

Estudio microbiológico de las manchas coloreadas de la Cueva del Viento (Tenerife, España)

Sara GUTIÉRREZ PATRICIO ⁽¹⁾, Valme JURADO LOBO ⁽¹⁾, Leonila LAIZ TROBAJO ⁽¹⁾, Alfredo LÁINEZ CONCEPCIÓN ⁽²⁾ Cesáreo SAIZ JIMÉNEZ ⁽¹⁾, Ana Zélia MILLER ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC), Av. Reina Mercedes 10, 41012 Sevilla, España. sara.gutierrez@irnas.csic.es, vjurado@irnase.csic.es, leo@irnase.csic.es, saiz@irnase.csic.es, anamiller@irnas.csic.es

⁽²⁾ Grupo de Espeleología BENISAHARE, Tenerife, Canarias, España. alfreilainez@hotmail.com

Resumen

Los tubos de lava se encuentran distribuidos por todo el mundo. Estas cuevas volcánicas, inicialmente formadas por el flujo de lava de un volcán en erupción, son habitadas por complejas comunidades microbianas una vez alcanzan la temperatura ambiente. En las paredes y techos del tubo de lava de la Cueva del Viento (Icod de los Vinos, Tenerife, España) se han encontrado colonizaciones microbianas que forman biopelículas de diferentes colores (blancas, amarillas y rojas). Esta cueva es uno de los tubos de lava más grande del mundo, y su nombre se debe a las importantes corrientes de aire que se producen en su interior. La Cueva del Viento presenta unas características geomorfológicas únicas y una gran diversidad de fauna subterránea. Sin embargo, la información disponible sobre la biodiversidad bacteriana presente en su interior es limitada. En este trabajo se llevaron a cabo técnicas de cultivo y análisis moleculares para la caracterización de las biopelículas microbianas y comprender su biodiversidad, así como el estado de conservación de esta cavidad volcánica. Se aislaron 42 cepas bacterianas, distribuidas principalmente en los filos *Actinomycetota* y *Bacillota*. El género más numeroso dentro de cada filo fue *Streptomyces* (ocho cepas), el cual es abundante en suelos, y *Bacillus* (nueve cepas), respectivamente. La especie *Paenarthrobacter nicotinovorans*, perteneciente al filo *Actinomycetota* y hallada en las muestras de colonias amarillas y blancas (cinco cepas), se caracteriza por degradar nicotina, atrazina y otros herbicidas nitrogenados, lo que evidenciaría una posible contaminación proveniente del suelo localizado sobre la cueva. La muestra más diversa correspondió a la biopelícula de color blanco, situada en una de las zonas más contaminadas de la cueva, donde se aislaron 14 cepas bacterianas. La caracterización de las comunidades microbianas presentes en la Cueva del Viento ayudará a comprender mejor su diversidad y a concienciar al público sobre la importancia de la conservación de este tubo de lava, proyectado hoy en día como un museo natural.

Palabras clave: bacteria, biodiversidad, técnicas de cultivo, tubos de lava.

Microbiological study of the colored mats of the Cueva del Viento (Tenerife, Spain)

Abstract

Lava tubes are distributed worldwide. These volcanic caves are inhabited by complex microbial communities. On the walls and ceilings of the lava tube of Cueva del Viento (Icod de los Vinos, Tenerife, Spain) microbial colonisations have been found forming biofilms of different colours (white, yellow and red). This is one of the largest lava tube in the world, and its name is due to the significant air currents that occur inside it. Cueva del Viento has unique geomorphological features and a great diversity of subterranean fauna. However, there is limited information available on the bacterial biodiversity present inside the cave. In this work, culture-dependent techniques and molecular analyses were carried out to characterise the microbial biofilms, to understand their biodiversity, and to the conservation of this volcanic cavity. Forty-two bacterial isolates were obtained, mainly distributed in the phyla Actinomycetota and Bacillota. The most numerous genera within each phylum were Streptomyces (eight strains), which is abundant in soils, and Bacillus (nine strains), respectively. The species Paenarthrobacter nicotinovorans (Actinomycetota) found in the yellow and white colony samples (five strains), is characterised by degrading nicotine, atrazine and other nitrogenous herbicides, which could be an evidence of soil contamination above the cave. The most diverse sample corresponded to the white biofilm, located in one of the most polluted areas of the cave, where 14 bacterial strains were isolated. The characterisation of the microbial communities present in the Cueva del Viento will help to better understand their diversity and to raise public awareness of the importance of the conservation of this lava tube. This cave is projected nowadays as a natural museum.

