadas, *K. pneumoniae* ATCC KPC y *K. pneumoniae* BAA 1706, se evidenció actividad antagónica, esto podría obedecer a que la especie bacteriana posee características propias que le permiten resistir a cualquier respuesta antagónica de las bacterias de la Cueva de los Tayos. Una de las estructuras más importantes de *K. pneumoniae* es la cápsula de polisacárido,

este es descrito como un factor de virulencia en la patogenicidad de la bacteria, debido a su capacidad de evitar la fagocitosis, le da cierta resistencia a antimicrobianos y evade la deposición de las enzimas del sistema del complemento (Huang et al., 2022). A pesar de que, conocidas mayoritariamente por su papel en la virulencia en huéspedes humanos, los polisacáridos de la cápsula también aumentan la aptitud celular bajo estrés abiótico y durante la competencia con otras bacterias (Rendueles, 2020). Por lo tanto, la cápsula de polisacárido de *K. pneumoniae* ATCC KPC y *K. pneumoniae* BAA 1706 fue un factor determinante en que no se evidencie ninguna respuesta antagónica por parte de las bacterias de la Cueva de los Tayos.

Por otro lado, las tres cepas de *E. coli* demostraron ser más sensibles a las respuestas antagónicas de las bacterias de la Cueva de los Tayos. A pesar de que algunas cepas de *E. coli* poseen cápsulas de polisacáridos, estas no forman parte de la estructura de las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio, haciéndolas más sensibles a las respuestas antagónicas.

Este ensayo permitió diferenciar cuales de los filos bacterianos que habitan la Cueva de los Tayos tienen actividad antagónica sobre bacterias entéricas, siendo así que, las bacterias del phylum Firmicutes (*Bacillus pumilus*, *Bacillus lincheniformis*, *Lisinibacillus xylaniticus* y *Brevibacillus parabrevis*) poseen respuestas antagónicas que permiten su proliferación sobre otras bacterias, mientras que las bacterias del phylum Proteobacteria (*Proteus mirabilis* y *Acinetobacter vivianii*) no presentan actividad antagónica, lo que limita su competencia por espacio y recursos. En este estudio, las bacterias del género *Bacillus* aisladas de la Cueva de los Tayos presentaron actividad antagónica sobre las 2 cepas de *E. coli* evaluadas. Durante varias décadas, las bacterias del género *Bacillus* han sido estudiadas como probióticos, debido a que son productoras de más de 200 antibióticos, los cuales difieren en estructura y espectro de actividad, es decir, algunos son eficaces contra bacterias de la misma especie, otros actúan sobre bacterias Gram negativas y otros tienen un amplio espectro de actividad, lo que incluye a antifúngicos y antiprotozoarios (Moore, Globa, Barbaree, Vodyanoy, y Sorokulova, 2013). En el estudio de Kummar y Rana (2017), se describió que las bacterias del género *Bacillus* poseen un efecto antimicrobiano significativo sobre

Vibrio cholerae, *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*. El presente estudio demostró que las bacterias del género *Bacillus* provenientes de la Cueva de los Tayos también son productoras de sustancia microbianas que intervinieron en el desarrollo de las 3 cepas de *E. coli* evaluadas.

Se conoce que la bacitracina producida por *Bacillus* sp. inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Prescott, Willey, Sandman, y Wood, 2020), sin embargo las 3 cepas de *E. coli* utilizadas parecieron reaccionar de manera distinta a los mecanismos antagónicos de las bacterias de la Cueva de los Tayos, lo que se evidenció en la diferencia entre los diámetros y la translucidez de cada halo evaluado, por lo que no se aseguró que la bacitracina sea la única respuesta antagónica de todas las especies de *Bacillus* en todos los casos.

Bacillus pumilus puede sintetizar varios compuestos antimicrobianos como surfactinas, iturinas, fengicinas, bacilomicinas D, quitinasas y otras proteínas activas (Chu et al., 2019). Dado que se presentaron diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición, se dedujo que las bacterias de la Cueva de los Tayos produjeron distintos compuestos antimicrobianos sobre cada cepa de *E. coli*. La media de los diámetros de inhibición más alta se dio sobre *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545, lo que sugirió que el compuesto antimicrobiano más efectivo de *B. pumilus* fue producido sobre esta bacteria. Presuntamente, *B. pumilus* pudo sintetizar iturinas o bacilomicinas, que son lipoheptapeptidos cíclicos con una fuerte propiedad antibiótica (Ariza y Sánchez, 2012).

