



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología

**Análisis, impacto y evolución de los biofilms
fotosintéticos en espeleotemas.
El caso de la Cueva de Nerja**

Yolanda del Rosal Padial





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Yolanda del Rosal Padial

 <http://orcid.org/0000-0003-0910-1214>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

PROF. DR. D. EDUARDO MARTÍNEZ MANZANARES, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA Y PROF. DRA. D^a. M^a CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ MARINÉ, PROFESORA JUBILADA DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA

CERTIFICAN: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Análisis, impacto y evolución de los biofilms fotosintéticos en espeleotemas. El caso de la Cueva de Nerja”, presentada por la Lcda. en Ciencias (Biología) YOLANDA DEL ROSAL PADIAL para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, bajo nuestra dirección reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado.

En Málaga, a 13 de noviembre de 2015



Fdo. Prof. Dr. D. Eduardo
Martínez Manzanares



Fdo. Prof. Dr. D^a. M. Concepción
Hernández-Mariné





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Departamento de Microbiología

D. JUAN JOSÉ BORREGO GARCÍA, Director del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga

INFORMA QUE:

D^a. Yolanda del Rosal Padial, ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expido el presente informe en Málaga, a once de noviembre de dos mil quince.



Fdo. Juan José Borrego García
Director Departamento de Microbiología

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA





A mis padres

Gracias...

A la Prof. Dra. Mariona Hernández Mariné por todo lo que me ha enseñado, por su esfuerzo y dedicación en la elaboración de esta memoria pero, sobre todo, por el cariño con el que ha endulzado tantas horas de trabajo. Mil gracias por ser mi maestra y amiga.

Al Prof. Dr. Eduardo Martínez Manzanares por ayudarme siempre y aportar luz en momentos de tinieblas. Gracias a sus enseñanzas, consejos y humanidad ha sido posible realizar este trabajo que ya culmina.

Al Prof. Dr. Fernando Marín, mi mentor, por confiar en mí e iniciarme en este maravilloso mundo de la investigación del medio subterráneo, en general y de la Cueva de Nerja, en particular. Al Prof. Dr. Francisco Javier Barón, por sus numerosas horas de explicación, siempre dispuesto a ayudarme con los números, en las múltiples ocasiones en que lo necesité.

A los servicios de microscopía de los Centros Científicos i Tecnológicos de la Universidad de Barcelona y de la Universidad Autónoma de Barcelona, especialmente y con mucho cariño, a Mónica. A la Unidad de Análisis de Imagen de la Universidad de Barcelona y al grupo de investigación de Microbiología Ambiental y Patrimonio Cultural del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, cuyos trabajos han sido imprescindibles para la realización de esta memoria. Al Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga por permitirme formar parte de su excepcional equipo científico y humano. Al Consejo Científico Asesor de la Cueva de Nerja por auspiciar, en todo momento, los proyectos de investigación destinados a la conservación y difusión de la cavidad, entre ellos, el que ha permitido la elaboración de esta tesis. A la Fundación Cueva de Nerja, sin cuya financiación no hubiera sido posible. A Cristina, amiga y compañera de innumerables experiencias vividas en el maravilloso el mundo subterráneo, gracias.

A mi familia. A mis padres y a mi hermana por su apoyo y confianza incondicional. A Manu, por hacer realidad este sueño de vida y formar parte de ella. A mis hijas, Noa y Marina.... porque son mi vida.... os debo muchas horas de juego.

A todos, gracias.



Los trabajos desarrollados para la elaboración de la presente tesis doctoral forman parte del *Proyecto General de Investigación aplicada a la conservación del Bien de Interés Cultural Cueva de (2008-2014)*

Consejería de Cultura, Junta de Andalucía (Reg. 200870100014844)

Financiado por la Fundación de Servicios Cueva de Nerja.

Las publicaciones científicas relacionadas con esta tesis que se han realizado son las siguientes:

del Rosal, Y., Garrido, A., Liñán, C. y Hernández Mariné, M. 2010. Los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja: catalogación, estudio y resultados preliminares. En: J.J. Durán y F. Carrasco (Eds.). *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*. 563-574. Madrid: ACTE. ISBN: 978-84-614-4630-8.

del Rosal, Y., Roldán, M., Liñán, C. Garrido, A. y Hernández-Mariné, M. 2012. Tecnologías de microscopía: una ventana al conocimiento del biodeterioro. En: J.J. Durán. y P.A. Robledo (Eds.). *Las cuevas turísticas como activos económicos: conservación e innovación*. 359-372. Madrid: ACTE. ISBN: 978-84-616-1140-9.

del Rosal, Y., Liñán, C. y Hernández-Mariné, M. 2014. The conservation of the Nerja Cave: preserving anthropogenic impact in a tourist cave. En: Saiz Jiménez (Ed.). *The conservation of Subterranean Cultural Heritage*. 193-206. ISBN: 978-1-138-02694-0.

del Rosal, Y., Roldán, M. y Hernández-Mariné, M. 2014. Phototrophic microorganisms in the tourist cave of Nerja. En: Rogerio-Candelera, M.A. (Ed.). *Science, Technology and Cultural Heritage*. 229-235. ISBN: 978-1-138-02744-2 (Hbk) ISBN: 978-1-315-71242-0 (eBook PDF)

RESUMEN

Análisis, impacto y evolución de los biofilms fotosintéticos en espeleotemas. El caso de la Cueva de Nerja

En cuevas y otros monumentos del patrimonio natural y cultural hipogeo, el desarrollo de organismos fotosintéticos en el entorno de las lámparas de luz eléctrica se conoce como *mal verde* (*maladie verte*) o *flora de las lámparas* (*lampenflora* o *lamp flora*). Con frecuencia, estos organismos forman parte de comunidades estructurales complejas, denominadas biofilms, que pueden inducir cambios físico-químicos en el sustrato colonizado. Cuando estas alteraciones son indeseables, tales como discoloración, disolución, ruptura o arenización se denominan biodeterioro. Conocer estas comunidades biológicas permite el diseño de estrategias para su control, en base a una adecuada conservación del patrimonio natural y cultural del medio subterráneo. En esta memoria se describen los trabajos de investigación realizados sobre los biofilms fotosintéticos que colonizan los espeleotemas de la Cueva de Nerja, con la finalidad de obtener información relativa a su biodiversidad, ecología y fisiología. Para ello se han empleado técnicas de fotomonitorización, análisis digital de imágenes, procesado estadístico y microscopía, estas últimas completadas con técnicas de análisis molecular. Los resultados obtenidos han permitido la descripción de biofilms con desarrollo epilítico y casmoendolítico, así como identificar aquellos factores ambientales que favorecen o perjudican su desarrollo. Estos biofilms inducen diferentes procesos de biodeterioro del sustrato y se forman por organismos fotosintéticos adaptados a las condiciones ambientales de la cavidad, en especial a la escasez de agua y una reducida iluminación. *Chroococcidiopsis* sp. y *Cyanidium* sp., considerados organismos extremófilos, han sido identificados como los grupos más abundantes y de presencia ubicua en la Cueva de Nerja. Otros géneros tales como *Aphanothece*, *Leptolyngbya*, *Gloeocapsa*, *Pseudophormidium*, *Chalicogloea*, *Desmococcus*, *Jenufa*, *Stichococcus*, *Humidophila*, *Gloethece* y *Nostoc* también han sido descritos. Entre las estrategias propuestas para controlar su desarrollo se encuentran evitar el aporte extraordinario de agua a la cavidad y el diseño de un sistema de iluminación eléctrica específico basado en la información pigmentaria ofrecida por las técnicas de microscopía. Por otro lado, los procesos de adaptación y las estrategias de resistencia que pueden desarrollar estos biofilms fundamentan la realización de ensayos, que incluyan la realización de estudios fisiológicos, previos a la realización de cambios definitivos en el sistema de iluminación de la cavidad.

INDICE

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Cuevas	21
1.2. Microbiota asociada a cuevas. Biofilms	24
1.3. Cuevas turísticas	29
1.4. Biofilms fotosintéticos en cuevas	30

CAPITULO 2.

LA CUEVA DE NERJA

2.1. Descripción	35
2.2. Geología y mineralogía	37
2.3. Hidrodinámica e hidroquímica	38
2.4. Microclima	38
2.5. Fauna	42
2.6. Microbiota	42



CAPITULO 3.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general	45
3.2. Objetivos específicos	45

CAPITULO 4.

BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS EN LA CUEVA DE NERJA

4.1. Antecedentes en el estudio de los biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja	47
4.2. Inventario de biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja	53
4.3. Criterios de selección de las zonas de control	55
4.4. Descripción de las zonas de control	57

CAPITULO 5.

EVOLUCIÓN DE LOS BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS DE LA CUEVA DE NERJA RELACIÓN CON LOS FACTORES AMBIENTALES

5.1. Introducción	67
5.2. Objetivos	70
5.3. Material y Método	70
5.3.1. Selección de las zonas de control	70
5.3.2. Iluminación de las zonas de experimentación	71
5.3.3. Realización de fotografías	71
5.3.4. Procesado digital de imágenes. Cálculo de la variable <i>verde</i>	72
5.3.5. Monitorización de los parámetros ambientales	81



5.3.6. Análisis estadístico	83
5.4. Resultados	85
5.4.1. Parámetros ambientales	85
5.4.1.1. Temperatura del aire	85
5.4.1.2. Humedad relativa del aire	86
5.4.1.3. Concentración de dióxido de carbono del aire	88
5.4.1.4. Radiación fotosintética activa (PAR)	89
5.4.2. Biofilms fotosintéticos	90
5.4.2.1. Representación gráfica	92
5.4.2.2. Resultados por zonas de control	109
5.4.2.3. Evolución del tamaño de los biofilms	117
5.4.2.4. Modelos de regresión	120
5.4.2.5. Correlación con los factores ambientales	121
5.4.2.6. Variabilidad del tamaño de los biofilms	122
5.4.2.7. Análisis de los cambios de tamaño de los biofilms	122
5.4.3. Zonas de experimentación	125
5.5. Discusión	130

CAPITULO 6.

ANÁLISIS DE LOS BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS: ESTRUCTURA, BIODIVERSIDAD, ESTADO FISIOLÓGICO DE LOS MICROORGANISMOS Y RELACIÓN CON EL SUSTRATO

6.1. Introducción	139
6.2. Objetivos	143



6.3. Material y Método	143
6.3.1. Selección de las zonas y toma de muestras	143
6.3.2. Técnicas de microscopía	145
6.3.2.1. Microscopía estereoscópica y de campo claro	146
6.3.2.2. Microscopia de Barrido Láser Confocal (CSLM)	146
6.3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	149
6.3.2.4. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	150
6.3.3. Análisis molecular	150
6.4. Resultados	155
6.4.1. Resultados del análisis microscópico por zonas de muestreo...	155
6.4.2. Tabla resumen	188
6.4.3. Resultados del análisis molecular	189
6.5. Descripción de los morfotipos y morfoespecies...	195
6.5.1. Cl. Cyanophyceae, O. Chroococciopsidales, F. Chroococciopsidaceae	195
6.5.2. Cl. Cyanophyceae, O. Chroococcales, F. Aphanothecaceae	200
6.5.3. Cl. Cyanophyceae, O. Chroococcales, F. Microcystaceae	205
6.5.4. Cl. Cyanophyceae, O. Chroococcales, F. Chroococcaeae	208
6.5.5. Cl. Cyanophyceae, O. Synechococcales, F. Leptolyngbyaceae	209
6.5.6. Cl. Cyanophyceae, O. Oscillatoriales, F. Microcoleaceae	212
6.5.7. Cl. Cyanophyceae, O. Nostocales, F. Nostocaceae	215
6.5.8. Cl. Chlorophyceae, O. Chlamydomonadales, F. Coccomyxaceae	217
6.5.9. Cl. Chlorophyceae, O. Chlorophyceae incertae sedis, F. Chlorophyceae	218
6.5.10. Cl. Trebouxiophyceae, O. Prasiolales, F. Prasiolaceae	222
6.5.11. Cl. Bacillariophyceae, O. Naviculales, F. Diadesmidaceae	227

6.5.12. Cl. Cyanidiophyceae, O. Cyanidiales, F. Cyanidiaceae	229
6.6. Discusión	232
CAPITULO 7.			
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES			
7.1. Conclusiones	241
7.2. Recomendaciones	244
BIBLIOGRAFIA	247
Anexo 1	Inventario biofilms fotosintéticos y planimetría	...	275
Anexo 2	Coefficientes estadística	...	305
Anexo 3	Espectroscopia Raman análisis de <i>Black Carbon</i>	...	325
Anexo 4	Resultados biología molecular (bacterias y arqueas)	...	331

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Cuevas

El término *cueva* posee definiciones en función de una amplia variedad de criterios (Ford, 1988). Según Curl (1996), es “un espacio hipogeo, de cualquier tamaño, formado por disolución, que, en la mayoría de los casos, no cuenta con una entrada accesible para los humanos”. Una visión más antropocéntrica la define como “un espacio hipogeo accesible para los humanos” (Gillieson, 1996; Hill y Forti, 1997; Northup y Lavoie, 2001). Para White (1984) una cueva es “toda oquedad en la roca que actúa como conducto para un flujo de agua, ocasional o continuo, entre puntos de entrada, como las simas o diversos conductos preferenciales de infiltración y puntos de salida, como los manantiales o goteos”.

Existen numerosos criterios para la clasificación de las cuevas como, por ejemplo, basados en el proceso de formación, la composición de la roca o del sedimento en el que se desarrolla (Palmer, 1991), la relación con el entorno (Worboys et al., 1982) o criterios de protección y gestión ambiental (Gillieson, 1996). No obstante, mediante el empleo de un único criterio no es posible realizar una clasificación completa y genérica de todos los elementos que engloba el término *cueva*. Desde un punto de vista heurístico, se puede establecer la siguiente clasificación que comprende los principales tipos de cuevas (Klimchouk, 2004):

1. Cuevas volcánicas: se forman mediante diferentes procesos. De ellos, el más significativo es la solidificación de la superficie de la lava que fluye de un volcán, que actúa como aislante térmico bajo el cual la lava continua desplazándose hasta que la erupción termina. El resultado es un hueco en el interior del tubo por el que circuló la lava. Estas cuevas también se denominan “tubos de lava”.
2. Cuevas glaciares: formadas a partir de la fusión del hielo de los glaciares en las grietas y zonas de contacto con la roca, debido al agua que resulta de la fusión del hielo más superficial del glaciar.
3. Cuevas de grieta: se pueden formar en cualquier roca, debido a la actividad de fuerzas de disyunción. Dentro de este grupo se incluyen las cuevas tectónicas.
4. Cuevas marinas: producidas por la erosión de las olas marinas o de grandes lagos. Se pueden formar a partir de varios tipos de rocas que se localizan en zonas costeras acantiladas.
5. Cuevas de tubería: se desarrollan en sedimentos de grano fino mal consolidados tales como turba, margas, arcillas y, especialmente, loess, a partir de la eliminación, por transporte, de pequeños clastos suspendido en agua.
6. Cuevas de erosión: se forman en rocas de características similares a la pizarra, debido a la acción mecánica de las corrientes de agua. Son numerosas en los acantilados.
7. Cuevas de disolución o kársticas: engloban a la mayoría de cuevas naturales (Engel, 2010) y se desarrollan, principalmente, en roca caliza y similares, aunque también surgen a partir de otras litologías como dolomías, evaporitas, silicatos, basaltos y granitos. Estas cuevas representan elementos geológicos característicos de los paisajes kársticos (Figura 1.1). Con el término *karst* (procedente de la palabra *karst*, nombre alemán de la región eslovena de Carso) se alude a una forma de relieve originada, esencialmente, por la disolución de rocas, como la caliza, dolomía, yeso, etc., que se componen por minerales solubles en agua. Cuando las cuevas se forman mediante otros procesos (transporte, fusión, erosión, etc.) también se emplea el término *pseudokarst* (Gillieson, 1996). Las cuevas kársticas presentan importantes interacciones con los

humanos y, probablemente, son las mejor estudiadas desde un punto de vista científico. Estas formaciones se pueden clasificar en cavidades de alta, moderada o baja energía, en función de que presenten un intercambio de energía elevado, medio o prácticamente nulo con el exterior (Heaton, 1986). Las cuevas de alta energía se caracterizan por presentar condiciones ambientales con importantes fluctuaciones de origen natural, por lo que difícilmente son alteradas por factores antrópicos. En cambio, las cuevas de baja energía presentan condiciones ambientales muy estables y son fácilmente alterables por factores antrópicos.

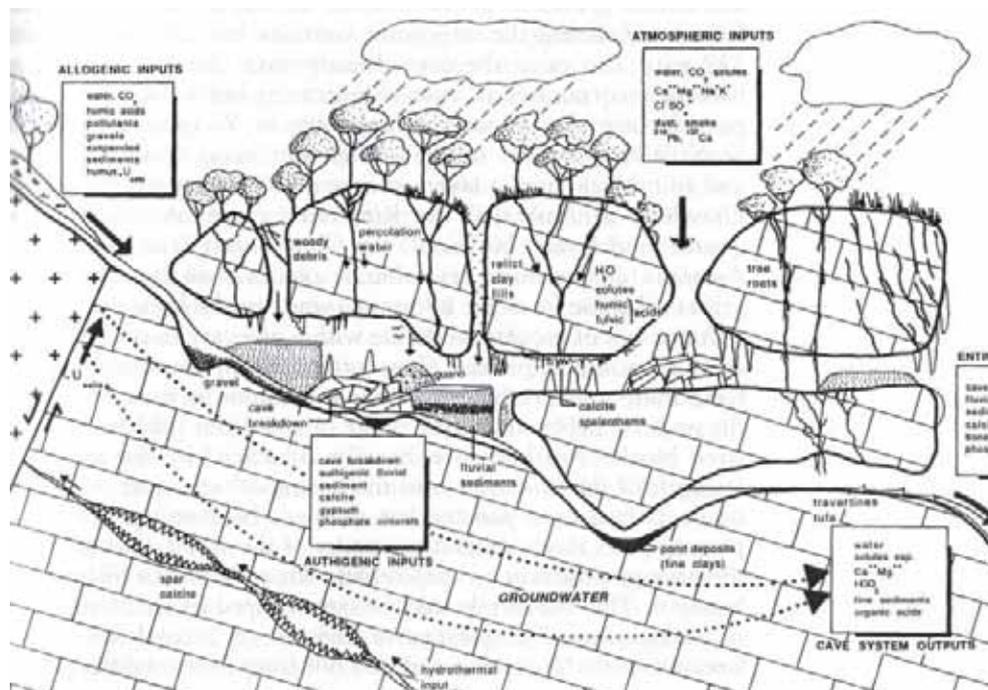


Figura 1.1. Teórico sistema de cuevas kársticas. Modificado de Gillieson (1996).

Las cuevas constituyen ambientes muy especializados caracterizados por una temperatura uniforme, elevada humedad, escasa o nula iluminación (Hernández-Mariné et al., 1999) y poca materia orgánica. En la mayoría de los casos, las cuevas presentan una comunicación con el medio externo que las convierte en zona de tránsito entre los sistemas ecológicos epigeo e hipogeo (Prous et al., 2004). En esta zona se pueden producir pequeñas fluctuaciones climáticas inducidas por variaciones atmosféricas en el exterior que serán más acentuadas en la entrada de la cueva mientras que, en la parte más profunda, las variables ambientales suelen permanecer prácticamente constantes. En relación con el intercambio de energía y materia orgánica con el exterior, las cuevas pueden ser consideradas ambientes prácticamente aislados (Cigna, 1993).



1.2. Microbiota asociada a cuevas. Biofilms

Los microorganismos forman el conjunto de seres vivos con mayor cantidad de biomasa del planeta y también el más extendido. Gracias a su gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales han colonizado la práctica totalidad de los ambientes descritos, incluidos los extremos. Este hecho les otorga un papel relevante en la mayoría de los procesos biogeoquímicos de la Tierra (Pace, 1997; Whitman et al., 1998).

Las cuevas son ambientes muy específicos, con escasos recursos nutricionales y energéticos (Delay y Juberthie, 1981), por lo que resultan hábitats hostiles para muchos grupos de microorganismos (Cunningham et al., 1995; Engel et al., 2001; Barton y Northup, 2007). En las cuevas, el grupo de microorganismos que habitualmente prolifera, en primer lugar, es el que integra a los microorganismos de metabolismo quimiolitotrofo: bacterias y arqueas que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos y emplean el anhídrido carbónico como fuente de carbono. El grupo de microorganismos heterótrofos suele ser menos numerosos y se localiza en zonas de acumulación de materia orgánica como, por ejemplo, excrementos de animales o sedimentos detríticos arrastrados por el agua al interior de la cueva (Humpreys, 1991; Bottrell, 1996). El grupo de microorganismos fotoautótrofos se desarrolla, de forma exclusiva, en zonas iluminadas (Albertano, 2012).

La entrada de microorganismos desde el exterior al interior de la cueva se puede llevar a cabo a través de varios medios de transporte como, por ejemplo, el agua de infiltración, las corrientes de aire, la fauna o mediante sedimentación a través de poros, fisuras o pequeños huecos en la roca. La colonización posterior de las diferentes zonas de la cavidad estará en función de las condiciones ambientales y de la biorreceptividad de los diferentes sustratos, es decir, su potencialidad de ser colonizados (Guillitte, 1995; Miller et al., 2009). Así, todos los sustratos, naturales o artificiales, en las condiciones adecuadas, son susceptibles de ser colonizados (Di Pippo et al., 2009; Warscheid y Braams, 2000).

Los trabajos sobre la microbiota de cuevas se iniciaron en el siglo XIX, principalmente en Europa (Caumartin, 1963). Desde entonces, un amplio espectro de microorganismos ha sido identificado habitando en el interior de cavidades. En este medio subterráneo, procariotas,

actinobacterias, hongos, levaduras y algas representan el conjunto de microorganismos principalmente identificados (Jurado et al., 2010).

Las bacterias son los microorganismos más representativos de la microbiota de cuevas, en especial, las actinobacterias de los géneros *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Nocardioides* and *Streptomyces* (González et al., 2005), responsables del característico olor de algunas cuevas (Northup y Lavoie, 2001). También se han descrito bacterias relacionadas con el ciclo del nitrógeno y del azufre, como los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Fliermans et al., 1974) y *Thiobacillus*, *Beggiatoa* y *Thiotrix* (Sarbu, et al., 1996) respectivamente. Otros géneros identificados son *Leptothrix*, *Gallionella* y *Clonothrix* (Caldwell y Caldwell, 1980; Davis et al., 1990), bacterias capaces de oxidar el hierro y el manganeso, cuya presencia también sugiere su participación en el depósito de manganeso y hierro en este medio hipogeo. Microorganismos del filo Proteobacteria también han sido identificados en cavidades, llegando a representar el grupo más abundante en algunos casos (González et al., 2005).

Las arqueas son un grupo de procariotas morfológicamente similar a las bacterias. En un principio, el desarrollo de este grupo microbiológico estuvo asociado a ambientes extremos pero, posteriormente, fue descrito en numerosos y variados ambientes naturales (DeLong et al., 1999). Aunque en menor número, también se han realizado trabajos sobre arqueas en cavidades como, por ejemplo, Wind Cave en Dakota del Sur (EEUU), donde se identificaron hasta veinte filotipos diferentes de Crenarchaeota y dos de Euryarchaeota (Chelius y Moore, 2004). Otros trabajos sobre el guano de murciélagos en Domica Cave (Eslovaquia) determinaron que la mayoría de las arqueas pertenecían a la división Crenarchaeota (Chroňáková et al., 2009).

Los hongos precisan de una fuente de materia orgánica para su desarrollo. En las cuevas, el aporte principal de materia orgánica procede de restos de organismos muertos y excrementos. Otros elementos de naturaleza orgánica, como madera y sus derivados, que se introducen en las cuevas con motivo de su habilitación turística pueden constituir una importante fuente nutricional para el desarrollo de estos microorganismos (Docampo et al., 2011). Los hongos más comunes identificados en este medio son los filamentosos (Zygomycetes) (Northup y Lavoie, 2001). En la cueva de Lascaux (Francia) el desarrollo masivo del hongo *Fusarium solani* representa el inicio de sucesivas crisis biológicas en la cavidad que han provocado un cambio

irreversible de sus condiciones ecológicas así como el cese de la actividad turística (Bastian et al., 2010).

Las algas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos que precisan de una fuente de luz para su desarrollo y utilizan el anhídrido carbónico como fuente de carbono. En cuevas, estos organismos se desarrollan en la zona más externa, con disponibilidad de luz natural, o en el entorno de los focos de luz eléctrica. Las algas clorófitas pueden ser las más numerosas en cuevas, donde también se han descrito rodófitas y diatomeas y, ocasionalmente, líquenes, musgos y helechos, especialmente en las zonas abiertas directamente al exterior.

Un grupo especial de microorganismos son los virus, endoparásitos estrictos que dependen fisiológicamente de una célula viva. En la Cueva del Tesoro (España) han sido descritos, por primera vez en este medio, virus asociados a microorganismos fotosintéticos (Jurado et al., 2014).

En la Naturaleza, la mayoría de los microorganismos raramente se encuentran como células individuales móviles sino que suelen formar comunidades unidas a superficies que se denominan biofilms o biopelículas, que les favorece la supervivencia en medios hostiles (Lawrence et al., 1991; Costerton et al., 1999). Los biofilms se componen de agua (70-90% aprox.), organismos de diverso metabolismo y una matriz hidratada de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), segregada por ellos mismos (Flemming, 1993). Los microorganismos pueden acceder al sustrato gracias a su movilidad o mediante diferentes medios de transporte como el aire, el agua o la fauna, entre otros. Posteriormente, casi todas las especies de microorganismos disponen de mecanismos de adhesión a la superficie y a otros microorganismos (Hernández-Mariné y Roldán, 2005; Belleza et al., 2006). Las características del sustrato, la disponibilidad de nutrientes, las condiciones medioambientales y la propia composición microbiana del biofilm serán los factores que determinen su estructura final (Davey y O'Toole, 2000; Walker y Pace, 2007). Los biofilms pueden constituir biocenosis complejas formadas por bacterias, cianobacterias, algas, hongos y levaduras (Cooksey, 1992; Jones, 1995). Kumar y Anand (1998) determinaron que los biofilms con mayor biodiversidad son los más resistentes frente a condiciones externas desfavorables. En un biofilm, las células actúan de forma coordinada y se comunican a través de señales químicas generadas por ellos mismos (*quórum*

sensing). Esta comunicación intercelular regula la expresión genética de las diferentes zonas de la comunidad del biofilm (Davies et al., 1998). En biofilms, formados por cianobacterias que habitan cuevas prehistóricas con pinturas murales, se ha demostrado su capacidad de producir autoinductores AHL (Laiz et al., 1999).

En ocasiones, el desarrollo de biofilms conlleva un cambio en las propiedades del sustrato (Golubic y Schneider, 2003). Cuando este cambio es indeseable se denomina biodeterioro (Hueck, 1965, 1968) y son numerosos los grupos de microorganismos que pueden producirlo (Brock y Sand, 1993; Sáiz-Jiménez, 1994). Una definición más detallada de biodeterioro lo describe como “un cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de organismos y/o microorganismos pertenecientes a varios grupos sistemáticos” (Hueck, 1965, 1968; Kumar y Kumar, 1999). En este sentido, son muchos los trabajos que han puesto de manifiesto la relación entre los procesos de alteración de monumentos pétreos y otras obras de arte y la presencia de microorganismos como bacterias, hongos, líquenes y algas (Saiz-Jiménez, 1994; Warshed y Braams, 2000; Roldán y Hernández-Mariné, 2009). Las alteraciones más comunes producidas por microorganismos son de tipo estético (discoloraciones), físico (disgregaciones o rupturas) y químico (disoluciones), entre otras (del Rosal et al., 2010a, 2014b, 2014c). La actividad fotosintética induce cambios en el entorno del biofilm en su conjunto, genera energía y reduce el dióxido de carbono, proporciona materia orgánica y oxígeno a los microorganismos heterótrofos y contribuye a la degradación de los compuestos orgánicos presentes en el medio (Albertano, 2012). Además, algunas cianobacterias son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico.

Las cuevas constituyen el nicho ecológico de un amplio espectro de biofilms, que pueden estar formados por microorganismos, plantas e incluso pequeños artrópodos. En general, estas comunidades biológicas en las cuevas suelen ser poco diversas, con una estructura sencilla y muy sensibles a cambios ambientales (Chelius et al., 2009). Las interacciones entre los microorganismos y la roca o los espeleotemas son complejas y variadas. En ocasiones, las consecuencias son puramente estéticas, debidas a la coloración de microorganismos pigmentados sobre el sustrato pero, en otros casos, puede inducir importantes procesos de alteración del sustrato (Warscheid y Braams, 2000). Así, Papida et al. (2000) pusieron de manifiesto procesos de deterioro en el sustrato rocoso a generados por los cambios físicos y/o químicos inducidos por

el desarrollo microbiano. Un tipo de biodeterioro de la piedra se genera debido a la acción de los ácidos orgánicos e inorgánicos, producidos como subproducto del metabolismo microbiano (Sand y Bock, 1991), que reaccionan con el calcio de la piedra y dan lugar a la formación de minerales. En las rocas carbonatadas, el ácido sulfúrico producido por bacterias del azufre puede formar yeso (sulfato de calcio), mientras que el ácido oxálico producido por hongos, líquenes y algunas bacterias, puede formar minerales de oxalato cálcico. Por otro lado, la matriz extracelular (EPS) que rodea a algunos microorganismos, de forma individual o conjunta, también puede participar en procesos de biodeterioro del sustrato mediante cambios en su volumen, de debido a su hidratación o desecación, o procesos de disolución del carbonato cálcico también (Warscheid y Braams, 2000; Perry et al., 2004).

El biodeterioro producido por biofilms puede poner en riesgo la conservación del patrimonio natural y/o cultural que albergan las cuevas. En la literatura científica se documentan varios casos que pueden considerarse extremos, en los que el desarrollo “incontrolado” de microorganismos ha representado una amenaza para la cueva que, en ocasiones, ha motivado su cierre, en el caso de cavidades turísticas. Uno de los más conocidos es el de la cueva de Lascaux (Francia). En esta cueva la colonización del alga *Bracteacoccus minor* como consecuencia de la presencia de luz artificial (Lefèvre, 1974) y, posteriormente, la colonización masiva del hongo *Fusarium solani*, han producido varias crisis biológicas en la cueva (Bastian et al., 2010). En la cueva de Tito Bustillo (España), numerosos espeleotemas se encontraban abundantemente colonizados por microorganismos fotosintéticos, entre ellos, la cianobacteria calcificante *Scytonema julianum* (Sáiz-Jiménez, 1999). La cueva de Castañar de Ibor tuvo que ser cerrada al público en 2008 debido a un brote fúngico producido por *Mucor circinelloides* y *Fusarium solani* (Jurado et al., 2010). Por último, el crecimiento de microorganismos fotosintéticos debido a una intensa iluminación artificial motivó el cierre de la cueva de Altamira en el año 2002, (Sáiz-Jiménez et al., 2011).

Las investigaciones realizadas en estas cuevas concluyeron para el diseño de actuaciones destinadas a prevenir y, en su caso, combatir los procesos de biodeterioro inducido por microorganismos se precisa de un análisis integral de estas comunidades biológicas que permita conocer su diversidad, estructura, fisiología y relación con el soporte (Albertano y Urzi, 1999; Hernández-Mariné et al., 2001, 2003; Roldán et al., 2004b; del Rosal et al., 2014b, 2014c;



Walker y Pace, 2007). Paralelamente, es importante conocer la evolución de estos organismos antes y después la puesta en práctica de actuaciones para su control.

1.3. Cuevas turísticas

Desde la Prehistoria, las cuevas han sido utilizadas por el hombre como refugio, zona de hábitat, de culto o necrópolis. Así, son numerosas las cuevas que albergan vestigios humanos prehistóricos, tales como las de Shanidar, en Iraq (Solecki, 1972), Cresswell Crags, en Inglaterra (Campbell, 1977), Lascaux, en Francia (Brune et al., 1990) o Altamira y Nerja, en España (Andrieux, 1983; Jordá, 1986), habiendo sido datada en 700.000 años antes del presente la evidencia humana más antigua hallada en una cueva (Ren et al., 1981). Además, las cuevas también han sido empleadas como fuente de agua, guano y minerales, e incluso como zona hospitalaria para enfermos de tuberculosis (Lyons, 1992). En la actualidad, las cuevas son utilizadas, principalmente, como recurso turístico. El turismo de cuevas, conocido como “subterráneo” fue iniciado a finales del siglo XIX, cuando esta actividad era practicada por un reducido número de personas equipadas con candelabros y antorchas. En la actualidad, aproximadamente 20 millones de turistas visitan cada año diferentes cavidades de todo el planeta (Gilleson, 1996). El aumento de esta práctica ha llegado a convertir este tipo de turismo en un importante recurso económico que, en ocasiones, constituye el principal motor económico del entorno social de la cueva. En 1981, se estimó la existencia de unas 650 cavidades turísticas, repartidas por todo el planeta, que contaban con accesos habilitados y sistemas de iluminación eléctrica. Posteriormente, esta cifra ha ido aumentando debido al descubrimiento y acondicionamiento de nuevas cavidades. La habilitación de una cueva para su visita precisa de una serie de actuaciones previas a su apertura, entre ellas, construir una entrada accesible desde el exterior, delimitar un recorrido a través de las salas interiores y la instalación de un sistema de iluminación eléctrica. Estas actuaciones y los cambios ambientales derivados de la presencia de personas en el interior de la cueva producen el denominado “impacto antrópico”, que puede estar relacionado con cambios hidrogeológicos, geomorfológicos, ambientales, microbiológicos o faunísticos (Gilleson, 1996, Carrasco et al, 2002). El grado de alteración antrópica de una cueva puede variar en función de las actuaciones acometidas y del tipo de turismo que se practica. Así, en cuevas turísticas convencionales, caracterizadas por un turismo “de masas”, el impacto

antrópico suele ser mayor que en las cuevas habilitadas para la práctica de espeleoturismo, con grupos limitados de participantes que sólo precisa de una instalación espeleológica y un reducido sistema de iluminación artificial.

Con frecuencia, las cuevas turísticas se encuentran bajo protección jurídica. En España, las figuras de protección de las cavidades las catalogan como Bien de Interés Cultural (anteriormente Monumento Nacional) o Monumento Natural, en base al patrimonio cultural y/o natural que albergue la cueva. A nivel internacional, la United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), otorga la consideración de Patrimonio de la Humanidad a sitios específicos del planeta que contienen un valor natural o cultural excepcional para la herencia común de la humanidad. Algunas cuevas catalogadas Patrimonio de la Humanidad son las de Altamira (España) o Mamuth Cave (EEUU). En cualquier caso, la finalidad principal de la protección de cavidades es catalogar, preservar y poner en valor su riqueza natural y cultural. Por ello, conciliar la actividad turística con una adecuada conservación de los valores patrimoniales que alberga una cavidad es, en la actualidad, un objetivo prioritario en la gestión de cavidades turísticas.

1.4. Biofilms fotosintéticos en cuevas

En la biosfera, los organismos autótrofos y los heterótrofos viven conjuntamente en un gran ciclo interdependiente. Los primeros obtienen la energía a partir de la luz y utilizan el dióxido de carbono para construir sus biomoléculas orgánicas mientras que, los segundos, emplean estos productos orgánicos y devuelven el dióxido de carbono al medio. La radiación fotosintética activa (PAR) corresponde a la radiación integrada del rango de longitudes de onda que puede ser empleada por los organismos fotosintéticos. Esta radiación coincide, aproximadamente, con el espectro de luz visible y comprende longitudes de onda entre 380 nm y 710 nm que equivales al rango de absorción de las moléculas encargadas de absorber la energía luminosa (Larcher, 1995). La disponibilidad de radiación fotosintética es el parámetro que determina si los microorganismos que forman un biofilm son mayoritariamente fotosintéticos (algas y cianobacterias) o heterótrofos (hongos y bacterias) (Roldán y Hernández-Mariné, 2009).



En condiciones de iluminación adecuadas, los microorganismos fotosintéticos se desarrollan preferentemente sobre sustratos húmedos y porosos, tales como la superficie de rocas calcáreas, pudiendo ser los colonizadores de rocas y espeleotemas. Un estado avanzado de su desarrollo puede formar estructuras más complejas que suelen integrar microorganismos heterótrofos, como bacterias y hongos que, en conjunto, pueden incrementar la agresión hacia el sustrato (Tiano, 1995; Tomaselli, 2000; Crispim, 2005). La evolución de estos biofilms se favorece o mengua en función de factores como la intensidad, calidad y duración de la iluminación y la disponibilidad de agua (Abdelahad, 1989; Smith y Olson, 2007), además de las características intrínsecas del sustrato (humedad, porosidad, composición, presencia de nutrientes, etc.).

En cuevas, la luz favorece el desarrollo de biofilms fotosintéticos fácilmente identificables por su coloración en tonalidades que oscilan desde el verde al gris y corresponden al color propio del sustrato combinado con los microorganismos que lo colonizan. Estos biofilms pueden crecer en el suelo, las paredes y los espeleotemas más próximos a la fuente de luz (Hernández-Mariné et al., 1999, Roldán et al., 2004a, del Rosal et al., 2014b, c). Cuando la luz que emplean es natural, los biofilms se consideran parte de la microbiota autóctona de la cueva y si la luz es artificial, se consideran oportunistas. La colonización del entorno de los focos de luz eléctrica por biofilms fotosintéticos se conoce como “mal verde” (*maladie verte*) (Lefevre, 1974) o “flora de las lámparas” (*lampenflora* o *lamp flora*) (Dobat, 1998). Esta colonización microbiana en el interior de las cuevas forma parte del denominado “impacto antrópico” que alude a la alteración de las condiciones naturales de una cueva como consecuencia de la actividad humana (Andrieux, 1988; Huppert et al., 1993; Mangin y D’Hulst, 1995).

Algas y cianobacterias son los microorganismos fotosintéticos mayoritariamente identificados en cavidades (Albertano, 2012). Estos microorganismos, ubicuos en el medio exterior, pueden acceder a estos sustratos de varias formas: debido a la movilidad del propio microorganismo, por sedimentación gravitacional tras acceder a través de poros o fisuras en el techo o transportados por corrientes de agua, aire, animales, etc. Las algas verdes poseen los pigmentos clorofila *a* y *b* y las algas rojas y cianobacterias, además de la clorofila *a*, poseen ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina), pigmentos accesorios que permiten ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y actuar como sistema de protección

frente a una elevada radiación luminosa. Esta composición pigmentaria y la resistencia a la desecación que les otorga una importante capa mucilaginosa compuesta de heteropolisacáridos, proteínas y ADN y segregada por ellos mismos, permite su evolución en el medio hipogeo iluminado. En general, en cavidades kársticas, las cianobacterias se disponen en mosaicos o cinturones según las condiciones ambientales (Roldán et al., 2004a). Así, las cianobacterias cocoides, rodeadas por grandes cantidades de exopolisacáridos, como las del género *Gloeothece* y la ubicua filamentosa *Scytonema julianum* (Kütz.) Menegh., son abundantes en zonas próximas a las entradas, en áreas iluminadas y con goteo, mientras que *Nostoc punctiforme* (Kütz.) Hariot o formas filamentosas tales como *Leptolyngbya* sp., *Microcoleus* sp., *Schizothrix* sp. o diversas especies del género *Scytonema* son más abundantes en zonas profundas y con poca luz. En las zonas más profundas de cavidades, con muy poca o ninguna luz, una humedad relativa generalmente elevada, pocas variaciones durante el ciclo diurno y pequeñas diferencias entre las temporadas secas y la época de lluvias, suelen proliferar cianobacterias filamentosas con vainas calcificadas y con pigmentos accesorios, tales como *Geitleria calcarea* Friedmann, *Herpyzonema pulverulentum* Hernández-Mariné & Canals, *Iphinoe spelaeobios* Lamprinou and Pantazidou, *Loriellopsis cavernicola* Hernández-Mariné & Canals y *Scytonema ocellatum* Lyngb. ex Bornet & Flahault (Hernández-Mariné et al., 2001).

Respecto a la humedad, para el desarrollo de los biofilms en general, parece ser más determinante la duración de los periodos secos y el número de períodos húmedos (Gladis-Schmacka et al., 2014) que la cantidad total de agua disponible (Büdel et al., 2009). En relación con la disponibilidad de agua, algunos organismos han desarrollado estrategias de supervivencia durante períodos de sequía (Potts, 1999), que incluyen el empleo de agua retenida en el sustrato y la formación de compuestos protectores tales como sacarosa o trehalosa (Potts, 2001). Por grupos taxonómicos, las algas verdes pueden sobrevivir con una humedad ambiental elevada, mientras que las cianobacterias necesitan agua líquida o un 100% de humedad ambiental para realizar la fotosíntesis. No obstante, cianobacterias como *Chroococidiopsis* sp. y *Nostoc commune* Vaucher, pueden llegar a desecarse sin morir (Alpert, 2006) y recuperarse rápidamente en condiciones favorables y, por tanto, soportar fluctuaciones de humedad y sobrevivir en los hábitats más extremos durante largos períodos (Potts, 2001; Wierzychos et al., 2006; Ramírez et al., 2011).

En relación con su desarrollo en el sustrato, en cuevas han sido descritos biofilms fotosintéticos epilíticos (sobre el sustrato), criptoendolíticos (en poros y oquedades), casmoendolíticos (en grietas) y endolíticos (bajo superficies translúcidas) (Golubic, 1981). En base a la textura, Gillieson (1996) determinó que los sustratos lisos presentan menor colonización por microorganismos fotosintéticos en relación con los sustratos rugosos. El desarrollo de estos biofilms en el sustrato puede implicar procesos de biodeterioro como, por ejemplo, discoloración, erosión, disgregación, ruptura, cristalización, disolución o alteración química, proceso especialmente dañino en sustratos calcáreos (Lefevre, 1974; Hernández-Marine et al., 2003; Sáiz-Jiménez, 2011; Albertano, 2012) que, en el caso de cianobacterias endolíticas, pueden inducir la exfoliación de las capas superficiales del sustrato (Krumbein, 1988). Por su parte, Ramírez et al. (2010) demostraron que la presencia de biofilms puede aportar estabilidad y protección al sustrato. Frente a condiciones ambientales adversas, algunos biofilms desarrollan estrategias de cooperación y resistencia que les permiten sobrevivir. En este sentido, resulta impreciso extrapolar características específicas de especies cultivadas por separado en un laboratorio a la realidad de un biofilm, donde coexisten múltiples especies (Albertano, 2012). Por ello, y debido a las dificultades que conlleva reproducir con precisión las complejas interacciones entre el biofilm y el sustrato, son más eficaces y productivas aquellas investigaciones que pueden llevarse a cabo *in situ* (Hernández-Mariné et al., 1999, 2003, Roldán et al., 2004a, 2004b).

El estudio de los biofilms fotosintéticos que afectan a las pinturas paleolíticas de la famosa cueva de Lascaux, en Francia, fue el primero que se desarrolló en relación al biodeterioro producido por microorganismos fotosintéticos en el medio hipogeo (Lefèvre et al., 1969). Desde entonces, esta forma de biodeterioro ha sido ampliamente investigado, tanto en cuevas como en otros monumentos hipogeos (Roldán et al., 2004a; Mulec et al., 2009; Lamprinou et al., 2009; Roldán y Hernández-Mariné, 2009; Urzi et al., 2010; Albertano, 2012; del Rosal et al., 2014b, entre otros). La información obtenida ha ofrecido, a los gestores de estos monumentos hipogeos, eficaces herramientas para el control de este tipo de colonización, acorde con una adecuada conservación del sustrato y, por tanto, del patrimonio (del Rosal et al., 2010, 2014a). Sus resultados han puesto de manifiesto que, en general, los organismos fotosintéticos hallados en cuevas son los mismos que los identificados en otros monumentos hipogeos con categoría de Patrimonio Cultural (Roldán et al., 2004b, Mulec y Kosi, 2009; del Rosal et al., 2010, 2014).

CAPITULO 2

LA CUEVA DE NERJA

2.1. Descripción

La Cueva de Nerja se ubica en el sector oriental de la provincia de Málaga, unos cinco kilómetros al este del pueblo costero de Nerja, sobre la vertiente meridional de Sierra Almijara. Fue descubierta en 1959 y abierta al público un año más tarde, tras su acondicionamiento turístico. La cavidad es una de las principales cuevas turísticas de España, con una media actual en torno a los 400.000 visitantes anuales. La cavidad, declarada Bien de Interés Cultural con categoría de Zona Arqueológica, alberga una secuencia crono-cultural y paleoambiental comprendida entre 25.000 y 3.600 años antes del presente y además constituye uno de los yacimientos más ricos del sur peninsular en manifestaciones artísticas prehistóricas, ya que cuenta con más de trescientos grupos pictóricos y grabados parietales catalogados, pertenecientes al Paleolítico Superior y a la Prehistoria Reciente (Sanchidrián, 1994). La Cueva de Nerja constituye, además, un elemento destacado del Patrimonio Natural de Andalucía, con importantes valores geológicos y biológicos (del Rosal et al., 2009) que han motivado su declaración como Lugar de Relevancia Geológica Internacional.

La cavidad tiene una superficie total aproximada de 35.000 m² y un volumen del orden de los 300.000 m³. Su desarrollo es prácticamente horizontal, entre las cotas 123 y 191 m s.n.m. (S.E.M., 1985) y cuenta con tres bocas de acceso, dos torcas subcirculares ubicadas a 161 y 162

m s.n.m y una entrada más amplia, a cota 158 m s.n.m., habilitada para la visita turística. A efectos prácticos, en la Cueva de Nerja se distinguen dos sectores: una zona habilitada para el turismo (Galerías Turísticas) y una zona no habilitada (Galerías Altas y Nuevas), que sólo recibe visitas ocasionales de investigadores y grupos reducidos de espeleoturistas (Fig. 2.1). Las Galerías Turísticas, con un volumen de 106.286 m³ y una superficie de 9.371 m², corresponden, aproximadamente, a un tercio del total de la cueva y se dividen las salas de Vestíbulo, Belén, Cascada, Fantasmas, Cataclismo, Mina y Torca.

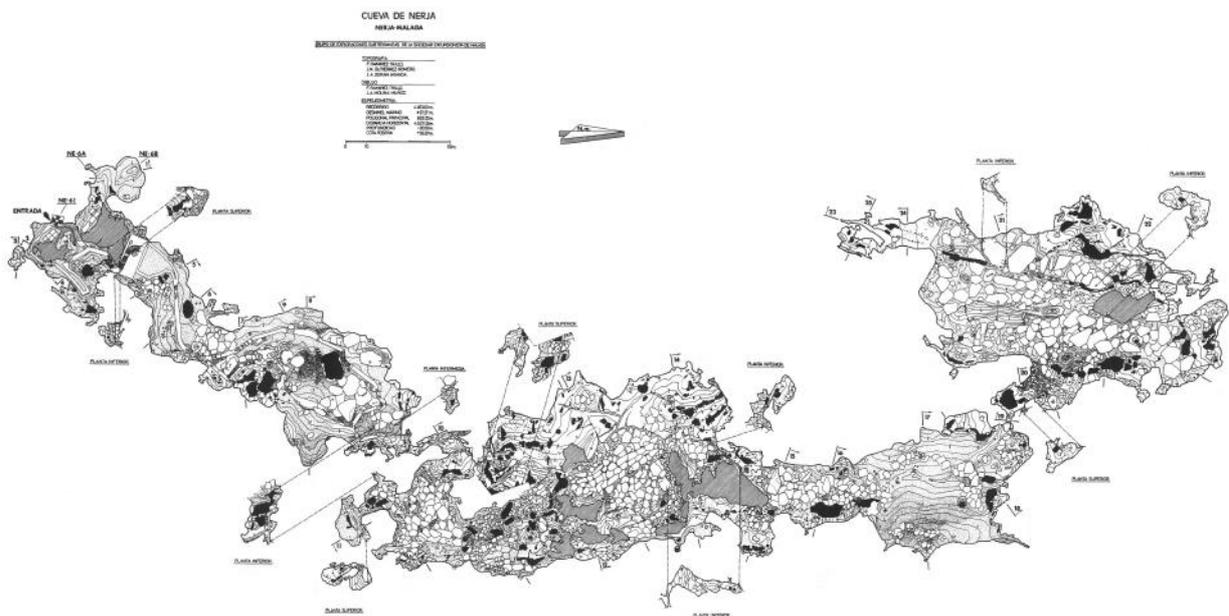


Figura 2.1. Modificado de SEM, 1985. Grupo de Exploraciones Subterráneas de la Sociedad de Excursionistas de Málaga. Plano topográfico de la Cueva de Nerja, la parte más al sur corresponde al sector de las Galerías Turísticas.

Los trabajos de acondicionamiento turístico de la cavidad comenzaron en septiembre de 1959, con la búsqueda de un acceso más viable y menos complicado que la pequeña torca empleada por los descubridores. Tras la apertura de la entrada, ésta se protegió con la construcción de un pequeño edificio de acogida. Los diferentes desniveles existentes dentro de la cueva se solventaron mediante la construcción de escaleras, algunas de considerable altura. En un primer momento, la visita se realizaba sobre el suelo original, salvo en la Sala del Cataclismo, donde se construyó un vial de hormigón de recorrido circular utilizando, en ocasiones, material de la propia cavidad, principalmente la arena procedente de la erosión de los mármoles sacaroideos en los que se desarrolla la gruta. Posteriormente, se construyeron viales de hormigón

en todas las salas del sector turístico. En algunas salas, el recorrido de la visita turística se delimitaba mediante cuerdas ensambladas en bases de cemento y postes de hierro mientras que, en otras, existían barandillas de hierro y madera algo más elaboradas. Además, se instaló un sistema de iluminación artística de gran potencia formado por proyectores con bombillas incandescentes, de hasta 1.500 vatios. En algunas zonas de la cavidad se instalaron luces de colores y dispositivos de sonido que amenizaban el recorrido del visitante durante los primeros años. Un sistema de lámparas de menor potencia iluminaba de forma directa los caminos. Los trabajos de acondicionamiento para el uso turístico de la Cueva de Nerja culminaron el 12 de junio de 1960, con el acto de inauguración de la cavidad, el I Festival de Música y Danza Cueva de Nerja (Liñán et al., 2010).

2.2. Geología y mineralogía

La cavidad se desarrolla en mármoles dolomíticos triásicos de la unidad alpujárride de Almirajara (Andreo y Carrasco, 1993). Los mármoles, muy diaclasados y con una potencia de hasta 500 metros, son permeables por fracturación y karstificación y constituyen el acuífero de la vertiente meridional de Sierra Almirajara (Pérez y Andreo, 2007).

Una de las características más destacables de la Cueva de Nerja es la abundancia y variedad de espeleotemas, formaciones de carbonato cálcico depositado a partir de aguas de infiltración. El estudio de dichos espeleotemas ha aportado información acerca de la historia geológica del sistema kárstico en el que se localizan y de las condiciones paleoambientales, además de caracterizar los distintos tipos de formaciones, analizar sus alteraciones y ayudar a predecir su posible evolución futura (Reyes et al., 1993; Caballero et al., 1995; Jiménez de Cisneros et al., 2006). El análisis mineralógico realizado a espeleotemas localizados en diferentes puntos de la Cueva de Nerja indicó que los componentes principales eran la calcita, el aragonito y la dolomita. En el moonmilk, además se determinó huntita, magnesita e hidromagnesita. El estudio sobre los procesos de alteración desarrollados en espeleotemas de la Cueva de Nerja y determinó al aragonito como componente mayoritario de las muestras seguido de calcita y dolomita. El análisis de los elementos traza (Sr, Mn, Mg, Fe) indicó que el contenido en Fe y Mn era mayor en las muestras que forman costras de alteración.

2.3. Hidrodinámica e hidroquímica

En la actualidad, la cueva está situada en la zona no saturada del acuífero, varios metros por encima del nivel piezométrico. Sobre la cavidad, el espesor del epikarst y la zona no saturada es muy variable: de 4 a 50 metros en el primer tercio de la cavidad y mayor de 90 metros en las zonas profundas. El agua que gotea desde el techo de la cueva se infiltra a través de fisuras y fracturas de los mármoles y procede tanto del agua de lluvia como del riego de una pequeña superficie de jardín que se encuentra por encima de la cueva (Andreo y Carrasco, 1993; Liñán et al., 2008).

El goteo dentro de la cavidad es, en general, muy bajo, entre 10-100 m³/año en condiciones pluviométricas promedio, con máximos en primavera-verano y mínimos en otoño-invierno. El análisis realizado para determinar el tiempo de tránsito del agua de lluvia a través del epikarst de las Galerías Turísticas indica la existencia de dos tipos de infiltración (Liñán et al., 1999, Andreo et al., 2005): uno lento, en torno a 8 meses, que predomina todo el año, y otro un poco más rápido, de aproximadamente 2 meses, que sólo se produce cuando los niveles de recarga son muy importantes en magnitud o intensidad. En las Galerías Altas y Nuevas, el flujo de agua de goteo muestra una variación estacional diferente, con máximos en otoño-invierno y mínimos en primavera-verano.

Desde un punto de vista hidroquímico, en la Cueva de Nerja hay dos tipos principales de agua: en la zona más cercana al exterior y en el resto de la cueva (Andreo et al, 1993). El primer tipo procede de un pozo cercano, se utiliza para regar el jardín y, posteriormente, se filtra en la cueva y el segundo tipo es de origen meteórico, como lo demuestra su composición química e isotópica (Liñán et al., 1999). El agua dentro de la cueva está sobresaturada en calcita durante todo el año, por lo que produce depósito de carbonato cálcico.

2.4. Microclima

El análisis de la amplia gama de datos ambientales disponible ha permitido determinar la variación “natural” de los parámetros controlados y la influencia antropogénica en la cavidad

(Carrasco et al., 1999, 2002; Liñán et al., 2014). No obstante, se debe tener en cuenta que los datos empleados en el análisis se obtuvieron tras la apertura de la cavidad a la visita turística.

Por un lado, una completa estación meteorológica ha permitido determinar los principales parámetros climáticos en el entorno inmediato de la cavidad. Así, en el exterior de la cueva, la temperatura media diaria del aire está comprendida entre 13 °C (Enero) y 26 °C (Agosto), con un valor medio anual de 19 °C (Carrasco et al., 1999; Carrasco et al., 2002; Liñán et al., 2007). Los valores medios de humedad relativa del aire están comprendidos entre el 61 y el 69 %, con un valor medio anual del 66 % y la precipitación media del área es de 487 mm/año (Liñán et al., 2007), con una marcada estación húmeda durante los meses de octubre a enero y una estación seca que comprende el período estival.

Por otro lado, en el interior de la cueva existe una red de control ambiental integrada por diversos sensores que actualmente miden, con periodicidad horaria, la temperatura, la humedad relativa y la concentración de ^{222}Rn y CO_2 del aire, entre otros parámetros (Carrasco et al., 2002; Liñán et al., 2009; Liñán et al., 2014). Los resultados obtenidos han permitido determinar los valores de los principales parámetros ambientales de la Cueva de Nerja, tanto en el sector turístico como en el no habilitado (Tabla 2.1).

En las Galerías Turísticas, la temperatura media del aire aproximada es de 18 °C y su evolución sigue un patrón similar al del exterior, con valores máximos durante el verano y mínimos en invierno, aunque con un desfase de casi un mes con respecto a la temperatura exterior. La temperatura del aire aumenta hacia las zonas más internas (Galerías Altas y Nuevas), excepto durante el período estival, momento en el que la mayor temperatura exterior produce una inversión del gradiente térmico.

La humedad relativa del aire de la cueva sigue la evolución de la humedad relativa del aire exterior, con un desfase de seis meses aproximadamente (Vadillo et al., 2001). El valor medio diario de la humedad relativa del aire de las Galerías Turísticas varía entre el 64 y el 92 %. A escala anual, este parámetro muestra valores mínimos en otoño-invierno, más elevados en primavera y máximos en verano, alcanzándose valores de saturación, como consecuencia del

incremento del caudal de goteo, menor ventilación natural de la cavidad y la llegada de masas de aire más húmedo desde las zonas más internas de la cavidad (Liñán y del Rosal, 2014).

La concentración media anual de CO₂ en las Galerías Turísticas es de aproximadamente 667 ppm y varía dependiendo de la época del año: en invierno, cuando menor es el número de visitantes, mayor es la capacidad de ventilación natural de la cavidad y menor es el caudal de goteo, se alcanzan valores diarios similares a los de la atmósfera exterior; en verano, cuando la visitabilidad es máxima, el índice de ventilación natural es menor y el caudal de goteo es más elevado se alcanzan valores diarios próximos a los 2000 ppm (Liñán et al., 2014). (Tabla 2.1). La temperatura de la roca permanece entre 1 y 2 °C por debajo de la temperatura del aire de la cueva (Carrasco et al., 2002).

A escala diaria se producen variaciones de los parámetros ambientales durante el horario en el que la cueva permanece abierta al público, debidas encendido de los focos de iluminación y a la presencia de visitantes. En el sector turístico, se producen incrementos de la temperatura del aire (entre 0,2-0,6 °C), pequeños incrementos en la humedad relativa del aire (del orden del 2 al 3 %) así como incrementos en la concentración de CO₂, que disminuyen durante las horas de cierre hasta llegar a la recuperación de los valores iniciales, previos al comienzo de la visita. En verano, esta recuperación puede no ser total, produciéndose un efecto acumulativo, especialmente notable durante la celebración del Festival de Música y Danza (Carrasco et al., 2002).

En las Galerías Altas y Nuevas, se ha determinado que el aire es más cálido, más húmedo y tiene menor concentración de CO₂ que el aire de las Galerías Turísticas, en sintonía con su ubicación, más alejada de la entrada de la cueva, más profunda con respecto a la superficie y con un reducido número de visitantes (Liñán et al., 2014). El valor medio de la temperatura del aire en las Galerías Altas y Nuevas supera casi en un grado centígrado el valor medio de temperatura del aire del sector turístico. Los valores de humedad relativa varían entre el 92 y el 100 %, con un valor medio prácticamente de saturación. Del mismo modo, el contenido medio de CO₂ del aire en el sector no visitable de la cueva es inferior al medido en las Galerías Turísticas (Tabla 2.1).

		Exterior	Galerías Turísticas			Galerías Altas y Nuevas		
			Belén	Cascada	Cataclismo	Hércules	Inmensidad (sc/c)	Lanza
			H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
T ^a (°C)	n	2050	1006	1923	1791	846	438	260
	Max	29,87	19,91	19,67	19,73	19,59	19,87	19,49
	Min	6,52	15,64	16,15	15,89	18,97	19,67	19,27
	Med	18,38	17,76	18,09	18,76	19,31	19,76	19,37
	V (%)	26,87	6,78	4,60	2,98	0,87	0,26	0,30
H.R. (%)	n	1708	970	401	1870	592	415	-
	Max	98	78	100	100	100	110	-
	Min	30	46	53	67	73	102	-
	Med	67	64	90	92	92	104	-
	V (%)	18	10	11	8	9	2	-
CO ₂ (ppm)	n	-	439	1369	615	538	353	88
	Max	-	1401	1185	1423	1181	1946	1239
	Min	-	456	357	400	400	350	350
	Med	-	682	563	756	607	516	540
	V (%)	-	33	24	29	25	30	40
Radón (Bq/m ³)	n	-	-	1217	-	-	-	321
	Max	-	-	719	-	-	-	526
	Min	-	-	80	-	-	-	90
	Med	-	-	201	-	-	-	241
	V (%)	-	-	79	-	-	-	47

Tabla 2.1. Valores medios de temperatura, humedad relativa y concentración de CO₂ y ²²²Rn del aire en el exterior y en el interior de la Cueva de Nerja, calculados a partir de datos horarios correspondientes al período 2008 -2013 (Liñán et al., 2014).

La concentración media anual de radón del aire del sector turístico y del no habilitado es similar, con valores de 201 y 240 Bq/m³ respectivamente (Liñán et al., 2014). Las concentraciones mínimas de radón corresponden a los meses de otoño-invierno y las concentraciones máximas a los meses de primavera-verano (Cañete, 1997; Dueñas et al., 1999; del Rosal et al., 2010b; Liñán et al., 2014).

Los trabajos realizados por Liñán y del Rosal (2014) pusieron de manifiesto la existencia de un patrón estacional en la circulación del aire interior así como de una nueva vía de entrada a la red kárstica de la Cueva de Nerja, aspecto que necesariamente debe ser tenido en cuenta para su adecuada gestión y conservación.

2.5. Fauna

La fauna de artrópodos identificada en la Cueva de Nerja se corresponde con la presente habitualmente en ecosistemas cavernícolas terrestres ibéricos (Barranco et al., 2004) e incluso europeos y se compone de Crustáceos, Arácnidos, Miriápodos e Insectos, este último grupo representado principalmente por las clases Diplurata, Collembola, y Euentomata, donde las especies detritívoras son más numerosas frente a las depredadoras (del Rosal et al, 2009). En contra de lo esperado, en las Galerías Turísticas se ha determinado una mayor diversidad de fauna respecto de las Galerías Altas y Nuevas, a pesar de que en esta zona las visitas son reducidas y cuenta con importantes masas de murciélago. Este hecho podría deberse a una pérdida de nutrientes de la murciélago con el paso del tiempo o a su contaminación, mediante el agua de infiltración, por una fuente exógena a la cueva, que conllevaría un desplazamiento de la fauna hacia la zona turística, más rica en energía. El estudio entomológico llevado a cabo por Tinaut et al. (2002), identificó una explosión demográfica de colémbolos, muy puntual en el tiempo y en el espacio y de origen desconocido, en la que se recogieron casi 4.500 individuos, cuando la cifra habitual no solía superar los 50 individuos. En este evento sólo se identificó a la especie *Mesogastrura ojcoviensis*, ampliamente distribuida por toda Europa y no específica de los ambientes cavernícolas.

2.6. Microbiota

A nivel microbiológico, en la Cueva de Nerja se han realizado estudios sobre la microbiota del aire, del agua y de los espeleotemas. En el aire, las bacterias identificadas pertenecen a la microbiota saprofita humana, en concreto a los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, de los que se identificaron las especies *S. aureus*, *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* y *S. salivarius*. Las especies del género *Bacillus*: *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. circulans* fueron halladas, con mayor frecuencia, en el aire de las Galerías Altas y Nuevas, junto con organismos del género *Actinomyces*, más abundante en épocas de menor visitabilidad (Cañaveras et al., 2004, del Rosal, 2005). El estudio de las esporas de hongos suspendidas en el aire de la cueva identificó los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium* como los más abundantes (del Rosal et al., 2007; Docampo et al, 2011).

En relación con la microbiota del agua, el agua de los gours muestreados en las Galerías Turísticas mostró una importante contaminación microbiológica, de origen remoto y/o tardío y con máximos en periodos estivales (Romero et al., 1991). Posteriormente, un estudio comparativo entre el agua de goteo y la almacenada en los gours, en las Galerías Turísticas, mostró que la concentración de microorganismos heterótrofos aerobios en el agua de goteo estaba muy por debajo de la concentración en el agua de gours (Cañaveras et al., 2004; del Rosal, 2005).

Bajo la premisa de que en la Cueva de Nerja no existe un suelo propiamente dicho, Ojeda (1992) llevó a cabo un estudio de la microbiota presente en el sedimento de diferentes zonas de las Galerías Turísticas y de las Galerías Altas. Sus conclusiones determinaron una contaminación biológica generada por los visitantes mediante el aporte de materia orgánica, que era más intensa en las zonas más próximas al recorrido turístico.

Por su parte, los trabajos llevados a cabo sobre la microbiota desarrollada en la superficie de paredes y espeleotemas de la cavidad, han centrado su atención en el control de los microorganismos fotosintéticos y sus resultados se detallan en el capítulo 4 de la presente memoria.



CAPITULO 3

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Obtener la información necesaria para el diseño de estrategias de control de los biofilms fotosintéticos en el interior de la Cueva de Nerja en base a una adecuada conservación del patrimonio cultural y natural de la cavidad.

3.2. Objetivos específicos

1. Recopilar y actualizar la información disponible sobre los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja. Elaborar un inventario que identifique y ubique los biofilms fotosintéticos en el interior de la cavidad.
2. Cuantificar el desarrollo de varios biofilms fotosintéticos durante un periodo de tiempo y determinar su relación con factores ambientales así como con otros factores que pudieran influir en éste. Evaluar la colonización primaria de espeleotemas por microorganismos fotosintéticos.
3. Realizar un análisis integral de los biofilms fotosintéticos que aporte información sobre su biodiversidad, estructura y actividad fisiológica, así como su relación con el sustrato.



CAPITULO 4

BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS

EN LA CUEVA DE NERJA

4.1. Antecedentes en el estudio de los biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja

La Cueva de Nerja cuenta con tres entradas, dos torcas circulares y un abrigo parcialmente taponado por sedimentos que, en la actualidad, comunica con el edificio de acceso a la cueva. Las torcas tienen 4 y 1 m de diámetro aproximadamente. En ambos casos, permiten la entrada de luz natural a la sala de la cueva en la que se encuentran, la Sala de la Torca, que favorece el desarrollo de biofilms fotosintéticos en paredes y espeleotemas. En el caso de la torca más pequeña, ubicada en una zona apartada de la sala, la luz es prácticamente inapreciable desde el interior de la cueva. Según la información disponible en el archivo histórico de la Fundación Cueva de Nerja, antes de su descubrimiento, en 1959, ya se conocía la presencia de ambas torcas así como su conexión con la Sala de la Torca. Por tanto, no podemos determinar el origen de la colonización fotosintética presente en esta zona de la cueva. No obstante, cuando se acometieron los trabajos de habilitación turística de la cueva, se limpió la Sala de la Torca, colmatada hasta el momento por sedimentos de diversa naturaleza y, probablemente, este hecho aumentó la entrada de luz natural a la sala y la colonización fotosintética de paredes y espeleotemas.

El resto de salas de las Galerías Turísticas ha permanecido en total oscuridad desde la colmatación de la entrada natural, hace unos 3.000 años, hasta su habilitación para la visita turística llevada a cabo en 1959. Estos trabajos incluyeron la instalación de un sistema de iluminación eléctrica que, progresivamente, ha ido cambiando a lo largo de los años. En un principio, este sistema estuvo formado por lámparas incandescentes de 1500 vatios que, posteriormente, fueron sustituidas por luces frías de menor potencia. La aplicación de esta medida permitió una bajada del consumo eléctrico de 200.000 a 136.000 vatios, desde 1989 a 1993 y un “apreciable descenso de la cantidad algas” (Marín, 1998). A principios de la década de los 90 comenzó la instalación de un sistema de fibra óptica que no finalizó debido, principalmente, a las continuas averías derivadas de la elevada humedad ambiental. En la actualidad la iluminación se realiza, principalmente, mediante lámparas fluorescentes de bajo consumo de 7, 11 y 18-20 vatios que se emplean en los diversos tipos de iluminación: escénica, viales y de emergencia. Para iluminar grandes superficies se emplean, además, lámparas de halogenuro metálico de 70 vatios (Figura 4.1).



Figura 4.1. Diferentes lámparas de iluminación empleadas en la cueva de Nerja. De izquierda a derecha, halogenuro metálico (70 w), fluorescente para iluminación escénica (20 w) y fluorescente para iluminación vial (7 w).

En total, el número de lámparas empleadas en el interior de la cueva ronda las 200 unidades, todas ellas con temperatura de color blanco frío. El tiempo de actividad de este sistema de iluminación es de unas 8 horas diarias, que engloba tanto el horario de apertura de la cueva como los trabajos de mantenimiento e investigación. Durante los meses de julio y agosto, debido a la modificación del horario de apertura de la cueva, el sistema de iluminación permanece encendido durante 10 horas al día, aproximadamente. Esta iluminación de las Galerías Turísticas se controla desde el exterior de la cueva, a través de un cuadro eléctrico ubicado en el edificio de

acogida, si bien existen pequeños paneles en el interior de la cavidad, para el control específico de infraestructuras. Para evitar problemas derivados de los posibles cortes de suministro eléctrico, se dispone de baterías UPS y de generadores de corriente. El desarrollo de biofilms fotosintéticos en las Galerías Turísticas debió comenzar tras la apertura de la cueva al público, aunque no se dispone de documentación sobre este hecho.

La iluminación de las Galerías Altas y Nuevas es de carácter escénico y se lleva a cabo mediante lámparas de halogenuro metálico de 70 vatios. Este sistema de iluminación se controla mediante un cuadro eléctrico ubicado en la entrada al sector no habilitado y se activa, exclusivamente, durante las visitas a la zona, que se limitan al desarrollo de la actividad de espeleoturismo o de campañas de investigación. Los escasos periodos de iluminación de este sector de la cueva no han favorecido, hasta el momento, la presencia de microorganismos fotosintéticos.

Los trabajos de investigación de los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja comenzaron en 1985, a cargo de Ruiz et al. (1992) quienes investigaron los microorganismos fotosintéticos que colonizaban paredes y estalactitas con agua de escorrentía en el interior de la cavidad. Su trabajo se centró en lo que estos investigadores denominaron “manchas de fieltro”, agregados coloniales de aspecto gelatinoso, así como en otros de aspecto pulverulento y seco (Figura 4.2).

El estudio, basado en la observación directa de varias zonas que mostraban colonización de biofilms fotosintéticos, puso de manifiesto la existencia de una estacionalidad en la disponibilidad de agua líquida en el sustrato, con mínimos durante el invierno, que se relacionaban con cambios morfológicos de las colonias. De hecho, este parámetro se consideró el más influyente en el aspecto de las colonizaciones. La identificación de los microorganismos fotosintéticos de los biofilms mostró a la cianobacteria *Gloeocapsa* sp. como el grupo más abundante en las paredes, mientras que los géneros *Oedogonium*, *Cladophora* o incluso *Microspora* predominaban mayoritariamente en las estalactitas. Durante este estudio también se realizaron experimentos sobre la resistencia de los biofilms a la privación de luz. Para ello se mantuvo en total oscuridad, durante 6 meses, una superficie colonizada de aproximadamente 0,75 m². Transcurrido este período no se observaron variaciones ostensibles en el aspecto

macroscópico de las colonias. Finalmente, el seguimiento de las zonas durante el período 1985-1990, no identificó un aumento en la cantidad de algas del interior de la cueva, ni en superficie, ni en densidad de las colonizaciones.



Figura 4.2. Imagen macroscópica de las dos texturas identificadas por Ruiz et al. (1992) en los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja. A la izquierda, “manchas de fieltro” con textura gelatinosa y, a la derecha, microorganismos con textura pulverulenta.

En el año 2000, el equipo de investigación dirigido por el profesor Marín desarrolló un nuevo trabajo sobre los biofilms fotosintéticos (Marín y Marín-Olalla, 2000). En esta ocasión se limpiaron, con agua a presión y un cepillo rotatorio de cerdas suaves, cuatro superficies colonizadas por biofilms fotosintéticos (Figura 4.3.). Posteriormente se llevó a cabo el seguimiento de las zonas limpiadas mediante la observación directa de las zonas y la comparación de imágenes de las mismas, obtenidas con una periodicidad mensual. Los resultados indicaron que aquellas superficies de mayor consistencia y colonizadas por microorganismos que se incrustaban en el sustrato, mostraban una apariencia completamente libre de microorganismos fotosintéticos tras la limpieza, pero transcurridos unos meses, el aspecto de la superficie se tornaba degranulado y pulverulento. Este fenómeno se consideró un efecto desestabilizador o alterativo del sustrato. Por otro lado, la limpieza de zonas con biofilms

fotosintéticos de textura gelatinosa y fácilmente desprendibles del sustrato, fue igualmente efectiva y no mostró formas de alteración de la superficie en los meses posteriores.



Figura 4.3. Una de las superficies limpiada mediante cepillado y agua a presión. A la izquierda, aspecto antes de la limpieza y, a la derecha, aspecto después de la misma (Marín y Marín-Olalla, 2000).

En el año 2006, se llevó a cabo otro ensayo de limpieza de espeleotemas (Garrido et al., 2007). En esta ocasión se emplearon dos diluciones de biocidas: una de agua saturada en calcita y peróxido de hidrógeno (15 %) (Faimon et al., 2003) y otra de agua saturada en calcita e hipoclorito cálcico (2 %) (Iliopoulou-Georgoudaki et al., 1993). En el caso de las zonas tratadas con peróxido de hidrógeno fue necesario aplicar tres tratamientos, espaciados entre sí un par de semanas, para conseguir un resultado satisfactorio de la limpieza (Fig. 4.4). Las zonas tratadas con hipoclorito cálcico, mostraron una intensa colonización fúngica de la superficie limpiada pocos días después de la aplicación del biocida. Para eliminar esta colonización fúngica, se llevó a cabo una nueva aplicación de biocida, en este caso, destinada a eliminar los hongos y restos de microorganismos muertos que permanecían en el sustrato y constituían la fuente nutricional de estos hongos (Fig. 4.4). En ambos casos, se realizó el seguimiento de las zonas tratadas a lo largo de un año, basado en la observación directa y la comparación de fotografías de las zonas limpiadas, obtenidas periódicamente. La recolonización del sustrato por microorganismos fotosintéticos transcurrido un año del proceso de limpieza se definió como “prácticamente

inapreciable”. En 2011, las zonas que habían sido limpiadas mediante las metodologías descritas anteriormente mostraban de nuevo colonización por microorganismos fotosintéticos.



Figura 4.4. Arriba, imágenes de la zona limpiada con peróxido de hidrógeno, antes y después del tratamiento. Abajo, imágenes de la zona limpiada con hipoclorito cálcico, antes y después del tratamiento.

Han sido muchas las técnicas empleadas para eliminar los biofilms fotosintéticos del interior de las cuevas, tanto físicas como químicas. La limpieza de las colonias mediante procesos físicos no es recomendable debido a que facilita la dispersión de propágulos (Rajczy, 1989; Hazslinszky, 2002) o a los posibles daños producidos en el sustrato. En relación con los biocidas, su principal desventaja es la toxicidad hacia el medio (Caumartin, 1977). De éstos, los compuestos clorados han sido los más ampliamente empleados a pesar de que el cloro, aun a baja concentración, puede afectar a la microbiota autóctona de la cueva y alterar el equilibrio del ecosistema subterráneo. Por otro lado, el cloro también disminuye el pH del sustrato y favorece los procesos de disolución de la calcita. (Faimon et al., 2003). La alternativa a estos compuestos se planteó mediante el empleo de una disolución de peróxido de hidrógeno (15 %) y agua saturada en calcita que minimiza la agresión del sustrato carbonatado (Faimon et al., 2003). En

cualquier caso, la puesta en práctica de cualquier protocolo de limpieza basado en el empleo de biocidas debe incluir la retirada del medio de la materia orgánica muerta producida, de cara a evitar la colonización masiva del medio por microorganismos fúngicos, tal y como ha sido descrito en la Cueva de Lascaux (Bastian et al., 2010). En esta cueva, la limpieza intensiva y periódica con biocidas durante años dio lugar al desplazamiento de la microbiota autóctona de la cueva que fue reemplazada por comunidades de microorganismos resistentes a los biocidas. En la actualidad, la microbiota de la cueva de Lascaux es el resultado de un largo periodo de impacto humano (visitantes, ventilación artificial, tratamientos con biocidas) que ha motivado la pérdida del equilibrio entre las poblaciones de microorganismos que forman este ecosistema y favorecido la colonización masiva del medio por microorganismos fúngicos (Bastian et al., 2010).

4. 2. Inventario de biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja

Además de consultar la información disponible, se planteó la necesidad de conocer el estado actual de colonización fotosintética de la Cueva de Nerja. Para ello, se elaboró un inventario que identificó y ubicó cada una de las zonas colonizadas por biofilms fotosintéticos en el interior de la Cueva de Nerja. Su resultado se presenta en el Anexo 1 de la presente memoria.

Este inventario integra un conjunto de imágenes de cada una de las zonas colonizadas así como su ubicación en el correspondiente plano topográfico de la sala en la que se encuentra (Fig. 4.5). Durante el desarrollo de este trabajo se pudo comprobar que la presencia de organismos fotosintéticos en la cueva continuaba limitada a la zona de las Galerías Turísticas a excepción de las salas de la Mina y de la Torca, ubicadas fuera del recorrido turístico. En estas dos salas, el sistema de iluminación se activa de forma puntual debido a que su acceso está restringido a personal de mantenimiento e investigador. En la Sala de la Mina, en oscuridad total la mayor parte del año, no se ha identificado colonización fotosintética y en la Sala de la Torca las zonas de colonización fotosintética se deben a la entrada de luz natural a través de las dos torcas presentes en la sala. En el resto de las salas de las Galerías Turísticas, los biofilms fotosintéticos se localizan en el entorno de las lámparas de luz eléctrica y su número es proporcional al tamaño de la sala y al número de fuentes de iluminación. En total, fueron identificados 114 puntos de los

cuales, más del 50 % se ubicaban en la Sala del Cataclismo (Tabla 4.1.). La elaboración de este inventario permitió identificar lámparas en avanzado estado de deterioro e incluso en desuso, que fueron sustituidas por otras nuevas o retiradas del interior de la cueva.

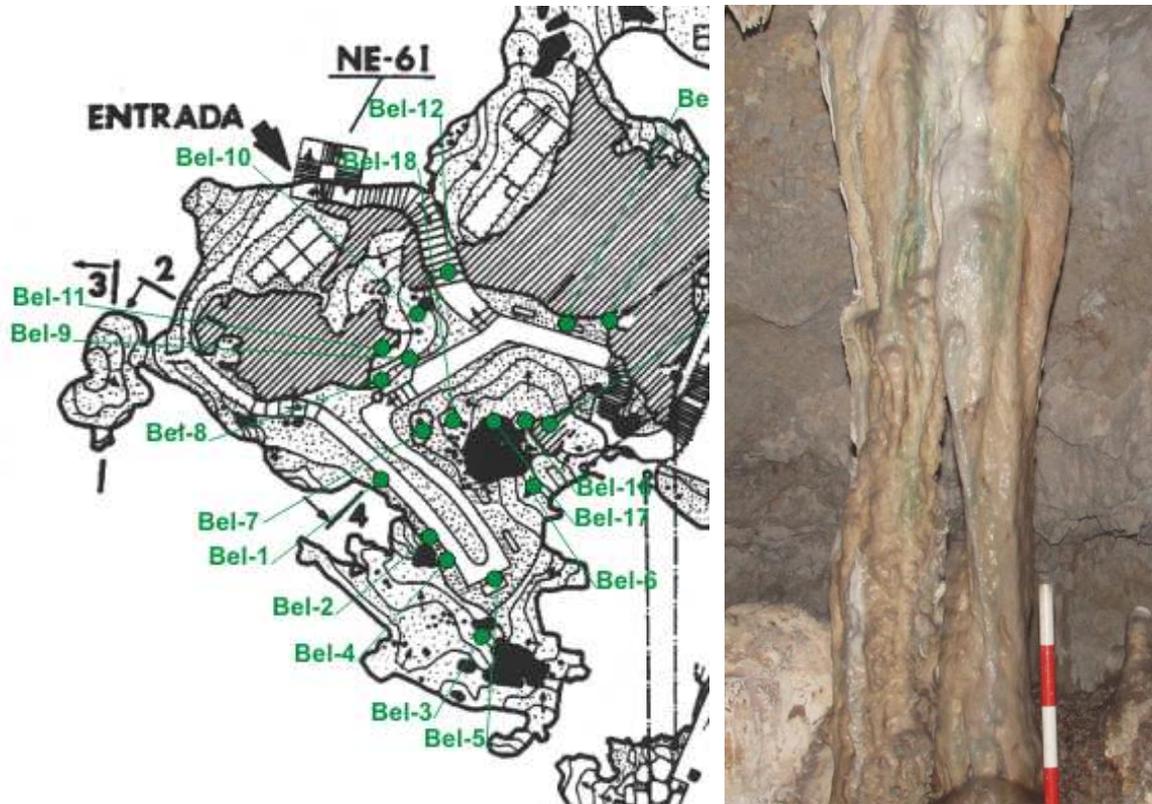


Figura 4.5. A la izquierda, sección de plano de la Sala del Belén, a la derecha, ejemplo de una imagen que forma parte del catálogo (Bel-3).

Sala Galerías Turísticas	Nomenclatura puntos	Total de puntos/sala
Sala de la Torca	Tor-1/Tor-4	4
Sala del Vestíbulo	Ves-1/Ves-4	4
Sala del Belén	Bel-1/Bel-16	16
Sala de la Cascada	Cas-1/Cas-18	18
Sala de los Fantasma	Fan-1/Fan-10	10
Sala del Cataclismo	Cat-1/Cat-62	62

Tabla 4.1. Planos que integran el catálogo, Nomenclatura y número de puntos en cada uno de ellos.

4.3. Criterios de selección de las zonas de control

Para la consecución de los objetivos propuestos en la presente memoria, se seleccionaron una serie de zonas colonizadas por biofilms fotosintéticos, que serían controladas y analizadas durante el periodo de estudio. La selección de estas zonas de estudio se basó en los siguientes criterios:

a) Textura del biofilm. Se seleccionaron zonas que mostraban colonización por biofilms con diferentes texturas. En general, se identificaron tres texturas principales: una gelatinosa, con colonias en forma de agregados de 1-2 cm de diámetro, conocido anteriormente como “manchas de fieltro” (Ruiz et al., 1992), otra pulverulenta, de distribución más homogénea en el sustrato y otra semi-gelatinosa, con mayor consistencia de los biofilms, en relación con la textura pulverulenta. Los diferentes tipos de textura se relacionaron con la presencia de agua líquida en el sustrato. Así, la textura gelatinosa se observó en biofilms con disponibilidad de agua líquida constante, la semi-gelatinosa en biofilms con disponibilidad de agua líquida estacional y la pulverulenta en biofilms que no disponían de agua líquida (visible) a lo largo del año.

b) Fuente de iluminación. Se seleccionaron zonas iluminados por luz natural y artificial. En este último caso, también se seleccionaron zonas iluminadas por lámparas de halogenuro metálico de 70 w y por lámparas fluorescentes de 20 w y 7 w.

c) Distancia al recorrido turístico. Formaron parte de nuestro estudio zonas que se encontraban a diferente distancia del recorrido turístico. En base este criterio, se establecieron las siguientes ubicaciones: *Próxima* (inferior a 1 m); *Intermedia* (entre 1 y 5 m); *Alejada* (superior a 5 metros) y *Ausente* (en una sala no visitable).

d) Disponibilidad de agua líquida y propiedades hidroquímicas del agua. En base a este criterio se seleccionaron zonas cuyo sustrato mostraba agua líquida estacional o permanente y otras con ausencia.

e) Aplicación de un tratamiento de limpieza. Se seleccionaron zonas que habían sido limpiadas mediante alguno de los tratamientos descritos en el apartado 4.1 de la presente memoria, así como otras en las que no se habían realizado limpiezas previas.

En base a estos criterios se seleccionaron 10 zonas de control, con evidente colonización por biofilms fotosintéticos, que fueron identificadas con las siglas Ne.1, Ne.2, Ne.3, Ne.4, Ne.7, Ne.8, Ne.9, Ne.10, Ne.11 y Ne.12 (Tabla 4.2).

Zona control	Recorrido turístico	Fuente luz principal	Agua líquida	Textura biofilm	Tratamiento limpieza
Ne.1	Alejada	F. blanco 20 W	No	Pulverulenta	Ca(ClO) ₂ (2 %)
Ne.2	Alejada	F. blanco 20 W	No	Pulverulenta	No
Ne.3	Intermedia	F. blanco 20 W	No	Pulverulenta	No
Ne.4	Ausente	Natural	No	Pulverulenta	No
Ne.5	Alejada	Experimentación	No	---	---
Ne.6	Alejada	Experimentación	No	---	---
Ne.7	Intermedia	F. blanco 20 W	No	Pulverulenta	H ₂ O ₂ (15 %)
Ne.8	Intermedia	H.M. blanco 70 W	No	Pulverulenta	No
Ne.9	Intermedia	F. blanco 20 W	No	Pulverulenta	No
Ne.10	Próxima	F. blanco 7 W	Si	Semi-gelatinosa	Agua a presión/ H ₂ O ₂ (15 %)
Ne.11	Próxima	F. blanco 20 W	Si	Pulverulenta/Gelatinosa	No
Ne.12	Próxima	F. blanco 20 W	Si	Pulverulenta/Gelatinosa	No
Ne.13	Alejada	Experimentación	No	---	---
Ne.14	Alejada	Experimentación	No	---	---

Tabla 4.2. Descripción de las zonas de control en base a los criterios de selección. Leyenda: F. (Fluorescente), H.M. (Halogenuro Metálico).

Además, se seleccionaron otras 4 zonas que no mostraban colonización fotosintética a simple vista y fueron denominadas: Ne.5, Ne.6, Ne.13 y Ne.14. Estas zonas formaron parte de un experimento destinado a conocer la colonización primaria por microorganismos fotosintéticos de varios espeleotemas iluminados mediante diferentes tipos de lámparas (leds y fluorescentes) y

colores (verde y blanco) (Tabla 4.2). La elección del color blanco fue debida a que, actualmente, es el color empleado para la iluminación de los monumentos, en general, y de la Cueva de Nerja, en particular. La elección del color verde se basó en Roldán et al. (2006), cuyos resultados recomiendan la iluminación de obras de arte mediante luz verde para prevenir o limitar el desarrollo de organismos fotosintéticos.

4.4. Descripción de las zonas de control

La descripción de las zonas seleccionadas se presenta continuación junto con la nomenclatura de cada una de ellas, entre paréntesis, correspondiente al inventario de zonas colonizadas que se presenta en el Anexo 1 de la presente memoria.

Ne.1 (Cat-57): Se ubica en la Sala del Cataclismo, alejada del recorrido turístico. El biofilm fotosintético es de textura pulverulenta y pocos milímetros de espesor. Se desarrolla en la cara transversal de dos espeleotema fracturados y ubicados en el suelo (Fig. 4.6). No se observa agua líquida en el sustrato. Ausencia de zonas de goteo en el entorno. La fuente de iluminación principal de la zona es una lámpara fluorescente (20 W). Uno de los espeleotemas de esta zona (el más grande, a la derecha de la imagen) fue limpiado en el año 2006 mediante dilución de hipoclorito cálcico en agua saturada en calcita (2 %).



Figura 4.6. Imagen de la zona Ne.1 (noviembre de 2011).

Ne.2 (Cat-57): Se ubica en la Sala del Cataclismo, alejada del recorrido turístico y aproximadamente a 1 metro de la zona Ne.1. El biofilm fotosintético presenta aspecto pulverulento y tiene un espesor de pocos milímetros. La colonización se desarrolla sobre un espeleotema fracturado que se encuentra en el suelo (Fig. 4.7). No se observa agua líquida en el sustrato y el goteo de agua de infiltración en el entorno de la zona es prácticamente nulo. La fuente de iluminación principal es la misma que la de la zona Ne.1, una lámpara fluorescente (20 W). Esta zona no presenta tratamiento de limpieza previo.



Figura 4.7. Imagen de la zona Ne.2 (noviembre de 2011).

Ne.3 (Cat-50): Se ubica en la Sala del Cataclismo, a una distancia media del recorrido turístico. El biofilm fotosintético es de aspecto pulverulento, de pocos milímetros de grosor y se desarrolla sobre los pliegues de un espeleotema caído en el suelo (Fig. 4.8). No se observa agua líquida en la superficie del sustrato y el goteo en el entorno de la zona es muy escaso. La fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente (20 W). Esta zona no ha sido sometida a tratamiento de limpieza. Entre los pliegues del espeleotema se observan numerosos excrementos de murciélago, probablemente de origen previo a la apertura de la cueva al turismo, cuando la colonia de quirópteros que frecuentaba la cavidad era muy numerosa.



Figura 4.8. Imagen de la zona Ne.3 (noviembre de 2011).

Ne.4 (Torca 1-2-3-4): Se localiza en la Sala de la Torca, fuera del recorrido turístico. El biofilm fotosintético presenta aspecto pulverulento, grosor variable y coloración en distintas tonalidades de verde. Se desarrolla sobre la pared y espeleotemas de la sala. En la pared se observa estacionalmente agua líquida. La fuente de iluminación principal es la luz natural que se introduce a través de las dos torcas de la sala. En esta zona tampoco se realizó tratamiento de limpieza en el pasado. Esta zona de control se ha subdividido en 4 zonas (Fig. 4.9)



Figura 4.9. Imagen de la zona Ne.4, sectorizada en 4 subzonas (noviembre de 2011).