Keywords: *bacteria, biodiversity, culture-dependent techniques, lava tubes.*

Introducción

El archipiélago canario se encuentra en el océano Atlántico oriental, frente a la costa del sur de Marruecos. Está formado por ocho islas principales de origen volcánico. En el centro de la cadena insular se localiza Tenerife, que es la isla más grande (2034 km²), más alta (3714 m s.n.m. en el pico del Teide) y más diversa tanto en ecosistemas como en especies animales y vegetales. La localidad de Icod de Los Vinos se encuentra al noroeste de la isla; esta zona presenta una alta densidad de tubos de lava, en la cual se localiza la Cueva del Viento (Oromí, 2018; Oromí *et al.*, 2021). Numerosos estudios indican una gran riqueza faunística en esta cavidad, pero la información sobre los microorganismos en esta cueva es limitada, y se basa en técnicas moleculares (Socorro *et al.*, 2010; Láinez *et al.*, 2014, Oromí *et al.*, 2021).

Las cuevas volcánicas se encuentran distribuidas por todo el mundo; varios estudios muestran las complejas comunidades microbianas que habitan en estos tubos de lava, que generalmente están formando biopelículas que recubren las paredes y los techos

(Riquelme *et al.*, 2015; González-Pimentel *et al.*, 2018). Estas biopelículas pueden tener diferentes tamaños, desde pequeñas colonias hasta cubrir extensas zonas. Además, también pueden tener diferentes coloraciones, incluyendo amarillo, naranja, gris, rosa y blanco. En 1981 se utilizaron métodos dependientes de cultivos para describir por primera vez las comunidades microbianas presentes en las cuevas de lava de Hawai e informaron sobre la presencia de hongos y bacterias aeróbicas (Lavoie *et al.*, 2017).

Las cuevas de lava son ambientes extremos, caracterizados por ser oligotróficos, con escaso contenido en carbono orgánico, temperatura y humedad constantes a lo largo del año y por la falta de luz en la zona profunda de la cueva, lo que crea un déficit de microorganismos productores primarios. El aislamiento de la mayoría de las cuevas limita la capacidad de los organismos para migrar, lo que resulta en altos niveles de endemismo entre los troglobiontes y los estigobiontes (Christman *et al.*, 2005). Los resultados de Hathaway *et al.* (2014) evidencian que esta tendencia puede extenderse a la diversidad bacteriana encontradas en las biopelículas microbianas de las cuevas de lava de las Azores y Hawai.

Las principales bacterias identificadas en los tubos de lava de todo el mundo pertenecen a los filos Actinomycetota, Pseudomonadota, Acidobacteriota, Nitrospirota, Bacillota, Bacteroidota y Chloroflexota. Actinomycetota y Pseudomonadota son los filos más abundantes en los tubos de lava de diferentes partes del mundo, alcanzando más del 50% del total de filos identificados en cada cueva. Riquelme *et al.* (2015) realizaron uno de los mayores esfuerzos de muestreo en cuevas volcánicas de España, Portugal, Estados Unidos y Canadá (Northup *et al.*, 2011; González-Pimentel *et al.*, 2018; Miller *et al.*, 2020).

Materiales y métodos

Localización y muestreo

La Cueva del Viento es una cavidad volcánica situada en la localidad de Icod de los Vinos, en el norte de la isla de Tenerife, Islas Canarias. Esta cavidad se formó hace unos 27.000 años con la erupción del volcán Pico Viejo. Esta cueva es una de las cavidades volcánicas más grandes del mundo. Tiene 18.500 metros explorados y topografiados, por parte de los espeleólogos del Grupo de Espeleología de Tenerife Benisahare (G.E.T. Benisahare). Su nombre se debe a las importantes corrientes de aire que se producen en su interior. Posee una enorme red laberíntica de paisajes subterráneos, con innumerables ramificaciones aún inexploradas. Esta cueva también destaca por sus características geomorfológicas únicas (figura 1), ya que sus galerías están dispuestas en tres niveles superpuestos, fenómeno que no se describe en ningún otro lugar del mundo. Además, presenta una gran riqueza faunística (Láinez *et al.*, 2014; Socorro *et al.*, 2010).

En septiembre de 2013 se recogieron cuatro muestras de las colonizaciones bacterianas localizadas en las paredes y techos de esta cueva. Las muestras se obtuvieron asépticamente, raspando las colonias con un bisturí estéril; se almacenaron en tubos estériles a 4 °C y se analizaron inmediatamente al llegar al laboratorio. Las muestras se resuspendieron en una solución estéril de NaCl al 0,85 % (p/v) y posteriormente se sembraron en agar nutritivo,