Bacillus lincheniformis sintetiza un compuesto tipo surfactina llamado linquenisina (Théatre et al., 2021). Este es un lipéptido anfifílico que cuenta con propiedades antibióticas, aunque se ha reportado que puede causar intoxicación alimentaria (Claire et al., 2022). Esta respuesta antagónica no mostró diferencias significativas en los diámetros de halos de inhibición sobre las tres cepas de *E. coli*, por lo tanto, se infirió que la respuesta antagónica de *B. lincheniformis*, la producción de linquenisina, se dio en las 3 cepas de *E. coli* evaluadas. El promedio más alto del diámetro de halo de inhibición se dio sobre *E. coli* ATCC 25922, lo que podría implicar que la producción de BLEE y la resistencia a colistina interviene en la respuesta antagónica de *B. lincheniformis*.

Lysinbacillus xylaniticus ha presentado potencial antimicrobiano debido a la producción de bacteriocinas y otros péptidos antibióticos (Sajid y Ahmad, 2022). En este caso, la actividad antagónica presentó diferencias significativas entre las tres cepas de *E. coli*, lo que se infiere que el compuesto antimicrobiano producido por *L. xylaniticus* fue diferente en las tres cepas utilizadas en el estudio, y dado que el promedio más alto de diámetros de halos de inhibición se presentó sobre la cepa *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545, se dedujo que la respuesta antagónica más efectiva se dio sobre esta cepa.

Brevibacillus parabrevis puede sintetizar agentes antibacterianos, antifúngicos e inclusive anti-invertebrados (Yang y Yousef, 2018). Dado que no se presentaron diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición, se dedujo que la respuesta antagónica de *B. parabrevis* fue la misma en todas las cepas de *E. coli*, a pesar de que el promedio más alto de diámetros de halos se dio sobre la cepa *E. coli* BLEE 4156 HVZ 545. Dicha respuesta antagónica pudo tratarse de la gramicidina, un polipéptido antibiótico que forma poros en las membranas celulares de las bacterias (Yang y Yousef, 2018).

El análisis comparativo entre las medias de los halos de inhibición demostró que la respuesta antagónica de *B. parabrevis* sobre las tres cepas de *E. coli* fue más efectiva a comparación de los mecanismos antagónicos de las otras bacterias.

A pesar de que se logró inferir las respuestas antagónicas específicas de cada una de las bacterias de las Cuevas de los Tayos, se requiere de un análisis metagenómico y proteómico para superar las barreras del ensayo fenotípico y determinar secuencias de genes codificantes de los compuestos antimicrobianos involucrados en la respuesta antagónica.

La concentración de células bacterianas en las suspensiones también pueden jugar un papel clave en la variación de respuestas antagónicas (Abudakar, 2009), en el presente estudio todas las diluciones de las bacterias de las Cuevas de los Tayos tuvieron la misma dilución (200 µl/5ml), por lo que es necesario realizar estudios posteriores que evidencien si cambios en concentración bacteriana de la

Cueva de los Tayos, podrían ocasionar variaciones en las respuestas antagónicas sobre bacterias entéricas.

7. CONCLUSIONES

La identificación bioquímica y proteómica pueden revelar la identidad de las bacterias provenientes de la Cueva de los Tayos y bacterias entéricas, además fueron importantes para inferir la composición relativa de los filos bacterianos que habitan la Cueva de los Tayos. Los 2 diferentes métodos de identificación bacteriana pueden ser complementarias entre sí, ya que se puede confirmar la identidad de las bacterias identificadas bioquímicamente a través de métodos más óptimos y discriminativos.

La detección fenotípica de resistencia o sensibilidad bacteriana debe determinarse bajo los criterios del CLSI. En este estudio, este método permitió la identificación inclusive del tipo de BLEE producido por *E. coli*. Sin embargo, pueden darse casos donde no se pueda determinar la resistencia o sensibilidad de una bacteria, por lo que se requerirán pasos adicionales que faciliten su detección o complementarlos con otros métodos más exactos.