Ne.7 (Cat-40): Se localiza en la Sala del Cataclismo, a una distancia media del recorrido turístico. El biofilm fotosintético es de textura pulverulenta, con coloración verde en diferentes tonalidades y se desarrolla en una colada (espeleotema) (Fig. 4.10). No se observa agua líquida en el sustrato y se observan zonas de goteo próximas. Su fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente de ahorro energético (20 W). Esta zona fue limpiada en el año 2006 con una dilución de peróxido de hidrógeno en agua saturada en calcita (15%).

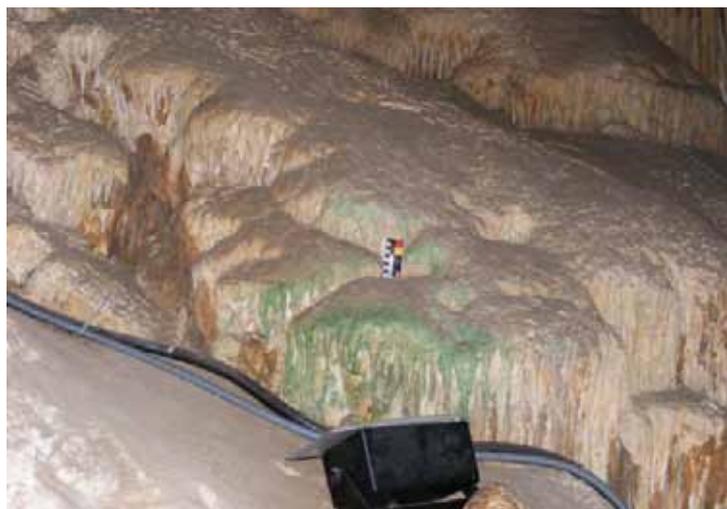


Figura 4.10. Imagen de la zona Ne.7 (noviembre de 2011).

Ne. 8 (Fan-7): Se localiza en la Sala de los Fantasmas, a una distancia media del recorrido turístico. El biofilm fotosintético es de aspecto pulverulento, coloración verde en diferentes tonalidades y se desarrolla en un conjunto estalagmítico (Fig. 4.11). No se observa agua líquida en el sustrato. A unos 5 metros se localiza una estalagmita con un goteo constante durante todo el año, más intenso en verano. Su fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente de ahorro energético (20 W). Esta zona no presenta tratamiento previo de limpieza. Con motivo de la celebración del Festival Cueva de Nerja, hasta el año 2013 se instalaban en esta sala unos camerinos contruidos de madera cuya presencia, a lo largo de varias semanas, favorecía el desarrollo de numerosas colonias de hongos filamentosos que provocaban un significativo aumento de esporas en el aire de la cavidad (Docampo, 2011).



Figura 4.11. Imagen de la zona Ne.8 (noviembre de 2011).

Ne.9 (Cas-8): Se localiza en la Sala de la Cascada, a una distancia media del recorrido turístico. La colonización por biofilm fotosintético afecta a un conjunto estalagmítico y presenta una textura pulverulenta y de coloración verde en distintas tonalidades (Fig. 4.12). No se observa agua líquida en el sustrato y el goteo del entorno es muy escaso. La fuente de iluminación principal es una lámpara de halogenuro metálico (70 W). Esta zona no fue sometida a limpieza previa a nuestro estudio.



Figura 4.12. Imagen de la zona Ne.9 (noviembre de 2011).

Ne.10 (Bel-9): Se localiza en la Sala del Belén, muy cerca del recorrido turístico. La superficie colonizada es una columna. La textura del biofilm fotosintético es semi-gelatinosa y su coloración verde en diferentes tonalidades (Fig. 4.13). Con frecuencia se observa agua de escorrentía sobre el sustrato, que se acumula en charcos en el suelo donde permanece durante días. La fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente (7 W) que forma parte de la iluminación vial. Esta zona fue sometida a limpieza en el año 2000 mediante cepillado y agua a presión. Posteriormente, en 2006 se volvió a limpiar con dilución de peróxido de hidrógeno en agua saturada en calcita (15 %). Durante algunas semanas del verano se observa una colonia de pequeños artrópodos que se nutre de estos organismos fotosintéticos (Fig. 4.13).



Figura 4.13. Imagen de la zona Ne.10 (noviembre de 2011). Detalle de colonia de artrópodos

Ne.11 (Bel-8): Se localiza en la Sala del Belén, muy cerca del recorrido turístico. El biofilm coloniza un pequeño macizo estalagmítico y presenta varias texturas: en el sustrato más seco es pulverulenta y en la zona más húmeda, con agua líquida disponible, es gelatinosa. Estas colonias gelatinosas forman agregados circulares de 1-2 mm de diámetro y marcado relieve (Fig. 4.14). La fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente (20 W). Esta zona no ha sido limpiada con anterioridad.



Figura 4.14. Imagen de la zona Ne.11 (noviembre de 2011).

Ne.12 (Cat-2): Se localiza en la Sala del Cataclismo, a una distancia media del recorrido turístico. La superficie colonizada es un conjunto de columnas y pequeñas estalagmitas (Fig. 4.15). El biofilm muestra dos texturas: en la zona más seca es pulverulenta y en la zona con agua líquida disponible es gelatinosa. La fuente de iluminación principal es una lámpara fluorescente (20 W). Esta zona se encuentra próxima a unos gours que suelen acumular agua estacionalmente tras eventos de lluvias intensas. Además, estos gours contenían numerosas monedas arrojadas por los visitantes que, por motivos de conservación, fueron retiradas antes de dar comienzo nuestro estudio al mismo tiempo que se prohibió esta práctica en el interior de la cueva.



Figura 4.15. Imagen de la zona Ne.12 (noviembre de 2011).

Ne.5: Se localiza en la Sala del Cataclismo, alejada del recorrido turístico, a unos 10 metros de los puntos de control Ne.1 y Ne. 2. La zona seleccionada es un espeleotema que se encuentra en oscuridad, sin evidencia de colonización fotosintética y ausencia de agua en el sustrato (Fig. 4.16).



Figura 4.16. Imagen de la zona Ne.5 (noviembre de 2011).

Ne.6: Se localiza en la Sala del Cataclismo, alejada del recorrido turístico y próxima las zonas Ne.5, Ne.1 y Ne.2. La zona seleccionada es un espeleotema que se encuentra en oscuridad, sin evidencia de colonización fotosintética y ausencia de agua en el sustrato (Fig. 4.17)



Figura 4.17. Imagen de la zona Ne.6 (noviembre de 2011).

Ne.13: Se localiza en la Sala del Belén, a una distancia media del recorrido turístico. La zona seleccionada es un espeleotema de la pared de la sala y se encuentra en oscuridad. Esta superficie no muestra evidencias de colonización fotosintética y no se observa agua líquida en el sustrato (Fig. 4.18)



Figura 4.18. Imagen de la zona Ne.13 (noviembre de 2011).

Ne.14: Se localiza en la Sala del Belén, a unos 5 metros de la zona Ne. 13 y a una distancia media del recorrido turístico. La zona seleccionada es un espeleotema que forma parte de la pared de la sala y se encuentra en oscuridad, sin evidencias de colonización fotosintética y sin agua líquida en el sustrato aunque el suelo (sedimento) se inunda en varias ocasiones a lo largo del año (Fig. 4.19).



Figura 4.19. Imagen de la zona Ne.14 (noviembre de 2011).

CAPITULO 5

EVOLUCIÓN DE LOS BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS DE LA CUEVA DE NERJA. RELACIÓN CON LOS FACTORES AMBIENTALES

5.1. Introducción

En la actualidad, las estrategias de conservación del patrimonio frente a la contaminación microbiana recomiendan la puesta en práctica de actuaciones preventivas. Prevenir el biodeterioro es la mejor estrategia de control y para conseguirlo, es imprescindible conocerlo. No existe una única técnica que permita el estudio integral de los procesos de biodeterioro. Diseñar estrategias de prevención y control del biodeterioro generado por biofilms precisa conocer la naturaleza del agente de alteración (biofilm) así como del sustrato alterado. No obstante, también es importante conocer *cuánto* y *por qué* cambia la alteración. Esta información permitirá identificar aquellos factores que más influyen en la evolución del biofilm así como predecir situaciones futuras. Un único examen de una zona de alteración puede informar sobre su estado en un momento concreto pero no informa sobre la tasa de alteración, que precisa de inspecciones durante un intervalo de tiempo. En estos casos, el análisis de fotografías realizadas a lo largo de un periodo de tiempo constituye una eficaz herramienta de trabajo y permite identificar cambios que escaparían a un simple análisis visual. Esta metodología, conocida como fotomonitorización, fue empleada por Thornbush y Viles (2008), quienes obtuvieron información cualitativa y cuantitativa relacionada con la progresión de la suciedad y el deterioro de la fachada de edificios

en el centro de Oxford (Inglaterra). Doehne y Pinchin (2008) emplearon el análisis de imágenes digitales para determinar daños sincrónicos en la superficie de piedra del Monasterio de Howden (Reino Unido) y correlacionarlos con condiciones ambientales inusuales, tales como fuertes vientos y Rogerio-Candelera et al. (2008) monitorizaron el crecimiento microbiano en una tumba de la Necrópolis de Carmona (España). A pesar de que el análisis de fotografías puede aportar valiosa información para los trabajos de conservación de los sustratos, es importante no sobrevalorar su objetividad (Doehne y Price, 2010). En este sentido, Winkler (1985) ofreció un gráfico alarmante de deterioro basado únicamente en el análisis de dos imágenes. Por tanto, aunque esta técnica permite obtener información útil relativa al biodeterioro de una superficie, a la hora de establecer la precisión de los resultados obtenidos hay que tener en cuenta posibles alteraciones debidas a otros factores, como las variaciones ambientales (Thornbush y Viles, 2008).

En relación con los factores ambientales, es interesante conocer cuáles intervienen en el desarrollo de los biofilms que producen biodeterioro y en qué medida lo hacen. En el medio subterráneo, la disponibilidad de luz es el factor que determina si los microorganismos que colonizan las paredes y los espeleotemas serán mayoritariamente autótrofos (cianobacterias y algas) o heterótrofos (bacterias y hongos) (Albertano, 2012). Por otro lado, la disponibilidad de agua es indispensable para el desarrollo de biofilms fotosintéticos (Gladis y Schumann, 2011). No obstante, aun se desconoce por qué, en ocasiones, no se desarrolla este tipo de biofilms aun cuando se presentan las condiciones ambientales favorables. La información sobre la relación entre el desarrollo de estos biofilms y las condiciones ambientales podría permitir comprender aspectos como el planteado anteriormente. En este sentido, Cuzman (2014) investigó la relación entre la evolución del microclima y el desarrollo de biofilms fotosintéticos en catacumbas con luz natural, a lo largo de un año.

En cuevas no turísticas la presencia de biofilms fotosintéticos muestra un gradiente que disminuye desde las zonas más externas hacia las más internas, acorde con la disminución de la luz natural que caracteriza a este tipo de cuevas (Roldán et al., 2004a). En las cuevas turísticas, el desarrollo de biofilms fotosintéticos es independiente de su proximidad al medio exterior, pues su presencia se debe a las lámparas de luz eléctrica que emiten luz con intensidad constante durante el periodo en el que se encuentran activas. El desarrollo de este tipo de biofilm puede

producir el deterioro de los espeleotemas o, en su caso, de las pinturas rupestres, si las hubiera. Conocer la influencia del microclima de la cueva, así como de otros factores ambientales, en la evolución de estos biofilms resulta una eficaz herramienta para el diseño de estrategias de control que limiten o prevengan su desarrollo.

En la Cueva de Nerja, el clima exterior influye directamente en los registros y fluctuaciones del microclima interior. Según la clasificación climática de Köppen (Köppen, 1936) el clima en el entorno de la Cueva de Nerja corresponde a un clima templado húmedo con veranos secos y calurosos, también denominado clima mediterráneo. En el exterior de la cueva, una completa estación meteorológica ha registrado datos ambientales desde principios de la década de los 90. El análisis de series de datos correspondientes a más de 10 años ha permitido determinar los principales parámetros climáticos en el entorno de la cavidad. Así, en exterior de la cueva, la temperatura media del aire oscila entre 13,2 °C (enero) y 25,9 °C (agosto), con un valor medio de 18,8 °C y la precipitación media del área es de 487 mm/año, con una marcada estación húmeda durante el otoño y el invierno (Liñán et al., 2007).

En una escala de tiempo anual, en el interior de la cueva las variaciones de temperatura del aire son un reflejo de las variaciones de temperatura del aire exterior, más o menos amortiguadas y desfasadas en el tiempo, en función de la distancia a la superficie y a las entradas de la cueva. En relación con las variaciones de humedad relativa del aire de las Galerías Turísticas, éstas también reflejan las variaciones de la humedad del aire exterior durante el período invernal y muestran una clara influencia de las Galerías Altas y Nuevas durante los meses estivales. Así, la humedad relativa del aire es máxima en el sector turístico durante el verano debido a un aumento del caudal de goteo, a una disminución del grado de ventilación natural de la cueva (menor evaporación del aire) y a la llegada de aire desde las zonas más húmedas de la cueva, las Galerías Altas y Nuevas (Liñán y del Rosal, 2014). Finalmente, la concentración de dióxido de carbono del aire muestra una curva normal con máximos en el verano y mínimos en el invierno, directamente relacionada con la afluencia de visitantes.

A escala diaria, los tres parámetros citados muestran incrementos y descensos relacionados con el horario de visita de la cueva. Así, se producen incrementos de la temperatura del aire (entre 0,2-0,6 °C) en las diferentes salas de las Galerías Turísticas debido al aporte de

calor por los focos de iluminación y por los visitantes (Carrasco et al., 1999, 2002). Los descensos que se observan diariamente se deben al cierre de la cueva y apagado de la iluminación durante el mediodía y al finalizar el horario de visita. La temperatura de la roca permanece entre 1 y 2 °C por debajo de la temperatura del aire de la cueva y también presenta modificaciones diarias, aunque con menor amplitud que en el aire, con incrementos diarios entre 0,02 y 0,15 °C (Carrasco et al., 1999, 2002). La entrada de visitantes también genera pequeños incrementos en la humedad relativa del aire, del orden del 2 al 3 % y de la concentración de CO₂ que, puntualmente en verano, puede superar la concentración de 2000 ppm (Carrasco et al., 1999, 2002).

Las variaciones observadas en los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja y las fluctuaciones determinadas en el microclima sugieren, por un lado, un crecimiento positivo del biofilm y, por otro, la relación de este crecimiento con el microclima de la cavidad.

5.2. Objetivos

Evaluar, desde un punto de vista cuantitativo, el crecimiento de varios biofilms durante un periodo de tiempo y determinar su relación con el microclima de la cueva así como con otros factores ambientales que pudieran condicionar su desarrollo. Evaluar la colonización primaria de espeleotemas por organismos fotosintéticos.

5.3. Material y Métodos

5.3.1. Selección de las zonas de control

Los biofilms controlados en este estudio se localizan en las zonas descritas en el apartado 4.4. *Descripción de las zonas de control* de la presente memoria. Todas las zonas descritas en este apartado forman parte de este estudio a excepción de la zona Ne.4 (Torca) que se desarrolla debido a luz natural que accede a la cueva por una de las torcas de la sala donde se ubica. Del

total de las zonas controladas, 11 presentaban desarrollo de biofilms fotosintéticos (Ne.1, Ne.2, Ne.3, Ne.7, Ne.8, Ne.9, Ne.10, 11 y Ne.12) y 4 se encontraban libres de colonización (Ne.5, Ne.6, Ne.13 y Ne.14) y formaron parte del ensayo de iluminación y colonización primaria de espeleotemas por microorganismos fotosintéticos.

5.3.2. Iluminación de las zonas de experimentación

Las zonas de experimentación se encontraban libres de biofilms fotosintéticos y fueron sometidas a diferentes tipos de iluminación. La zona Ne.5 fue iluminada mediante 3 lámparas leds que emitían luz de color verde (5 W/lámpara, OSRAM). La separación entre las lámparas y la zona a iluminar fue de 0,5 m. La zona Ne.6 fue iluminada con 1 lámpara fluorescente de ahorro energético que emitió luz de color verde (18 W, OSRAM) separada unos 0,9 m de la superficie iluminada. La zona Ne.14 fue iluminada mediante 1 lámpara fluorescente de ahorro energético que ofrecía luz blanca con temperatura de color blanco frío (18 W, OSRAM) separada 1 m de la superficie iluminada. La zona Ne.13 fue iluminada mediante 3 lámparas leds que emitieron luz blanca con temperatura de color blanco frío (5 W/lámpara, OSRAM) separada unos 0,8 m de la superficie iluminada. La selección de la iluminación se basó en la iluminación actual de la cueva y en los resultados obtenidos por Roldán et al. (2006). La distancia de separación entre las lámparas y el sustrato estuvo condicionada por las geomorfología de la zona de trabajo.

5.3.3. Realización de fotografías

En cada uno de los puntos de control se tomaron fotografías, con una periodicidad aproximadamente quincenal, durante el periodo comprendido entre los meses de abril de 2011 y febrero de 2013, ambos inclusive. Las zonas Ne.13 y Ne.14 fueron incorporadas al estudio 11 meses más tarde que el resto de las zonas.

Las imágenes, de 3072 x 2304 píxeles, se obtuvieron con una cámara digital FUJIFILM modelo FinePix S5700, de 7,1 megapíxeles, equipada con zoom óptico de 10x y zoom digital

aproximado de 4,8x. La cámara se dispuso en modo “automatico”, que la obliga a realizar los ajustes considerados óptimos en el momento de hacer la foto. Dado que, por lo angosto del terreno, se descartó el empleo de trípode durante la realización de fotografías, se procuró que todas las imágenes de una misma zona de control fueran realizadas a la misma distancia y con la misma perspectiva. En total se obtuvieron 13 series de imágenes, con una media de 65 imágenes por cada serie a excepción de las series correspondientes a las zonas Ne.13 y Ne.14 que quedaron formadas por 39 imágenes debido a que su fotomonitorización se inició más tarde.

5.3.4. Procesado digital de imágenes. Cálculo de la variable *verde*

Para poder comparar la evolución de biofilms próximos, en cada zona de control se delimitaron dos superficies que fueron identificadas con los subíndices 1 y 2 (a excepción de las zonas Ne.10 y Ne.5 donde sólo se delimitó una). Cada una de estas superficies delimitadas se relacionó con la presencia de un biofilm. Para acotar cada biofilm se emplearon, como puntos de referencia, manchas o deformidades del sustrato, por su carácter inalterable frente a rotaciones, traslaciones, etc. El marcado de cada uno de estos puntos de referencia y, por tanto, la delimitación de los biofilms, se realizó manualmente en cada una de las fotografías. Antes de proceder al recorte de cada una de las zonas, algunas imágenes fueron rotadas para ajustar la calidad del recorte. Así, en cada serie se realizaron hasta dos rotaciones diferentes, para cada una de las dos zonas delimitadas (Fig. 5.1). Se obtuvieron 25 zonas para su análisis digital (Figs. 5.2 a-m).

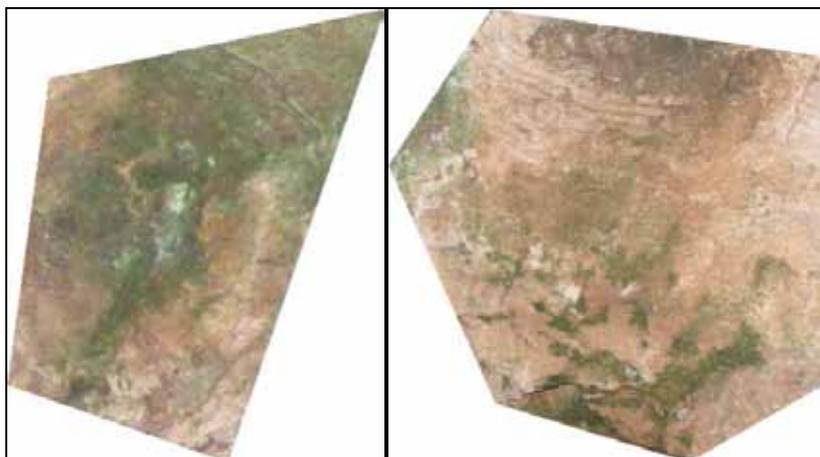


Figura 5.1. Resultado de la rotación y recorte de las zonas Ne.1.1 y Ne.1.2 (dcha. e izda. respectivamente) obtenidas en el punto de control Ne.1.

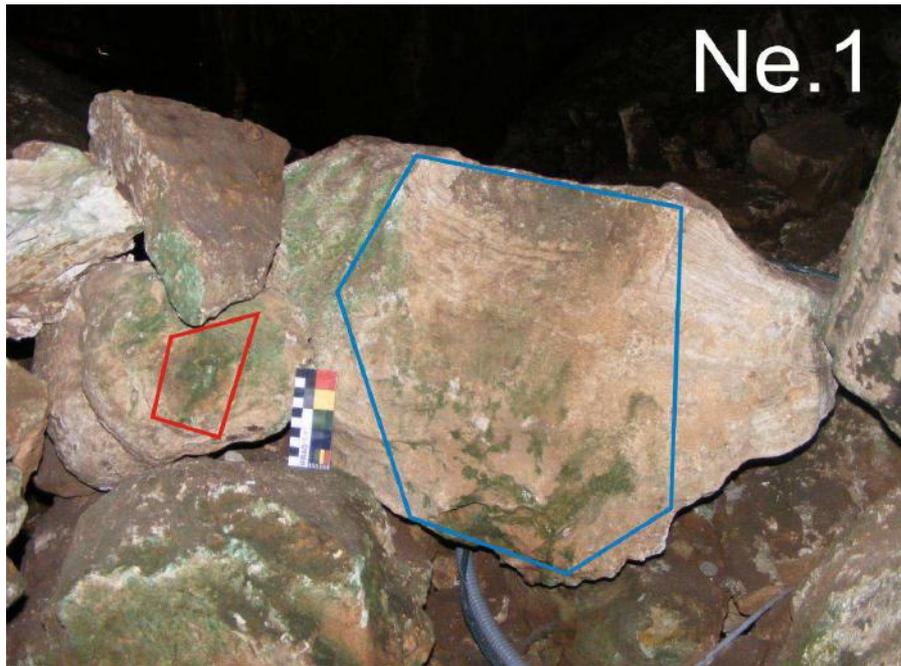


Figura 5.2a. Zona de control Ne.1, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).

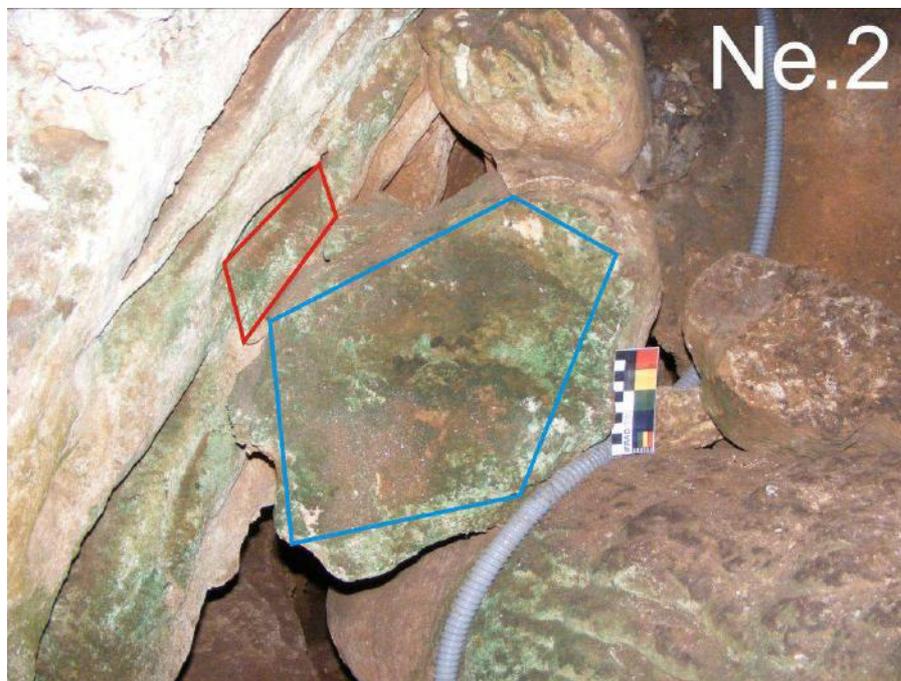


Figura 5.2b. Zona de control Ne.2, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).

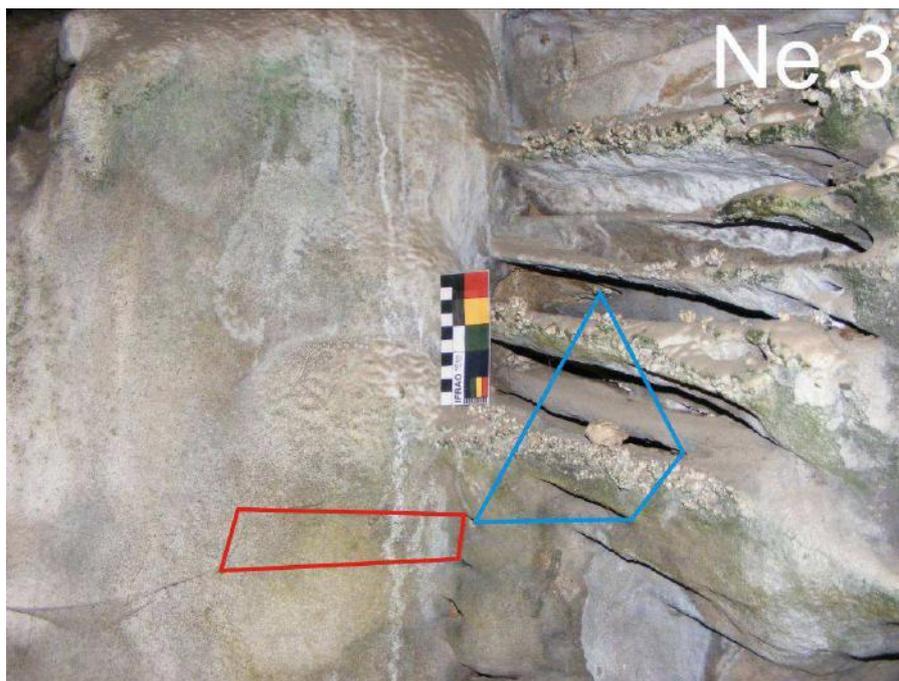


Figura 5.2c. Zona de control Ne.3, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).



Figura 5.2d. Zona de control Ne.5, con la delimitación del área de experimentación (1: azul).

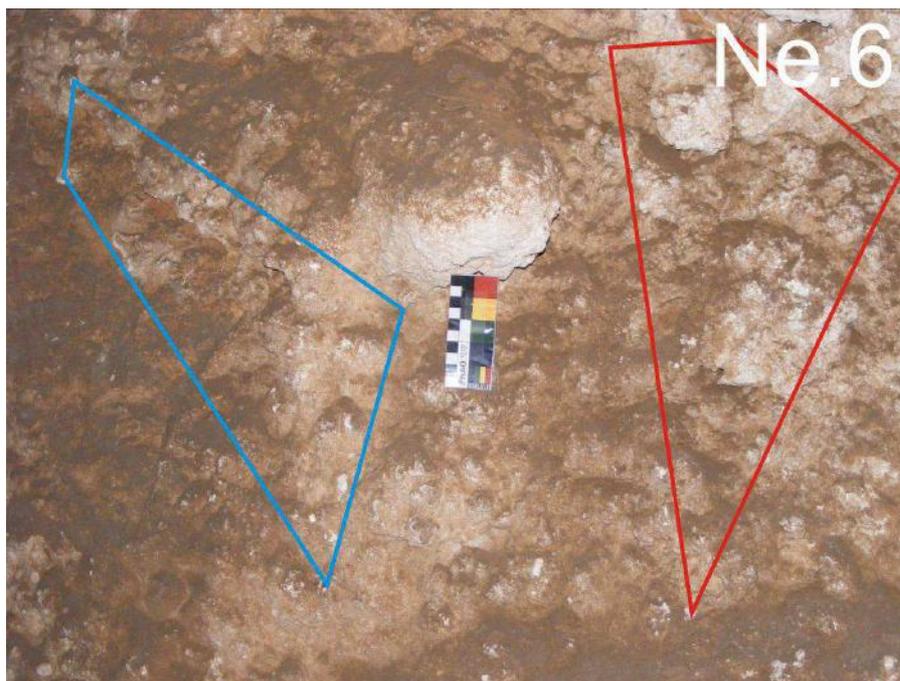


Figura 5.2e. Zona de control Ne.6, con la delimitación de las dos áreas de experimentación (1: azul y 2: rojo).

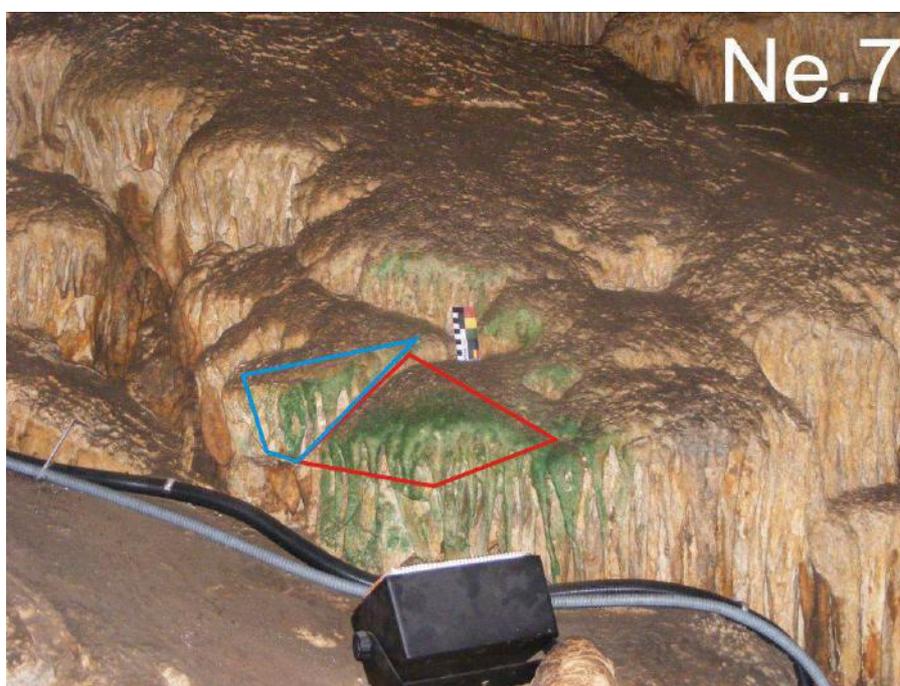


Figura 5.2f. Zona de control Ne.7, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).

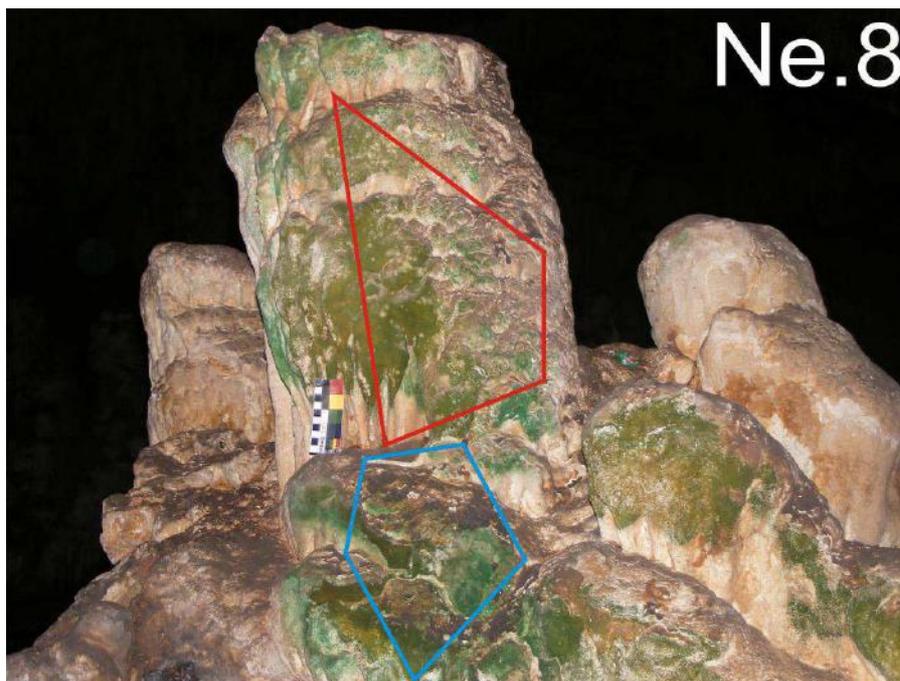


Figura 5.2g. Zona de control Ne.8, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).



Figura 5.2h. Zona de control Ne.9, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).



Figura 5.2i. Zona de control Ne.10, con la con la delimitación del biofilm monitorizado (1: azul).

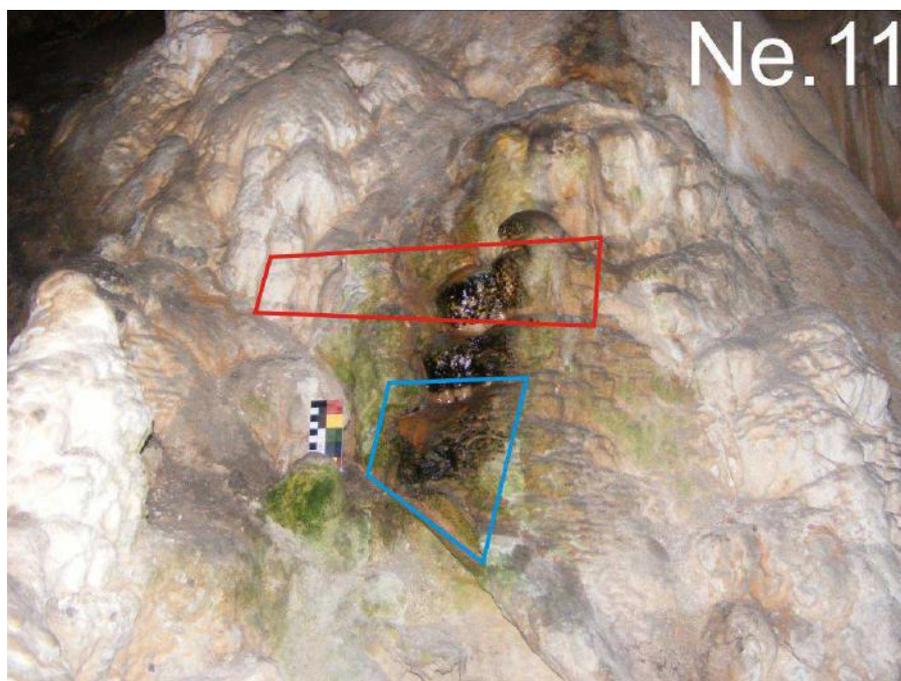


Figura 5.2j. Zona de control Ne.11, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).

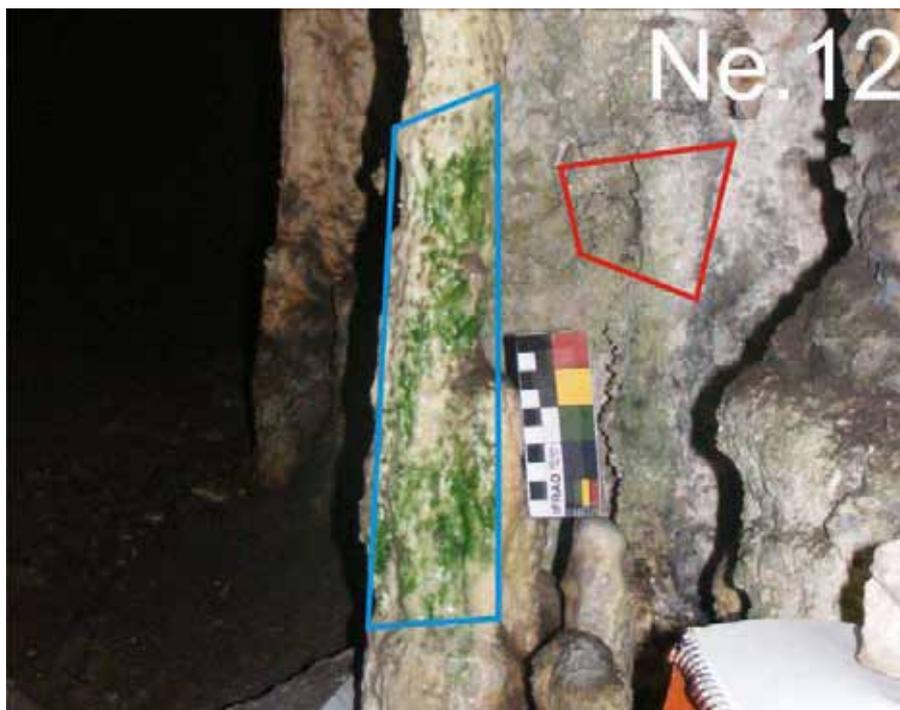


Figura 5.2k. Zona de control Ne.12, con la delimitación de los dos biofilms monitorizados (1: azul y 2: rojo).

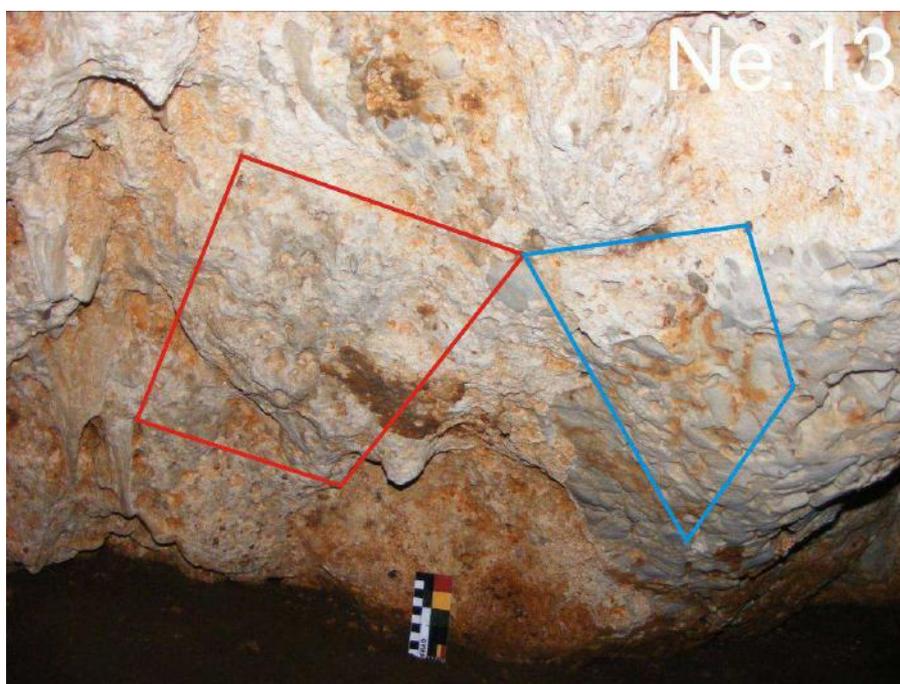


Figura 5.2l. Zona de control Ne.13, con la delimitación de las dos áreas de experimentación (1: azul y 2: rojo).

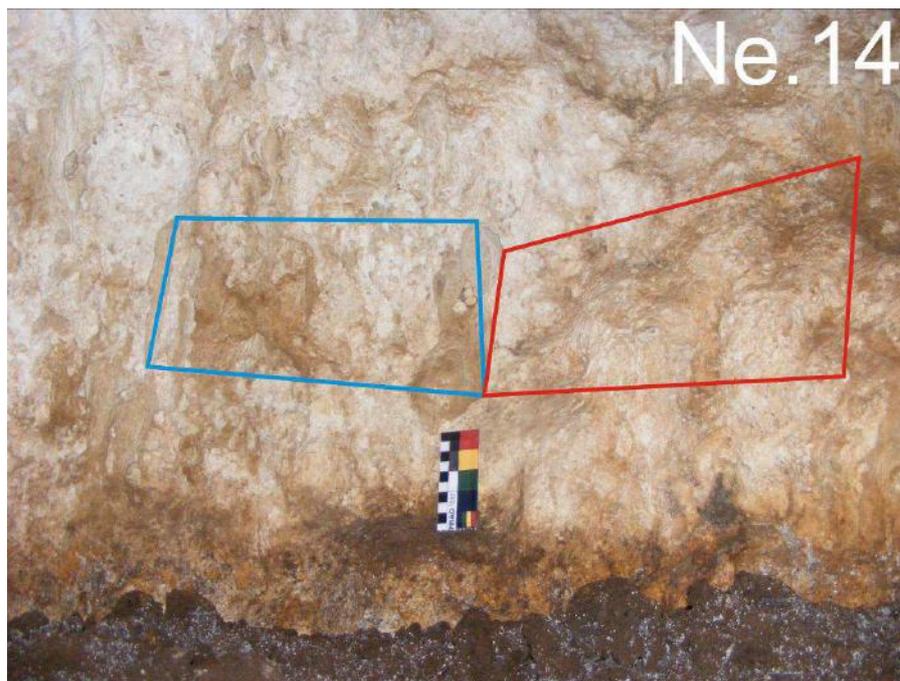


Figura 5.2m. Zona de control Ne.14, con la delimitación de las dos áreas de experimentación (1: azul y 2: rojo).

El análisis digital de las imágenes, realizado en la Unitat d'Anàlisi d'imatges, Centres Científics i Tecnològics Universitat de Barcelona, empleó en el modelo de color HSV (Smith, 1978) y se basó en el análisis del color verde. Este modelo representa los colores combinando tres valores: el tono (H), la saturación o cantidad de color (S) y el brillo (V). Estos valores se suelen representar en un diagrama circular donde H adopta valores de 0-360°, S de 0-100% en función de la cantidad de color y V de 0-100%., desde totalmente oscuro hasta la máxima luminosidad.

Para realizar el análisis digital, las imágenes fueron binarizadas, es decir, la información aportada por cada una se redujo a dos valores: color *verde* y color *no verde*. Mediante esta técnica, se comparó cada pixel de la zona seleccionada con un determinado umbral o límite de binarización (valor límite que determina si un pixel será de color verde o no). Para cada serie de imágenes se establecieron los rangos para los componentes H, S y V, que definieron y discriminaron, de forma automática, el color verde en cada serie de imágenes (Tabla 5.1).

DIRECTORIO	RANG H	RANG S	RANG V
Ne.1	40-120	0-1	0.15-0.85
Ne.2	40-120	0-1	0.15-0.85
Ne.3	50-120	0-1	0.25-0.75
Ne.5	60-120	0-1	0.25-0.75
Ne.6	60-120	0-1	0.25-0.75
Ne.7	40-160	0-1	0.10-0.75
Ne.9	40-120	0-1	0.15-0.75
Ne.10	40-180	0-1	0.10-0.75
Ne.11	40-120	0-1	0.15-0.85
Ne.12(1)	50-120	0-1	0.15-0.75
Ne.12(2)	70-120	0-1	0.15-0.75
Ne.13	60-120	0-1	0.25-0.75
Ne.14	60-120	0-1	0.25-0.75

Tabla 5.1. Rangos empleados en las series de imágenes de cada una de las zonas de control.

Los mismos rangos se aplicaron a todas las imágenes de una misma serie (zona), a excepción de la serie correspondiente al punto de control Ne.12, que precisó de rangos diferentes en cada una de las dos zonas seleccionadas. Los rangos seleccionados pudieron variar entre las series para evitar errores derivados del color de la roca, la presencia de sombras u otras incidencias que se consideraron de interés.

Posteriormente se determinó el número de píxeles que se encontraban dentro de los rangos definidos para el color verde (Fig. 5.3). El número de píxeles verdes es independiente del ángulo de rotación sobre el eje x-y de la imagen pero no del tamaño. Para evitar este error, se normalizan los resultados obteniendo el número de píxeles totales de la superficie analizada basado en la proporción de verde en la imagen, que es independiente del tamaño de ésta. Con este cálculo se obtuvo el tamaño de cada uno de los biofilms en cada imagen, identificado como variable *verde* y empleado en el análisis estadístico.

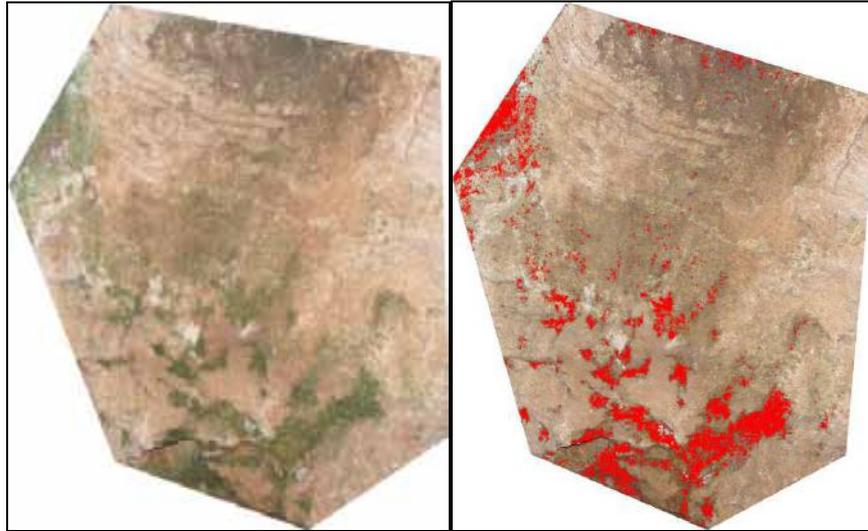


Figura 5.3. Cuantificación de los píxeles que se encuentran dentro de los rangos establecidos.

Los parámetros que pueden afectar al resultado obtenido en cada caso derivan de diferencias en la posición de la cámara, del recorte manual de cada imagen y del empleo de una escala manual. Para calcular el error cometido debido a los factores citados anteriormente, se analizó 10 veces la misma imagen y se determinó un coeficiente de variación de resultados inferior a 1%. Por tanto, aquellas variaciones de verde inferiores a este porcentaje se consideraron dentro del margen de error aceptado durante el cálculo estadístico.

5.3.5. Monitorización de los parámetros ambientales

El control del microclima interior de la cueva se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre el 6 de enero de 2012 y el 18 de febrero de 2013. Para ello se instalaron tres sensores en diferentes ubicaciones de las Galerías Turísticas: uno próximo a la entrada (Belén), otro en la zona intermedia (Cascada) y un tercero en la zona más profunda (Cataclismo). Estos sensores (datalogger VAISALA MI70) provistos con sondas HMP1554, registraron datos horarios de temperatura (T), humedad relativa (RH) y concentración de dióxido de carbono (CO₂) del aire.

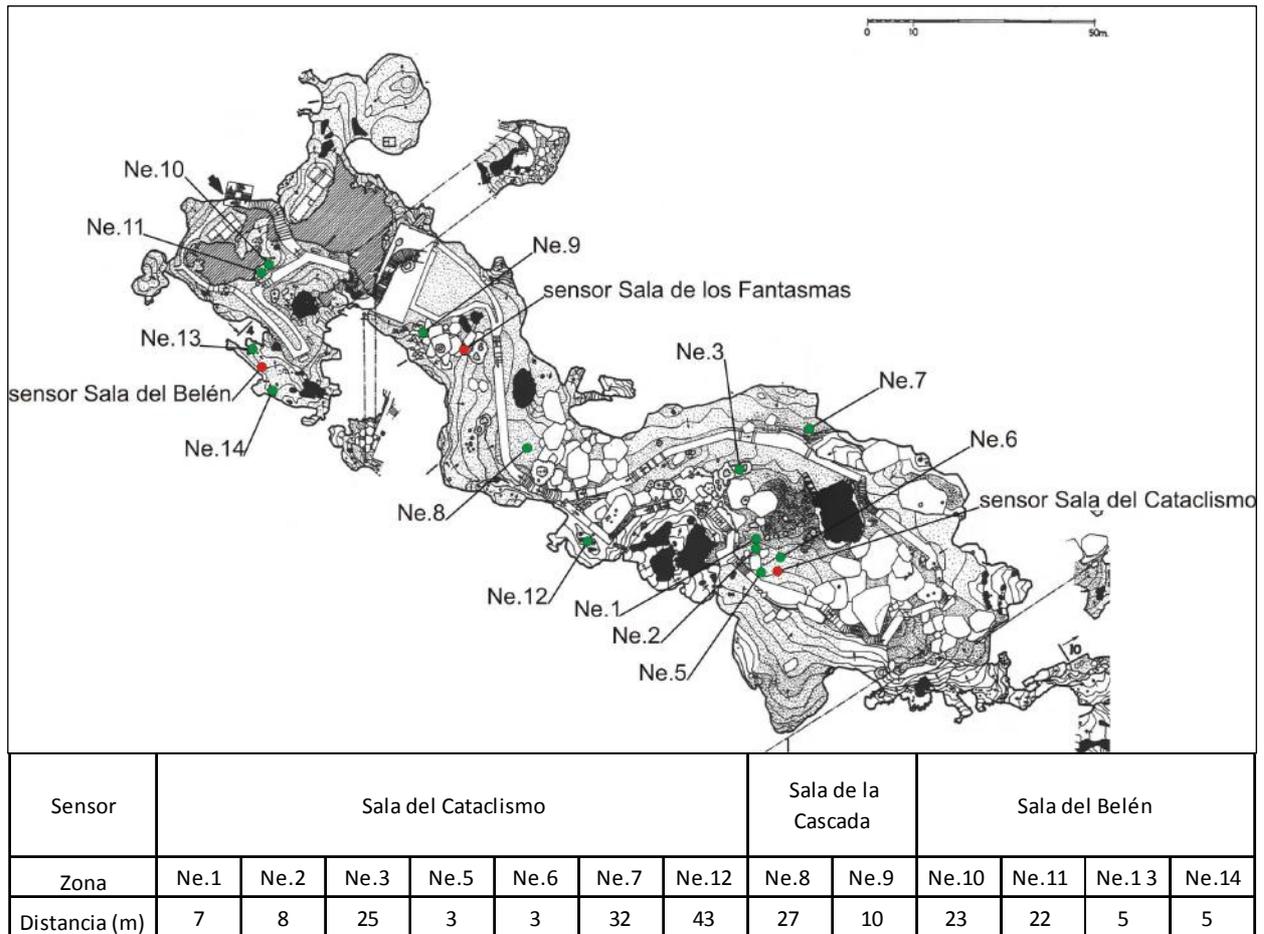


Figura 5.4. Arriba: planta de las Galerías Turísticas con la ubicación de las zonas controladas y de los sensores. Debajo: asignación de los datos registrados por los sensores a cada una de las zonas y distancia que los separa.

A cada una de las zonas controladas se le asignaron los datos obtenidos por el sensor más próximo. La figura 5.4 muestra la ubicación de las zonas de control y de los sensores, así como la distancia entre cada una de las zonas y el sensor más próximo, que recibió el nombre de la sala en la que se ubicó.

Mediante un sensor quantum (Modelo LI-188B), se determinó la intensidad luminosa recibida por cada uno de los biofilms y en las zonas de experimentación objeto de estudio. Para estimar la cantidad de luz recibida se ubicó el sensor en el área central de la zona de control y se realizaron dos medidas, una con el sensor paralelo a la superficie y otra con el sensor dirigido hacia la fuente de luz. Las lecturas se realizaron cuando el sensor mostró un valor estable durante, al menos, 10 segundos. El resultado informó sobre la radiación fotosintética activa o PAR (energía luminosa comprendida entre 400 nm y 700 nm) y ofreció datos en unidades de

micromol de fotones por metro cuadrado por segundo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Este parámetro no se midió en continuo debido a que su valor se estima constante, salvo cambios notables en el sistema de iluminación, que fueron evitados durante el transcurso del presente estudio. No obstante, dado que la radiación fotosintética activa puede variar en función de la casa comercial que suministre la lámpara, entre otros factores, se realizaron varias medidas a lo largo del periodo de estudio en cada una de las zonas de control que permitieron calcular la radiación fotosintética activa media en cada zona.

5.3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el análisis de imágenes y la monitorización ambiental se llevó a cabo con los softwares Excel y SPSS.20.

El estudio descriptivo de las variables consideradas permitió conocer su evolución a lo largo del periodo de estudio. Mediante el programa R Core Team (2013) se elaboraron diagramas de cajas que mostraron la evolución de las variables *verde*, T, RH, y CO₂ durante el periodo de estudio. Este gráfico aportó información relacionada con la variabilidad de los resultados, los rangos intercuartílicos, los valores extremos y los valores atípicos (ubicados entre 1,5 y 3 veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo) dentro de cada mes de estudio.

Para determinar relación del tamaño del biofilm con los factores ambientales monitorizados se realizó un análisis de regresión, que consideró a las variables ambientales explicativas (T, RH y CO₂) y al tamaño del biofilm (*verde*) variable explicada. Para homogeneizar las escalas de medida de las variables y evitar errores producidos por diferencias entre el peso específico por unidad de las variables en el análisis de regresión se empleó el valor estandarizado que identificó a las variables con el subíndice z. Los datos de las variables ambientales correspondieron a la media de los registros horarios obtenidos el mismo día en el que se tomó la imagen, pero también se empleó el valor medio de estos datos y los registros horarios obtenidos 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días antes de tomar la foto, respectivamente. Así, se identificaron las variables ambientales con los subíndices z.0, z.1, z.2, z.3, z.4, z.5 y z.6.

El resultado del análisis de regresión ofreció modelos que seleccionaron las variables ambientales relacionadas con el tamaño del biofilm y descartaron aquellas que no aportaron información. Para la interpretación de los resultados se evaluaron los coeficientes (B) de los modelos propuestos, el error asociado a cada uno de ellos (error típ.) y, en su caso, el grado de correlación de estas variables con la variable explicada (tamaño del biofilm). El valor del Factor de Inflación de la Varianza (FIV) y la representación gráfica de las variables ambientales permitió evaluar la colinealidad de las mismas.

Para cada uno de los modelos de regresión se obtuvo un coeficiente de correlación múltiple (R) y un coeficiente de determinación (R^2), que informaron sobre proporción de variabilidad de la variable dependiente (*verde*) que podía ser explicada por el conjunto de variables independientes. No obstante, R^2 presenta el inconveniente de que, a medida que aumenta el número de variables que participan en el modelo, mayor es su valor, por tanto, en la interpretación de los datos se empleó el coeficiente de determinación corregido (R^2 corregido), que modificó el valor de R^2 en función del número de observaciones y de variables que participan en la ecuación.

Los resultados de la radiación fotosintética activa (PAR) se emplearon en la interpretación de los resultados pero no formaron parte del análisis estadístico dado que su valor se supone constante.

Mediante un análisis de varianza de *Student* para muestras relacionadas se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el verano y el invierno de un mismo año, así como durante los inviernos de años sucesivos (para un nivel de significación de $p = 0,05$).

5.4. Resultados

5.4.1. Parámetros ambientales

En la tabla 5.2 se presentan los coeficientes del análisis descriptivo de las variables ambientales que fueron monitorizadas en el interior de la cueva, obtenidos a partir de registros horarios.

variable	Sala	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv.	CV
Temperatura (°C)	Belén	340	11,83	19,29	16,73	1,83	11
	Cascada	284	17,47	19,67	18,60	0,50	3
	Cataclismo	336	17,59	19,47	18,48	0,68	4
Humedad relativa (%)	Belén	341	37,57	100	83,11	16,60	20
	Cascada	293	53,01	100	92,36	13,70	15
	Cataclismo	304	70,3	98,61	90,48	6,78	7
Dióxido de Carbono (ppm)	Belén	322	454	1260	667	202	30
	Cascada	260	447	1320	649	177	27
	Cataclismo	335	408	1337	732	223	30

Tabla 5.2. Datos descriptivos para las variables ambientales Temperatura, Humedad Relativa y concentración de dióxido de carbono en el aire obtenidos a partir de registros horarios durante el periodo de estudio.

5.4.1.1. Temperatura del aire

La temperatura del aire de las Galerías Turísticas de la cueva osciló entre un valor mínimo de 11,83 °C y máximo de 19,67 °C, registrados en la sala del Belén y de la Cascada, respectivamente. La evolución de la temperatura del aire de la cueva durante el periodo de estudio dibujó una curva con valores máximos durante el verano y mínimos durante el invierno,

semejante a la evolución de la temperatura del aire exterior (Liñán et al., 2007). Por salas, se observó un gradiente que aumentaba hacia las zonas más profundas, con un valor medio anual similar en las dos salas más profundas.

La Sala del Belén fue la que mostró mayor oscilación de los registros de temperatura, con un coeficiente de variación del 11 % y valores comprendidos entre 11,83 y 19,29 °C con un valor medio de 16,73 °C. A escala anual, los registros máximos se observaron durante el verano y un descenso durante el otoño que culminó en los valores más bajos durante el invierno.

En la Sala de la Cascada, en la zona intermedia de las Galerías Turísticas, la evolución de esta variable fue similar a la observada en la Sala del Belén, pero con menor oscilación. En esta sala la temperatura del aire osciló entre 17,47 y 19,67 °C, con un valor medio de 18,60 °C y un coeficiente de variación del 3 %. Los registros más altos correspondieron al verano, durante el otoño la temperatura descendió y se alcanzaron los registros más bajos durante el invierno.

En la Sala del Cataclismo la temperatura del aire osciló entre 17,59 y 19,47 °C con un valor medio de 18,48 °C. El coeficiente de variación para esta sala fue del 3 %. A escala anual, los registros más elevados se obtuvieron durante el verano y el otoño. A partir de noviembre, la temperatura comenzó a disminuir hasta alcanzar los valores más bajos en el invierno. Los registros observados durante las primeras semanas del otoño podrían ser debidos a la llegada a esta sala de aire más cálido procedente de las Galerías Altas y Nuevas de la cueva, en función del modelo de circulación de las corrientes de aire descrito para la cavidad (Liñán y del Rosal, 2014).

5.4.1.2. Humedad relativa del aire

Durante el periodo de estudio la humedad relativa del aire de las Galerías Turísticas de la cueva estuvo comprendida entre el valor mínimo de 37,57 %, registrado en la sala del Belén y un valor máximo de 100 %, registrado en las salas del Belén y de la Cascada. En las tres salas monitorizadas, la humedad relativa más alta del aire se observó durante el verano y las primeras semanas del otoño y la más baja durante el invierno. Este incremento de humedad relativa al

inicio de la época estival podría estar relacionado con un aumento del caudal de goteo (Carrasco et al., 2002; Liñán et al., 2008) y con la llegada a la zona turística, desde la zona más interna de la cavidad, de masas de aire más húmedo (Liñán y del Rosal, 2014). En relación con el valor medio de humedad relativa durante el periodo de estudio, se observó un gradiente que aumenta desde la zona más externa hacia la más profunda, si bien en esta zona se distorsiona levemente. La interpretación de los resultados de este parámetro debe tener en cuenta el registro de posibles datos erróneos de saturación ambiental (100 %) en las Salas del Belén y de la Cascada, motivados por la condensación de agua en la sonda de medida del sensor.

En la Sala del Belén, el valor medio de humedad relativa durante el periodo de estudio fue de 83,11 %, con valor mínimo y máximo de 37,57 y 100 %, respectivamente y coeficiente de variación del 20 %. A escala anual, los datos más elevados de humedad relativa se observaron durante el verano, con valores de saturación durante los meses de junio, julio, agosto y septiembre. Esta sala mostró numerosos episodios de incremento y descenso de humedad relativa, que podrían estar relacionados con periodos de lluvia en el exterior, dado que el pequeño espesor del techo de esta sala permite la filtración rápida de agua de origen meteórico. Por otro lado, estos episodios también podrían estar relacionados con la llegada de agua de riego del entorno de la cavidad (Carrasco et al., 1996) o con fallos en el funcionamiento de los depósitos de agua del exterior que dan lugar a la filtración de agua a la cueva.

En la sala de la Cascada la humedad relativa estuvo comprendida entre el 53,01 y el 100 %, con un valor medio de 92,36 % y un coeficiente de variación del 15 %, durante el periodo de estudio. La evolución de este parámetro en la sala mostró tres periodos de saturación ambiental, registrados durante la primavera, el verano y el invierno, respectivamente. Durante la primavera y el invierno, el periodo de saturación ambiental fue más corto que el registrado durante el verano. Por otro lado, los episodios de saturación ambiental observados durante la primavera y el invierno no coinciden con el patrón histórico de humedad relativa en esta sala y podrían ser debidos a la presencia de agua de condensación en la sonda del sensor.

La sala del Cataclismo fue la que mostró menor variación de humedad relativa, con registros comprendidos entre el 70,30 y el 98,61 %, un valor medio 90,48 % y un coeficiente de variación del 7 %.. Durante el periodo de estudio, la humedad relativa de la sala dibujó una curva

con registros de humedad más bajos durante el invierno, incrementos durante la primavera y valores máximos durante el verano y principio del otoño. Posteriormente, se observó un descenso progresivo hasta alcanzar, de nuevo, valores más bajos durante el invierno. En esta sala no se registraron datos de saturación ambiental aunque sí muy próximos. La ausencia de condensación en la sonda del sensor evitó que en este sensor se registraran datos erróneos como los observados (probablemente) en las salas del Belén y de la Cascada.

5.4.1.3. Concentración de dióxido de carbono en el aire

La concentración de dióxido de carbono en las Galerías Turísticas de la cueva está directamente relacionada con las visitas y la tasa de ventilación (Cañete, 1997). Habitualmente, este parámetro alcanza los registros más elevados durante los meses de mayor visitabilidad y menor ventilación natural, que corresponden a julio y agosto (Carrasco et al., 2002; Liñán et al., 2008). Durante el periodo de estudio la concentración de dióxido de carbono de la cueva estuvo comprendida entre 408 y 1337 ppm, ambos registros obtenidos en la sala del Cataclismo. En todas las salas las mayores concentraciones se obtuvieron durante el verano y las más bajas durante el invierno. Igualmente, en todos los casos se registró un pico de dióxido de carbono durante el mes de octubre que podría estar relacionado con cambios de la ventilación natural o la celebración de algún evento “extraordinario” en la cueva que hubiera motivado la presencia de público durante la noche.

En la sala del Belén, la concentración de dióxido de carbono del aire estuvo comprendida entre 454 y 1260 ppm, con un valor medio de 667 ppm y un coeficiente de variación de 30 %. Este parámetro mostró las concentraciones más bajas durante el invierno y las más elevadas durante el verano, con máximos en agosto y mínimos en invierno, durante diciembre y enero.

En la sala de la Cascada, la concentración de dióxido de carbono estuvo comprendida entre 447 y 1320 ppm, con un valor medio de 649 ppm y un coeficiente de variación de 27 %. En esta sala los registros más elevados se obtuvieron durante el verano y los más bajos durante el invierno.

En la sala del Cataclismo la concentración media de dióxido de carbono durante el periodo de estudio fue de 732 ppm y los registros máximo y mínimo fueron 1337 y 408 ppm, respectivamente. El coeficiente de variación de este parámetro fue de 30 %. La evolución de este parámetro, al igual que sucedió en las otras salas, mostró los registros más elevados durante el verano y los más bajos durante el invierno. A partir de septiembre, la concentración de dióxido de carbono en la sala comienza a disminuir hasta alcanzar los registros más bajos durante el invierno.

5.4.1.4. Radiación fotosintética activa (PAR)

Todos los biofilms que forman parte de este estudio se encuentran iluminados artificialmente por lámparas de luz eléctrica. No obstante, tal y como se ha indicado anteriormente, todas las lámparas no son iguales y, en aquellos casos en que sí lo son, no se ubican a la misma distancia del sustrato. Para medir la radiación fotosintética activa media (PAR) a la que estuvo sometida cada una de las zonas de control durante el periodo de estudio se llevaron a cabo tres campañas de medida: al principio, a mitad y al final de dicho periodo. El motivo por el cual se realizaron tres campañas cuando, en teoría, la iluminación debía ser constante, fue debido a que, aunque las bombillas fundidas son reemplazadas por otras de características semejantes, con frecuencia las nuevas no proceden de la misma casa comercial que la retirada, por lo que suelen mostrar pequeñas diferencias entre ellas. Por otra parte, al envejecer, el filamento de la bombilla pierde grosor y presenta mayor resistencia al paso de la corriente, lo que incrementa la radiación de las longitudes de onda corta y aumenta su eficacia. Los resultados de radiación fotosintética activa obtenidos se muestran en la tabla 5.3.

Los resultados mostraron que los biofilms de las zonas Ne.10 (iluminación vial) y Ne.12 (iluminación escénica) presentaban una radiación notablemente superior al resto de zonas colonizadas, con resultados del orden de $9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Por otro lado, los biofilms menos iluminados, con PAR inferior a $4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fueron Ne.1, Ne. 2, Ne.3, Ne.9 y Ne.11, todos ellos iluminados mediante lámparas fluorescentes de ahorro energético forman parte de la iluminación escénica.

Zonas	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Valor medio ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
Ne.1	3,05	5,2	1,5	3,25
Ne.2	0,17	0,15	0,34	0,66
Ne.3	3,63	3,62	2,55	3,27
Ne.5	10,67	10,2	12,5	11,12
Ne.6	3,87	3,75	4,26	3,96
Ne.7	1,47	8,7	4,52	4,87
Ne.8	4,93	4,98	--	4,96
Ne.9	3,68	3,59	3,42	3,56
Ne.10	6,65	10,4	10,9	9,32
Ne.11	1,53	4,89	3,9	3,44
Ne.12	10,4	11,6	5,7	9,23
Ne.13	4,74	5,25	--	4,96
Ne.14	1,4	1,91	--	1,66

Tabla 5.3. Datos de radiación fotosintética activa (PAR) medida en la parte central de cada zona indicada.

En relación con las zonas de experimentación, libres de colonización fotosintética y empleadas para la investigación del desarrollo de nuevos biofilms, la zona Ne.5, iluminada con 3 leds (5 W cada uno) presentó una medida de radiación fotosintética activa muy superior a las zonas Ne.6 y Ne.14, iluminadas con lámparas fluorescentes de ahorro energético (18 W) de color verde y blanco, respectivamente y a la zona Ne.13, iluminada con 3 leds (5 W cada uno) de color blanco (Tabla 5.3).

5.4.2. Biofilms fotosintéticos

Para la interpretación de los resultados, la variable *verde* se identificó como una medida del tamaño del biofilm fotosintético. Así, un cambio de *verde* en una serie de imágenes fue interpretado como un cambio del tamaño del biofilm. Para cada zona de control, se analizaron los tamaños de los biofilms ubicados en las áreas (1) y (2) delimitadas, tal y como se describe en el apartado 5.3.4. *Procesado digital de imágenes. Cálculo de la variable verde*, de la presente memoria. Los registros obtenidos para cada biofilm se representaron mediante un diagrama de cajas que mostró la evolución del tamaño junto a la evolución de las variables ambientales de

temperatura (T), humedad relativa (RH) y concentración de dióxido de carbono (CO₂) del aire en base a los registros del sensor más próximo al biofilm en cuestión. Así, cada imagen se relacionó con el valor medio de los registros horarios obtenidos por el sensor durante el día en el que se realizó cada fotografía. Para cada una de las variables representadas, el diagrama de cajas ofreció información sobre su evolución durante el periodo de estudio, los periodos de crecimiento o decrecimiento así como los registros más elevados y más bajos. Este diagrama también aportó información a escala mensual, mediante la representación de los tres cuartiles e identificó los registros mínimo y máximo para cada mes, así como la variabilidad asociada a los datos obtenidos en un mismo mes. Finalmente, el diagrama también determina los datos atípicos, es decir, numéricamente distantes del resto. La presentación conjunta de la evolución del tamaño de los biofilms y de las variables ambientales permitió observar su comportamiento de forma individual y en conjunto, así como plantear hipótesis de dependencia entre ellas, que posteriormente fueron corroboradas mediante análisis estadístico de regresión. Los resultados del análisis de regresión ofrecieron información sobre la dependencia del tamaño del biofilm de las variables ambientales monitorizadas (T, RH y CO₂) así como los coeficientes de los diferentes estadísticos obtenidos que permitieron la interpretación de los resultados. Los datos correspondientes a los coeficientes evaluados durante el análisis estadístico regresión se ofrecen en el Anexo 2 de la presente memoria.

Finalmente, para determinar cambios significativos en el tamaño de cada uno de los biofilms se calculó el estadístico *t de Student* que permitió comparar el tamaño durante diferentes períodos. Por un lado se comparó el tamaño durante el invierno y el verano de un mismo año y, por otro lado, durante el invierno de dos años consecutivos.

5.4.2.1. Representación gráfica

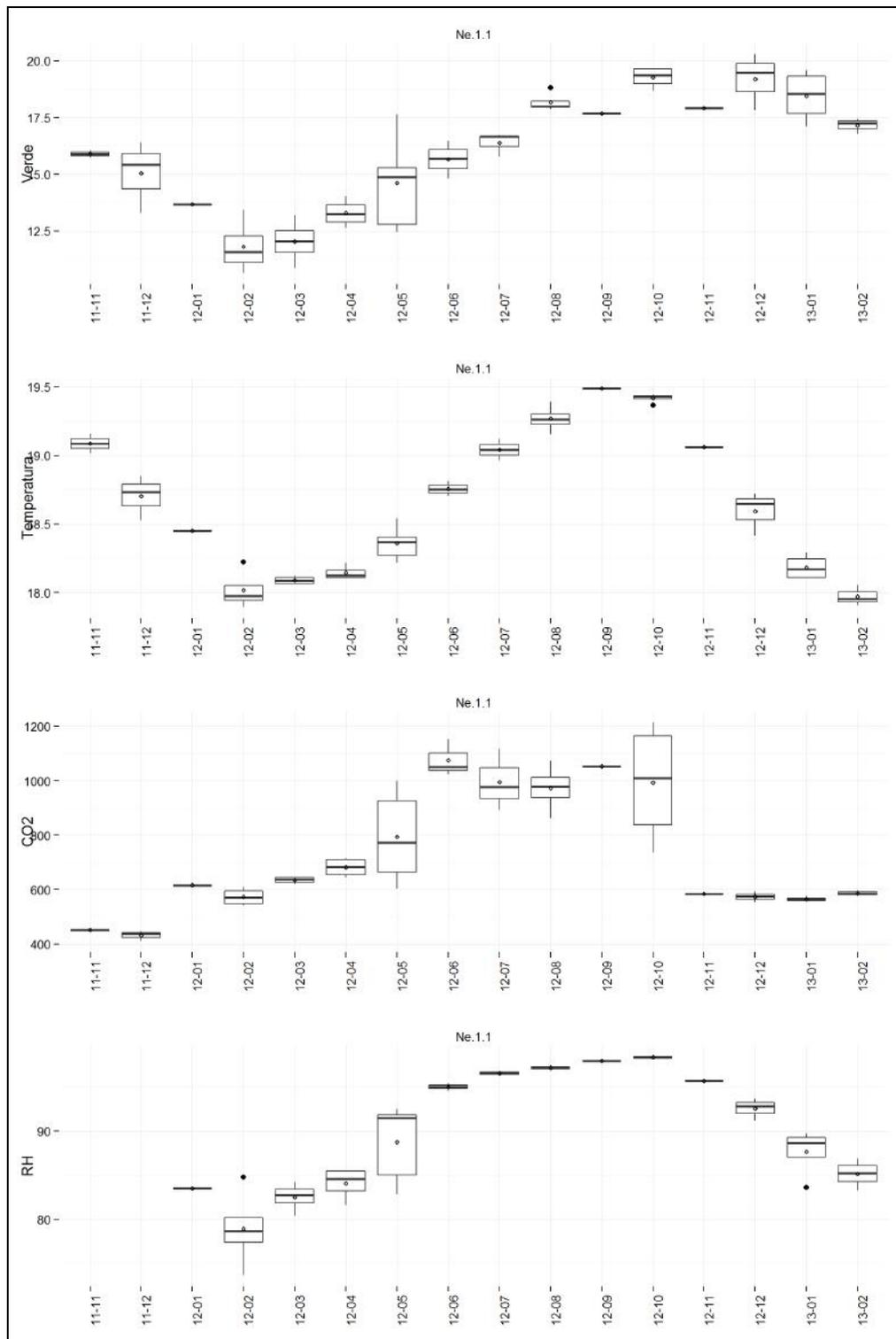


Figura 5.5. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.1(1).

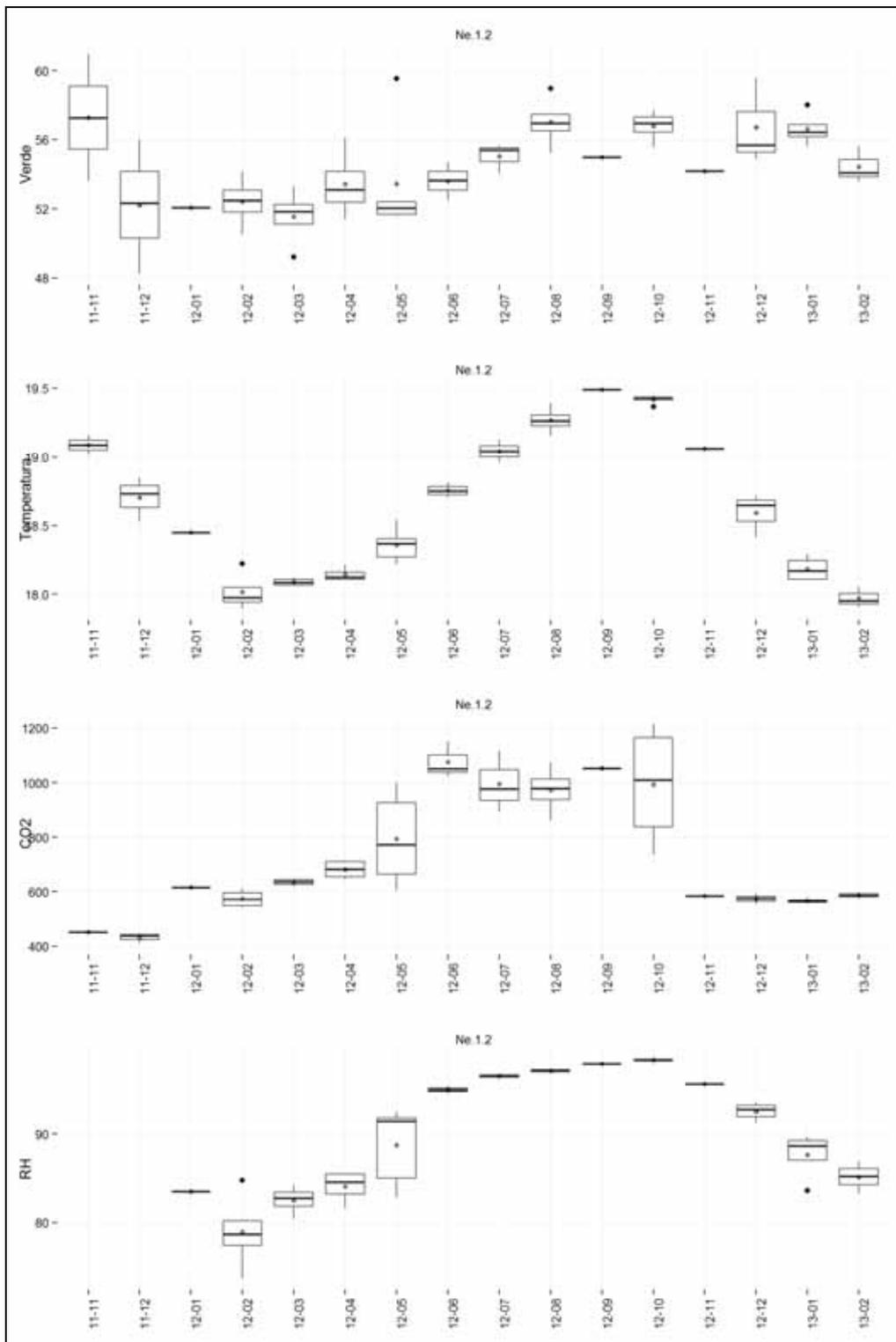


Figura 5.6. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm No.1(2).

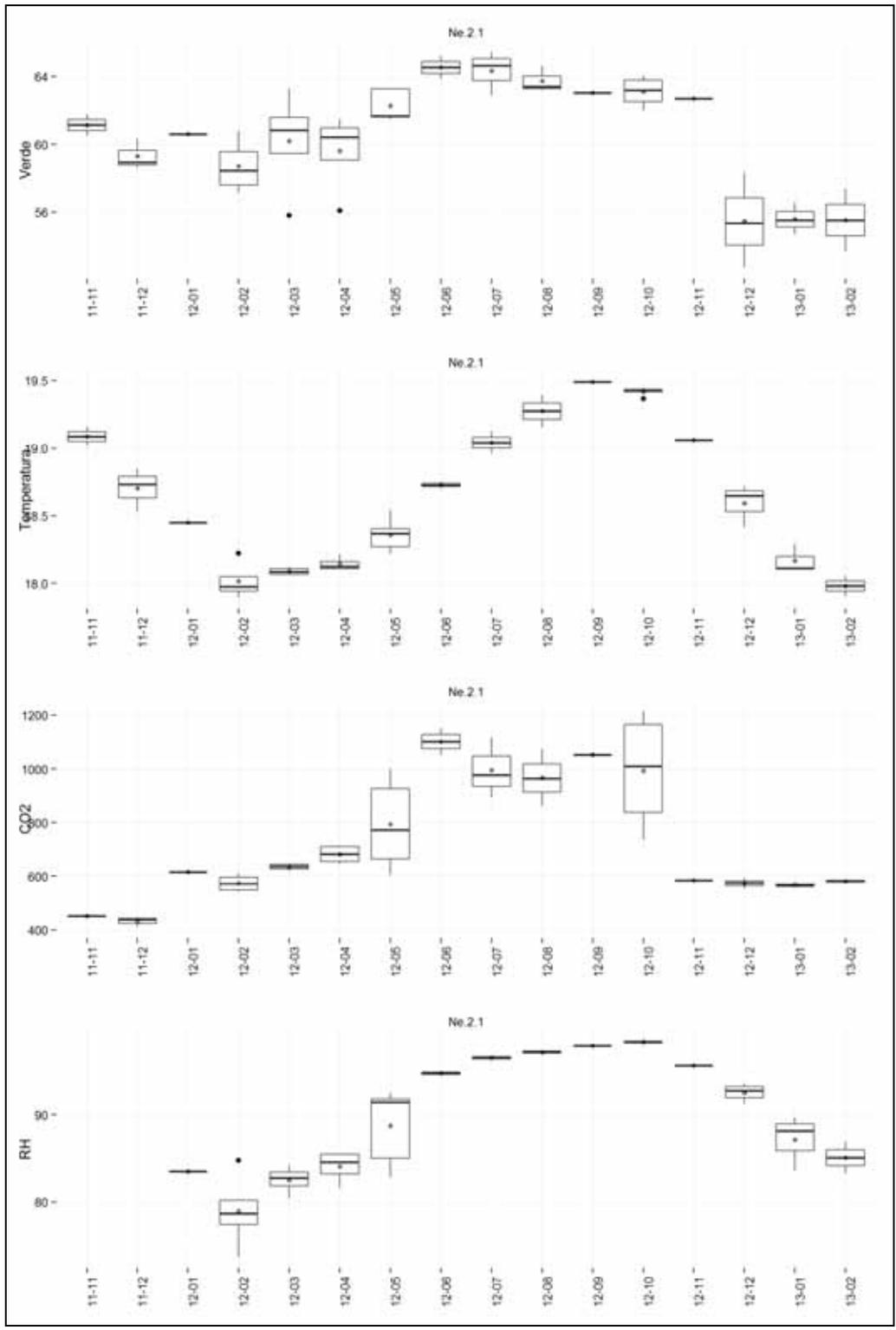


Figura 5.7. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.2(1).

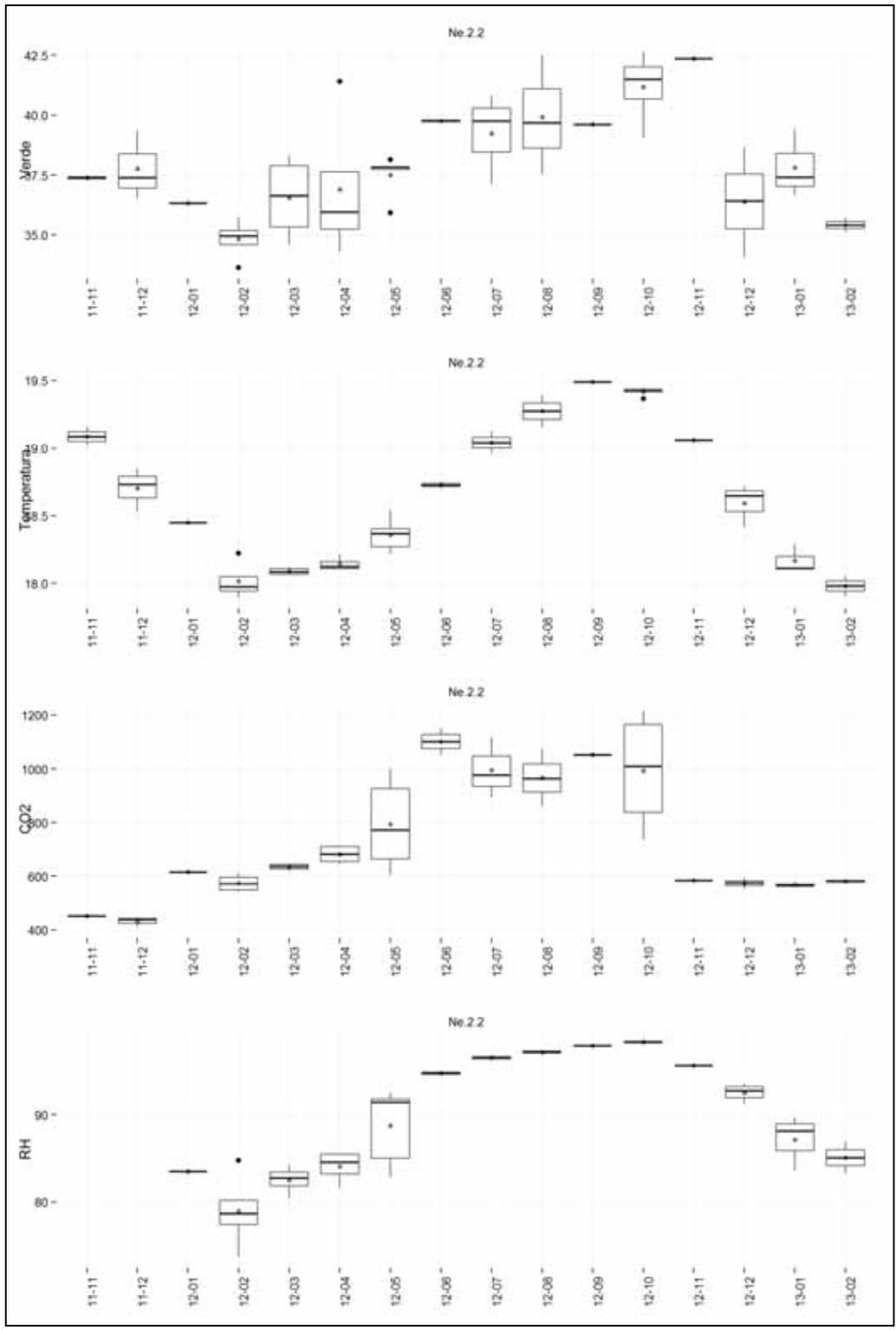


Figura 5.8. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.2(2).

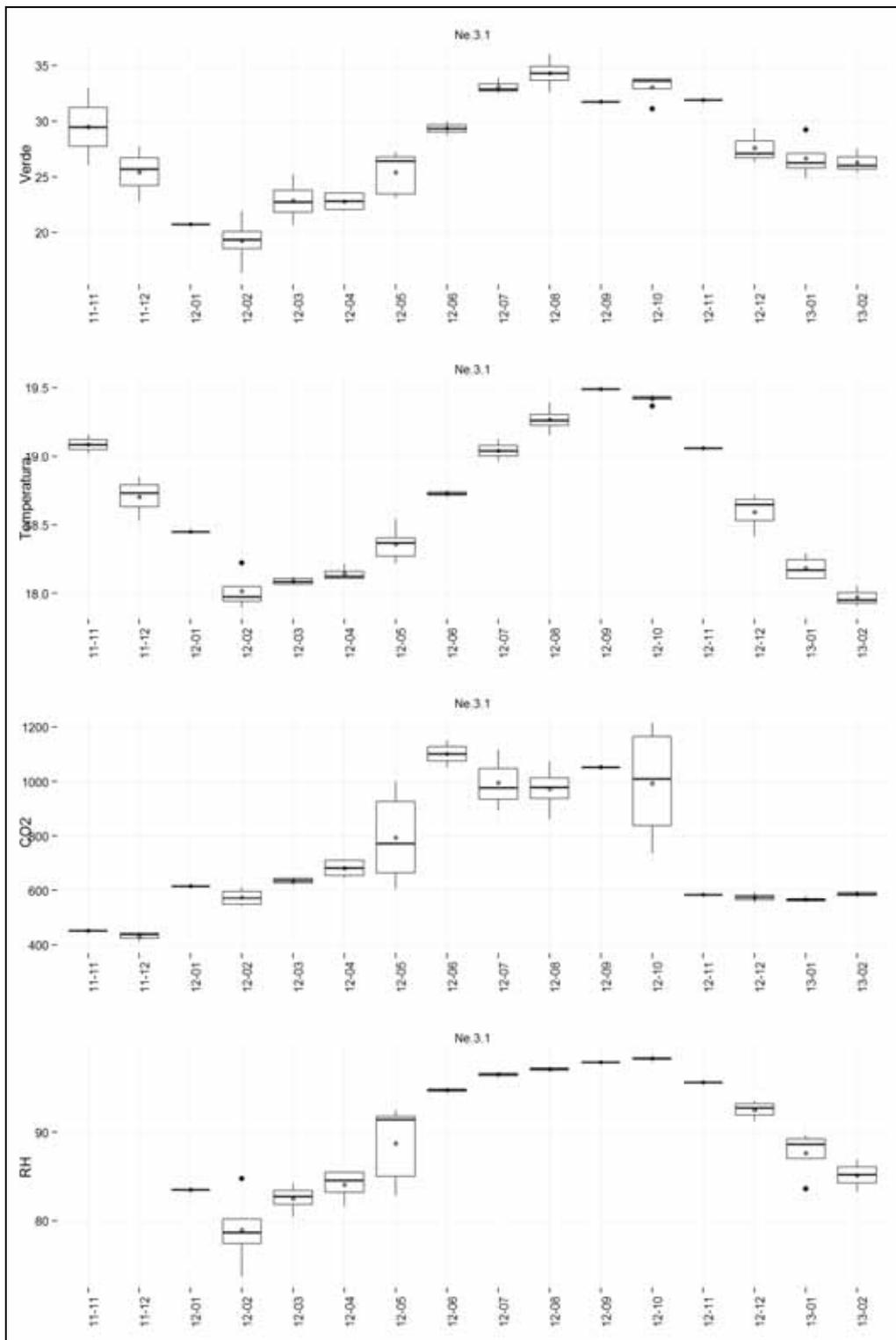


Figura 5.9. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.3(1).