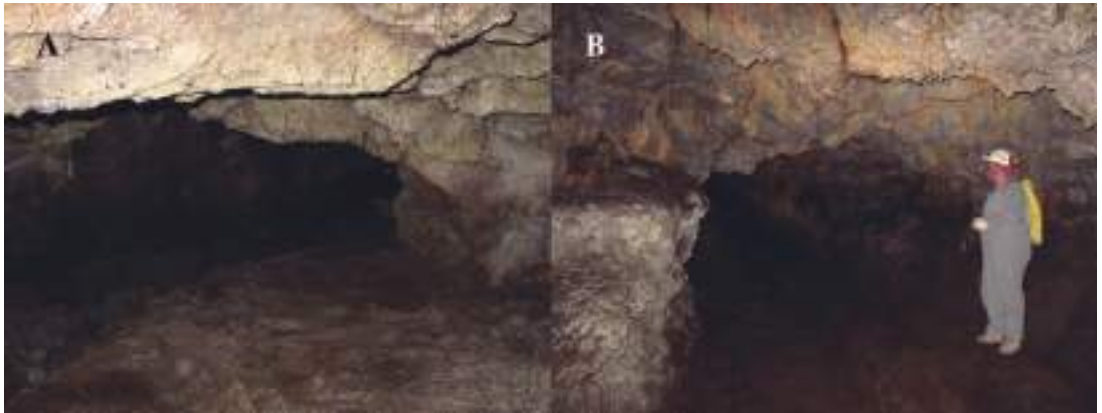


Figura 1. Tubos de lava de la Cueva del Viento.

agar tripton-soja (TSA) y agar tripton-soja con sales de hierro, magnesio y silicio al 3 % (TSBAdFeMgSi). Todas las muestras se incubaron a 30 °C durante 7 semanas. Pasado este tiempo, las colonias bacterianas fueron seleccionadas según sus características morfológicas.

Las muestras 3C y 7G (biopelículas amarillas) se obtuvieron en el tubo B y entrada, respectivamente. La muestra 5E (biopelícula roja) se tomó en el punto B9 y la muestra 11K (biopelícula blanca) en la galería Breveritas inferior, este lugar se encuentra contaminado con un vertido de aguas residuales (tabla 1).

Cepas	Nº acceso	Identificación	% Similitud	Origen
0913CV3CTS3	LN867256	<i>Streptomyces palmae</i> (LC073309)	98,38	Rizosfera palma aceitera
0913CV3CTS5	LN867257	<i>Streptomyces rhizosphaerihabitans</i> (HQ267983)	98,75	Suelo de un bosque de bambú
0913CV3CT5	LN867258	<i>Streptomyces</i> sp ¹ .	100,00	Suelo
0913CV3CTS4	LN867259	<i>Streptomyces plumbiresistens</i> (EU526954)	98,48	Suelo contaminado con plomo
0913CV3CT2	LN867259	<i>Streptomyces palmae</i> (LC073309)	98,36	Rizosfera palma aceitera
0913CV3CTS6	LN867261	<i>Streptomyces</i> sp ² .	99,17	Suelo
0913CV3CT1	LN867262	<i>Bacillus</i> sp ³ .	100,00	Suelo y leche
0913CV3CNS1.2	LN867263	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (AM747813)/ <i>Peribacillus simplex</i> (BCVO01000086)	99,32	Suelo árido (Marrueco) y suelo
0913CV5ET4	LN867264	<i>Streptomyces</i> sp ⁴ .	99,78	Suelo
0913CV5ET7	LN867265	<i>Bacillus atrophaeus</i> (AB021181)	99,77	Suelo

Tabla 1. Bacterias aisladas de la Cueva del Viento.

0913CV5ETS4	LN867266	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99,29	Condimento tailandés (Poo-khem)
0913CV5ET2	LN867267	<i>Bacillus</i> sp. ⁵	99,85	Nave especial, agua y leche
0913CV5ENS2;2	LN867268	<i>Bacillus tequilensis</i> (AYTO01000043)	100,00	Tumba mexicana
0913CV5ETS6	LN881695	<i>Bacillus tequilensis</i> (AYTO01000043)	98,85	Tumba mexicana
0913CV5ENS2;1	LN881696	<i>Bacillus tequilensis</i> (AYTO01000043)	99,08	Tumba mexicana
0913CV7GT56	LN867269	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> (X80743)	99,41	Suelo
0913CV7GN51	LN881697	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> (X80743)	99,35	Suelo
0913CV7GT54	LN881698	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> (X80743)	99,12	Suelo
0913CV7GN7.1	LN867270	<i>Micrococcus luteus</i> (CP001628)	99,12	Piel de mamífero
0913CV7GTS1.2	LN867271	<i>Micrococcus</i> sp. ⁶	99,87	Superficie de <i>Polyspora</i> y piel
0913CV7GN52	LN867272	<i>Peribacillus simplex</i> (BCVD01000086)	99,80	Suelo
0913CV7GTS8	LN881699	<i>Peribacillus simplex</i> (BCVD01000086)	99,66	Suelo
0913CV7GTS2	LN867273	<i>Bacillus siamensis</i> (AJVF01000043)	99,80	Condimento tailandés (Poo-khem)
0913CV7GN6	LN867274	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	99,77	Leche
0913CV7GT7;2	LN867275	<i>Rossellomarea vietnamensis</i> (AB099708)	99,58	Salsa de pescado vietnamita
0913CV7GT7;1	LN881700	<i>Rossellomarea vietnamensis</i> (AB099708)	99,36	Salsa de pescado vietnamita
0913CV7GTS	LN867276	<i>Pseudomonas laurylsulfatiphila</i> (KY462012)	99,40	Suelo contaminado
0913CV7GTS5	LN867277	<i>Psychrobacillus soli</i> (KJ956929)	99,42	Suelo contaminado con aceite
0913CV11KT10	LN867278	<i>Arthrobacter ginkgois</i> (KP128918)	99,21	Rizosfera de <i>Ginkgo biloba</i>
0913CV11KTS3	LN867279	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> (X80743)	99,42	Paciente clínico
0913CV11KN7	LN867280	<i>Paenarthrobacter nicotinovorans</i> (X80743)	99,38	Paciente clínico
0913CV11KTS		<i>Micrococcus luteus</i> (CP001628)	99,52	Piel
0913CV11KTS6	LN867281	<i>Micrococcus luteus</i> (CP001628)	99,58	Piel
0913CV11KTS1	LN867282	<i>Streptomyces</i> sp. ⁴	99,46	Suelo
0913CV11KTS2	LN867283	<i>Streptomyces halmagora</i> (KV917375)	99,23	Suelo
0913CV11KTS5	LN867284	<i>Metabacillus litoralis</i> (AY608605)	99,01	Mar Amarillo, Corea
0913CV11KT6	LN867285	<i>Pseudomonas yangonensis</i> (MK907288)	97,89	Herida de un paciente