El potencial antagónico de las bacterias de la Cueva de los Tayos frente a bacterias entéricas se expresó solo en las cepas de *E. coli* debido a que *K. pneumoniae* posee características que dificultan la actividad antagónica sobre las mismas. Las bacterias del género *Bacillus*, producen una serie de compuestos antimicrobianos específicos que afectan la observación fenotípica de antagonismo sobre cada cepa. *Brevibacillus parabrevis* fue la especie de la Cueva de los Tayos que mejor controló a las bacterias entéricas mientras que *E. coli* BLEE 4156 HBZ 545 fue la especie de bacteria entérica más susceptible a las bacterias antagónicas evaluadas en la disertación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abudakar, E.-M. M. (2009). Antibacterial efficacy of stem bark extracts of *Mangifera indica* against some bacteria associated with respiratory tract infections. *Scientific Research and Essay*, 4(10), 1031-1037.
- Adetutu, E., y Ball, A. (2014). Microbial diversity and activity in caves. *Microbiology Australia*, 35(4), 192-194. doi:10.1071/MA14062
- Almeida, E. (5 de Enero de 2023). *La Cueva de los Tayos*. Recuperado el 3 de Junio de 2023, de Sección Nacional del Ecuador del Instituto Panamericano de Geografía e Historia: <https://www.ipgh.gob.ec/portal/index.php/comision-de-historia/20-la-cueva-de-los-tayos>
- American Type Culture Collection. (15 de Enero de 2023). *Escherichia coli* (ATCC®). Recuperado el 3 de Junio de 2023, de ATCC Product Sheet: <https://bvsper.paho.org/share/goliva/12set19/76.%20ATCC%2025922.pdf>
- American Type Culture Collection. (21 de Enero de 2023). *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan BAA-1706™. Recuperado el 3 de Junio de 2023, de ATCC: <https://www.atcc.org/products/baa-1706>
- Ariza, Y., y Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-155. doi:10.22490/24629448.1003
- Arnold, R., Thom, K., Sharma, S., Phillips, M., Johnson, J., y Morgan, D. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *Southern Medical Journal*, 104(1), 40-45. doi:10.1097/SMJ.0b013e3181fd7d5a
- Aryal, S. (10 de Agosto de 2022). *Biochemical Test and Identification of Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado el 24 de Abril de 2023, de Microbiology Info: <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-and-identification-of-pseudomonas-aeruginosa/>
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., y Robledo, C. (2020). *Manual de Usuario InfoStat*. Córdoba: Editorial Brujas.
- Banoon, S., y Ali, Z. (2018). Identification the local thermophilic strains of *Bacillus licheniformis* by VITEK-2 system and Gyrase B gene. *Al-Kufa University Journal for Biology*, 10(2), 157-167.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., y Gupta, R. (2007). Bacterial Chitinases: Properties and Potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1), 21-28. doi:10.1080/07388550601168223
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.

- Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Calvo, P., y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.
- Castanheira, M., Simner, P. J., y Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(1). doi:10.1093/jacamr/dlab092
- Centers for Disease Control and Prevention. (5 de Octubre de 2022). *About Antimicrobial Resistance*. Recuperado el Marzo de 2023, de Antimicrobial Resistance: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- Chu, J., Wang, Y., Zhao, B., Zhang, X., Liu, K., Mao, L., y Kalamiyets, E. (2019). Isolation and identification of new antibacterial compounds from *Bacillus pumilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(1), 8375-8381. doi:10.1007/s00253-019-10083-y
- Claire, K., Perko, M., Staring, G., Fernandez, B., Wells, J., Abee, T., y Wells, M. (2022). Lichenysin Production by *Bacillus licheniformis* Food Isolates and Toxicity to Human Cells. *Frontiers in Microbiology*, 13(1). doi:10.3389/fmicb.2022.831033
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (Trigésimo tercera ed.). Estados Unidos: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Constantin, S., Toulkeridis, T., Moldovan, O., Villacís, M., y Addison, A. (2019). Caves and karst of Ecuador – state-of-the-art and research perspectives. *Physical Geography*, 40(1), 28-51. doi:10.1080/02723646.2018.1461496
- Constantiniu, S., Romaniuc, A., Iancu, L., Filimon, R., y Tarasi, I. (2004). Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine*, 12(3-4), 35-42.
- Constantiniu, S., Romaniuc, A., Smaranda, L., y Filimon, R. (2004). Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. Strains isolated from hospital units. *The Journal of Preventive Medicine*, 12(3-4), 35-42.
- Di Rienzo, J., Cassanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. (2020). *InfoStat versión 2020*. Córdoba: Editorial Brujas.
- Feichtmayer, J., Deng, L., y Griebler, C. (2017). Antagonistic Microbial Interactions: Contributions and Potential Applications for Controlling Pathogens in the Aquatic Systems. *Frontiers in Microbiology*, 8(2192), 1-14. doi:10.3389/fmicb.2017.02192
- García, L., y Comstock, L. (2018). Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. *Science*, 361(6408), 81-87. doi:10.1126/science.aat2456