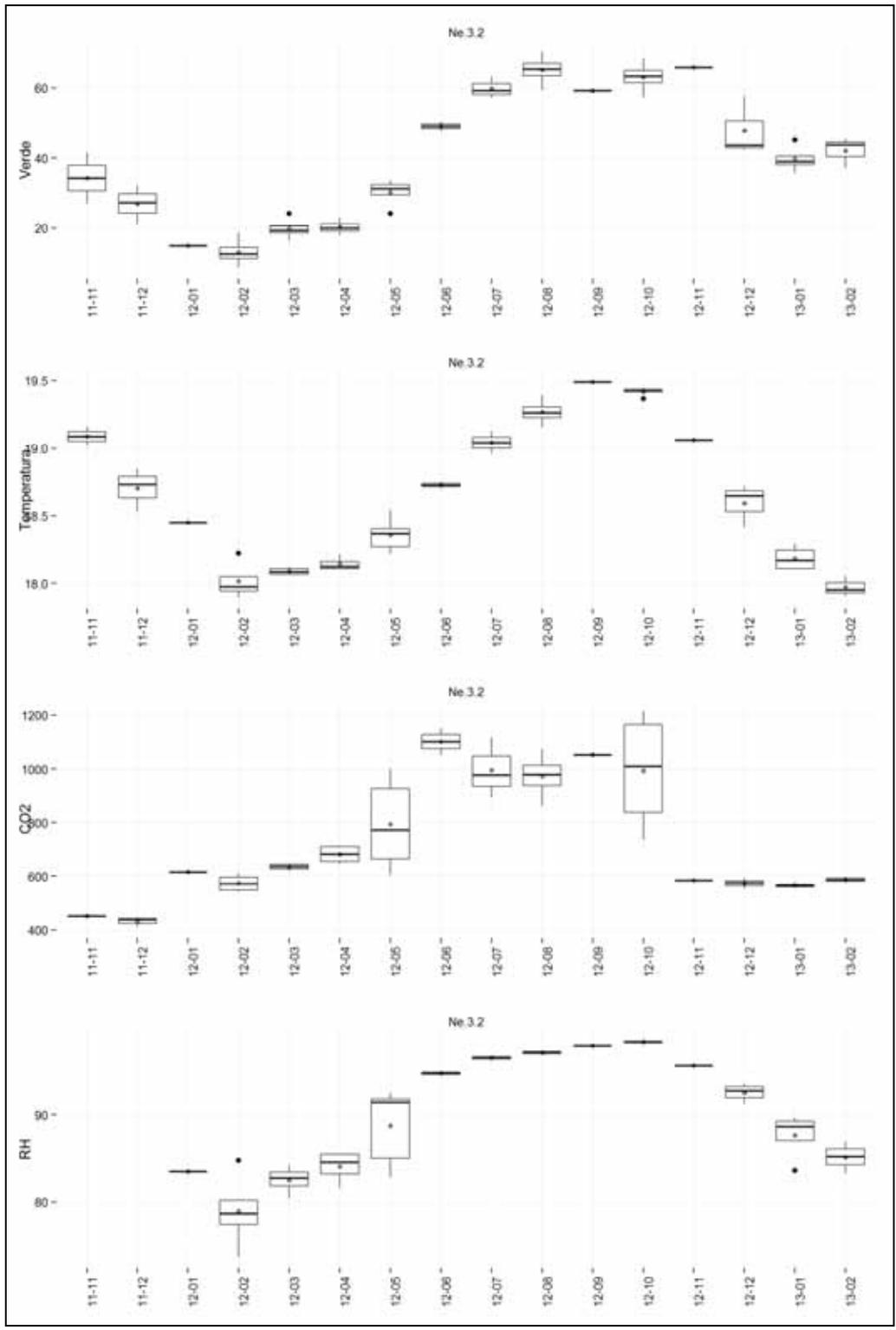


Figura 5.10. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.3(2).

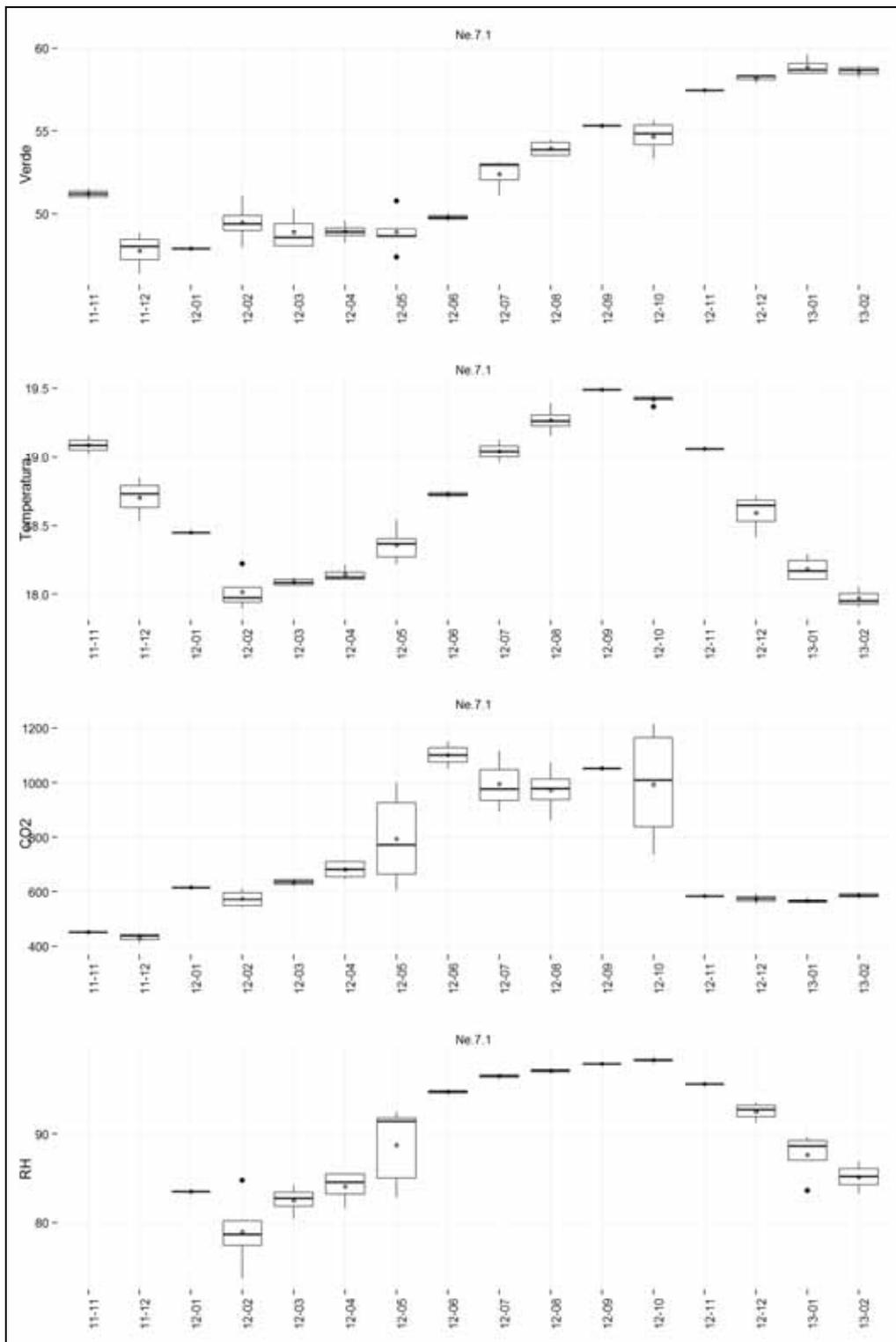


Figura 5.11. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.7(1).

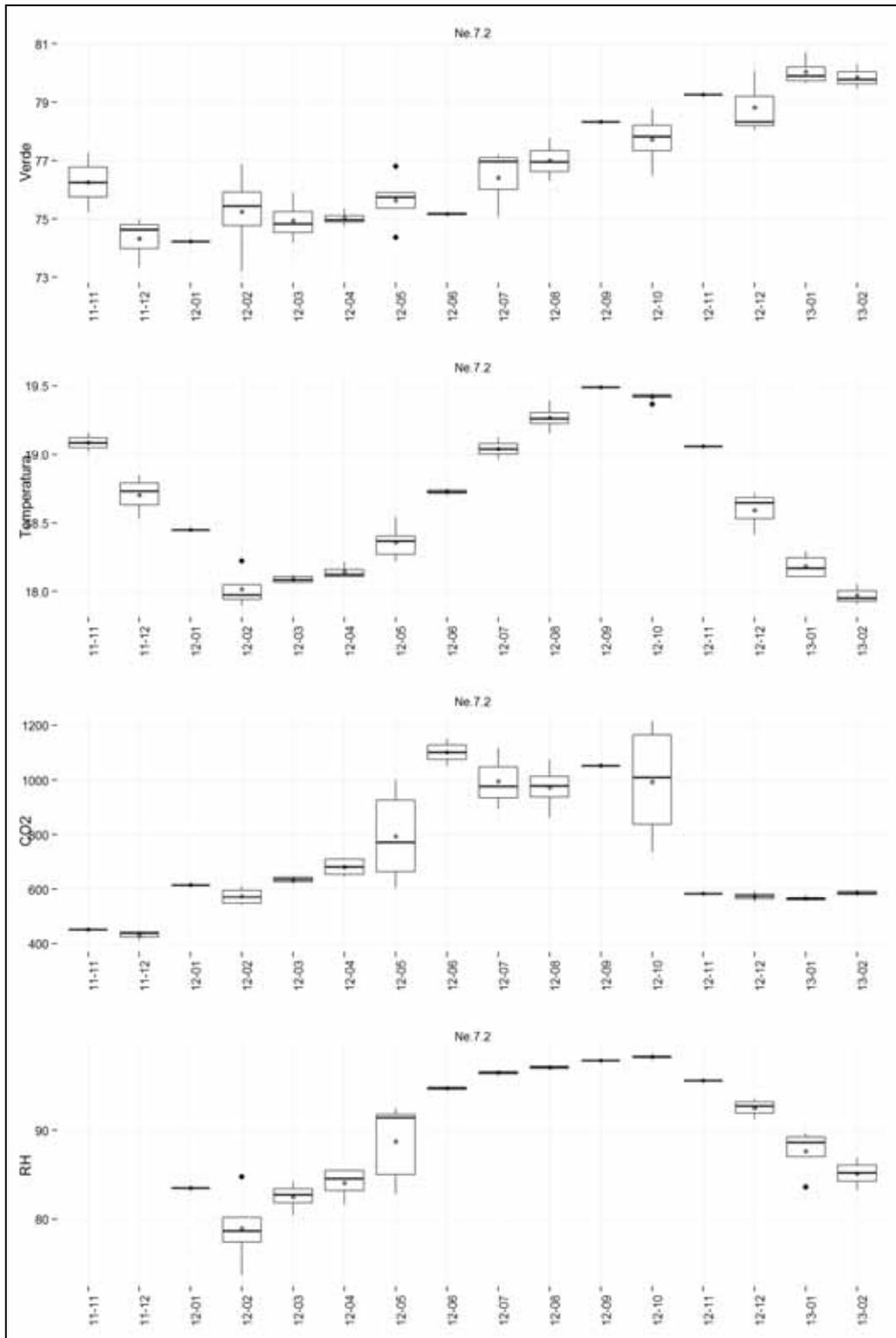


Figura 5.12. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.7(2).

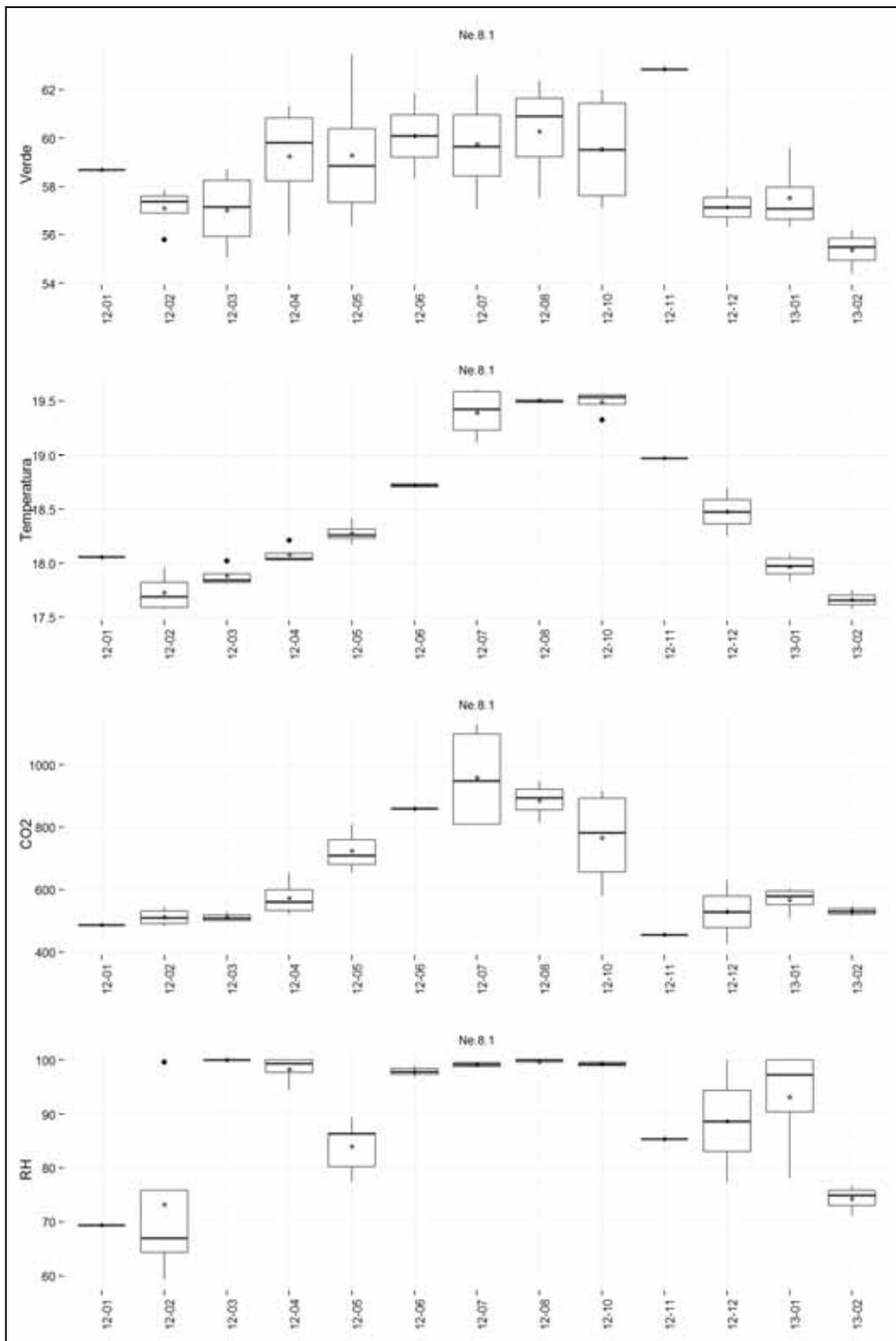


Figura 5.13. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.8(1).

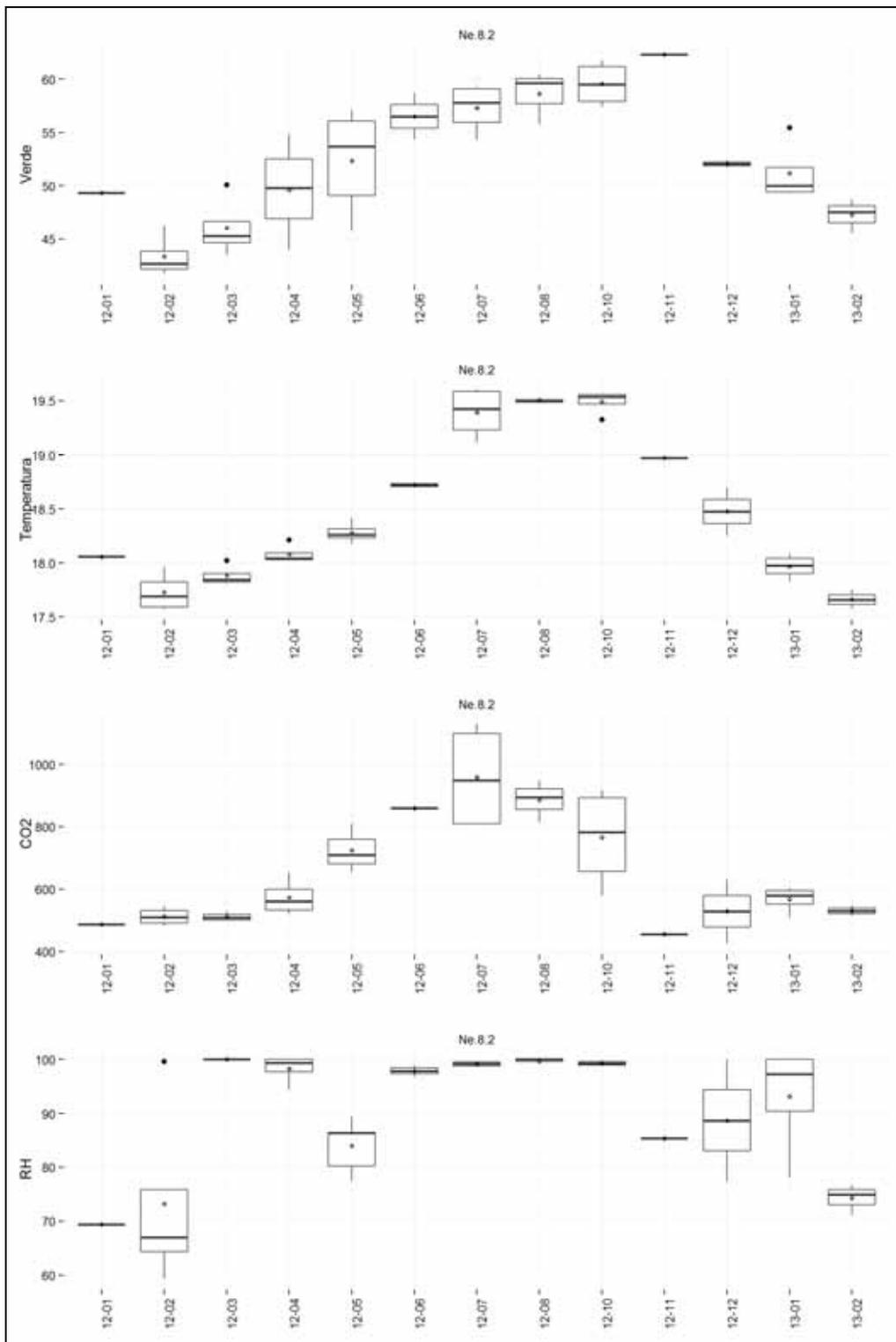


Figura 5.14. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.8(2).

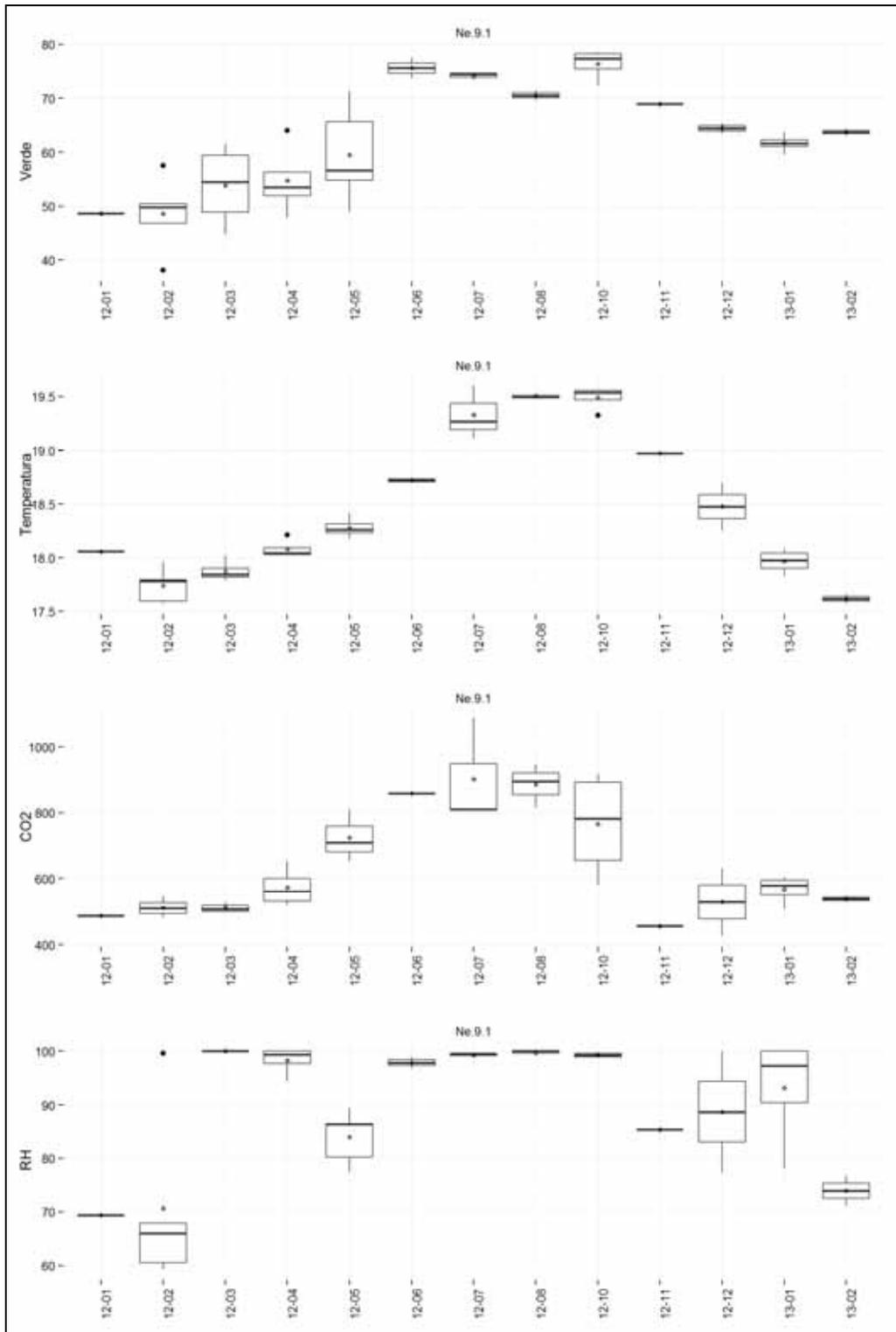


Figura 5.15. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.9(1).

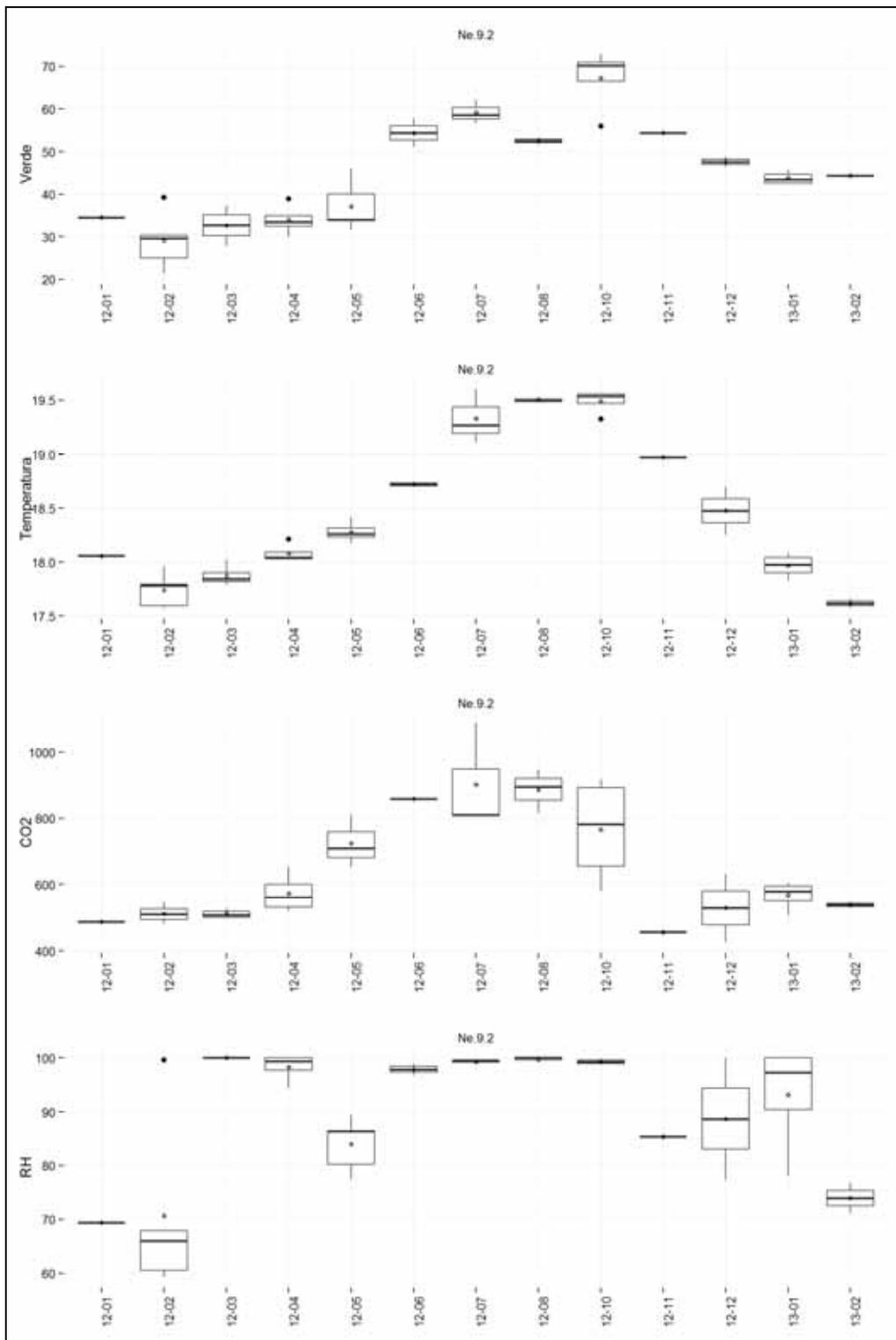


Figura 5.16. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.9(2).

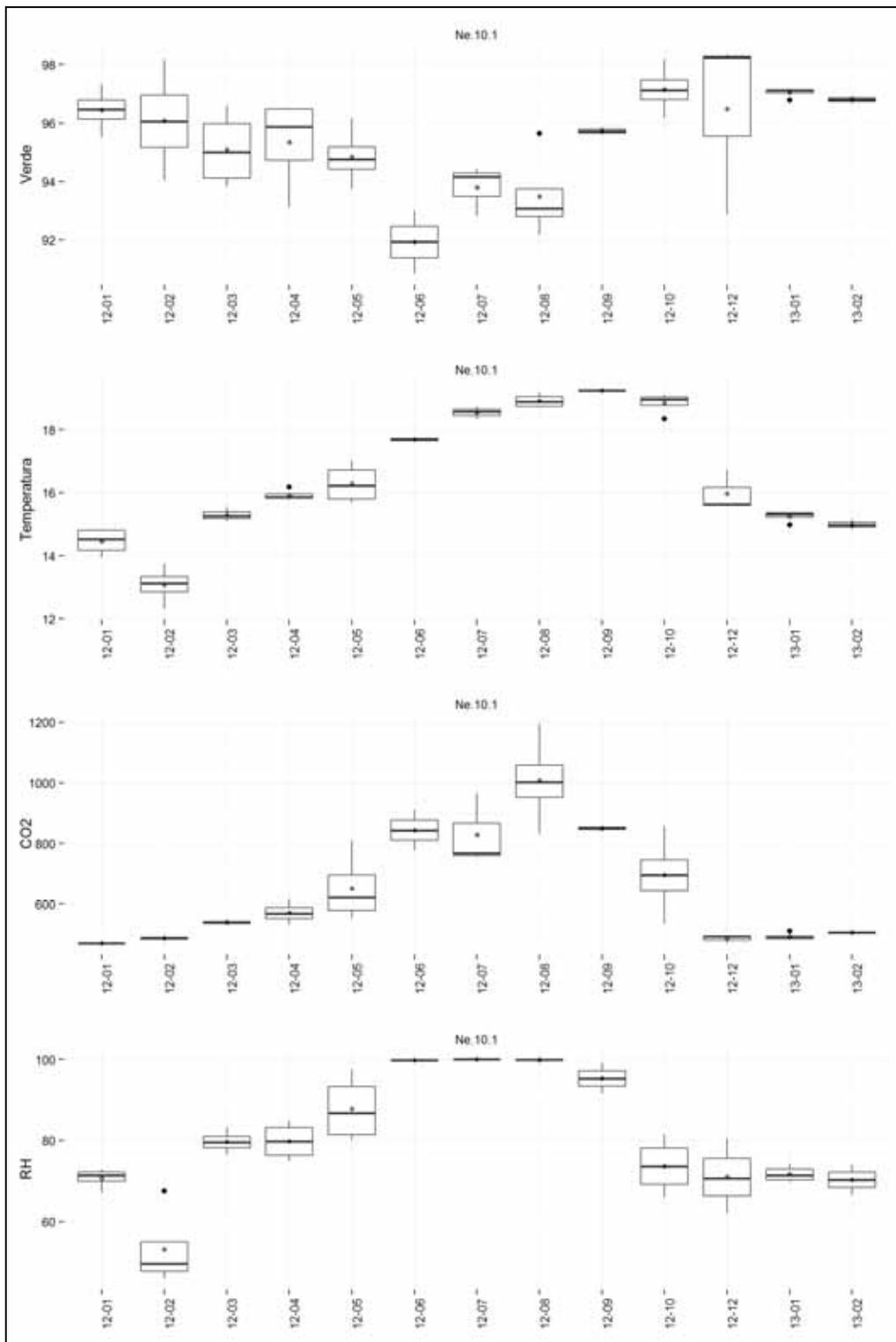


Figura 5.17. Gráficos de evolución de las variables *verde*, Temp, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.10(1).

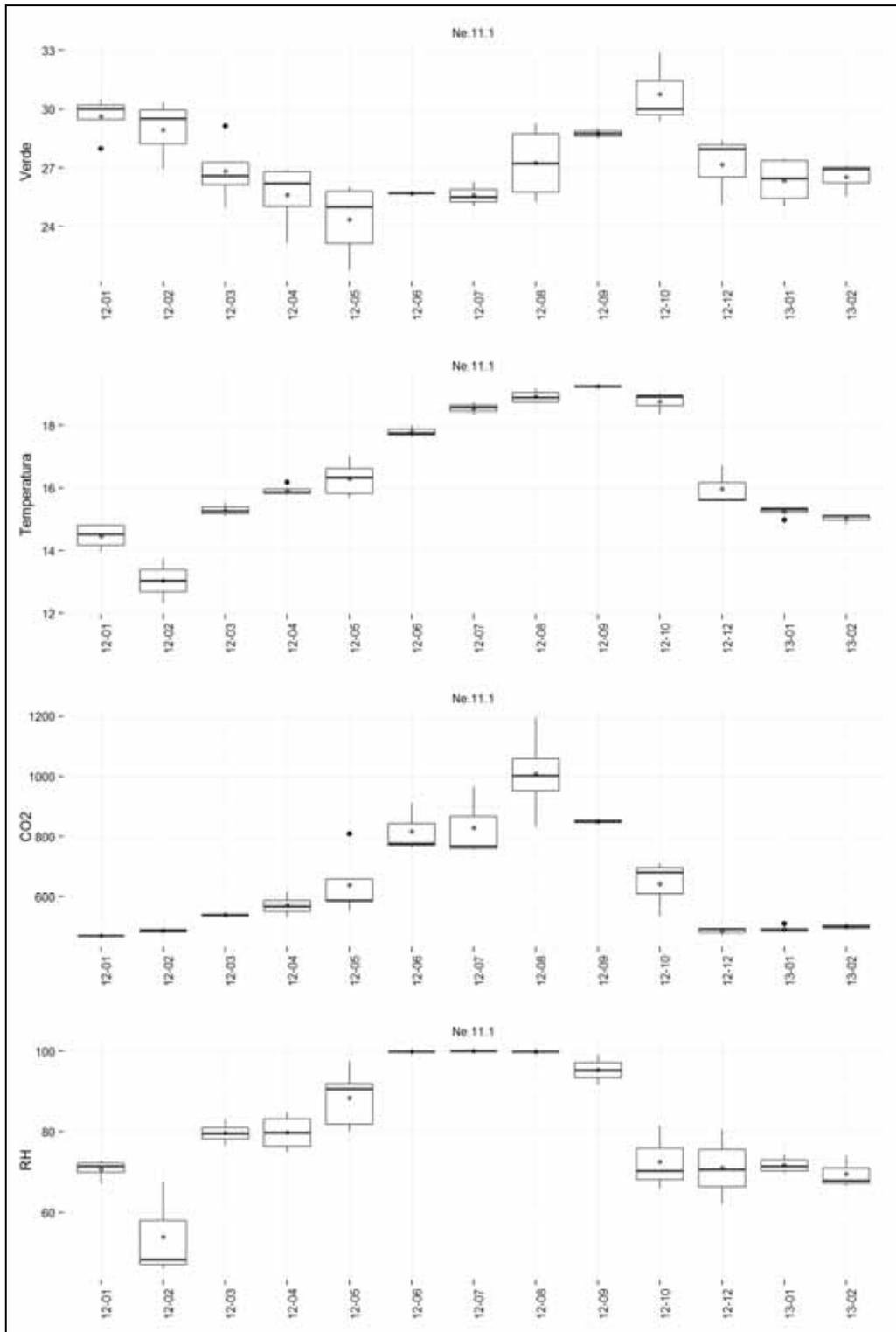


Figura 5.18. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.11(1).

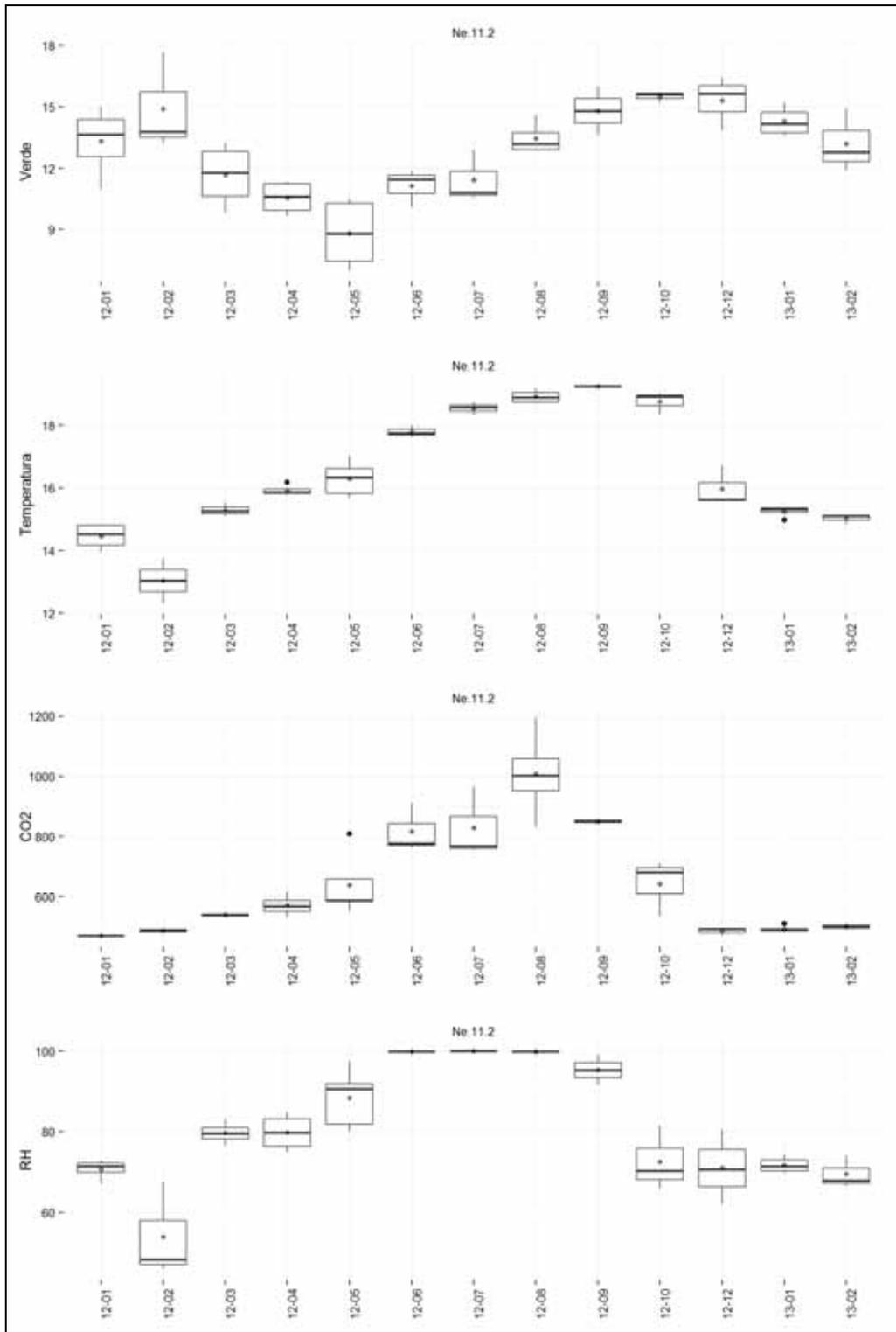


Figura 5.19. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.11(2).

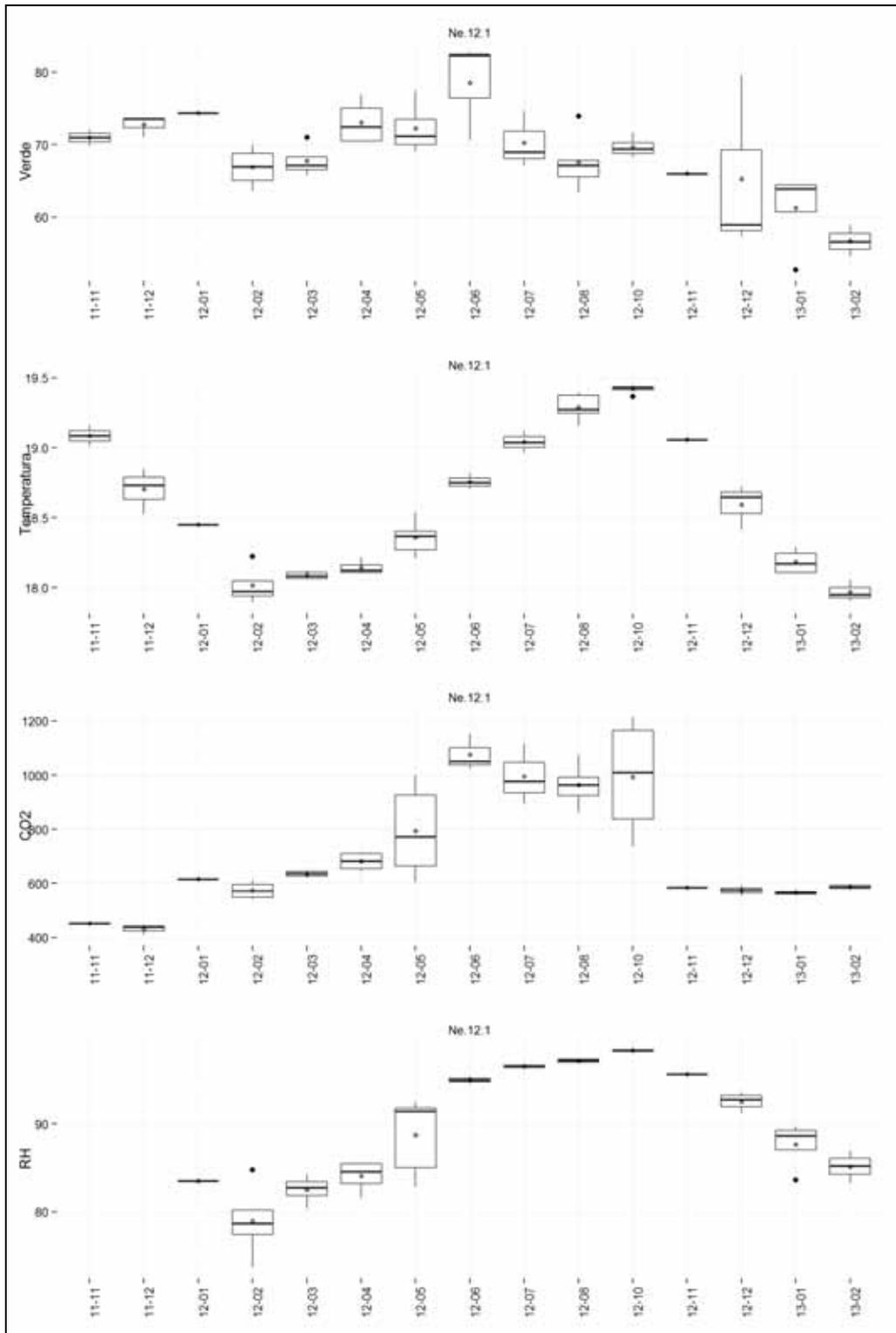


Figura 5.20. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm No.12(1).

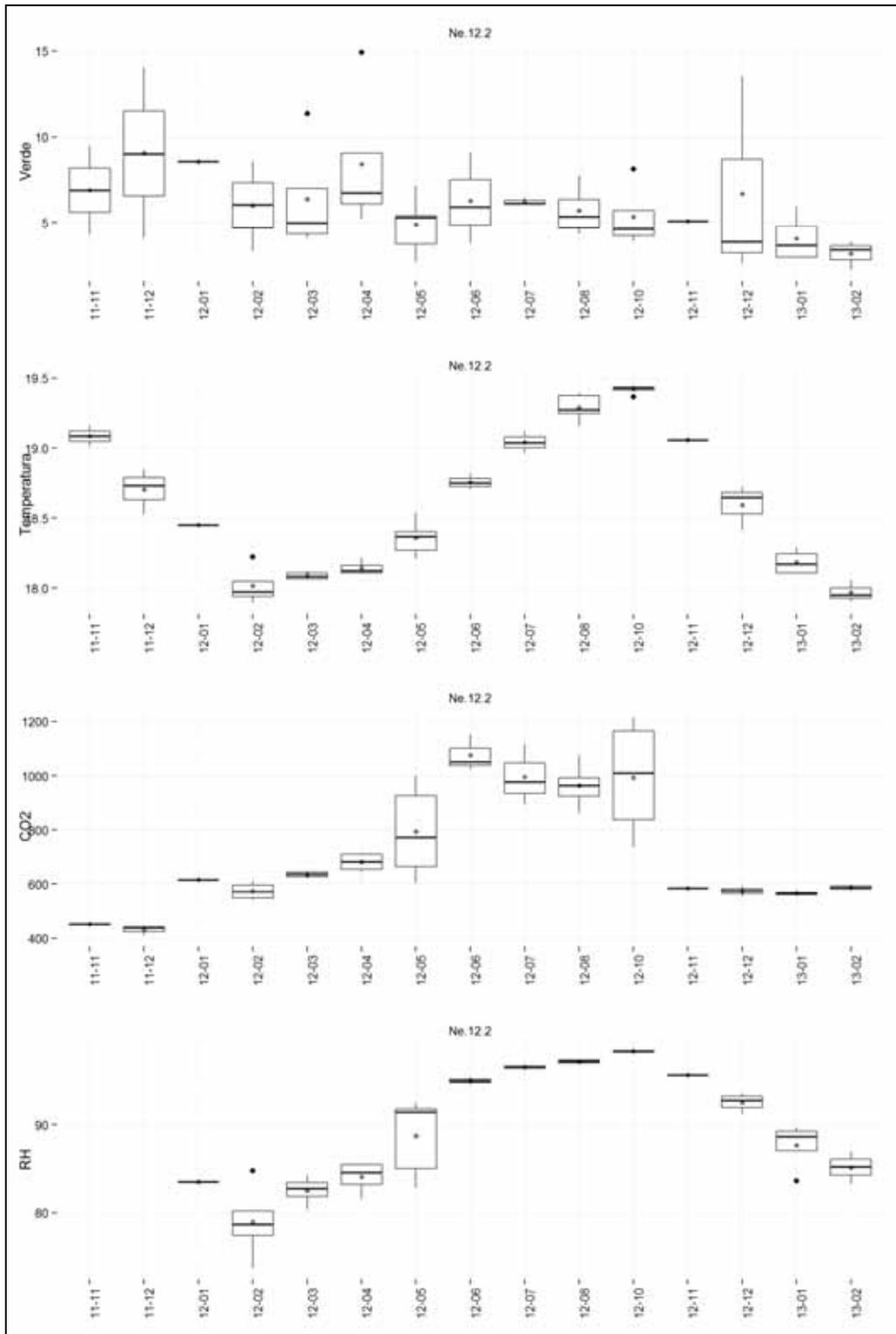


Figura 5.21. Gráficos de evolución de las variables *verde*, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm No.12(2).

5.4.2.2. Resultados por zonas de control

El biofilm Ne.1(1) presentó un coeficiente de variación del 17%. Su evolución mostró un descenso al principio del estudio, durante el invierno (desde noviembre hasta febrero), seguido de un incremento durante la primavera hasta el verano, cuando se obtuvieron los registros más altos junto con el otoño. Durante el siguiente invierno se volvió a observar un nuevo descenso. A escala mensual, en mayo se observó una notable variabilidad de los resultados y en agosto un resultado atípico (Fig. 5.5). La representación gráfica del tamaño mostró semejanza con la evolución de la humedad relativa del aire. El estadístico *t de Student* determinó diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 3,2E-08$) y también entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 1,32E-05$). El incremento del tamaño anual fue de 6 %. Los modelos de regresión que relacionaron el tamaño del biofilm con las variables ambientales mostraron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 59,6 y 67,9 %. El mayor poder explicativo lo presentó el modelo que empleó los registros ambientales de hasta 4 días antes de tomar la fotografía. La variable ambiental que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire.

El tamaño del biofilm Ne.1(2) presentó un coeficiente de variación del 5 %. La evolución que mostró el gráfico de cajas fue similar a la observada para Ne.1(1), con tamaños más pequeños durante el invierno y mayores durante el verano y parte del otoño, si bien las oscilaciones de este biofilm fueron más pequeñas que las de Ne.1(1). Destacamos los meses iniciales del estudio, noviembre y diciembre de 2011, que mostraron una notable variabilidad de resultados y albergaron el tamaño máximo y mínimo del biofilm, respectivamente. Asimismo, durante los meses de marzo, mayo y septiembre de 2012 y enero de 2013 se obtuvieron resultados atípicos (Fig. 5.6). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los tamaños del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 5,6E-05$) y también entre los tamaños registrados durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0230$). El incremento del tamaño a lo largo de un año fue de 3 %. Los modelos de regresión propuestos que relacionaron el tamaño con las variables ambientales mostraron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 30,1 y 39,4 %. El mayor poder explicativo correspondió al modelo que empleó los registros

de hasta 5 días antes de tomar la fotografía. La variable ambiental que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire.

El biofilm Ne.2(1) mostró un coeficiente de variación para el tamaño del 5 %. Así, el tamaño permaneció casi estable, si bien se observó un pequeño descenso durante el primer invierno seguido de un incremento en primavera y hasta verano, cuando el tamaño fue máximo y se mantuvo también durante parte del otoño. Posteriormente, se observó un nuevo descenso hasta registrar el tamaño más pequeño durante el invierno siguiente. A escala mensual, diciembre de 2012 fue el mes con mayor variabilidad de resultados y marzo y abril de 2012 presentaron resultados atípicos (Fig. 5.7). El estadístico *t de Student* determinó diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,0006$) y también entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0167$). A lo largo del año se determinó una reducción del tamaño del 3 %. Los modelos de regresión propuestos que relacionaron el tamaño con las variables ambientales mostraron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 47,2 y 61,8 %. El mayor porcentaje de variabilidad explicada se obtuvo cuando se emplearon los datos ambientales obtenidos el mismo día en el que se realizó la fotografía. La variable ambiental más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la concentración de dióxido de carbono del aire.

El tamaño del biofilm Ne.2(2) mostró un coeficiente de variación del 5 %. Su evolución comenzó con un descenso durante el invierno, seguido de un aumento durante la primavera hasta alcanzar los tamaños más grandes durante el verano y parte del otoño. A partir de entonces, comenzó una nueva disminución que perduró hasta el siguiente invierno. En este segundo invierno de estudio se observó un incremento puntual del tamaño. A escala mensual, los meses de marzo, abril, agosto y diciembre de 2012 mostraron una notable variabilidad de resultados y en febrero, abril y mayo de 2012 se obtuvieron resultados atípicos (Fig. 5.8). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,0004$). Sin embargo, estas diferencias no se observaron entre el tamaño del biofilm durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,1344$). El porcentaje de variabilidad explicada de los modelos propuestos estuvo comprendido entre 47,8 y 54,6 %. El modelo que mostró mayor poder explicativo fue el que empleó registros ambientales correspondientes al

mismo día en el que se tomó la fotografía. La variable ambiental más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la temperatura del aire

El biofilm Ne.3(1) presentó un coeficiente de variación del tamaño del 47 %. Su evolución comenzó con un descenso durante el invierno seguido de un incremento durante la primavera hasta el verano, cuando se registraron los tamaños mayores (máximo agosto 2012). En otoño volvió a disminuir y continuó hasta el invierno, cuando el tamaño se vuelve más estable (mínimo febrero 2012). A escala mensual, no se observaron meses con notable variabilidad de resultados. En octubre de 2012 y enero de 2013 se obtuvieron resultados atípicos (Fig. 5.9). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 3,2E-09$) así como entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0012$). El aumento anual del tamaño fue del 6 %. El análisis de regresión ofreció modelos con un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 74,6 y 82 %, correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales desde 4 días antes de tomar la fotografía. La variable que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire.

El biofilm Ne.3(2) mostró un coeficiente de variación del tamaño del 18 %. Su evolución comenzó con un descenso durante el invierno (mínimo febrero 2012), seguido de un incremento durante la primavera que perduró hasta alcanzar el tamaño mayor, durante el verano (máximo agosto 2012). A partir de octubre se observó un nuevo descenso que perduró hasta el siguiente invierno, cuando el tamaño se mantuvo casi constante. Durante el último mes de estudio, febrero de 2013, se observó un nuevo incremento del tamaño del que desconocemos su continuidad, debido a la finalización del estudio. Al igual que el biofilm Ne.3(1), no se observaron meses con notable variabilidad de tamaños y los registros atípicos correspondieron a los meses de marzo y mayo de 2012 y de enero de 2013 (Fig. 5.10). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 1,9E-12$) y también entre durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 4,2E-05$), asociado a un incremento anual del 27 %. El análisis de regresión ofreció modelos que relacionaron el tamaño del biofilm y las variables ambientales con un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 75,4 y 81,5 %, correspondiendo el mayor poder explicativo que empleó registros ambientales desde 4

días antes de tomar la fotografía. La variable más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire.

El biofilm Ne.7(1) presentó un coeficiente de variación del 8 %. Su evolución fue distinta a la observada en el resto de biofilms analizados. Comenzó con un pequeño descenso del tamaño al inicio del primer invierno (mínimo diciembre 2011) y un tamaño, aproximadamente constante después, que se mantuvo durante la primavera hasta alcanzar el verano, cuando comenzó un incremento que perduró hasta el otoño y se mantuvo durante el invierno (máximo enero 2013). En suma, este biofilm mostró un crecimiento casi constante a lo largo del estudio, con un tamaño más pequeño al principio y mayor al final. No se observaron meses con elevada variabilidad y tan sólo se determinó un resultado atípico durante mayo de 2012 (Fig. 5.11). Como era de esperar, se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 1,3E-06$) y también durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 2,9E-5$). El incremento de tamaño anual fue del 9 %. Los modelos ofrecidos presentaron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 27,6 y 46,9 %. El mayor poder explicativo correspondió al modelo que empleó registros ambientales desde 6 días antes de tomar la fotografía. Los factores ambientales más correlacionados con el tamaño del biofilm fueron la humedad relativa y la concentración de dióxido de carbono del aire (esta última de forma inversa).

El biofilm Ne.7(2) presentó un coeficiente de variación para el tamaño del 3 %. Al igual que el biofilm Ne.7.1, durante el primer invierno mostró una disminución del tamaño (mínimo febrero 2012), que continuó con un leve incremento durante la primavera, más acentuado durante el verano, el otoño y el invierno, momento en el que el biofilm mostró el mayor tamaño (máximo enero 2013). No se observaron meses con elevada variabilidad de resultados y los registros atípicos se registraron en el mes de mayo (Fig. 5.12). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,0015$) así como entre el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 7,7E-05$). El incremento anual del tamaño fue del 6 %. Los modelos ofrecidos por el análisis de regresión mostraron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 25,7 y 38,2 %. El mayor poder explicativo correspondió al modelo que empleó registros ambientales desde 6 días antes de tomar

la fotografía. La variable más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire.

El biofilm Ne.8(1) mostró un coeficiente de variación del tamaño del 4 %. Su evolución comenzó con una disminución durante el primer invierno, seguida de un aumento durante la primavera hasta alcanzar los registros más elevados, que perduraron durante el verano y el otoño. Al final del otoño, el tamaño comenzó a disminuir hasta alcanzar los registros más bajos durante el invierno siguiente (mínimo febrero 2013). A escala mensual, los meses que registraron los tamaños mayores también mostraron la mayor variabilidad. No obstante, el dato atípico se observó en febrero de 2012, que no destacó por su elevada variabilidad (Fig. 5.13). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,0079$). En cambio, estas diferencias no se determinaron entre los tamaños de los inviernos de 2012 y de 2013 ($p: 0,1363$). Los modelos de regresión ofrecidos mostraron un porcentaje de variabilidad explicada muy pequeña, comprendida entre 17,7 y 33,6 % correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales desde 4 días antes de tomar la fotografía. La variable más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la temperatura del aire.

El biofilm de la zona Ne.8(2) presentó un coeficiente de variación del tamaño del 11 %. Su evolución comenzó con un descenso durante el invierno (mínimo febrero 2012), seguido de un incremento progresivo durante la primavera hasta alcanzar los tamaños más elevados durante el verano y el otoño y un nuevo descenso en el invierno. Abril y mayo fueron los meses con mayor variabilidad de tamaño y en marzo de 2012 y enero de 2013 se obtuvieron resultados atípicos (Fig. 5.14). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y durante el verano de 2012 ($p: 2,3E-07$) así como entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0051$), asociadas a un incremento del tamaño del 4 %. El análisis de regresión ofreció modelos con un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 67,0 y 77,2 %, correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales desde 2 días antes de tomar la fotografía. La variable ambiental más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la temperatura del aire.

El biofilm de la zona Ne.9(1) presentó un coeficiente de variación del 17 %. A diferencia de la evolución de los biofilms descritos hasta el momento, el biofilm comenzó a aumentar el tamaño desde el primer invierno (mínimo febrero 2012) y durante la primavera hasta alcanzar los registros más elevados en verano y otoño, con un tamaño casi constante (máximo octubre 2012). Al inicio del segundo invierno se observó un descenso que continuó durante varios meses hasta finalizar el periodo de estudio. Los meses con mayor variabilidad fueron marzo y mayo y durante febrero de 2012 y abril se observaron valores atípicos (Fig. 5.15). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm en invierno y en verano de 2012 ($p: 4E-06$) y también entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0043$) relacionadas con un incremento del tamaño del 11 %. Los modelos propuestos para el tamaño del biofilm y su relación con las variables ambientales ofrecieron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 55,1 y 66,4. El mayor poder explicativo correspondió al modelo que empleó registros ambientales obtenidos el mismo día en el que se tomó la foto. La variable ambiental con mayor correlación con el tamaño del biofilm fue la temperatura del aire.

El biofilm Ne.9(2) mostró un coeficiente de variación del 29 %. Su evolución comenzó con un pequeño descenso, durante el primer invierno (mínimo febrero 2012), seguido de aumento durante la primavera hasta llegar al otoño, cuando mostró el mayor tamaño (máximo octubre 2012). A partir de otoño comenzó un nuevo descenso que perduró hasta el invierno, sin llegar a alcanzar el tamaño inicial. El mes con mayor variabilidad de resultados fue mayo y abril y octubre se observaron resultados atípicos (Fig. 5.16). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm en invierno y verano de 2012 ($p: 1,7E-07$) así como entre el tamaño registrado en el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0177$) relacionadas con un aumento de la superficie del biofilm del 10 %. El análisis de regresión ofreció modelos con un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 62,1 y 68,8 %, correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales obtenidos el día en el que se tomó la foto. Al igual que se observó en Ne 9(1), la variable ambiental más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la temperatura del aire.

En la zona Ne.10(1) el tamaño del biofilm presentó un coeficiente de variación del 2 %. Su evolución mostró una dinámica totalmente diferente a las observadas hasta el momento. Así, el tamaño del biofilm permaneció casi constante, con una leve disminución durante el invierno y

la primavera, hasta alcanzar el registro más bajo (mínimo junio). Durante el verano y el otoño, el tamaño aumentó progresivamente hasta alcanzar el tamaño mayor durante el segundo invierno, cuando permanece casi constante. Se observaron numerosos meses con notable variabilidad de registros, a destacar, febrero, marzo, abril y diciembre de 2012. Los meses que registraron valores atípicos fueron agosto 2012 y enero 2013 (Fig. 5.17). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,0041$) pero no se observaron estas diferencias entre el tamaño del biofilm durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,1873$). El análisis de regresión ofreció modelos con un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 40,2 y 61,0 % correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales obtenidos de hasta 5 días previos a la realización de la fotografía. Las tres variables ambientales mostraron asociación significativa con el tamaño del biofilm en grado semejante. La humedad relativa ambiental fue la variable que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm, pero con relación inversa.

El biofilm Ne.11(1) mostró un coeficiente de variación del tamaño del 8 %. Su evolución comenzó con un descenso durante el primer invierno hasta la primavera, cuando se alcanzaron los tamaños más pequeños (mínimo mayo 2012). A partir del verano aumentó el tamaño del biofilm hasta el otoño, cuando se registraron los tamaños más elevados (máximo octubre 2012). Durante el siguiente invierno se observó un nuevo descenso del tamaño del biofilm, que finalizó con un tamaño menor que al principio. La mayor variabilidad se observó en los meses de mayo y agosto y los registros atípicos en los meses de enero y marzo de 2012 (Fig. 5.18). No se observaron diferencias significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,1084$) pero si fueron determinadas entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0144$), siendo un 3 % más pequeña el área ocupada por el biofilm durante el segundo invierno. Los modelos propuestos por el análisis de regresión presentaron un porcentaje de variabilidad explicada comprendida entre 28,3 y 53,7 %. El mayor poder explicativo correspondió al modelo que empleó registros ambientales desde 4 días previos a la realización de la fotografía. La humedad relativa ambiental fue la variable que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm, pero con relación inversa.

El biofilm Ne.11(2) presentó un coeficiente de variación del tamaño del 19 %. La evolución del tamaño del biofilm no fue igual a la observada en la zona Ne. 11(1). En esta

oportunidad, se observó un incremento del tamaño al inicio del estudio y, posteriormente, en primavera, el tamaño comenzó a disminuir hasta alcanzar el valor más bajo (mínimo mayo 2012). Durante el verano se produjo un nuevo incremento que perduró hasta el otoño (máximo octubre 2012) cuando, de nuevo, comenzó a decrecer y continuó durante el invierno. Los meses con variabilidad de registros mayor fueron los de la primavera, especialmente mayo de 2012, y no se determinaron valores atípicos para esta variable en Ne. 11(2) (Fig. 5.19). No se determinaron diferencias significativas entre el tamaño del biofilm registrado durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,9377$) y tampoco entre el tamaño durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,3371$). El porcentaje de variabilidad explicada ofrecida por los modelos estuvo comprendida entre 35,4 y 52,9 %, correspondiendo el mayor poder explicativo al modelo que empleó registros ambientales obtenidos de hasta 2 días previos a la realización de la fotografía. La humedad relativa ambiental fue la variable que mostró mayor correlación con el tamaño del biofilm, pero con relación inversa.

El biofilm Ne.12(1) mostró un coeficiente de variación del tamaño del 9 %. Su tamaño fue muy similar durante el periodo de estudio, con leves incrementos y descensos durante el primer invierno. Posteriormente, en primavera y verano, se registraron los tamaños mayores (máximo junio 2012) y, desde finales de verano y hasta el invierno siguiente, se produjo un descenso del tamaño hasta alcanzar los registros más bajos (mínimo enero 2013). Se observó una notable variabilidad de resultados durante el mes de diciembre de 2012 y los registros atípicos correspondieron a los meses de marzo y agosto de 2012 y enero de 2013 (Fig. 5.20). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm registrado en el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,7820$). En cambio, estas diferencias sí fueron observadas entre el tamaño registrado en invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0041$), siendo el tamaño al final del estudio un 12 % inferior al registrado al inicio. Los modelos ofrecidos presentaron un porcentaje de variabilidad explicada muy pequeño, comprendido entre 16,6 y 21,6 %. De ellos, el mayor poder explicativo correspondió al modelo que tuvo en cuenta los registros ambientales de hasta 1 día antes de la realización de la fotografía. La variable que mostró asociación significativa con el tamaño del biofilm fue la concentración de dióxido de carbono del aire.

El biofilm Ne.12(2) mostró un coeficiente de variación del tamaño del 48 %. Su evolución fue casi lineal y, principalmente, decreciente, salvo un pequeño incremento al

principio del estudio que albergó el tamaño máximo (diciembre 2011). Posteriormente, se observó una disminución del tamaño que perduró hasta el final del periodo de estudio (mínimo febrero 2013). Los meses de diciembre de los años 2011 y 2012 mostraron la mayor variabilidad de resultados y en marzo, abril y octubre de 2012 se determinaron registros atípicos (Fig. 5.21). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante el invierno y el verano de 2012 ($p: 0,2583$). En cambio, estas diferencias sí se determinaron entre el tamaño del biofilm durante el invierno de 2012 y de 2013 ($p: 0,0122$). En este caso, la superficie ocupada por el biofilm también disminuyó un 4 %. El análisis de regresión ofreció modelos estadísticamente no significativos, con porcentaje de variabilidad explicada inferior al 10 %. No se observó correlación entre el tamaño de este biofilm y las variables ambientales monitorizadas.

5.4.2.3. Evolución del tamaño de los biofilms.

En base a la representación gráfica obtenida para la evolución del tamaño de cada uno de los biofilms, fueron identificados 4 patrones de comportamiento, denominados, respectivamente *Patrón de Evolución 1, 2, 3 y 4* (Fig. 5.22).

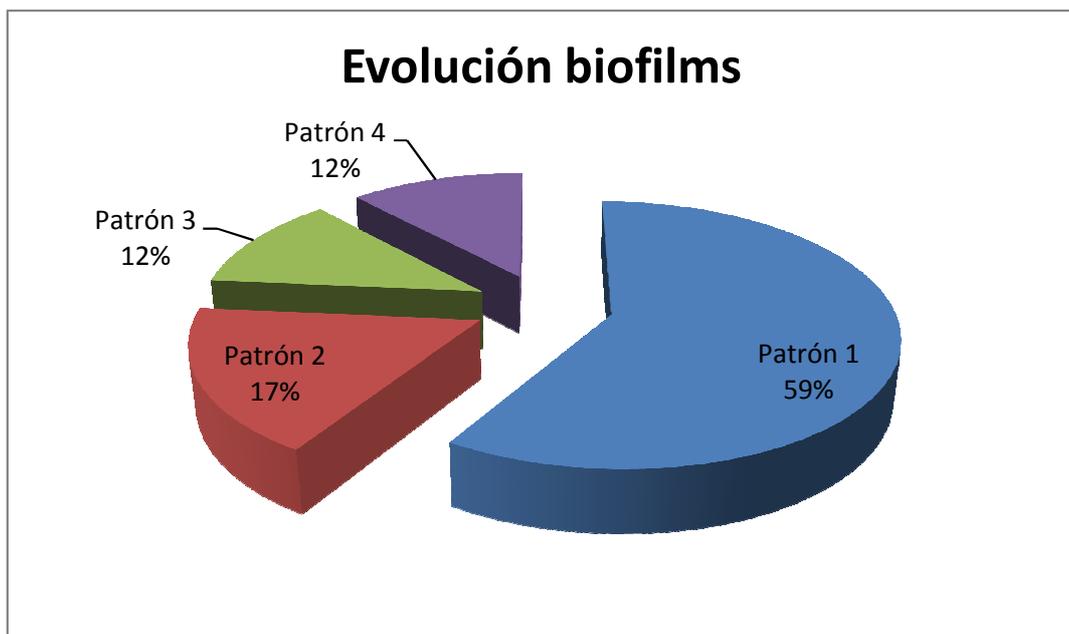


Figura 5.22. Incidencia de cada uno de los *Patrones de Evolución* de los biofilms descritos.

El 59 % de los biofilms monitorizados mostró un desarrollo según el *Patrón de evolución 1*, el 17 % según el *Patrón de evolución 2* y el 24 % restante según los *Patrones de evolución 3 y 4*, distribuido este porcentaje de forma equitativa. La descripción de los cuatro tipos de evolución observada es la siguiente:

Patrón de evolución 1: comenzó con un descenso del tamaño durante el otoño e invierno del primer año de estudio, hasta alcanzar los registros más bajos durante el invierno. Posteriormente, en primavera, se observó un incremento que perduró hasta el verano, cuando se alcanzaron los registros máximos que se mantuvieron casi constantes hasta la mitad del otoño, cuando se observó un nuevo descenso hasta alcanzar tamaños pequeños durante el invierno (Fig. 5.23). Esta evolución muestra notables semejanzas con la evolución de las variables ambientales monitorizadas, que se presentan de forma conjunta en los diagramas de cajas. Los biofilms que mostraron este patrón de evolución fueron Ne.1(1), Ne.1(2), Ne.2(1), Ne.2(2), Ne.3(1), Ne.3(2), Ne.8(1), Ne.8(2), Ne.9(1) y Ne.9(2), que equivalen a la mayoría de los biofilms monitorizados (59 %). La ubicación de estos biofilms es, en todos los casos, las salas más profundas de las Galerías Turísticas: las salas de Cascada, Fantasmas y Cataclismo.

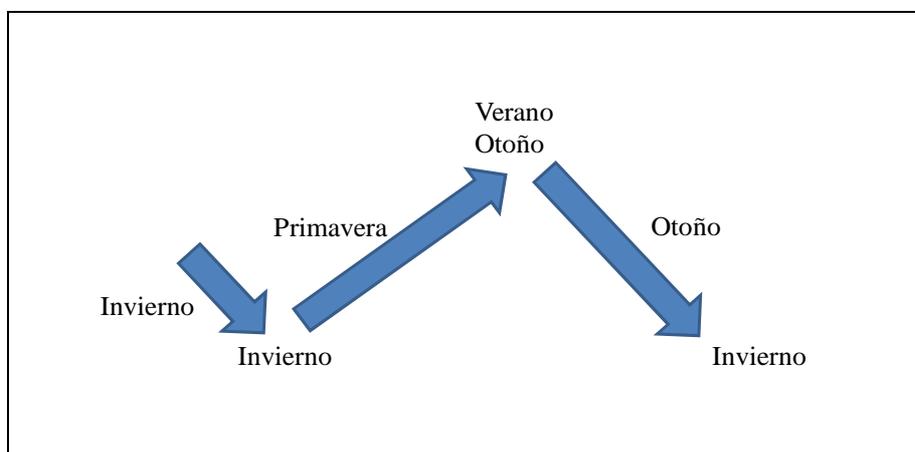


Figura 5.23. Esquema de la evolución de los biofilms según el Patrón 1.

Patrón de evolución 2: se observó un tamaño aproximadamente constante durante el invierno, seguido de una disminución durante la primavera hasta alcanzar los tamaños más pequeños durante el verano. Seguidamente, durante el otoño, se observó un nuevo incremento que continuó hasta el siguiente invierno, cuando los tamaños se mantuvieron aproximadamente constantes (Fig. 5.24). Al comparar esta evolución con la evolución de las variables ambientales

se vislumbra una relación inversa de los registros. Los biofilms que mostraron este patrón de evolución fueron Ne.10(1), Ne.11(1) y Ne.11(2), ubicados en la Sala del Belén, la más externa de las Galerías turísticas.

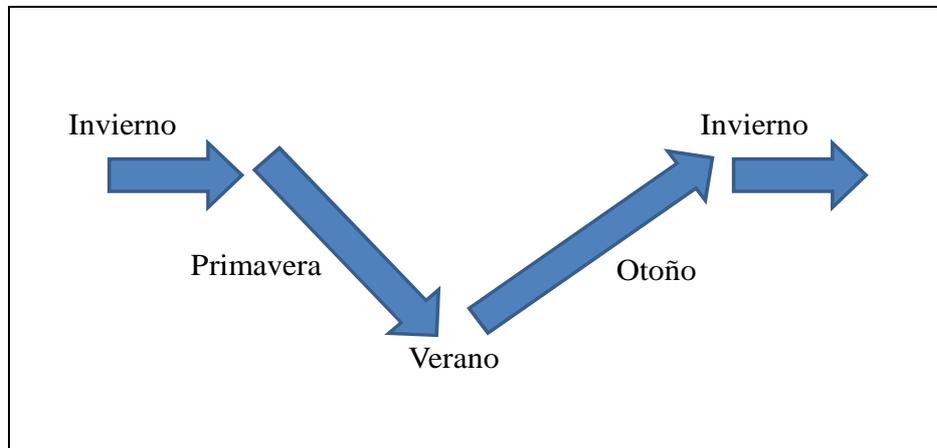


Figura 5.24. Esquema de la evolución de los biofilms según el Patrón 2.

Patrón de evolución 3: los biofilms relacionados con esta evolución mostraron crecimiento durante todo el periodo de estudio, con un tamaño más pequeño al principio del estudio (invierno del primer año) y mayor al final del mismo (invierno del segundo año) (Fig. 5.25). Este tipo de evolución no muestra relación aparente con la evolución de las variables ambientales. Este patrón de evolución se observó en los biofilms Ne.7(1) y Ne.7(2), ubicados en la Sala del Cataclismo.

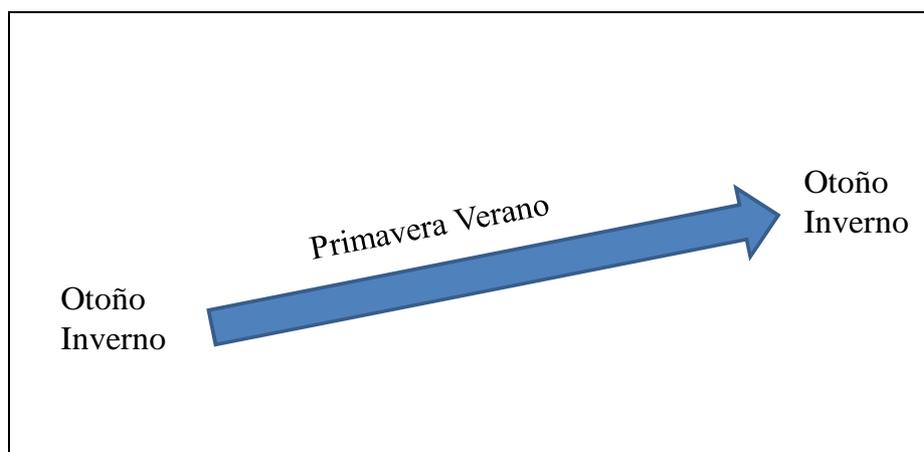


Figura 5.25. Esquema de la evolución de los biofilms según el Patrón 3.

Patrón de evolución 4: los biofilms relacionados con este patrón mostraron un decrecimiento prácticamente constante a lo largo del periodo de estudio, con un mayor tamaño al principio y menor al final (Fig. 5.26). Los biofilms que mostraron esta evolución fueron Ne.12(1) y Ne.12.(2), ubicados en la Sala del Cataclismo.

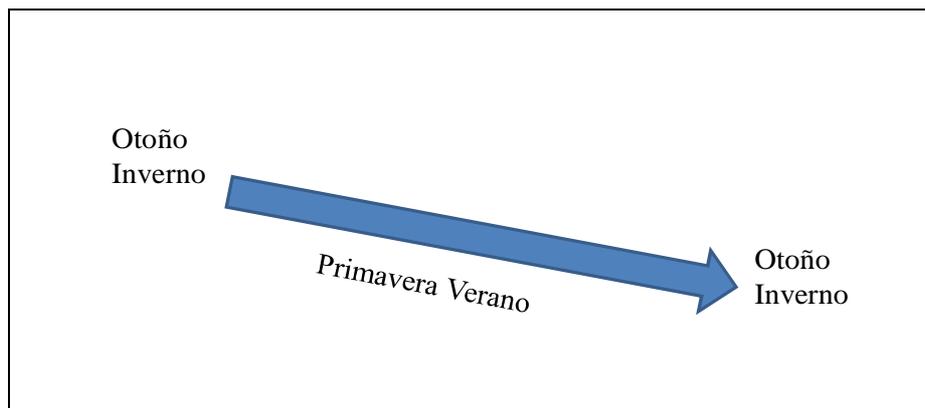


Figura 5.26. Esquema de la evolución de los biofilms según el Patrón 4.

5.4.2.4. Modelos de regresión

El análisis de regresión lineal múltiple permite explorar y cuantificar la relación estadística entre una variable, considerada dependiente y otras consideradas independientes o predictoras. En nuestro estudio, se analizó la relación entre el tamaño de los biofilms (variable *verde*) y los factores ambientales (variables de temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono del aire). La información ofrecida por el coeficiente R^2 corregida nos permite conocer el porcentaje de tamaño de los biofilms que puede ser explicado mediante las variables ambientales (Tabla 5.4).

En general, se observó que el conjunto de variables ambientales analizadas pudo explicar en torno a un 50 % del tamaño determinado en los biofilms. Los modelos que presentaron mayor poder explicativo se relacionaron con el *Patrón de evolución 1* y correspondieron a los biofilms Ne.1(1), Ne.1(2), Ne.2(1), Ne.2(2), Ne.3(1), Ne.3(2), Ne.8(2), Ne.9(1) y Ne.9(2). Destacamos el biofilm Ne.8(1), que presentó una evolución según el *Patrón 1* y ofreció modelos con una

variabilidad explicada notablemente inferior. Los modelos correspondientes a los biofilms Ne.10(1), Ne.11(1) y Ne.11.(2), que mostraron un *Patrón de evolución 2*, también mostraron buen poder explicativo, aunque inferior, en términos generales a los anteriormente citados. Los biofilms Ne.7(1) y Ne.7(2), relacionados con el *Patrón de evolución 3* y el biofilm Ne.12(1) relacionado con el *Patrón de evolución 4*, ofrecieron modelos que mostraron una variabilidad explicada muy pequeña. En el caso del biofilm Ne.12(2), los modelos obtenidos no se consideraron estadísticamente significativos por el programa de análisis.

zona	R ² corregida	zona	R ² corregida
Ne.1(1)	0,596-0,679	Ne.8(1)	0,177-0,336
Ne.1(2)	0,301-0,394	Ne.8(2)	0,670-0,772,
Ne.2(1)	0,472-0,618	Ne.9(1)	0,551-0,664
Ne.2(2)	0,478-0,546	Ne.9(2)	0,621-0,688
Ne.3(1)	0,746-0,82	Ne.10(1)	0,402-0,610
Ne.3(2)	0,754-0,815	Ne.11(1)	0,283-0,537
Ne.7(1)	0,276-0,469	Ne.11(2)	0,354-0,529
Ne.7(2)	0,257-0,382	Ne.12(1)	0,166-0,216

Tabla 5.4. Rango de coeficientes de R² corregida relacionados con los diferentes modelos de regresión de la variable *verde* en cada una de las zonas de estudio. Ne.12.2 ofreció modelos no significativos.

En relación con el periodo de antelación a la realización de las fotografías considerado para el registro de las variables ambientales, los resultados obtenidos no mostraron diferencias notables entre la variabilidad explicada de los modelos en relación con el número de días de antelación a la toma de fotografías (desde 0 hasta 6) que había sido considerado por el análisis estadístico.

5.4.2.5. Correlación con los factores ambientales

A pesar de que el análisis de regresión estadística consideró el conjunto de las variables ambientales en la descripción de la relación con el tamaño de los biofilms, este análisis de regresión también ofreció información sobre los coeficientes no estandarizados (B), que definen la ecuación de regresión en puntuaciones directas, así como los coeficientes estandarizados (β),

que definen la ecuación de regresión en puntuaciones típicas. Estos coeficientes estandarizados permitieron valorar la importancia relativa (peso) de cada variable independiente dentro de la ecuación (Anexo 2).

Así, la humedad relativa del aire fue la variable que mostró mayor peso sobre la variable *verde*, es decir, sobre el tamaño de los biofilms. En concreto, el 71 % de los biofilms presentaron una mayor dependencia de su tamaño con la humedad relativa del aire, a excepción de Ne.8(1), Ne.8(2), Ne.9(1) y Ne.9(2) que mostraron mayor relación de su tamaño con la temperatura del aire, y del biofilm Ne.12(1) cuyo tamaño presentó mayor correlación con la concentración de dióxido de carbono del aire. En el caso de los biofilms Ne.10(1), Ne.11(1) y Ne.11(2) se observó una relación inversa entre la humedad relativa del aire y el tamaño de los biofilms, que registraron los mayores tamaños durante el invierno.

5.4.2.6. Variabilidad del tamaño de los biofilms

En general, el coeficiente de variación de la variable *verde* osciló entre un 48 y un 2 %. Teniendo en cuenta que el grado de error estimado para esta variable fue del 1 %, todos los biofilms que formaron parte de este trabajo registraron cambios de tamaño a lo largo del periodo de estudio. Los biofilms con mayor y menor coeficiente de variación fueron Ne.12(2) y Ne.10(1) respectivamente, ambos muy próximas entre sí. El coeficiente de variación obtenido para el resto de biofilms fue menor del 10 % a excepción del biofilm Ne.3(1) cuyo coeficiente de variación fue del 47 %. En relación con la variabilidad de tamaños registrados para cada biofilm durante un mismo mes, fueron los meses de primavera los de mayor variabilidad.

5.4.2.7. Análisis de los cambios de tamaño de los biofilms

Para evaluar los cambios de tamaño dentro de un mismo año así como a lo largo de éste, se realizó la prueba estadística *t de Student*, que comparó las medias de los registros de la variable *verde* durante diferentes periodos de tiempo. En primer lugar, se compararon los tamaños de cada biofilm durante el verano y el invierno de un mismo año y, en segundo lugar,



los tamaños durante dos inviernos consecutivos. En todos los casos se comparó el mismo número de muestras. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.5.

Zona	<i>p</i> (invierno-verano)	Cambio	<i>p</i> (invierno-invierno)	Cambio	% cambio (invierno-invierno)
Ne.1.1	3,2E-08	aumenta	1,32 E-5	aumenta	6
Ne.1.2	5,6E-05	aumenta	0,0230	aumenta	3
Ne.2.1	0,0006	aumenta	0,0167	disminuye	-3
Ne.2.2	0,0004	aumenta	0,1344	no cambia	1
Ne.3.1	3,2E-09	aumenta	0,0012	aumenta	6
Ne.3.2	1,9E-12	aumenta	4,2 E-5	aumenta	27
Ne.7.1	1,3E-06	aumenta	2,9 E-5	aumenta	9
Ne.7.2	0,0015	aumenta	7,7 E-5	aumenta	6
Ne.8.1	0,0079	aumenta	0,1363	no cambia	0
Ne.8.2	2,3E-07	aumenta	0,0051	aumenta	4
Ne.9.1	4E-06	aumenta	0,0043	aumenta	11
Ne.9.2	1,7E-07	aumenta	0,0177	aumenta	10
Ne.10.1	0,0041	disminuye	0,1873	no cambia	1
Ne.11.1	0,1084	no cambia	0,0144	disminuye	-3
Ne.11.2	0,9377	no cambia	0,3371	no cambia	-1
Ne.12.1	0,7820	no cambia	0,0041	disminuye	-12
Ne.12.2	0,2583	no cambia	0,0122	disminuye	-4

Tabla 5.5. Análisis de varianza de la variable *verde*. Se ofrece el estadístico de significación *p* (invierno-verano de un mismo año) y *p* (invierno-invierno de años sucesivos). La tabla también informa del tipo de cambio y el % de crecimiento o decrecimiento del tamaño.

El análisis de la varianza de la media del tamaño de los biofilms indicó que Ne.1(1), Ne.1(2), Ne.2(1), Ne.2(2), Ne.3(1), Ne.3(2), Ne.7(1), Ne.7(2), Ne.8(1), Ne.8(2), Ne.9(1) y Ne.9(2) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sus tamaños durante el invierno y el verano, relacionadas con un crecimiento. El biofilm Ne.10(1) también mostró diferencias estadísticamente significativas durante este periodo pero relacionadas con una reducción del tamaño. Los biofilms Ne.11(1), Ne.11(2), Ne.12(1) y Ne.12(2) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sus tamaños para este mismo periodo de tiempo.

El análisis comparativo de los tamaños durante dos inviernos consecutivos determinó que todos los biofilms que habían aumentado su tamaño durante el invierno y el verano, también mostraron crecimiento a lo largo de un año, a excepción de los biofilms Ne.2(2) y Ne.8(1) que no mostraron cambios estadísticamente significativos anuales y del biofilm Ne.2(1) cuya evolución anual indicó una disminución del tamaño. En el caso del biofilm Ne.10(1) no se observaron diferencias significativas de tamaño a lo largo del año. Los biofilms Ne.11(1), Ne.12(1) y Ne.12(2) que no habían mostrado diferencias significativas entre su tamaño durante el invierno y el verano, sí las mostraron a lo largo de un año, relacionadas con una reducción del mismo. Finalmente, el tamaño del biofilm Ne.11(2) no mostró cambios significativos en ambos casos de análisis. Dado que se analizó el mismo número de muestras en cada caso, las diferencias observadas en el estadístico p estuvieron motivadas por la variabilidad de registros. Así, un valor muy pequeño de p se relacionó con un conjunto de registros más homogéneos y viceversa.

Para valorar, cuantitativamente, el cambio de tamaño de los biofilms se empleó la escala anual. En este sentido, el biofilm Ne.3(2) fue el que registró mayor aumento de tamaño (27%), mientras que Ne.3(1), desarrollado en el mismo espeleotema, aumentó un 6%. Los siguientes biofilms que mostraron mayor crecimiento fueron, por orden decreciente, Ne.9(1) y Ne.9(2) que aumentaron un 11 y 10 % respectivamente, y Ne.7(1) y Ne.7(2), que aumentaron un 9 y 6 %, respectivamente. El biofilm Ne.1(1) también aumentó un 6 % pero su pareja, Ne.1(2), mostró el porcentaje de crecimiento más bajo, del 3 %. Otra pareja que no cambió de tamaño de forma semejante fue la formada por Ne.8(2) y Ne.8(1). Así, Ne.8(2) creció un 4 %, mientras Ne.8(1) no cambió de tamaño, desde un punto de vista estadístico.

En relación con la reducción del tamaño a lo largo de un año, el biofilm que mostró un cambio más acentuado fue Ne.12(1), con una reducción del 12 %. Otras disminuciones de tamaño significativas se observaron en los biofilms Ne.2(1), Ne.11(1) y Ne.11(2), con cambios del 3, 3 y 4 %, respectivamente.

Tal y como se indica en el apartado 5.3.4. *Procesado digital de imágenes. Cálculo de la variable verde* los biofilms que mostraron cambios de tamaño del 1% o inferiores no se consideraron estadísticamente significativos.

5.4.3. Zonas de experimentación

Los trabajos desarrollados para determinar la colonización primaria de sustratos por organismos fotosintéticos se realizaron en superficies de espeleotemas que se encontraban, originalmente, en oscuridad. Tras ser examinados visualmente, se comprobó que los sustratos seleccionados no presentaban colonización por organismos fotosintéticos. La inspección del entorno descartó la presencia de antiguas lámparas en la zona que pudieran haber iluminado las superficies seleccionadas.

La descripción de las zonas seleccionadas, denominadas: Ne.5, Ne.6, Ne.13 y Ne.14, se describen en el apartado 4.4. *Descripción de las zonas de control* de la presente memoria. La iluminación de cada una de las zonas se describe en el apartado 5.3.2. *Iluminación de las zonas de experimentación*.

Al igual que las zonas que mostraban biofilms fotosintéticos, estas zonas fueron fotografiadas periódicamente, obteniéndose las correspondientes series de imágenes, formadas por 44 y 47 imágenes para las zonas Ne.5 y Ne.6, respectivamente y por 37 imágenes para las zonas Ne.13 y Ne.14. El análisis digital de las imágenes que permitió la cuantificación de la variable *verde* se realizó mediante la misma metodología empleada en las imágenes que mostraban colonización y descrita en el apartado 5.4.3. *Procesado digital de imágenes. Cálculo de la variable verde*. Del mismo modo no se consideraron cambios de la variable *verde* inferiores al 1 %.

Las zonas Ne.5(1) y Ne.5(2) fueron iluminados durante 22 meses con una radiación fotosintética activa (PAR) de $11,12 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, las zonas Ne.6(1) y Ne.6(2) fueron iluminados durante 22 meses con una radiación fotosintética activa (PAR) de $3,96 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, los biofilms Ne.13(1) y Ne.13(2) fueron iluminados durante 11 meses con una radiación fotosintética activa (PAR) media fue de $4,96 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y las zonas Ne.14(1) y Ne.14(2) fueron iluminados durante 11 meses con una radiación fotosintética activa (PAR) de $1,66 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Tabla 5.6).

En relación con los datos ambientales de temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono del aire, los biofilms de las zonas Ne.5 y Ne.6 se relacionaron con los datos obtenidos en el sensor ubicado en la Sala del Cataclismo y los biofilms de las zonas Ne.13

y Ne.14 se relacionaron con los datos registrado por el sensor instalado en la Sala del Belén. Esta relación estuvo basada en criterios de proximidad.

Zonas	PAR ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
Ne.5	11,12
Ne.6	3,96
Ne.13	4,96
Ne.14	1,66

Tabla 5.6. Datos de radiación fotosintética activa (PAR) medida en la parte central de cada zona indicada.

En todas las zonas de experimentación, excepto en la pareja de Ne.13, el análisis digital de las imágenes determinó la ausencia de *verde*. Este resultado se interpretó como ausencia de colonización fotosintética observable en estas zonas. En la zona Ne.13(1) la cuantificación de la variable *verde* ofreció resultados que indicaron la presencia de microorganismos fotosintéticos en el sustrato. Durante el periodo de estudio, esta variable mostró un coeficiente de variación del 60 % con incrementos y descensos del porcentaje de *verde* de periodicidad bimensual/trimestral. Su evolución comenzó con un aumento del tamaño (primavera) que correspondió a un aumento de la variable *verde* de un 5 % aproximadamente. A partir del mes de junio se observó un descenso del tamaño que perduró hasta el mes de septiembre, cuando la variable *verde* registró valores próximos a 0. En el periodo final del estudio, desde octubre hasta diciembre, el biofilm mostró un nuevo aumento de tamaño y, posteriormente permaneció casi constante, hasta el mes de febrero, cuando finalizó el periodo de estudio. El mes que mostró mayor variabilidad de registros fue enero. Durante los meses de mayo y octubre se obtuvieron registros atípicos (Fig. 5.27). La duración del estudio de esta zona fue inferior a un año y no permitió llevar a cabo un análisis de la varianza del tamaño semejante al realizado a los otros biofilms fotosintéticos que forman parte de este estudio, que comparó su tamaño durante el invierno y verano así como durante dos inviernos consecutivos. Por ello, el análisis comparativo de los tamaños se realizó con los datos registrados durante el verano de 2012 y el invierno de 2013. El resultado no mostró diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño del biofilm durante ambas estaciones ($p: 0,1143$). El análisis de regresión sólo ofreció modelos significativos cuando se consideraron los datos ambientales desde 5 y 6 días previos a la realización de la fotografía, pero con porcentaje de variabilidad explicada muy pequeño, de 14,2 y 14,3 %, respectivamente. La

variable ambiental más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la humedad relativa del aire e inversamente, la concentración de dióxido de carbono.

El análisis de la variable *verde* en la zona Ne.13(2) mostró un coeficiente de variación del 100 %. La evolución del tamaño de este biofilm fue sincrónica a la descrita para el biofilm Ne.13(1), con un incremento de tamaño inicial hasta junio, seguido de un descenso hasta septiembre. En octubre se observó un nuevo aumento del tamaño del biofilm hasta el mes de diciembre. El mes con mayor variabilidad de registros fue enero y, durante mayo y en octubre se obtuvieron registros atípicos (Fig. 5.28). El análisis comparativo de los tamaños durante el verano de 2012 y el invierno de 2013 no determinó diferencias estadísticamente significativas ($p: 0,0322$). Los modelos de regresión propuestos no se consideraron estadísticamente significativos y mostraron un porcentaje de explicación inferior al 10 %.