Tabla 1 (continuación). Bacterias aisladas de la Cueva del Viento.

0913CV11KN6,1		<i>Pseudomonas yangonensis</i> (MK907288)	98,59	Herida de un paciente
0913CV11KNS1	LN867286	<i>Pseudomonas lalkuanensis</i> (MF943158)	98,87	Suelo contaminado
0913CV11KN6;2	LN867287	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. ⁷	99,38	Suelo y agua contaminado
0913CV11KN3;2	LN867288	<i>Chryseobacterium candidae</i> (SDLV01000037)	98,32	Levadura <i>Candida</i> sp.
0913CV11KN2	LN867289	<i>Flaviumibacter cheonanensis</i> (KF309176)	98,57	Sedimento de un lago

Tabla 1 (continuación). Bacterias aisladas de la Cueva del Viento.

¹Comparte la misma similitud con *Streptomyces cyaneus* (AF346475), *S. lincolnensis* (X79854), *S. antibioticus* (AB184184), *S. mirabilis* (AB184412), *S. shaanxiensis* (FJ465151) y *S. griseoruber* (AB184209).

²Grupo taxonómico *Streptomyces lydicus*: *S. lydicus* (AB184281) y *S. chattanoogensis* (AJ621611).

³Grupo taxonómico *Bacillus mycooides*: *B. mycooides* (ACMU01000002) y *B. weihenstephanensis* (BAUY01000093).

⁴Grupo taxonómico *Streptomyces lavendulae*: *S. avidinii* (AB184395), *S. xanthophaeus* (AB184177), *S. cirratus* (AY999794), *S. vinaceus* (AB184394), *S. spororaveus* (AJ781370), *S. nojiriensis* (AJ781355), *S. lavendulae* subsp. *lavendulae* (AB184146), entre otros.

⁵Comparte la misma similaridad con: *Bacillus zhangzhouensis* (JOTP01000061), *B. safensis* subsp. *safensis* (ASJD01000027) y *B. safensis* subsp. *osmophilus* (KY990920).

⁶Grupo taxonómico *Micrococcus luteus*: *M. yunnanensis* (FJ214355) y *M. luteus* (CP001628).

⁷La cepa CV11KN6,2 comparte la misma similitud con *Pseudoxanthomonas mexicana* (AF273082), *P. japonensis* (AB008507) y *P. arseniciresistens* (MN685193).

Análisis molecular de comunidades microbianas

La identificación de las comunidades bacterianas se realizó mediante técnicas de biología molecular basadas en el análisis del gen ARNr 16S. El ADN fue extraído utilizando el protocolo descrito por Griffiths *et al.* (2000). El gen ARNr 16S se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 616F 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' (Juretschko *et al.*, 1998), 1510R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' (Echigo *et al.*, 2005), 907R 5'-AATTCCTTTGAGTTT-3' (Weisburg *et al.*, 1991), y 1492R 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3' (Lane, 1991).

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador FlexCycler (Analytik Jena AG, Alemania), utilizando las siguientes condiciones: 94 °C durante 2 min; 35 ciclos de 94°C durante 20s, 55°C durante 20s, 72 °C durante 2 min; y el paso final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR positivos se purificaron usando el Kit JetQuick PCR Purification Spin Kit (GenoMed Inc., Leesburg, FL, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

Los productos purificados por PCR se secuenciaron en el Laboratorio Secugen (CSIC, Madrid, España), las secuencias obtenidas se editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.0.4.1; Hall, 1999).