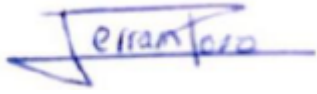
- Gonzales, E., Patiño, L., Ore, E., Martínez, V., Moreno, S., Cruzado, N., . . . Bustamante, D. (2019). β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M en aislamientos clínicos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud del Niño-Breña, Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 30(4), 242-248. doi:10.20453/rmh.v30i4.3659
- González, G. (1986). *Metodos estadísticos y principios de diseño experimental* (Segunda ed.). Quito: Editorial Universitaria.
- Gupta, N., Gandham, N., Jadhav, S., y R, M. (2015). Isolation and identification of *Acinetobacter* species with special reference to antibiotic resistance. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 6(1), 159-162. doi:10.4103/0976-9668.149116
- Hamzah, A. (2019). Molecular Detection of *Lysinibacillus Fusiformis* Isolated from. *Journal of Global Pharma Techonolgy*, 11(5), 280-285.
- Huang, X., Li, X., An, H., Wang, J., Ding, M., Wang, L., . . . Zhang, J. (2022). Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. *PLOS Pathogens*, 18(8). doi:10.1371/journal.ppat.1010693
- Kebede, A., Aragie, S., y Shimelis, T. (2017). The common enteric bacterial pathogens and their antimicrobial susceptibility pattern among HIV-infected individuals attending the antiretroviral therapy clinic of Hawassa university hospital, southern Ethiopia. *Antimicrobial Resistance y Infection Control*, 6(128). doi:10.1186/s13756-017-0288-7
- Kosznik-Kwasnicka, K., Golec, P., Jaroszewicz, W., Lubomska, D., y Piechowicz, L. (2022). Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms*, 10(2). doi:10.3390/microorganisms10020222
- Kumar, K., y Rana, D. (2017). Evaluation of antagonistic activities of *Bacillus* spp. against certain bacteria of medical importance. *Archives of Agriculture and Environmental Science*, 2(4), 353-356. doi:10.26832/24566632.2017.020419
- Moore, T., Globa, L., Barbaree, J., Vodyanoy, V., y Sorokulova, I. (2013). Antagonistic Activity of *Bacillus* Bacteria against Food-Borne Pathogens. *Probiotics y Health*, 1(110). doi:10.4172/2329-8901.1000110
- Nájera, A. L., y Fierro, M. J. (2019). Prevalencia de microorganismos multi-resistentes en infección de vías urinarias en la población pediátrica y su asociación con uropatías en el Hospital Metropolitano en Quito-Ecuador de Enero del 2016 a Diciembre del 2018. (*Tesis de especialización*). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Nehra, V., Saharan, B., y Choudhary, M. (2016). Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) crop. *SpringerPlus*, 5(948). doi:10.1186/s40064-016-2584-8

- Neu, H. C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*, 257(5073), 1064-1073. doi:10.1126/science.257.5073.1064
- Ortega, D. (2010). Genotipage de la resistencia a antibioticos en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de Beta-Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). (*Tesis de licenciatura*). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Ortega, D., Barba, P., Mena, S., Espinel, N., Crespo, V., y Zurita, J. (2020). High quantities of multidrug-resistant *Escherichia coli* are present in the Machángara urban river in Quito, Ecuador. *Journal of Water and Health*, 18(1), 67-76. doi:10.2166/wh.2019.195
- Ortega, D., de Janon, S., Villavicencio, F., Jaramillo, K., De La Torre, K., Villacís, J., . . . Vinueza, C. (2020). Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(1), 1-8. doi:10.3389/fvets.2020.547843
- Paton, A., Morona, R., y Paton, J. (2009). Treatment and prevention of enteric infections with toxin-binding probiotics. *Discovery Medicine*, 6(31), 35-39.
- Peterson, S., Bertolli, S., y Mougous, J. (2020). The Central Role of Interbacterial Antagonism in Bacterial Life. *Current Biology*, 30(19), 1203-1214. doi:10.1016/j.cub.2020.06.103
- Prescott, M., Willey, J., Sandman, K., y Wood, D. (2020). *Prescott's Microbiology* (Onceava ed.). Estados Unidos: McGraw Hill.
- Rendueles, O. (2020). Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. *Molecular Microbiology*, 113(5), 883-888. doi:10.1111/mmi.14474
- Rivera, A., Larrosa, N., Mirelis, B., y Navarro, F. (2014). Importancia de los controles de calidad para la detección de la resistencia a antibióticos β -lactámicos en enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 30-36. doi:10.1016/S0213-005X(14)70147-8
- Rivera-Jacinto, M., Rodríguez-Ulloa, C., Flores, R., Serquén, L., y Arce, Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 752-755.
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M., y Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 33-41. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x
- Russel, J., Roder, H., Madsen, J., y Sorensen, S. (2017). Antagonism correlates with metabolic similarity in diverse bacteria. *Biological Science*, 114(40), 10684-10688. doi:10.1073/pnas.1706016114