Aunque las imágenes de la zona Ne.14 no indicaron la presencia de organismos fotosintéticos en el sustrato, sí se observó su presencia en el suelo (sedimento) en el que se ubicó la lámpara.

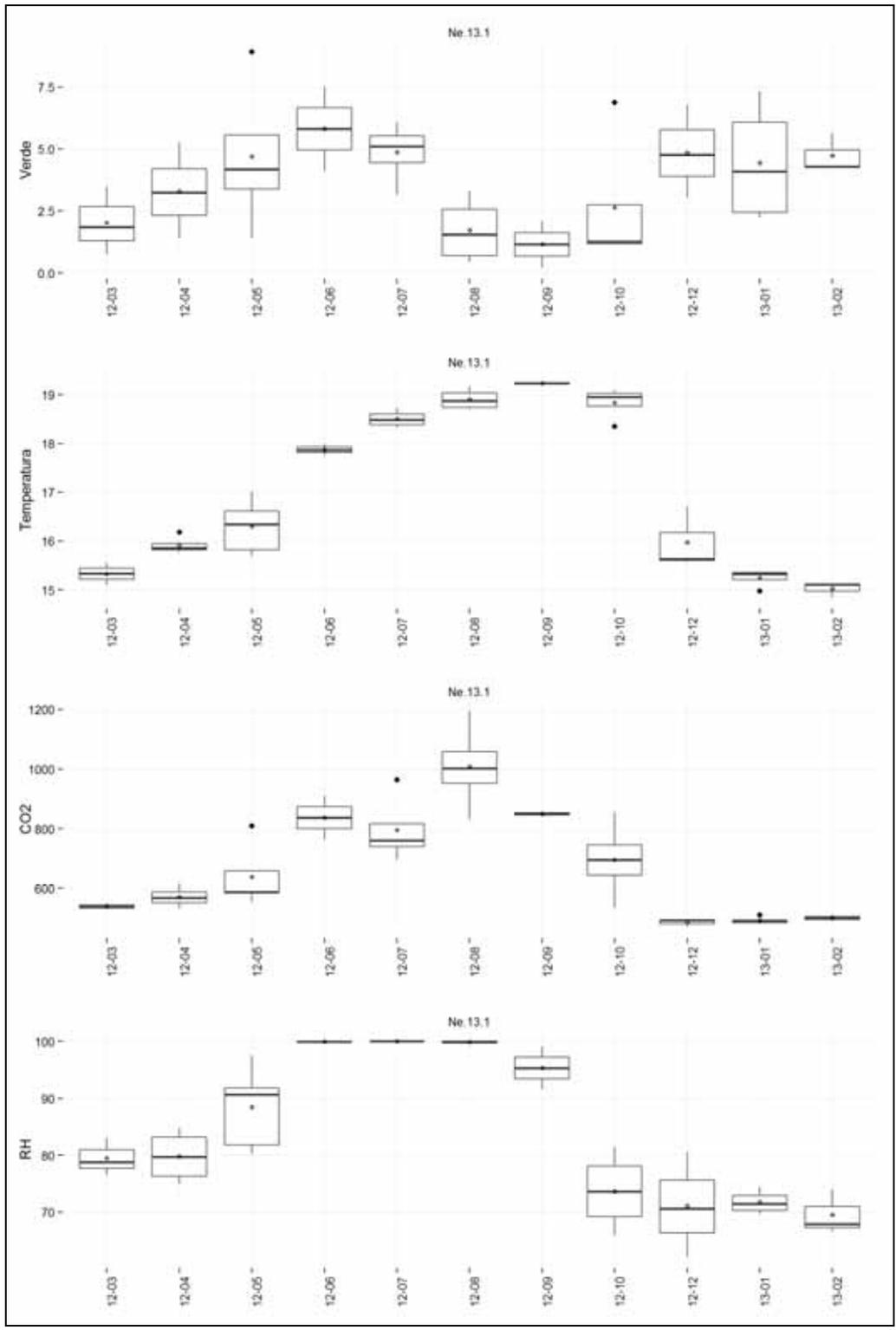


Figura 5.27. Gráficos de evolución de las variables verde, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.13(1).

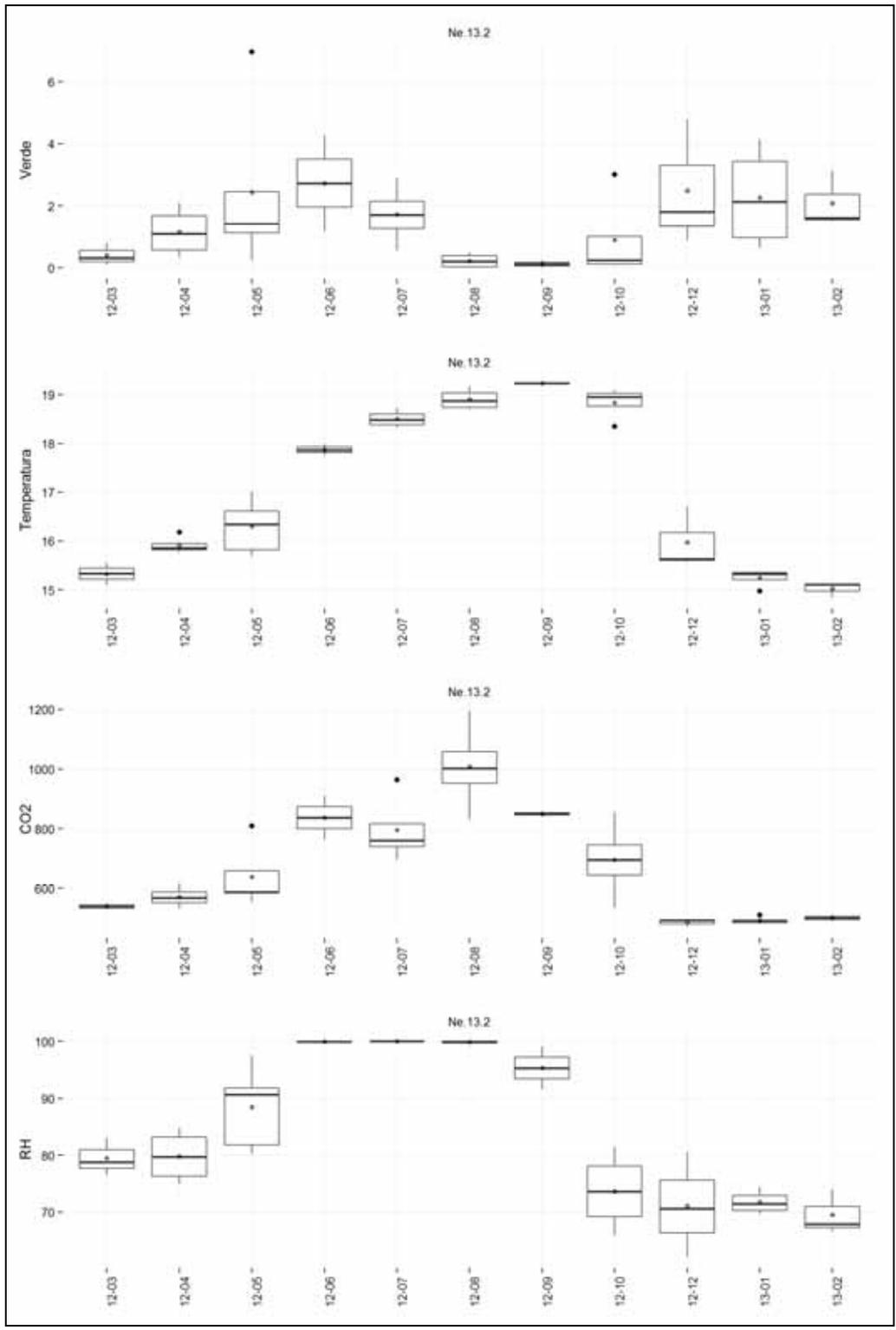


Figura 5.28. Gráficos de evolución de las variables verde, T, CO₂ y RH correspondientes al biofilm Ne.13(2).

5.5. Discusión

Los microorganismos fotosintéticos aerofíticos (fundamentalmente cianobacterias y algas) son importantes componentes de biofilms fotosintéticos en cuevas (Roldán y Hernández-Mariné, 2009), siempre que se den las condiciones ambientales y nutricionales favorables. Además de estas variables, el proceso de colonización también depende, por un lado, de la receptividad del sustrato que favorecerá o perjudicará su colonización por microorganismos (Gullitte, 1995) y, por otro lado, de la capacidad de colonización de estos organismos, directamente sobre el sustrato o sobre otros organismos que lo hayan colonizado previamente (Miller et al., 2009).

Limitar e incluso evitar el desarrollo de estos organismos precisa controlar y poner en práctica una serie de premisas durante los trabajos habituales de mantenimiento (Ashurst y Ashurst, 1988) así como durante la iluminación de las superficies. En este sentido, los trabajos que determinan la eficacia de estas actuaciones son cada vez más numerosos (Fratini et al., 2006; Doehne y Pinchin, 2008; Cuzman et al., 2014).

En este capítulo se ha analizado la evolución de biofilms fotosintéticos que colonizan espeleotemas del interior de la Cueva de Nerja. Para ello se han empleado series de imágenes digitales de los biofilms, datos ambientales y bibliografía.

La monitorización de las variables ambientales de temperatura, humedad relativa y la concentración de dióxido de carbono del aire permitió conocer su evolución durante el periodo de estudio. Los resultados mostraron evoluciones similares para las tres variables, que presentaron un pequeño rango de variación. El valor medio de humedad relativa y de temperatura del aire en la mayoría de cuevas investigadas de centro Europa es de 85-95 % y 5-8 °C, respectivamente (Czerwik-Marcinkowska y Mrozińska, 2011). En la Cueva de Nerja, el valor medio anual de la humedad relativa del aire se encuentra en sintonía con estos resultados pero la temperatura media anual es mayor, con un valor aproximado de 19 °C. En nuestro estudio se observó que ambas variables ambientales, junto con la concentración de dióxido de carbono del aire mostraban una dinámica anual semejante, condicionada, principalmente, por la afluencia de visitantes a la cueva y el patrón de ventilación natural de la cavidad (Liñán y del Rosal, 2014).

Por salas, el valor medio de estas variables ambientales mostró un gradiente que aumentaba hacia las salas más profundas de la cueva (ocasionalmente distorsionado), donde las oscilaciones fueron menores, probablemente, debido a una menor influencia del medio exterior.

El análisis de fotografías realizadas periódicamente a las zonas de control ha permitido reconocer cambios despreciables mediante un análisis visual humano (Kuhn et al., 2007). La utilización de técnicas de fotomonitorización en nuestro estudio dotó de una dimensión cuantitativa el crecimiento de los biofilms fotosintéticos durante un periodo de tiempo. Los resultados indicaron que, en general, los biofilms que colonizan el mismo espeleotema o espeleotemas muy próximos mostraron un desarrollo sincrónico. La evolución sincrónica de los biofilms, relacionada con los cambios en el ambiente, también ha sido descrita por Doehne y Pinchin (2008) durante su estudio del biodeterioro de las paredes del Monasterio de Howden (Inglaterra).

El estudio de la evolución de los diferentes biofilms fotosintéticos permitió la descripción de cuatro patrones de evolución. De ellos, el más común fue el *Patrón de evolución 1*, que se caracterizó por un mayor tamaño del biofilm durante el verano y menor durante el invierno. Este patrón fue observado en todos los biofilms localizados en las salas más profundas de la cueva, a excepción de los biofilms de las zonas Ne.7 y Ne.12. Los biofilms que mostraron el *Patrón de evolución 1* se desarrollaron sobre espeleotemas con textura aparentemente porosa y sin disponibilidad de agua líquida visible. Este *Patrón de evolución 1*, fue el que mostró mayor correlación con el microclima de la cueva. Así, el análisis de regresión determinó que, hasta un 80% de los tamaños de los biofilms que mostraron este patrón, podía ser explicado por el conjunto de variables ambientales: temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono del aire. Esta relación de dependencia de los biofilms y las variables ambientales también fue determinada por Cuzman et al., (2014) durante su investigación en las catacumbas Santi Marco, Marcelliano y Damaso (Italia).

En relación con la correlación observada entre el tamaño de los biofilms y cada una de las variables ambientales de forma individual, todos los biofilms que se relacionaron con el *Patrón de evolución 1* mostraron mayor correlación con la humedad relativa del aire, a excepción de Ne.2(1) y Ne.2(2) que mostraron mayor correlación con la concentración del dióxido de carbono

del aire y los biofilms de las zonas Ne.8 y Ne.9, que mostraron mayor correlación con la temperatura del aire. Dado que ambos biofilms se relacionan con los registros ambientales obtenidos por el mismo sensor y en base a las notables diferencias observadas entre los registros de humedad relativa de esta la sala obtenidos durante nuestro estudio y la información bibliográfica disponible (Carrasco et al., 1999, 2000, 2002) planteamos la posibilidad de que los datos de humedad relativa registrados por el sensor de la Sala de la Cascada respondan a un fallo de su funcionamiento debido, probablemente, a la condensación de agua sobre la sonda.

La influencia determinada de la humedad relativa del aire en el tamaño de los biofilms podría estar relacionada con la capacidad de los organismos fotosintéticos de obtener agua del aire o con fenómenos de condensación de agua sobre la superficie de los espeleotemas. Estos eventos de condensación de agua, observados en períodos de elevada humedad relativa ambiental en diversas zonas de la Sala del Cataclismo (IICN, 2014), permitirían a los microorganismos fotosintéticos disponer de agua líquida y favorecerían su reproducción. Esta relación de la evolución de los biofilms fotosintéticos con la presencia de agua líquida también fue observada en biofilms que colonizaban monumentos en Méjico, donde la sequía representaba un factor de estrés para los organismos que precisaban de estrategias de adaptación para su supervivencia (Ramírez et al., 2011).

El *Patrón de evolución 2*, se relacionó con biofilms de las zonas Ne.10 y Ne.11, cuyo tamaño fue mayor en invierno y menor en el verano y se ubicaron en la Sala del Belén, la más externa de la cueva. El análisis estadístico ofreció modelos que relacionaron el tamaño de los biofilms y las variables ambientales con un porcentaje de variabilidad explicada entre el 50 y 60 %. La variable más correlacionada con el tamaño de los biofilms fue, de nuevo, la humedad relativa del aire pero en relación inversa. Esta relación inversa entre la humedad relativa del aire y el tamaño del biofilm resulta una incongruencia en base a la información disponible sobre los requerimientos nutricionales y ambientales de los organismos fotosintéticos aerofíticos (Häubner et al., 2006; Gladis y Schumann, 2011). No obstante, podría estar relacionada con la presencia estacional de agua líquida en los sustratos donde se desarrollan los biofilms con *Patrón de evolución 2*, ubicados en la Sala del Belén. Esta sala presenta un reducido grosor del techo por lo que la filtración del agua de lluvia es muy rápida. Estos episodios de lluvia, que aportan agua

líquida al sustrato, son más abundantes durante el invierno, cuando la humedad relativa del aire es menor y viceversa y podrían justificar el resultado de los modelos de regresión.

El *Patrón de evolución 3* se observó en la pareja de biofilms de la zona Ne.7, en la Sala del Cataclismo y se caracterizó por un crecimiento, prácticamente constante, durante todo el periodo de estudio. Los modelos de regresión obtenidos indicaron que el conjunto de variables ambientales monitorizadas podría explicar, como máximo, un 45 % del tamaño de los biofilms. Este resultado indica que la presencia de otros factores que influyen en el tamaño de los biofilms en mayor grado que las variables ambientales. Los biofilms que presentaron esta evolución mostraron mayor correlación con la humedad relativa del aire.

El *Patrón de evolución 4* se observó en la pareja de biofilms de la zona Ne.12, ubicados en la Sala del Cataclismo, que mostró una reducción del tamaño a lo largo del periodo de estudio. En este caso, los biofilms mostraban diferencias morfológicas notables. El biofilm Ne.12(1), de aspecto gelatinoso, se desarrollaba sobre una columna de aparente escasa porosidad y con agua líquida. Los modelos obtenidos para este biofilm indicaron una baja relación estadística entre su tamaño y las variables ambientales monitorizadas, con un coeficiente de variabilidad explicada comprendido entre el 10-20 %. En este caso, se plantea la influencia de otras variables en el tamaño del biofilm, no consideradas en el modelo. En este caso, la variable más correlacionada con el tamaño del biofilm fue la concentración de dióxido de carbono en el aire. Estos datos se encuentran en sintonía con los resultados obtenidos durante el estudio del rendimiento fotosintético de este biofilm, que determinaron una mayor respuesta al CO₂ en términos de Producción (ETR) frente a los biofilms de la zona Ne.8 (que mostraron *Patrón de evolución 1*) (López-Figueroa et al., 2014). El biofilm Ne.12(2), de textura pulverulenta, se desarrolló sobre una columna anexa, de aspecto poroso y sin evidencia de agua líquida durante el periodo de estudio. El análisis de regresión para este biofilm no ofreció modelos estadísticamente significativos que relacionaran su evolución con las variables ambientales.

La evolución sincrónica de los biofilms de la zona Ne.12 planteó la existencia de un factor común que condicionara su desarrollo, no considerado por los modelos estadísticos. En este caso, la presencia de agua líquida podría ser el factor más relacionado con el tamaño de ambos biofilms pero tan sólo se observó en el sustrato del biofilm Ne.12(1) así como en algunos

gours del entorno, en este caso de forma estacional. No obstante, la proximidad de ambas zonas con el sustrato colonizado por Ne.12(2) podría permitir la llegada de agua líquida mediante procesos de difusión. Por otro lado, la bibliografía disponible sobre la Cueva de Nerja informó que el suelo del entorno de la zona Ne.12, formado por sedimento, acumulaba abundantes monedas, arrojadas por los visitantes, con anterioridad al comienzo de nuestro estudio. La presencia de estas monedas en el suelo podría favorecer la impermeabilización parcial del suelo de los gours y permitiría la presencia de agua acumulada durante mayor periodo de tiempo. La limpieza de monedas esta zona favorece la filtración de agua en el sedimento, limita su disponibilidad y podría estar relacionada con la disminución progresiva de tamaño observada en los biofilms Ne.12(1) y Ne.12(2).

En relación con el periodo de antelación de los registros ambientales a la toma de las fotografías no observaron cambios sustanciales entre los modelos obtenidos con los datos ambientales del mismo día de la fotografía y los que emplearon datos ambientales registrados desde 1 a 6 días antes de ésta (Anexo 2). En este sentido, parece que las condiciones ambientales a lo largo de todo el periodo de estudio estuvieron más relacionadas con el crecimiento de los biofilms que las de un periodo limitado de tiempo, en nuestro caso, de hasta 6 días previos a la obtención de las imágenes. Por tanto, la intensidad y la duración de los periodos húmedos y secos parecen ser más determinantes en el crecimiento de los biofilms fotosintéticos que los periodos de tiempo considerados, de hasta 6 días, en nuestro análisis estadístico.

La humedad relativa del aire fue la variable que mayor correlación mostró con el tamaño del biofilm en la mayoría de los casos de estudio que también mostraron una baja correlación con la temperatura y la concentración de dióxido de carbono del aire que parecen no ser limitantes para el desarrollo de estos biofilms en la Cueva de Nerja. Estos datos se encuentran en sintonía con numerosos estudios que identificado a la disponibilidad de agua como el factor ambiental más importante para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos aeroterrestres (Haubner et al., 2006; Gladis y Schumann, 2011). No obstante, algunos organismos fotosintéticos no dependen de la disponibilidad de agua líquida en el medio porque son capaces utilizar el vapor de agua (Nienow, 1996; Gustavs et al., 2011), probablemente mediante el empleo de la parte hidrofóbica de su pared celular o mediante osmolitos (Nienow, 1996 y sus referencias). Por otro lado, las cianobacterias son capaces de sobrevivir durante períodos de

sequía mediante adaptaciones fisiológicas, protección frente a la pérdida de agua con paredes celulares gruesas, presencia de una matriz de EPS y un morfotipo simple y mediante la formación de agregados en su interior (Gorbushina, 2007; Ramirez et al. 2011). Las algas verdes aeroterrestres también pueden paliar el estrés osmótico de la desecación mediante la biosíntesis y acumulación de osmolitos orgánicos, tales como polioles (Gustavs et al., 2011). En ambos casos, los microorganismos tienen la capacidad de recuperar rápidamente su eficiencia fotosintética en condiciones de humedad favorables (Haübner et al., 2006).

Predecir el desarrollo de biofilms fotosintéticos en el interior de la Cueva de Nerja no es tarea fácil, los modelos de regresión determinaron que el conjunto de variables ambientales monitorizadas podía explicar un porcentaje del tamaño de los biofilms fotosintéticos y, para explicar el resto, se debían tener en cuenta otros factores. Por ello, otras variables ambientales como la radiación fotosintética activa (PAR), la presencia de nutrientes o los criterios de selección de las zonas de control (descritos en el apartado 4.3. *Criterios de selección de las zonas de control* de la presente memoria), también se tuvieron en cuenta durante el análisis de la evolución de estos biofilms.

En relación con la cercanía del biofilm al recorrido turístico, no observó relación entre ésta y el desarrollo de los biofilms. Así, biofilms que se encontraban a distancias equivalentes del recorrido turístico, mostraron crecimientos muy diferentes (por ejemplo, Ne.7 y Ne.8) y biofilms desarrollados a diferente distancia del recorrido, mostraron crecimiento semejante (Ne.2 y Ne.11).

En base a la tasa de radiación fotosintética activa (PAR) recibida por cada biofilm, algunos biofilms fotosintéticos de ambientes con escasa iluminación pueden sobrevivir y reproducirse incluso con intensidad de luz inferior al punto de compensación de la fotosíntesis (Mulec, 2005), esto es, el estado en el cual se equilibran el CO₂ absorbido con el desprendido, sin ganancia ni pérdida de peso seco y con un valor de fotosíntesis neta igual a cero. Las cianobacterias y diatomeas tienen un punto de compensación de la fotosíntesis comprendido entre 5 y 6 μmol de fotones $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, mientras que el equivalente para las algas verdes es del orden de 21 μmol de fotones $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Hill, 1996). No obstante, en cuevas turísticas de Eslovenia, se determinó crecimiento de algas con intensidad de iluminación del orden de 0,33 μmol de fotones

$\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Mulec, 2005) y Martincic et al. (1981) identificó algas en cuevas que sobrevivían con un rango de intensidad lumínica comprendido entre 0,5 y 1 μmol de fotones $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Por tanto, en cuevas, la capacidad de heterotrofia debe jugar un importante papel, similar al determinado en algas plantónicas y bentónicas (Tuchman, 1996). En relación con el tipo de iluminación de las cuevas, Byoung-Woo (2002) recomendó instalar las lámparas de iluminación a una distancia de los espeleotemas de, al menos, dos metros. En nuestro estudio, la intensidad de iluminación (PAR) determinada en las zonas de control se encuentra por debajo del punto de compensación de las algas y, en la mayoría de los casos, también por debajo del punto de compensación de las cianobacterias y diatomeas. En cuanto a la relación de la variable PAR con el crecimiento de los biofilms, el valor más bajo de PAR se correspondió con una pequeña tasa de crecimiento, observada en la pareja de biofilms de la zona Ne.2. Sin embargo, los valores más elevados de PAR, determinados en las zonas Ne.12 y Ne.10, no se correspondieron con un aumento de tamaño que, por el contrario, permaneció aproximadamente constante e incluso disminuyó durante nuestro estudio. Durante la interpretación de los resultados, se tuvo en cuenta que el valor PAR adjudicado a cada uno de los biofilms se obtuvo en la parte central de las zonas de control (de los biofilms) y no se corresponde, necesariamente, con el valor PAR en el perímetro del biofilm, zona por donde se determinó el cambio de tamaño. Esta discrepancia de intensidad aumenta a medida que aumenta la superficie del biofilm y por tanto, no consideramos fiable establecer una relación entre el factor PAR de nuestro estudio y el crecimiento de los biofilms. Por otro lado, los datos obtenidos ofrecen información útil sobre la iluminación y el desarrollo de organismos fotosintéticos en los espeleotemas de la Cueva de Nerja.

En base al tipo de iluminación, se observó que los biofilms iluminados con una lámpara de halogenuro metálico, Ne.9(1) y Ne.9(2), mostraron un notable crecimiento anual, con un valor del 10 y 11 %, muy superior al que mostraron biofilms con PAR semejante e iluminados con lámparas fluorescentes de ahorro energético.

Otro factor que podría estar relacionado con el desarrollo de los biofilms fotosintéticos es la presencia de murcielaguina en el sustrato. En este sentido, el biofilm Ne.3(2) mostró el mayor crecimiento anual, que alcanzó el 27 % y su pareja, Ne.3(1), creció un 6 % para el mismo periodo. La presencia de abundante murcielaguina entre los pliegues del espeleotema sobre el que se desarrollan ambos biofilms podría ser un elemento potenciador de su crecimiento. Los

excrementos de murciélago aportan productos de descomposición orgánica, nutrientes esenciales para el metabolismo de los microorganismos fotosintéticos, tales como fósforo y nitrógeno orgánico y, por otro lado, favorecen la humedad del sustrato mediante la absorción y retención de agua del aire.

El empleo de biocidas durante tratamientos de limpieza previos a nuestro estudio también pudo favorecer el desarrollo de los biofilms. De hecho, los biofilms Ne.7(1) y Ne.7(2) que se desarrollaron sobre sustratos que habían sido limpiados con una dilución de peróxido de hidrógeno y agua saturada en calcita (15 %) mostraron un crecimiento anual del 9 y 6 %, respectivamente. La superficie colonizada por el biofilm Ne.1(1), que fue limpiada con dilución de hipoclorito cálcico en agua saturada en calcita (2 %), también creció un 6 %. Estos biofilms mostraron un mayor crecimiento que otros, de características ambientales semejantes, que no habían sido sometidos a limpieza con biocida. Ambas limpiezas podrían haber favorecido la biorreceptividad posterior de los sustratos y, con ello, una recolonización más rápida por los organismos, además favorecer la persistencia de los más resistentes. Respecto al biofilm Ne.1(2), destacamos que, aunque es la pareja de Ne.1(1), se desarrolla sobre un espeleotema diferente que no fue limpiado con biocida y mostró un crecimiento del 3 %.

El sustrato sobre el que se desarrolla el biofilm Ne.10(1) también fue limpiado con peróxido de hidrógeno y agua saturada en calcita (15 %), pero el biofilm no mostró un crecimiento estadísticamente significativo. Este hecho podría deberse a la presencia de otros factores ambientales que influyeron en el desarrollo del biofilm como, por ejemplo, la presencia de una colonia de colémbolos que se nutrió de los organismos fotosintéticos durante el periodo estival y podría haber contribuido a la reducción de tamaño observada durante este periodo.

Otra pareja de biofilms con diferente evolución fue la correspondiente a la zona Ne.8. En este caso, los modelos asociados a los biofilms Ne.8(1) y Ne.8(2) fueron muy diferentes entre sí, por lo que se plantea la influencia de otros factores cuya naturaleza desconocemos en el crecimiento de ambos biofilms.

Finalmente, en relación con la colonización primaria de los sustratos, los microorganismos fotosintéticos (microalgas, cianobacterias, etc.) pueden colonizar superficies de

pedra, incluso en ausencia de materia orgánica, con un desarrollo más favorable en superficies porosas. Estos organismos desempeñan un papel importante como colonizadores primarios de materiales pétreos y otras superficies expuestas a condiciones favorables para su desarrollo (Ortega-Calvo et al., 1991; Tiano et al., 1995; Lamenti et al., 2000; Tomaselli et al., 2000; Bellinzoni et al., 2003; Miller et al., 2009; Warscheid y Braams, 2000; Crispim y Gaylarde, 2005; Gorbushina, 2007). Las zonas de experimentación de colonizadores fotosintéticos primarios en la Cueva de Nerja, sometidas a iluminación por diferentes lámparas mostraron sólo crecimiento en las dos subzonas de Ne.13, así como en el suelo de la zona Ne.14. En Ne.13, los modelos de regresión obtenidos mostraron una escasa relación del tamaño de los biofilms con las variables ambientales monitorizadas, por tanto, el desarrollo inicial de estos biofilms debió estar más influenciado por otros factores no considerados en el análisis estadístico.

Por otro lado, estos resultados indicaron que la iluminación con las propiedades que presenta la lámpara de luz verde limita el desarrollo de microorganismos fotosintéticos en el interior de la Cueva de Nerja, de acuerdo con Roldán et al. (2006). No obstante, controlar estos organismos mediante la iluminación debe tener en cuenta la capacidad que presentan algunos grupos de fotoaclimatación (MacIntyre et al., 2002) y de adaptación (Tandeau, 1977), así como la presencia de diferentes pigmentos en los organismos fotosintéticos. La iluminación de cuevas turísticas, como la Cueva de Nerja, además de los aspectos relativos a la conservación de su Patrimonio Natural y Cultural, debe tener en cuenta los relacionados con la seguridad de los visitantes y la normativa vigente sobre iluminación de recintos de pública concurrencia que, en la actualidad, no dispone de criterios para la iluminación de cuevas turísticas en España.

CAPITULO 6

ANÁLISIS DE LOS BIOFILMS FOTOSINTÉTICOS

ESTRUCTURA, BIODIVERSIDAD, ESTADO FISIOLÓGICO DE LOS MICROORGANISMOS Y RELACIÓN CON EL SUSTRATO

6.1. Introducción

Combatir el biodeterioro producido por biofilms precisa conocer su origen, es decir, qué organismos lo generan, cómo se estructuran, qué actividad fisiológica presentan y cómo se relacionan entre ellos y con el sustrato (Albertano y Urzi, 1999; Hernández-Mariné et al., 2001; 2003; Roldán et al., 2004b; Walker y Pace, 2007; del Rosal et al., 2010a, 2014b, 2014c). Esta información resulta indispensable para el diseño de estrategias preventivas y de control de estas comunidades biológicas, acordes con una adecuada conservación del patrimonio cultural y natural.

La combinación de las técnicas de microscopía actuales aporta información sobre variados aspectos del biofilm, relacionados con su biodiversidad, distribución espacio-temporal, comunicación molecular, fisiología celular e interacción con el sustrato. En relación con el estudio de los biofilms fotosintéticos, en especial los que originan el *mal verde* o lampenflora, responsable del deterioro en el medio subterráneo, las técnicas de microscopía permiten, además, conocer la diversidad y abundancia de microalgas y cianobacterias respecto de otros grupos de organismos como hongos o actinobacterias y determinar posibles sinergias entre conjuntos de organismos.



Por todo ello, las diversas técnicas de microscopía resultan una herramienta de trabajo imprescindible para evaluar la influencia que ejercen los microorganismos sobre el sustrato y el grado de deterioro del mismo. La evaluación conjunta de los datos que aporta cada una de ellas permite una visión general del proceso en cuestión (Roldán et al., 2004b, 2004c; del Rosal et al., 2012)

La microscopía de barrido láser confocal (Scanning Electron Microscopy, SEM) ofrece imágenes generadas por un haz de electrones que escanea la muestra. Tradicionalmente la muestra debía ser conductora, por lo que esta técnica sólo permitía observar microorganismos previamente pulverizados con carbono o metales pesados. En la actualidad, se dispone de SEM ambientales y de alta resolución que permiten observar microorganismos no recubiertos. La técnica SEM permite el empleo de electrones retrodispersados con alta energía (Back Scatter Electron, BSE) que escapan a través de la superficie de la muestra después de haber interactuado con los núcleos de los elementos presentes en ella. El coeficiente de electrones retrodispersados depende del número atómico de los elementos presentes y, por tanto, aporta información relativa a la naturaleza química o composicional de la muestra (Jembrih et al., 2000, Schreiner et al., 2007). Además, la energía dispersada de rayos X (Energy dispersive spectrometry, EDS), permite realizar microanálisis que determinan la composición química del material y su distribución en diferentes áreas de la muestra (Jembrih et al., 2000, Schreiner et al., 2007). Esta técnica de microscopía se emplea habitualmente para caracterizar la superficie de los sustratos colonizados, el aspecto general y la morfología de los biofilms, así como su relación con el sustrato (Jembrith et al., 2000; Hernández-Mariné et al., 2004; Schreiner et al., 2007).

La microscopía electrónica de transmisión (Transmisión Electron Microscopy, TEM) utiliza un haz de electrones que atraviesa la muestra y genera una imagen con diferentes intensidades, en función de la densidad del material atravesado, que permite observar su composición (Hernández-Mariné et al., 2004). El aspecto final de la imagen presenta diferentes tonalidades de gris, en función de la disposición de los metales pesados que previamente han sido absorbidos, de forma selectiva, por la muestra y que dan lugar a diferentes densidades en la misma. TEM además ofrece información sobre el tamaño, forma y disposición de los orgánulos dentro de las células.

El microscopio de barrido láser confocal (Confocal Scanning Laser Microscopy, CLSM) es una herramienta de relativamente reciente aplicación al estudio de los biofilms fotosintéticos. El diseño del CLSM combina el método de exploración láser superficial con la detección 3D de los objetos biológicos y permite observar, individualmente, diferentes secciones ópticas de una muestra fluorescente y, con ello, construir su imagen tridimensional. La aplicación de esta técnica precisa, en su aplicación biológica, de especímenes con fluorescencia, que puede ser intrínseca o producida por marcadores. El principio de CSLM se basa en iluminar la muestra con luz monocromática generada por láseres, eliminar la luz reflejada o procedente de planos fuera de foco y observar la fluorescencia, una propiedad que poseen moléculas denominadas fluorocromos, capaces de emitir la luz absorbida con una longitud de onda superior. CLSM obtiene secciones ópticas extremadamente finas (resolución axial ~ 500 nm) a diferentes planos de la muestra. Las diferentes secciones ópticas se pueden utilizar de forma independiente, para observar una parte interna de la muestra, o recopiladas, para realizar una reconstrucción tridimensional. CLSM es una herramienta muy útil en el estudio de biofilms fotosintéticos (Roldán et al., 2004c), pues proporciona gran volumen de información con un mínimo procesado de la muestra. El CLSM habitualmente emplea varios láseres, cada uno de ellos con una o varias líneas de excitación. Existen dos tipos de láseres: los diodos o los constituidos por gases nobles. Los láseres más comúnmente empleados son: argón (láser multilínea: 458, 476, 488 y 514 nm), helio-neón (543, 594 y 633 nm) y ultravioleta-argón (351-364 nm), así como los diodos 405 nm y 561 nm. Un filtro sintonizable, AOTF (Acousto-Optic Tunable Filters) permite seleccionar la línea de láser y la intensidad que mejor se ajuste al espectro de excitación de los fluorocromos que se desean visualizar. El láser atraviesa primero un divisor de haz acústico óptico sintonizable, AOB (Acousto-Optical Beam Splitter) o un espejo dicróico y después el objetivo e ilumina un punto de la muestra. Posteriormente, el láser se desplaza a través de la zona de muestreo mediante un conjunto de espejos galvanométricos. La señal luminosa que emite la muestra vuelve por el mismo camino, atraviesa un diafragma que selecciona la luz procedente del plano focal iluminado (pinole) y elimina la información generada por otros planos. La señal continúa hasta el sistema de detección espectral que separa la luz recibida en función de su longitud de onda y un fotomultiplicador transforma la luz en señal eléctrica, que es digitalizada y almacenada en un ordenador, que ofrecerá la imagen tridimensional de la muestra. Algunos CSLMs poseen un sistema de detección espectral que permite obtener el espectro de emisión real de un fluorocromo. Para obtener los espectros de

fluorescencia de las muestras se define un rango de longitudes de onda, dentro de las cuales se adquiere una colección de imágenes a un intervalo predeterminado. El resultado es una serie de imágenes $x-y-\lambda$ que muestran la intensidad de fluorescencia para cada rango de longitud de onda predeterminado. El procesamiento de dichas series permite obtener el espectro de emisión de la muestra. Gracias a esta función es posible caracterizar la emisión de los diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos e identificar cianobacterias y algas, pertenecientes a distintos grupos filogenéticos, mediante la fluorescencia natural de sus pigmentos fotosintéticos (Roldán et al., 2004a, 2004c; del Rosal et al., 2012). Conocer aspectos sobre la intensidad de fluorescencia también aporta información sobre la fisiología de los organismos (Roldán y Hernández-Mariné, 2007) y permite cuantificar su biomasa. Los elementos del biofilm que no posean fluorescencia natural, como por ejemplo, el ADN o la matriz extracelular, requieren del empleo de marcadores específicos fluorescentes, caracterizados por un máximo de excitación y de emisión. El empleo de CLSM en modo reflexión (excitación a 488 nm y emisión 480-490 nm) permite identificar los componentes inorgánicos de la muestra. Finalmente, la superposición de imágenes permite observar la distribución espacial de los microorganismos que componen el biofilm así como su distribución en el sustrato.

Otras técnicas, más avanzadas, que derivan de la microscopía láser confocal son la microscopía de excitación bi-fotónica y la microscopía de fluorescencia de super-resolución. Estas técnicas no han sido empleadas en el presente trabajo.

La taxonomía clásica emplea caracteres morfológicos y citológicos así como aspectos ecológicos y fisiológicos de los organismos. La biología molecular se basa en el genoma de los organismos y, por tanto, es independiente de las condiciones de cultivo, del ciclo de vida y de la subjetividad del investigador. El uso de las técnicas moleculares ha aumentado la posibilidad de analizar e identificar el conjunto de seres vivos, entre ellos, las microalgas y cianobacterias. Los hábitats terrestres tienen la dificultad añadida de tener formas morfológicas simples y especies crípticas. Algunos caracteres morfológicos usados para definir grupos, han aparecido o se han perdido durante la evolución, de manera que organismos con la misma forma son filogenéticamente distintos, debido a convergencias evolutivas (Fucikova, 2014; Komárek et al., 2014).

Actualmente la tendencia de la taxonomía, tanto en las microalgas como en las cianobacterias, es el sistema de clasificación polifásico, que incluye los datos moleculares junto a toda la información disponible morfológica, fisiológica y ecológica y los integra en un consenso amplio. La clasificación general resultante es un trabajo que integra un mínimo de contradicciones. Este sistema de clasificación polifásica ha sido empleado en la identificación de los organismos fotosintéticos de la Cueva de Nerja. La información molecular fue obtenida gracias al proyecto Estudio microbiológico de la Cueva de Nerja. Investigación de los organismos implicados en el biodeterioro, dirigido por el Dr. Cesáreo Saiz y financiado por la Fundación Cueva de Nerja (Jurado et al, 2015).

6.2. Objetivos

Realizar un análisis integral de los biofilms fotosintéticos que aporte información sobre su biodiversidad, estructura y actividad fisiológica, así como su relación con el sustrato.

6.3. Material y Métodos

6.3.1. Selección de las zonas y toma de muestras

Los biofilms analizados se obtuvieron en cada una de las zonas descritas en el apartado 4.4, *Descripción de las zonas de control* de la presente memoria. Un total de 14 zonas fueron muestreadas para la consecución de los objetivos propuestos en este capítulo. En las zonas Ne.4, Ne.11 y Ne.12, las diferencias morfológicas que se observaron en la colonización de los sustratos motivaron su división en varias subzonas, a partir de las cuales se obtuvieron las muestras correspondientes. La nomenclatura de estas subzonas fue Ne.4(1), Ne.4(2), Ne.4(3), Ne.4(4), Ne.11(a), Ne.11(b), Ne.11(c), Ne.12(a) y Ne.12(b).

Punto de control	Junio (2007)	Noviembre (2008)	Junio (2011)	Noviembre (2012)	Febrero (2014)	Julio (2014)
Ne.1	-	-	x	x	x	x
Ne.2	-	-	x	x	x	-
Ne.3	-	-	x	x	-	-
Ne.4	X(4)	x(4)	-	-	x	x
Ne.5	-	-	x	x	-	-
Ne.6	-	-	x	x	-	-
Ne.7	-	-	x	x	-	-
Ne.8	x	-	x	x	x	x
Ne.9	-	X	x	x	-	-
Ne.10	-	-	x	x	x	x
Ne.11	-	-	x(3)	x(3)	x(3)	x(3)
Ne.12	-	x(2)	x(2)	x(2)	-	-
Ne.13	-	-	-	x	x	-
Ne.14	-	-	-	x	-	-

Tabla 6.1. Campañas de muestreo de las diferentes zonas de control. Leyenda: (x) muestra, (-) no muestra, (nº) número de muestras obtenidas.

Las campañas de muestreo se llevaron a cabo en junio (2007), noviembre (2008), junio (2011), noviembre (2012), febrero (2014) y julio (2014) (Tabla 6.1). Las muestras se obtuvieron mediante raspado suave, con bisturí estéril, de una pequeña superficie de sustrato colonizada por biofilm fotosintético. El material desprendido fue depositado directamente en placas de Petri con medio de cultivo BG11 (1/2) (Stanier et al., 1971) o medio BBM (Bischoff y Bold, 1963), ambos solidificados con agar (1 %) (MERCK). En cada campaña también se recolectaron lascas desprendidas de sustrato colonizado y, puntualmente, se obtuvieron porciones de sustrato colonizado, de aproximadamente 0,25 cm² de superficie, que se emplearon para estudiar la penetración del biofilm y la composición química del sustrato. De cada muestra, una parte fue examinada directamente o procesada para su análisis posterior y el resto fue cultivado para el aislamiento de los diferentes organismos fotosintéticos.

Adicionalmente y de forma puntal se obtuvieron muestras de zonas concretas cuyos resultados completan los datos taxonómicos ofrecidos en este capítulo. Estas muestras se identificaron con las siglas 3c-2, Ne.ama y Ne.14.suelo (Fig. 6.1).



Figura 6.1. A la izquierda y arriba, zona de muestreo Ne.14.suelo, debajo, Ne.ama y a la derecha, 3c-2.

6.3.2. Técnicas de microscopía

La metodología empleada en el desarrollo de este estudio incluye las siguientes técnicas de microscopía: estereoscópica, de campo claro, de barrido láser confocal (CLSM), electrónicas de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). A ésta última se le incorporó el modo de electrones retroproyectados (BSE) y la difracción de rayos X (DRX).

Las características de especies individuales se observaron mediante microscopía convencional y CLSM y las técnicas de microscopía electrónica como auxiliares. La identificación taxonómica se basó en los caracteres morfológicos reconocidos en las muestras sin procesar y en la observación de las colonias que se desarrollaron en las placas de agar, de

acuerdo con la bibliografía de referencia. La identificación de las diferentes morfoespecies de microalgas y morfotipos de cianobacterias se basó en Ettl y Gärtner (1995), Komarek y Anagnostidis (1998, 2005) y Komárek (2013). También se utilizó bibliografía especializada, que se detalla en el apartado 6.5 de la presente memoria, correspondiente a la descripción de cada uno de los taxones hallados.

6.3.2.1. Microscopía estereoscópica y de campo claro

La observación directa de material de campo y de cultivos vivos de las muestras se llevó a cabo mediante un microscopio óptico Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) y las imágenes fueron captadas mediante una cámara digital AxioCam MRc5 y procesadas con el software Axioplan LE. Esta microscopía permitió identificar los constituyentes autótrofos de las muestras (algas y cianobacterias) así como la presencia, grosor, disposición y agrupamiento de sus respectivas envolturas (sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Rippka et al., 1979).

6.3.2.2. Microscopia de Barrido Láser Confocal (CSLM)

La técnica CSLM proporciona información sobre la arquitectura y la heterogeneidad en el interior de los biofilms (Davey y O'Toole 2000), evitando los inconvenientes de otros procesos (Neu y Lawrence 1997; Lawrence y Neu, 1999) entre ellos, la pérdida de viabilidad de los organismos de la muestra. Así, el CSLM permite realizar secciones ópticas horizontales o sagitales de biofilms intactos, vivos o no y de gran grosor, reconstruir y caracterizar su estructura tridimensional (Roldán et al., 2007) y observar las interacciones entre los organismos y las superficies a las cuales se adhieren (Lawrence y Neu, 1999).

La mayor parte de las muestras de la Cueva de Nerja fueron observadas mediante esta técnica en los días posteriores a su recolección. Esta técnica también fue empleada para observar muestras sin procesar, obtenidas a partir de los cultivos de enriquecimiento y de los aislamientos. En algunos casos, las muestras se fijaron con solución de paraformaldehído al 3 % en tampón fosfato alcalino (Phosphate Buffer Solution, PBS) 0,1 M Sacarosa 60 mM y se mantuvieron a 4

°C. Alicuotas de las muestras, tanto frescas como fijadas, se marcaron con la lectina Concanavalina A (Con-A Alexa-Fluor 488, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) (Schüßler et al., 1997) para observar los polisacáridos extracelulares que forman la matriz que rodea a los biofilms. También se usó el marcador específico de DNA, Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) que se une a las regiones ricas en adenina-timina y permitió observar células vivas (Roldán et al., 2004b). El montaje de las muestras, debido a su grosor, rigidez y opacidad precisó de placas Mat-teck (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), a las que se añadieron pequeñas cantidades de PBS para evitar la deshidratación de la muestra durante la observación.

La observación de las muestras se llevó a cabo mediante un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GMBH, Mannheim, Germany), equipado con ocho líneas de láser y cinco canales de detección. Las longitudes de onda de excitación de los láseres son las siguientes: diodo azul (405 nm), Argón (458, 476, 488 y 514 nm), diodo naranja (561 nm) y HeNe (594 y 633 nm). De ellas, tan solo se emplearon algunas y en diferentes proporciones junto con los objetivos Plan Apocromáticos: 10x(0.4 AN), 40x(1.25-0.75 AN), 63x(1.4 AN).

La línea 405 nm se empleó para detectar el DNA marcado con Hoechst 33258 y la fluorescencia espontánea azul de algunas vainas. La línea láser Ar-488 nm, con emisión a 500-550 nm, se empleó para observar los EPS, marcados previamente con Con-A. Esta información permitió observar los mecanismos de adhesión entre los microorganismos y entre éstos y el sustrato. La morfología del sustrato se observó mediante el empleo del microscopio confocal en modo reflexión, usando la misma línea de láser Ar 488 nm y recogiendo la señal a 480-495 nm. También las líneas láser 488 nm, con emisión entre 500-800, 594 nm, con emisión entre 670-790 nm y 561 nm, con emisión entre 575-625 nm, se emplearon para observar los pigmentos fotosintéticos de microalgas y cianobacterias (clorofilas y ficobiliproteínas) que presentan fluorescencia natural. La información obtenida permitió determinar la morfología y el estado fisiológico de los microorganismos, así como su posición en el sustrato y respecto al resto de organismos o sustancias fluorescentes.

Para determinar la relación espacial de los pigmentos fotosintéticos y los EPS, se adquirieron imágenes de la misma zona en los diferentes canales de forma secuencial, para evitar

el solapamiento de las diferentes señales de fluorescencia. Se realizaron secciones ópticas horizontales (x-y) a lo largo del eje z de la muestra. Posteriormente, estas secciones fueron recopiladas para hacer la reconstrucción xyz (3D) de la muestra. Los límites superior e inferior de la captación se adquirieron utilizando la autofluorescencia de los pigmentos y, en algunos casos, la fluorescencia de la Con-A como marcador, tomando como límites las secciones, de la primera a la última, que mostraban fluorescencia. El número de secciones que se captaron, así como la distancia entre sección y sección, fueron elegidas en función de cada muestra. Las imágenes se adquirieron en los formatos de 512 x 512 píxeles y de 1024 x 1024 píxeles y fueron captadas en un rango dinámico de 8 bits (256 niveles de grises). El procesamiento de imágenes se realizó con el programa informático Imaris versión 6.1 (Bitplane AG Zürich, Switzerland) y el Leica (Las AF) y con el programa abierto Fiji (GNU General Public License). Una vez procesadas las series, se obtuvieron imágenes tridimensionales de los biofilms (Roldán et al., 2004c) que mostraron la distribución de los organismos y su relación con el sustrato. Una de las funciones empleadas de este programa, denominada “Extended”, permitió observar el biofilm dividido en tres secciones, que representan la proyección de intensidad máxima de fluorescencia para los planos x-y, x-z, y-z y.

Además, el equipo Leica TCS-SP5 está acoplado a un detector espectral que permite obtener el espectro de emisión de los fluorocromos naturales presentes en las cianobacterias y microalgas del biofilm (Roldán et al., 2004b). Para ello, es necesario definir un rango de longitudes de onda dentro de las cuales se adquiere una colección de imágenes x-y que muestran la intensidad de fluorescencia para cada rango de longitud de onda predeterminado. El procesamiento de dichas series permite obtener el gráfico correspondiente al espectro real de emisión de cada muestra (Roldán et al., 2004b, 2004c). El análisis de la fluorescencia se llevó a cabo mediante la elección de regiones de interés (ROIs), equivalentes a $1 \mu\text{m}^2$ para cada x-y- λ de imágenes de la zona de tilacoidal de las cianobacterias y de los cloroplastos de las algas. Gracias a esta función fue posible caracterizar la emisión de los diferentes tipos de pigmentos fotosintéticos e identificar cianobacterias y algas y, dentro de ellas, las pertenecientes a distintos grupos filogenéticos (Roldán et al., 2004b). Conocer aspectos sobre la intensidad de fluorescencia también aporta información sobre la fisiología de los organismos (Roldán y Hernández-Mariné, 2007, del Rosal et al., 2012; Roldán et al., 2014).

6.3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía SEM fue empleada para caracterizar la superficie de los sustratos colonizados, el aspecto general y la morfología de los biofilms, así como su relación con el sustrato (Jembrith et al., 2000; Hernández-Mariné, et al., 2004; Welton, et al., 2005; Schreiner, et al., 2007). También se aplicaron dos técnicas de análisis complementarias: espectroscopía de rayos X (Energy Dispersive X-ray, EDX) y electrones retrodispersados (Back Scattered Electron, BSE). La primera realizó un microanálisis cualitativo y cuantitativo de los componentes de la muestra (Jembrith et al., 2000, Schreiner et al., 2007) y la segunda aportó información relativa a la naturaleza química o composicional de la muestra y a su topografía (Jembrith et al., 2000, Schreiner et al., 2007).

El procesado de las muestras se llevó a cabo mediante fijación en glutaraldehído (0,2 %) y paraformaldehído (2 %) en tampón cacodilato 0,1 M. Para mejorar la conductividad de las muestras se postfijaron en una solución de tetróxido de osmio (1 %). El deshidratado se realizó mediante gradiente de etanol y el secado mediante punto crítico. Finalmente, las muestras fueron recubiertas con carbono y observadas a microscopio. La observación de las muestras se llevó a cabo mediante un Microscopio Electrónico de Barrido con electrones retrodifundidos (BSE) y rayos X de energía dispersiva (EDX) (Quanta 200, FEI þ EDAX). Los espectros de rayos X fueron adquiridos en una tensión de aceleración de 20 kV, con una corriente de haz de 10 Torr y un tiempo de adquisición de 30 s. Tras el análisis elemental de las muestras, algunas de ellas fueron recubiertas con oro para mejorar la calidad de las imágenes obtenidas y evaluar con mayor precisión las relaciones entre los organismos así como entre éstos y el sustrato (Hernández-Mariné et al. 2004). Esta técnica de microscopía también empleó un equipo Jeol 6510 con tensión de aceleración de 15KV. En este caso, se empleó la misma técnica de preparación pero se obvió la metalización con oro para evitar interferencias durante la obtención de imágenes.

Parte de las muestras de las zonas Ne.4 y Ne.1 fueron incluidas en bloques de resina y cortadas para su observación a microscopio. La fijación de las muestras se llevó a cabo mediante una mezcla de paraformaldehído (2 %) y glutaraldehído (2,5 %) en tampón cacodilato (0,1 M) durante 2 horas. Posteriormente, fueron lavadas en este tampón e impregnadas en frío con resina

epoxy (Epofix Struers) en moldes de 25 mm de diámetro. La impregnación en resina se realizó al vacío, mediante un equipo BUEHLER modelo CAST'N VAC. Posteriormente se realizaron 2 cortes planoparalelos (base y techo de la probeta) con sierras de isometría de precisión Low-speed (BUEHLER). La superficie a observar se pulió con carburo de silicio de tamaño de grano sucesivo P200, P400 y P800, mediante el empleo de pulidora (LAPMASTER 1.5). El pulido “espejo” de la superficie se consiguió mediante polvo de diamante de tamaño de grano de 1 y 0.1 μm y pulidora PRESI modelo GEOPOL-GEOROD.

6.3.2.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El empleo de la microscopía TEM aportó información sobre la presencia, el tamaño, forma y disposición de los orgánulos dentro de las células y de las relaciones entre distintos grupos de organismos y de su integridad o estado de degradación celular y subcelular.

Para la fijación química de las muestras procedentes de cultivo se utilizó una mezcla de paraformaldehído (2 %) y glutaraldehído (2,5 %) en tampón cacodilato (0,1 M) durante 2 horas. Posteriormente, las muestras se lavaron en este tampón y fijaron en una solución de tetróxido de osmio (1 %). La deshidratación se realizó mediante una serie graduada de acetona y, tras esto, las muestras fueron incluidas en resina Spurr (Sigma Aldrich) (Spurr, 1969). Los cortes ultrafinos, obtenidos a partir del bloque, fueron teñidos con los metales pesados acetato de uranilo y citrato de plomo (2 %) (Hernandez-Marine et al. 2004). El equipo empleado para el examen de los cortes fue un microscopio JEOL 1010 TEM (Jeol, Japón) a 80 kV de aceleración.

6.3.3. Análisis molecular

Para completar la información aportada por las técnicas de microscopía, se emplearon técnicas de análisis molecular para la identificación de cianobacterias y eucariotas. En las muestras analizadas mediante técnicas moleculares también se identificaron las bacterias y arqueas asociadas a los biofilms, cuyos resultados se pueden consultar en el Anexo 3 de la

presente memoria que integra parte del informe emitido por el IRNAS-CESIC (Sevilla) (Jurado et al., 2015).

Las muestras analizadas mediante biología molecular se obtuvieron en las zonas Ne.1, Ne.2, Ne.4, Ne.8, Ne.10, Ne.11, Ne.11(b) y Ne.13.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó siguiendo el método de Griffiths et al. (2000), que permite el análisis en paralelo del ADN y ARN. En un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 150-200 mg de muestra natural se añadieron perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro, 500 µl de tampón de extracción CTAB (Tris 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2%; pH 8) y 500 µl de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1, pH 8). La mezcla se homogenizó con un equipo Fast-Prep 24 (MP Biomedicals) y ciclo de 15 s a una velocidad de 5,5 m/s y centrifugación 5 min a 12500 rpm. El sobrenadante se purificó con 500 µl de cloroformo:isoamilalcohol (24:1), se agitó durante 5-10 s y se centrifugó de nuevo. La precipitación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo con 50 µl de acetato de sodio (3M) y 500 µl de isopropanol, centrifugado durante 30 min a 12500 rpm, lavado del precipitado con etanol (70 %) y secado a temperatura ambiente. Este precipitado se disolvió en 80 µl de agua ultra pura libre de ARNsa (Sigma-Aldrich) y se cuantificó la concentración de ADN y ARN resultante con un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Del producto de la extracción, 50 µl se emplearon para la purificación del ARN y el resto para análisis del ADN. Para aislar el ARN se eliminó el ADN con la enzima *RNase-Free DNase* (Quiagen GmbH). Para ello, se añadieron 20 µl del tampón de reacción RDD (suministrado con la enzima), 5 µl de la enzima ADNsa y 125 µl de agua ultra pura libre de ARNsa. La reacción enzimática se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos. El ARN se purificó en 14 µl de agua ultra pura libre de ARNsa empleando el *RNeasy Minielute Cleanup Kit* (Quiagen).

Para el análisis de las comunidades microbianas metabólicamente activas, se sintetizó el ADN complementario (ADNc) mediante la reacción de retrotranscripción catalizada por la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen Life Technologies). Se siguió el protocolo detallado por el fabricante y los cebadores Cya 781R (5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3') para cianobacterias (Nübel et al., 1997), 907R (5'-CCC CGT CAA TTC

ATT TGA GTT T-3') para bacterias (Teske et al., 1996) y 915R (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') y para arqueas (Großkopf et al., 1998).

La identificación de cianobacterias, bacterias y arqueas se realizó mediante la secuenciación del gen ARN ribosómico 16S. La identificación de eucariotas se realizó con el gen ARN ribosómico 18S. Los genes se amplificaron mediante PCR con las parejas de cebadores Cya 106F (5'-CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A-3') y Cya 781R para cianobacterias (Nübel et al., 1997), 616F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') y 907R para bacterias (Juretschko et al., 1998; Teske et al., 1996), Arch109F (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3') y 915R para arqueas (Großkopf et al., 1998) y, EUKA (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') y EUKB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') para eucariotas (Diez et al., 2001). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler de BioRad (Hercules, California, EE.UU.). Las reacciones se prepararon en tubos de 0,2 ml (Greiner BioOne, Monroe, EE.UU.). Cada reacción se realizó con 5 µl de tampón de PCR 10x BioTaq (Bioline, Randolph, EE.UU.), 1,5 µl de MgCl₂ (solución stock 50 mM), 1 µl de de una mezcla de los cuatro nucleótidos (dNTP) (2 mM) (Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.), 0,5 µl de cada cebador de concentración 50 µM, 0,25 µl de la ADN polimerasa BioTaq (Bioline, Randolph, EE.UU.) y ADN molde. El volumen final de la reacción se completó hasta 50 µL con agua ultra pura. Para cada reacción, como ADN molde se añadieron unos 10-20 ng de extracto de ADN, mientras que para el análisis del ARN, se añadieron 1-2 µl de una dilución 1:10 del ADNc. El protocolo de amplificación por PCR fue: 5 min de desnaturalización inicial a 94 °C; 30 ciclos de 2 min a 94 °C, 15 s a 55 °C y 2 min a 72 °C, seguidos de 10 min de extensión final a 72 °C. Los resultados de las reacciones de PCR se comprobaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v) y los productos amplificados se purificaron usando el kit JETquick Spin (Genomed), y fueron conservados a -20 °C hasta su uso en el análisis de DGGE y la construcción de genotecas. El análisis de DGGE precisó de una segunda PCR sobre el producto amplificado de los genes de ARNr. Los cebadores utilizados para cianobacterias y bacterias fueron el 341F-GC (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') (Neefs et al., 1990) y el 518R (5'-GCG GGG GCA CGG GGG G-3') (Neefs et al., 1990) y para arqueas: el Arc344F-GC (5'-TCG CGC CTG CTG CYC CCC GT-3') (Großkopf et al., 1998) y el 518R. La composición de la mezcla de reacción fue idéntica a la utilizada en la primera reacción de amplificación y utilizando como ADN molde 1 l del

producto de PCR purificado del gen ARNr 16S. Los protocolos de PCR utilizados fueron los anteriormente citados.

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) permitió separar los productos de PCR con tamaños parecidos o iguales en base a la reducción de su movilidad electroforética al desnaturalizarse parcialmente la doble cadena de ADN. El resultado es un patrón de bandas que representa a la comunidad microbiana de la muestra analizada. La técnica se realizó según Muyzer et al. (1993) con modificaciones. Se utilizaron geles de 20 x 16 x 0,1 cm con un 8% (p/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad) en tampón TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético glacial 10 mM, EDTA 0,5 mM), con un gradiente de agentes desnaturalizantes (urea 7M, formamida desionizada 40% (v/v)) de 30-50%. La zona superior del gel, donde se sitúan los pocillos para cargar las muestras, se completó con una solución de acrilamida sin agentes desnaturalizantes. La polimerización de los geles se catalizó con N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y una solución al 10% de persulfato amónico (APS). Una vez preparado el gel, se mantuvo dos horas a temperatura ambiente hasta su completa polimerización. La electroforesis se realizó en tampón TAE 0,5X con el equipo de electroforesis vertical D-Code System (Bio-Rad), conectado a una fuente de alimentación Consort E-865 (Consort NV). Antes de cargar las muestras, los geles ya polimerizados se sometieron, durante 20 minutos, a las condiciones electroforéticas determinadas para estos experimentos (60 °C y 200 V), tras lo cual se cargaron 10 µl de ADN mezclados con 5 µl de tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 50, sacarosa 0,25 g/ml, azul de bromofenol 1 g/l, SDS 5 mg/ml). La electroforesis se llevó a cabo durante 3,5 horas y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µg/ml). La observación se realizó con un transiluminador EX-26.MX (Vilber Lourmat) que emite luz de 312 nm de longitud de onda y las imágenes se capturaron con un equipo Kodak EDAS-290 (Kodak) y el programa Kodak 1D v. 3.5.4. Imaging Scientific System (Kodak).

Las genotecas se construyeron a partir de los productos de PCR purificados de los genes ARNr 16S y 18S, que fueron clonados mediante el kit comercial TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen, California, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El vector empleado fue el plásmido pCR4-TOPO (Invitrogen). Tras la transformación, las células se sembraron en placas de LB con ampicilina e incubaron a 37 °C durante, aproximadamente, 18 h.



Las colonias obtenidas se recogieron al azar y se crecieron en medio líquido de LB con ampicilina. Se recogieron un total de 900 clones. Para comprobar la presencia del inserto (producto purificado de PCR) se realizó una PCR empleando los cebadores T7 promotor (T7) (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y M13 Reverso (M13R) (5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC- 3') (Ausubel et al., 2003), específicos de la secuencia del vector. La composición de la mezcla de reacción fue la utilizada con otros cebadores y como ADN molde se empleó 1 µl de la suspensión acuosa del clon a analizar. Los clones fueron procesados en el secuenciador 3730XL DNA de la empresa Macrogen (Seúl, Corea).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit 7.0.5.3. (Hall, 1999). Para cada una de las secuencias, se detectó la posición del inserto y se eliminaron las regiones correspondientes al vector de clonación. Las secuencias demasiado cortas (< 300 nucleótidos) o cuyo cromatograma mostraba baja calidad se eliminaron. Las secuencias obtenidas se analizaron en busca de posibles estructuras quiméricas, fragmentos de ADN generados durante la amplificación por PCR que proceden de, al menos, dos microorganismos distintos. Para detectarlos se utilizó el software *mothur* (Schloss et al., 2009). Tras este análisis, las secuencias de la base de datos no redundantes se compararon con las secuencias depositadas en el National Center for Biotechnology (NCBI; [http:// www.ncbi.nlm.nih.org/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast/)) usando el algoritmo BLASTN (Altschul et al., 1990). Las secuencias alineadas se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTUs), con una identidad del 97%. Además, se construyeron las curvas de rarefacción para cada una de las muestras analizadas, con el fin de estimar el grado de cobertura de los clones analizados respecto a la diversidad esperable de la comunidad microbiana.

Para aislar especies del género *Chroococidiopsis* se cultivó durante 14 días y en medio sólido BG11, biofilm de la muestra Ne.8. La extracción de ADN se realizó mediante FastDNA SPIN for Soil Kit (MP Biomedicals, France) según instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la amplificación mediante PCR con cebadores de cianobacterias, clonación y secuenciación según protocolo descrito anteriormente.

6.4. Resultados

6.4.1. Resultados del análisis microscópico en las zonas de muestreo

Ne.1

Las muestras presentaban, superficialmente, un biofilm de color verde, cuya profundidad máxima no superó 0,1 mm. El biofilm se encontraba formado por organismos que mostraban distintas tonalidades de color, con gradación entre amarillento, azulado y variados tonos de verde. La colonización de la superficie del sustrato fue irregular, con desarrollo de organismos mezclados con los gránulos del sustrato (Fig. 6.1).

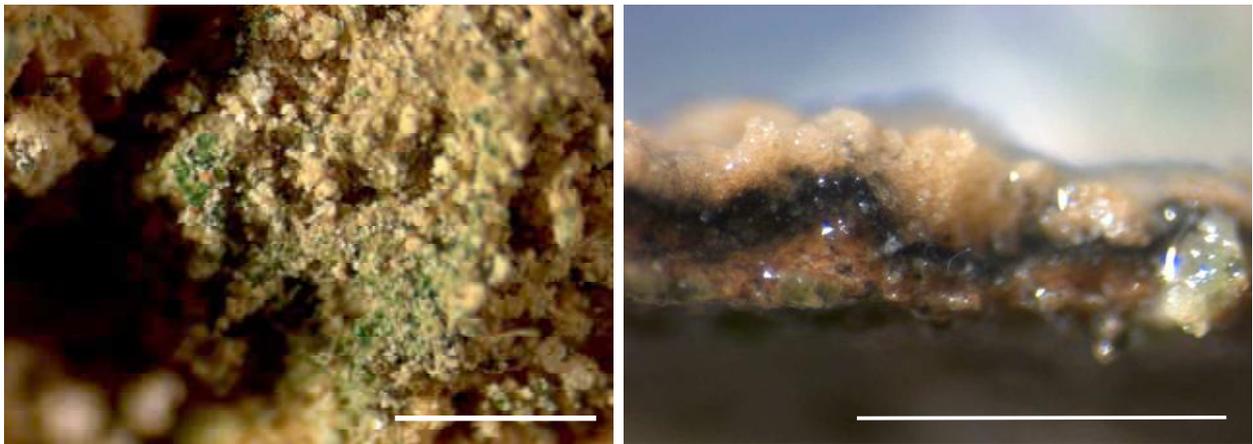


Figura 6.1. Microfotografías de la muestra Ne.1. A la izquierda, superficie que muestra distribución irregular de la pátina formada por microorganismos fotosintéticos. A la derecha, sección transversal de la muestra con organismos fotosintéticos superficiales, casmoendolíticos y criptoendolíticos y capa subsuperficial negra de carbón, paralela a la superficie (escalas 1 mm).

CLSM corroboró la distribución irregular del biofilm en el sustrato y permitió observar organismos en la superficie y en el interior de grietas y oquedades (Fig. 6.2). En la superficie de la muestra se observaron numerosas láminas de cristal, dispuestas en paralelo, entre las que se disponían organismos (Fig. 6.2).

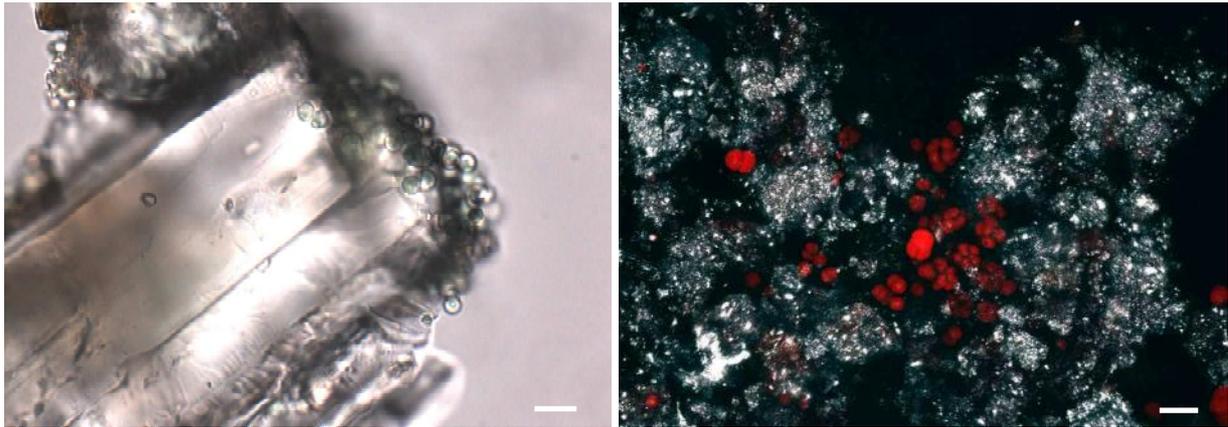


Figura 6.2. A la izquierda, microfotografía óptica de cristal de calcita de Ne.1 recubierto de microorganismos fotosintéticos. A la derecha imagen CLSM de intensidad de proyección máxima de autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (rojo) y de reflexión de las partículas de mineral (blanco). La imagen permite observar la presencia de organismos en el interior del sustrato. (escalas 10 μm)

Los organismos observados en las muestras presentaban dos morfologías principales. Una de ellas se formaba por células esféricas o subsféricas de diámetro comprendido entre 4-7 μm , carentes de núcleo, cloroplastos y mitocondrias y rodeadas por una vaina incolora, de grosor variable, que las envolvía individualmente o en agregados. La mayoría de los individuos con esta morfología mostró división por fisión binaria en planos irregulares. En una muestra obtenida en noviembre, se observó la formación de baeocitos: células pequeñas no móviles, formadas a partir de múltiples fisiones en la célula madre. El otro grupo morfológico, menos abundante, se formaba por células más pequeñas, de aproximadamente 3 μm de diámetro, sin vaina y con un único cloroplasto discoidal sin pirenoide. Estas morfologías permitieron la identificación de los grupos taxonómicos correspondientes a la cianobacteria *Chroococciopsis* sp. y al alga roja *Cyanidium* sp., respectivamente. El análisis de la fluorescencia de los pigmentos y de la ultraestructura de los organismos permitió observar la coexistencia de individuos vivos y muertos en el biofilm.

Bajo el biofilm fotosintético de una de las muestras de esta zona se observó una capa de color negro intenso y grosor máximo de 0,15 mm, a una profundidad de la superficie comprendida entre 0,15 – 0,3 mm. Un corte transversal de este fragmento incluido en resina permitió observar una estructura, desde la superficie de la muestra y hacia el interior, en la que se diferenciaban tres zonas: la más externa, que presentaba el biofilm, otra intermedia, que contenía la capa de carbón y la más interna, que mostraba una importante disgregación de los componentes, más acorde con la de una capa superficial en otros puntos de análisis. (Fig. 6.3).

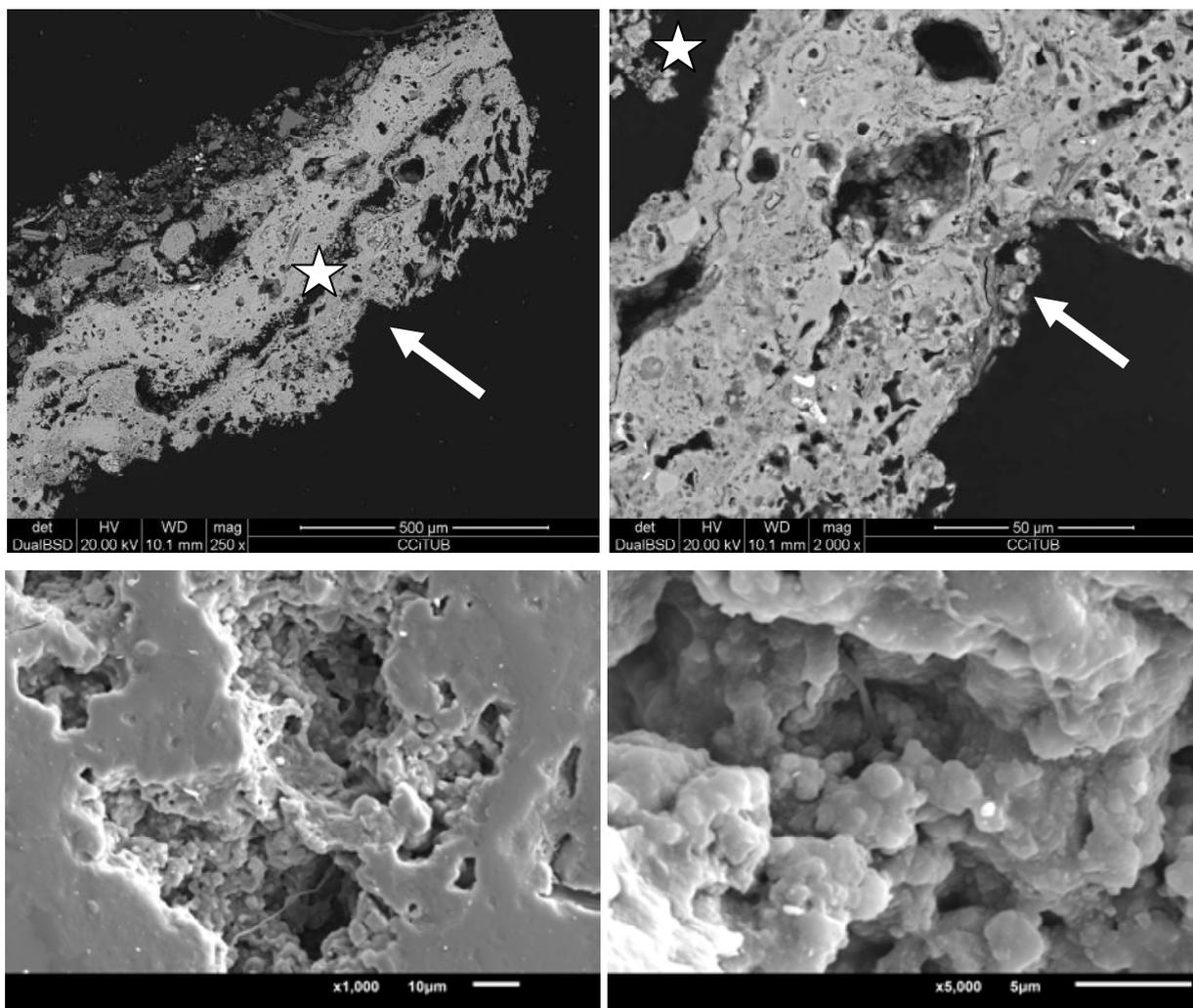


Figura 6.3. Arriba, microfotografías SEM–BSE. Vista general de un corte transversal de la muestra de Ne.1 incluida en resina epoxy, que muestra una línea negra (estrella) correspondiente a la capa de carbón tipo *black carbon*, analizada mediante espectroscopia Raman. Los microorganismos se encuentran dispuestos en concavidades superficiales como en el interior de poros del sustrato (flecha). Debajo, ampliación de las imágenes superiores que muestran la modificación del sustrato debida a la colonización por microorganismos y la presencia de depósitos en el interior de las cavidades.

Para profundizar en el origen de esta capa se analizó mediante espectroscopia Raman (Unidad Raman, Centro Científico y Tecnológico, Universidad de Barcelona) (Anexo 4). Los resultados indicaron la presencia de carbono amorfo, tipo *black carbon*, con una banda de fosfato asociable a la hidroxiapatita (Fig. 6.4). El análisis químico del sustrato identificó cristales de fosfato y calcio (feldespato, plagioclasas y apatita o hidroxiapatita) y de carbonato cálcico junto con arcilla y, posiblemente, murcielaguina (6.4).

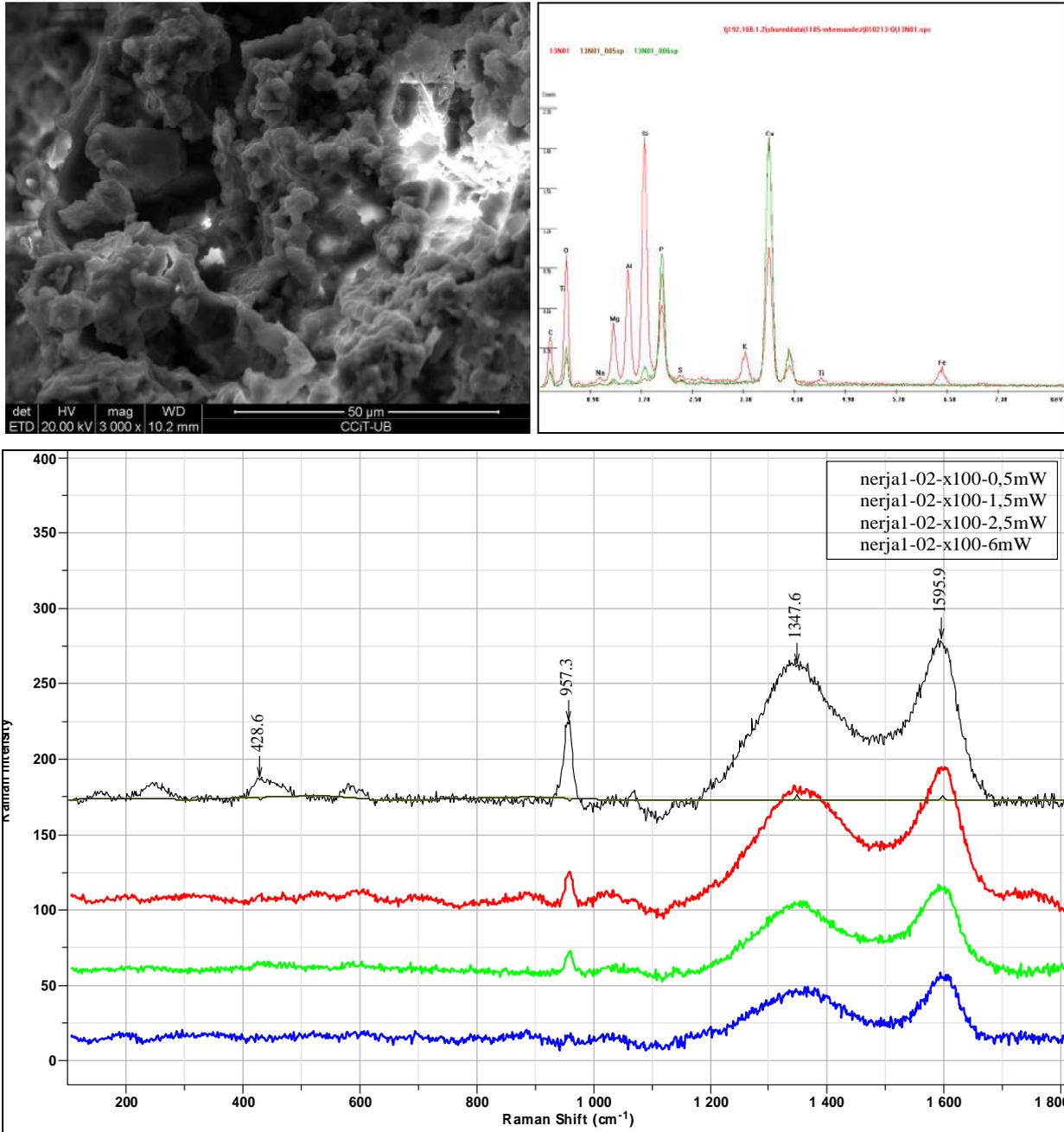


Figura 6.4. Arriba imagen SEM de la superficie de la muestra Ne.1 y comparativa de espectros XRD obtenidos en cuatro puntos de la muestra, tres de ellos con una composición química similar, formado por cristales de fosfato y calcio y un cuarto con mayor proporción de arcilla. Los distintos máximos revelan la irregularidad de la composición del sustrato en puntos muy próximos, debido a la mezcla de calcita y arcilla. El contenido de fósforo podría estar relacionado con la presencia de murcielaguina. Debajo, espectro Raman de la capa subsuperficial negra que muestra la composición de *black carbon*.

Ne.2

Las muestras presentaban un biofilm superficial de color verde intenso que, ocasionalmente, se tornaba azulado. Este biofilm se extendía irregularmente por la superficie donde también se observaron numerosos fragmentos de cristal (Fig. 6.5). La imagen estereoscópica de una cara lateral de una de las muestras permitió observar la disposición paralela de cristales transparentes así como la presencia de organismos entre éstos (Fig. 6.5). La profundidad máxima a la que se observó el biofilm fue cercana al 1 mm, si bien su desarrollo fue más intenso en la zona menos profunda. La disposición de los organismos fue, mayoritariamente, en agregados, más frecuentemente cuando el biofilm se distribuía en los huecos del sustrato, tal y como puso de manifiesto con microscopía láser confocal (Fig. 6.5).

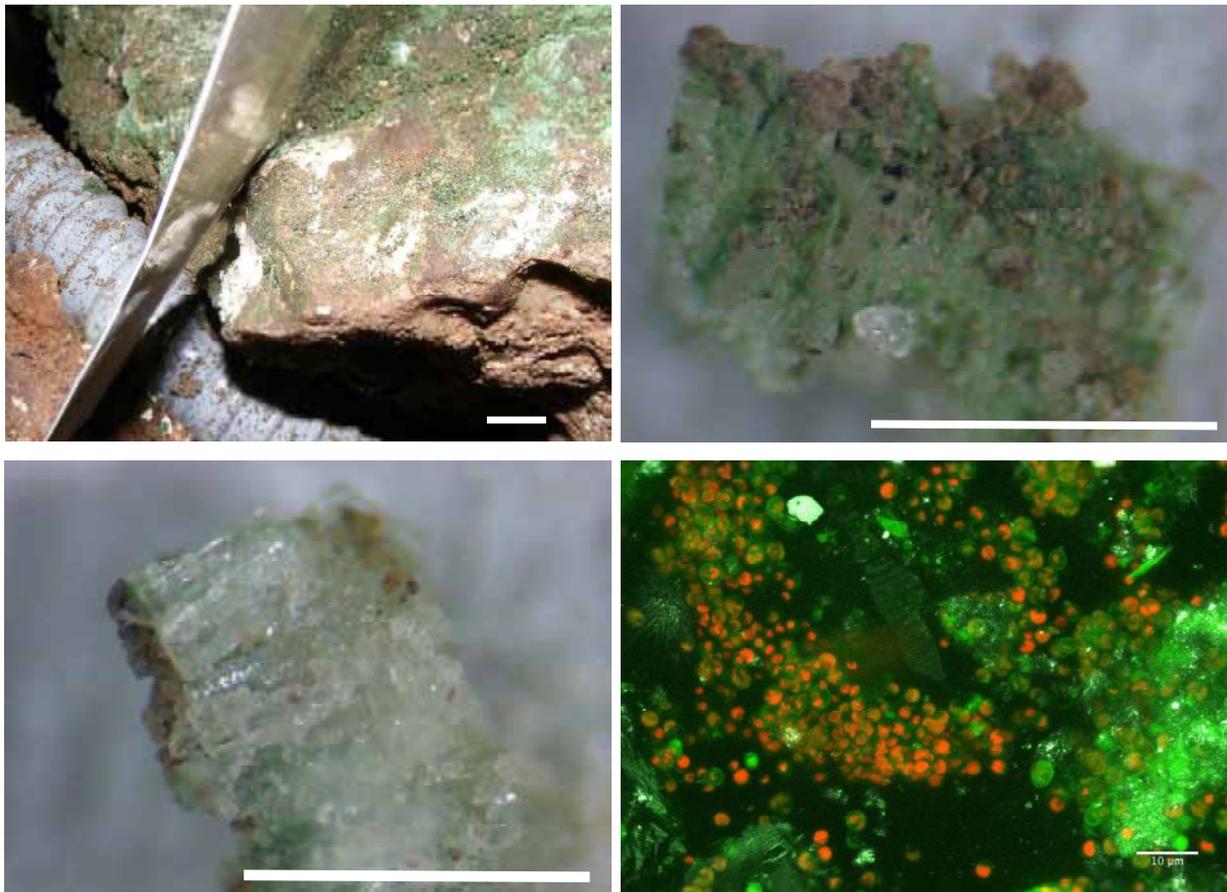


Figura 6.5. Arriba izquierda, aspecto macroscópico de la zona donde se obtuvo la muestra Ne.2 (escala 10 mm). Arriba derecha imagen estereoscópica de la superficie de la muestra, que muestra distribución irregular de los organismos en el sustrato. Debajo izquierda, imagen estereoscópica de cara lateral de la muestra donde se observan cristales en disposición paralela y, entre ellos, organismos fotosintéticos (escala 1 mm). Debajo derecha, imagen CLSM con proyección de intensidad máxima de autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (rojo) y de las vainas EPS (verde). La imagen también muestra la reflexión del sustrato (blanco) (escala 10 μ m).

Las morfologías de los organismos fotosintéticos observados en el biofilm motivaron la descripción de tres grupos. Uno de ellos de células esféricas o subesféricas, con diámetro comprendido entre 4-7 μm , y rodeadas por una vaina incolora. Algunas de estas células mostraban agregados de células hijas a partir de una célula maternal y llegaron a superar las 10 μm de diámetro antes de romper la vaina para liberar a las células hijas.

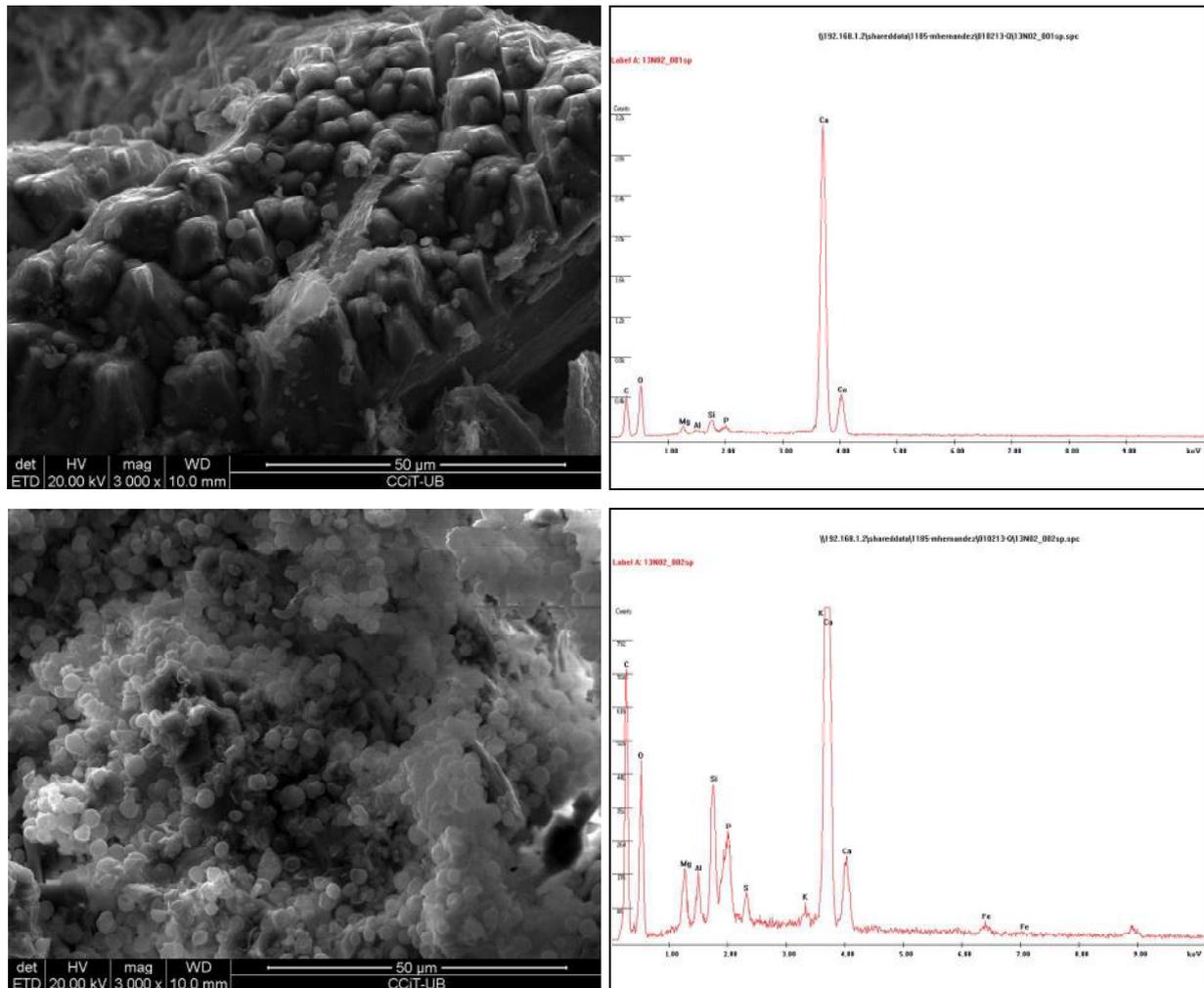


Figura 6.6. A la izquierda, microfotografías SEM de dos puntos de la muestra Ne.2. A la derecha, espectros XRD correspondientes a estos puntos. En las imágenes superiores se observa mayor proporción de cristales y menor número de organismos. Por el contrario, las imágenes de abajo muestran mayor proporción de arcilla y mayor crecimiento superficial de organismos.

Al igual que la muestra de Ne.1, en una muestra coetánea de la zona Ne.2 también se observó formación de baecitos. Este morfotipo fue identificado como *Chroococidiopsis* sp. Otro morfotipo, de abundancia similar en el biofilm, fue identificado como *Cyanidium* sp. y se formaba por células de 3 μm de diámetro aproximado y ausencia de vaina envolvente.