La identificación de las secuencias del gen ARNr 16S se realizó utilizando la base de datos EZBioCloud y la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), utilizando el algoritmo BLASTN. Las secuencias se depositaron en la base de datos del NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), con los números de acceso LN867256-LN867289 y LN881695-LN881702.

Resultados y discusión

En este estudio se han obtenido 42 cepas bacterianas, distribuidas principalmente en los filos Actinomycetota (42,86%) y Bacillota (40,48%). Los géneros más numerosos fueron *Streptomyces* (44,45%) y *Bacillus* (58,82%). El filo Pseudomonadota (11,90%) se encontró en la muestra de biopelícula amarilla B (7G) y en la de biopelícula blanca (11K). El filo Bacteroidota (4,76%) sólo se halló en la muestra 11K, que fue la más diversa, ya que en ella estuvieron presentes los cuatro filos mencionados.

Dentro del filo Actinomycetota, el género *Streptomyces* (44,45%) fue el más numeroso, ya que estuvo presente en todas las muestras, salvo en la muestra 7G. Este género está ampliamente distribuido y es abundante en suelos, incluido el compost. También se ha aislado de otras cuevas volcánicas y cuevas kársticas (Gutierrez-Patricio, 2016; Riquelme *et al.*, 2017). Algunas especies son patógenas de animales y humanos, mientras que otras son fitopatógenas (Kämpfer, 2012). De este género se aislaron seis cepas diferentes, las tres cepas identificadas a nivel de especie se aislaron de la muestra de manchas amarillas A (3C). De *Streptomyces palmae* se aislaron dos cepas en la muestra 3C. Los miembros de este género son conocidos por producir antibióticos y compuestos bioactivos. Por ejemplo *S. palmae*, que se aisló de la rizosfera de la palma aceitera, presenta actividad antifúngica frente a algunos hongos fitopatógenos como *Ganoderma boninense*, y también presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sujarit *et al.*, 2016; 2020). Asimismo, se aislaron las especies *S. rhizosphaerihabitans* y *S. plumbiresistens*. La primera de ellas se aisló por primera vez de la rizosfera de un bosque de bambú coreano, mientras que la segunda fue aislada de un suelo chino contaminado con plomo. Además, se ha demostrado que la cepa *S. plumbiresistens* produce polihidroxialcanoato (PHA) un polímero conocido como plástico biodegradable (Guo, *et al.*, 2009; Al-Hamdani, 2016; Lee *et al.*, 2016).

Miembros de la familia Micrococcaceae se aislaron de las muestras 7G y 11K. Los géneros encontrados fueron *Arthrobacter*, *Paenarthrobacter* y *Micrococcus*. Del género *Arthrobacter*, y concretamente de la especie *A. ginkgonis* sólo se encontró una cepa en la muestra 11K. Esta especie fue aislada por primera vez de la raíz de *Ginkgo biloba* (Cheng *et al.*, 2017). El género *Paenarthrobacter* se halló en la muestra 7G (tres cepas) y 11K (dos cepas). Todas las cepas aisladas se identificaron como *P. nicotinovorans*. Esta especie se caracteriza por la degradación de nicotina, atrazina y otros herbicidas triazínicos (Kodama *et al.*, 1992, Aislabie *et al.*, 2005, Busse, 2016). Por último, se aislaron tres cepas del género *Micrococcus*, que se caracteriza por ser quimioorganótrofo con metabolismo estrictamente respiratorio. Estas cepas se identificaron como *M. luteus*, especie originariamente aislada de la piel de mamífero.

El filo Bacillota, como se ha mencionado anteriormente, fue muy numeroso y diverso, en cuanto al número de géneros hallados. En estas muestras se aislaron 9 cepas de *Bacillus*, género formado por un gran número de bacterias heterogéneas que están ampliamente distribuidas en el suelo y subsuelo. Algunas especies de *Bacillus* se utilizan en aplicaciones industriales, como la síntesis de productos farmacéuticos y químicos, o en la producción de alimentos como es el caso de *B. siamensis* (5E y 7G), aislado inicialmente de un condimento alimentario tailandés muy popular (Poo-khem) (Sumpavapol *et al.*, 2010) y *B. mycoides* (7G) aislado de la leche. Además de las dos especies mencionadas anteriormente, se aislaron otras dos especies de *Bacillus* en la muestra 5E; *B. atrophaeus*, aislada de suelo (Nakamura, 1989), y tres cepas de *B. tequilensis*, aislada por primera vez en una tumba mexicana (Gatson *et al.*, 2006). Asimismo, se aislaron tres cepas de *Bacillus* que no se pudieron identificar a nivel de especie.