- Sajid, Q., y Ahmad, V. (2022). Lysinibacilli: A Biological Factories Intended for Bio-Insecticidal, Bio-Control, and Bioremediation Activities. *Journal of Fungi*, 8(12). doi:10.3390/jof8121288
- Sampedro, F. (1977). *Cartillas de Divulgación Ecuatoriana N° 15: Las Cuevas de los Tayos*. Quito: Editorial Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- Suárez, J. (2020). Antagonismo de asilados bacterianos procedentes de la Cueva de los Tayos frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*. (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- The Weather Company. (3 de Junio de 2023). *El Tiempo Hoy: Limón Indanza, Morona Santiago*. Recuperado el 3 de Junio de 2023, de The Weather Channel: <https://weather.com/es-EC/tiempo/hoy//-2.95,-78.45?par=google>
- Théâtre, A., Cano, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., . . . Jacques, P. (2021). The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(1). doi:10.3389/fbioe.2021.623701
- Tsang, J. (7 de Febrero de 2020). *Identifying Bacteria Through Look, Growth, Stain and Strain*. Recuperado el 2 de Junio de 2023, de American Society for Microbiology: <https://asm.org/Articles/2020/February/Identifying-Bacteria-Through-Look,-Growth,-Stain>
- Turrini, P., Tescari, M., Visaggio, D., Pirolo, M., Lugli, G., Ventura, M., . . . Visca, P. (2020). The microbial community of a biofilm lining the wall of a pristine cave in Western New Guinea. *Microbiological Research*, 241(126584). doi:10.1016/j.micres.2020.126584
- Vera, A., Barría, C., Carrasco, S., Lima, C., Aguayo, A., Domínguez, M., . . . González, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484.
- Vivas, R., Teixeira, A., Santana, S., y Jain, S. (2019). Multidrug-Resistant Bacteria and Alternative Methods to Control Them: An Overview. *Microbial Drug Resistance*, 25(6). doi:10.1089/mdr.2018.0319
- Wallace, M. J., Fishbein, S. R., y Dantas, G. (2020). Antimicrobial resistance in enteric bacteria: current state and next-generation solutions. *Gut Microbes*, 12(1), 1-21. doi:10.1080/19490976.2020.1799654
- Yang, X., y Yousef, A. (2018). Antimicrobial peptides produced by *Brevibacillus* spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(57). doi:10.1007/s11274-018-2437-4
- Yang, X., Ye, W., Qi, Y., Ying, Y., y Xia, Z. (2021). Overcoming Multidrug Resistance in Bacteria Through Antibiotics Delivery in Surface-Engineered Nano-Cargos: Recent Developments for Future Nano-Antibiotics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(696514), 1-15. doi:10.3389/fbioe.2021.696514

Zada, S., Sajjad, W., Rafiq, M., Ali, S., Hu, Z., Wang, H., y Cai, R. (2022). Cave Microbes as a Potential Source of Drugs Development in the Modern Era. *Microbial Ecology*, 84(1), 676-687. doi:10.1007/s00248-021-01889-3

Firma del (la) estudiante y fecha:



Jerram Steve Pozo Gancino

Quito, 16 de junio de 2023

Firma del director (a) de disertación y fecha:

Dra. Iliana Alcocer

Quito, 16 de junio de 2023

Firma de la Coordinadora de la Carrera de Microbiología y fecha:

Mtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez

Quito, 16 de junio de 2023

9. ANEXOS

Anexo 1. Medidas de tendencia central de las pruebas de antagonismo expresadas como diámetros de los halos de inhibición.