Finalmente, organismos morfológicamente asociables al género *Aphanothece* también fueron identificados en esta zona, pero en abundancia muy inferior. El análisis de la ultraestructura de los organismos mostró la coexistencia de diferentes estados fisiológicos dentro del biofilm.

El análisis elemental indicó que el sustrato se formaba por abundantes cristales de carbonato cálcico y arcilla, cuya proporción variaba en puntos próximos de la muestra (Fig. 6.6). Las muestras con mayor proporción de arcilla mostraron mayor concentración de organismos respecto de las muestras con mayor concentración cristales (Fig. 6.6).

Ne.3

El sustrato de las muestras mostró una colonización muy irregular por un biofilm de color verde que ocupaba, principalmente, las zonas más internas y espacios intersticiales del sustrato (Fig. 6.7).



Figura 6.7. A la izquierda, aspecto macroscópico de la colonización del sustrato por el biofilm en la zona Ne.3. Las flechas blancas señalan la presencia de excrementos de murciélago (escala 10 mm). A la derecha, imagen CLSM que representa la proyección de intensidad máxima de autofluorescencia de pigmentos fotosintéticos (rojo) y de vainas EPS (verde) junto con la reflexión del mineral (blanco) (escala 10 μ m).

Las técnicas de microscopía permitieron diferenciar dos grupos de organismos fotosintéticos en base a su morfología. Uno de ellos se formaba por individuos esféricos, con

tonalidad verde intensa muy homogénea, aislados o formando grupos, y de distintos tamaños, comprendidos entre 2,3-(7,0)-8,5. Estos organismos se encontraban rodeados por una vaina transparente que los envolvía individualmente o en agregados. Las divisiones observadas fueron irregulares mayoritariamente, más regulares en la fase inicial y, posteriormente, se tornaban más irregulares. Ocasionalmente, se observaron células que albergaban numerosas células redondeadas e inmóviles que eran liberadas al romperse la pared de la célula madre, identificadas como baeocitos. Este grupo se relacionó con *Chroococidiopsis* sp.

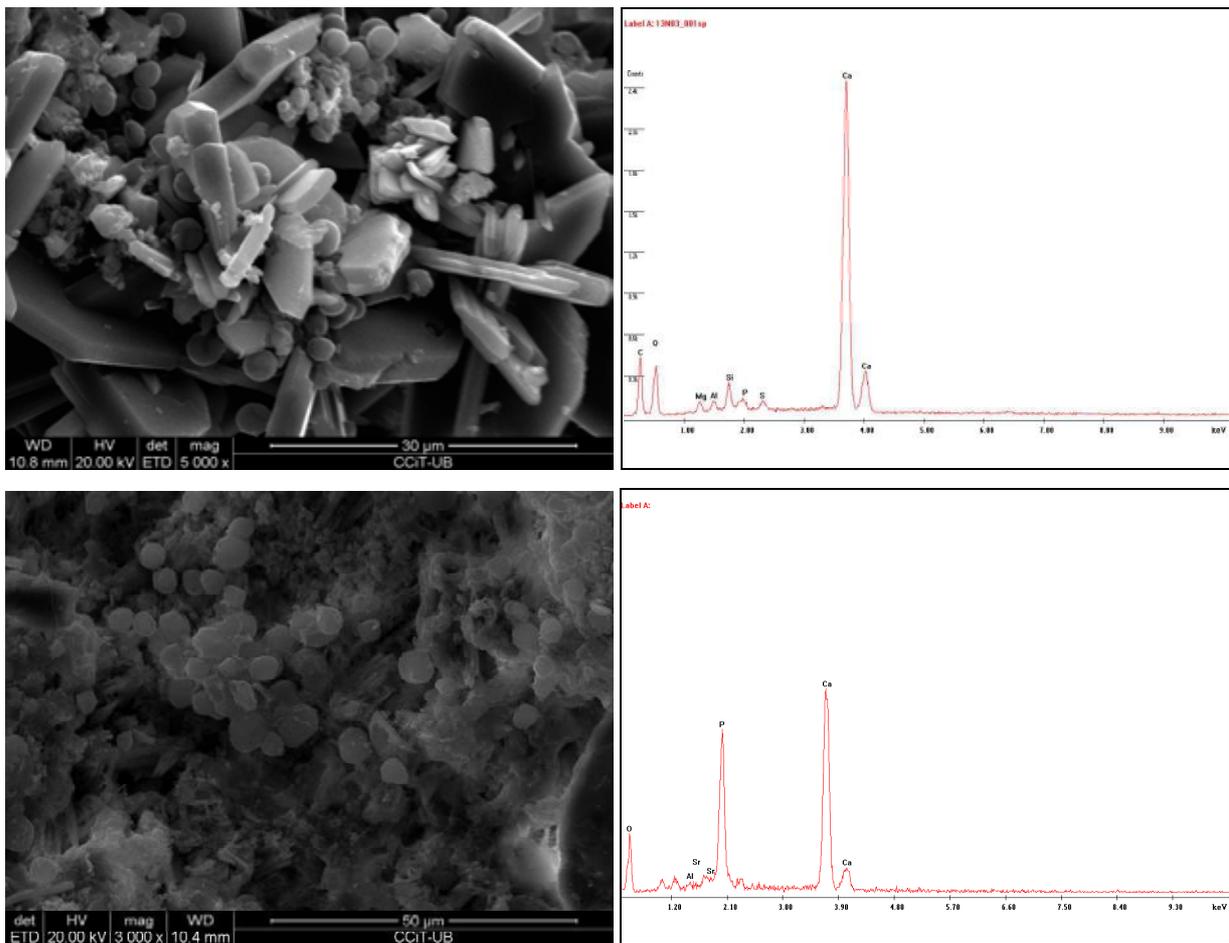


Figura 6.8. A la izquierda, microfotografías SEM de dos puntos de la muestra Ne.3. A la derecha, espectros XRD correspondientes a estos puntos. Las imágenes superiores permiten observar una zona de la muestra cuyo espectro indica la presencia, prácticamente exclusiva, de cristales de carbonato cálcico. Las imágenes inferiores muestran una zona de la muestra, muy próxima a la anterior, con mayor número de organismos y un importante pico de fósforo en el espectro.

Las imágenes de la superficie del sustrato mostraron abundantes cristales dispuestos en paralelo, muchos ellos con evidencias de deterioro como, por ejemplo, pequeñas zonas de disolución en los cristales. Entre estos cristales y en cavidades del sustrato se observó otro

morfotipo formado por organismos esféricos, de unas 3 μm de diámetro, que se asociaron al género *Cyanidium* (Fig. 6.9). El análisis de la composición química de la muestra determinó la presencia de abundantes cristales de carbonato cálcico. Este análisis mostró, ocasionalmente, picos de fósforo que podrían estar relacionados con los abundantes excrementos de murciélago (murcielaguina) observados en la zona de muestreo. Al igual que en Ne.1 y Ne.2, las muestras con mayor cantidad de cristales mostraron la presencia de un menor número de organismos respecto de las muestras con mayor cantidad de arcilla, en las que se pudo observar mayor presencia orgánica (Fig. 6.8).

Mediante la microscopía confocal y de transmisión identificó organismos en diferentes condiciones fisiológicas dentro de una misma colonia. Con relativa frecuencia, se observaron numerosos individuos muertos en el biofilm, que solían estar rodeados de pequeños organismos sin fluorescencia, compatibles con bacterias, junto a otros organismos cuyas imágenes de ultraestructura mostraban una aparente reordenación de los tilacoides (Fig. 6.9).

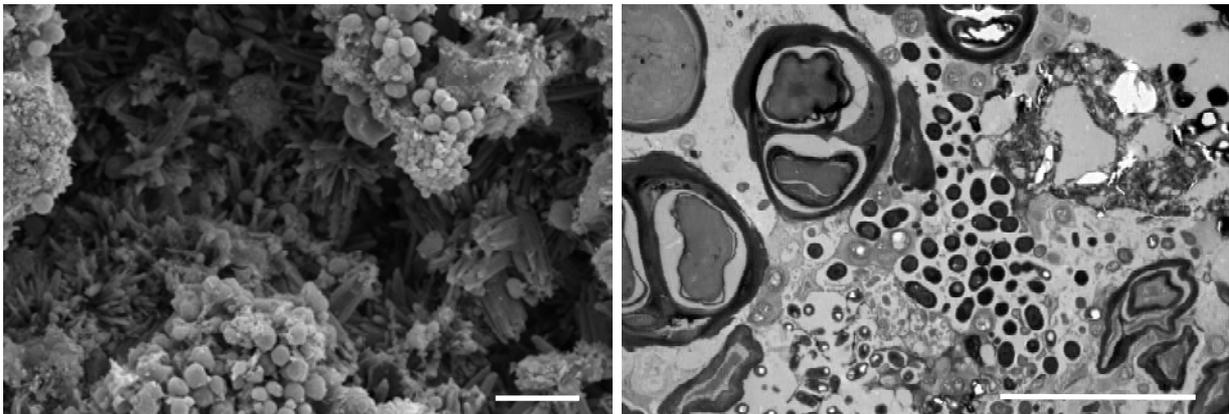


Figura 6.9. A la izquierda, microfotografías SEM de Ne.3 que muestra la presencia de cristales de calcita y organismos adheridos a éstos, que también se desarrollan en oquedades de la superficie (escala 20 μm). 3. A la derecha, imagen TEM de Ne.3 que muestra colonia con la mayoría de organismos fotosintéticos en malas condiciones y, junto a éstos, numerosas bacterias, probablemente heterótrofas. Los organismos en buenas condiciones presentan vacuolas y una aparente reorganización de tilacoides previa a la fase de división celular.

Ne.4

En la Sala de la Torca la capa de microorganismos fotosintéticos es visible por su coloración en distintas tonalidades de verde. En el año 2007 se obtuvieron muestras de 4 zonas diferentes de la Sala de la torca: Ne.4(1) Ne.4(2), Ne.4(3) y Ne.4(4). Todas las muestras presentaban colonización del sustrato por biofilms con diversas tonalidades de verde, que abarcaban desde verde intenso o tenue hasta azulado, si bien en Ne.4(1) y Ne.4(4) se observó un mayor desarrollo del biofilm (Fig. 6.10).

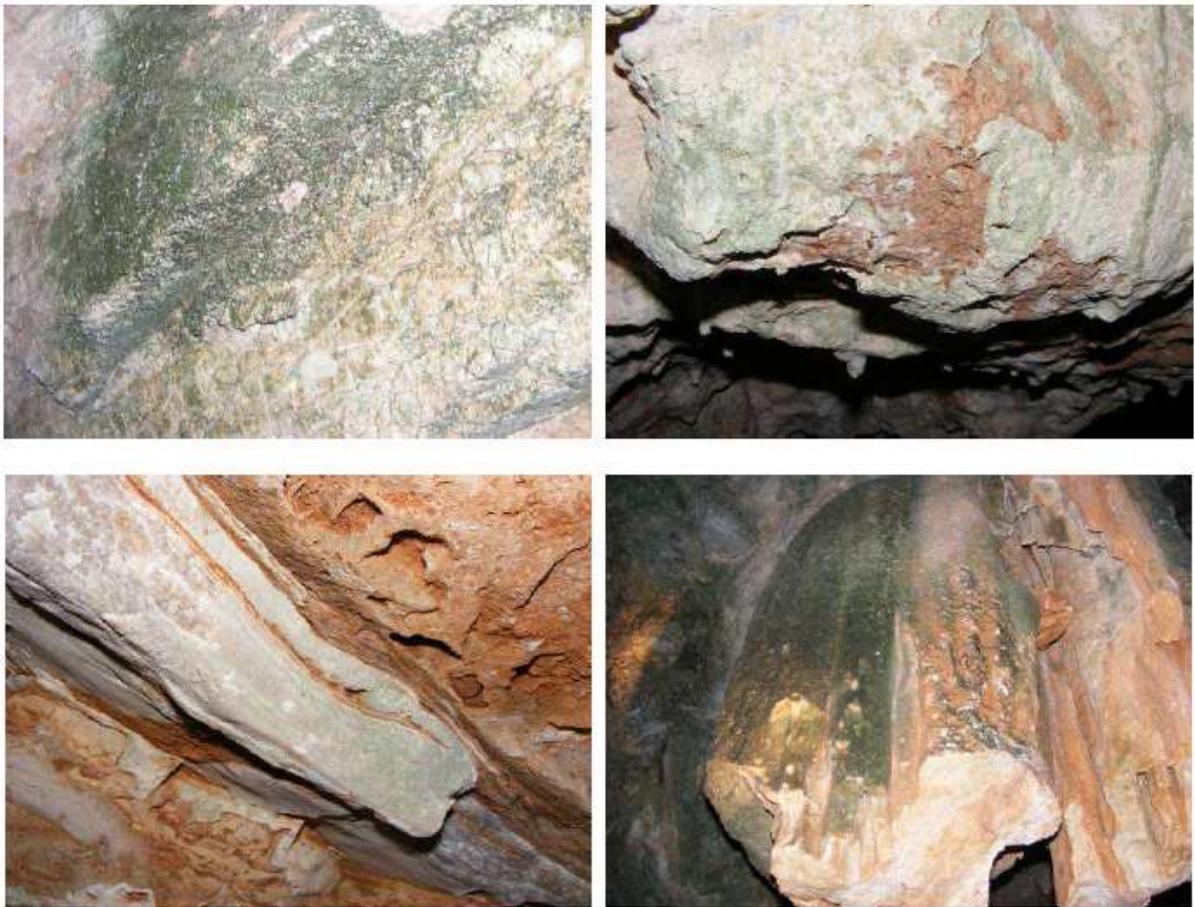


Figura 6.10. Imágenes de las 4 superficies muestreadas en la Sala de la Torca. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: Ne.4(1) Ne.4(2), Ne.4(3) y Ne.4(4)

La microscopía de luz transmitida permitió observar organismos y su distribución en el sustrato, en ocasiones asociada a cristales de neoformación. Microorganismos o sus restos se observaron, tanto superficialmente como en el interior de cavidades, en todas las muestras (Fig.

6.11). La alteración de la capa más superficial del soporte debida a la presencia de organismos ligados a partículas de sustrato se observó macroscópicamente y se corroboró mediante microscopía SEM (Figs. 6.12 y 6.13). El análisis composicional de la muestra indicó la presencia de cristales de carbonato cálcico y de carbonato cálcico y magnésico, junto con arcilla (Fig. 6.15).

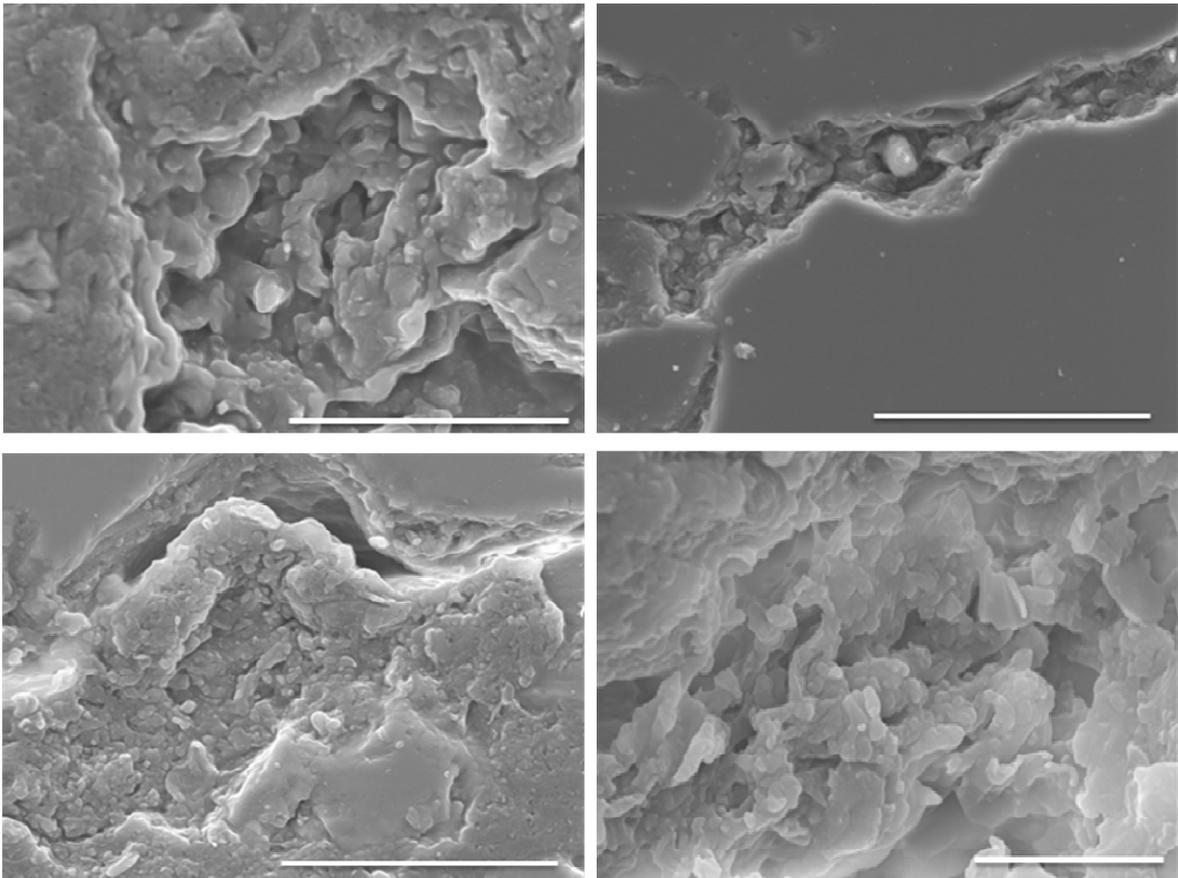


Figura 6.11. Microfotografías SEM. Vista general de cortes transversal de las 4 zonas de la Torca, incluidas en resina epoxy y metalizadas con oro. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: Ne.4(1), Ne.4(2), Ne.4(3) (escala 30 μm) y Ne.4(4) (escala 10 μm). La distribución de los microorganismos o sus restos se observó tanto en superficie del sustrato como en las concavidades y zona interna de los poros.

Tanto el grosor como la profundidad alcanzada por el biofilm en el sustrato fueron diferentes para cada una de las zonas evaluadas. A pesar de que la microscopía óptica permitió observar organismos fotosintéticos, o sus vainas vacías en todas las muestras, mediante CLSM, en la zona Ne.4(3) no se detectaron microorganismos con fluorescencia, mientras que en la zona Ne.4(2) la fluorescencia fue muy débil. En las otras zonas, los microorganismos fotosintéticos, revelados mediante fluorescencia y por lo tanto activos, no se identificaron a profundidades

superiores a 1 mm (Fig. 6.12). No obstante microorganismos aún viables a profundidades superiores podrían estar presentes, pero con fluorescencia difícilmente detectable.

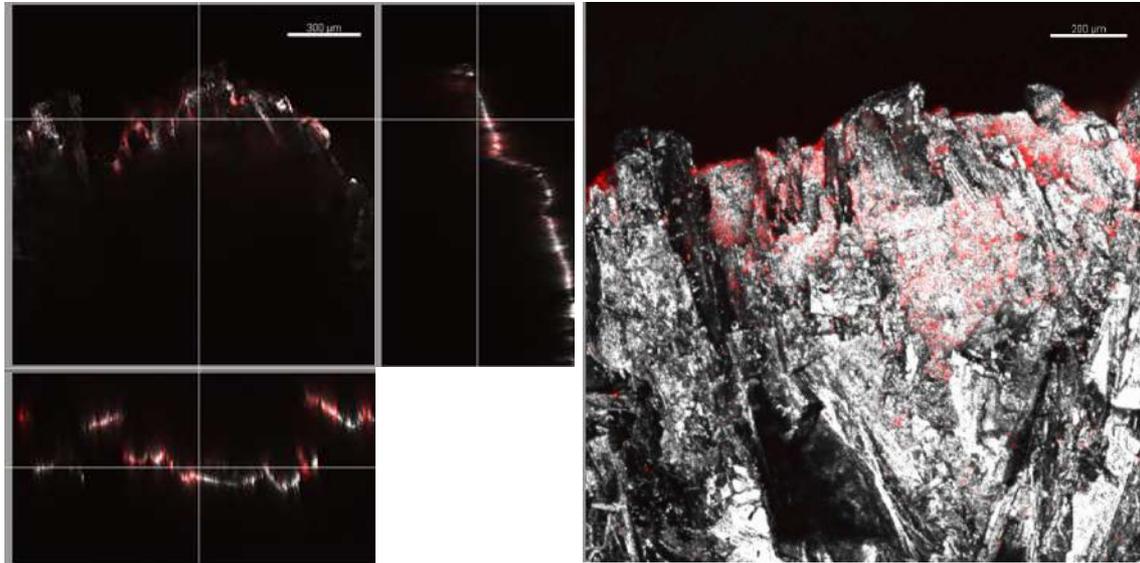


Figura 6.12. Microfotografías CSLM de muestra Ne.4(1) con máxima intensidad de proyección de la autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (rojo). A la izquierda, sección individual, a la derecha, composición de 152 imágenes. Grosor total 873,4 µm (escalas 200 µm).

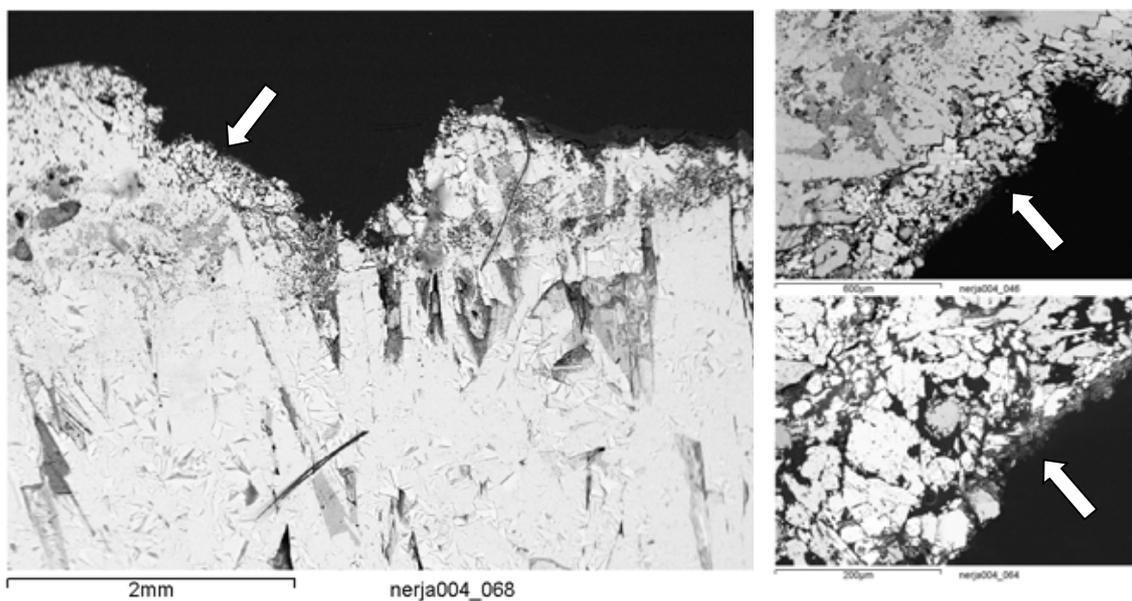


Figura 6.13. Microfotografías SEM-BSE de muestra Ne.4(1) que permiten observar la relación entre los biofilms y el sustrato, con presencia de microorganismos entre los gránulos de sustrato y deterioro de la capa más superficial (flechas).

En general, los microorganismos con baja intensidad de fluorescencia presentaban una gruesa vaina envolvente, mientras que los que se mostraron muy fluorescentes poseían una fina vaina. La matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se observó irregularmente distribuida, posiblemente recubriendo microorganismos heterótrofos (Fig. 6.14). Las técnicas de microscopía determinaron la presencia de la cianobacteria *Chroococidiopsis* sp. En Ne.4(1), la muestra obtenida en el año 2007 mostró también a la cianobacteria *Nostoc punctiforme* que sólo volvió a observarse en una ocasión posterior, aunque en malas condiciones.

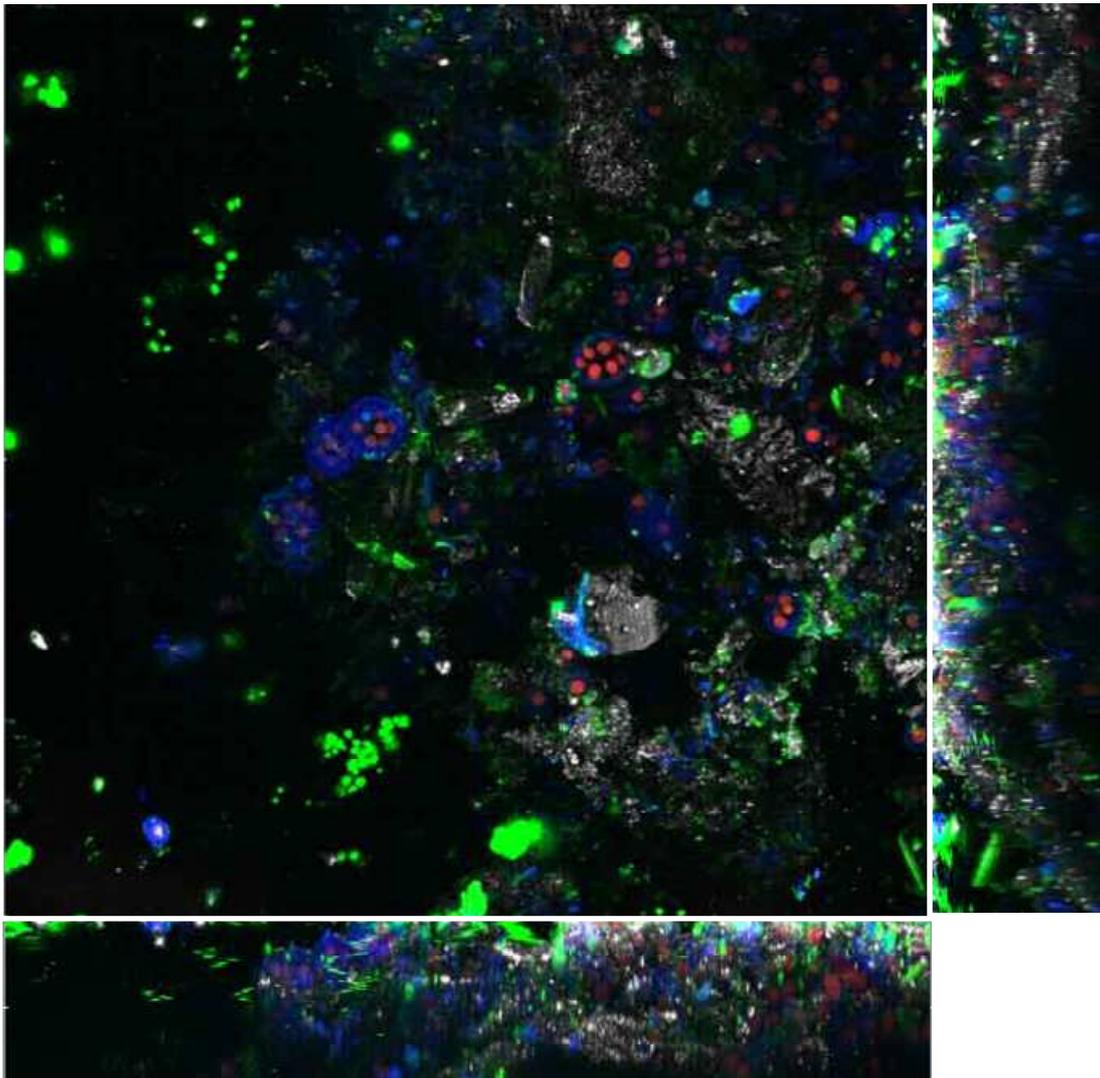


Figura 6.14. Imagen CLSM de muestra procedente de Ne.4(4) con proyección tridimensional “extended focus” en x-y, x-z, y-z, interpolada en x-y y visualizada en z. Proyección máxima de fluorescencia simulada en tres canales. Identificación de los colores: reflexión de partículas minerales (blanco), autofluorescencia de clorofilas (azul), autofluorescencia de ficobilinas (rojo), autofluorescencia colocalizada de las cianobacterias en azul (clorofilas) y en rojo (ficobilinas) (magenta), EPS marcadas con ConA-Alexa 488 (verde). En este caso el color azul brillante corresponde a la fluorescencia inherente de las vainas de *Chroococidiopsis* sp.

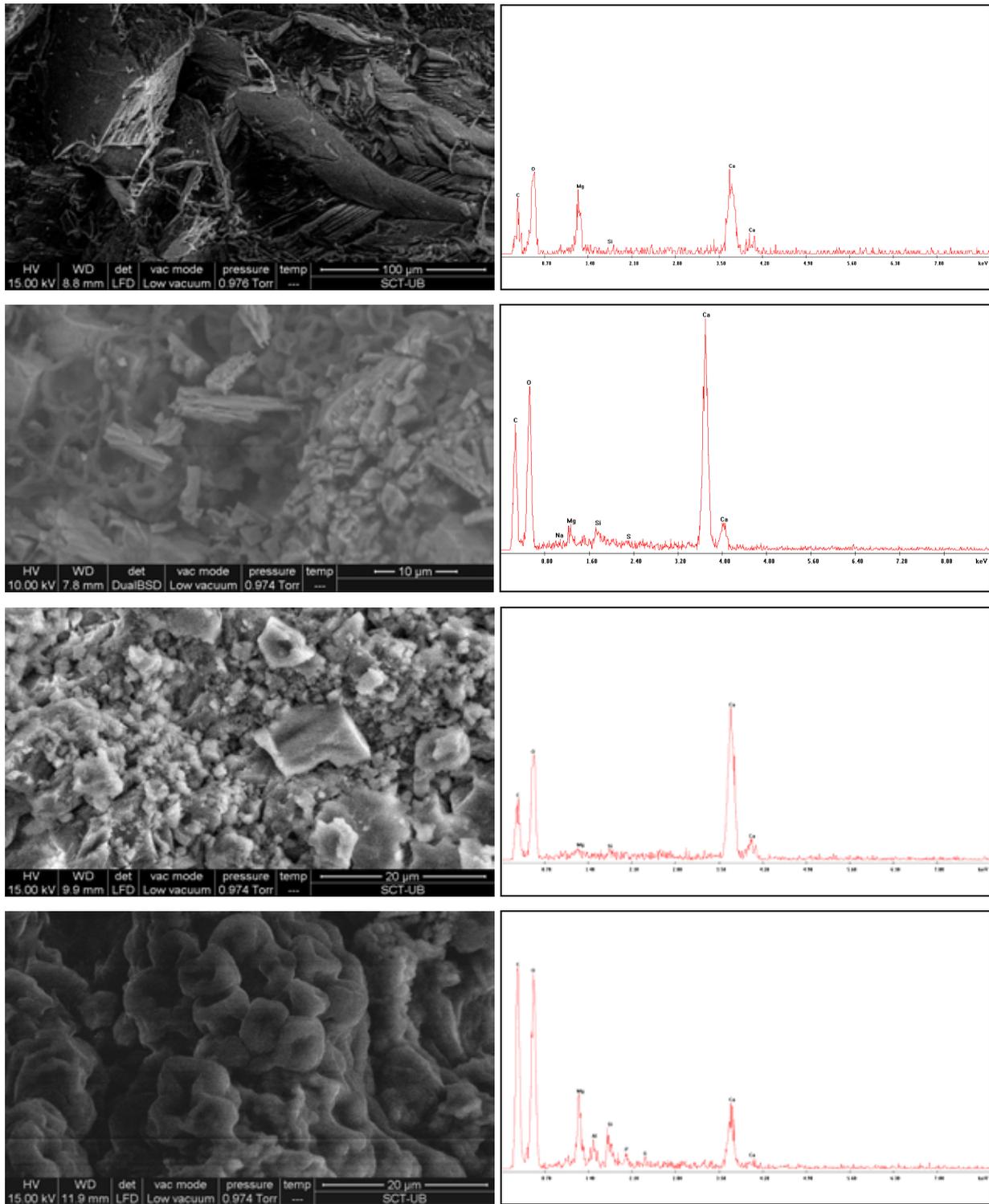


Figura 6.15. De arriba abajo, microfotografías SEM (izquierda) y espectros XRD (derecha) correspondientes a muestras de las zonas Ne.4(1), Ne.4(2), Ne.4(3) y Ne.4(4), respectivamente. Los espectros revelan una composición química muy similar formada, principalmente por cristales de carbonato cálcico y de carbonato cálcico y magnésico.

Ne.7

Las muestras analizadas contenían un biofilm de tonalidad verde intenso, con aspecto homogéneo y pequeño grosor, que no alcanzó una profundidad superior a 3 mm (Fig. 6.16). Este biofilm mostró un desarrollo irregular en el sustrato, donde también se observaron cristales sin organismos. Las técnicas de microscopía mostraron el desarrollo de los organismos en las zonas más internas del sustrato, como huecos y grietas (Fig.6.16).

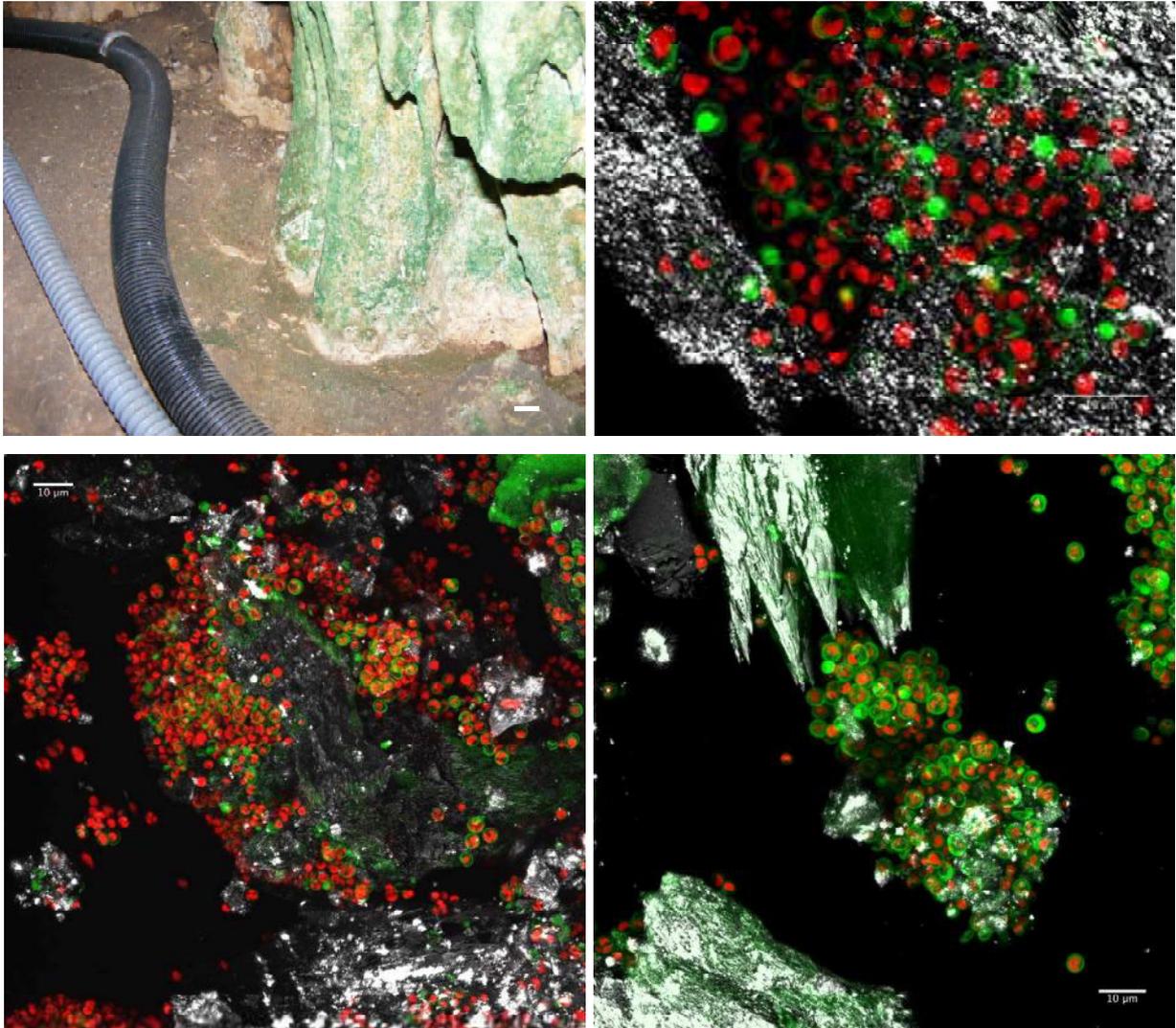


Figura 6.16. Arriba izquierda, aspecto macroscópico que muestra la colonización del sustrato en la zona Ne.7 (escala 10 mm). Resto, imágenes CLSM que muestran la proyección de intensidad máxima en dos canales de fluorescencia y uno de reflexión. Identificación de colores: autofluorescencia de pigmentos fotosintéticos (rojo), autofluorescencia vainas EPS (verde) y reflexión de partículas minerales (blanco). Se observa la adherencia extrema de los organismos al sustrato y su desarrollo, más intenso, en los huecos de éste (escalas 10 µm).

Las imágenes de CLSM pusieron de manifiesto técnicas de adherencia extrema de los organismos al sustrato así como su distribución en el biofilm, donde los organismos más próximos a la superficie poseían vainas más gruesas y los más interiores vainas más finas y mayor fluorescencia de sus pigmentos (Fig. 6.16). La única morfología celular identificada fue *Cyanidium* sp. que se relacionó con células esféricas uninucleadas con un cloroplasto discoidal. Mediante fluorescencia, ocasionalmente se pudieron observar las cuatro células resultantes de la división del organismo. El análisis de la ultraestructura de este organismo permitió observar colonias con microorganismos en diferentes estados fisiológicos (Fig. 6.18).

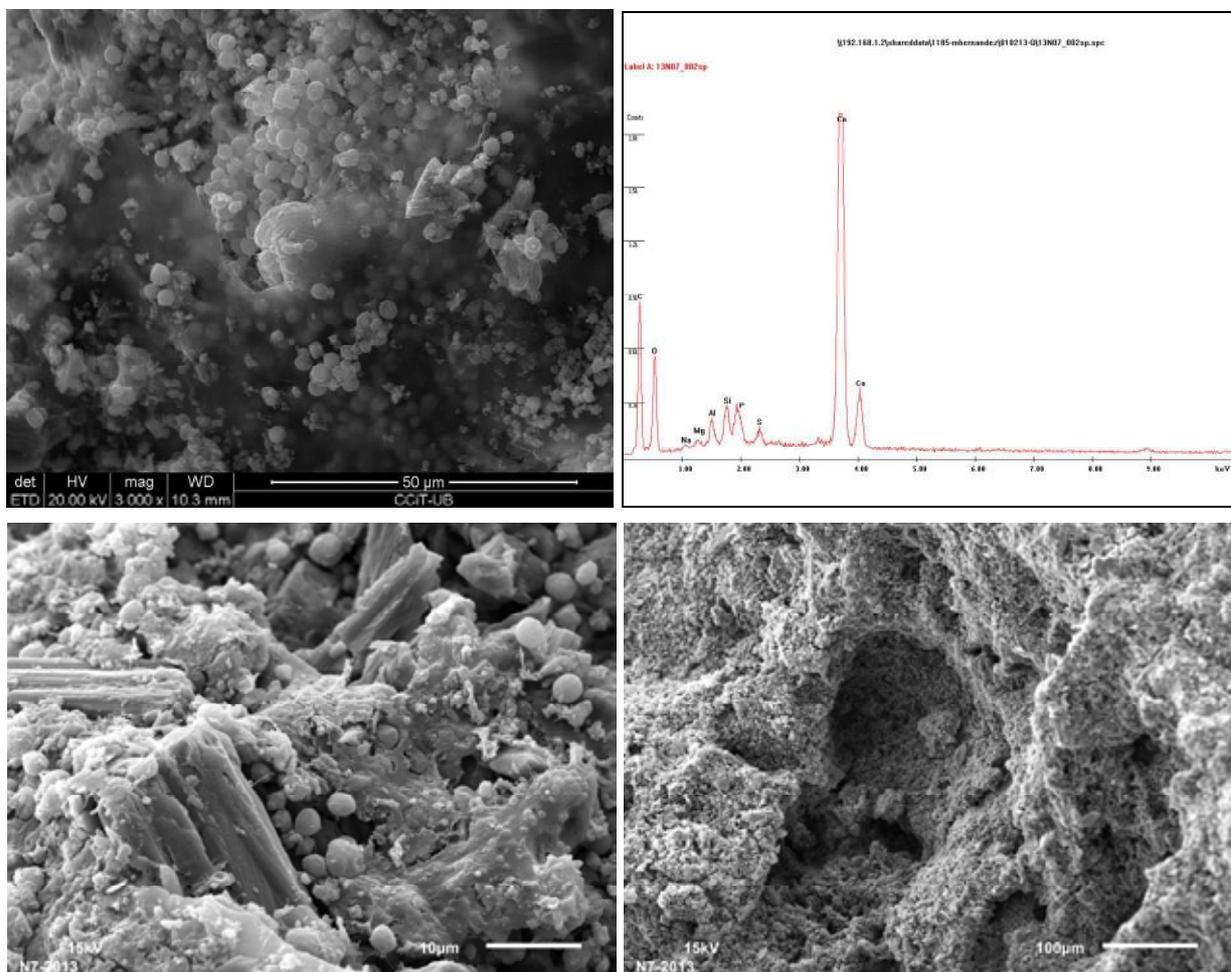


Figura 6.17. Arriba microfotografía SEM de un punto de la zona Ne.7 (izquierda) y espectro XRD correspondiente (derecha) que muestra un sustrato compuesto, mayoritariamente, por cristales de calcita. Debajo, microfotografías SEM que muestran la colonización del sustrato con mezcla de cristales y microorganismos esféricos y filamentosos.

La superficie de las muestras se caracterizó por la abundancia de cristales de calcita entre los que se pudieron observar organismos esféricos que, en ocasiones se encontraban rodeados

por filamentos, de 0,3 μm de diámetro aproximado, que no mostraban fluorescencia y de morfología semejante a actinobacterias (6.17). En comparación con otras muestras analizadas, Ne.7 contó con menor número de bacterias. La composición elemental del sustrato demostró que se encontraba formado, principalmente, por cristales de carbonato cálcico y arcilla, esta última en menor proporción.

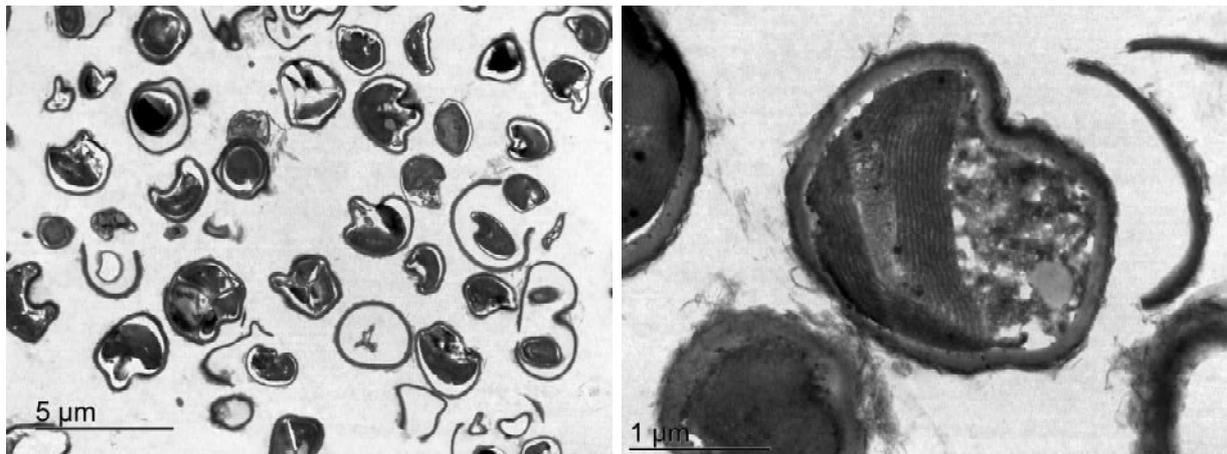


Figura 6.18. Microfotografías TEM. A la izquierda, colonia de *Cyanidium* sp. con la mayoría de organismos en condiciones fisiológicas desfavorables o senescentes. A la derecha, *Cyanidium* sp. con interior conservado y gruesa vaina.

Ne.8

Las muestras manifestaron un recubrimiento del sustrato por un biofilm de color verde y textura pulverulenta, que colonizaba, de forma casi homogénea, toda la superficie (Fig. 6.19). El aspecto general mostró individuos en malas condiciones, la mayoría con gruesas vainas, muchas vacías, y escasos procesos de división. Ocasionalmente se observaron divisiones celulares múltiples y vainas de menor grosor. La microscopía láser confocal permitió observar la fluorescencia natural de los pigmentos y la coexistencia de individuos vivos y muertos dentro de una misma colonia. Mediante reflexión, se identificó la presencia de cristales, tanto en la superficie del sustrato y, de forma puntual, sobre los organismos del biofilm. Desde un punto de vista tridimensional, los biofilms observados parecían presentar relación entre la profundidad a la que se encontraban los organismos en el sustrato y su estado fisiológico, de forma que los más viables se encontraban en las partes más profundas del biofilms. Se identificó un único grupo taxonómico, *Chroococcidiopsis* sp. formado por organismos fotosintéticos de forma esférica o

levemente alargada, unicelulares y de diámetro comprendido entre 7,4-(6,8)-2,0 μm , rodeados por una vaina individual que, ocasionalmente, envolvía agregados de células que eran resultado de la división celular (Figs. 6.19 y 6.21). En una de las muestras cultivadas en laboratorio, se identificó al alga verde *Choricystis chodatii* (Jaag) Fott, que resultó muy numerosa en cultivo. Este alga se consideró invasora debido a que no fue identificada en muestras sin cultivar.



Figura 6.19. Izquierda, imagen macroscópica de la zona Ne.7 (escala 10 mm). Derecha, imagen CLSM de proyección de intensidad máxima de fluorescencia y reflexión. Identificación de colores: autofluorescencia de pigmentos fotosintéticos (rojo), autofluorescencia EPS (verde) y reflexión de partículas minerales (blanco) (escala 10 μm).

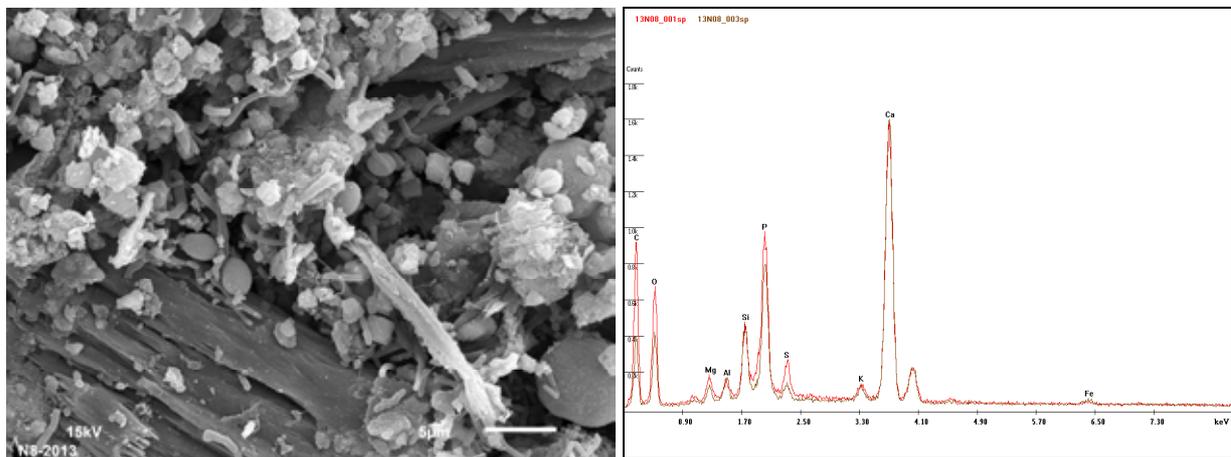


Figura 6.20. A la izquierda, microfotografía SEM de la superficie de Ne.8 colonizada por numerosos y diversos microorganismos, de diferente morfología y tamaño, que se adhieren a fragmentos de sustrato con evidentes signos de deterioro (escala 5 μm). A la derecha, comparativa de espectros XRD obtenidos en dos puntos de la muestra que muestran una composición química similar, formado por cristales de carbonato cálcico, arcilla y un pico de fósforo.

El análisis composicional de varios puntos de una muestra ofreció una composición química muy semejante entre ellos, con presencia de cristales calcita, arcilla y un notable

porcentaje de fósforo que podría estar relacionado con la presencia de materia orgánica (Fig. 6.20). No obstante, contrariamente a lo observado en la zona Ne.3, en esta zona no se determinó la presencia de restos de murcielaguina.

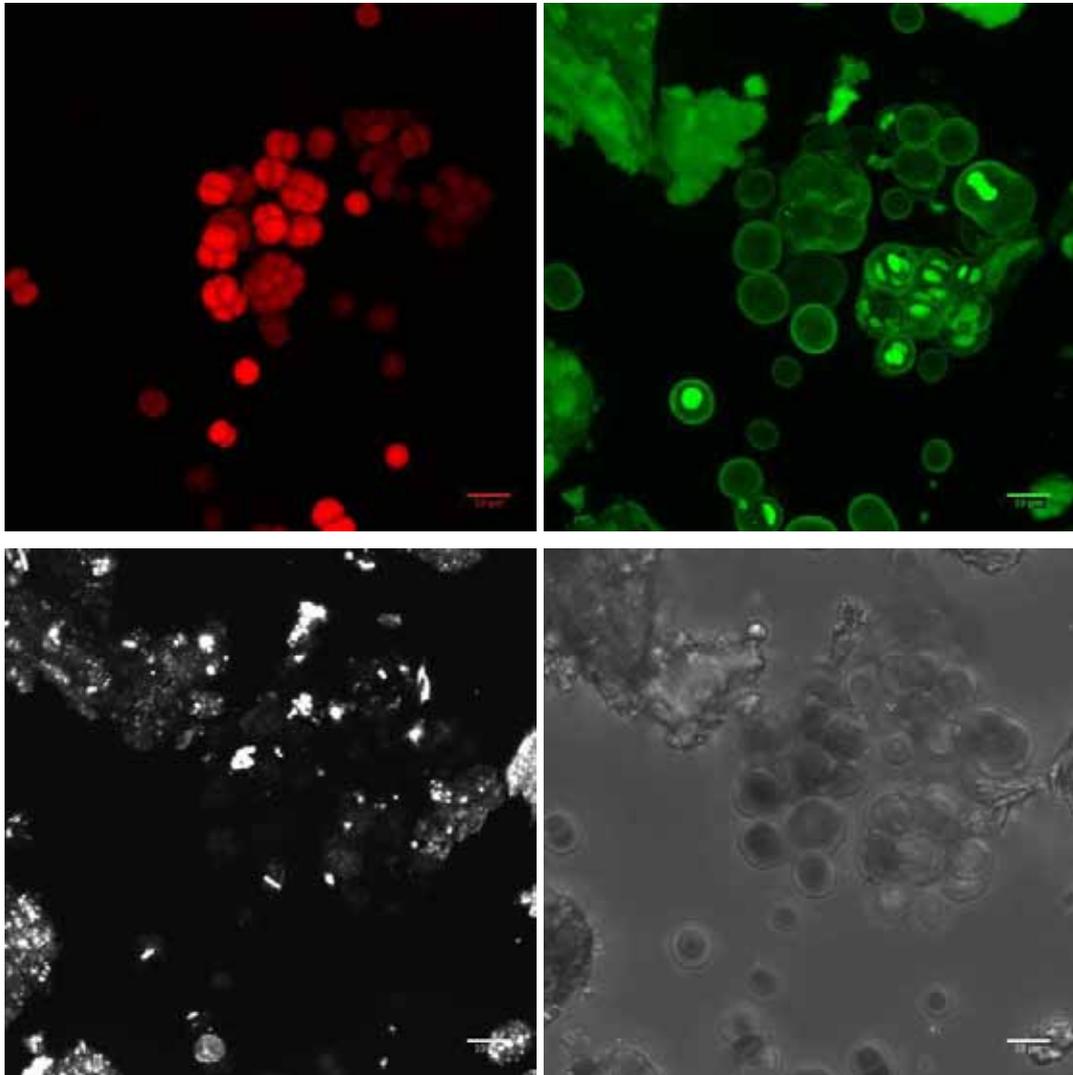


Figura 6.21. De arriba abajo y de izquierda a derecha, microfotografías CLSM de la misma zona de la muestra Ne.8 observada mediante intensidad de proyección máxima de los canales rojo, verde y de reflexión. La fluorescencia de los pigmentos (rojo) y de las vainas EPS (verde) permite conocer el estado fisiológico de los organismos. La reflexión del sustrato permite observar su depósito sobre los organismos (escalas 10 μ m).

Ne.9

Los biofilms fotosintéticos de las muestras analizadas presentaron un aspecto pulverulento, con diferentes tonalidades de verde, que abarcaron desde el verde amarillento hasta el verde azulado (Fig. 6.22). Mediante estereoscopía se observó, ocasionalmente, el desarrollo de organismos verdes y otros de tonalidad rojiza, compatibles con la morfología de cuerpos fructíferos de hongos (Fig. 6.22). En una de las muestras, obtenida en el año 2008, se observó la presencia de cianobacterias filamentosas, de morfología asociable a *Leptolyngbya* sp., junto con células que podrían corresponder a los géneros *Jenufa* y *Apanothece*. También se observaron individuos pequeños y solitarios, con un gran plasto en copa y en proceso de división y sin pirenóide, que se identificaron como *Cyanidium* sp. La microscopía TEM permitió observar grandes grupos de organismos con vainas muy gruesas y tilacoides concéntricos que forman un triángulo. Entre los organismos, también hubo abundantes restos de vainas vacías de *Leptolyngbya* y de una diatomea junto con numerosas bacterias, más abundantes cerca de los restos de vainas vacías citados.

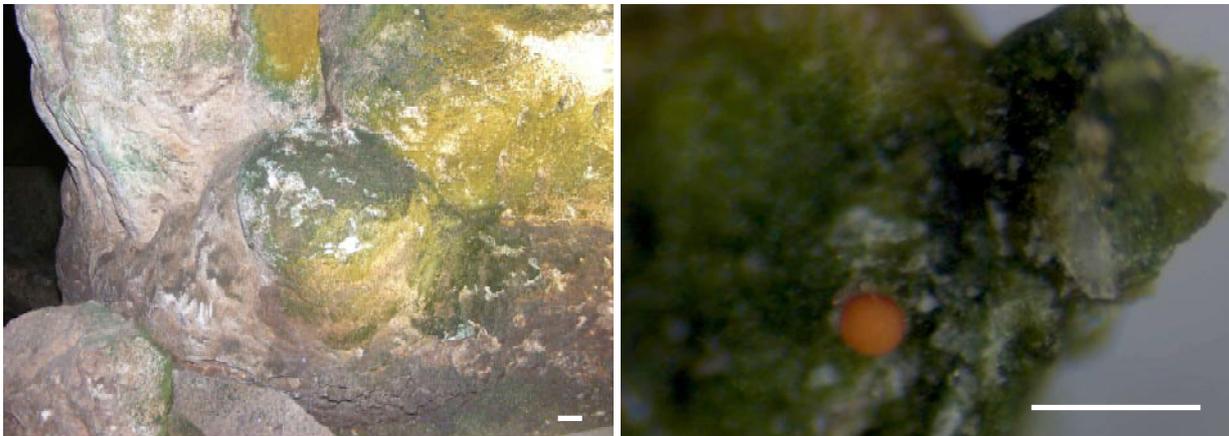


Figura 6.22. A la izquierda, aspecto macroscópico de la colonización del sustrato por el biofilm en la zona Ne.9 (escala 10 mm). A la derecha, detalle de la colonización del sustrato que presenta estructura orgánica rojiza y esférica (escala 250 μ m).

En las muestras obtenidas en noviembre de 2012, tan sólo se identificaron organismos fotosintéticos morfológicamente asociables a *Chroococidiopsis* sp. Ocasionalmente, se observaron células maternas con numerosas células hijas rodeadas por vainas individuales y protegidas, en conjunto, por una vaina maternal. Estas células madre albergaban un mayor

número de células hijas viables en relación con las muertas. Junto a estas cianobacterias también se encontraron filamentos que no mostraron fluorescencia de pigmentos que, por su morfología y diámetro (1-2 μm), podrían corresponder a actinobacterias.

Mediante SEM se puso de manifiesto una distribución muy irregular de organismos cocoides en el sustrato, que mostraba un aspecto muy disgregado. La composición elemental del sustrato determinó la presencia de cristales de carbonato cálcico junto con arcilla, con mayor abundancia de organismos en las zonas que tenían más arcilla. En estas zonas con mayor cantidad de arcilla y organismos, también se observó un pico de fósforo que podría tener su origen en la murcielaguina de la sala (Fig. 6.23).

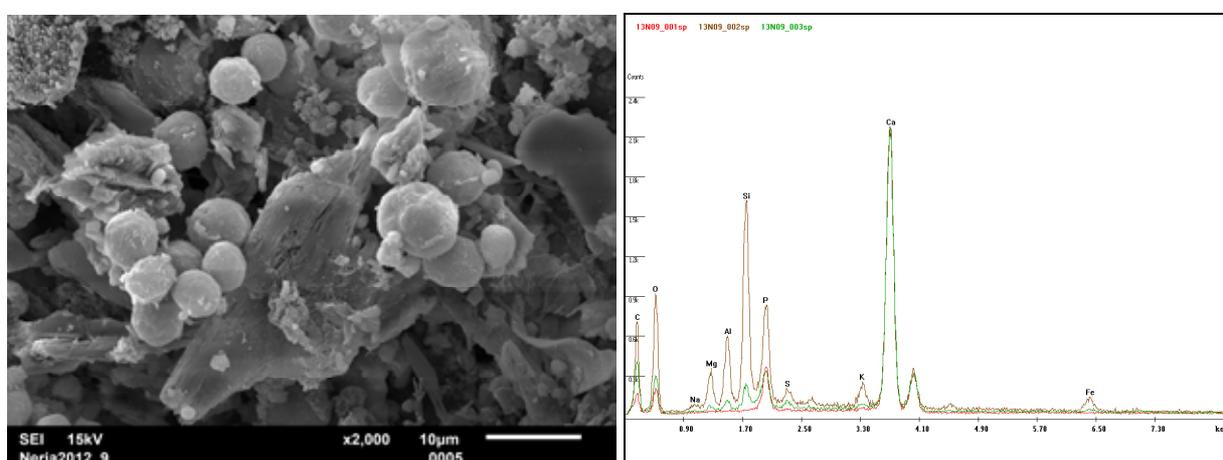


Figura 6.23. A la izquierda, microfotografía SEM de muestra de la zona Ne.9 A la derecha, espectros XRD correspondientes a tres puntos de una de las muestras de esta zona. La superposición de espectros informa de la presencia de cristales de carbonato cálcico en todas las muestras. El espectro que indica mayor porcentaje de arcilla se determinó en un punto con mayor cantidad de organismos, en relación con el resto de puntos analizados. Este espectro también mostró un importante pico de fósforo.

Ne.10

El biofilm mostró varias tonalidades de verde, más intenso cuando esta entidad ocupaba el interior de grietas y oquedades del sustrato. La superficie de las muestras presentó un aspecto irregular, con pequeñas áreas de sustrato sin colonizar. La visión estereoscópica confirmó que la mayoría de estas zonas, despobladas de biofilm, se correspondían con cristales blanquecinos semitransparentes. Tal y como se ha descrito en el capítulo 4 de la presente memoria, en la zona Ne.10 se observó, estacionalmente, la presencia una colonia de psocópteros (*Psyllipsocus*

ramburii, Selys-Longchamps, 1872), junto a otros artrópodos, que se nutren del biofilm. Junto a estos individuos también se encontraban colonias de hongos filamentosos (Fig. 6.24).

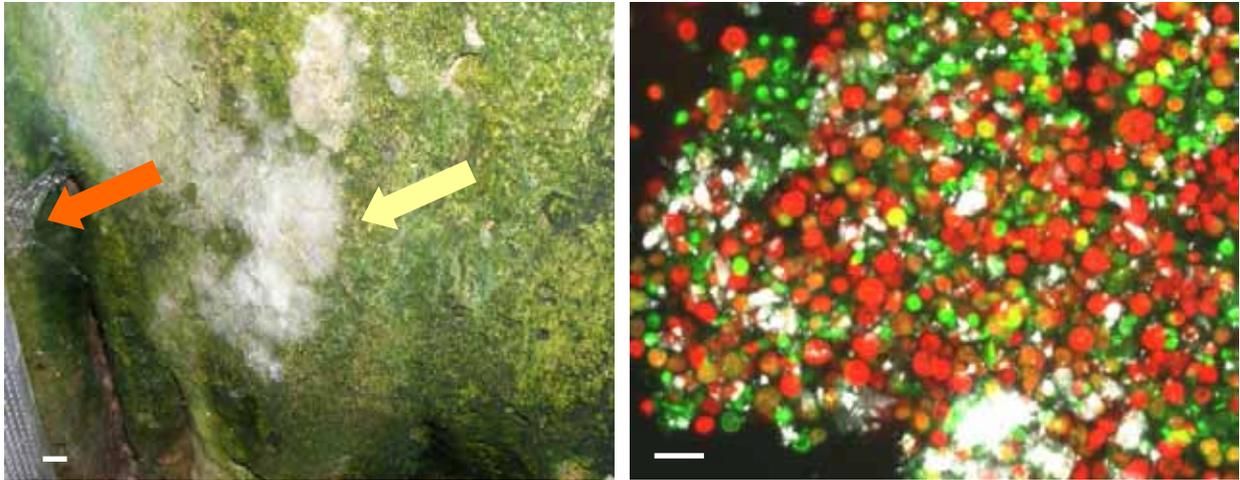


Figura 6.24. A la izquierda, aspecto macroscópico de la colonización del sustrato por el biofilm en la zona Ne.10 con presencia de colonia de hongos filamentosos (flecha amarilla) y una telaraña (flecha naranja) (escala 10 mm). A la derecha, microfotografía CLSM que muestra proyección de intensidad máxima de fluorescencia de pigmentos (rojo) y de vainas EPS (verde). En blanco, reflexión de los componentes inorgánicos del biofilm (escala 10 μm).

El estudio del biofilm mostró su composición por dos tipos de organismos fotosintéticos que se encontraron, generalmente, aislados. Uno de ellos fue una cianobacteria filamentosa de entre 2-3 μm de diámetro, con gruesas vainas individuales y células necróticas, con características morfológicas compatibles con *Leptolyngbya* sp. o *Pseudophormidium* sp. El grupo que formaba la mayor parte del biofilm constaba de células de morfología esférica e irregular y fue identificado como los géneros *Jenufa* y *Desmococcus*. Este último se observó en dos fases distintas de su ciclo, con morfotipo esférico o irregular o, en ocasiones, alargado formando filamentos cortos con aspecto sarcinoide. En las muestras obtenidas durante el mes de noviembre, la morfología esférica de este grupo de organismos fue superior a la filamentosa. En cambio, en las muestras obtenidas durante el mes de julio, la morfología filamentosa dominó sobre la esférica. En una sola ocasión, se pudo observar el género *Humidophila*. También se observaron abundantes bacterias en las muestras (Fig. 6.25).

La composición química del sustrato de la zona Ne.10 fue la que manifestó mayor diversidad de componentes, entre los que destacan, por su abundancia, los cristales de carbonato cálcico y la arcilla, comunes a las otras zonas de control. No obstante, el espectro de difracción

de rayos X mostró también picos de aluminio, carbono, oxígeno, silicio y azufre, compatibles con la presencia de plagioclasas y yeso. (Fig. 6.25)

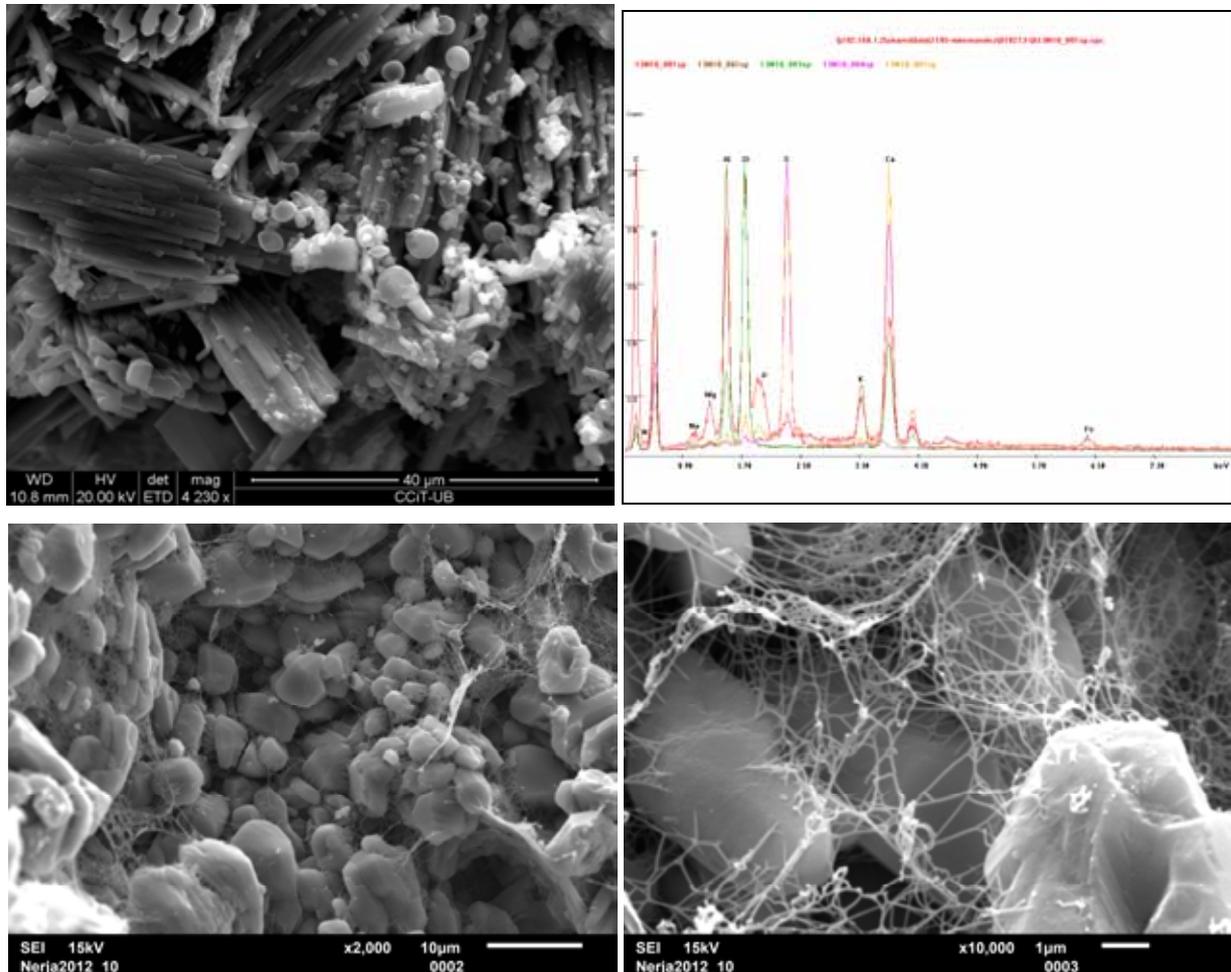


Figura 6.25. Arriba, a la izquierda, microfotografía SEM de la superficie de la zona Ne.10 que muestra el sustrato con evidencias de deterioro y numerosos organismos de diferente morfología que se adhieren a éstos. A la derecha espectros XRD correspondientes a cinco puntos de una de las muestras de esta zona. La superposición de espectros permite comprobar diversidad de componentes del sustrato, entre los que se encuentran cristales de carbonato cálcico, plagioclasas y yeso, junto con arcilla. Debajo, microfotografías SEM que muestran la presencia de abundantes filamentos de actinobacterias que envuelven a los organismos y a los gránulos de sustrato.

Ne.11

En esta zona de control se observaron tres tipos de biofilms, diferentes desde un punto de vista macroscópico. Por este motivo, la zona se dividió en tres subzonas, identificadas con las siglas Ne.11a, Ne.11b y Ne.11c, a partir de las cuales se obtuvieron muestras que fueron analizadas mediante microscopía. Las muestras procedentes de Ne.11a mostraron un biofilm que

se desprendía fácilmente del sustrato y formaba agregados macroscópicos de color verde oliva, aspecto muy húmedo y textura mucilaginosa (Fig. 6.26). La dureza del sustrato sobre el que se desarrolla este de biofilm no permitió obtener una pequeña porción de este, tal y como se hizo en las otras zonas de control. Como organismo más abundante se identificó a la cianobacteria *Aphanothece saxicola*, organismo unicelular, de color verde azulado y forma ovalada u oblonga. Otras cianobacterias observadas pertenecían a los géneros *Gloeocapsa* y *Chalicogloea*, ambas recubiertas de vainas y con división binaria, según plano transversal, dando como resultado células esféricas. En el biofilm se observaron también vainas vacías, probablemente de *Leptolyngbya* sp., y restos de *Chroococidiopsis* sp., junto con el alga roja *Cyanidium* sp., en número muy reducido. Las algas verdes estaban representadas por organismos unicelulares esféricos, de color verde más claro y cloroplasto parietal que, ocasionalmente mostró una forma filamentosa emergente. Esta morfoespecie fue identificada como *Desmococcus endolithicus*. Finalmente, en las muestras también se observaron esporas de hongos y actinobacterias.

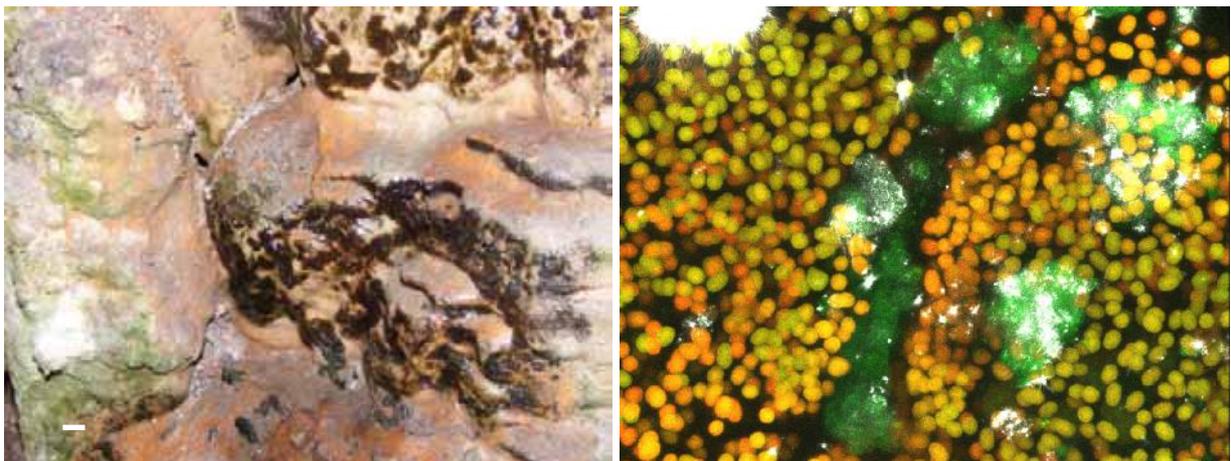


Figura 6.26. A la izquierda, aspecto macroscópico de la colonización del sustrato por el biofilm en la zona denominada Ne.11a (escala 10 mm). A la derecha, microfotografía CLSM que muestra organismos del biofilm con proyección máxima de los canales rojo y verde. Identificación de colores: autofluorescencia de pigmentos fotosintéticos (rojo) y autofluorescencia EPS (verde)

El análisis de la composición química indicó la presencia, casi exclusiva de materia orgánica, junto diversas proporciones de silicio, azufre, calcio, aluminio, magnesio y titanio compatibles con la presencia de arcillas, yeso, ortosas y feldespatos (Fig. 6.27).

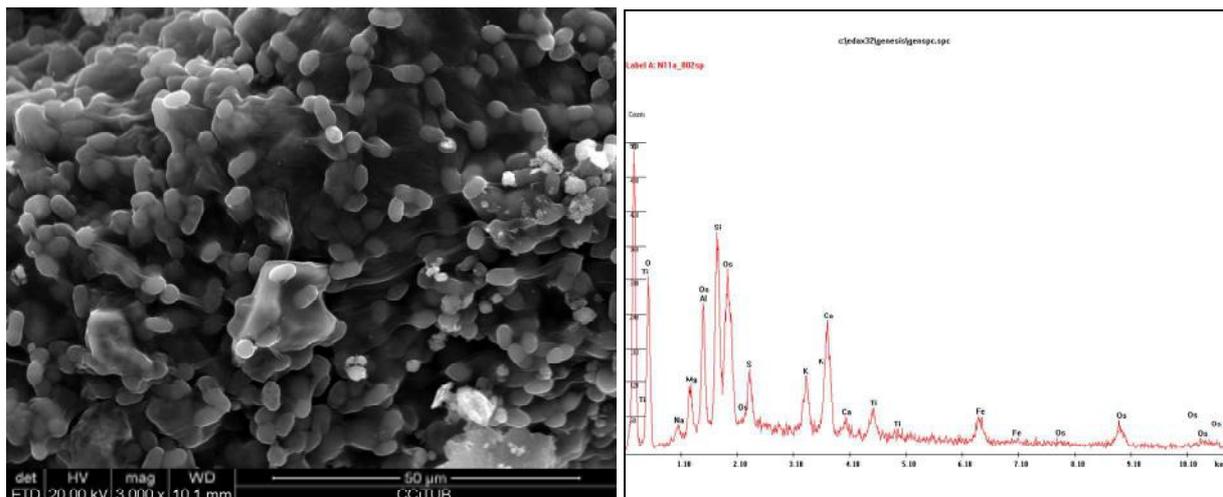


Figura 6.27. A la izquierda, microfotografía SEM del biofilm de la zona Ne.11a, que muestra agregados de organismos envueltos en una vaina. A la derecha espectro XRD correspondiente a la imagen, que muestra la presencia mayoritaria de materia orgánica junto con arcillas. La presencia de osmio en el espectro se debe a una contaminación debida a la osmificación de la muestra durante el procesado de mejora de la imagen.

Las muestras obtenidas en Ne.11b presentaban un biofilm de color verde intenso, con un desarrollo aparentemente compacto y homogéneo sobre la superficie del sustrato. Mediante estereoscopia se observó el biofilm en zonas que, a simple vista, parecían ausentes de colonización, tales como huecos del sustrato, con una profundidad inferior a 3 mm. A pesar de la evidente humedad del biofilm y del sustrato, su textura no alcanzó a ser gelatinosa (Fig. 6.28).

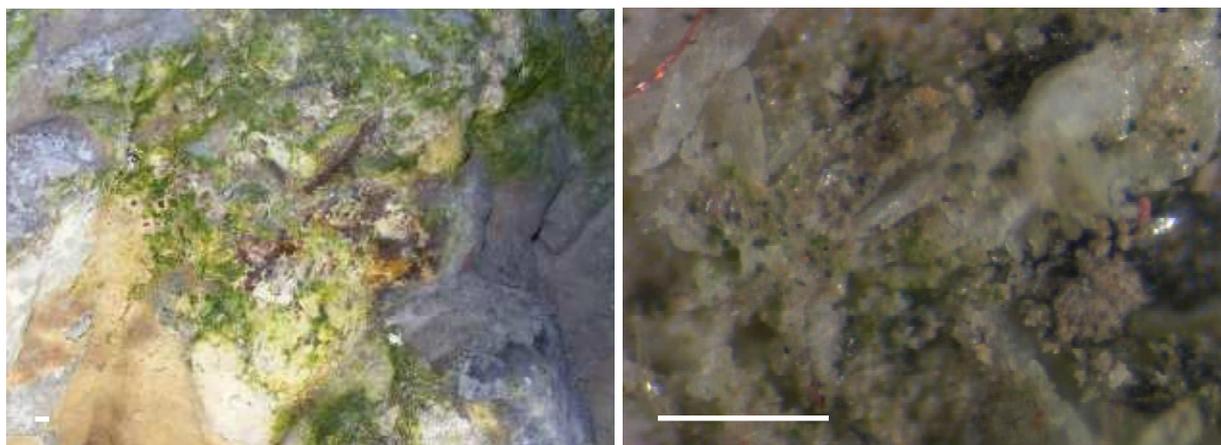


Figura 6.28. A la izquierda, aspecto macroscópico de la zona Ne.11b (escala 10 mm). A la derecha, fotografía estereoscópica con abundantes cristales y desarrollo de organismos fotosintéticos en las oquedades y grietas del sustrato (escala 250 μm).

Se identificaron organismos unicelulares en el biofilm, esféricos y de color verde intenso, con núcleo, mitocondrias y cloroplasto parietal. Estos organismos mostraron, ocasionalmente,

filamentos emergentes del cuerpo celular y fueron identificados como *Desmococcus endolithicus*. Junto a ellos se observaron bacterias en diferentes estados fisiológicos: división celular, senescencia y muerte, junto con vainas vacías de antiguos organismos, si bien las bacterias más próximas a los organismos fotosintéticos parecían presentar mejores condiciones. Ocasionalmente se observaron organismos que podrían corresponder a la morfoespecie *Stichococcus* sp. (Fig. 6.29).

La microscopía TEM también puso de manifiesto un desarrollo superficial de los organismos, que no penetraban de forma activa en el sustrato sino que se adherían a éste y ocupaban sus zonas más profundas.

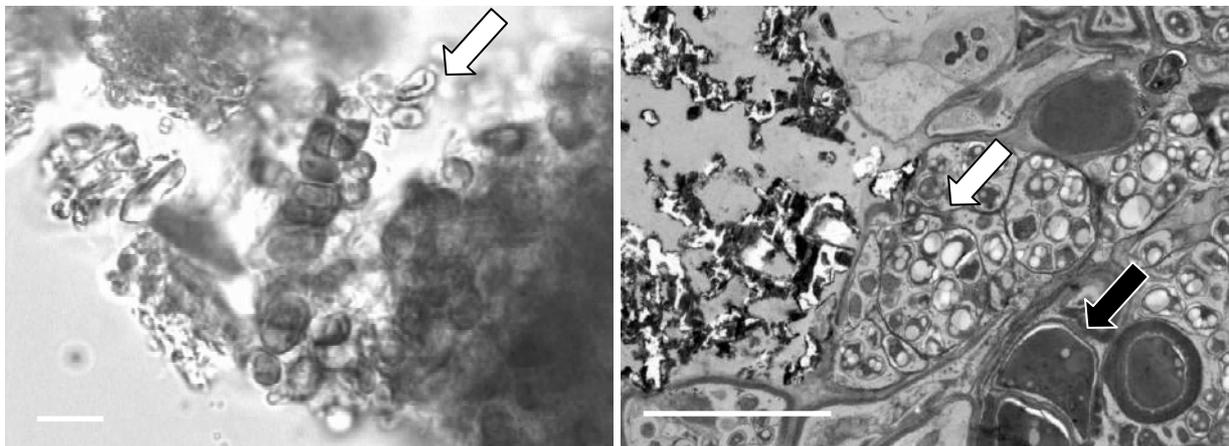


Figura 6.29. A la izquierda, imagen de microscopía óptica convencional que muestra a los organismos cubriendo la superficie del sustrato. La flecha señala un organismo del género *Stichococcus* sp. (escala 10 μm). A la derecha, microfotografía TEM de la capa más superficial del sustrato, que muestra la presencia de bacterias (flecha blanca) y organismos fotosintéticos (flecha negra) (escala 5 μm).

El análisis químico de la muestra indicó una elevada variabilidad de componentes, en puntos muy próximos de la muestra. Los compuestos identificados fueron cristales de carbonato cálcico, carbonato cálcico y magnésico, silicatos, arcilla, ortosas, etc.

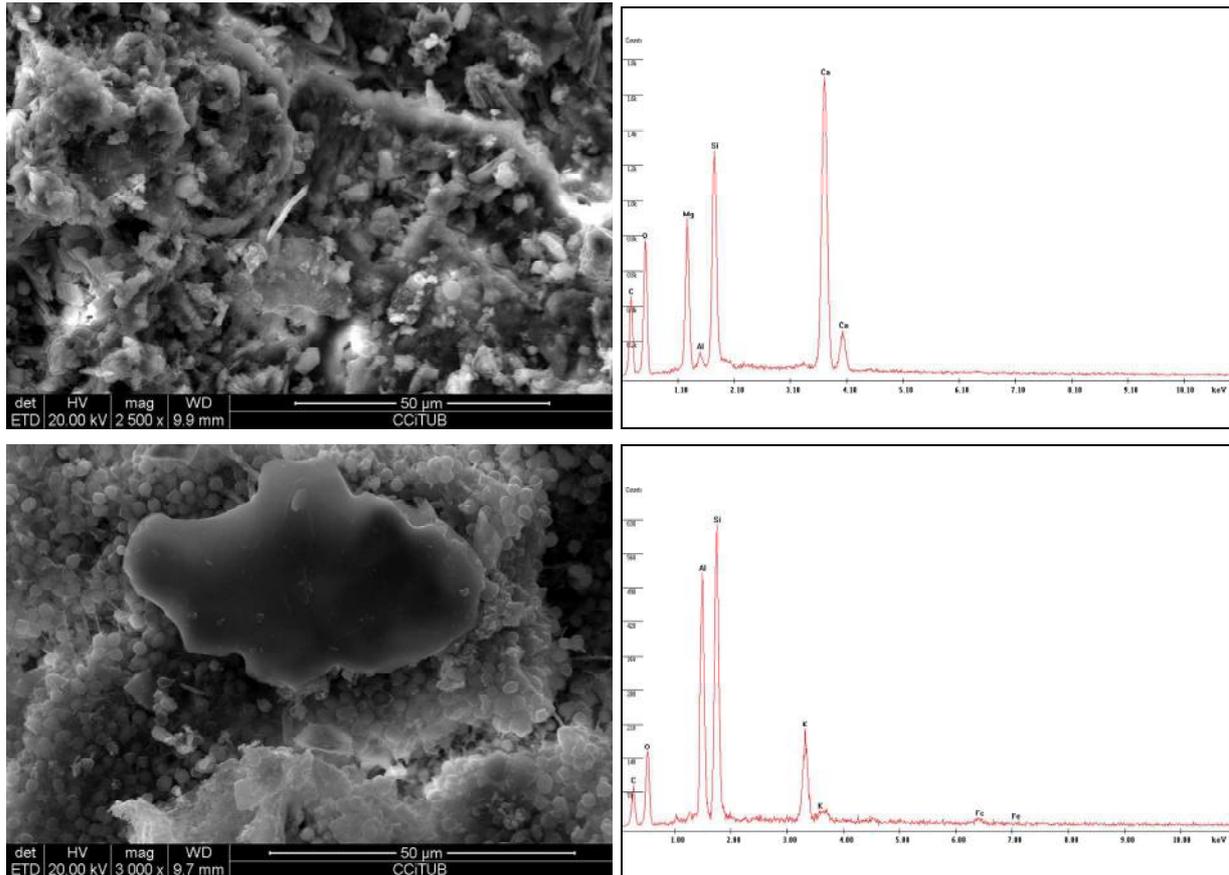


Figura 6.30. A la izquierda microfotografías SEM de dos puntos de una muestra de la zona Ne.11b. A la derecha espectros XRD correspondientes a estas imágenes, que determinan un sustrato de composición muy heterogénea. El espectro superior muestra la presencia de cristales de carbonato cálcico, carbonato cálcico y magnésico y silicatos de magnesio y el espectro inferior muestra la presencia de ortosas.

El aspecto macroscópico de la zona Ne.11c fue muy similar al de la zona Ne.11b, si bien la colonización se mostró más homogénea y la superficie del sustrato más húmeda. Mediante estereoscopía se observó que las muestras contenían un biofilm de color verde intenso que colonizaba, irregularmente, la superficie del sustrato. A nivel microscópico, se identificó un grupo taxonómico formado por organismos unicelulares, esféricos y de color verde intenso que, con frecuencia, formaban agregados. La ultraestructura celular permitió observar en este grupo la presencia de núcleo, mitocondrias y un cloroplasto parietal, así como figuras de división. A pesar de que no pudo ser observado su ciclo completo, las características morfológicas y la cercanía de las zonas Ne.11a y Ne.11b, motivó la identificación de este grupo como *Desmococcus endolithicus*. Junto a estos organismos, se observaron organismos semejantes, más pequeños, que podrían corresponder a células aisladas y agregados sarcinoides de *D. endolithicus* o a miembros del género *Jenufa* sp. También se observó un grupo morfológico formado por células esféricas,

con plasto discoidal y división mediante autosporas. A pesar de que no pudo ser observada su ultraestructura, este grupo fue identificado como *Cyanidium* sp. debido a su morfología, tipo de división, color y aspecto del biofilm que formaba.

Mediante microscopía SEM-BSE se observó la colonización de la superficie de la muestra por abundantes organismos fotosintéticos. El análisis de la composición química indicó la presencia mayoritaria de cristales de carbonato cálcico.

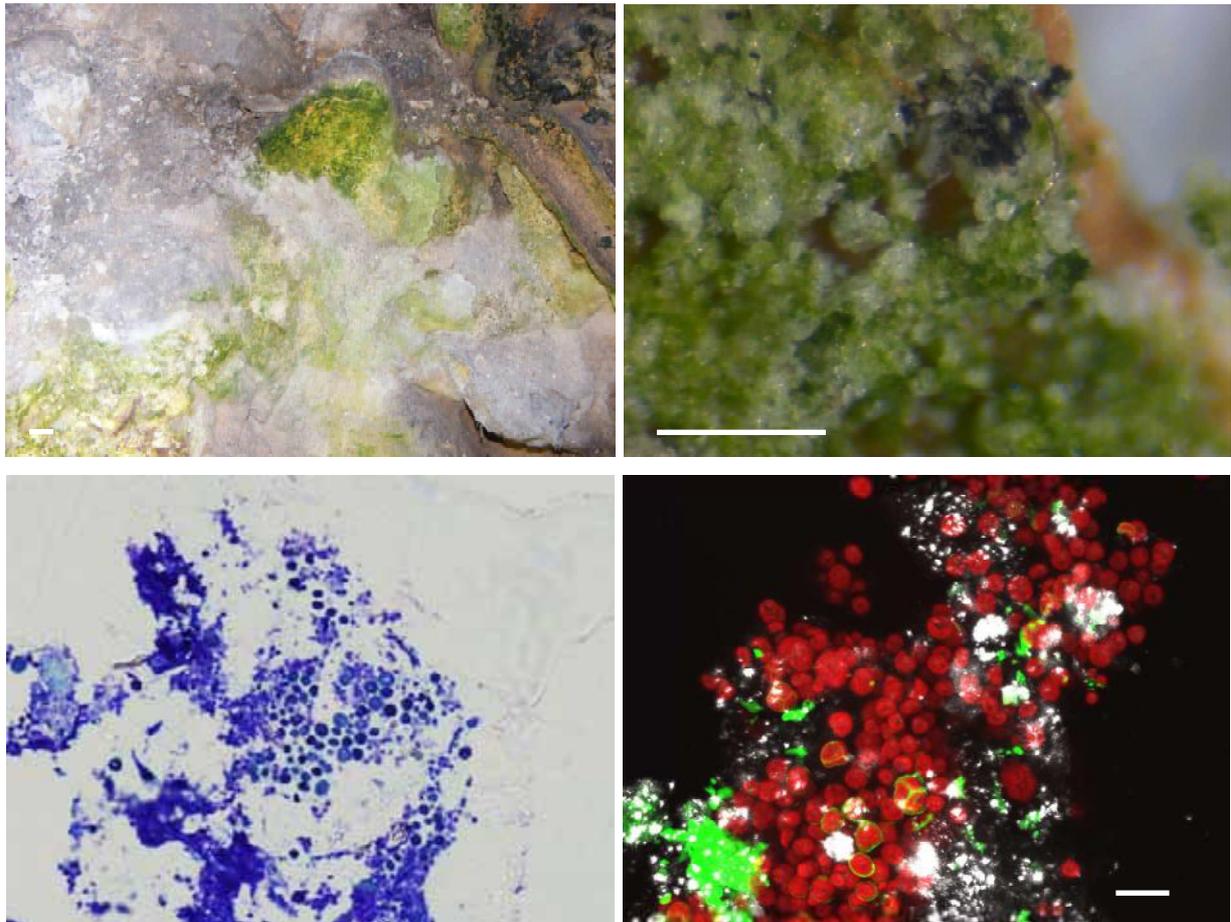


Figura 6.31. Arriba, a la izquierda, aspecto macroscópico de la zona Ne.11c (escala 10 mm). A la derecha, fotografía estereoscópica que muestra un desarrollo del biofilm más homogéneo que Ne.11b (escala 250 μm). Debajo, a la izquierda, microfotografía de microscopía óptica de corte semifino de una muestra teñida con azul de metileno en la que se observan los microorganismos fotosintéticos dispuestos en el interior del sustrato. A la derecha, imagen CLSM con proyección máxima de intensidad de autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (rojo) y de las vaina de EPS (verde). En blanco, reflexión de sustrato inorgánico. Se observa la presencia de *Desmococcus endolithicus* y un organismo semejante de menor tamaño, probablemente *Jenufa* sp. (escala 250 μm).