También se aislaron otras cuatro especies pertenecientes al filo Bacillota, tres de ellas se aislaron en la muestra 7G, los géneros *Peribacillus*, *Psychrobacillus* y *Rosellomorea*, mientras que los géneros *Metabacillus* y *Sutcliffiella* se aislaron en la muestra 11K. La mayor parte de los miembros del género *Peribacillus* se han aislado de suelos, como es el caso de la cepa aislada en este trabajo, *P. simplex*, aunque también se han aislado de intestinos de animales o de humanos, de permafrost y algunas especies se utilizan industrialmente en la remediación del butanol como, por ejemplo, *P. butanolivorans* (Patel y Gupta, 2020). El género *Psychrobacillus* se caracteriza por ser psicrotolerante, sólo se aisló una cepa correspondiente a *P. soli*, que tiene capacidad para degradar aceite, y se aisló inicialmente de un suelo contaminado con aceite próximo a una gasolinera (Thi Pham *et al.*, 2015). El género *Rosellomorea*, por el contrario, está presente principalmente en ambientes marinos, la especie aislada en este estudio fue *R. vietnamensis*, una bacteria moderadamente halotolerante que fue aislada inicialmente de una salsa de pescado vietnamita (Noguchi *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2020). El género *Metabacillus* se ha aislado de diversos ambientes, incluidos suelos, lago hipersalino y región costera marina. En este trabajo se aisló una cepa de *M. litoralis* (ambiente marino) (Yoon y Oh, 2005, Patel y Gupta, 2020); mientras que la cepa alcalófila *Sutcliffiella halmapalus* fue aislada de suelo (Nielsen *et al.*, 1995; Gupta *et al.*, 2020).

Por otro lado, el filo *Pseudomonadota* sólo estuvo representado en la muestra 7G y 11K, con el género *Pseudomonas*; este género es muy numeroso y se puede aislar de varios ambientes naturales como agua, suelo, plantas y animales. La mayoría de las especies no son patógenos de plantas y animales, pero algunas causan infecciones en humanos, además son muy versátiles metabólicamente y tienen propiedades biotecnológicas importantes. En la muestra 7G se obtuvo una cepa *P. laurylsulfatiphila*, que se caracteriza por degradar dodecilsulfato sódico (SDS) y se aisló inicialmente de un suelo de turba de una planta de tratamiento de aguas residuales (Furmanczyk *et al.*, 2018). También se encontraron las especies *P. yangonensis* (2 cepas) y *P. lalkuanensis* (1 cepa) en la muestra 11K. La primera fue aislada de una herida de un paciente de un hospital de Myanmar, mientras que la segunda fue aislada de un consorcio de bacterias de suelo contaminado enriquecido para la remediación de desechos electrónicos (Tohya *et al.*, 2020; Thorat *et al.*, 2020).

Otro género de *Pseudomonadota* aislado en la muestra 11K fue *Pseudoxanthomonas*; los miembros pertenecientes a este género tienen una amplia distribución en la naturaleza, concretamente fue aislado del lodo de un reactor anaerobio que trata las aguas residuales de una quesería, de la orina de un niño, aguas subterráneas contaminadas con arsénico en la India, etc. Las bacterias de este género reducen arsénico y nitrato (Thierry *et al.*, 2004; Mohapatra *et al.*, 2018).

En la muestra 11K se identificaron las dos únicas especies pertenecientes al filo Bacteroidota; *Chryseobacterium candidae*, aislada de la levadura *Candida* (Indu *et al.*, 2020) y *Flaviumibacter cheonanensis*, aislada de sedimento de un arroyo en Corea (Kim *et al.*, 2014). Ambas cepas merecen interés, debido a que este filo se aísla con poca frecuencia mediante las técnicas de cultivos tradicionales. A pesar de presentar valores superiores al 97% de similitud podrían ser buenos candidatos para su descripción como nuevas especies, ya que el valor del gen del ARNr 16S del 97% no es un valor de corte estricto.

Las cuevas volcánicas, como la Cueva del Viento, pueden ser un buen escenario para estudiar la diversidad microbiana, para la caracterización de nuevas especies bacterianas y para el estudio de la producción de sustancias bioactivas, especialmente en los géneros *Streptomyces*, *Paenarthrobacter* y *Pseudomonas*. Además, la cepa de *Pseudomonas yangonensis* presentó un especial interés debido a que poseía bajos porcentajes de similitud (97,89%) con respecto a las secuencias del gen del ARNr 16S disponibles en las bases de datos EzTaxon (Rosselló-Móra y Amann, 2001; Stackebrandt, 2003; Kim *et al.*, 2014). La homología de la secuencia completa del ARNr 16S es uno de los primeros datos a tener en cuenta para la selección y estudio de posibles nuevas especies. Por esta razón esta y otras cepas aisladas de cuevas volcánicas podrían ser objeto de investigación en futuros estudios taxonómicos.

Agradecimientos

Esta publicación es parte del proyecto de investigación TUBOLAN PID2019-108672RJ-I00 y del contrato Ramón y Cajal (RYC2019-026885-I), financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033. Además, este trabajo ha recibido apoyo de la Fundação para a Ciência e Tecnologia de Portugal (FCT) en el marco del proyecto MICROCENO (PTDC/CTA-AMB/0608/2020), y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a través del proyecto intramural PIE_20214AT021.