Bacterias <i>E. coli</i>	Bacterias de la Cueva de los Tayos	N	Media	D.E.	E.E.	Mín.	Máy.
E. c. ATCC	<i>Bacillus lincheniformis</i>	8	29,12	6,78	2,4	17,93	36,25
E. c. ATCC	<i>Bacillus pumilus</i>	8	20,89	2,29	0,81	18,03	25,66
E. c. ATCC	<i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	8	12,9	2,2	0,78	10,87	17,74
E. c. ATCC	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	8	33,31	6,38	2,26	24,27	44,77
E. c. BLEE	<i>Bacillus lincheniformis</i>	4	26,61	0,74	0,37	25,72	27,31
E. c. BLEE	<i>Bacillus pumilus</i>	4	27,73	5,86	2,93	23,36	36,38
E. c. BLEE	<i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	4	24,2	3,89	1,95	20,24	29,48
E. c. BLEE	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	4	34,63	4,57	2,28	31,18	41,36
E. c. COL	<i>Bacillus lincheniformis</i>	4	25,23	2,51	1,25	22,97	28,15
E. c. COL	<i>Bacillus pumilus</i>	4	19,36	2,14	1,07	16,36	21,42
E. c. COL	<i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	4	16	1,61	0,8	14,43	17,49
E. c. COL	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	4	28,77	3,28	1,64	24,72	32,29

N, número de observaciones correspondientes al diámetro de halos de inhibición; D.E. desviación estándar; E.E., error estándar; Min., valor mínimo; Max., valor máximo; E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection.

Anexo 2. Análisis de la varianza de InfoStat vinculado a R

Bacillus lincheniformis

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos de inhibición generado por <i>Bacillus lincheniformis</i>	16	0,12	0	18,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	44,9	2	22,45	0,85	0,4486
<i>Bacillus lincheniformis</i>	44,9	2	22,45	0,85	0,4486
Error	342,13	13	26,32		
Total	387,03	15			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,15390

Error: 26,3173 gl: 13

Bacterias <i>E. coli</i>	Medias	N	E.E.	
E. c. COL	25,23	4	1,25	A
E. c. BLEE	26,61	4	0,37	A
E. c. ATCC	29,12	8	2,4	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Bacillus pumilus

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos de inhibición generado por <i>Bacillus pumilus</i>	16	0,52	0,45	15,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	168,12	2	84,06	7,12	0,0082
<i>Bacillus pumilus</i>	168,12	2	84,06	7,12	0,0082
Error	153,51	13	11,81		
Total	321,63	15			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=4,79210

Error: 11,8088 gl: 13

Bacterias <i>E. coli</i>	Medias	N	E.E.	
E. c. COL	19,36	4	1,07	A
E. c. ATCC	20,89	8	0,81	A
E. c. BLEE	27,73	4	2,93	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Lysinibacillus xylaniliticus

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos de inhibición generados por <i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	16	0,8	0,77	15,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	341,4	2	170,7	25,53	<0,0001
<i>Lysinibacillus xylaniliticus</i>	341,4	2	170,7	25,53	<0,0001
Error	86,91	13	6,69		
Total	428,3	15			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,60560

Error: 6,6851 gl: 13

Bacterias <i>E. coli</i>	Medias	N	E.E.	
E. c. ATCC	12,9	8	0,78	A
E. c. COL	16	4	0,8	A
E. c. BLEE	24,2	4	1,95	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).*Brevibacillus parabrevis*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos de inhibición generados por <i>Brevibacillus parabrevis</i>	16	0,17	0,04	16,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	79,06	2	39,53	1,35	0,2929
<i>Brevibacillus parabrevis</i>	79,06	2	39,53	1,35	0,2929
Error	380,22	13	29,25		
Total	459,28	15			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,54166

Error: 29,2476 gl: 13

Bacterias <i>E. coli</i>	Medias	N	E.E.	
E. c. COL	28,77	4	1,64	A
E. c. ATCC	33,31	8	2,26	A
E. c. BLEE	34,63	4	2,28	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

N, número de observaciones correspondientes al diámetro de halos de inhibición; R², coeficiente de determinación; R² Aj, coeficiente de determinación ajustado; CV, coeficiente de variación; F.V., fuente de variación; SC, suma de cuadrados; gl, grados de libertad; CM, cuadrados medios; F, valor de la prueba de Fisher; LDS, lower difference significant; DMS, valor de la diferencia mínima significativa; E.E., error estándar; E. c., *Escherichia coli*; COL, resistencia a colistina; BLEE, β -lactamasas de espectro extendido; ATCC, American type culture collection.