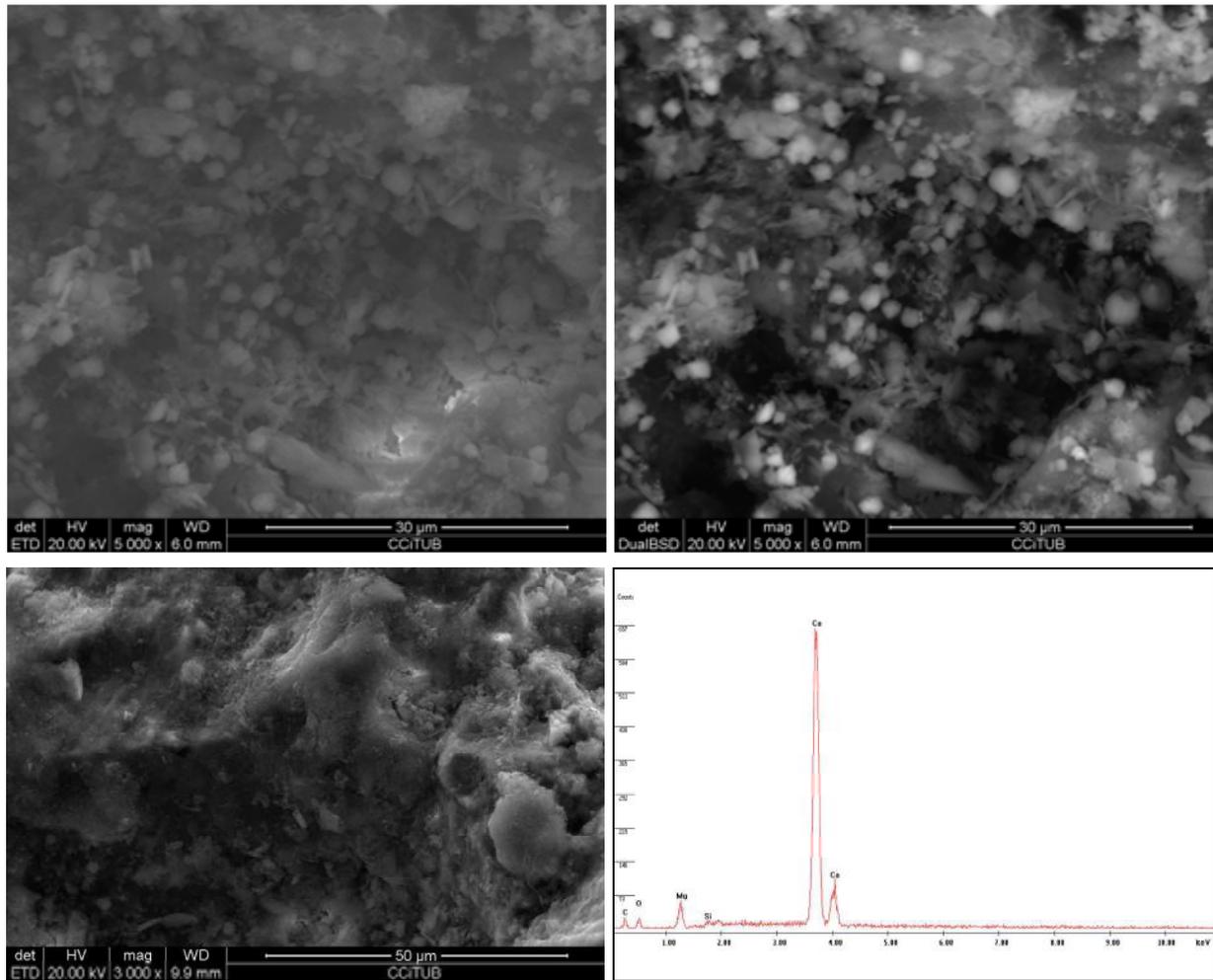


Figura 6.32. Arriba microfotografías SEM-BSE que muestran la distribución de los organismos en el sustrato de Ne.11c. Debajo, a la izquierda, microfotografía SEM de un punto de la superficie y, a la derecha, espectro XRD correspondiente a esta imagen que indica la presencia mayoritaria de calcita en la muestra junto con una escasa proporción de magnesio.

Ne.12

Al igual que la zona Ne.11, esta zona Ne.12 se dividió en dos subzonas: Ne.12a y Ne.12b, en base a las diferencias macroscópicas observadas. La zona Ne.12a se encontraba colonizada por un biofilm de color verde intenso que se desarrollaba superficialmente en un espeleotema con agua líquida en la superficie. El estereoscopio permitió observar una mayor colonización de los huecos y grietas del sustrato por los organismos (Fig. 6.33). El empleo de las técnicas combinadas de microscopía permitió observar organismos filamentosos con falsas ramificaciones, de (3,3)-4,7-(6,6) de longitud y 2,5 µm de anchura, identificados como *Pseudophormidium* sp. Otro organismos observados mostraron también filamentos, más finos

que los anteriores, y se identificaron como *Leptolyngbya* sp. y *Aphanothece saxicola*. Otros organismos observados en el biofilm fueron relacionados con las especies *Gloeocapsa atrata* y *Chalicogloea cavernícola* en base a sus características morfológicas, ambas con envueltas mucilaginosas, así como con algas verdes de los géneros *Desmococcus* y *Jenufa* (Fig. 6.33).

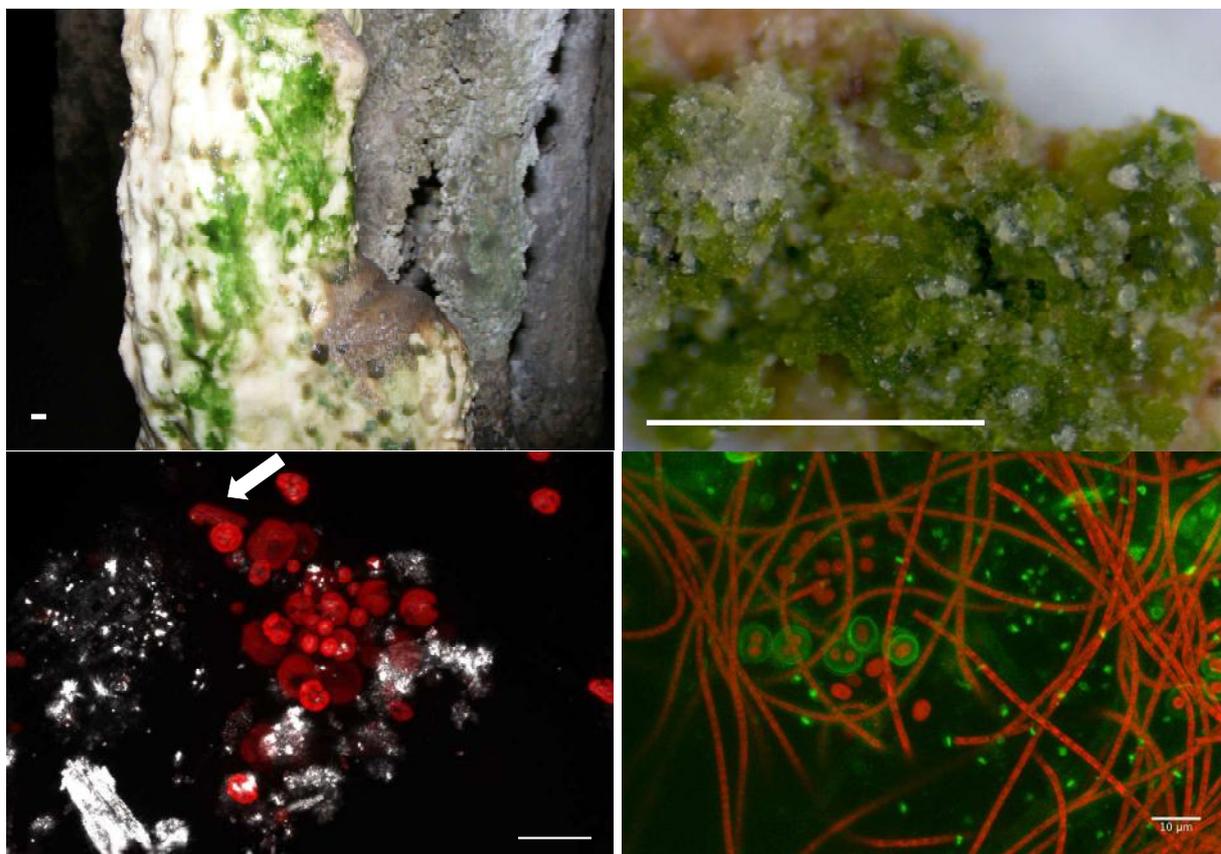


Figura 6.33. Arriba, a la izquierda, aspecto macroscópico de la zona Ne.12a (escala 10 mm). A la derecha, fotografía estereoscópica que muestra el sustrato colonizado por un biofilm fotosintético junto a cristales sin colonizar (escala 1 mm). Debajo, microfotografías CLSM con proyección máxima de intensidad de autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (rojo) y reflexión de sustrato inorgánico (blanco). La flecha blanca, en la imagen de la izquierda, señala un filamento de *Desmococcus endolithicus* que comienza a alargarse y, junto a éste, se encuentran organismos más pequeños que podrían pertenecer al género *Jenufa*. A la derecha mezcla de *Aphanothece saxicola*, *Gloeocapsa atrata* y *Leptolyngbya* sp.

El espectro de difracción de rayos X de la muestra mostró que el sustrato se componía, principalmente, de mineral de carbonato cálcico y arcilla. Los puntos de la muestra analizada que presentaron mayor cantidad de arcilla mostraron también un pico de fósforo y se encontraban colonizados por un mayor número de organismos (Fig. 6.34). En otros puntos de la muestra, el espectro de difracción de rayos X mostró la presencia casi exclusiva de cristales de carbonato cálcico.

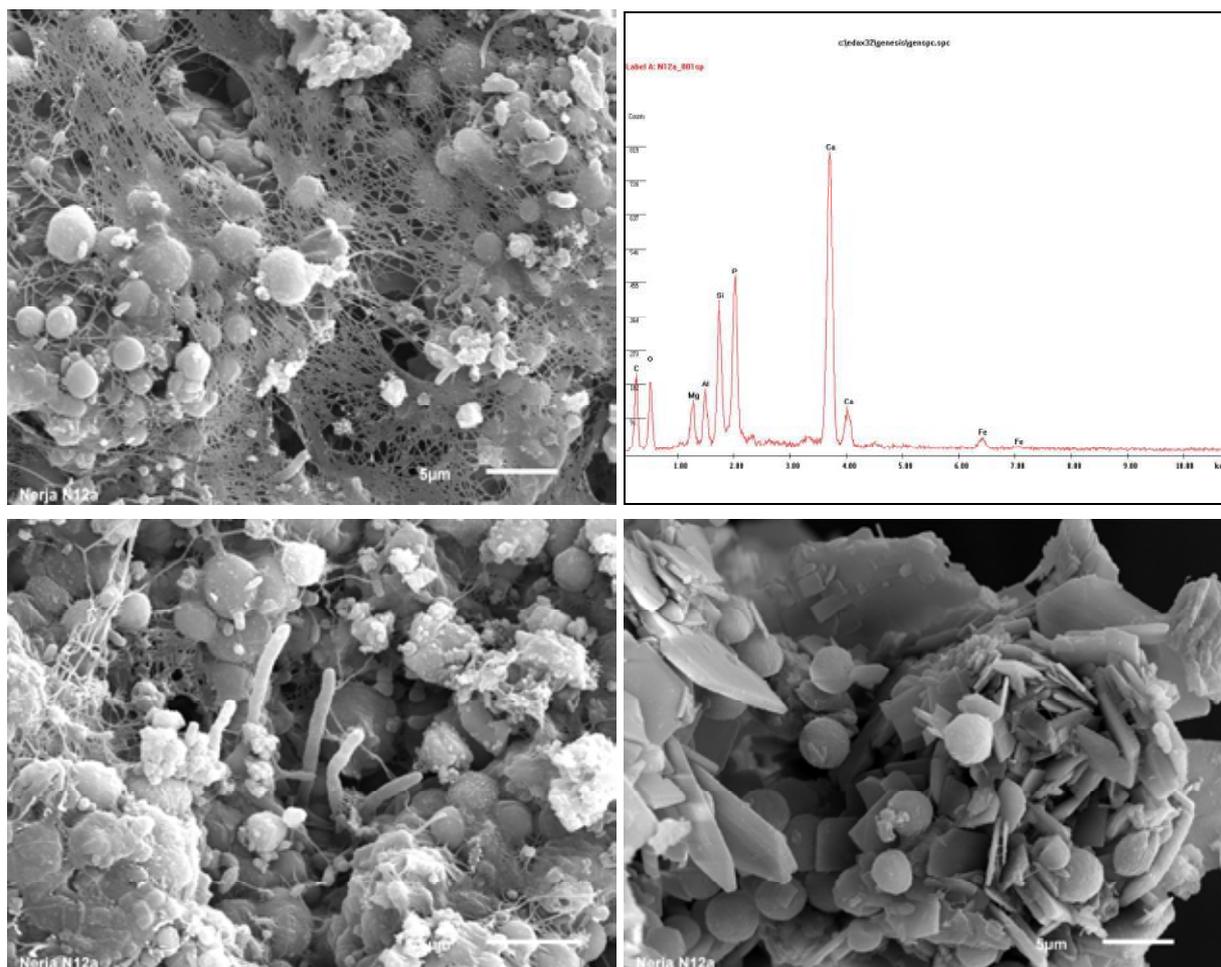


Figura 6.34. Microfotografías SEM que muestran la distribución de los organismos en el sustrato de Ne.12a. Se observa la presencia de numerosos organismos fotosintéticos junto a una notable red de actinobacterias y otros organismos filamentosos no fotosintéticos dispuestos entre los cristales de neoformación. Arriba a la derecha, espectro XRD que describe la composición química del sustrato, formado por cristales de carbonato cálcico y una importante proporción de arcilla. En este punto de la muestra, el pico de fósforo identificado en el espectro podría estar relacionado con la presencia de los numerosos organismos en la muestra.

La zona Ne.12b mostró un biofilm de tonalidad verde pardo, escaso grosor y distribución irregular en el sustrato. La superficie del espeleotema donde se desarrollaba presentó un aspecto poroso y, aparentemente seco, al contrario de lo observado en la zona Ne.12b (Fig. 6.35). En este biofilm se identificaron los géneros *Cyanidium* y *Pseudophormidium* (Fig. 6.36)



Figura 6.35. Arriba, a la izquierda, aspecto macroscópico de la zona Ne.12b (escala 10 mm). A la derecha, fotografía estereoscópica que muestra la superficie del sustrato colonizada por biofilm fotosintético junto a cristales sin colonizar (escala 1 mm).

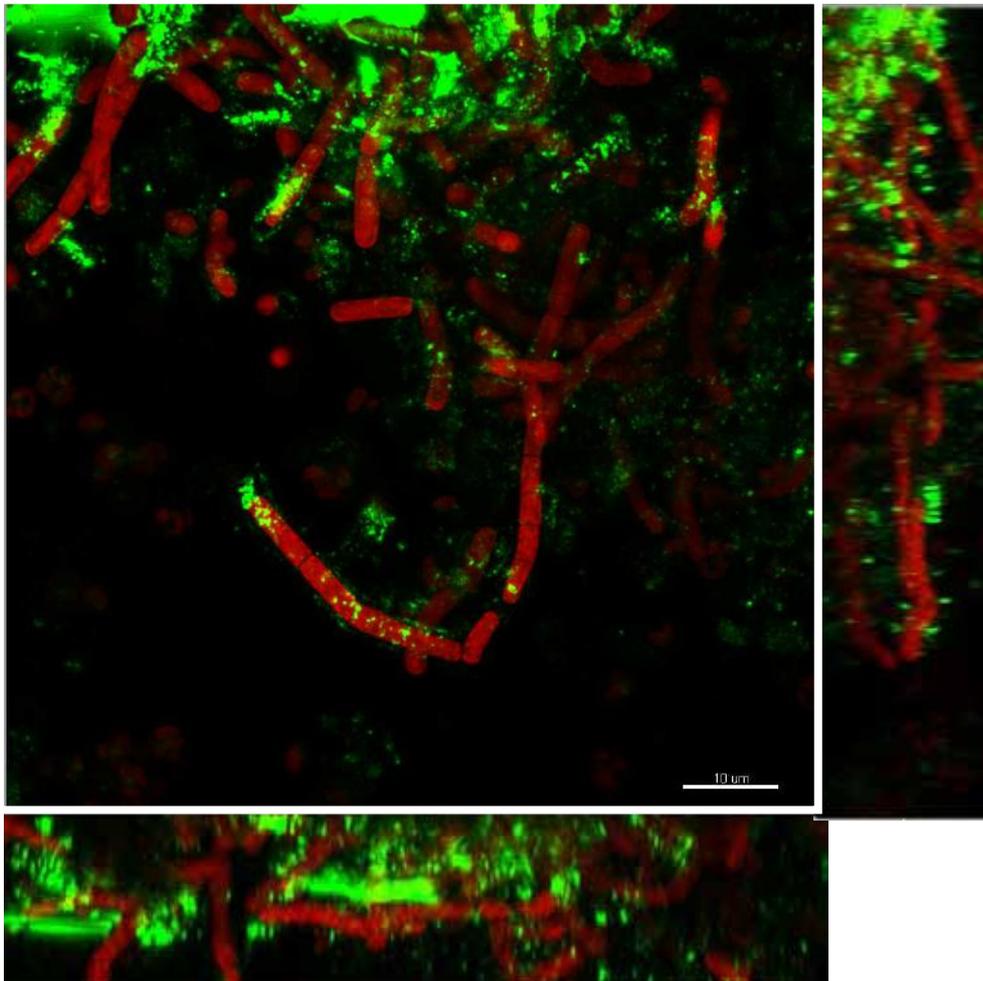


Figura 6.36. Imagen CLSM de muestra de Ne.12b con *Pseudophormidium* sp. Proyección tridimensional “extended focus” en x-y, x-z, y-z, interpolada en x-y y visualizada en z. Proyección máxima de fluorescencia en dos canales: autofluorescencia de pigmentos fotosintéticos (rojo) y autofluorescencia de vainas EPS (verde).

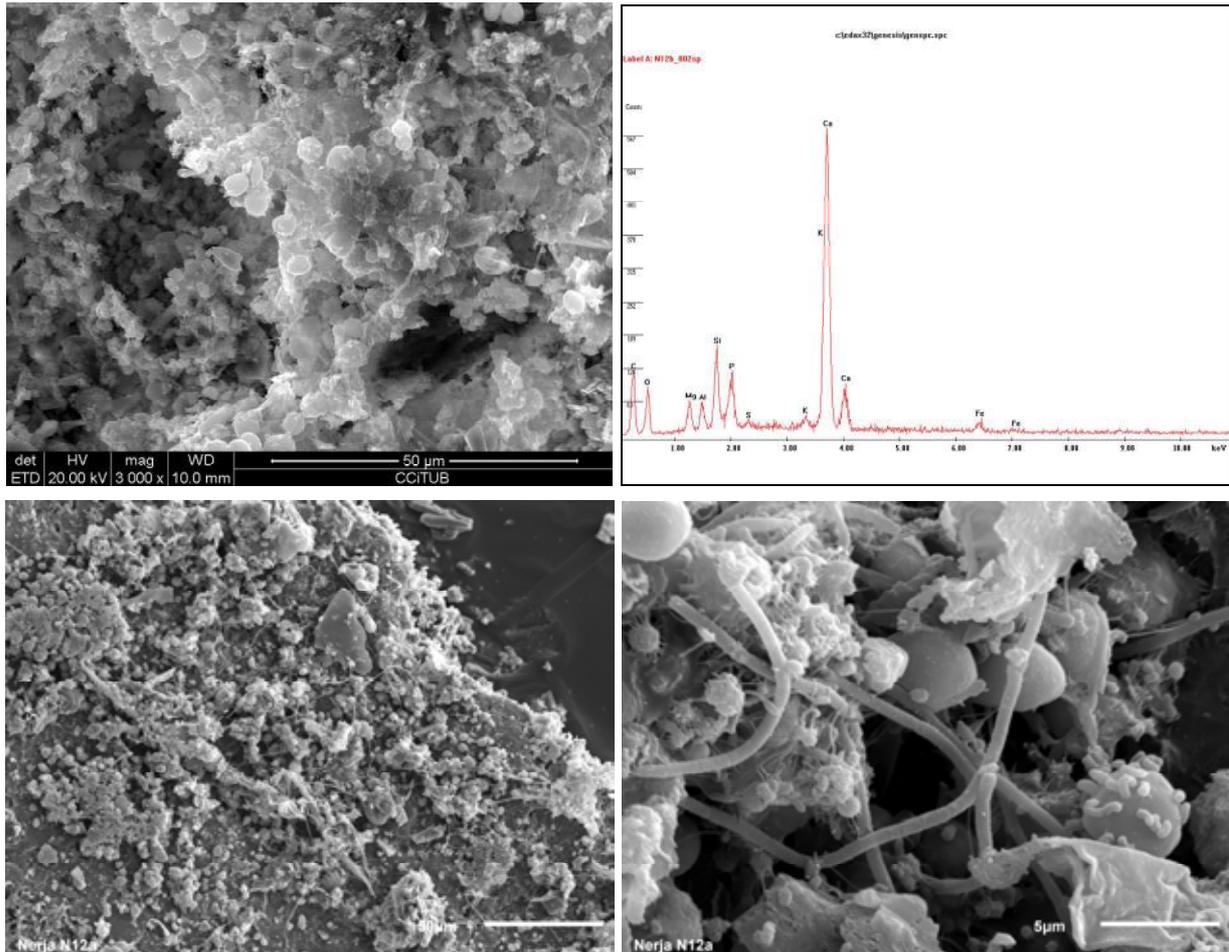


Figura 6.37. Arriba a la derecha, espectro XRD que muestra la composición química del sustrato que se forma, principalmente, por cristales de carbonato cálcico y menor proporción de arcilla. Resto, microfotografías SEM que muestran la distribución de los organismos en el sustrato de Ne.12a y la presencia de organismos no fotosintéticos, probablemente bacterias, en el biofilm.

Ne.13

La zona Ne.13 corresponde a una superficie que, inicialmente, se encontraba libre de colonización por organismos fotosintéticos y fue sometida a iluminación mediante leds que emitían luz blanca (ver capítulos 4 y 5). Transcurridos unos meses, se observó el desarrollo de pequeñas pátinas verdes en la superficie iluminada (Fig. 6.38). Mediante estereoscopía se identificaron organismos fotosintéticos que se distribuían de forma irregular sobre el sustrato, con mayor presencia en las zonas más blanquecinas (Fig. 6.38). Estas muestras sólo fueron observadas mediante microscopía óptica convencional, que permitió la identificación morfológica de las algas verdes *Desmococcus endolithicus* y *Stichococcus bacillaris*, junto a

filamentos bacterianos, probablemente pertenecientes a actinobacterias (Fig. 6.38). El análisis molecular confirmó la presencia de *D. endolithicus* y *Stichococcus* sp.

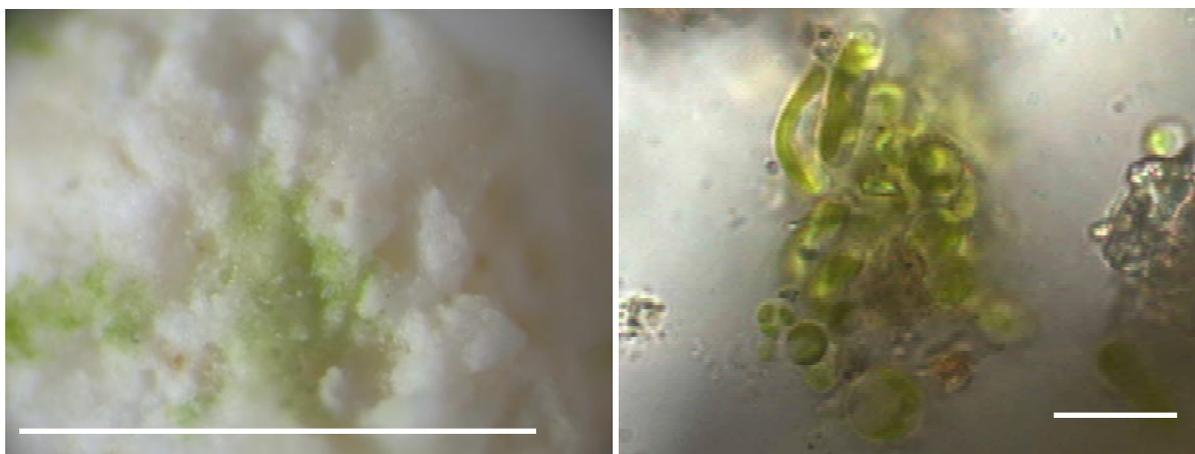


Figura 6.38. A la derecha, fotografía estereoscópica que muestra la superficie del sustrato, muy blanca, colonizada por biofilm (escala 1 mm). Debajo, microfotografía óptica con organismos fotosintéticos esféricos y alargados, compatibles con los géneros *Desmococcus* y *Stichococcus* (Escala 10 µm).

6.4.2. Tabla resumen

morfoespecies	zonas de estudio											puntuales		
	Ne.1	Ne.2	Ne.3	Ne.4	Ne.7	Ne.8	Ne.9	Ne.10	Ne.11	Ne.12	Ne.13	Ne.14 suelo	Ne.ama	3c-2
<i>Chroococidiopsis</i> sp.	+	+	+	+		+	+			+				
<i>Gloeothece rupestris</i>														+
<i>Gloecapsa atrata</i>												+		
<i>Chalicogloea cavernicola</i>									+	+				
<i>Nostoc punctiforme</i>				+								+		
<i>Leptolyngbya</i> sp.							+	+	+	+				
<i>Pseudophormidium</i> sp.								+		+			+	+
<i>Aphanothece saxicola</i>		+					+		+	+			+	
<i>Jenufa</i> sp.								+	+	+				
<i>Desmococcus endolithicus</i>								+	+	+	+			
<i>Stichococcus bacillaris</i>									+		+			+
<i>Choricystis</i> sp.						+								
<i>Cyanidium</i> sp.	+	+	+		+		+		+	+				
<i>Humidophila contenta</i>									+			+		

Tabla 6.2. Morfoespecies y morfotipos identificados en cada zona de control así como en las zonas de muestreo puntual.

6.4.3. Resultados del análisis molecular

Los resultados obtenidos para la identificación de cianobacterias y eucariotas fotosintéticos, en las zonas analizadas, fueron los siguientes (Jurado et al., 2015):

Ne.1

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne1ARNCya-K24	79,5	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales
		91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	Chroococcales
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	
Ne1ARNBact-K8	20,5	91	<i>Rhopalodia gibba</i>	Diatomea
		90	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	Chroococcales
		90	<i>Microcoleus chthonoplastes</i> (EF654089)	Oscillatoriales

Identificación de eucariotas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne1ADNEUKAB-K26	85	92	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749)	Eukaryota Alveolata Apicomplexa Conoidasida Eugregarinorida
		92	<i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	
Ne1ADNEUKAB-K9	5	93	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749)	
		92	<i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	
Ne1ADNEUKAB-K15	5	92	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749)	
		92	<i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	
Ne1ADNEUKAB-K37	5	92	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749)	
		82	<i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	

Ne. 2

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne2ARNCya-K41	42,3	95	Cloroplasto de <i>Cyanidium</i> sp. (FJ390400)	Eukaryota Rhodophyta
Ne2ARNCya-K26	30,8	95	Cloroplasto de <i>Cyanidium</i> sp. (FJ390400)	
Ne2ARNCya-K51	7,7	95	Cloroplasto de <i>Cyanidium</i> sp. (FJ390400)	
Ne2ARNCya-K49	3,8	95	Cloroplasto de <i>Cyanidium</i> sp. (FJ390400)	
Ne2ARNCya-K32	7,7	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales
		91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	Chroococcales
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	
Ne2ARNCya-K55	7,7	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales
		91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	Chroococcales
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	

Identificación de eucariotas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne2ADNEUKA-K25	94,7	89 90	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749) <i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	Eukaryota Alveolata Apicomplexa
Ne2ADNEUKA-K22	5,3	89 89	<i>Gregarina tropica</i> (FJ459749) <i>Gregarina blattarum</i> (FJ459741)	Conoidasida Eugregarinorida

Ne.8

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne8ARNCya-K10	75	90 90 90 90	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075) <i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865) <i>Plectonema</i> sp. (AY430160) <i>Halotheca</i> sp. (AJ000724)	Oscillatoriales
Ne8ARNBact-K46	25	90 90 90 90	Cianobacteria simbiote de <i>Rhopalodia gibba</i> (AB546729) <i>Rhopalodia gibba</i> (AJ582391) <i>Symplocastrum torsivum</i> (EF654065) <i>Coleofasciculus chthonoplastes</i> (JEF654043)	Cyanobacteria Diatomea Oscillatoriales Oscillatoriales

Identificación de microorganismos fototróficos cultivables

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne8-K9	51,6	99	<i>Navicula phyllepta</i> (FJ002222)	Diatomea
Ne8-K18	22,6	100 100	<i>Synechocystis</i> sp. (CP003265) <i>Aphanocapsa cf. rivularis</i> (JQ070058)	Chroococcales
Ne8-K29	9,7	92	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC999638)	Oscillatoriales
Ne8-K8	6,4	98 98	<i>Geminocystis</i> sp. (AP014821) <i>Synechocystis</i> sp. (AB039001)	Chroococcales
Ne8-K13	3,2	97	<i>Geminocystis</i> sp. (AP014821)	Chroococcales
Ne8-K15	3,2	91	<i>Halotheca</i> sp. (AJ000724)	Chroococcales
Ne8-K25	3,2	93	<i>Choricystis parasitica</i> (KM462878)	Chlorophyta

Ne.11

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne11ARNBact-K39	100	91 91 90	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806) <i>Gloeocapsa</i> sp. (AB067579) <i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	Chroococcales Chroococcales Stigonematales

Ne.10

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne10ARNCyA-K96	22,8	91	<i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	Stigonematales Chroococcales Chroococcales Oscillatoriales Chroococcales
		91	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806)	
		91	<i>Glaeocapsa</i> sp. (AB067575)	
		91	<i>Geitlerinema</i> sp. (EF372580)	
		91	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806)	
Ne10ARNCyA-K32	18,5	91	<i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	Stigonematales Chroococcales
		91	<i>Glaeocapsa</i> sp. (AB067575)	
Ne10ARNBact-K2	14,1	90	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806)	Chroococcales Chroococcales Stigonematales
		90	<i>Glaeocapsa</i> sp. (AB067579)	
		90	<i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	
Ne10ARNCyA-K64	11,9	91	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ458262)	Chlorophyta
		91	Cloroplasto de <i>Planctonema lauterbonii</i> (KM462880)	
		91	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (FJ458262)	
Ne10ARNBact-K4	6,5	90	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806)	Chroococcales Chroococcales Stigonematales
		90	<i>Glaeocapsa</i> sp. (AB067579)	
		90	<i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	
Ne10ARNCyA-K90	6,5	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales Oscillatoriales Chroococcales
		91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	
Ne10ARNCyA-K17	4,3	91	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ458262)	Chlorophyta
		91	Cloroplasto de <i>Planctonema lauterbonii</i> (KM462880)	
		91	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (FJ458262)	
Ne10ARNBact-K46	3,3	91	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ436975)	Chlorophyta
		91	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (AP012494)	
		91	Cloroplasto de <i>Pleodorina starrii</i> (JX977846)	
Ne10ARNCyA-K70	3,3	94	Cloroplasto de <i>Cyanidium</i> sp. (FJ390400)	Rhodophyta
Ne10ARNCyA-K1	1,1	91	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ458262)	Chlorophyta Chlorophyta Bryophyta
		90	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (AP012494)	
		90	Cloroplasto de <i>Physcomitrella patens</i> (AP005672)	
Ne10ARNCyA-K84	1,1	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales Oscillatoriales Chroococcales
		91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	
Ne10ARNCyA-K51	1,1	91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075)	Oscillatoriales Oscillatoriales Chroococcales
		90	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	
		91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	
Ne10ARNCyA-K39	1,1	90	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ458262)	Chlorophyta Chlorophyta Bryophyta
		90	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (AP012494)	
		90	Cloroplasto de <i>Physcomitrella patens</i> (AP005672)	
Ne10ARNCyA-K4	1,1	91	<i>Phormidium</i> cf. <i>aerugineo-caeruleum</i> (KC463210)	Oscillatoriales
		90	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC999631)	

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne10ARNCya-K28	1,1	91	<i>Phormidium cf. aerugineo-caeruleum</i> (KC463210)	Oscillatoriales
		90	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC999631)	
Ne10ARNBact-K30	1,1	91	Cloroplasto de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (FJ436975)	Chlorophyta
		91	Cloroplasto de <i>Gonium pectorale</i> (AP012494)	
		91	Cloroplasto de <i>Pleodorina starrii</i> (JX977846)	
Ne10ARNBact -K47	1,1	89	<i>Geitlerinema</i> sp. (EF372580)	Oscillatoriales Stigonematales Chroococcales
		90	<i>Loriellopsis cavernicola</i> (NR117881)	
		90	<i>Cyanothece</i> sp. (CP000806)	

Identificación de eucariotas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne10EUKAADN-K89	28,6	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		93	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN-K61	14,3	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		93	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K88	7,1	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		92	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K63	7,1	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		93	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN-K73	7,1	97	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		92	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K96	7,1	97	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		92	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K74	7,1	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		92	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K87	7,1	99	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		96	<i>Jenufa perforata</i> (HM563743)	
		93	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K6	7,1	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		92	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	
Ne10EUKAADN -K48	7,1	98	<i>Jenufa minuta</i> (HM563744)	Chlorophyta
		93	<i>Bracteacoccus ruber</i> (JQ259919)	

Ne.11 (gelatinoso)

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne11BmixARNCya-K23	52	92	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBactK31	33,3	92	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBactK21	4,2	92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067580)	Chroococcales
		92	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBactK17	4,2	92	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBactK32	2,1	92	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBact48	2,1	93	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	
Ne11BmixARNBactK16	2,1	93	<i>Cyanothece</i> sp. (AB067581)	Chroococcales
		92	<i>Gloeotheca</i> sp. (AB067577)	
		92	<i>Aphanocapsa</i> sp. (EU249123)	

Ne.13

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne13ADNCya-K40	41,5	92	Cloroplasto de <i>Koliella longiseta</i> (HE610163)	Chlorophyta
		92	Cloroplasto de <i>Pabia signiensis</i> (KM462866)	
		92	Cloroplasto de <i>Chlorella ellipsoidea</i> (X12742)	
Ne13ADNBact-K22	54,7	93	Cloroplasto de <i>Pseudochlorella</i> sp. (AB928020)	Chlorophyta
		93	Cloroplasto de <i>Pabia signiensis</i> (KM462866)	
		93	Cloroplasto de <i>Chlorella ellipsoidea</i> (X12742)	
		93	Cloroplasto de <i>Koliella longiseta</i> (HE610163)	
Ne13ADNBact-K84	1,9	93	Cloroplasto de <i>Pseudochlorella</i> sp. (AB928020)	Chlorophyta
		93	Cloroplasto de <i>Pabia signiensis</i> (KM462866)	
		93	Cloroplasto de <i>Chlorella ellipsoidea</i> (X12742)	
		93	Cloroplasto de <i>Koliella longiseta</i> (HE610163)	
Ne13ADNCya-K24	1,9	91	Cloroplasto de <i>Koliella longiseta</i> (HE610163)	Chlorophyta

Identificación de eucariotas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne13ADNEUKab-K44	100	98 98	<i>Stichococcus minutus</i> (JN400256) <i>Desmococcus endolithicus</i> (EU434026)	Chlorophyta

Ne. 4 (Torca)

Identificación de cianobacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
TorcaARNCya-K32	75	91 91	<i>Microcoleus</i> sp. (EF654075) <i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK3	5	90	<i>Spirulina major</i> (AM709631)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK10	2,5	91	<i>Microcoleus steenstrupii</i> (KC311865)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK6	2,5	91 90	<i>Microcoleus</i> sp. (KC463204) <i>Spirulina major</i> (AM709631)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK8	2,5	90 91	<i>Spirulina major</i> (AM709631) <i>Microcoleus</i> sp. (KC463204)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK4	2,5	90 88 89 90	<i>Microcoleus</i> sp. (KC463204) <i>Plectonema</i> sp. (AY430160) <i>Halothece</i> sp. (AJ000724) <i>Phormidium</i> cf. <i>aerugineo-caeruleum</i> (KC463210)	Oscillatoriales Oscillatoriales Chroococcales Oscillatoriales
TorcaARNBactK5	2,5	91 90	<i>Microcoleus</i> sp. (KC463204) <i>Spirulina major</i> (AM709631)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK2	2,5	91 90	<i>Microcoleus</i> sp. (KC463204) <i>Spirulina major</i> (AM709631)	Oscillatoriales
TorcaARNBactK11	2,5	90 90 91	<i>Spirulina</i> sp. (AM709631) <i>Spirulina major</i> (FM177505) <i>Microcoleus</i> sp. (KC463204)	Oscillatoriales
TorcaARNAArch-K26	2,5	91	<i>Halothece</i> sp. (AJ000724)	Chroococcales

6.5. Descripción de los morfotipos y morfoespecies

6.5.1. Clase Cyanophyceae, Orden Chroococcidiopsidales, Familia Chroococcidiopsidaceae (Komárek et al., 2014)

1. *Chroococcidiopsis* Geitler 1933

Especie tipo: *Chroococcidiopsis thermalis* Geitler 1933

Presenta células solitarias, en grupos o en agregados que se distribuyen irregularmente sobre el sustrato. Con membranas finas no gelatinosas, incoloras, no concéntricas. Las células vegetativas son cocoides, globulosas, irregulares o poligonales después de divisiones sucesivas o cuando forman grupos. Se dividen siguiendo tres planos distintos, dando lugar a células hijas irregulares, aunque las primeras divisiones suelen parecer regulares. En función de las condiciones ambientales, también puede formar numerosos baecitos inmóviles, tanto en células aisladas como dentro de células que forman grupos. Cuando se liberan estos baecitos aumentan su tamaño hasta igualar el tamaño de las células vegetativas. (Komárek y Anagnostidis, 1998). Las células que se dividen, las células aisladas y los baecitos se liberan por rotura irregular y/o gelatinización de las envolturas maternas. No presenta estadios filamentosos. Los tilacoides suelen estar distribuidos irregularmente en el protoplasto (Budel y Rhiel, 1985).

Este género fue descrito por primera vez en fuentes calientes de Sumatra y, posteriormente, ha sido identificado en otros hábitats extremos de todo el planeta, tales como desiertos secos, aguas dulces y marinas, ambientes hipersalinos, cuevas con nitratos, etc. (Wierzchos et al., 2006; Hauer, 2015). Se considera un organismo muy resistente a condiciones desfavorables extremas y un importante factor de biodeterioro del patrimonio (Miller et al., 2010).

Chroococcidiopsis sp.

Presenta células solitarias o en agregados de tamaños y agrupaciones muy variables. Se encuentra irregularmente distribuido sobre el sustrato, con tendencia a ocupar las grietas y

oquedades, así como el espacio entre los cristales, donde se observan posibles zonas de disolución (Fig. 6.39).

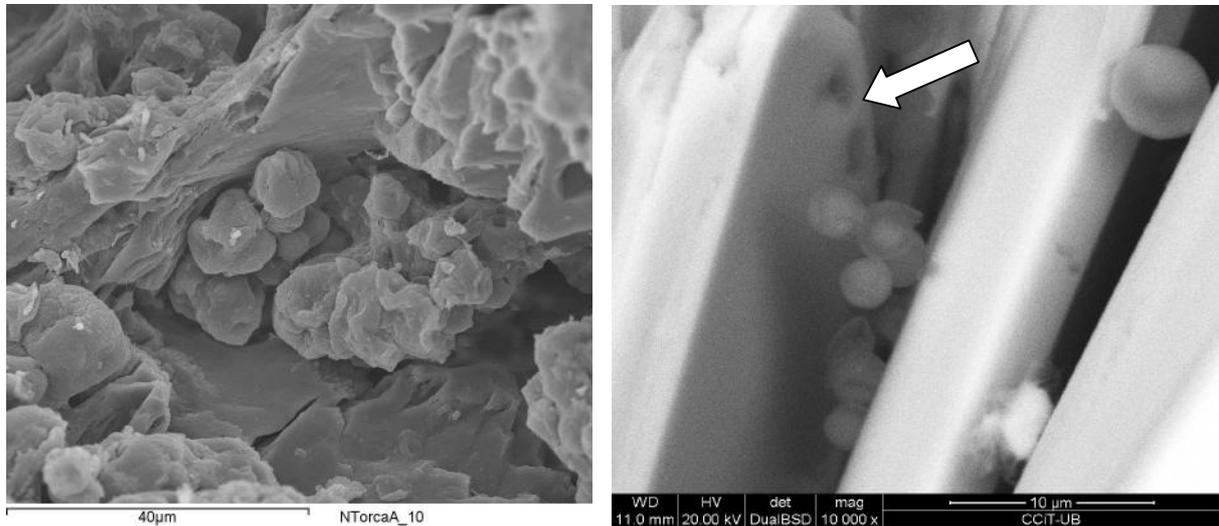


Figura 6.39. Imágenes SEM que muestran el desarrollo casmoendolítico de *Chroococcidiopsis* sp. en oquedades del sustrato (izda.) y entre los cristales (dcha.). La flecha señala posibles zonas de disolución de los cristales.

El color de sus colonias oscila entre el verde azulado, brillante, amarillento u oliva, dependiendo de la coloración de las células que las forman, relacionado, a su vez, con la humedad del sustrato (Fig. 6.40).

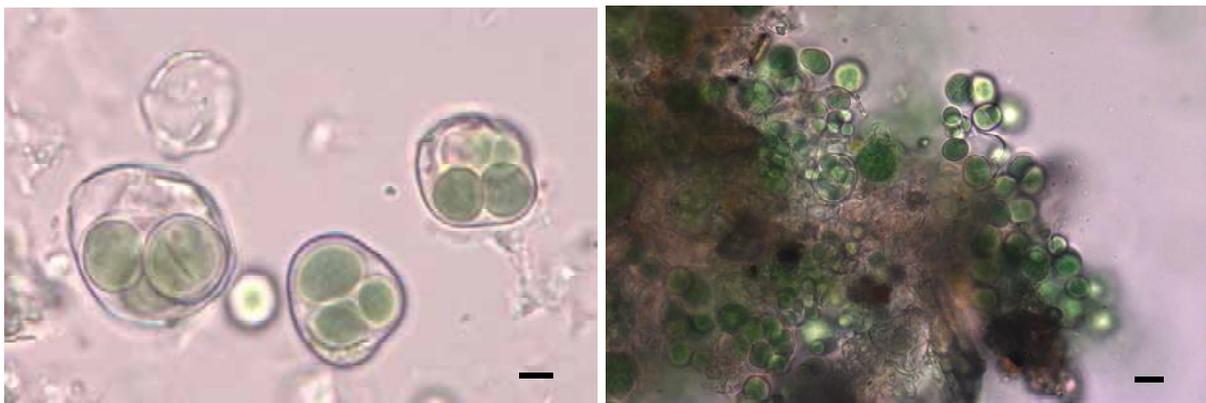


Figura 6.40. Microscopía óptica convencional de células aisladas (izda.) y agregados (dcha.) de *Chroococcidiopsis* sp. procedentes de muestras de campo de la Cueva de Nerja (escala 10 µm).

Las vainas son de grosor variable, muy finas en colonias con las células dividiéndose y gruesas en las células individuales, aparentemente resistentes, claramente delimitadas e incoloras. El tamaño de las células vegetativas es variable, se observa un continuo entre el

tamaño mínimo de los baeocitos (0,8 μm), levemente elipsoidales, hasta el máximo de las células solitarias (4,9 μm), con tamaños medios de (2,6)-3,5-(4,9) 9 μm (n=50). El número de células hijas determinadas en el interior de los esporocistes es variable, desde 2 o 4 hasta más de 50 baeocitos, aunque este último caso tan sólo se observó de forma puntual en cultivo (Fig. 6.41). El espectro de emisión de las células muestra la presencia de los pigmentos ficocianina y aloficocianina (máximo entre 640 y 660 nm). En menor proporción se observa también clorofila a (máximo a 680 nm no distinguible con la fluorescencia del conjunto) (Fig. 6.40).

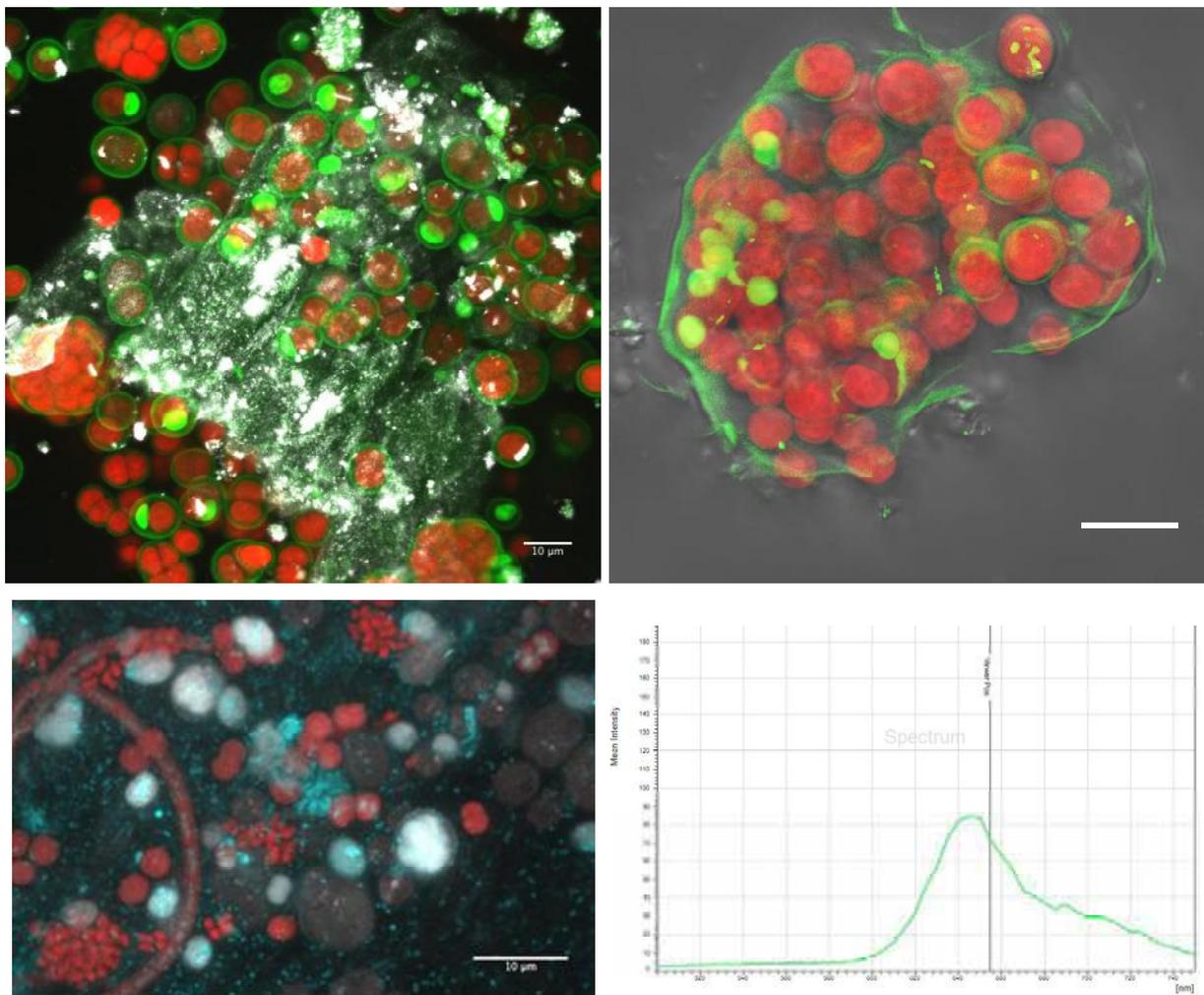


Figura 6.40. Arriba, imágenes de CLSM con proyección de intensidad máxima y observadas en la dirección z, que muestran *Chroococcidiopsis* sp, incluido en la roca encajante. A la derecha, detalle de la colonia. Identificación de colores: autofluorescencia los pigmentos (rojo), autofluorescencia de las vainas (verde), reflexión del sustrato (blanco). Debajo, imagen CLSM de *Chroococcidiopsis* sp. con formación de baeocitos, junto a *Leptolyngbya* sp. y numerosas bacterias acompañantes visibles por la tinción de su ADN con el marcador Hoechts 33342. Identificación de colores: nucleoides (azul), autofluorescencia de pigmentos (rojo), reflexión del sustrato (blanco). A la derecha, espectro de emisión de *Chroococcidiopsis* sp. que muestra un amplio máximo correspondiente a la ficocianina y aloficocianina y, en menor proporción, la clorofila a.

La ultraestructura revela la presencia de una vaina fina en todos los tipos de células, que puede engrosarse o formar capas, y de una pared gruesa que se abre para permitir la liberación de las células procedentes de divisiones vegetativas o simultáneas (baecitos). Los tilacoides se disponen en capas concéntricas parietales, con algunos fascículos con orientación distinta, o repartidos por toda la célula. En alguna célula se observan gránulos irregulares blancos, con aspecto de polihidroxiálkenoatos. Se determina división vegetativa irregular mediante invaginación de la membrana citoplasmática y de la capa de peptidoglicano (Fig. 6.41).

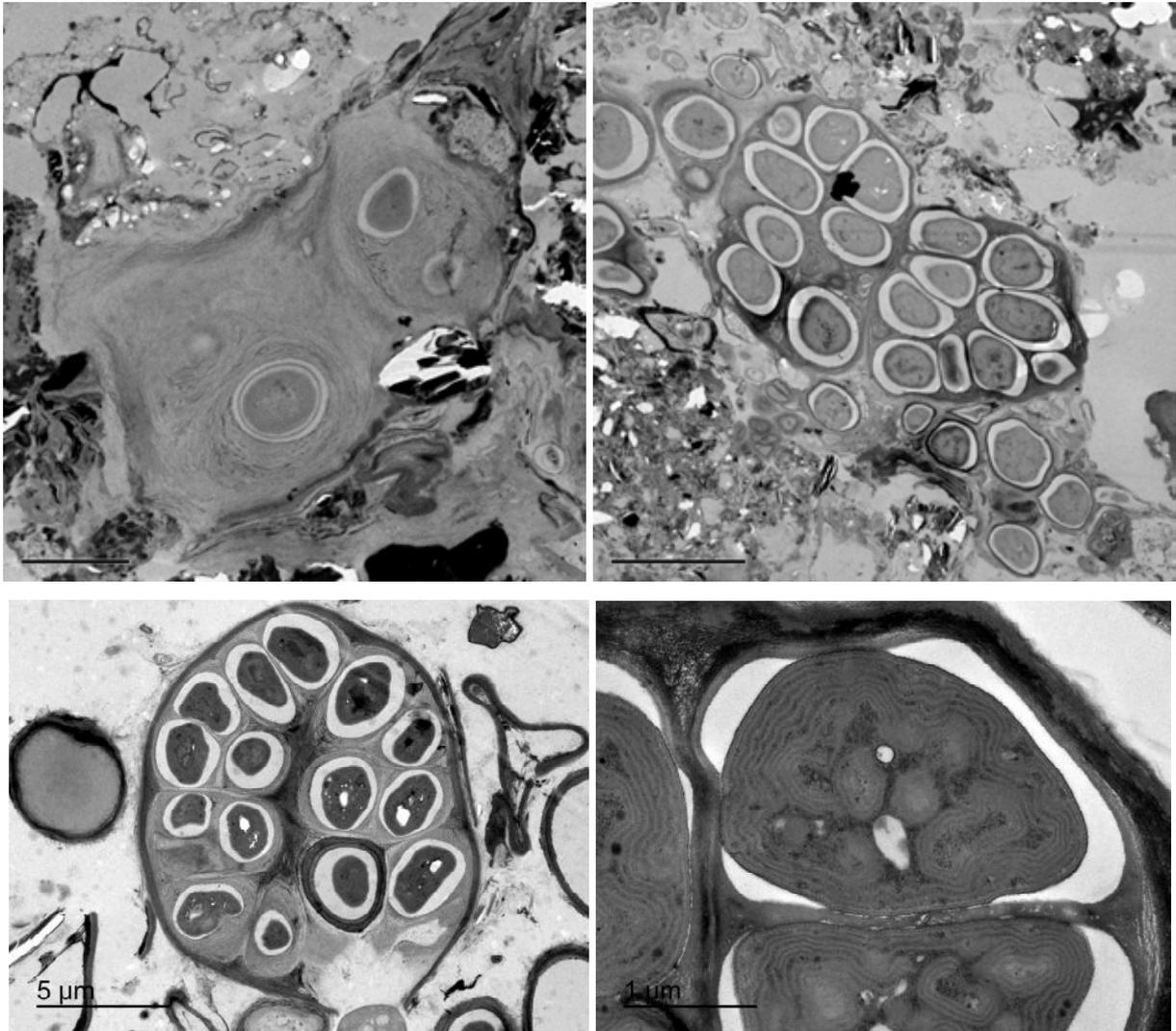


Figura 6.41. Microfotografías TEM de *Chroococidiopsis* sp. Arriba se observan las células inmersas en sustancias exopoliméricas de baja densidad que les permiten absorber y retener la humedad. También se observan bacterias acompañantes. Debajo, a la izquierda, estadio avanzado de la división celular con liberación de las células hijas por ruptura de la vaina maternal. A la derecha, estadio inicial de la división con reestructuración del contenido tilacoidal, sin aparición de paredes, previa a la formación de baecitos.

La producción de baeocitos puede ser realizada de dos modos diferentes. El más común se presenta después de una o dos divisiones binarias con sus planos rectangulares entre sí, las células hijas se dividen en diferentes planos sin crecimiento intermedio. El otro tipo presenta divisiones múltiples e irregulares simultáneas que producen numerosas células (Budel y Kauff, 2012) (Fig. 6.41). En el material procedente de la Cueva de Nerja se han observado ambos tipos de división. La división simultánea se comprobó mediante TEM, que permitió observar la disposición de los tilacoides formando grupos enrollados en el interior de la célula madre, sin formación de paredes celulares simultáneas (Fig. 6.41).

Por la forma y tamaño de las células y baeocitos, así como por los tipos de agregados, la morfoespecie de la Cueva de Nerja puede corresponder a la especie *C. fissurarum* (Ercegovic) (Komárek y Anagnostidis, 1998) organismo que coloniza tanto la superficie como las oquedades y poros del sustrato, descrito en rocas calcáreas supralitorales de la costa croata del Mediterráneo.

Su posición taxonómica no es clara y ha sido trasladado de grupo diversas veces. Los análisis filogenéticos de la especie tipo *C. thermalis*, habitante de fuentes termales, mostraron que formaba una familia, Chroococciopsidaceae Geitler ex Büdel, Donner & Kauff (Büdel y Kauff, 2012), definida por su morfología, con células solitarias subsféricas o irregulares que formaban agrupaciones no polarizadas. El género forma un orden propio Chroococciopsidales (Komárek y Anagnostidis 1998; Komárek et al., 2014). Se trata de organismos que, en su mayoría, viven en hábitats extremos tales como desiertos fríos o cálidos o hábitats salobres (Komárek y Hindak, 1975; Friedmann, 1980; de los Ríos et al., 2010; Cumbers y Rothschild 2014).

En la Cueva de Nerja, representa el morfotipo más abundante de las muestras analizadas y ha sido identificado en las zonas Ne.1, Ne.2, Ne.3, Ne.4, Ne.8, Ne.9, Ne.11. A nivel molecular, secuencias obtenidas de material de campo de Ne.1, Ne.2 y Ne.10 y de cultivo muestran un 90% de similitud con de una cepa halotolerante del género *Halotheca* (García-Pichel et al., 1998).

6.5.2. Clase Cyanophyceae, Orden Chroococcales, Familia Aphanothecaceae (Komárek et al., 2014)

1. *Aphanothece* Nägeli 1849

Especie tipo: *Aphanothece microscopica* Nägeli 1849

Colonias multicelulares micro o macroscópicas, gelatinosas, esféricas o sin forma definida, formadas por células ovales o cilíndricas con extremos redondeados, dispuestas irregularmente en colonias mucilaginosas amorfas. El mucílago colonial puede ser delgado, incoloro, homogéneo y difluente (subg. *Anathece*), de límites definidos y superficie más o menos lisa y homogénea (subg. *Cyanogastrum*) o estratificado, de color amarillento a amarillo pardusco en la periferia formándose, en este último caso, vainas individuales delimitadas y/o estratificadas alrededor de las células (subf. *Aphanothece*) (Fig. 6.42). El cromatoplasma, en ocasiones, está bien diferenciado. La división celular se lleva a cabo por fisión binaria en un plano perpendicular al eje longitudinal, durante sucesivas generaciones. El movimiento de las células hijas, después de la división, dan la apariencia de división oblicua (Kómarek y Anagnostidis, 1998; Komárek et al., 2011). La reproducción se lleva a cabo por fragmentación de las colonias e incluso por células aisladas. La formación de nanocitos se da sólo en algunas especies.

El género *Aphanothece* fue descrito por Nägeli, en 1849, en base a criterios morfológicos. Posteriormente, esta descripción del género ha sido modificada y ampliada diversas veces y ha dado lugar a la separación de subgéneros y la transferencia de diversas morfoespecies a otros géneros (Kómarek et al., 2011). La reorganización se ha basado en caracteres moleculares (16S rDNA) como criterio básico para evaluar las unidades taxonómicas a nivel genérico y los caracteres ultraestructurales y morfológicos (fenotípicos) que coincidían con los resultados genéticos, como criterios adicionales (método polifásico).

Aphanothece saxicola Nägeli 1849

Los morfotipos identificados en la Cueva de Nerja coinciden, morfológicamente, con esta especie. Se observa su desarrollo sobre espeleotemas con escorrentía irregular, formando colonias microscópicas, dispuestas densamente en grandes masas localmente abundantes,



gelatinosas y amorfas, de color pardo. Poseen una única envoltura mucilaginosa incolora, indistinta. Las células son ovales o cilíndricas con extremos redondeados, con contenido no homogéneo, de color verde oliva y sin clara separación entre cromatoplasma y nucleóide. Su tamaño (2,2- 2,4- 2,8 (-3,5) x (3,3-) 3,9- 4.1 (-5,0) μm es ligeramente superior a los mínimos citados para la especie (1,5 μm de ancho) (Figs. 6.42 y 6.43).

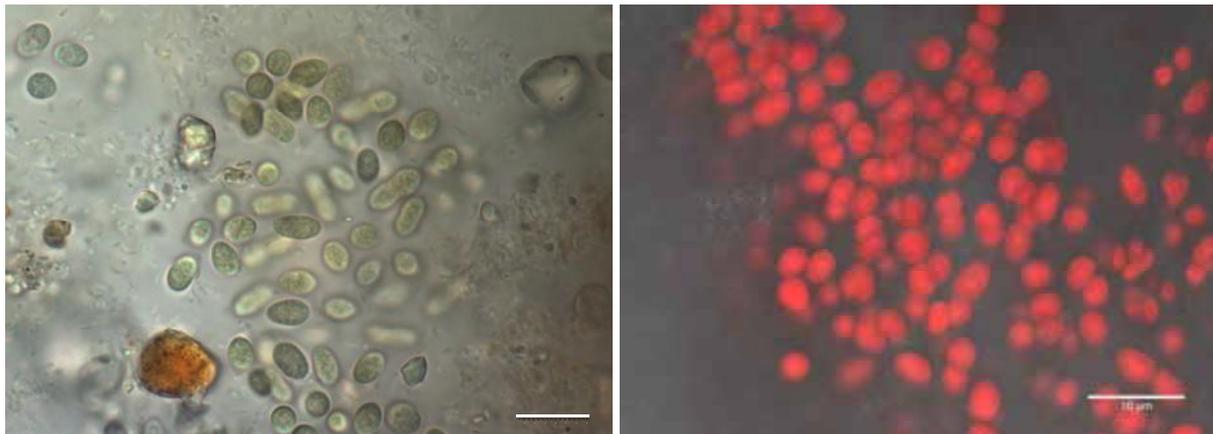


Figura 6.42. Microfotografías de *Aphanothece saxicola* de la zona Ne.11. A la izquierda, óptica convencional de la superficie de la muestra con organismos y gránulos de sustrato. A la derecha, CLSM de máxima intensidad de proyección para la fluorescencia natural de los pigmentos fotosintéticos (escala 10 μm).

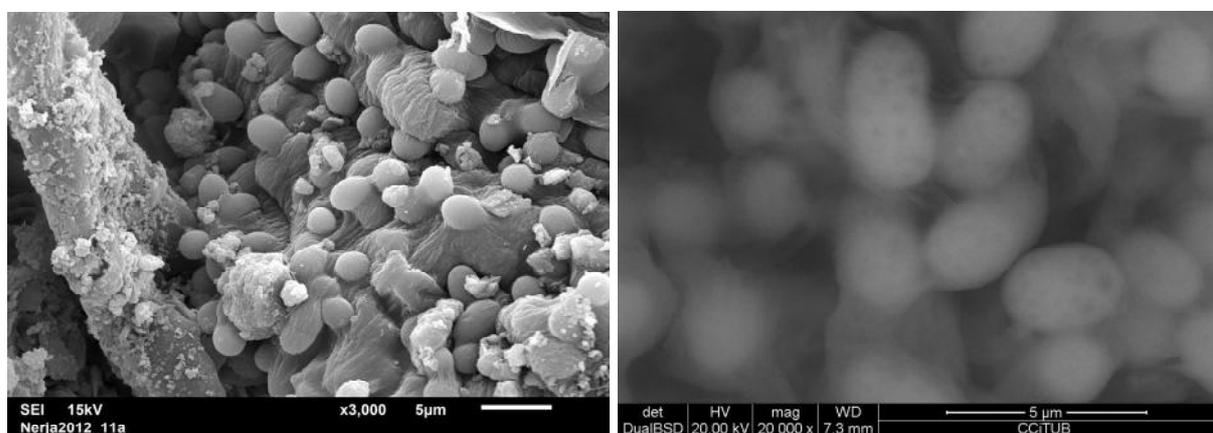


Figura 6.43. Imágenes de *Aphanothece saxicola*. A la izquierda, microfotografía SEM que muestra su distribución en el sustrato. A la derecha, microfotografía SEM-BSE en la que se aprecia la presencia de vaina y la irregularidad de la disposición de los tilacoides en el interior de los organismos.

Mediante longitud de onda de excitación de 488 nm, el espectro de emisión permitió determinar la presencia de los pigmentos ficoeritrina (emisión entre 572 a 577 nm), ficocianina (emisión entre 640 a 645 nm), aloficocianina (emisión entre 658 a 664 nm) y clorofila a (emisión entre 679 a 684 nm) (Fig. 6.44).

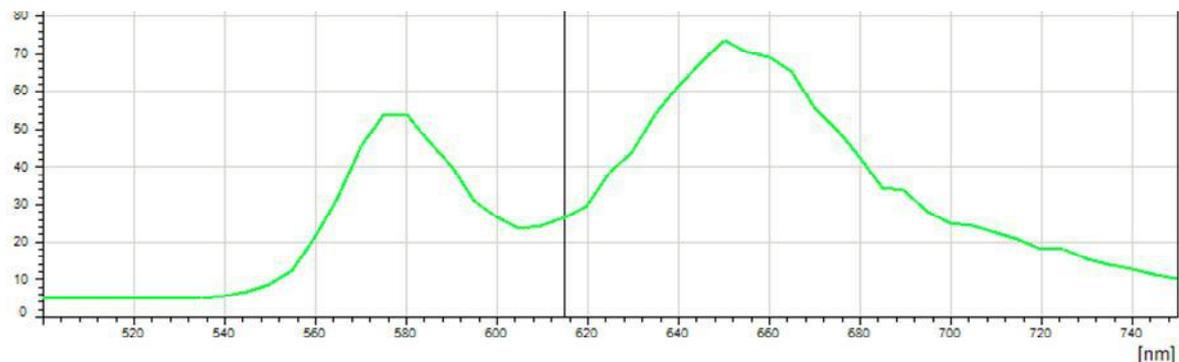


Figura.6.44. Perfil espectral de la máxima autofluorescencia emitida por los pigmentos fotosintéticos de *A. saxicola* mediante longitud de onda de excitación de 488 nm. Se observan los picos de emisión de la flicocitrina y la suma de aloflicocianina y clorofila a.

A nivel ultraestructural los tilacoides se disponen paralelamente en pequeños fascículos que se encuentran irregularmente distribuidos por todo el volumen de la célula. Esta distribución, característica del grupo de *Aphanothece sensu stricto* (Kómarek et al., 2011), es visible tanto en las secciones longitudinales como en las transversales (Fig. 6.45).

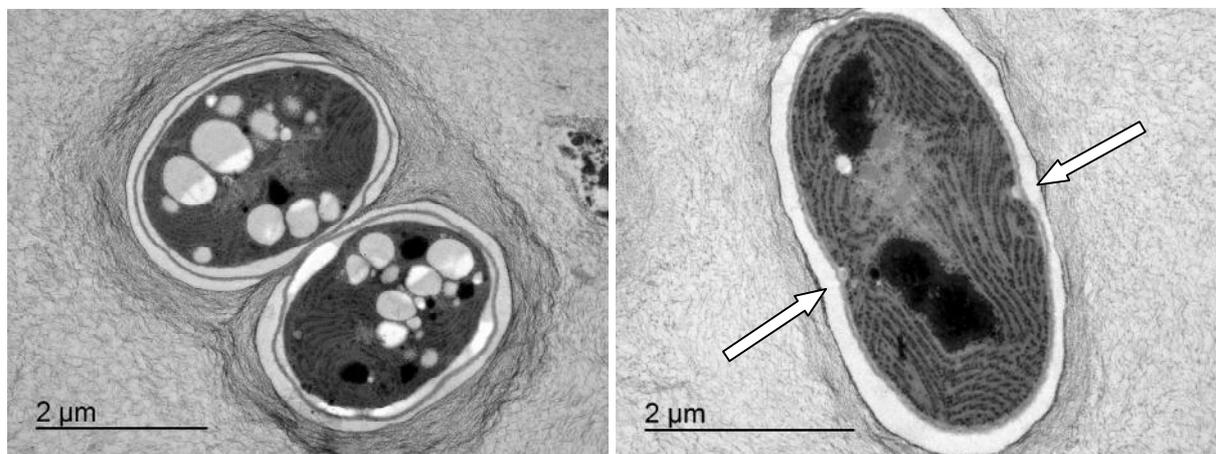


Figura 6.45. Microfotografías TEM de células de *Aphanothece saxicola* (Ne.12) A la izquierda, dos células cortadas transversalmente después de la división. A la derecha, sección longitudinal de célula alargada con evidencia de la formación del septo (flechas) característico de las primeras etapas de la división. En ambas imágenes se observan los tilacoides paralelos, formando fascículos e irregularmente distribuidos por la célula. También se observan las vainas difluentes alrededor de las células.

El resultado del análisis molecular no indica evidencia de su pertenencia al género *Aphanothece*. La similitud con especies de los géneros próximos: *Cyanothece* sp. (AB067581), *Gloeothece* sp. (AB067577) y *Aphanocapsa* sp. (EU249123) es del 92%.

A. saxicola es una especie aerofítica y subaerofítica que crece sobre rocas húmeda, suelos y otros ambientes húmedos. También ha sido descrita en cuevas (Popovic, 2015, Seckt, 1938; Margalef, 1952). Más información sobre su distribución puede consultarse en Komárek y Hauer, (2013) y, específicamente, sobre superficies rocosas en Hauer et al. (2015).

En la Cueva de Nerja este morfotipo se ha identificado en las zonas Ne.9, Ne.11, Ne.2, Ne.12 y Ne.ama.

2. Gloeotheca Nägeli 1849

Especie tipo: *Gloeotheca linearis* Nägeli 1849

Este género forma colonias pequeñas, compuestas por grupos de 2, 4 o más células que poseen vainas gelatinosas individuales y vainas comunes que, a veces, rodean a los grupos. Las capas de mucílago se componen de sustancias poliméricas producidas por las propias células. Las vainas pueden ser hialinas o formar envolturas lameladas, incoloras o azuladas, violetas o pardas, con márgenes delimitados. Pueden formar grandes acumulaciones micro o macroscópicas de textura mucilaginosas. Las células son anchamente ovales o cilíndricas con extremos redondeados, azuladas, verde azuladas, pardas o violetas. Presentan contenido granular o gránulos prominentes. La división celular es transversal, respecto al eje longitudinal, en un plano durante generaciones sucesivas. Antes de la siguiente división, las células crecen hasta el tamaño original y producen sus propias vainas. La reproducción se realiza mediante la desintegración de los agregados coloniales o por liberación de las células tras la gelatinización de las envolturas.

La mayoría de especies del género se desarrollan en hábitats aerofíticos, principalmente piedras húmedas en montañas. Se han citado también en zonas húmedas con plantas y detritos y una especie planctónica (Geitler, 1932; Komárek, 1992; Komárek y Anagnostidis, 1998).

Gloeotheca rupestris (Lybgbye) Bornet in Wittrock et Nordstedt 1880

El morfotipo identificado en Nerja coincide morfológicamente con la especie *G. rupestris* (Lybgbye). Presenta colonias verdosas, pequeñas y formadas hasta por 32 células con vainas,

que se agrupan irregularmente. Las vainas son concéntricas, lameladas, conspicuas, delimitadas e incoloras o con la capa exterior amarillenta, al menos en algunos grupos (Fig. 6.46). Las células son verdosas con contenido granuloso, elipsoidales, ovoides o cilíndricas con extremos redondeados de tamaño (7,6-) 7,6 (-7,7) x (10,8-) 14,1 (-16,0) μm (Fig. 6.46).

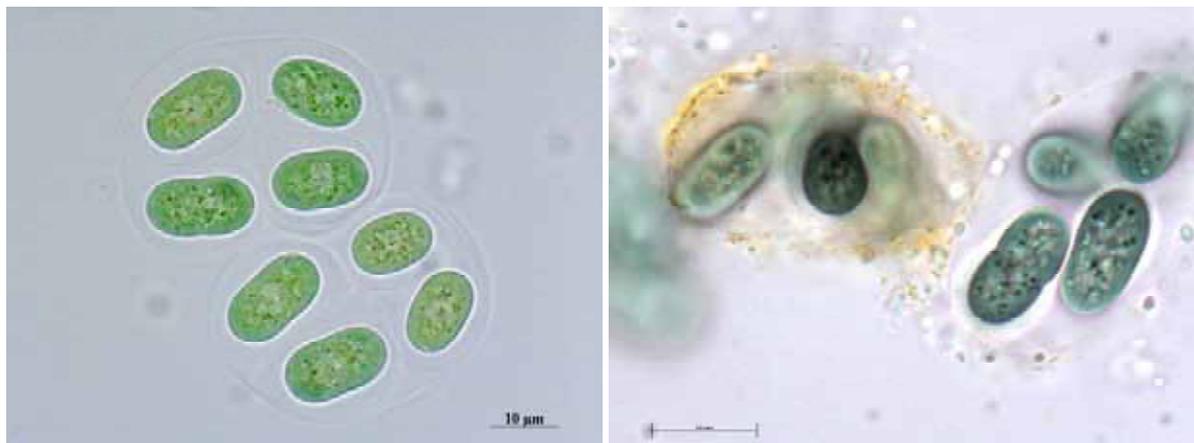


Figura 6.46. Microscopía óptica de *Gloeotheca rupestris* que muestra las capas concéntricas lameladas, formadas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS). La imagen de la derecha presenta exterior de la vaina con coloración amarillenta (típico del morfotipo) y también con pequeños depósitos (escala 10 μm).

A nivel ultraestructural, los tilacoides se disponen más o menos radialmente en fascículos que se encuentran irregularmente distribuidos por todo el volumen de la célula. Se dividen mediante fisión binaria simple y simétrica en dos partes iguales, con plano de división orientado perpendicularmente al eje mayor (Fig. 6.47).

G. rupestris se considera una especie cosmopolita, con desarrollo aerofítico o sobre rocas húmedas, tanto en medios antrópicos como naturales, entre ellos, las cuevas (Komárek y Anagnostidis, 1998; Komárek y Hauer, 2013; Hauer et al., 2015).

En la Cueva de Nerja, este morfotipo se identificó en Ne.3c-2, de muestreo puntual y con características ecológicas semejantes a las zonas Ne.11 y Ne.12.

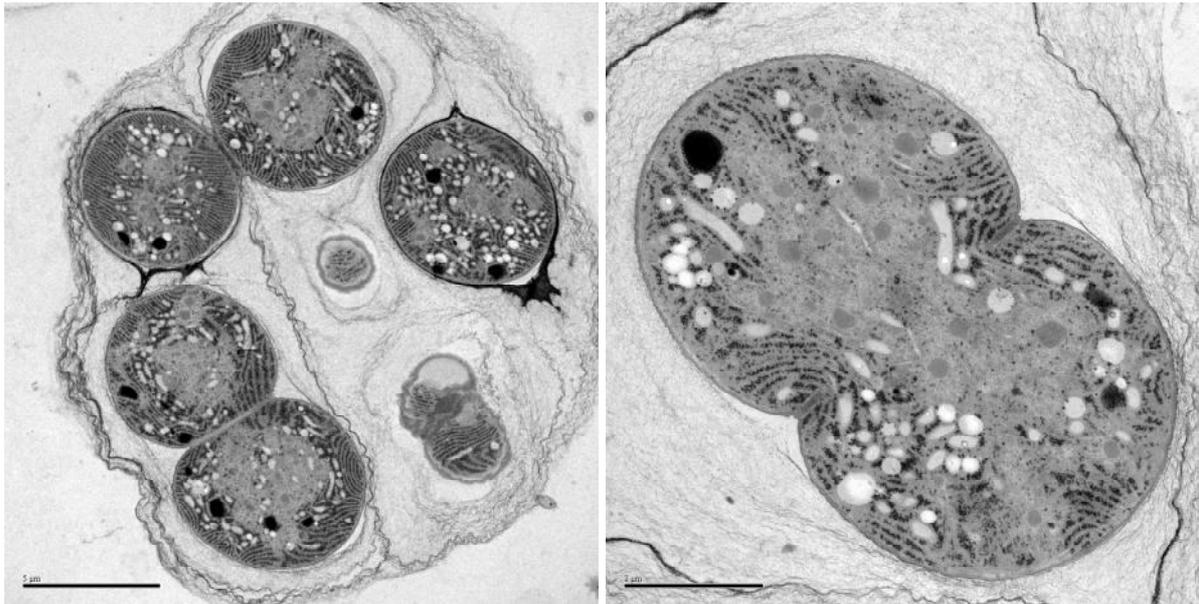


Figura 6.47. Microfotografías TEM de *Gloeotheca rupestris*. A la izquierda, colonia con capas mucilaginosas amplias y lameladas y células con tilacoides periféricos que se agrupan, casi perpendiculares, a la superficie. A la derecha, inicio de la división celular mediante invaginación simétrica de la membrana citoplasmática y de la capa de peptidoglicano.

6.5.3. Clase Cyanophyceae, Orden Chroococcales, Familia Microcystaceae (Guiry, 2015)

Género *Gloeocapsa* Kützing 1843

Especie tipo: *Gloeocapsa atrata* Kützing 1843

Colonias microscópicas que pueden llegar a ser macroscópicas, generalmente pluricelulares (formadas por pequeños grupos de células), mucilaginosas, amorfas, epilíticas o epífitas (raramente libres en agua). Tanto las células individuales como los grupos se rodean de anchas vainas, generalmente concéntricas, estratificadas y mucilaginosas, que se unen formando masas. Las vainas pueden ser incoloras o coloreadas por pigmentos (gloeocapsina, escitonemina) que le confieren tonalidad amarilla, amarilla-marrón, naranja, roja, azul o violeta, en función de la especie, de la fase del ciclo de vida y del hábitat en el que se desarrollen los organismos.

Las células son esféricas o raramente ovaladas. Cada célula se divide mediante fisión binaria dentro de su vaina y, en las divisiones sucesivas, en tres planos perpendiculares produciendo su propia vaina. Después de la división son hemisféricas, generalmente con contenido homogéneo azul-verde pálido, a veces con gránulos solitarios. Crecen hasta el tamaño

original antes de volver a dividirse. Se reproducen mediante la liberación de células, con o sin envolturas mucilaginosas. Presentan ciclos vegetativos con distintas formas morfológicas (status), condicionadas por influencias ecológicas. Pueden colonizar grandes áreas sobre de sustratos rocosos áridos o húmedos y en otras zonas húmedas. Se considera que muchas especies son cosmopolitas (Komárek y Anagnostidis, 1998).

***Gloeocapsa atrata* Kützing 1943**

El morfotipo identificado en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Gloeocapsa atrata*. Presenta colonias de hasta 30 μm de diámetro, constituidas por subcolonias subesféricas. Cada subcolonia está formada por 2, 4, 8 o más células esféricas con envolturas individuales incoloras, ovales o esferoidales, aunque claramente lameladas y de grosor variable.

Las células son de color azul-verdoso y pálido, de forma esférica o levemente alargada, semiesférica después de la división, que tiene lugar por fisión binaria, en primer lugar, y en tres planos perpendiculares en las sucesivas divisiones. Los tamaños que presenta son variables, en su mayoría 1,1-(2,35)-3,34, aunque algunas células son más grandes, sin superar los 4,2 μm de diámetro.

El espectro de emisión de los pigmentos informó de la presencia de ficocianina (entre 640 a 645 nm), aloficocianina (entre 658 a 664 nm) y clorofila a (entre 679 a 684 nm) (Fig. 6.48).

Esta especie presenta una distribución cosmopolita y ha sido ampliamente descrita en paredes y rocas húmedas, suelos y cuevas, principalmente de zonas no antropizadas. (Hauer et al., 2015, Komarek y Anagnostidis, 1998).

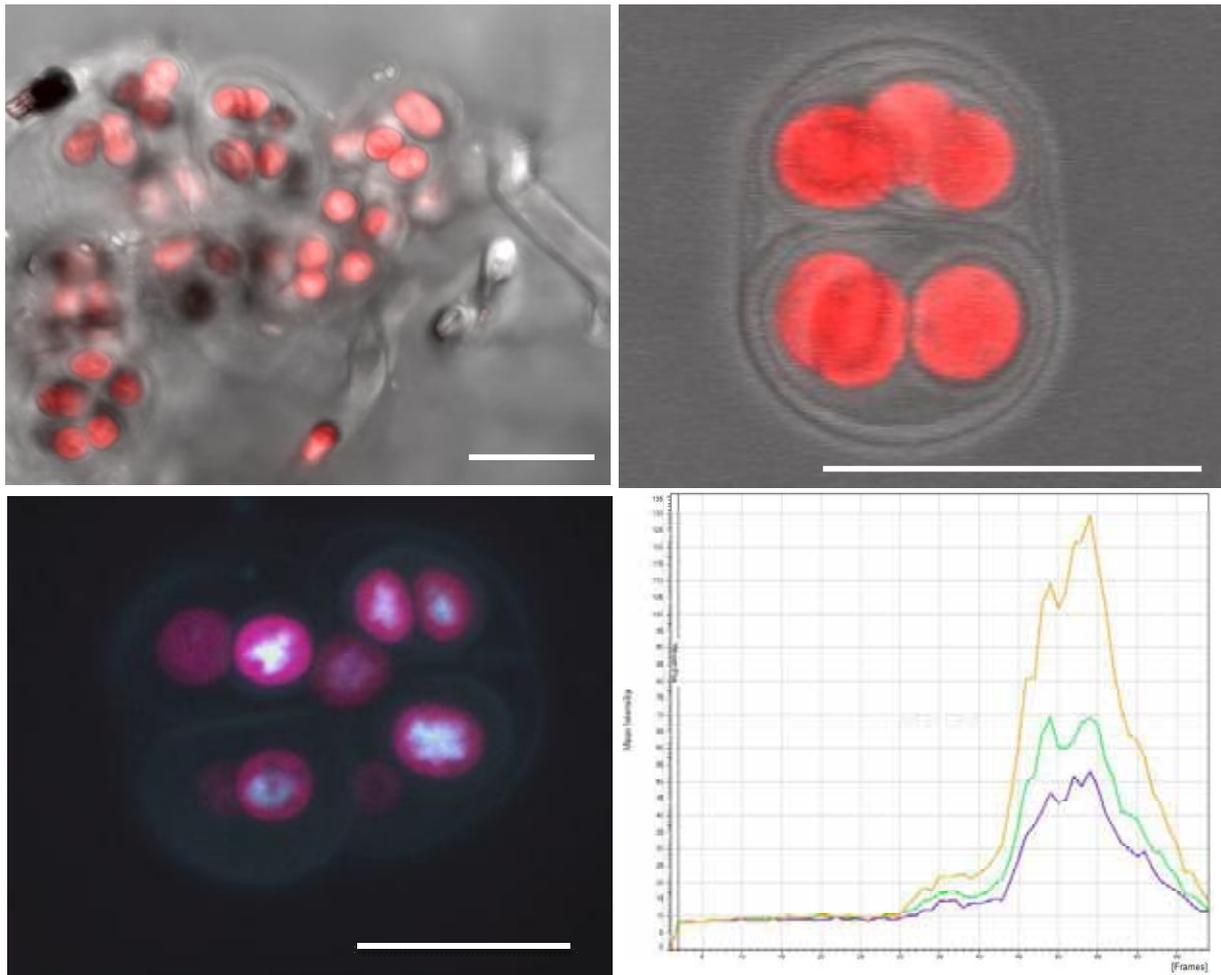


Figura 6.48. *G. atrata*. Arriba, imágenes de microscopía convencional y CLSM de máxima intensidad de proyección de fluorescencia los pigmentos (rojo). A la derecha, detalle de las vainas, claramente lameladas. Debajo, imagen CLSM de máxima intensidad de proyección. Identificación de colores: DNA teñido con marcador Hoechts 33342 (azul), fluorescencia natural de los pigmentos aloficocianina, ficocianina y clorofila a (rosa) y de las vainas (azul). A la derecha, espectro de emisión de los pigmentos de tres células que muestra, en los tres casos, los mismos máximos de emisión, correspondientes a la ficocianina (entre 640 a 645 nm), aloficocianina (entre 658 a 664 nm) y clorofila a (entre 679 a 684 nm) (escala 10 μm).

En la Cueva de Nerja, este morfotipo se identificó en las muestras de la zona Ne.12, a las que no se le realizó análisis molecular. En muestras de Ne.11, con características morfológicas semejantes a Ne.12, el análisis molecular identificó clones de *Gloeocapsa* sp. con 91% similitud con *Gloeocapsa* AB067579, procedentes de aguas costeras de Singapur (Ohki, 2008).

6.5.4. Clase Cyanophyceae, Orden Chroococcales, Familia Chroococcaeae (Komárek et al., 2014)

1. Chalicogloea M. Roldán, M. Ramírez, J. del Campo, M. Hernández-Mariné & J. Komárek 2012.

Especie tipo: *Chalicogloea cavernicola* M. Roldán, M. Ramírez, J. del Campo, M. Hernández-Mariné y J. Komárek 2012.

Este género integra células procariotas, esféricas o ligeramente oblongas, con vainas concéntricas, individuales, mucilaginosas, incoloras, lameladas o no. Los organismos se disponen en colonias microscópicas irregulares densamente pobladas. Presentan contenido azulado, incoloro en el centro y tilacoides fasciculados, irregularmente repartidos, principalmente cerca de la pared. La división es regular, en planos perpendiculares. En colonias adultas se pueden observar divisiones irregulares en las generaciones sucesivas, que no recuperan el tamaño inicial antes de la siguiente división. Especie aerofítica descrita en una cueva turística de España (Roldán et al., 2012) que, en la actualidad, no ha sido identificada en otro hábitat (Hauer et al., 2015).

Chalicogloea cavernicola M. Roldán, M. Ramírez, J. del Campo, M. Hernández-Mariné & J. Komárek 2012

La morfoespecie identificada en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Chalicogloea cavernicola*. Esta especie fue identificada formando colonias de hasta 60 µm de diámetro. Las células mostraron un tamaño de 1,7-2,5 x 2,7-3.3 µm de diámetro, contenido granular y una línea hialina central. Se observaron vainas marcadas o informes, no lameladas. Su identificación como *Chalicogloea cavernicola* se basó en criterios de hábitat y similitud de las características morfológicas, aunque en la Cueva de Nerja se mostró un tamaño ligeramente inferior a la descripción original (Fig. 6.49).

No hay evidencia molecular de la pertenencia del morfotipo identificado en la Cueva de Nerja a la especie *Chalicogloea cavernicola*.



En la Cueva de Nerja este morfotipo ha sido identificado en muestras de las zonas Ne.11 y Ne.12.

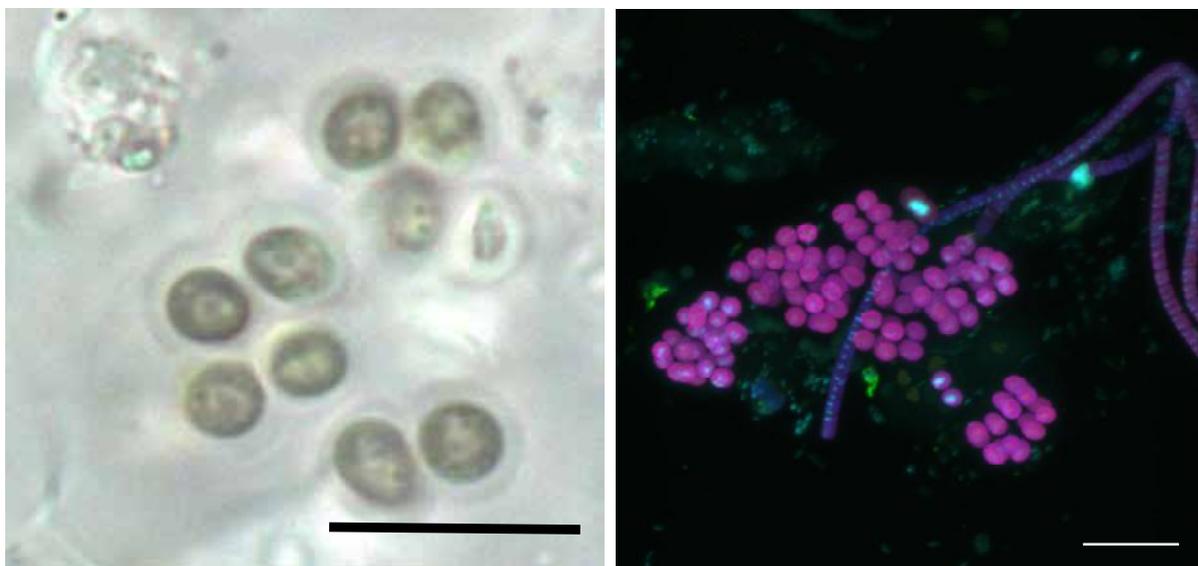


Figura 6.49. A la izquierda, microfotografía óptica convencional de *Chalicogloea cavernicola* en muestra de la zona Ne.11a (escala 10 µm). A la derecha, microfotografía CLSM con máxima intensidad de proyección para cuatro canales: rojo (autofluorescencia de ficobilinas), azul (autofluorescencia de clorofila a), verde (autofluorescencia de EPS) y azul turquesa (fluorescencia de ácidos nucleicos marcados Hoechst 33342). Composición de 108 x-y secciones ópticas (0,13 µm de intervalo). Se observa *Leptolyngbya* sp., una célula en división de *Chroococidiopsis* sp. y *Chalicogloea cavernicola* (escala 10 µm).