Referencias

- Aislabie, J., Bej A.K., Ryburn J., Lloyd N., Wilkins, A. (2005). Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology*, 1;52(2),279-86. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.012>.
- Al-Hamdani, M. A. (2016). Polyhydroxyalkanoate production by *Streptomyces plumbiresistens* CCNWHX 13-160T. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6,12.
- Busse, H.J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov.,

- Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 9-37. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000702>.
- Cheng, J., Zhang, M.Y., Zhao, J.C., Xu, H., Zhang, Y., Zhang, T.Y., Wu, Y.Y., Zhang, Y.X. (2017). *Arthrobacter ginkgonis* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizosphere of *Ginkgo biloba* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 319-324. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001623>.
- Christman, M.C., Culver, D.C., Madden, M.K., White, D. (2005). Patterns of endemism of the eastern North American cave fauna. *Journal of Biogeography*, 32, 1441-1452. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01263.x>.
- Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R. (2005). Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 1, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-8>.
- Furmanczyk E.M, Lipinski L, Dziembowski A and Sobczak A (2018). Genomic and functional characterization of environmental strains of SDS-degrading *Pseudomonas* spp., providing a source of new sulfatases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01795>.
- Gatson, J.W., Benz, B.F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., Hart, M.E. (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1475-1484. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63946-0>.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., Anthony, G., Donnell, O., Bailey, M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5488-5491. <https://doi.org/10.1128/aem.66.12.5488-5491.2000>.
- Gonzalez-Pimentel, J.L., Miller, A.Z., Jurado, V., Laiz, L., Pereira, M.F.C.; Saiz-Jimenez, C. (2018). Yellow coloured mats from lava tubes of La Palma (Canary Islands, Spain) are dominated by metabolically active *Actinobacteria*. *Scientific Reports*, 8, 1944. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20393-2>.
- Guo, J.K., Lin, Y.B., Zhao, M.L., Sun, R., Wang, T.T., Tang, M., Wei, G.H. (2009). *Streptomyces plumbiresistens* sp. nov., a lead-resistant actinomycete isolated from lead-polluted soil in north-west China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1326-30. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.004713-0>.
- Gupta, R.S., Patel, S., Saini, N., Chen, S. (2020). Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 5753-5798. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.
- Gutiérrez-Patricio, S. (2016). Identificación de nuevas especies bacterianas aisladas de cuevas españolas. *Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla*.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya Balasch, M., Spilde, M.N., Stone, F.D., Dapkevicius, M.L.N.E., Amorim, R.I., Gabriel, R., Borges, P. A. V., Northup, D.E. (2014). Comparison of bacterial diversity in Azorean and Hawaiian lava cave microbial mats. *Geomicrobiology Journal*, 31, 205-220. <https://doi.org/10.1080/01490451.2013.77491>.
- Indu, B., Kumar, G., Smida, N, Shabbir, A. Sasikala, Ch., Ramana, Ch. V. (2020). *Chryseobacterium candidae* sp. nov., isolated from a yeast (*Candida tropicalis*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 93-99. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003716>.
- Kim, W.H., Lee, S., Ahn, T.Y. (2014). *Flaviumibacter cheonanensis* sp. nov., isolated from sediment of a shallow stream. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 64, 3235-3239. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.063370-0>.
- Kodama, K., Yamamoto, H., Amano, N., Amachi, T. (1992). Reclassification of two strains of *Arthrobacter oxydans* proposal of *Arthrobacter nicotinovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 234-239. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-234>.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.P., Wagner, M. (1998). Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 3042-3051. <https://doi.org/10.1128/aem.64.8.3042-3051.1998>.

- Kämpfer, P., Lai, W.A., Arun, A. B., Young, C.C., Rekha, P.D., Martin, K., Busse, H.J., Chen, W.M. (2012). *Paracoccus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the plant *Crossostephium chinense* (L.) Makino (Seremban). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2750-2756.
- Láinez, A., Mesa, F.M., Finke, C., Milenkovic, D. (2014). La Cueva del Viento, otra forma de interpretar y percibir el mundo subterráneo turístico. En: J.M. Calaforra y J.J. Durán (eds.). *Iberoamérica Subterránea*. Asociación de Cuevas Turísticas Españolas, Madrid, pp. 171-180.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En: E. Stackebrandt y M. Goodfellow, (eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, pp 115–175.
- Lavoie, K.H., Winter A.S., Read K.J.H., Hughes E.M., Spilde M.N., Northup D.E. (2017) Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PLoS One*, 12, e0169339. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169339>.
- Lee, H.J., Whang, K. S. (2016). *Streptomyces rhizosphaerihabitans* sp. nov. and *Streptomyces adustus* sp. nov., isolated from bamboo forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3573–3578. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001236>.
- Miller, A.Z., García-Sánchez, A.M., L. Coutinho, M., Costa Pereira, M.F., Gázquez, F., Calaforra, J.M., Forti, P., Martínez-Frías, J., Toulkeridis, T., Caldeira, A.T., Saiz-Jimenez, C. (2020). Colored microbial coatings in show caves from the Galapagos Islands (Ecuador): First Microbiological Approach. *Coatings*, 10, 1134. <https://doi.org/10.3390/coatings1011134>.
- Mohapatra, B., Sar, P., Kazy, S.K., Maiti, M.K., Satyanarayana, T. (2018). Taxonomy and physiology of *Pseudoxanthomonas arseniciresistens* sp. nov., an arsenate and nitrate-reducing novel gammaproteobacterium from arsenic contaminated groundwater, India. *PLoS One*, 13, e0193718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193718>.
- Nakamura, L.K. (1989). Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39,295-300. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-295>.
- Nielsen, P., Fritze, D., Priest, F. G. (1995). Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. *Microbiology*, 141, 1745–1761. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1745>.
- Noguchi, H., Uchino, M., Shida, O., Takano, K., Nakamura, L. K. Komagata, K. (2004). *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 2117–2120. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02895-0>.
- Northup, D.E., Melim, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L.N.E., Riquelme, C. (2011). Lava cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: Implications for life detection on other planets. *Astrobiology*, 11, 601–618. <https://doi.org/10.1089/ast.2010.0562>.
- Oromí, P. (2018). Researches in lava tubes. En: *Cave Ecology*; Moldovan, O.T., Kovác, L., Halse, S., (eds.), Springer, Cham, Switzerland. pp. 369–381.
- Oromí, P., Socorro, S. (2021). Biodiversity in the Cueva del Viento lava tube system (Tenerife, Canary Islands). *Diversity* 13, 226. <https://doi.org/10.3390/d13060226>.
- Patel, S., Gupta, R.S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov., and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 406-438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>.
- Riquelme, C., Hathaway, J.J.M., Dapkevicius, M.L.N.E., Miller, A.Z., Kooser, A., Northup, D.E., Jurado, V., Fernandez, O., Saiz-Jimenez, C., Cheeptham, N. (2015). Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1342. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01342>.
- Riquelme, C., Dapkevicius, M.L.E., Miller, A.Z., Charlop-Powers, Z., Brady S., Mason, C., Cheeptham, N. (2017). Biotechnological potential of Actinobacteria from Canadian and Azorean volcanic caves. *Applied Microbiology Biotechnology*, 101,843-857. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7932-7>.
- Rosselló-Móra, R., Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review* 25, 39-67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x>.
- Socorro Hernández, J.S., Láinez Concepción, A., Mesa Luís, F. (2010). *Parque geológico Cueva del Viento (Icod de los Vinos, Tenerife). Una ruta interpretativa turística*. En: J.J. Durán y F. Carrasco (eds.). *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*. Asociación de Cuevas Turísticas Españolas, Madrid, 279-292.

- Stackebrandt, E. (2003). The richness of prokaryotic diversity: There must be a species somewhere. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 17-22.
- Sujarit, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Pathom-Aree, W., Lumyong, S. (2016). *Streptomyces palmae* sp. nov., isolated from oil palm (*Elaeis guineensis*) rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3983–3988. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001298>.
- Sujarit, K., Mori, M., Dobashi K., Shiomi, K., Pathom-aree, W., Lumyong, S. (2020). New antimicrobial phenyl alkenoic acids isolated from an oil palm rhizosphere-associated actinomycete, *Streptomyces palmae* CMU-AB204T. *Microrganisms*, 8, 350. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030350>.
- Sumpavapol, P., Tongyongk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, Luxanani, P., Visessanguan, W. (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 60, 2364-2370. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.018879-0>.
- Thi Pham, V.H.T., Jeong, S.W., Kim, J. (2015). *Psychrobacillus soli* sp. nov., capable of degrading oil, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 65, 3046-3052. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.000375>.
- Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geißdörfer, W., Assih, E.A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R., Monroy, O., Labat, M., Ouattara, A.S. (2004) *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 54, 2245-2255. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02810-0>.
- Tohya, M., Watanabe, S., Teramoto, K., Tada, T., Kuwahara-Arai, K., Mya, S., Zin, K.N., Kirikae, T., Tin, H.H. (2020). *Pseudomonas yangonensis* sp. nov., isolated from wound samples of patients in a hospital in Myanmar. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 3597-3605. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004181>.
- Thorat, V., Kirdat, K., Tiwarekar, B., DaCosta, E., Debbarma, P., Shouche, Y., Sathe, S., Goel, R., Lodha, T., Yadav, A. (2020). *Pseudomonas lalkuanensis* sp. nov., isolated from a bacterial consortium of contaminated soil enriched for the remediation of e-waste. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 6468-6475. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004559>.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
- Yoon, J.H., Oh, T.K. (2005). *Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 55, 1945-1948. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63332-0>.