6.5.5. Clase Cyanophyceae, Orden Synechococcales, Familia Leptolyngbyaceae (Komárek et al., 2014)

1. *Leptolyngbya* Anagnostidis & Komárek 1988

Especie tipo: *Leptolyngbya boryana* (Gomont) Anagnostidis et Komárek

Forma filamentos y suelen encontrarse en grupo. Habitualmente forma láminas planas, flotantes o unidas al sustrato aunque también puede formar colonias compactas o costras. Los filamentos son flexuosos o curvados, solitarios o en fascículos, raramente atenuados o capitados. Pueden presentar vainas o no y, tanto su presencia como el grosor, suelen depender de los factores ambientales. Los tricomas son de 0,5-3,5 µm de ancho y presentan hormogonios móviles o inmóviles. Las células son cilíndricas, isodiamétricas, más largas o más cortas que anchas, con tilacoides periféricos y contenido homogéneo, sin vesículas de gas. Algunas cepas

presentan adaptación cromática. La reproducción es por fragmentación de tricomas, con o sin células necríticas.

Se trata de un género muy común que integra más de 80 especies, actualmente en reevaluación y definición de las características diacríticas. Engloba muchas especies que habían sido descritas en otros géneros, tales como *Lyngbya*, *Phormidium* y *Plectonema*. Es sinónimo del LPP-group B sensu (Rippka et al., 1979).

Las especies de *Leptolyngbya* son habitantes muy comunes de suelos, aguas dulces, salobres o termales. También se han descrito en rocas y paredes de monumentos. Este género es especialmente abundante en cuevas o otros medios naturales así como en ambientes artificiales (Hauer et al., 2015). La taxonomía es difícil debido a su simplicidad morfológica (Komárek, 1992). Sobreviven con escasa iluminación gracias a los pigmentos fotosintéticos ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina, además de la clorofila a (Albertano, 2012, Albertano y Hernández-Mariné, 2001).

***Leptolyngbya* sp.**

Presenta filamentos solitarios que se mezclan entre otras algas y cianobacterias, raramente formando costras con los filamentos entremezclados.

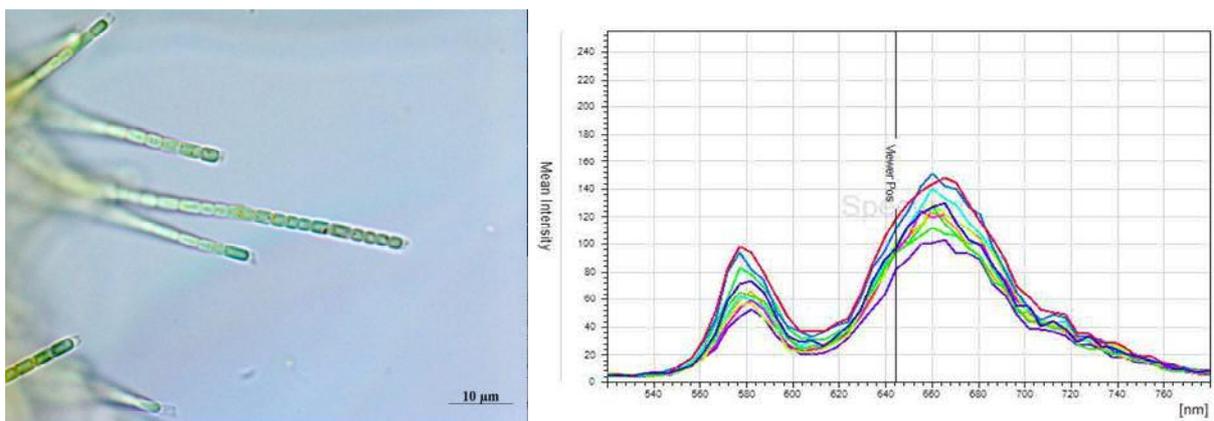


Figura 6.50. Arriba izquierda, microfotografía óptica convencional de *Leptolyngbya* sp. en sustrato. A la derecha, espectro de emisión de *Letolyngbya* sp que muestra los máximos emisión de la ficoeritrina y de un conjunto formado por ficocianina, aloficocianina y clorofila a.

Células cilíndricas, cuadradas o levemente más cortas o largas que anchas de tamaño (1,4) 2,1-2,3 (-2,5) x (1,5-) 1,7-1.9 (-2,3) μm . Célula terminal no ensanchada, redondeada o apuntada asimétricamente. Sin ensanchamiento terminal. La vaina puede ser no visible o medir hasta 3 μm de anchura (Figs. 6.51 y 6.52). El espectro de emisión celular informó de la presencia de los pigmentos ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina y clorofila a (Fig. 6.50).

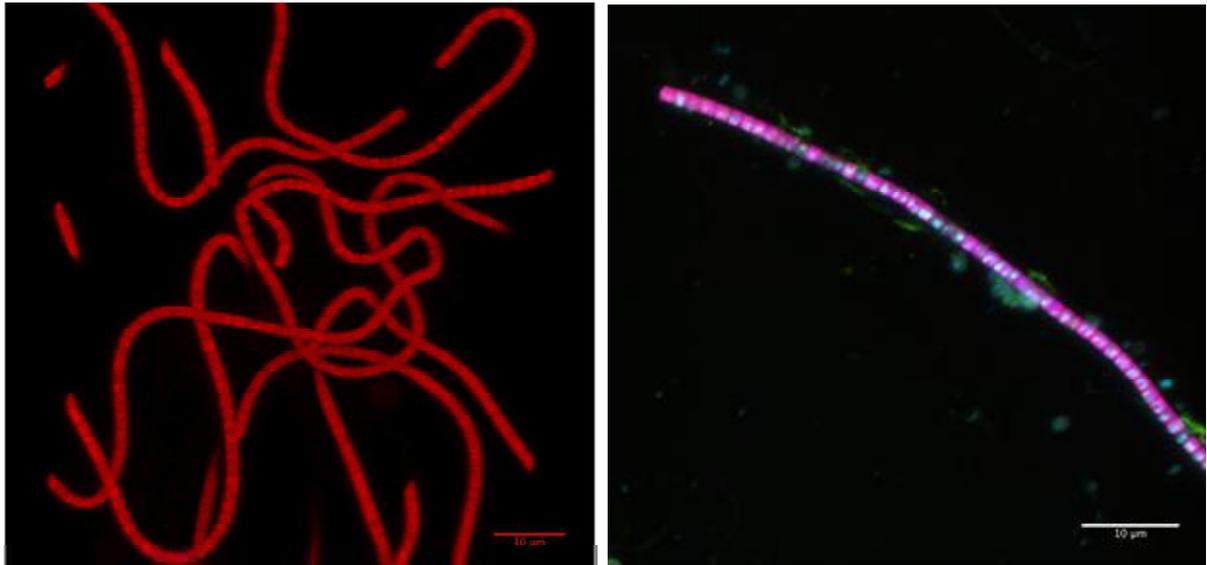


Figura 6.51. A la izquierda, imagen CLSM con máxima intensidad de proyección para la fluorescencia de los pigmentos (rojo). A la izquierda, tricoma aislado con células necróticas. Identificación de colores: nucleoides teñidos con Hoechts 33342 (cyan), sustancias exopoliméricas y/o sustrato (verde), ficobilinas (rojo) y clorofila a (azul) (escalas 10 μm).

Sus características morfológicas y de hábitat no se corresponden con ninguno de los morfotipos previamente descritos. En la Cueva de Nerja, este morfotipo ha sido identificado en muestras obtenidas en las zonas Ne.9, Ne.10, Ne.11 y Ne.12. El morfotipo identificado en la Cueva de Nerja presenta, molecularmente, un máximo de similitud del 91% con otros géneros de las Oscillatoriales, pero no con el género *Leptolyngbya*.

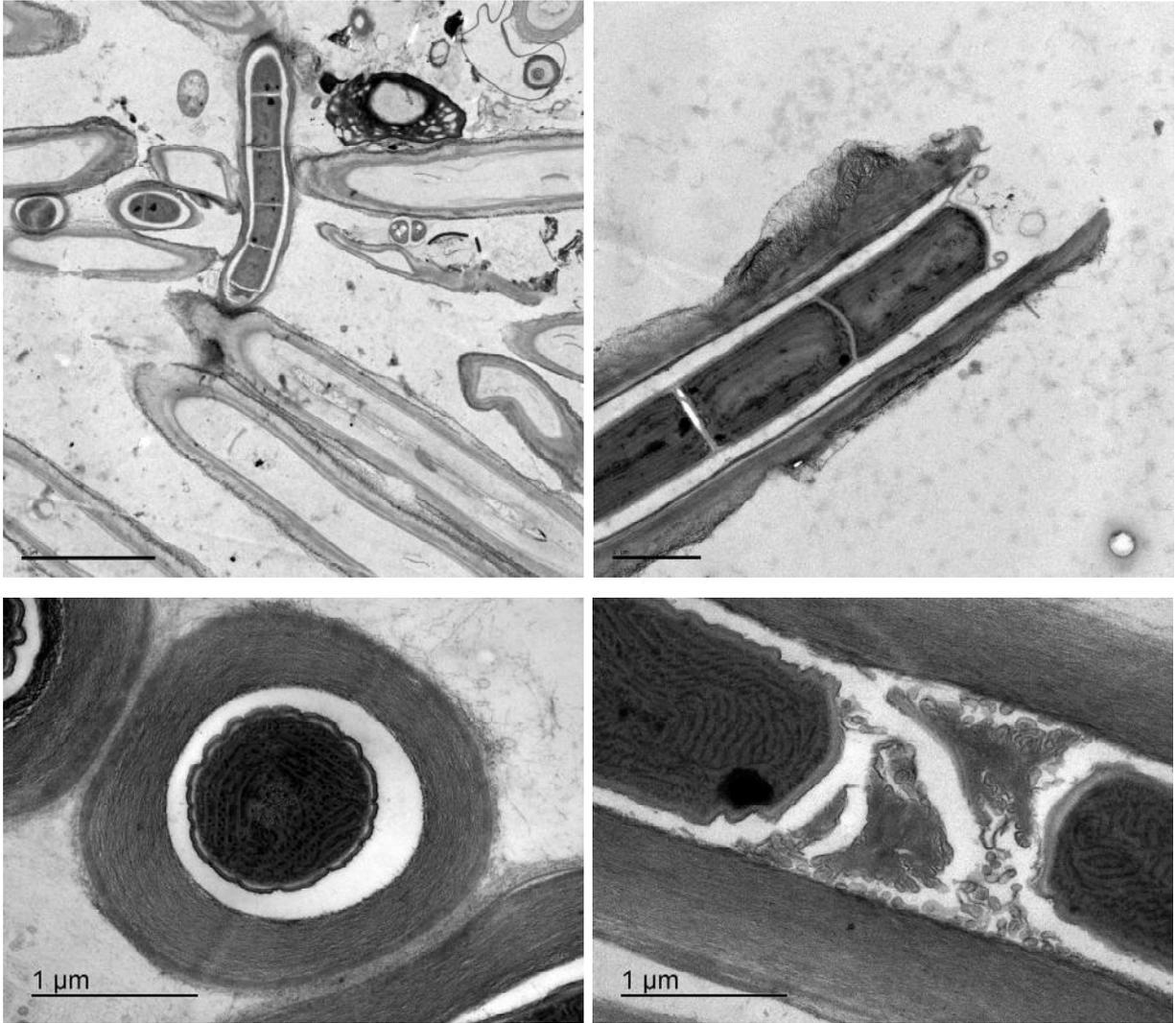


Figura 6.52. Microfotografías TEM de *Leptolyngbya* sp. Arriba, izquierda, filamento rodeado de restos de vainas (escala 5 μm). El resto de las imágenes muestran las amplias capas mucilaginosas de los tricomas, los tilacoides en disposición periférica, paralela a la pared celular necrédicas pareadas, que permiten la rotura de los tricomas y la formación de hormogonios.

6.5.6. Clase Cyanophyceae, Orden Oscillatoriales, Familia Microcoleaceae (Komárek et al., 2014)

1. *Pseudophormidium* (Forti) Anagnostidis & Komárek 1988

Especie tipo: *Pseudophormidium phormidioides* (Hansgirg ex Forti) Anagnostidis & Komárek 1988.

Por lo general, este género forma masas o grupos, a veces organizados radialmente, aunque también pueden encontrarse solitarios y mezclados con otras algas. Los filamentos tienen falsas ramas frecuentes, simple, dobles o superpuestas, en el interior de una vaina delgada y firme, raramente mucilaginosas, lamelada o no e incolora. Suelen presentar constricciones en los tabiques. Las células son isodiamétricas, en general, aunque pueden presentar forma variable. La célula terminal es obtuso-cónica, sin calibra ni ensanchamiento terminal. Los tricomas se fragmentan mediante hormocitos u hormogonios móviles. La división celular es sentido transversal, perpendicular al eje longitudinal de los tricomas, las células hijas crecen hasta el tamaño original antes de la siguiente división. Todas las células pueden dividirse, pero pueden aparecer zonas meristemáticas. No presentan vacuolas de gas y, con frecuencia, tienen gránulos. El género incluye especies del perifiton o de arroyos, junto con otras que se desarrollan en sustratos subaéreos. Muchas especies han sido transferidas a este género desde el género *Plectonema* (Komárek y Anagnostidis, 2005).

***Pseudophormidium* sp.** (Forti) Anagnostidis & Komárek, 1988

El morfotipo identificado en la Cueva de Nerja presenta un talo de color verde oliva y se encuentra irregularmente distribuido sobre el sustrato (Fig. 6.55). Los filamentos se encuentran aislados o en grupos, de 2,3-3,8 μm de ancho. Presenta falsas ramificaciones simples, tan anchas como los filamentos de los que proceden (Fig. 6.54). Vaina incolora lisa, sin ensanchamientos en la base de las ramificaciones. Tricomas cilíndricos, oliváceos, sin constricciones (1,1-) 1,6-1,8 (-1,9) x (3,0-) 4-7 (-8,7) μm . El contenido celular es homogéneo. Se observan células necríticas y células apicales redondeadas.

Este morfotipo no guarda parecido con los morfotipos de *Pseudophormidium* descritos actualmente. Así, *P. hollerbachianum* (Elenkin) Anagnostidis y *P. spelaeoides* (Cado) Anagnostidis, de ecología similar, presentan células isodiamétricas o más cortas que anchas y tienen constricciones en los tabiques. La longitud de las células del morfotipo de la Cueva de Nerja supera, en más del doble a la medida del ancho.

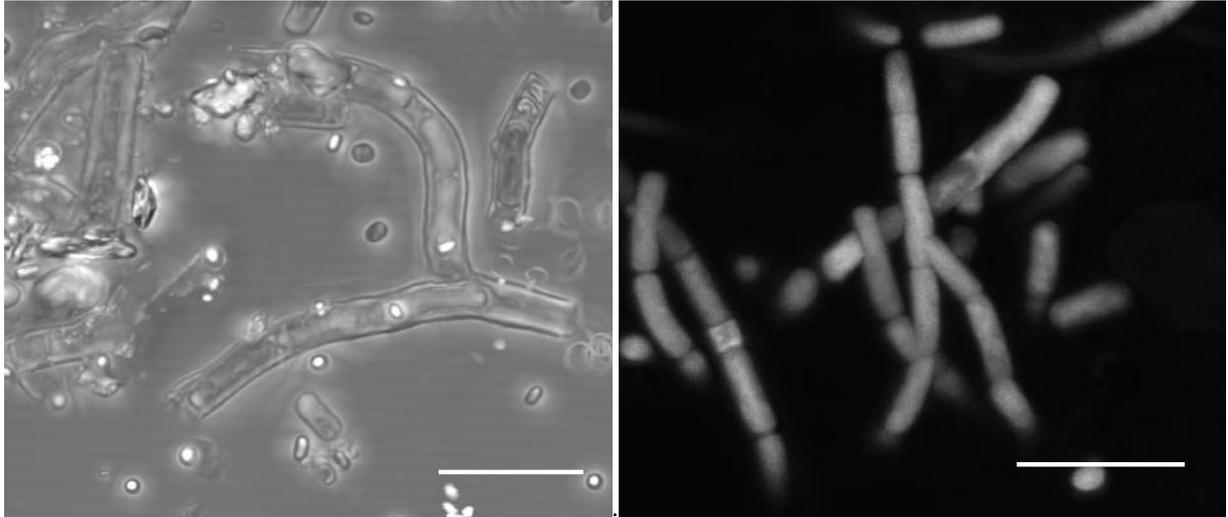


Figura 6.54. *Pseudophormidium* sp. Izquierda, microfotografía óptica convencional con falsa ramificación de tricoma, mantenida por la vaina.. Derecha, imagen CLSM de máxima intensidad de proyección de ficobilinas (blanco) (escalas 10 μ m).

El espectro de emisión de los indicó la presencia de los pigmentos ficoeritrina (pico sobre 560 nm) y ficocianina, aloficocianina y clorofila a (con picos solapados sobre 650) (Fig. 6.55).

El desarrollo observado es epilítico y casmoendolítico, en ningún caso endolítico (Fig. 6.56)

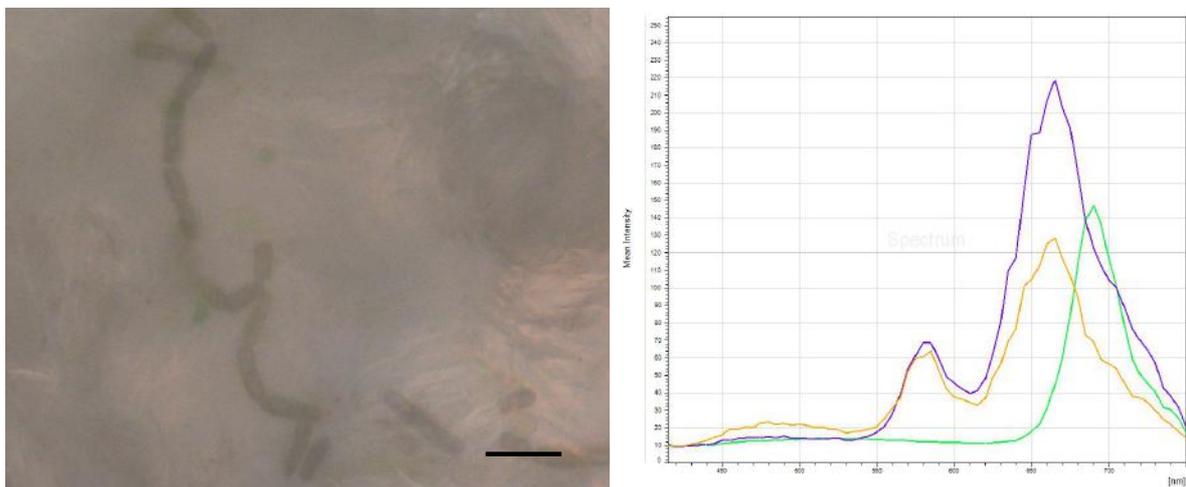


Figura 6.55. Imagen de campo de *Pseudophormidium* sp. (escala 10 μ m) y espectros de emisión superpuestos de los pigmentos de *Pseudophormidium* sp. (morado y amarillo) y *Jenufa* sp. (verde). Los espectros morado y amarillo corresponden a *Pseudophormidium* sp. y muestran dos máximos, uno sobre 560 nm, que corresponde a la ficoeritrina y otro sobre 650 que representa el solapamiento de la ficocianina, aloficocianina y clorofila a. El espectro verde corresponde a *Jenufa* sp. y muestra un máximo, sobre 680 nm que corresponde a las clorofilas a y b.

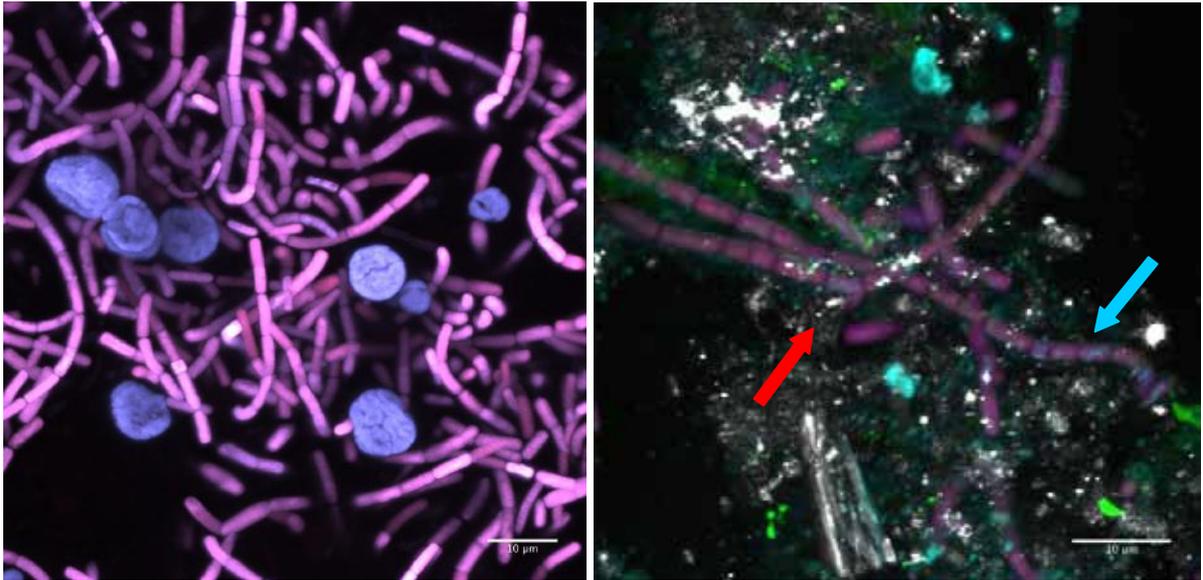


Figura 6.57. Microfotografías CLSM de máxima intensidad de proyección de material de campo con *Pseudophormidium* sp. y *Jenufa* sp. (izqd.). A la derecha, las flechas señalan los nucleoides (azul) y un inicio de ramificación *Pseudophormidium* sp. (roja). Identificación de colores: autofluorescencia de la ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina (rojo), DNA teñido con Hoechts 33342 (cian), autofluorescencia de la clorofila (azul), autofluorescencia EPS (verde), reflexión material inorgánico (blanco) (escalas 10 µm).

Este morfotipo se identificó en las zonas Ne.10, Ne.12, Ne.ama, 3c-2. La inexistencia de clones similares en el análisis molecular plantea la hipótesis de que se trate de un morfotipo no descrito

6.5.7. Clase Cyanophyceae, Orden Nostocales, Familia Nostocaceae (Komárek et al., 2015)

1. *Nostoc* Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888.

Especie tipo: *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888.

Se observa como filamentos agregados y entremezclados irregularmente en colonias gelatinosas, usualmente macroscópicas, con envolturas periféricas. Las colonias suelen ser esféricas cuando son pequeñas y, posteriormente, adoptan morfologías variables en el mucílago común. Presentan ciclos de vida variables, con diferentes filamentos y forma de las colonias. Los tricomas son uniseriados y se estrechan en los tabiques, inicialmente envueltos por vainas mucilaginosas. Las células tienen morfología de tonel a cilíndricas. Los heterocistos son generalmente solitarios y con frecuencia tienen posición apical. Los acinetos se desarrollan a

partir de células vegetativas solitarias, aunque todas las células del filamento pueden transformarse sucesivamente. Suelen ser mayores que las células vegetativas. La reproducción se lleva a cabo mediante hormogonios móviles. Las células se dividen en un plano perpendicular al eje del tricoma (Komárek, 2013).

El género *Nostoc* es heterogéneo y se encuentra en revisión en la actualidad. El análisis molecular ha motivado la separación de grupos a nivel de género. De distribución ecológica amplia, incluye importantes fijadores de nitrógeno y muchos tipos simbióticos.

Nostoc punctiforme (Kützing ex Hariot) Hariot 1891

El morfotipo identificado en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Nostoc punctiforme*. Presenta colonias pequeñas, esféricas, subaerofíticas, unidas a sustrato, negruzcas, generalmente de menos de 1 mm de diámetro que se forman por filamentos entremezclados densamente que, en estadios jóvenes, se observan aglomerados. Vainas finas e incoloras. Células en forma de barril, irregularmente esféricas a elipsoidales de tamaño (2,4-) 2-4,5 (-5.0) μm . Se observan heterocistos con forma de tonel de 4-6 μm y no se determinan acinetos (Fig. 6.58).



Figura 6.58. Imagen de microscopía óptica convencional con *Nostoc punctiforme* de muestra de campo de la zona Ne.14_suelo (escala 10 μm).

El espectro de emisión de los pigmentos fotosintéticos informó de la presencia de ficoeritrina (sobre 580 nm) y ficocianina, aloficocianina y clorofila a (sobre 650 nm) (Fig. 6.59). En la Cueva de Nerja se observó, con desarrollo epilítico y casmoendolítico, en la Sala de la Torca, iluminada por luz natural (Ne.4) al principio de nuestro estudio y posteriormente, no se volvieron a identificar en esta zona (Fig. 6.59). En el interior de la cueva, en una zona de

muestreo puntual, con sustrato de sedimento y presencia de agua líquida estacional (Ne.14_suelo), también ha sido observada. Esta especie es típicamente aerófitica, cosmopolita y muy común en ambientes naturales (entre ellos las cuevas) y artificiales y también ha sido citada como simbiótica (Komárek, 2013; Hauber, 2015; Guiry, 2015).

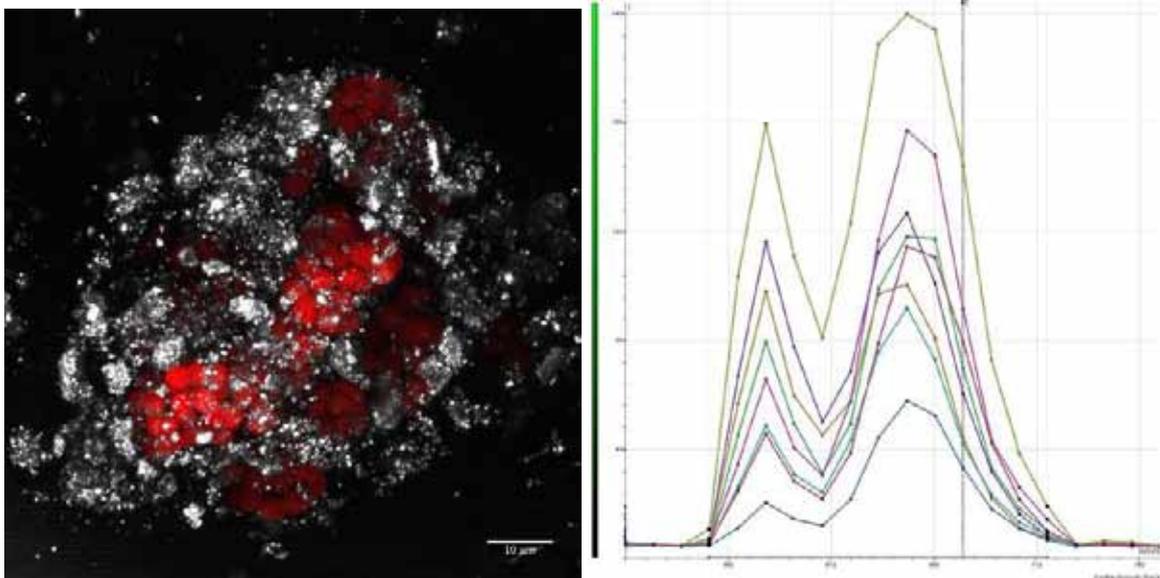


Figura 6.59. A la izquierda, imagen CLSM de máxima intensidad de proyección de la fluorescencia natural de los pigmentos fotosintéticos de *Nostoc punctiforme*. A la derecha, espectros superpuestos de emisión de diversas células individuales que muestran distintas intensidades de fluorescencia, con los picos de máximo de la ficoeritrina y los picos máximos solapados de la ficocianina, aloficocianina y clorofila a.

6.5.8. Clase Chlorophyceae, Orden Chlamydomonadales, Familia Coccomyxaceae (Guiry, 2015)

1. *Choricystis* (Skuja) Fott, 1976

Especie tipo: *Choricystis minor* (Skuja) Fott

Alga verde que presenta células aisladas, ocasionalmente en parejas. Con forma anchamente elipsoidal, ovoide o globulosa, con cloroplasto parietal abierto y sin pirenoide. Reproducción por división oblicua y esporulación mediante ruptura de la pared celular.

En las muestras procedentes de la Cueva de Nerja, *Choricystis* sp. presenta células solitarias, libres y sin mucílago, elipsoidales, ovoides o casi globulosas de tamaño 6,0-8,5 x 4,0-

5,0 μm , con simetría respecto al eje longitudinal, los extremos ampliamente redondeados o cónicos y un plasto parietal, raramente dos, sin pirenoide. Se multiplican mediante división vegetativa oblicua en el interior de la membrana maternal (dos autosporas).

Esta morfoespecie se identificó exclusivamente en material de cultivo de enriquecimiento de muestras obtenidas en la zona Ne.8 y, en ningún caso, en material de campo.

6.5.9. Clase Chlorophyceae, Orden Chlorophyceae incertae sedis, Familia Chlorophyceae (Guiry, 2015)

1. Jenufa Nemcová, M. Eliás, Skaloud & Neustupa, 2011

Especie tipo: *Jenufa perforata* Němcová, M. Elias, Skaloud & Neustupa, 2011

Presenta células vegetativas solitarias, esféricas o con contorno irregular. Tienen un núcleo único y centrado. La pared celular es lisa y claramente visible. El cloroplasto es parietal, único, perforado o lobulado y sin pirenoide. La reproducción asexual tiene lugar mediante la formación de 2 a 8 autoesporas. No se ha observado reproducción sexual ni producción de zoosporas. No presenta carotenoides secundarios. El género se diferencia de otros miembros de las Chlorophyceae por la secuencia de 18S rRNA (Němcová et al., 2011).

***Jenufa* sp.**

Las células vegetativas son solitarias, uninucleadas con contorno esférico, irregular o elíptico, de tamaño (2,3-) 3,3-5,8(-6,5) μm de diámetro y pueden presentar un pequeño ensanchamiento de la pared. El único cloroplasto es parietal, en copa en las autosporas, con lóbulos irregulares en las células adultas y sin pirenoide. La reproducción asexual se realiza mediante 2 o 4 autosporas, raramente 8. No se observa la reproducción sexual ni la producción de zoosporas. El espectro de emisión de los pigmentos fotosintéticos no muestra la presencia de carotenoides (Fig. 6.60).



El análisis de la ultraestructura celular revela la presencia de autosporas redondeadas u ovoides con núcleo junto a un cloroplasto inicialmente parietal. Presentan vacuolas, con contenido poco denso, que aumentan de tamaño y contenido en las células adultas. La mitocondria se encuentra entre el núcleo y el cloroplasto. En las células adultas el cloroplasto tiene gránulos de almidón en la matriz y el margen ondulado o lobulado, que se separa de la membrana citoplasmática. Durante la autosporulación el núcleo se divide en 2 o 4, raramente 8 y, seguidamente, se separa el citoplasma dentro de la pared maternal. La pared celular se compone de dos capas principales: por fuera de la membrana citoplasmática presenta una capa amorfa de 50 a 150 nm de grosor, dependiendo de la rapidez de su división. Dicha capa está rodeada exteriormente por otra capa trilaminar de casi el mismo grosor. Estas capas son visibles tanto en las células adultas como en las membranas maternales, que pueden llegar a medir hasta 300 nm y en las que se observan manchas electrón-densas. Después de la división, la pared maternal permanece durante un tiempo unida a las paredes de las autosporas, que ya han formado su propia pared y, posteriormente, se degrada.

Hasta el momento se han descrito dos especies del género *Jenufa* que se desarrollan en cortezas de árboles de Singapur (Němcová et al., 2011). Ambas especies presentan escasas diferencias morfológicas y fueron diferenciadas molecularmente. En su descripción, se citan diferencias en el número de autosporas producidas, hasta 8 en *J. perforata* y hasta 6 en *J. minuta*. No obstante, se cita que esta última puede presentar hasta 8 núcleos durante la autosporulación, lo que indica que también podría producir hasta 8 autosporas. Este hecho motivaría la inexistencia de diferencias marcadas entre ambas especies a nivel de la producción de esporas. Morfológicamente *J. perforata* tiene el cloroplasto parietal, que puede llegar a formar una esfera vacía, densamente perforada, mientras que en *J. minuta* el único cloroplasto es también parietal y con lóbulos. Ambas especies carecen de pirenoide y tienen gránulos de almidón. Sus tamaños se solapan, aunque *J. minuta* presenta un tamaño máximo menor. En relación con la pared celular, *J. perforata* tiene una gruesa capa interna de hasta 300 nm, compuesta por varias capas discernibles microfibrilares. Se observan fragmentos de la pared celular maternal unida a las autosporas recién liberadas. La capa interna granulo-fibrilar de la pared celular madre se reduce y se llena con inclusiones electrón-densas. En contraste, *J. minuta* tiene una capa amorfa de unos 150 nm. La capa exterior, posiblemente bilaminar, es de unos 50 nm. No obstante se observó una subestructura trilaminar en la pared celular madre, después de la degradación de la capa interior

amorfa. Estas pequeñas diferencias morfológicas no justificarían la separación de especies, pero las diferencias moleculares si lo permiten (Němcová et al., 2011).

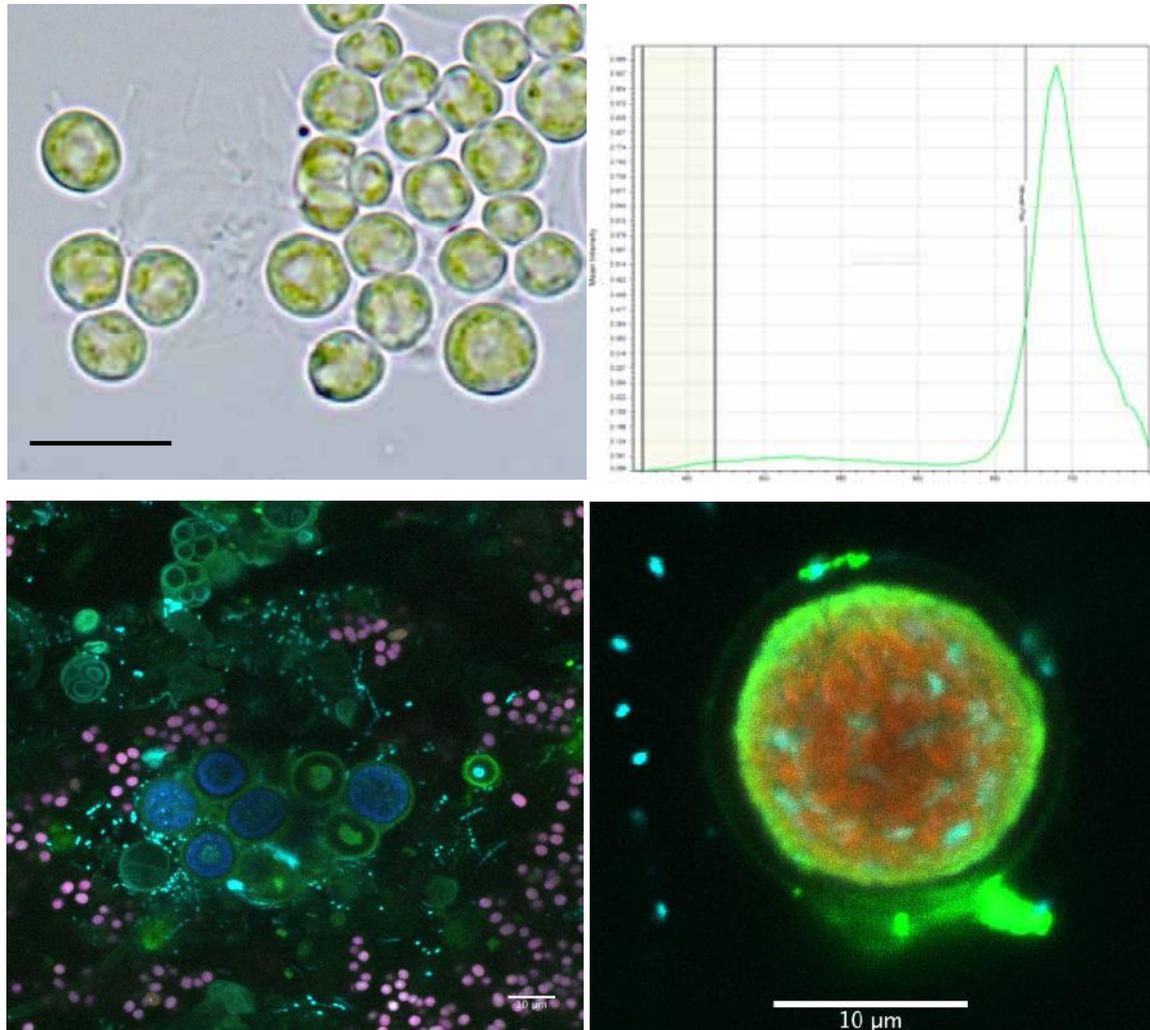


Figura 6.60. Arriba, microfotografía de *Jenufa* sp. en material de campo de la Cueva de Nerja y espectro de emisión de *Jenufa* sp. que muestra los picos de emisión máxima de la clorofila a y b (entorno a 680 nm), únicos pigmentos fotosintéticos de esta morfoespecie. Debajo, imágenes CLSM. A la izquierda, proyección máxima en la dirección z que permite observar la estructura del biofilm gelatinoso en Ne.12, con mezcla de *Aphanothece saxicola*, *Gloeocapsa atrata* y *Jenufa* sp. Identificación de colores: DNA marcado con Hoechts 33342 (cian), EPS marcado con Oregon green (verde), autofluorescencia de las ficobilinas (rojo), fluorescencia de clorofilas (azul). El color rosa que marca a la cianobacteria *A. saxicola* resulta de la mezcla de la fluorescencia de las ficobilinas y la clorofila. A la derecha, célula aislada de *Jenufa* sp. con formación de autosporas. Identificación de colores: DNA marcado con Hoechts 33342 (cian), EPS marcado con Oregon green (verde), autofluorescencia de clorofilas (rojo) (escalas 10 µm).

Por otra parte, Hodac et al., (2012), mediante análisis filogenéticos de secuencias del 18S rDNA procedentes de secuencias de clones ambientales y de cepas de cultivo, revelaron que el linaje de *Jenufa* relacionado con *J. minuta*, estaba ampliamente distribuido en Alemania, Europa

y Ecuador y mostraba preferencia por el crecimiento subaéreo sobre rocas o sustratos duros artificiales (paredes de la cueva de Altamira (España) y muros en Alemania) entre otros, además de una notable adaptación a largos períodos de oscuridad. Hodac et al., (2012) también encontraron varias secuencias de *Jenufa* sobre sustratos duros, epilíticos o endolíticos, con un grupo genéticamente similar, también adaptado a zonas con baja intensidad luminosa.

La morfoespecie *Jenufa* sp., observada en la zona Ne.10 de la Cueva de Nerja, difiere de ambas especies desde un punto de vista molecular, con una similitud del 96% respecto a *J. perforata* y del 98% respecto a *J. minuta*. Por otro lado, comparte caracteres morfológicos con ambas especies descritas, aunque el tamaño y la ultraestructura, tanto de la pared como del cloroplasto es más similar a la morfología de *J. minuta* (Fig. 6.61). En base a los datos moleculares obtenidos y morfológicos observados, podemos asignar los especímenes procedentes de la Cueva de Nerja al género *Jenufa* Němcová, M. Elias, Skaloud & Neustupa. Probablemente, la morfoespecie identificada en la Cueva de Nerja (Ne.10) corresponde a una nueva especie del género *Jenufa*, pendiente de descripción.

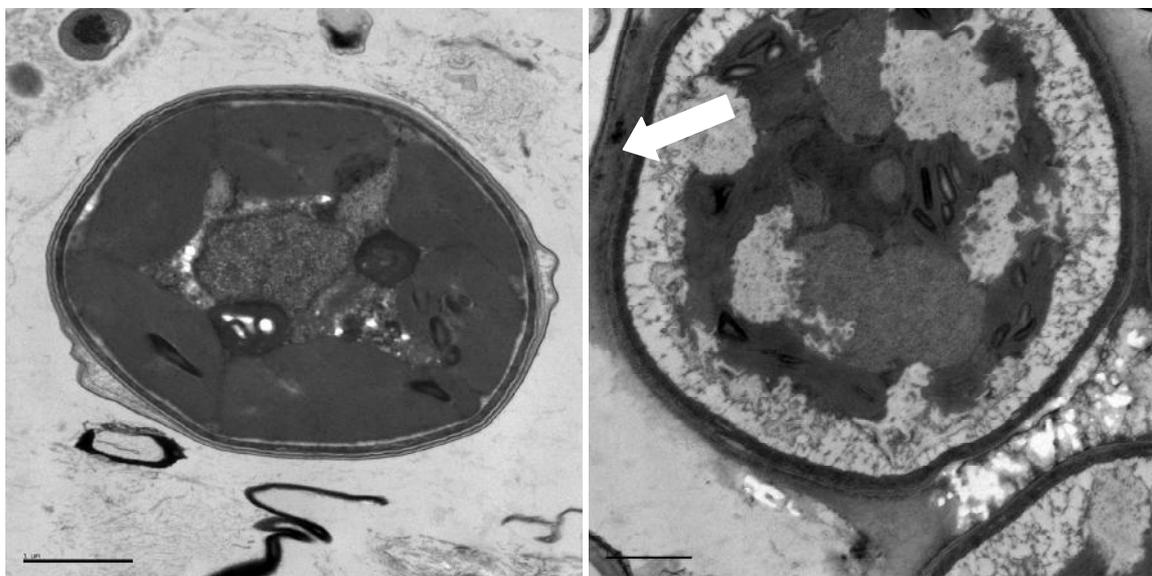


Figura 6.61. Microfotografía TEM de *Jenufa* sp. A la izquierda, autospora con cloroplasto parietal lobulado. A la derecha, célula adulta con cloroplasto con incisiones y perforaciones. La flecha señala restos de la membrana maternal (escalas 1 µm).

Esta morfoespecie fue identificada en las zonas Ne.10, Ne.11 y Ne.12.

Previamente a la descripción del género *Jenufa* y a la información procedente de los análisis moleculares de la Cueva de Nerja, las formas cocales, identificadas actualmente como pertenecientes al género *Jenufa* (Němcová et al., 2011) se habían asignado al género *Muriella* J. B. Petersen, 1932, cuyo holotipo es *Muriella terrestris* J. B. Petersen. Esta especie es morfológicamente igual a las especies del género *Jenufa* y está estrechamente relacionada con el género *Chlorella* Hanagata, 1998. La diagnosis del género *Muriella* es breve y en él se puede incluir un grupo amplio de células redondeadas de pequeño tamaño, sin pirenoide. Sin embargo, la morfoespecie de la Cueva de Nerja se diferencia del género *Muriella* por la carencia de pigmentos anaranjados en las células adultas. *Muriella* forma parte de un linaje distinto (Němcová, et al., 2011, Fučíková y Lewis, 2012), en un conjunto artificial de linajes, relacionados indirectamente, que han desarrollado aspectos morfológicos similares debido a convergencia evolutiva (Krienitz et al., 2003).

6.5.10. Clase Trebouxiophyceae, Orden Prasiolales, Familia Prasiolaceae (Guiry, 2015)

1. Desmococcus F. Brand 1925

Espece tipo: *Desmococcus olivaceus* (Persoon ex Acharius) J.R. Laundon 1985

Organismo polimórfico cuyas células pueden ser, en función del estadio del ciclo de vida, globulosas aisladas, dispuestas en paquetes cúbicos o formando filamentos uniseriados, ramificados, a veces reducidos a pocas células. Presentan un cloroplasto parietal con un pirenoide, en ocasiones difícilmente visible. Se reproducen por división vegetativa, siguiendo tres planos del espacio, y formación de aplanosporas baciliformes, producidas en gran cantidad en esporocistes grandes, esféricos con superficie verrucosa o puntuada. No se conoce la zoosporulación.

La sinonimia de los géneros *Pleurococcus* y *Protococcus* era tan complicada que Brand (1925) propuso el nuevo nombre de *Desmococcus* para *Pleurococcus naegelii* R. Chodat = *Protococcus viridis* Agardh = *Pleurococcus vulgaris* Nägeli. Esta diagnosis primitiva fue completada por Geitler (1942) y Vischer (1960). El género *Desmococcus* presenta desarrollo subaéreo y cosmopolita, con desarrollo sobre paredes y cortezas de árboles. La especie *D.*

olivaceus se considera el alga terrestre más común del planeta (Laundon 1985; Ettl y Gärtner 1995).

Desmococcus endolithicus P.A. Broady & M. Ingerfeld 1993

La morfoespecie identificada en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Desmococcus endolithicus*. El talo está compuesto de células esféricas a subsféricas de tamaño (2,6)-5,3-7,4-(10,0) (n=50) μm de diámetro. Estas células pueden presentar paredes gruesas o carecer de ellas y se encuentran aisladas o formando agregados (Fig. 6.62). Forma aplanosporas en esporocistes esféricos con paredes gruesas, sin verrugas, o filamentos procedentes de la germinación de células recubiertas de gruesas vainas. Las divisiones vegetativas dan lugar a tétradas o cadenas cortas (Fig. 6.64).

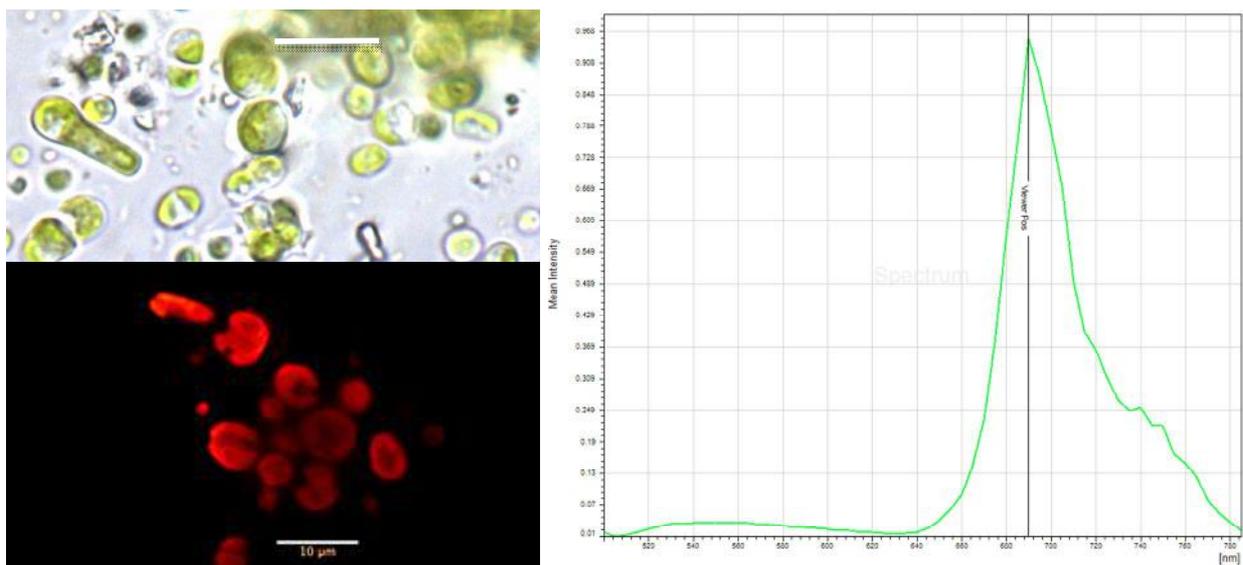


Figura 6.62. A la izquierda, microfotografía de microscopía convencional que muestra un estadio inicial de *Desmococcus endolithicus*, procedente de material de campo. Debajo, microfotografía CLSM de intensidad máxima de proyección que muestra la fluorescencia natural de los pigmentos. También se pueden observar los cloroplastos parietales lobulados con el pirenoide (escalas 10 μm). A la derecha, espectro de emisión, mediante longitud de onda de excitación a 480 nm, de una célula de *D. endolithicus* que permite identificar la máxima autofluorescencia emitida por las clorofilas a y b, alrededor de 680 -690 nm.

Presentan cloroplasto parietal en copa, en las células jóvenes, y dividido, en las células adultas, con pirenoide inconspicuo. El cloroplasto está localizado en uno de los lados de la célula, y ocupa, aproximadamente, la mitad del volumen celular. La matriz del pirenoide es poco visible. Los gránulos de almidón se encuentran repartidos por el cloroplasto. La mitocondria es

única y está asociada al núcleo y al cloroplasto. La pared celular es gruesa y se forma por capas, con la más exterior homogénea. La microscopía TEM permite observar envolturas gruesas, de hasta 450 nm. El pirenoide presenta pirenoglóbulos (Fig. 6.63). No se han observado células verrucosas (típicas de *D. olivaceus* (Persoon ex Acharius) J.R. Laundon). El espectro de emisión de los pigmentos, excitados con longitud de onda de 480 nm, permitió identificar las clorofilas a y b, con emisión alrededor de 680 nm (Fig. 6.62).

La identificación de la especie de la Cueva de Nerja como *D. endolithicus* P.A. Broady & M. Ingerfeld estuvo basada en el conjunto de características morfológicas así como en el desarrollo casmoendolítico de los organismos.

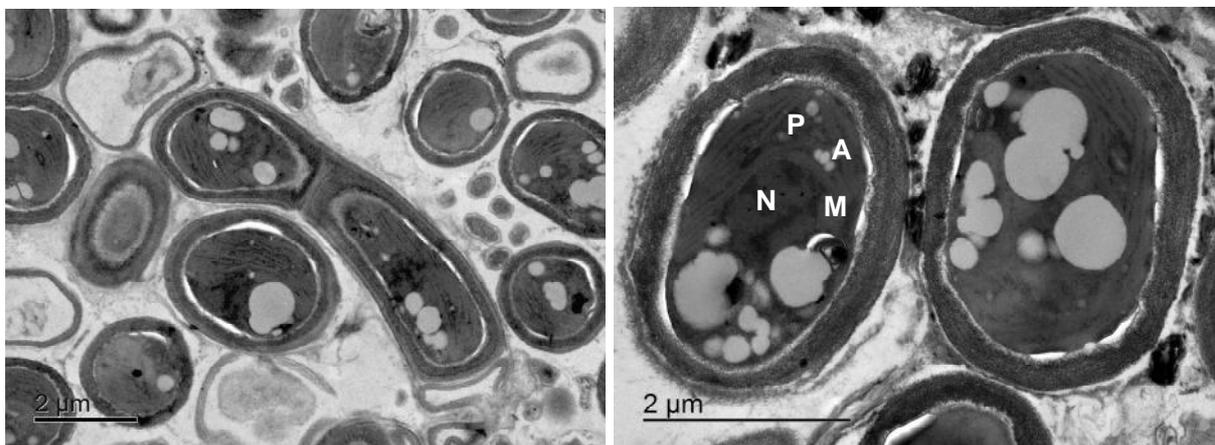


Figura 6.63. Microfotografías TEM. Secciones y filamentos de *D. endolithicus* en muestras de material de campo de la zona Ne.11c. Las células presentan gruesas paredes celulares con una capa exterior fibrosa. En ambas imágenes también se observan bacterias acompañantes. N: núcleo, A: gránulos de almidón, P: pirenoide, M: mitocondria.

La secuencia de ADN de clones aislados de la zona Ne.13 presentó un 98 % de similitud con *Desmococcus endolithicus* (EU434026, Mikhailyuk et al., 2008), lo que indica su cercanía con esta especie. Este resultado confirma la identificación propuesta en base a la morfología y el hábitat de los organismos. El género *Desmococcus* está incluido en el grupo de las algas verdes Trebouxiophyceae (Chlorophyceae). Las cepas del género *Desmococcus* que han sido identificadas molecularmente comparten un origen único y son sister-group de *Stichococcus bacillaris* (Mikhailyuk et al. 2008).

Este morfotipo se identificó en las zonas Ne.10, Ne.11, Ne.12 y Ne.13.

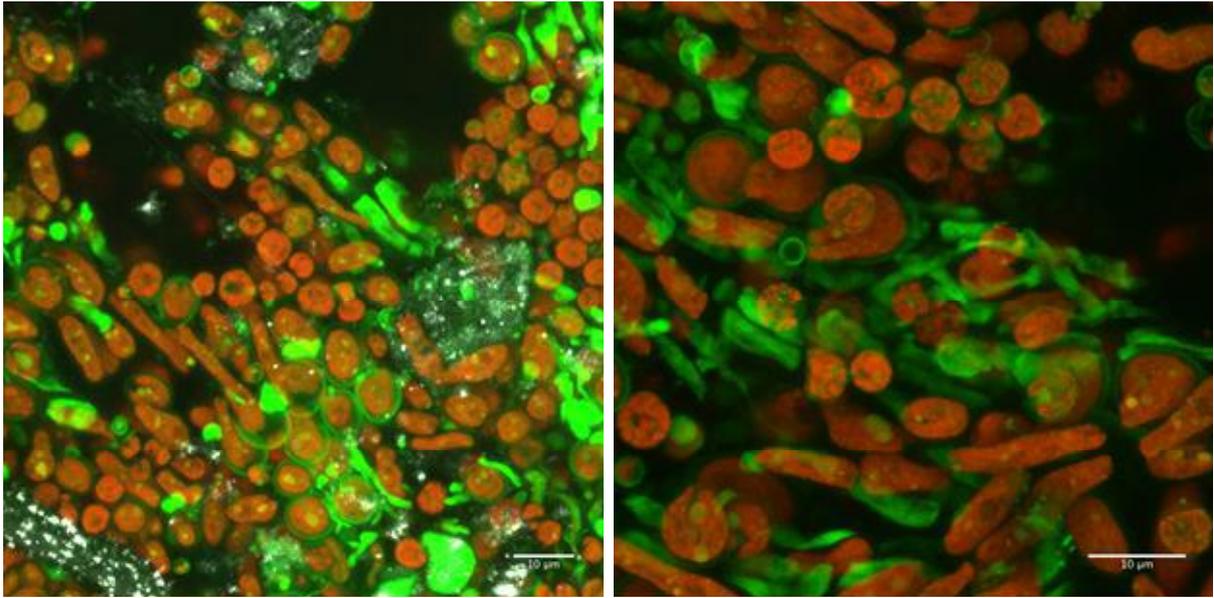


Figura 6.64. Microfotografías CLSM de máxima intensidad de proyección para la fluorescencia natural de los pigmentos (rojo) y de las vainas mucilaginosas (verde). Muestras procedentes de material con células de *Desmococcus endolithicus*, con cubiertas gruesas, que germinan dando lugar a filamentos.

2. *Stichococcus* Nägeli, 1849

Especie tipo: *Stichococcus bacillaris* Nägeli

Esta alga verde presenta células cilíndricas, rectas o sigmoideas, con extremos redondeados y plasto parietal estrecho, sin pirenoide o con un pirenoide desnudo. Las células no presentan vaina mucilaginosa y pueden ser solitarias o formar pequeñas cadenas de 3 o 4 individuos, después de la división. Sólo se conoce la reproducción mediante la división vegetativa. Este género integra especies subaéreos o formadoras de gonidios de líquenes.

Stichococcus bacillaris Nägeli

La morfoespecie identificada en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Stichococcus bacillaris* Nägeli. Se desarrolla en colonias de tonalidad verde a amarillo-verdoso compuestas de células aisladas o en cortas cadenas, de 2 o 4 células, que se disgregan con facilidad (Fig. 6.65). Las células son cilíndricas, con ápices redondeados de 3,7 x 2,4-(4,2 x 2,8)-5,0 x 3,4 µm.



Figura 6.65. *Stichococcus bacillaris*. Microscopía óptica de muestra de campo de la zona Ne.13 (escala 10 μm).

El cloroplasto se encuentra en banda y cubre un poco más de la mitad de la anchura de las células y toda su longitud. Presenta un pirenóide no visible al microscopio óptico pero sí a microscopía electrónica de transmisión, de forma lenticular y atravesado por tilacoides (Fig. 6.66). Los pirenóides en el género *Stichococcus* fueron estudiados por Silverberg (1975). No se observan gránulos de almidón.

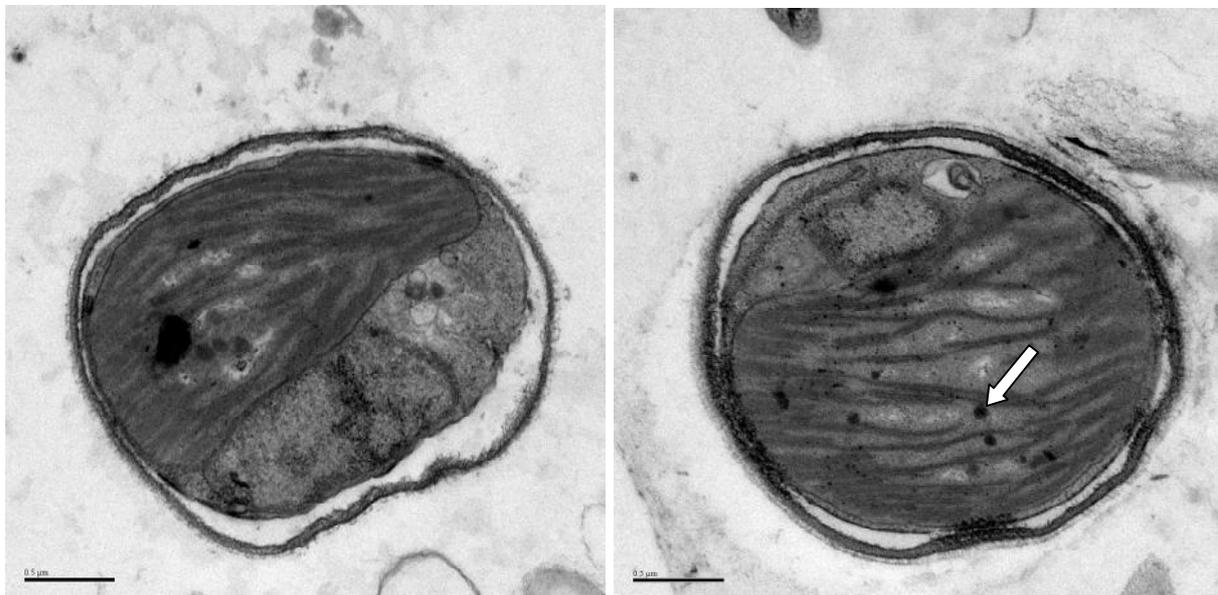


Figura 6.66. Microfotografías TEM. Morfología típica de *Stichococcus bacillaris* que muestra el plasto y el núcleo. A la derecha, sección transversal con detalle del pirenóide atravesado por tilacoides y presencia de pirenoglóbulos (flecha) (escalas 0,1 μm).

Esta morfoespecie fue identificada en muestras de las zonas Ne.11, Ne.13 y en la muestra puntual 3c-2. Un clon de Ne.13 presenta un 98% de similitud con un *Stichococcus minutus* identificado en muestras de la Antártida (Chen et al., 2012).

Esta especie se considera cosmopolita y aerofítica (Ettl y Gärtner, 1995), ha sido identificada en cuevas, suelos, rocas y cortezas de árboles (Guiry, 2015) y se considera resistente a la desecación (Petersen, 1935).

6.5.11. Clase Bacillariophyceae, Orden Naviculales, Familia Diadesmidaceae (Guiry, 2015)

1. Humidophila (H.Lange-Bertalot & Werum) R.L. Lowe, P. Kociolek, J.R. Johansen, B. Van de Vijver, H. Lange-Bertalot & K. Kopalová, 2014

Especie tipo: *Humidophila undulata* Lowe, Kociolek & Johansen

Células con valvas lineales, lineal elípticas o elípticas con ápices redondeados. Cara valvar plana. Estrías alargadas transapicalmente, areola ovoide o elíptica. El rafe, si está presente, es filiforme con extremos proximales simples o en forma de ancla. Los extremos distales terminan en una pequeña helictoglosa y las aberturas aerolares se encuentran cubiertas por un himen poroso. El nódulo central es pequeño y redondeado.

Todas las especies del género son relativamente pequeñas, birrafídeas, a veces filamentosas y comúnmente subaéreos de zonas húmedas. Las células vivas contienen un único cloroplasto, débilmente lobulado.

El género *Humidophila* ha sido recientemente descrito (Lowe et al., 2014) e incorpora especies de otros géneros, principalmente de *Paradiadesmis*, subgénero de *Diadesmis* cuyos componentes diferían de la descripción de *D. confervacea*, especie tipo del género *Diadesmis*. El género es polifilético. La especie *Navicula contenta* Grunow ex Van Heurck, ya había sido transferida al género *Diadesmis* cuando fue reestablecido por Round et al. (1990).

Humidophila contenta (Grunow) Lowe, Kociolek, Johansen, Van de Vijver, Lange-Bertalot & Kopalová

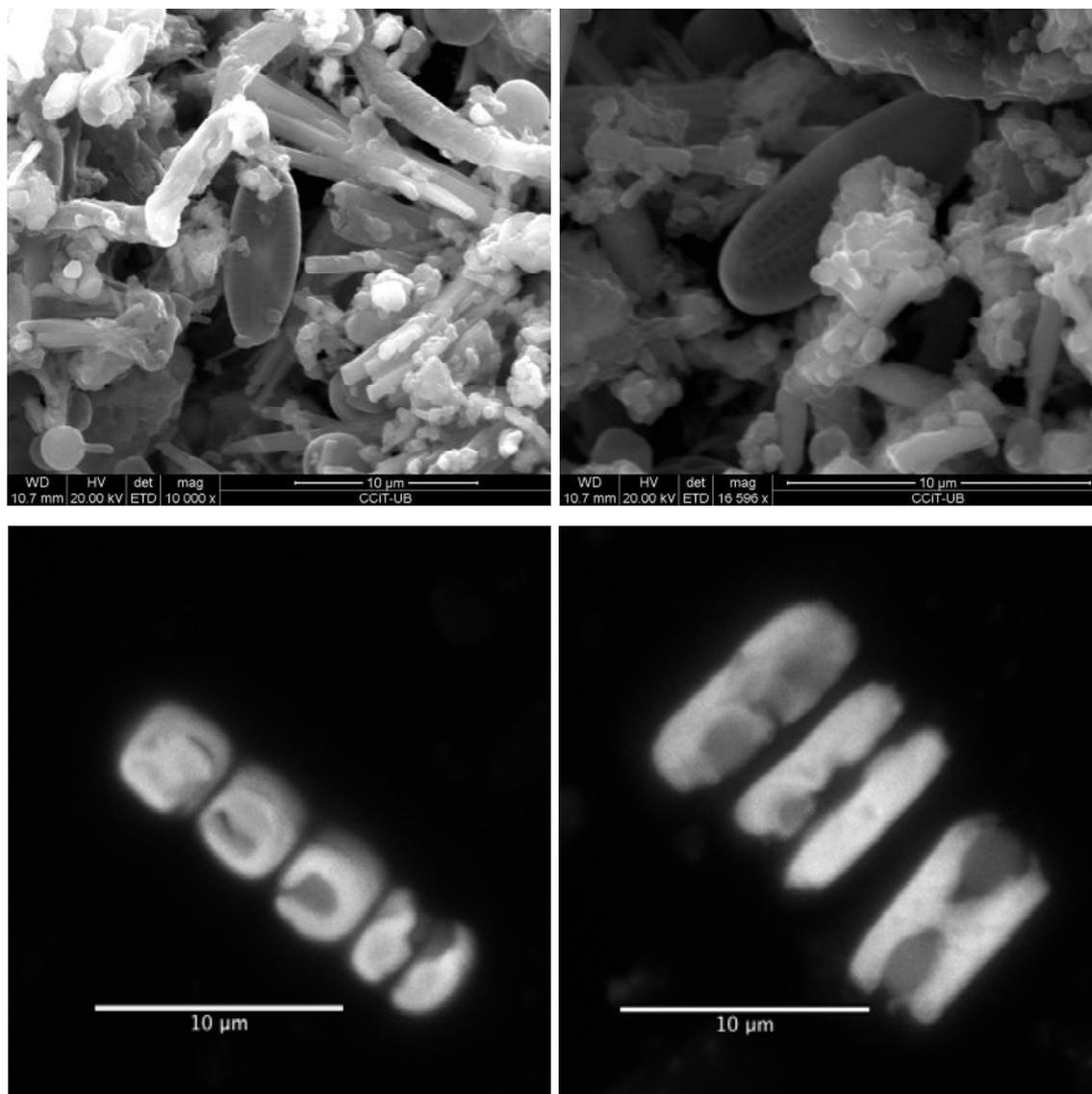


Figura 6.67. Microfotografías de *Humidophila contenta*. Arriba SEM de muestra de campo de la zona Ne.10, donde se observa el exterior de las valvas. Debajo, CLSM de muestra puntual de Ne.14_suelo, que permite observar la visión transversal (izda.) y valvar-pleural (dcha.) de los plastos, revelados mediante fluorescencia de los pigmentos (escalas 10 µm).

La morfoespecie identificada en la Cueva de Nerja coincide morfológicamente con *Humidophila contenta* (Grunow). Presenta células solitarias o formando filamentos, con valvas lineal-elípticas, levemente ensanchadas o constrictas en el centro, de tamaño (10,0-11,0) x (2,5 - 8,0) µm. Los especímenes observados mediante SEM mostraron 34-40 estrías en 10 µm. Las valvas sólo se observaron mediante SEM en una muestra de la zona Ne.10 (Fig. 6.67). En una

muestra puntual, Ne.14_suelo, con sustrato de sedimento e inundación irregular, se encontró esta especie en forma filamentosa (Fig. 6.67) Esta especie, bajo el nombre de *Diadsmis contenta*, ha sido repetidamente citada en ambientes con escasa iluminación (Ettl y Gärtner, 1995; Roldán y Hernández-Mariné, 2009).

6.5.12. Clase Cyanidiophyceae, Orden Cyanidiales, Familia Cyanidiaceae (Guiry, 2015)

1. Cyanidium Geitler, 1933

Especie tipo: *Cyanidium caldarium* (J. Tilden) L. Geitler, 1933

Presenta células esféricas de 1,5-6 μm de diámetro que se encuentran aisladas o raramente unidas en una matriz mucilaginosa común. Se reproduce mediante 4 endosporas de 2-3 μm de diámetro. No se conoce reproducción sexual. Contiene un cloroplasto parietal plano azul-verdoso y sin pirenoide. El cloroplasto contiene tilacoides aislados, paralelos y concéntricos, con ficobilisomas, al igual que otras especies de algas que contienen ficocianina. La mitocondria es única y está situada entre el núcleo y el cloroplasto. Las células adultas presentan grandes vacuolas.

El género *Cyanidium* se considera cosmopolita e incluye dos grupos morfológicamente similares. El primero fue descrito en hábitats extremófilos geotermales y ácidos, con un rango de temperatura entre 13 y 57 °C y desarrollo óptimo en 45 °C. Puede desarrollarse a pH comprendido entre 0,05 - 5,0, con óptimo entre 2 - 3. El segundo grupo se describió en hábitats no termófilos ni ácidos, como rocas de acantilados y cuevas, donde habitan morfoespecies mesófilas, con una temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 35 °C. En ambos casos se realizaron análisis moleculares que corroboraron los datos (Albertano et al., 2000; Ciniglia et al., 2004).

Cyanidium sp.

De células azuladas, esféricas o levemente apiramidadas, con un cloroplasto ovoidal y sin pirenoide. Se observa reproducción es asexual, cada célula forma cuatro autosporas que se

disponen en forma de tetraedro dentro de la membrana maternal (Figs. 6.68 y 6.69). El diámetro de las células y de las autosporas es de 2-(3,5)- 5,5 μm y 1,7- 2-3 μm , respectivamente. La liberación de las autosporas se produce por rotura de la membrana maternal, de alrededor de 25 nm de ancho, que pasará a formar parte del biofilm (Fig. 6.70). El espectro de emisión de los pigmentos de *Cyanidium* sp. indica la presencia de clorofila a, con un máximo de emisión a 680 nm y ficobilinas (ficocianina y aloficocianina) con máximos superpuestos entre 640 y 660 nm (Fig. 6.68).

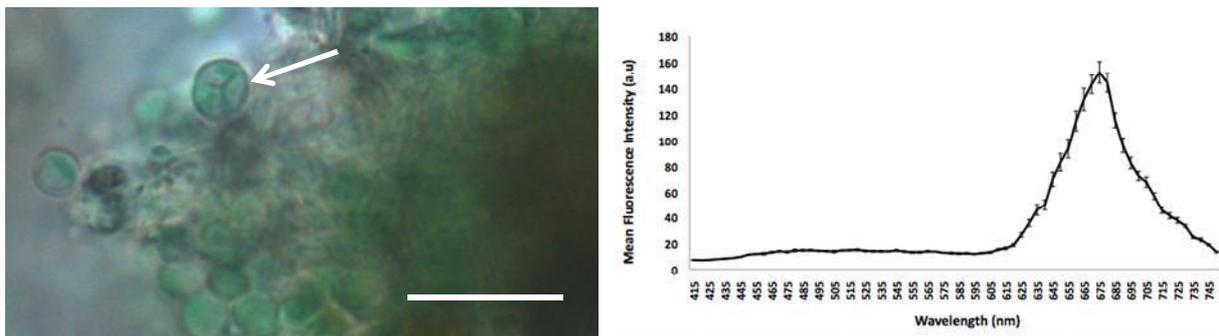


Figura 6.68. A la izquierda, microfotografía de material de campo con biofilm de *Cyanidium* sp. sobre el sustrato. Las células muestran células aisladas y esporocistas (flecha) (escala 10 μm). A la derecha espectro de emisión de *Cyanidium* sp. con un amplio pico máximo que corresponde a la ficocianina y aloficocianina (entre 640 y 660 nm) y la clorofila a, que se encuentra en menor proporción (680 nm), no separable de la fluorescencia del conjunto.

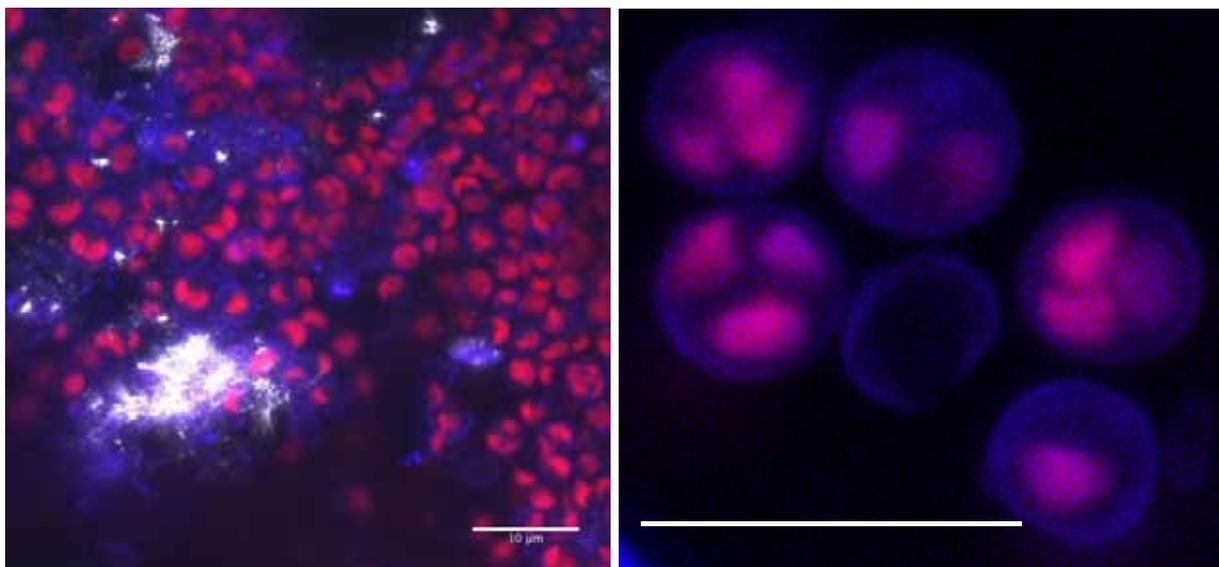


Figura 6.69. Imágenes CLSM con proyección de intensidad máxima en dirección z. A la izquierda, conjunto del biofilm incluido en el sustrato. A la derecha, detalle *Cyanidium* sp. Identificación de colores: autofluorescencia de los pigmentos fotosintéticos (magenta), vaina envolvente (azul) y reflexión de sustrato (blanco) (escalas 10 μm).

El análisis de las secuencias del ARNr 16S dio resultados prácticamente idénticos para todos los clones de los distintos puntos analizados. Con estos datos se pudieron relacionar las cepas de la Cueva de Nerja con un *Cyanidium* sp., descrito de Monte Rotaro (Italia) (Ciniglia et al., 2004) y otro de Atacama (Chile) (Azua-Bustos et al., 2009), con similitudes comprendidas entre 94,6 y 95,2 %, respectivamente. Con la cepa descrita de la cueva Sybil (Italia) (Ciniglia et al., 2004) la similitud fue menor, del 92 %. La similitud con *Cyanidium caldarium* extremófilo fue, tan sólo del 48,8 %.

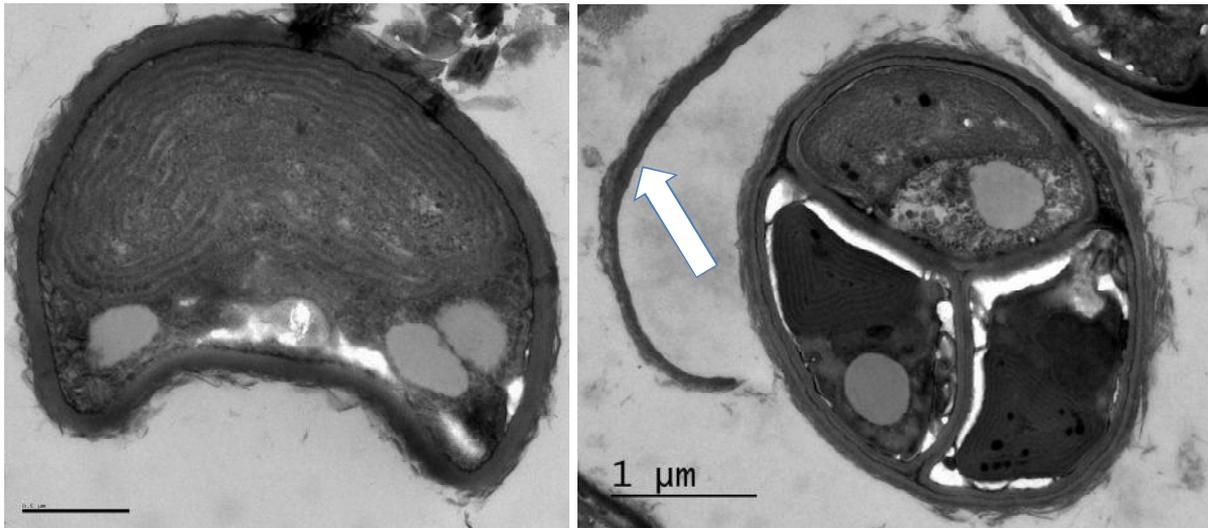


Figura 6.70. Microfotografías TEM de *Cyanidium* sp. A la izquierda, célula aislada que muestra la gruesa pared celular y los tilacoides aislados y paralelos (escala 0,5 μm). A la derecha, autoesporociste con las autoesporas formando un tetraedro. Se observan restos de la pared maternal anterior que aun perduran en el medio (flecha) (escala 1 μm).

Los sustratos de la Cueva de Nerja colonizados mayoritariamente por *Cyanidium* sp. mostraban una fina pátina color verde azulado intenso, de aspecto pulverulento y fácil disgregación que los recubría irregularmente y penetraba a una profundidad no superior a 3 mm. Se identificó como único organismo fotosintético, en la zona Ne. 7 o junto a *Chroococciopsis* sp. En estos casos, *Cyanidium* sp. se encontró debajo de *Chroococciopsis*.

Este morfotipo se identificó en las zonas: Ne.1, Ne.2, Ne.3, Ne.7, Ne.9, Ne.11 y Ne.12.

6.6. Discusión

En este capítulo se han analizado biofilms que dan lugar al conocido *mal verde* de la Cueva de Nerja, formado por pátinas de color verde que se desarrollan sobre paredes y espeleotemas en el entorno de las lámparas de luz eléctrica (del Rosal et al., 2010, 2014). La información ofrecida por las técnicas de microscopía óptica convencional, láser confocal y electrónicas de barrido y de transmisión han permitido identificar los organismos que integran estos biofilms, en especial, las morfoespecies de algas y los morfotipos de cianobacterias, determinar su estado fisiológico así como su desarrollo en el sustrato. El empleo de electrones retrodispersados y la difracción de rayos x han ofrecido información sobre la naturaleza y composición química de los biofilms y de los sustratos. El espectro de emisión de los pigmentos fotosintéticos ha permitido identificar los pigmentos que posee cada grupo de organismos. Finalmente, el análisis molecular ha completado y, en su caso, corroborado la información taxonómica obtenida mediante las técnicas de identificación morfológica basadas en la microscopía.

Los resultados han puesto de manifiesto que los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja contienen, además de organismos fotosintéticos, microorganismos heterótrofos como bacterias y hongos que, en conjunto, forman una estructura compleja que se desarrolla sobre la superficie de los espeleotemas. Estos biofilms muestran un crecimiento epilítico, sobre la superficie del sustrato, así como casmoendolítico en las grietas y oquedades (Golubic et al., 1981; Büdel et al., 2009; Ramírez et al., 2010) que alcanza una profundidad de desarrollo no superior a 3 mm. La escasa intensidad lumínica disponible, probablemente, es el motivo por el cual no se identificaron organismos endolíticos, capaces de penetrar activamente en el interior del sustrato y desarrollarse. En general, el aspecto de las superficies colonizadas mostró un estado alterado del sustrato, con mezcla de microorganismos y fragmentos de sustrato con diferentes grados de deterioro.

El desarrollo de estos biofilms fotosintéticos produce la alteración física y química del sustrato debido, entre otros factores, a cambios de coloración, tensiones e incluso disolución del sustrato como resultado de la actividad metabólica de los organismos, tal y como mostraron algunas imágenes SEM. Por otro lado, los organismos superficiales pueden actuar como núcleos

de condensación de agua y favorecer la precipitación de cristales, contribuyendo a la travertinizacón del sustrato. La precipitaci3n de carbonato cálcico inducido por microorganismos ha sido descrita en algas que habitan en rocas calcáreas (Pouličková y Hařler, 2007). Estas especies, documentadas en cuevas con baja intensidad luminosa, forman parte de biofilms delgados y con poco mucilago envolvente y se corresponden con taxones que muestran filamentos, pues sobreviven mejor en estas condiciones (Lamprinou et al., 2012). La capacidad de precipitar cristales en su superficie tambi3n ha sido documentada en cianobacterias del género *Scytonema*, *Geitleria* o *Chroococidiopsis* (Albertano 2012; Whitton, 2012). En la Cueva de Nerja tan sólo en una muestra de la zona Ne.8 se observaron pequeños dep3sitos de cristales sobre la vaina de algunos microorganismos que podrían corresponder a precipitados cristalinos. El carácter ocasional de este evento tan sólo permite su planteamiento como una hipótesis y, en ningún caso, como una afirmaci3n. Por otro lado, la presencia de organismos fotosintéticos observada entre los cristales del sustrato favorece la p3rdida de consistencia del mismo e incrementa su porosidad y, con ello, las zonas más propicias para la condensaci3n de agua superficial. El desarrollo casmoendolítico observado en las zonas más secas se debe, probablemente, a la condensaci3n de agua en estas zonas más profundas de la superficie y a la necesidad de agua líquida de los organismos fotosintéticos identificados para llevar a cabo la reproducci3n.

Casi todos los organismos identificados, especialmente las cianobacterias, presentan una vaina gelatinosa extracelular, de diferente grosor, formada por polisacáridos (EPS). Entre los principales componentes de estas vainas se encuentran proteínas protectoras de la desecaci3n, glicanos y pigmentos para la absorpci3n de rayos UVA/B (Pattanaik et al., 2007). Estas vainas desarrollan un papel fundamental durante el proceso de adhesi3n de los organismos al sustrato así como en los periodos de sequía, dado que actúan como reservorio de agua (Macedo et al., 2009; Keshari y Adhikary, 2013). Los procesos de adherencia junto con los cambios de volumen, debidos al almacenamiento y p3rdida de agua, pueden producir daños en el sustrato y favorecer los procesos de disgregaci3n de las capas más superficiales. En la Cueva de Nerja, la cianobacteria más abundante y ubicua es *Chroococidiopsis* sp., habitual de ambientes extremos. En la Cueva de Nerja, esta cianobacteria presenta un desarrollo epilítico y casmoendolítico y cuenta con una importante vaina mucilaginosa, que la envuelve y protege frente a factores

ambientales desfavorables. El resto de cianobacterias identificadas en la cavidad también presentan vainas envolventes.

La difracción de rayos x indica la presencia mayoritaria de sustratos de composición homogénea formados, principalmente, por minerales de carbonato cálcico (calcita y aragonito), dolomita y arcilla. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Reyes et al. (1993) y Caballero et al. (1995) sobre la composición mineralógica de los espeleotemas de la Cueva de Nerja. Así, Reyes et al. (1993) determinaron que la mayoría de los espeleotemas se formaban, principalmente, por aragonito seguido de calcita, en proporción semejante y otros minerales como la dolomita y la magnesita, en proporciones variables y el cuarzo (en forma de indicios). Esta composición mineralógica difiere ampliamente de la de la roca encajante, compuesta casi exclusivamente por dolomita. En el caso de algunas muestras de moonmilk, se determinó una composición exclusiva por hidromagnesita, huntita e hidroxiapatito. Por otro lado, Caballero et al. (1995) determinaron que el mineral principal en los espeleotemas analizados fue la calcita, seguido de la dolomita y del aragonito, además de minerales secundarios como yeso, ankerita, mica e hidromagnesita, abundantes en las costras de alteración.

El espectro de difracción de rayos x también permite observar una mayor colonización de los sustratos más porosos y con mayor cantidad de arcilla. Este hecho puede tener relación con una mayor protección y aporte de humedad por parte de estos sustratos hacia los biofilms, así como un mayor aporte de nutrientes, asociados a la arcilla. La textura del sustrato ha sido propuesto como una de las principales propiedades que determinan su biorreceptividad (Guillite, 1995), es decir, su potencialidad de ser colonizado por microorganismos. Así, los sustratos con capacidad de retener agua incrementan el periodo favorable de crecimiento de los microorganismos (Sáiz-Jiménez y Ariño, 1995; Roldán y Hernández-Mariné, 2009).

La arcilla también se relaciona con algunos picos de fósforo en el espectro de difracción de rayos x de las muestras, que muestran una cantidad superior a la justificable por la presencia de organismos. El origen de este fósforo puede ser la murcielaguina, muy abundante en tiempos pasados en toda la cavidad y que aún puede observarse sobre algunos espeleotemas, como el de la zona Ne.3. En este sentido, tanto la arcilla como la murcielaguina aportan humedad y nutrientes que favorecen el desarrollo de los organismos fotosintéticos.

El sustrato de la zona Ne.1 presenta una capa negra, identificada como carbón tipo *black carbon* mediante espectroscopía Raman (Anexo 3). Este carbón podría datar de la Prehistoria, dada la ocupación humana de la cavidad durante esta época, o ser actual y debida a las numerosas prospecciones espeleológicas que se llevaron a cabo tras su descubrimiento, en 1959. En cualquier caso, esta composición no afecta a la composición, estructura y desarrollo del biofilm fotosintético, formado por la cianobacteria *Chroococcidiopsis* sp. y el alga roja *Cyanidium* sp., los organismos fotosintéticos más comunes de la cueva.

El espectro de la composición química de la zona Ne.10 indica la presencia de yeso, considerado mineral de alteración (Caballero et al., 1995). El biofilm desarrollado en esta zona presenta una diversidad notablemente superior al resto de biofilms analizados.

En relación con la estructura y diversidad, en todas las zonas de estudio se observa un crecimiento de los organismos en estructuras complejas o biofilms, formados por más de un grupo de organismos fotosintéticos, acompañados en su mayoría de otras bacterias (actinobacterias) y, con menor frecuencia por hongos. La presencia de organismos no fotosintéticos también fue más abundante en aquellos sustratos que mostraron mayor cantidad de arcilla y fósforo. En comparación con otras cuevas iluminadas artificialmente y con mayor humedad ambiental a lo largo del año, los biofilms de la Cueva de Nerja presentan menor diversidad de organismos (Vinogradova et al., 1998; Asencio y Aboal, 2000; Smith y Olson, 2007; Mulec et al., 2008; Roldán y Hernández Mariné, 2009; Urzi et al., 2010; Zammit et al., 2011; Albertano, 2012).

En relación con la supervivencia de los biofilms, las especies dominantes suelen presentar distintas estrategias que les permiten resistir durante condiciones ambientales adversas (Ramírez et al., 2011). Por ejemplo, en épocas de lluvia, las poblaciones de *T. aurea* forman zoosporas móviles que favorecen su dispersión a nuevos espacios y la formación de nuevos biofilms (Ramírez et al., 2011). Las formas procedentes de reproducción sexual sobreviven durante la época seca protegidas por los restos de los biofilms desarrollados durante la época lluviosa. En el caso de *N.cf. commune*, los organismos incrementan el tamaño de algunas células y reducen su número, mediante el sacrificio de un gran número de ellas, para aumentar las posibilidades de supervivencia. En otros casos, las estrategias se basan en la formación de gruesas vainas y la

producción de ficoeritrina, que aporta protección frente al exceso de iluminación (Ramírez et al., 2011). La producción de gruesas vainas como estrategia de defensa también ha sido descrita en las Chroococcales (Grilli-Caiola et al., 1996). En la Cueva de Nerja, la microscopía CLSM y TEM permitió observar la coexistencia de diferentes estadios fisiológicos de los organismos que, con frecuencia, presentaban gruesas vainas envolventes, especialmente durante las épocas de menor humedad ambiental. En estos casos de coexistencia de los organismos, los que se presentaban buenas condiciones fisiológicas, reveladas por fluorescencia, se encontraban en un número notablemente inferior al resto, que se encontraba en malas condiciones o muertos. La microscopía también reveló la presencia de numerosas bacterias que formaban parte del biofilm y se ubicaban, fundamentalmente, alrededor de los organismos muertos. Esta ubicación de las bacterias puede deberse a la presencia de un medio anaeróbico y de una fuente nutricional.

En general, se observan dos tipos de biofilms. Uno de ellos se desarrolla en espeleotemas secos y se caracteriza por presentar una textura pulverulenta y escaso grosor. Este biofilm presenta un bajo número de especies y se identificó en las zonas Ne.1, Ne.2, Ne. 3, Ne.7 o Ne.8. Esta escasa diversidad de organismos es una característica habitual en biofilms que se desarrollan en condiciones extremas, que pueden llegar a estar formados por una única especie (Potts, 2001). En la Cueva de Nerja, estos biofilms se encuentran formados por la cianobacteria *Chroococciopsis* sp. y el alga roja *Cyanidium* sp. Ambos grupos son los más frecuentemente identificados en las muestras de la Cueva de Nerja, probablemente gracias a su capacidad de desarrollo casmoendolítico así como su resistencia a los periodos de sequía o la baja intensidad lumínica, pues ambos factores parecen ser limitantes para el desarrollo los organismos fotosintéticos en la cavidad (ver capítulo 5). Así, las formas cocoides presentan mejor adaptación a condiciones de baja intensidad luminosa, en comparación con otras formas de cianobacterias, porque toleran mejor la irradiancia baja y forman la mayor parte de los biofilms (Mulec, 2008). Especies del género *Oscillatoria* también suelen ser muy abundantes en zonas con baja intensidad luminosa (Roldán y Hernández-Mariné, 2009; Lamprinou, 2012), sin embargo, miembros de este grupo no han sido encontrados en la Cueva de Nerja, posiblemente debido a la presencia de otros factores ambientales que inhiben su desarrollo como, por ejemplo, las condiciones hídricas del sustrato (Popović et al., 2015).

El otro tipo de biofilm se desarrolla sobre espeleotemas con agua líquida y presenta una textura mucilaginosa que, ocasionalmente, forma agregados de 1,2 cm de diámetro. Este biofilm fue observado en las zonas Ne.10, Ne.11 y Ne.12 y presenta una diversidad de organismos notablemente superior al primer tipo descrito, con varias especies de algas verdes tales como *Desmococcus endolithicus* o *Jenufa* sp. y cianobacterias que no se han identificado en otras zonas como, por ejemplo, *Aphanothece saxicola*, *Pseudophormidium* sp. o *Gloeocapsa atrata*, entre otras.

Según la bibliografía disponible, las morfoespecies y morfotipos identificados durante nuestro estudio en la Cueva de Nerja indican un cambio cualitativo respecto de los grupos identificados en estudios previos. Así, Ruiz et al. (1992) identificaron a la cianobacteria *Gloeocapsa* sp. como el morfotipo más abundante en las paredes de la cueva, mientras que, en las estalactitas, predominaban mayoritariamente las morfoespecies *Oedogonium* sp, *Cladophora* sp. o incluso *Microspora* sp. En cambio, nuestro trabajo presenta a la cianobacteria *Chroococidiopsis* sp. y el alga roja *Cyanidium* sp. como los organismos fotosintéticos más abundantes en la cavidad. La progresiva reducción de la intensidad de iluminación de la cueva a lo largo del tiempo podría haber contribuido a la disminución de las clorofitas, que no suelen habitar zonas con baja iluminación (Popović et al., 2015). Por otro lado, la escasez de agua líquida disponible en la mayoría de los espeleotemas, induce la presencia de organismos formadores de vainas envolventes, como las cianobacterias, que pueden así sobrevivir con menor cantidad de agua.

Estos resultados obtenidos en la Cueva de Nerja difieren parcialmente de los obtenidos en estudios similares realizados en otras cuevas que afirman que en los biofilms fotosintéticos de cuevas que disponen de luz natural las cianobacterias representan el grupo dominante (Hauer et al., 2015) mientras que los en biofilms fotosintéticos se desarrollan debido a la presencia de luz artificial, las cianobacterias desempeñan un papel secundario, en relación con otros grupos como los eucariotas (principalmente algas verde y diatomeas) que, generalmente, representan el grupo dominante (Smith and Olson, 2007). En cuevas muy profundas, que carecen de luz natural y artificial, también han sido identificadas cianobacterias con desarrollo, probablemente, heterotrófico (Hauer et al., 2015). En la Cueva Charles Brewer (Venezuela), las rodófitas y diatomeas forman los grupos mayoritarios de organismos fotosintéticos (Hauer et al., 2015). En

catacumbas iluminadas con luz natural y artificial, las cianobacterias representan el grupo de organismos fotosintéticos dominantes, mientras que las algas verdes dominan en las superficies iluminadas por luz natural (Gómez-Bolea et al., 2014).

En la Cueva de Nerja el empleo complementario de técnicas de taxonomía clásica, basada en caracteres morfológicos y de biología molecular ha permitido identificar especies ya descritas, especies crípticas y proponer la presencia de especies nuevas. Además, el análisis molecular ha puesto de manifiesto la presencia de una notable diversidad de organismos que no pudieron ser identificados mediante el empleo de las bases de datos disponibles en la actualidad. Este resultado plantea la hipótesis de la presencia de nuevas especies de cianobacterias y algas aun no descritas. Por otro lado, los datos taxonómicos y moleculares han permitido identificar especies como *Desmococcus endolithicus* que, además, es un colonizador primario de la zona de experimentación Ne.13. No obstante, su presencia no pudo ser confirmada molecularmente en las zonas Ne.10 y Ne.11. En el caso de otras especies, a pesar de que la identificación genética aporta un notable porcentaje de similitud, del orden de 97-98 %, la identificación morfológica señala diferencias entre las especies propuestas y los ejemplares de la Cueva de Nerja. Estos casos se corresponden con las especies *Stichococcus minutus*, con porcentaje de similitud genética del 98 % y *Jenufa minuta*, con porcentaje de similitud de 97-99 %. En relación con *Stichococcus*, los ejemplares de la Cueva de Nerja muestran semejanza morfológica con *S. bacillaris* y en el caso de *Jenufa*, los ejemplares observados en la cavidad muestran caracteres asociables tanto a *J. minuta* como *J. perforata* por lo que, probablemente, se trate de especies nuevas para la ciencia.

Por otro lado, los resultados también pusieron de manifiesto la presencia de especies crípticas, es decir, morfológicamente iguales a un género descrito pero con notables diferencias moleculares. Este fue el caso de *Chroococidiopsis* sp. cuyo análisis molecular, realizado a secuencias obtenidas de material de campo de Ne.1, Ne.2 y Ne.10 y de cultivo, mostró un 90% de similitud con de una cepa halotolerante del género *Halotheca* (García-Pichel et al., 1998) Resulta llamativo que, en ningún caso, se identifican clones con un elevado porcentaje de similitud con el género *Chroococidiopsis*, tal y como se observó en los estudios realizados en otras cuevas próximas a la Cueva de Nerja (Jurado et al., 2014), sino porcentajes bajos, alrededor del 90%. La similitud genética de un *Chroococidiopsis*-like de saladares del desierto de

Atacama también ha sido citada en otro estudio filogenético (de los Rios et al., 2010). En base a estos datos se plantea la hipótesis de que el morfotipo identificado como *Chroococcidiopsis* sp. puede corresponder a un nuevo filotipo, alejado de las cepas del género *Chroococcidiopsis* depositadas en las bases de datos disponibles en la actualidad.

La identificación de la rodófito *Cyanidium* sp. mediante análisis de las secuencias del ARNr 16S dio resultados prácticamente idénticos para todos los clones de las distintas muestras analizadas, correspondientes a diferentes zonas. Con estos datos se pueden relacionar las cepas de la Cueva de Nerja con el *Cyanidium* sp., descrito de Monte Rotaro (Italia) (Ciniglia et al., 2004) y otro de Atacama (Chile) (Azua-Bustos et al., 2009), con similitudes comprendidas entre 94,6 y 95,2 %, respectivamente. Con la cepa de la cueva Sybil (Italia) (Ciniglia et al., 2004) la similitud es menor, del 92 %. La similitud con *Cyanidium caldarium* extremófilo es de, tan sólo, el 48,8 %.

Finalmente, en la Cueva de Nerja no se ha observado un patrón general de diversidad de algas y cianobacterias de los biofilms estudiados en relación con intensidad de luz que reciben (PAR), de acuerdo con Lamprinou et al. (2012) y Popović et al. (2015). No obstante, la luz es uno de los factores limitantes más importantes en el desarrollo de los biofilms fotosintéticos, aunque no el único (Gómez-Bolea et al., 2014) y está directamente relacionado con su desarrollo y con el estado fisiológico de los organismos que los integran (Roldán et al., 2006). Los resultados ofrecidos por la microscopía CLSM han permitido identificar los pigmentos de cada uno de los grupos de organismos fotosintéticos de la Cueva de Nerja y, con ello, el espectro de iluminación más favorable para su desarrollo.



CAPITULO 7

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones generales

1. El *mal verde* de la Cueva de Nerja se debe a la presencia de microorganismos fotosintéticos que se desarrollan en el entorno de las lámparas de luz eléctrica de las Galerías Turísticas. Estos organismos forman parte de comunidades estructurales complejas, denominadas biofilms, que colonizan tanto la superficie como las grietas y oquedades del sustrato, alcanzando una profundidad no superior a 3 mm.

2. Su presencia se ha relacionado con procesos de alteración física y química del sustrato, tales como discoloración, disolución, ruptura o arenización. Además, estas comunidades biológicas proporcionan materia orgánica que sustenta el desarrollo de organismos heterótrofos y modifica la población de microorganismos autóctonos de la cueva.

3. El empleo de técnicas de fotomonitorización, control ambiental y análisis estadístico ha permitido cuantificar la colonización de los espeleotemas de la Cueva de Nerja por biofilms fotosintéticos, así como conocer su evolución durante el periodo de estudio. Los cambios de



tamaño determinados en los biofilms se relacionaron, mayoritariamente, con un aumento de la superficie colonizada.

4. El conjunto de variables: humedad relativa, concentración de dióxido de carbono y temperatura del aire pudo explicar, en algunos casos, hasta un 80 % del tamaño de los biofilms mientras que, en otros, este porcentaje fue muy inferior. De estas variables ambientales, la humedad relativa del aire resultó ser la más influyente en el tamaño de los biofilms.

5. Otros factores ambientales, tales como disponibilidad de agua líquida, presencia de murcielaguina, tipo de iluminación, empleo de biocidas o presencia de artrópodos han sido propuestos como favorecedores o detractores del crecimiento de los biofilms fotosintéticos y deben tenerse en cuenta durante los trabajos de iluminación de espeleotemas.

6. El empleo combinado de las técnicas de microscopía ha ofrecido información sobre la estructura, composición y relación con el sustrato de los biofilms fotosintéticos, así como sobre la diversidad de organismos que los integran y su estado fisiológico. Las técnicas moleculares han permitido contrastar y, en su caso, corroborar la identificación los organismos fotosintéticos propuesta por el estudio morfológico.

7. Se han establecido dos tipos de biofilms en base a sus propiedades macroscópicas y diversidad de organismos fotosintéticos. El tipo más abundante presenta textura pulverulenta, se relaciona con sustrato secos y se compone por *Cyanidium* sp. y *Chroococcidiopsis* sp. El otro tipo es de textura gelatinosa y semi-gelatinosa, se desarrolla en superficies con presencia de agua líquida y se forma, además, por representantes de los géneros *Aphanothece*, *Leptolyngbya*, *Gloeocapsa*, *Pseudophormidium*, *Chalicogloea*, *Desmococcus*, *Jenufa* y *Stichococcus*. Otros géneros, tales como *Humidophila*, *Gloethece* y *Nostoc*, también han sido identificados en la Cueva de Nerja pero con menor frecuencia.

8. Los organismos fotosintéticos que integran estos biofilms se encuentran perfectamente adaptados a las condiciones ambientales disponibles, especialmente a la escasez de agua y una reducida iluminación. De ellos, los organismos más abundantes son *Chroococcidiopsis* sp. y *Cyanidium* sp. considerados extremófilos y de presencia ubicua en la Cueva de Nerja.

9. Las especies de algas *Desmococcus endolíthicus* y *Stichococcus bacillaris* fueron los colonizadores primarios de una superficie de espeleotema sometida a iluminación controlada.

10. En relación con el tipo de sustrato, los sustratos con mayor proporción de arcilla o con disponibilidad de agua líquida mostraron mayor biorreceptividad para su colonización por microorganismos, en general y de metabolismo fotosintético, en particular.

11. A pesar de que no se pudo establecer una relación entre la intensidad de iluminación (PAR) y el crecimiento de los biofilms, se ha determinado su desarrollo a intensidades de iluminación muy por debajo del punto de compensación de la fotosíntesis de cianobacterias y algas, lo que pone de manifiesto su capacidad de supervivencia en condiciones de escasa iluminación. Por tanto, para controlar estos biofilms no basta con reducir, cuantitativamente, la intensidad de iluminación que reciben sino que también es necesario adecuar esa iluminación, cualitativamente, a las condiciones más desfavorables para el desarrollo de estos organismos.

12. El espectro de emisión de los organismos fotosintéticos de la Cueva de Nerja ha permitido identificar los pigmentos que posee cada grupo de organismos y, por tanto, conocer las condiciones de iluminación más favorables o desfavorables para su desarrollo.

13. La combinación de los resultados obtenidos para la identificación de los organismos basados en los caracteres morfológicos y en el análisis genético han permitido identificar, en la Cueva de Nerja, la presencia de especies ya descritas morfológica y molecularmente en la bibliografía, especies morfológicamente iguales y molecularmente diferentes a las descritas en la bibliografía, denominadas especies crípticas y, finalmente, especies nuevas, que aun no han sido descritas morfológica y molecularmente.

14. La información ofrecida por este trabajo sobre los biofilms fotosintéticos que dan lugar al *mal verde* de la Cueva de Nerja, en relación con sus procesos de desarrollo y dispersión, sus estrategias de colonización y sus requerimientos específicos, resulta una herramienta básica para el diseño de estrategias de control de estas comunidades biológicas en base a una adecuada conservación del patrimonio natural y cultural de la cavidad.

15. No obstante, las medidas metódicas del biodeterioro de los espeleotemas producido por los biofilms fotosintéticos y el conocimiento de las consecuencias a lo largo del tiempo son todavía una asignatura pendiente y necesaria para la protección del patrimonio cultural y natural hipogeo, en general, y de la Cueva de Nerja, en particular, que precisa continuar el trabajo desarrollado por esta memoria mediante la puesta en práctica de las recomendaciones indicadas a continuación.

7.2. Recomendaciones

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una notable colonización por biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja que aumenta su tamaño con el paso del tiempo. Para estos biofilms, la disponibilidad de agua líquida y de iluminación artificial en el sustrato representan los principales factores limitantes de su desarrollo. En relación con el agua, se recomienda evitar su aporte extraordinario, es decir, procedente del riego de jardines del exterior o de depósitos de almacenamiento. No obstante, dada la naturaleza “húmeda” del medio subterráneo, controlar la iluminación se plantea como una de las principales actuaciones de cara a eliminar, reducir o prevenir el desarrollo de los biofilms fotosintéticos.

Así, a nivel cuantitativo, se recomienda reducir la duración de los periodos de iluminación de la cavidad. Desde un punto de vista cualitativo, la información ofrecida por los espectros de emisión de fluorescencia de los organismos fotosintéticos ha permitido identificar sus pigmentos y, por tanto, conocer el rango de longitud de onda más desfavorable para su desarrollo. En base a esta información se propone, como iluminación más adecuada para la Cueva de Nerja, una longitud de onda alrededor de 560 nm y una temperatura de color por debajo de 2800 K. Con frecuencia, las longitudes de onda emitidas por las lámparas comerciales no se adecuan a los requisitos de conservación recomendados a excepción de las lámparas de tungsteno. No obstante, estas lámparas incandescentes precisan de un tiempo de encendido e incrementan la temperatura y disminuyen la humedad ambiental del entorno, por lo que no representan una alternativa apropiada para la iluminación de cavidades (D’Agostino et al., 2015). En la actualidad, de los tipos de lámparas disponibles en el mercado, las compuestas por diodos (LEDs) se consideran las más adecuadas para la iluminación de cavidades (Olson, 2006).

En base a ello, se recomienda el diseño experimental de lámparas LEDs que presenten las características indicadas. Prototipos de esta luminaria, de carácter preliminar, deben ser empleados en ensayos en el interior de la cueva que monitoricen del estado fisiológico de los biofilms y determinen posibles procesos de fotoaclimatación o adaptación de los organismos fotosintéticos. Los resultados obtenidos permitirán el diseño final del nuevo sistema y programa de iluminación, que debe tener en cuenta la naturaleza turística de la Cueva de Nerja y, por tanto, la legislación vigente relativa a la seguridad de los visitantes.

Por otro lado, un cambio drástico en la iluminación de zonas colonizadas por biofilms fotosintéticos podría inducir la muerte masiva de organismos y, por tanto, aumentar la materia orgánica muerta del medio, que representa una fuente nutricional para los hongos. Un desarrollo de hongos a gran escala en el interior de la cueva podría generar una situación semejante a la sucedida en la cueva de Lascaux, tal y como se describe en el capítulo 4 de la presente memoria. Para evitar este hecho, se propone el reemplazo de forma progresiva y controlada de la iluminación, así como la limpieza previa de aquellos espeleotemas colonizados intensamente, a fin de reducir la cantidad de materia orgánica del medio. En aquellos espeleotemas con desarrollo epilítico de los biofilms y presencia de un sustrato estable, desde un punto de vista estructural, se propone una limpieza mecánica suave, que evite la dispersión de propágulos. Este tipo de limpieza no se debe realizar cuando los organismos se desarrollen casmoendolíticamente o en sustratos arenizados y fácilmente disgregables, dado que aumentaría su deterioro sin eliminar la totalidad de los organismos. En estos casos, se recomienda el empleo de biocidas que no alteren el sustrato ni aporten sustancias tóxicas al medio. En base a la información bibliográfica así como a nuestra propia experiencia, se recomienda el empleo de una dilución de peróxido de hidrógeno y agua saturada en calcita (15 %) seguido de la retirada del medio de la materia orgánica muerta que se genere.

Finalmente, la iluminación primaria de zonas que se encuentran en oscuridad debe evitar aquellos sustratos más biorreceptivos, es decir, con elevada porosidad, presencia de murcielaguina o disponibilidad de agua líquida.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelahad, N. 1989. On four *Myxosarcina*-like species (Cyanophyta) living in the Inferniglio cave (Italy). *Archiv fur Hydrobiologie 82 Algological Studies*, 54, 3-14.
- Albertano, P. y Urzì, C. 1999. Structural Interactions among Epilithic Cyanobacteria and Heterotrophic Microorganisms in Roman Hypogea. *Microbial Ecology*, 38, 244-252.
- Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G. y Pollio, A. 2000. The taxonomic position of *Cyanidium*, *Cyanidioschyzon* and *Galdieria*: an update. *Hydrobiologia*, 433, 137-143.
- Albertano, P. y Hernández-Mariné, M. 2001. Algae in habitats with reduced and extreme radiation. *Nova Hedwigia*, Beiheft, 123, 225-22.
- Albertano, P. 2012. Cyanobacterial Biofilms in Monuments and Caves. En: Whitton, B.A. (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*. Durham: Springer, 317-343.
- Alpert, P. 2006. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *The Journal of Experimental Biology*, 209, 1575-1584.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.



- Anagnostidis, K. y Komárek, J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie*, 80, 327-472.
- Andreo, B. y Carrasco, F. 1993. Estudio hidrogeológico del entorno de la Cueva de Nerja. En: Carrasco, F. (Ed.), *Geología de la Cueva de Nerja. Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, 3, 163-187.
- Andreo, B., Liñán, C., Carrasco, F., Batiot, C., Emblanch, C. y Durán, J.J. 2005. Infiltration in the dolomitic karstic system of Nerja cave (southern Spain). En: *Final Programme and Abstract Book of the 14th Internacional Congress of Speleology*, Atenas, 154.
- Andrieux, C. 1983. Etude des circulation d'air dans la grotte de Niaux. Conséquences. *Karstologia*, 1, 19-24.
- Andrieux, C. 1988. Influence del'homme sur l'environnement climatique souterrain. En Paris, S.C. (Ed.). *Actes des Journées Trombes, Mémoires S.C. Paris, Moulis (France)*, 1, 96-122.
- Asencio, A.D. y Aboal, M. 2000. A contribution to knowledge of chasmoendolithic algae in cave-like environments. *Algological Studies*, 98, 133-151.
- Ashurst, J. y Ashurst, N. 1988. *Practical Building Conservation*, 1, Stone Masonry. New York: Halsted Press.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/Wiley Interscience. Nueva York.
- Azúa-Bustos, A., González, C., Mancilla, R.A., Salas, L., Palma, E., Wynne, J.J., McKay, C.P. y Vicuña, R. 2009. Ancient Photosynthetic Eukaryote Biofilms in an Atacama Desert Coastal Cave. *Microbial Ecology*, 58, 485-496.
- Barton, H.A. y Northup, D.E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 163-178.



- Barranco, P., Mayoral, J.G., Ruiz-Portero, C., Amate, J., García-Pardo, J., Piquer, M., Ortega, D., Salavert, V., Ruíz-Avilés, F., Lara, M.D. y Tinaut, A. 2004. Fauna endokárstica andaluza. En: Andreo, B y Durán J.J. (Eds.). *Investigaciones en sistemas kársticos españoles*. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España. Serie: Hidrogeología y aguas subterráneas, 12, 473-504.
- Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C. y Sáiz-Jiménez, C. 2010. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 156, 644-652.
- Bellezza, S., Albertano, P., Roberto de Philippis, R. y Paradossi, G. 2006. Exopolysaccharides of two cyanobacterial strains from Roman Hypogea. *Geomicrobiology Journal*, 23, 301-310.
- Bellinzoni, A.M., Caneva, G., y Ricci, S. 2003. Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities. *International Biodeterioration Biodegradation*, 51, 203-210.
- Bischoff, H.W. y Bold, H.C. 1963. Phycological Studies IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and related Algal Species. *University of Texas Publication*, Austin Texas, 6318, 1-95.
- Bottrell, S. 1996. Organic carbon concentration profiles in recent cave sediments: Records of agricultural pollution or diagenesis? *Environmental Pollution*, 91, 325-332.
- Brand, F. y Stockmayer, S. 1925. Analyse der aerophilen Grünalgenanflüge, insbesondere der proto-pleurococcoiden Formen. *Archiv für Protistenkunde*. 52, 265-355.
- Broadly, P.A. y Ingerfeld, M. 1993. Three new species and a new record of chaetophoracean (Chlorophyta) algae from terrestrial habitats in Antarctica. *European Journal of Phycology*. 28, 25-31.
- Brock, E. y Sand, W. 1999. The microbiology of the masonry biodeterioration. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 503-514.
- Brunet, J., Vidal, P. y Vouvé, J. 1990. Protection et gestion du patrimoine rupestre et de l'environnement associé. Application à la grotte de Lascaux. 50 ans après la découverte de Lascaux. Actes des journées internationales d'étude sur la conservation de l'art rupestre, Groupe Art Rupestre de l'ICOM pour la conservation, Dordogne-Périgord (France), 89-100.

- Büdel, B. y Rhiel, E. 1985. A new cell wall structure in a symbiotic and free-living strain of the blue-green alga genus *Chroococcidiopsis* (Pleurocapsales). *Archives of Microbiology*, 143, 117-121.
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K.I., Salisch, M., Reisser, W. y Weber, B. 2009. Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microbial Ecology*, 57, 229-247.
- Büdel, B. y Kauff, F. 2012. Prokaryotic Algae, Bluegreen Algae. En: Frey, W. (Ed.). Syllabus of plant families - A Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien Part1/1: *Blue-green Algae, Myxomycetes, and Myxomycete-like organisms, Phytoparasitic protists, Heterotrophic Heterokontobionta and Fungi*, Borntraeger, Stuttgart, 5-39.
- Byoung-Woo, K. 2002. Ecological study for the control of green contamination in Korean show caves. *Proceedings, 4 th Samcheok International Cave Symposium*, Kangwon Development Research Institute, Samcheok City, South Korea, 74-76.
- Caballero, E., Jiménez de Cisneros, C. y Reyes, E. 1995. Geochemical study of the alteration processes affecting carbonate materials at the Nerja Cave site (Málaga, S. Spain). *Mineralogica et Petrographica Acta*, 38, 1-14.
- Caldwell, D.E. y Caldwell, S.J. 1980. Fine structure of in situ microbial iron deposits. *Geomicrobiology Journal*, 2, 39-53.
- Campbell, J.B. 1977. *The Upper Palaeolithic of Britain: a study of man and nature during the Late Ice Age*. Oxford, Clarendon press, 264 pp. y 376 pp. (2 vols).
- Cañaveras, J.C., Cuezva, S., González-Grau, J.M., Marín, F., Martín-Rosales, W., Martínez-Manzanares, E., del Rosal, Y., Sáiz-Jiménez, C., Sánchez-Moral, S. y Simón, M.D. 2004 .Microbiología y depósitos endokársticos. En: *Investigaciones en sistemas kársticos españoles. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España*. Serie Hidrogeología y aguas subterráneas, 12, 431-458.
- Cañete, S. 1997. *Concentraciones de Radón e intercambio de aire en la Cueva de Nerja*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Málaga, 84 pp.



- Carrasco, F., Andreo, B., Vadillo, I., Durán, J.J. y Liñán, C. 1999. El medio ambiente subterráneo de la Cueva de Nerja (Málaga). Modificaciones antrópicas. En: Andreo, B. Carrasco, F. y Durán, J.J. (Eds.). *Contribución del estudio científico de las cavidades kársticas al conocimiento geológico*. Patronato de la Cueva de Nerja, Nerja (Málaga), 323-334.
- Carrasco, F., Andreo, B., Vadillo, I. y Liñán, C. 2000. Human influence on the karst water of the Nerja Cave. En: Drew, D. y Hotzl, H. (Eds.). *Human impacts and Karst Groundwater: International Contribution to Hydrogeology*, 20, 168-173.
- Carrasco, F., Vadillo, I., Liñán, C., Andreo, B. y Durán, J.J. 2002. Control of environmental parameters for management and conservation of Nerja Cave (Malaga, Spain). *Acta Carsológica*, International Workshop Monitoring of Karst Caves, Eslovenia, 31, 105-122.
- Caumartin, V. 1963. Review of the microbiology of underground environments. *National Speleological Society Bulletin*, 25, 1-14.
- Caumartin, V. 1977. Conservation des cavernes aménagées. Resultats obtenus dans quelques pays d'Europe occidentale. En: Ford, T.D. (Ed.). *Proceedings of the 7th International Congress of Speleology*, Sheffield, U.K., University of Leicester, 96-98.
- Chelius, M.K. y Moore, J.C. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21,123-134.
- Chelius, M.K., Beresford, G., Horton, H., Quirk, M., Selby, G., Simpson, R.T., Horrocks, R. y Moore, J.C. 2009. Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology*, 38, 1-10.
- Chen, Z., He, C. y Hu, H. 2012. Temperature responses of growth, photosynthesis, fatty acid and nitrate reductase in Antarctic and temperate *Stichococcus*. *Extremophiles*, 16, 27-133.
- Chroňáková, A., Horák, A., Elhottová, D. y Křišťůfek, V. 2009. Diverse archaeal community of a bat guano pile in Domica Cave (Slovak Karst,Slovakia). *Folia Microbiologica*, 54, 436-446.

- Cigna, A.A. 1993. Environmental management of tourist caves. *Environmental Geology*, 21, 173-180.
- Ciniglia, C., Yoon, H.S. Pollio, A. Pinto G. y Bhattacharya, D. 2004. Hidden biodiversity of the extremophilic Cyanidiales red algae. *Molecular Ecology*, 13, 1827-1838.
- Cooksey, K.E. 1992. Bacterial and algal interaction in biofilms. En: Melo, L.F., Bott, T. R., Fletcher, M. y Capdeville, B. (Eds.). *Biofilms Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Netherlands, 163-173.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.
- Crispim, C.A. y Gaylarde, C.C. 2005. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microbial Ecology*, 49, 1-9.
- Cumbers. J. y Rothschild, L. 2014. Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* (Pleurocapsales). *Journal of Phycology*, 50, 472-482.
- Cunningham, K.I., Northup, D.E, Pollastro, R.M., Wright, W.G. y LaRock, E.J. 1995. Bacteria, fungi, and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environmental Geology*, 25(1), 2-8.
- Curl, R.L. 1966. Caves as a measure of karst. *The Journal of Geology*, 74, 798-830.
- Cuzman, A.O., Tapete, D., Fratini, F., Mazzei, B., Riminesi, C. y Tiano, P. 2014. Assessing and facing the biodeteriogenic presence developed in the Roman Catacombs of Santi Marco, Marcelliano e Damaso, Italy. *European Journal of Science and Theology*, 10, 185-197.
- Czerwik-Marcinkowska, J. y Mrozinska, T. 2011. Algae and Cyanobacteria in caves of the Polish Jura. *Polish Botanical Journal*, 56, 203-243.
- D'Agostino, D., Beccarisi, L., Camassa, M. y Febroriello, P. 2015. Microclimate and microbial characterization in the Zinzulusa show cave (South Italy) after switching to LED lighting. *Journal of Cave and Karst Studies*, 77(3), 133-144.

- Davey, M. y O'Toole, G. A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Davis, D.G., Palmer, M.V. y Palmer, A.N. 1990. Extraordinary subaqueous speleothems in Lechuguilla Cave, New Mexico. *Bulletin of the National Speleological Society*, 52, 70-86.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. y Greenberg E.P. 1998. The Involvement of Cell to Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science*, 280, 295-298.
- Delay, B. y Juberthie, C. 1981. Les problemes d'introduction d'énergie dans le milieu souterrain superficiel. *Mémoires de Biospéologie*, 8, 45-52.
- DeLong, E.F, Taylor, L.T, Marsh, T.L. y Preston, C.M. 1999. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5554-5563.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. y Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2942-2951.
- Di Pippo, F., Bohn, A., Congestri, R., De Philippis, R. and Albertano, P. 2009. Capsular polysaccharides of cultured phototrophic biofilms. *Biofouling*, 25, 495-504.
- Dobat, K. 1998. Flore de la lumière artificielle (lampenflora-maladie verte). En: Juberthie, C. y Decu, V. (Eds.). *Encyclopaedia Biospeologica*, Tome 2, Societe de Biospeologie, Moulis-Bucarest, 1325-1335.
- Docampo, S., Trigo, M.M., Recio, M., Melgar, M., García-Sánchez, J. y Cabezudo, B. 2011. Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): Diversity and origin. *Science of the Total Environment*, 409, 835-843.

- Doehne, E. y Pinchin, S. 2008. Time-lapse macro-imaging in the field: Monitoring rapid flaking of magnesian limestone. En: Lukaszewicz, J. W. y Niemcewicz, P. (Eds.). *Proceedings of the 11th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland, 365-372.
- Doehne, E. y Price, C.A. 2010. Stone conservation: an overview of current research. 2nd Edition. http://www.getty.edu/conservation/publications_resources/books/stone_conservation_overview_current_research.html
- Dueñas, C., Fernández, M.C., Cañete, S., Carretero, J. y Liger, E. 1999. ^{222}Rn concentrations, natural flow rate and the radiation exposure levels in the Nerja Cave. *Atmospheric Environment*, 33, 501-510.
- Engel, A.S., Porter, M.L. y Kinkle, B.K. 2001. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiology Journal*, 18(3), 259-274.
- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Payn, R.A., Schmid, M. y Stern, L.A. 2010. Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *Isme*, 4, 98-110.
- Ettl, H. y Gärtner, G. 1995. *Syllabus der Boden, Luft und Flechtenalgen*. Fischer, G. (Ed.) Stuttgart-Jena-New York, 721 pp.
- Faimon, J., Stelcl, J., Kubsova, S. y Zimák, J. 2003. Environmentally acceptable effect of hydrogen peroxide on cave “lamp-flora”, calcite speleothems and limestones. *Environmental Pollution*, 122, 417-422.
- Flemming, H.C. 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Science Technology*, 27, 1-10.
- Fliermans, C. B., Bohlool, B. B. y Schmidt, E. L. 1974. Autecological study of the chemoautotroph Nitrobacter by immunofluorescence. *Applied Microbiology*, 27, 124-129.
- Ford, D.C. 1988. Characteristics of dissolutional cave system in carbonate rocks. En: James, N.P. y Choquette, P.W. (Eds.). *Paleokarst*, Springer-Verlag, 25-57.

- Fott, B. 1976. Choricystis, eine neue Gattung der Chlorococcales (Chlorophyceae). *Archiv fur Hydrobiologie, supplement 49, Algological Studies*, 17, 382-388.
- Fratini, F., Rescic, S. y Tiano, P. 2006. A new portable system for determining the state of conservation of monumental stones. *Materials and Structures*, 39, 139-147.
- Friedman, E.I. 1980. Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Origins of Life*, 10, 223-235.
- Fučíková, K. y Lewis, L.A. 2012. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Fottea*, 12(1), 83–93.
- Fučíková, K., Lewis, P. O. y Lewis, L. A. 2014. Putting incertae sedis taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*. 50, 14-25.
- García-Pichel, F., Nubel, U. y Muyzer, G. 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol*, 169(6), 469-482.
- Garrido, A., Liñán, C., Simón, M.D. y del Rosal, Y. 2007. *Memoria Científica 2006. Instituto de Investigación Cueva de Nerja*. Fundación Cueva de Nerja, Inédito, 246 pp
- Geitler, L. 1933. Diagnosen neuer Blaualgen von den Sunda-Inseln. *Archiv fur Hydrobiologie*, 8, 622-634.
- Geitler, L. 1942. Morphologie, Entwicklungsgeschichte und Systematik neuer bemerkenswerter atmophytischer Algen aus Wien. *Flora* 136, 1-29.
- Gillieson, D. 1996. *Caves: processes, development, and management*. Oxford, Blackwell Publishers Ltd., 324 pp.
- Gladis, F. y Schumann, R. 2011. Influence of material properties and photocatalysis on phototrophic growth in multi-year roof weathering. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 65, 36-44.

- Gladis-Schmacka, F., Glatzel, S., Karsten, Ulf., Böttcher, H. Y Schumann, R. 2014. Influence of local climate and climate change on aeroterrestrial phototrophic biofilms, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 30(4), 401-414.
- Golubic, S., Friedmann, E.I. y Schneider, J. 1981. The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. *Journal of Sedimentary Petrology*, 51, 475-478.
- Golubic, S. y Schneider, J. 2003. Microbial endoliths as internal biofilms. En: Krumbein, W.E. Dornieden, T., Volkmann, M., Paterson, D.M. y Zavarzin, G.A. (Eds.). *Fossil and Recent Biofilms. A natural History of Life on Earth*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 249–263.
- Gómez-Bolea, A., Alvaro, I., Llop, E., Sammut, S. y Hernández-Mariné, M. 2014. Indoors diversity in phototrophic biofilms at St. Paul’s Catacombs (Malta). En: Sáiz-Jiménez (Ed.). *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*, 83-88.
- González, J.M., Laiz, L. Portillo, C. y Sáiz-Jiménez, C. 2005. Microbial communities inhabiting caves with Palaeolithic paintings. *ICOM Committee for Conservation 14th Triennial Meeting*, 1, 381-385.
- Gorbushina, A.A. 2007. Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, 9, 1613-1631.
- Griffiths, R.I., Whiteley ,A.S., O’Donnell, A.G. y Baile, 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.
- Grilli-Caiola, M., Billi, D. y Friedmann, E.I. 1996. Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *European Journal of Phycology*, 31, 97-105.
- Grokopf, R.F., Janssen, P.H. y Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence alignments. *Bioinformatics*, 20, 2317-2319.
- Guillitte, O. 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Science of Total Environmet*, 167, 215-220.

- Guiry, M.D. 2015. En: Guiry, M.D. y Guiry, G.M. (Eds.) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> Acceso 23/10/2015.
- Gustavs, L., Gors, M. y Karsten, U. 2011. Polyol patterns in biofilm-forming aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 47(3), 533-537.
- Habe, F. 1981. Bericht der commission fur karstschutz und schauholen del UIS. En: *Proceedings 8th International Congress of Speleological Society*, Kentucky (USA), 2, 442-443.
- 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.
- Hanagata, N. 1998. Phylogeny of the subfamily Scotiellocoystoideae (Chlorophyceae, Chlorophyta) and related taxa inferred from 18S ribosomal RNA gene sequence data. *Journal of Phycology*, 34, 1049-1054.
- Hariot, P. 1891. Le genre Polycoccus Kützing. *Journal de Botanique*, 5, 29-32.
- Häubner, N., Schumann, R. y Karsten, U. 2006. Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on facades - response to temperature and water stress. *Microbial Ecology*, 51, 285-293.
- Hauer, T., Mühlsteinová, R., Bohunická, M., Kaštovský, J. y Mareš, J. 2015. Diversity of cyanobacteria on rock surfaces. *Biodiversity and Conservation*, 24, 759-779.
- Hazslinszky, T. 2002. Ubersicht der Lampenflorabekämpfung in Ungarn. En: Hazslinszky, T. (Ed.). *International Conference on Cave Lighting, Budapest, Hungary*, Hungarian Speleological Society, 41-50.
- Heaton, T. 1986. Caves: a tremendous range of energy environments on Earth. *National Speleological Society News*, August, 301-304.
- Hernández-Mariné, M., Asencio-Martínez, A., Canals, A., Ariño, X., Aboal, M. y Hoffmann, L. 1999. Discovery of populations of the lime incrusting genus *Loriella* (Stigonematales) in Spanish caves. *Archiv für Hydrobiologie, Supplement Algological Studies*, 94, 121-138.

- Hernández-Mariné, M., Roldán, M., Clavero, E., Canals, A. y Ariño, X. 2001. Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of Puigmoltó skinhole. En: Elster, J., Seckbach, J., Vincent, W.P. y Lhotsky, O. (Eds.). *Algae and extreme environments*, Nova Hedwigia, Beih. 123, 237-253.
- Hernández-Mariné, M., Clavero, E. y Roldán, M. 2003. Why there is such luxurious growth in the hypogean environments? *Algological Studies*, 109, 229-239.
- Hernández-Mariné, M., Clavero, E. y Roldán, M. 2004. Microscopy methods applied to cyanobacteria. *Limnética*, 23, 179-186.
- Hernández-Mariné, M. y Roldán, M. 2005. Adherence of hormogonia to substrata is mediated by polysaccharides produced by necridic cells. *Algological Studies*, 117, 239-249.
- Hill, W.R. 1996, Effects of light. En: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. y Lowe, R.L. (Eds.). *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. San Diego, Academic Press, 121-144.
- Hill, C.A. y Forti, P. 1997. *Cave minerals of the world*, 2nd Ed. Huntsville, National Speleological Society, 463 pp.
- Hodac, L., Hallmann, C., Rosenkranz, H., Faßhauer y F., Friedl, T. 2012. Molecular Evidence for the Wide Distribution of Two Lineages of Terrestrial Green Algae (Chlorophyta) over Tropics to Temperate Zone. International Scholarly Research Network, doi:10.5402/2012/795924
- Hueck-van der Plas, E.H. 1965. The biodeterioration of materials as a part of hylobiology. *Material und Organismen*, 1, 5-34.
- Hueck-van der Plas E.H. 1968. The microbiological deterioration of porous building materials. *International Biodeterioration Bulletin*, 4, 11-28.
- Humphreys, W.F. 1991. Experimental re-establishment of pulse-driven populations in a terrestrial troglobite community. *Journal of Animal Ecology*, 60, 609-623.
- Huppert, G., Burri, E., Forti, P. y Cigna, A. 1993. Effects of tourist development on caves and karst. *Catena supplement*, 25, 251-268.

- Iliopoulou-Georgoudaki, J., Pantazidou, A. y Theoulakis, P. 1993. An assessment of cleaning photoautotrophic microflora: The case of “Perama” cave, Ioannina Greece. *Memoires de Biospeologie*, 20, 117-120.
- Instituto de Investigación Cueva de Nerja (IICN). 2015. *Memoria Científica 2014*. Fundación Cueva de Nerja, Inédito, 541 pp.
- Jembrih, D., Neelmeijer, Ch., Schreiner, M., Peev, M., Clausen, Ch. y Krejsa, P. 2000. *Microchimica*, 133, 151-157.
- Jiménez de Cisneros, C., Caballero, E. y Vera, J.A. 2006. Extracción de inclusiones fluidas en espeleotemas de la Cueva de Nerja. En: *Karst, cambio climático y aguas subterráneas*, Publicaciones del IGME, Serie Hidrogeología y aguas subterráneas, 18, 333-337.
- Jones, M.V. 1995. Fungal Biofilms; eradication of a common problem. En: Wimpenny, J., Handley P., Gilbert, P., y Lappin-Scott H.M. (Eds.). *The Life and Death of Biofilm*. Cardiff, Bioline, 157-160.
- Jordá-Pardo, J.F. 1986. La Prehistoria de la Cueva de Nerja. *Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, 1, Patronato de la Cueva de Nerja, Málaga, 339 pp.
- Jurado, V., Porca, E. y Sáiz-Jiménez, C. 2010. Control de un brote fúngico en la Cueva de Castañar de Ibor. En: Durán, J.J. y Carrasco, F. (Eds.). *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*, Madrid, Asociación de Cuevas Turísticas Españolas, 611-620.
- Jurado, V., Novakova, A., Hernández-Mariné, M. y Sáiz-Jiménez, C. 2014. Cueva del Tesoro, Rincón de la Victoria, Málaga: a treasure of biodiversity. En: Sáiz-Jiménez (Ed.). *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*, 207-213.
- Jurado, V., Galocha, I, Domínguez, I., Rogerio, M.A. y Sáiz-Jiménez. 2015. Estudio microbiológico de la Cueva de Nerja. Investigación de los organismos implicados en el biodeterioro. IRNAS-CSIC, Sevilla, Inédito, 50 pp.

- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommering-Röser, A., Koops, H.P. y 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 and Environmental Microbiology*, 64, 3042-3051.
- Keshari N. y Adhikary, S.P. 2013. Characterization of cyanobacteria isolated from biofilms on stone monuments at Santiniketan, India. *Biofouling*, 29(5), 525-536.
- Klimchouk, A. 2004. Caves. En: Gunn, J. (Ed.). *Encyclopedia of caves and karst science*, 203-205.
- Komárek, J. 1992. *Diversita a moderní klasifikace sinic (Cyanoprokaryota)* [Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota). - inaugural dissertation, not published.
- Komárek, J. y Hindák, F. 1975. Taxonomy of the new isolated strains of *Chroococidiopsis* (Cyanophyceae). *Archiv für Hydrobiologie*, 13, 311-329.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. 1998. *Cyanoprokaryota I: Chroococcales*. En: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. y Mollenhauer, D. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*. Gustav Fischer, Jena/Stuttgart/Lübeck/Ulm, 548 pp.
- Komárek, J. y Anagnostidis, K. 2005. *Cyanoprokaryota 2: Oscillatoriales*. En: Büdel, B., Krienitz, L., Gärtner, G. y Schagerl, M. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 759 pp.
- Komárek, J., Kastovsky, J. y Jezberová, J. 2011. Phylogenetic and taxonomic delimitation of the cyanobacterial genus *Aphanothece* and description of *Anathece* gen. nov. *European Journal of Phycology*, 46(3), 315-326.
- Komárek, J. 2013. *Cyanoprokaryota 3: Heterocytous Genera*. En: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. y Schagerl, M. (Eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/3*. Spektrum Akademischer Verlag, 1130 pp.
- Komárek, J. y Hauer, T. 2013. *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera*. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>. Acceso 16/10/2015.

- Komárek, J., Kaštovsky, J., Mareš, J. y Johansen, J.F. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia*, 86, 295–335.
- Köppen, W. 1936. Das geographische System der Klimate. En: Köppen W, Geiger R (Eds.). *Handbuch der Klimatologie*, Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1-44.
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D. y Wolf, M. 2003. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia*, 58, 437–446.
- Krumbein, W.E. 1988. Microbial interactions with mineral materials. En: Houghton, D.R., Smith, R.N. y Eggins, H.O.W. (Eds.). *Biodeterioration*, 7, Elsevier, London, 78-100.
- Kuhn, A.R., Klein, J.A. y Stevens, W.R. 2007. The digital blink comparison technique as a diagnostic aid for medical imaging. *Computer-Assisted Radiology and Surgery*, 2, 62-64.
- Kumar, C.G. y Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9-27.
- Kumar, R. y Kumar, A.V. 1999. *Biodeterioration of stone in tropical environments*. En: Neville, A. (Ed.). *Research in Conservation*, The Getty Conservation Institute, Los Angeles, 85 pp.
- Kützing, F.T. 1843. *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser, 458 pp.
- Laiz, I., Groth, I., Gonzalez, I. y Sáiz-Jiménez, C. 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiology*, 36, 129-138.
- Lamenti, G., Tiano, P. y Tomaselli, L. 2000. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *Journal of Applied Phycology*, 12, 427-433.
- Lamprinou, V., Pantazidou, A., Papadogiannaki, G., Radea C. y Economou-Amili, A. 2009. Cyanobacteria and associated invertebrates in Leontari cave. *Fottea*, 9, 155-164.

- Lamprinou, V., Danielidis, D.B., Economou-Amilli, A. y Pantazidou, A. 2012. Distribution survey of Cyanobacteria in three Greek caves of Peloponnese. *International Journal of Speleology*, 4(2), 267-272.
- Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin, 506 pp.
- Laundon, J. 1985. *Desmococcus olivaceus*—the name of the common subaerial green algae. *Taxonomy*, 34, 671-672.
- Lawrence, J. R., Korber, D.R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. y Caldwell, D. E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173, 6558-6567.
- Lawrence J. y Neu T.R. 1999. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of Microbial Biofilms. *Methods in Enzymology*, 310, 131-144.
- Lefèvre, M. y Laporte, G.S. 1969. The “maladie verte” of Lascaux. diagnosis and treatment. *Studies in Speleology*, 2, 35-44.
- Lefèvre, M. 1974. La “maladie verte” de Lascaux. *Studies in Conservation*, 19, 126-156.
- Liñán, C., Andreo, B., Carrasco, F. y Vadillo, I. 1999. Hidrodinámica e hidroquímica de las aguas de goteo de la Cueva de Nerja. En: Andreo, B., Carrasco, F. y Durán, J.J. (Eds.). *Contribución del estudio científico de las cavidades kársticas al conocimiento geológico*, 393-402.
- Liñán, C., Simón, M. D., del Rosal, Y. y Garrido, A. 2007. Estudio preliminar del clima en el entorno de la Cueva de Nerja (Andalucía, provincia de Málaga) En: Durán et al. (Eds.). *Cuevas turísticas: aportación al desarrollo sostenible*. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España, Madrid, Serie Hidrogeología y Aguas Subterráneas, 24, 159-168.
- Liñán, C., Carrasco, F., Vadillo, I. y Garrido, A. 2008. Estudios hidrogeológicos en la Cueva de Nerja (Málaga). En: López-Geta et al. (Eds.). *Agua y Cultura*. Publicaciones del IGME, serie: Hidrogeología y aguas subterráneas, 25, 673-683.

- Liñán, C., Carrasco F., Calaforra, J.M., del Rosal, Y., Garrido, A. y Vadillo, I. 2009. Control de parámetros ambientales en las Galerías Altas y Nuevas de la Cueva de Nerja (Málaga). Resultados preliminares. En: Durán, J.J. y López-Martínez, G. (Eds.). *Cuevas Turísticas, cuevas vivas. Actas del II Congreso español sobre cuevas turísticas*, ACTE, 131-144.
- Liñán, C., del Rosal, Y., Montesino, A. y Garrido, A. 2010. Plan de difusión del Patrimonio Cultural y Natural de la Cueva de Nerja (Málaga, Andalucía). En: Durán y Carrasco (Eds.), *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*, Madrid, ACTE, 35-46.
- Liñán, C. y del Rosal, Y. 2014. Natural Ventilation of Karstic Caves: New Data on the Nerja Cave (Malaga, S of Spain). En: B. Andreo et al. (Eds.). *Hydrogeological and Environmental Investigations in Karst Systems, Environmental Earth Sciences* 1, 505-511.
- Liñán, C., del Rosal, Y. y Carrasco, F. 2014. Control de parámetros ambientales en el sector no habilitado de una cueva turística: la Cueva de Nerja (Málaga, España). En: Calaforra y Durán (Eds.). *Iberoamérica subterránea. Actas del I Congreso Iberoamericano y V Congreso español sobre cuevas turísticas*, ACTE, 229-238.
- López-Figueroa, F., Korbee, N., Celis-Plá, P., Jerez, C., Álvarez-Gómez, F., del Rosal, Y. y Hernández-Mariné, M. 2014. Monitorización del estado fisiológico de los biofilms de la Cueva de Nerja (Málaga) mediante la fluorescencia in vivo de la clorofila a asociada al FOTOSISTEMA II. En: Calaforra, J.M. y Durán, J.J. (Eds.). *Iberoamérica subterránea*, Madrid, ACTE, 485-495.
- Lowe, R.L., Kociolek, P., Johansen, J.R., Van de Vijver, B., Lange-Bertalot, H. & Kopalová, K. 2014. *Humidophila* gen.nov., a new genus for a group of diatoms (Bacillariophyta) formerly within the genus *Diademesmis*: species from Hawaii, including one new species. *Diatom Research*, 29(4), 351-360.
- Lyons, R. G. 1992. Radon hazard in caves: a monitoring and management strategy. *Helictite*, 30(2), 33-40.
- Macedo, M.F., Miller A.Z., Dionísio, A. y Saiz-Jimenez C. 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology*, 155, 3476-3490.

- MacIntyre, H.L., Kana, T.M., Anning, T. y Geider, R. 2002. Photoacclimation of Photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 38, 17-38.
- Mangin, A. y D'Hulst, D. 1995. Fréquentation des grottes touristiques et conservation. Méthode d'approche pour en étudier les effets et proposer une réglementation. *Simposio Internazionale Grotte turistiche e Monitoraggio Ambientale*, Stazione Scient, Bossea, Italia, 117-145.
- Mangin, A., Bourges, F. y D'Hulst, D. 1999. La conservation des grottes ornées: un problème de stabilité d'un système naturel (l'exemple de la grotte préhistorique de Gargas, Pyrénées françaises). *Proceedings of the National Academy of Science*, Paris, 295-301.
- Margalef, R. 1952. Materiales para una flora de las algas del NE. de España, IV a. Cyanophyceae. *Collectanea Botanica*, 3(10), 210-229.
- Marín, F. 1998. *Acta Consejo Científico Asesor de la Cueva de Nerja*. Nerja, 4 de febrero de 1998. Inédito, 6 pp.
- Marín, F. y Marín-Olalla, E. 2000. Factores biológicos implicados en la conservación de la Cueva de Nerja. *Memoria final de las actividades realizadas durante el año 2000*. Instituto de Investigación Cueva de Nerja, Inédito, 78 pp.
- Martincic, A., Vrhovshek, D. y Batic, F. 1981, Flora v jamah z umetno osvetlitvijo. *Bioloski Vestnik*, 29(2), 27-56.
- Mikhailyuk, T.I., Sluiman, H.J., Massalski, A., Mudimu, O., Demchenko, E.M., Kondratyuk, S.Y. y Friedl, T. 2008. New streptophyte green algae from terrestrial habitats and an assessment of the genus *Interfilum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta). *Journal of Phycology*, 44(6), 1586-1603.
- Miller, A.Z., Dionisio, A., Laiz, L., Macedo, M.F. y Sáiz-Jinénez, C. 2009. The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Annals of Microbiology*, 59, 705-713.

- Miller, A.Z., Rogerio-Candelera, M.A., Laiz, L., Wierzchos, J., Ascaso, C., Sequeira-Braga, M.A., Hernández-Mariné, M., Maurício, A., Dionísio, A.; Macedo, M. F. y Saiz-Jiménez, C. 2010. Laboratory-induced endolithic growth in calcarenites: biodeteriorating potential assessment. *Microbial Ecology*, 60, 55-68.
- Mulec, J. 2005. *Algae in the karst caves of Slovenia*. Tesis doctoral, Ljubljana, Slovenia, University of Ljubljana, 149 pp.
- Mulec, J., Kosi, G. y Vrhovsek, D. 2008. Characterization of cave aerophytic algal communities and effects of irradiance levels on production of pigments. *Journal of Cave and Karst Studies*, 70, 3–12.
- Mulec, J. y Kosi, G. 2009. Lampenflora algae and methods of growth control. *Journal of Cave and Karst Studies*, 71(2), 109-115.
- Muyzer, G. y Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73, 127-141.
- Nägeli, C. 1849. Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet. Neue Denkschriften der Allg. *Schweizerischen Gesellschaft für die Gesammten Naturwissenschaften* 10(7), 139 pp.
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., Hendriks, L. y De Wachter, R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 18, 2237-2317.
- Němcová, Y., Eliáš, M., Škaloud, P., Hodač, L. y Neustupa, J. 2011. Jjenufa Gen. Nov.: a new genus of coccoid green algae (Chlorophyceae, incertae sedis) previously recorded by environmental sequencing. *Journal of Phycology*, 47, 928-938.
- Neu, T. y Lawrence, J.R. 1997. Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 11–25.
- Nienow, J.A. 1996. Ecology of subaerial algae. *Nova Hedwigia Beiheft*, 112, 537–552.

- Northup, D.E. y Lavoie, K.H. 2001. Geomicrobiology of caves: A review. *Geomicrobioly Journal*, 18, 199-222.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. y Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3327-3332.
- Ohki, K., Kamiya, M., Honda, D., Kumazawa, S. and Ho, K.K. 2008. Morphological and phylogenetic studies on unicellular diazotrophic cyanobacteria (Cyanophytes) isolated from the coastal waters around Singapore. *Journal of Phycology*, 44, 142-151.
- Ojeda, F. 1991. Contribución al estudio edafológico de materiales detríticos superficiales. *Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, 2, 129-173.
- Olson, R. 2006. Control of lamp flora in developed caves. En: Hildreth-Werker, V. y Werker, J.C. (Eds.), *Cave Conservation and Restoration: Huntsville, National Speleological Society*, 343-348.
- Ortega-Calvo, J.J., Hernández-Mariné, M., Sáiz-Jiménez, C. 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration*, 28, 165-185.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276, 734-740.
- Palmer, A.N. 1991. Origin and morphology of limestone caves. *Geological Society of America Bulletin*, 103, 1-21.
- Papida, S, Murphy, W. y May, E. 2000. Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 305-17.
- Pattanaik, B., Schumann, R. y Karsten, U. 2007. Effects of ultraviolet radiation on Cyanobacteria and their protective mechanisms. En: Seckbach J. (Ed.). *Algae and Cyanobacteria in extreme environments*, Springer, 29-45.
- Pérez, I. y Andreo, B. 2007. Sierra Almijara y Alberquillas. En: Durán, J.J. (Ed.) *Atlas Hidrogeológico de la provincia de Málaga*, 2, IGME-DPM, 144-148.

- Perry, T.D., Duckworth, O.W. y McNamara, C.J. 2004. Effects of the biologically produced polymer alginic acid on macroscopic and microscopic calcite dissolution rates. *Environmental Science of Technology*, 38, 3040-3046.
- Petersen J. B. 1935. Studies on the biology and taxonomy of soil algae. *Dansk Botanisk arkiv*. 8, 1-180.
- Popović, S., Subakov, G., Stupar, M., Unković, N., Predojević, D., Jovanović, J. y Ljaljević, M. 2015. Cyanobacteria, algae and microfungi present in biofilm from Božana Cave (Serbia). *International Journal of Speleology*, 44(2), 141-149.
- Potts, M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 34, 319-328.
- Potts, M. 2001. Desiccation tolerance: a simple process? *Trends in Microbiology*, 9, 553-559.
- Pouličkova, A. y Hašler, P. 2007. Aerophytic diatoms from caves in central Moravia (Czech Republic). *Preslia*, 79, 185-204.
- Prous, X., Ferreira, R.L. y Martins, R.P. 2004. Ecotone delimitation: Epigeal-hypogean transition in cave ecosystems. *Australian Ecology*, 29 (4), 374-382.
- Rajczy, M., 1989, The flora of Hungarian caves, Karszt e's Barlang, *Special issue*, 69-72.
- Ramírez, M., Hernández-Mariné, M., Novelo, E. y Roldán, M. 2010. Cyanobacteria containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. *Biofouling*, 26(4), 399-409.
- Ramírez, M., Hernández-Mariné, M., Mateo, P., Berrendero, E. y Roldán, M. 2011. Polyphasic approach and adaptative strategies of *Nostoc cf. commune* (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments. *Fottea*, 11(1), 73-86.
- Ren, M., Liu, Z., Jin, J., Deng, X., Wang, F., Peng, B. Wang, X. y Wang, Z. 1981. Evolution of limestone caves in relation to the life of early man at Zhoukoudian, Beijing. *Scientia Sinica*, 14(6), 843-851.

- Reyes, E., Caballero, P., Rodríguez-Jiménez, P., Jiménez de Cisneros, C. y Delgado, A. 1993. Caracterización isotópica de los procesos de degradación de los materiales carbonatados de la Cueva de Nerja. Estudio Preliminar. En: Carrasco, F. (Ed.). *Geología de la Cueva de Nerja. Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, 3, Patronato de la Cueva de Nerja, Málaga, 267-292.
- de los Ríos, A., Valea, S., Ascaso, C., Davila, A. F., Kastovsky, J., McKay, C. P., Gomez-Silva, B., y Wierzchos, J. 2010. Comparative analysis of the microbial communities inhabiting halite evaporites of the Atacama Desert. *International Microbiology*, 2, 79-89.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. y Stanier, R.Y. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.
- Rogério-Candelera, M.A., Laiz, L., González, J.M. y Sáiz-Jiménez, C. 2008. Monitorización del crecimiento microbiano en una tumba romana mediante técnicas de teledetección. En: García, M., Montero, I. y Rovira, S. (Eds.). *Actas del VII Congreso Ibérico de Arqueometría*, 593-600.
- Roldán, M., Clavero, E., Canals, T., Gómez-Bolea, A., Ariño, X. y Hernández-Mariné, M. 2004a. Distribuiton of phototrophic biofilms in cavities (Garraf, Spain). *Nova Hedwigia*, 78, 329-351.
- Roldán, M., Clavero, E., Castel, S. y Hernández-Mariné, M. 2004b. Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. *Algological Studies*, 111, 127-133.
- Roldán, M., Thomas, F., Castel, S., Quesada, A., Hernández-Mariné, M. 2004c. Noninvasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3745-50.
- Roldán, M., Oliva, F., Gónzalez del Valle, M.A., Sáiz-Jiménez, C. y Hernández-Mariné, M. 2006. Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3026-3031.

- Roldán, M. y Hernández-Mariné, M. 2007. *Characterisation of photosynthetic biofilms via 3D imaging and subcellular identification of pigments* (Poster). Focus on microscopy 2007, Valencia, Spain, April 10-13, 2007.
- Roldán, M. y Hernández-Mariné, M. 2009. Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *International Journal of Speleology*, 38(1), 41-53.
- Roldán, M., Ramírez, M., del Campo, J., Hernández-Mariné, M. y Komárek, J. 2012. *Chalicogloea cavernicola* gen. nov. sp. nov. (Chroococcales, Cyanobacteria) from low light aerophytic environments: Combined molecular, phenotypic and ecological criteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2326-2333.
- Roldán, M., Ascaso, M. y Wierchos, J. 2014. Fluorescent Fingerprints of Endolithic Phototrophic Cyanobacteria Living within Halite Rocks in the Atacama Desert. <http://aem.asm.org/> Acceso 21/09/2015.
- Romero, P., Borrego, J.J., de Vicente, A., Moriñigo, M.A., Martínez-Manzanares, E., Arrabal, F., Florido, J.A., Avilés, M., Cornax, R., Codina, J.C. y Arcos, M.L. 1991. Estudio microbiológico y químico de las aguas de la cueva de Nerja. *Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, 2, 45-109.
- del Rosal, Y. 2005. *Análisis de la calidad microbiológica de la Cueva de Nerja (aire y agua) y sus implicaciones para la salud pública*. Trabajo para la Suficiencia Investigadora, Universidad de Málaga, Inédito. 74 pp
- del Rosal, Y., Martínez-Manzanares, E., Marín, F., Liñán, C. y Simón, M.D. 2007. Análisis de la calidad microbiológica aérea en el interior de la Cueva de Nerja. En: Durán et al. (Eds.). *Cuevas turísticas: aportación al desarrollo sostenible, Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España*. Serie Hidrogeología y aguas subterráneas nº 24, 181-190.
- del Rosal, Y., Lara, M.D., Tinaut, A. y Garrido, A. 2009. La entomofauna de la Cueva de Nerja (Málaga). En: Durán y López Martínez (Eds.). *Cuevas Turísticas, cuevas vivas*. Madrid, ACTE, 91-100.
- del Rosal, Y., Garrido, A., Liñán, C. y Hernández-Mariné, M. 2010a. Los biofilms fotosintéticos de la Cueva de Nerja (Málaga): catalogación, estudio y resultados preliminares. En: Durán, J.J. y

- Carrasco, F. (Eds.). *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*, Madrid. ACTE, 563-574.
- del Rosal, Y., Garrido, A., Montesino, A. y Liñán, C. 2010b. Estudios del radón en la Cueva de Nerja (Málaga). En: Durán, J.J. y Carrasco, F. (Eds.), *Cuevas: Patrimonio, Naturaleza, Cultura y Turismo*, Madrid, ACTE, 183-192.
- del Rosal, Y., Roldán, M., Liñán, C., Garrido, A. y Hernández Mariné, M. 2012. Tecnologías de microscopía: una ventana al conocimiento del biodeterioro. En: Durán, J.J. y Robledo, P.A (Eds.). *Las cuevas turísticas como activos económicos: conservación e innovación*, Madrid, ACTE, 359-372.
- del Rosal, Y., Liñán, C. y Hernández, M. 2014a. The conservation of the Nerja Cave: preserving anthropogenic impact in a tourist cave. En: Sáiz-Jiménez (Ed.) *The conservation of Subterranean Cultural Heritage*, 193-206.
- del Rosal, Y., Roldán, M. y Hernández-Mariné, M. 2014b. Phototrophic microorganisms in the tourist cave of Nerja. En: Rogerio-Candelera, M.A. (Ed.). *Science, Technology and Cultural Heritage. Proceedings of the Second International Congress on Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage*. Sevilla, 229-235.
- del Rosal, Y., Roldán-Molina, M. y Hernández-Mariné, M. 2014c. Biofilms fotosintéticos en la Cueva de Nerja: *Chroococcidiopsis* sp. En: Calaforra, J.M. y Durán, J.J. (Eds.). *Iberoamérica Subterránea. I Congreso Iberoamericano y V Congreso Español de Cuevas Turísticas*, Madrid, ACTE, 463-472
- Round, F.E., Crawford, R.M. y Mann, D.G. 1990. *The Diatoms: Biology and morphology of the genera*, Cambridge: Cambridge University Press, 747 pp.
- Ruíz, J., Marín-Girón, F., Ojeda, F., Marón-Olalla, F., Berros, J. y Marín-Olalla, E. 1992. Estudio Macroscópico "In situ" y microscópico-ecológico de pequeñas zonas de flora verde (algas verdes y verdeazuladas) del interior de la Cueva de Nerja. En: Marín, F. y Carrasco, F. (Eds.). *Investigación Biológica y Edafológica de la Cueva de Nerja (Málaga)*. Trabajos sobre la Cueva de Nerja, 2, 113-125.

- Sáiz-Jiménez, C. 1994. Biodeterioration of stone in historic building and monuments. En: Llewellyn, G.C., Dashek, W.W. y O'Read, C.E. (Eds.). *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plants Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*. Plenum, Nueva York, 587-603.
- Sáiz-Jiménez, C. y Ariño, X. 1995. Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fototrofos. *Materiales de construcción*, 45(240), 5-16.
- Sáiz-Jiménez, C. 1999. Biogeochemistry of weathering processes in monuments. *Geomicrobioly Journal*, 16, 27-37.
- Sáiz-Jiménez, C., Cuezva, S., Jurado, V., Fernández-Cortes, A., Porca, E., Benavente, D., Cañaveras, J.C. y Sánchez-Moral, S. 2011. Paleolithic Art in Peril: Policy and Science Collide at Altamira Cave. *Science*, 334, 42-43.
- Sand, W. y Bock, E. 1991. Biodeterioration of mineral materials by microorganisms-biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobioly Journal*, 9, 129-38.
- Sanchidrián, J.L. 1994. Arte rupestre de la Cueva de Nerja. *Trabajos sobre la Cueva de Nerja*, nº 4, Málaga, 356 pp.
- Sarbu, S.M., Kane, T.C. y Kindle, B.K. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272, 1953-1954.
- Seckt, H. 1938. Contribución al conocimiento de las algas aerófilas en la Argentina. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*, 34(2), 108-141.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. y Smith, A. R. 1978. Color Gamut Transform Pairs. *Computer Graphics*, 12(3), 12-19.

- Schreiner, R.P., Tarara, J.M. y Smithyman, R.P. 2007. Deficit irrigation promotes arbuscular colonization of fine roots by mycorrhizal fungi in grapevines (*Vitis vinifera L.*) in an arid climate. *Mycorrhiza*, 17, 551-562.
- Schüßler, A., Meyer, T., Gehrig, H. y Kluge M. 1997. Variations of lectin binding sites in extracellular glycoconjugates during the life cycle of *Nostoc punctiforme*, a potentially endosymbiotic cyanobacterium. *European Journal of Phycology*, 32, 233-239.
- Silverberg, B. A. 1975. Some structural aspects of the pyrenoid of the ulotrichalean alga *Stichococcus*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 84(4), 550-565.
- Smith, T. y Olson, R. 2007. A taxonomic survey of lamp flora (Algae y Cyanobacteria) in electrically lit passages within Mammoth Cave National Park, Kentucky. *International Journal of Speleology*, 36, 105-114.
- Sociedad de Excursionistas de Málaga, S.E.M. 1985. La Cueva de Nerja. Grupo de Exploraciones Subterráneas de la Sociedad Excursionista de Málaga, Málaga, 87 pp.
- Solecki, R. 1972. *Shanidar: the Humanity of Neanderthal Man*. London: Allen Lane, 222 pp.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, R y Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35, 171-205.
- Tandeau, N. 1977. Occurrence and nature of chromatic adaptation in Cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 82-91.
- Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. y Ramsing, N.B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and DGGE of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1405-1415.
- Thornbush, M.J. y Viles, H.A. 2008. Photographic monitoring of soiling and decay of roadside walls in central Oxford, England. *Environmental Geology*, 56(3-4), 777-787.

- Tiano, P., Acolla, P. y Tomaselli, L. 1995. Phototrophic biodeteriogens in lithoid surfaces: an ecological study. *Microbial Ecology*, 29, 299-309.
- Tinaut, A., Lara, M.D. y Ruíz-Avilés, F. 2002. Entomofauna de la Cueva de Nerja (Málaga). Fundación Cueva de Nerja, Inédito, 128 pp.
- Tomaselli, L., Lamenti, G., Bosco, M. y Tiano, P. 2000. Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 251-258.
- Tuchman, N.C. 1996. The role of heterotrophy in alga. En: Stevenson, R.J., Bothwell, M.L. y Lowe, R.L. (Eds.). *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*, San Diego, Academic Press, 299-316.
- Urzi, C., De Leo, F., Bruno, L. y Albertano, P., 2010. Microbial diversity in Paleolithic caves: a study case on the phototrophic biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microbial Ecology*, 60, 116-129.
- Vadillo, I., Liñán, C., Carrasco, F. y Andreo, B. 2001. Control of environmental parameters for management and conservation of Nerja Cave (Malaga, Spain). *Kras*, 49, 48-49.
- Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*, VII, 7, 181.
- Vinogradova, O.N., Kovalenko, O.V., Wasser, S.P., Nevo, E. y Weinstein-Evron, M. 1998. Species diversity gradient to darkness stress in blue-green algae/cyanobacteria: a microscale test in a prehistoric cave, Mount Carmel, Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*, 46, 229-238.
- Vischer, W. 1960. Reproduktion und systematische Stellung einiger Rinden-und Bodenalgae. *Schweiz. Zeitschr. Hydrol.* 22, 330-349.
- Walker, J.J. y Pace, N.R. 2007. Endolithic microbial ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 61, 331-347.
- Warscheid, T.H. y Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 46, 343-368.

- Weber, C.F. 2009. Introducing mothur: Open Source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537-7541.
- Welton, R.G., Silva, M.R., Gaylarde, C., Herrera, L.K., Anleo, X., De Beile, N y Modrý, S. 2005. Techniques applied to the study of microbial impact on building materials. *Materials and structures*, 38(284), 883-893.
- Wierzchos, J., Ascaso, C., McKay, C.P. 2006. Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 6, 415-422.
- White, W. B. 1984. *Geomorphology and Hydrology of Karst Terrains*. Nueva York: Oxford University Press, 464 pp.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C. y Wiebe, W.J. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy Science*, 95, 6578–6583.
- Whitton. B.A. 2012. *Ecology of Cyanobacteria II: their diversity in space and time*. Springer, London, 760 pp.
- Winkler, E. M. 1985. A durability index for stone. *Actes 5th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, 151–56. Lausanne, 25–27 sept .1985.
- Wittrock, V.B. y Nordstedt, C.F.O. 1880. *Algae aquae dulcis exsiccatae*, Lund, 7, 301-350.
- Worboys, G., Davey, A. y Stiff, C. 1982. Report on cave classification. *Cave Management in Australia*, 4, 11-18.
- Zammit, G., Billi, D., Shubert, E., Kaštovský, J. y Albertano, P. 2011. The biodiversity of subaerobic phototrophic biofilms from Maltese hypogea. *Fottea*, 11, 187-201.

ANEXO 1

Inventario de zonas colonizadas por biofilms fotosintéticos: imágenes y planimetría



INVENTARIO 1. SALA DEL VESTIBULO

Ves-1



Ves-2



Ves-3



Vest-4



INVENTARIO 2. SALA DEL BELÉN

Bel-1



Bel-2



Bel-3



Bel-4



Bel-5



Bel-6



Bel-7



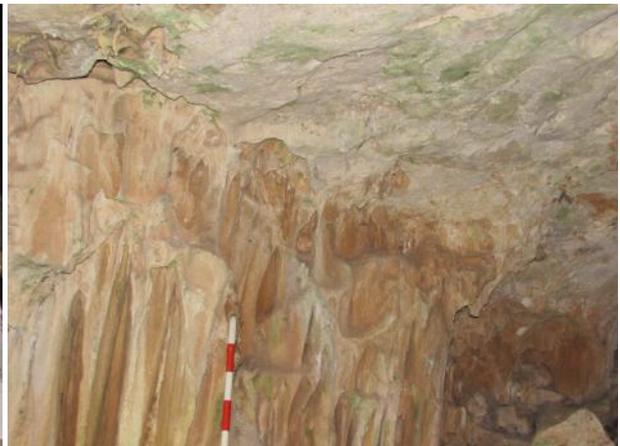
Bel-8 (Ne.11)



Bel-9 (Ne.10)



Bel-10



Bel-11



Bel-12



Bel-13



Bel-14



Bel-15



Bel-16



Bel-17



Bel-18



INVENTARIO 3. SALA DE LA CASCADA

Cas-1



Cas-2



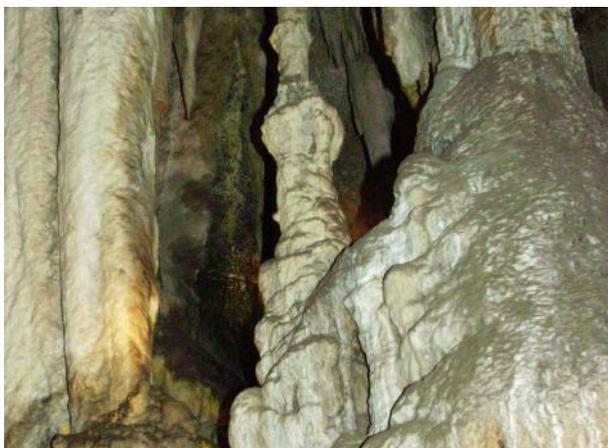
Cas-3



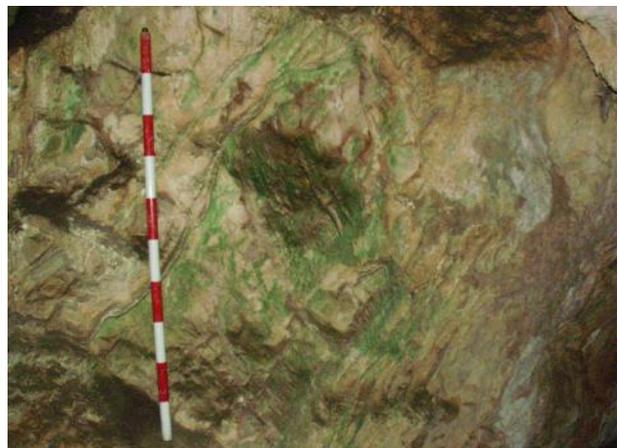
Cas-4



Cas-5



Cas-6



Cas-7



Cas-8 (Ne. 9)



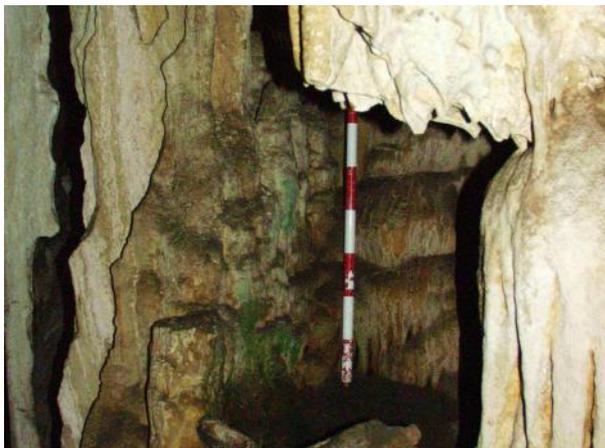
Cas-9



Cas-10



Cas-11



Cas-12



Cas-13



Cas-14



Cas-15



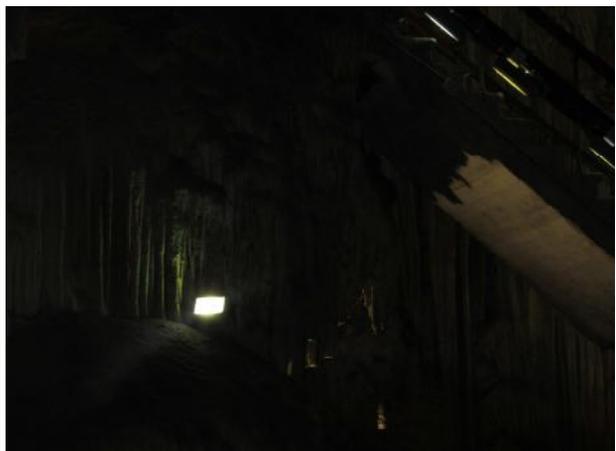
Cas-16



Cas-17



Cas-18



INVENTARIO 4. SALA DE LOS FANTASMAS

Fan-1



Fan-2



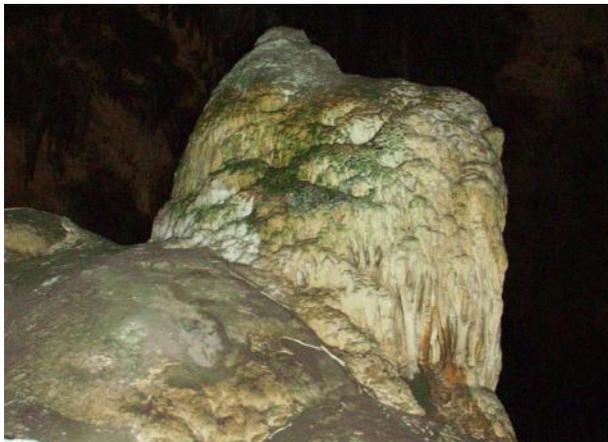
Fan-3



Fan-4



Fan-5



Fan-6 (varias zonas)



Fan-7 (Ne. 8)



Fan-8



Fan-9



Fan-10



INVENTARIO 5. SALA DEL CATACLISMO

Cat-1



Cat-2 (Ne.12)



Cat-3



Cat-4



Cat-5



Cat-6



Cat-7



Cat-8



Cat-9



Cat-10



Cat-11



Cat-12



Cat-13



Cat-14



Cat-15



Cat-16



Cat-17



Cat-18



Cat-19



Cat-20



Cat-21



Cat-22



Cat-23



Cat-24



Cat-25



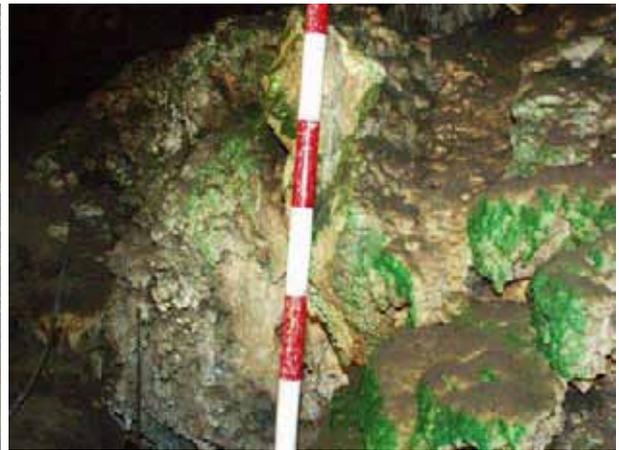
Cat-26



Cat-27



Cat-28



Cat-29



Cat-30



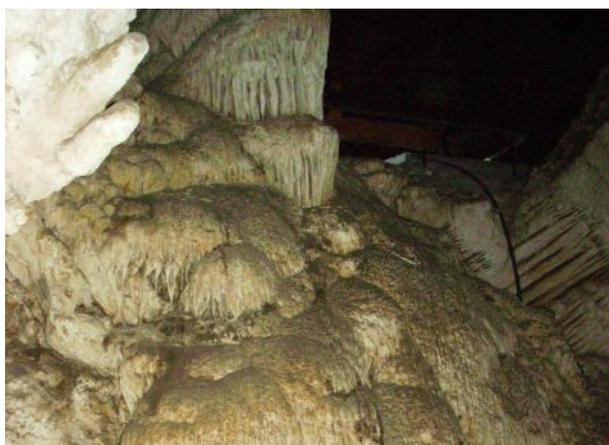
Cat-31



Cat-32



Cat-33



Cat-34



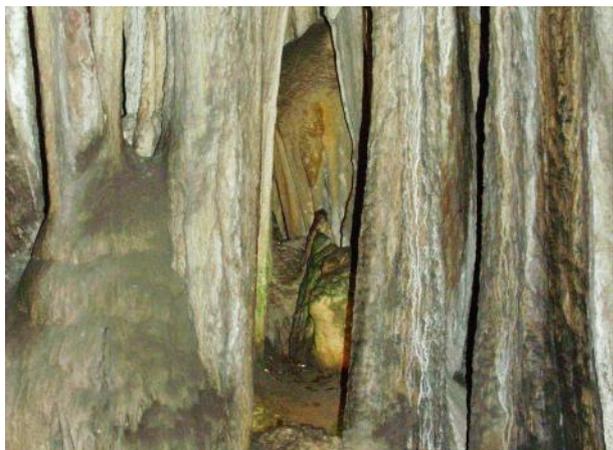
Cat-35



Cat-36



Cat-37



Cat-38



Cat-39



Cat-40 (Ne.7)



Cat-41



Cat-42



Cat-43



Cat-44



Cat-45



Cat-46



Cat-47



Cat-48



Cat-49



Cat-50 (Ne.3)



Cat-51



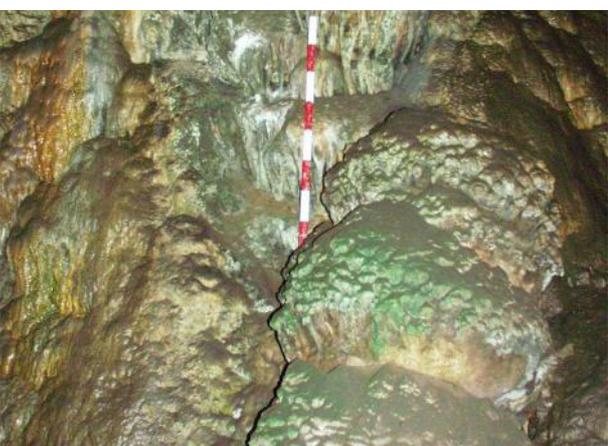
Cat-52



Cat-53



Cat-54



Cat-55



Cat-56



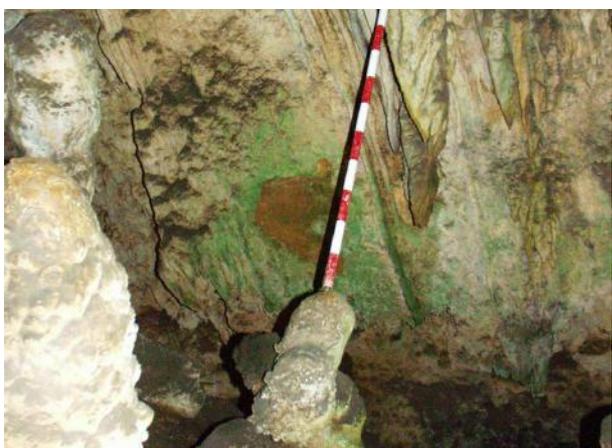
Cat-57 (Ne.1 y Ne.2)



Cat-58



Cat-59



Cat-60



Cat-61



Cat-62



Cat-63



SALA DE LA TORCA

Tor-1



Tor-2 (Ne.4)

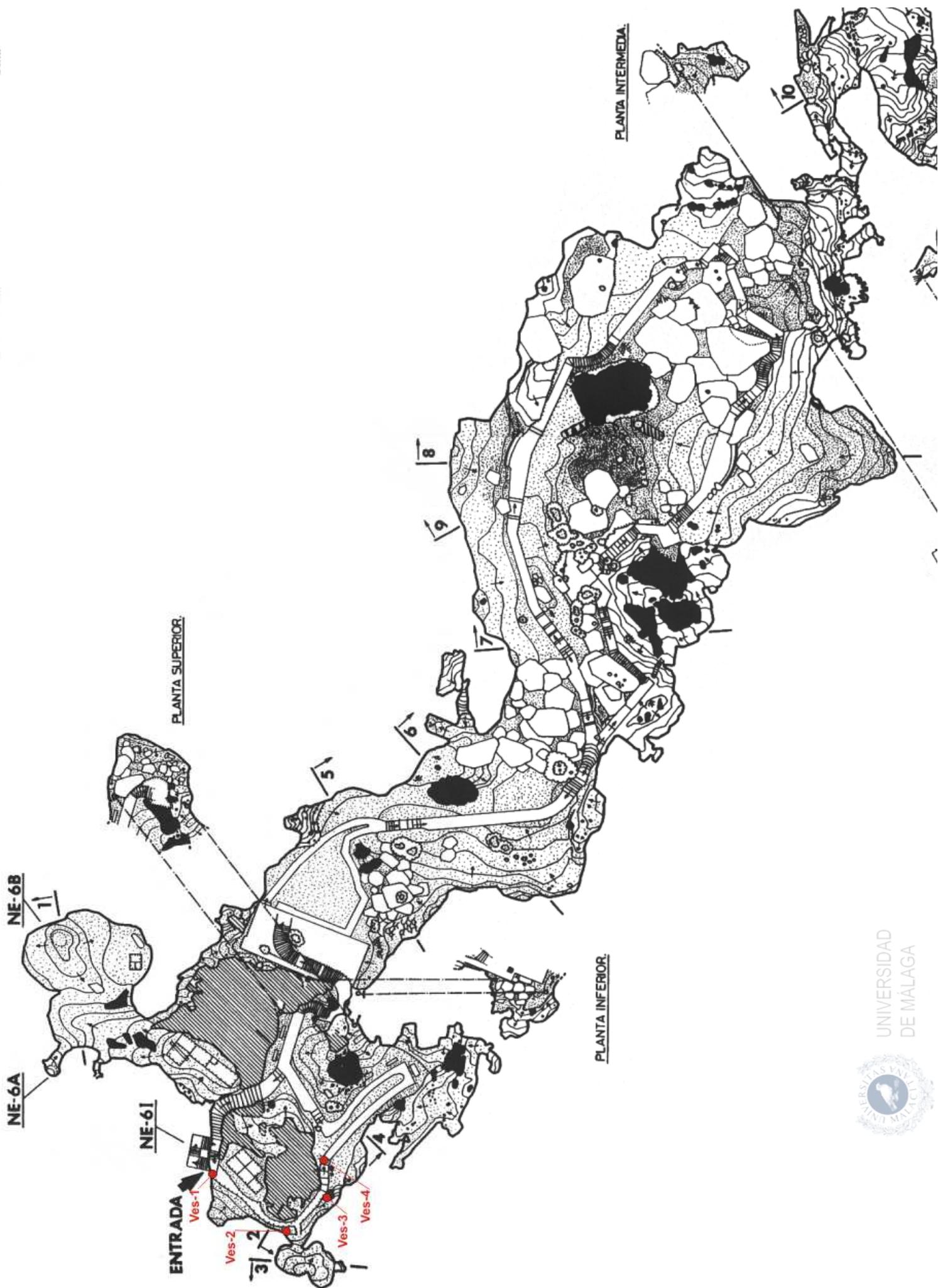


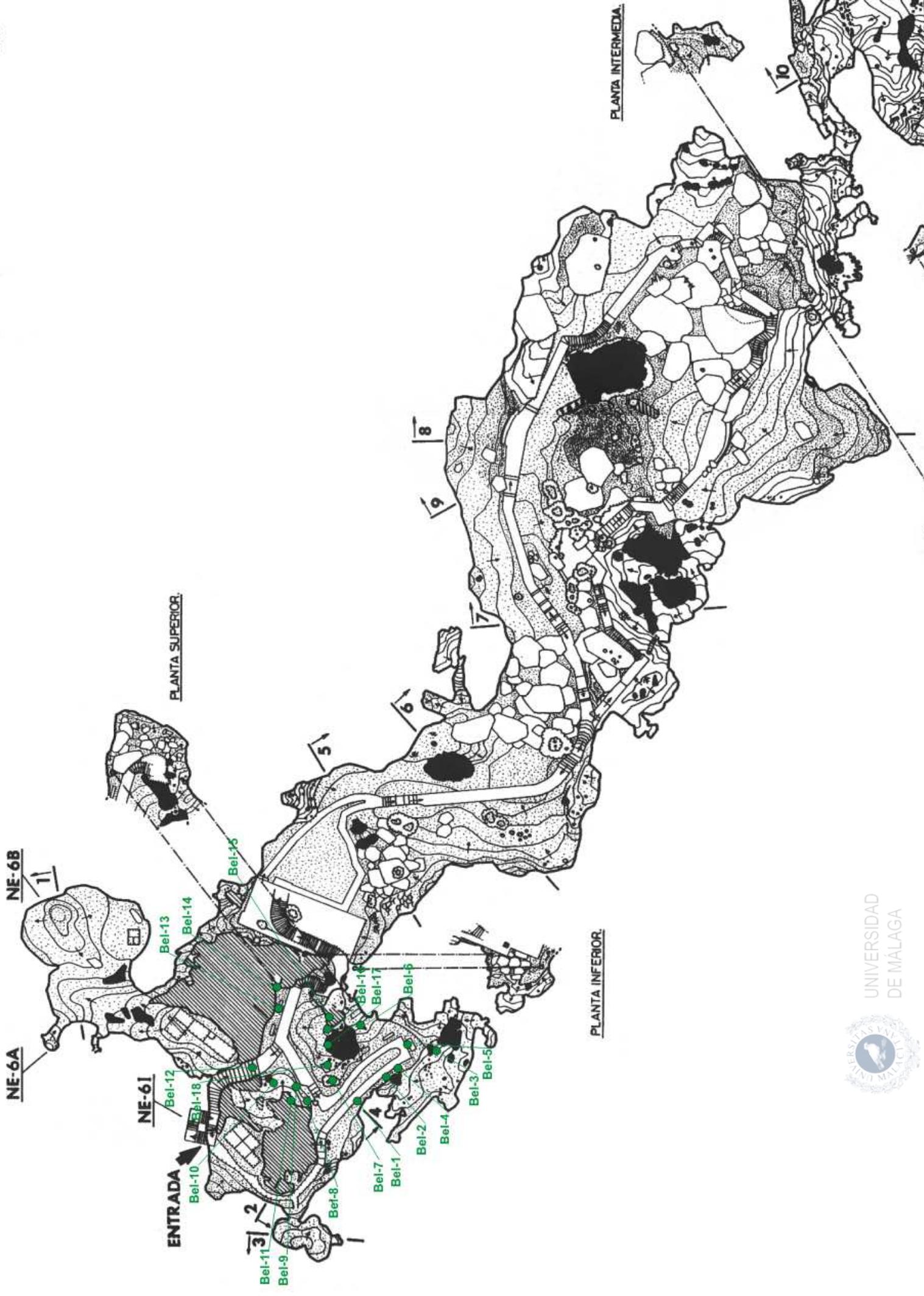
Tor-3 (Ne.4)



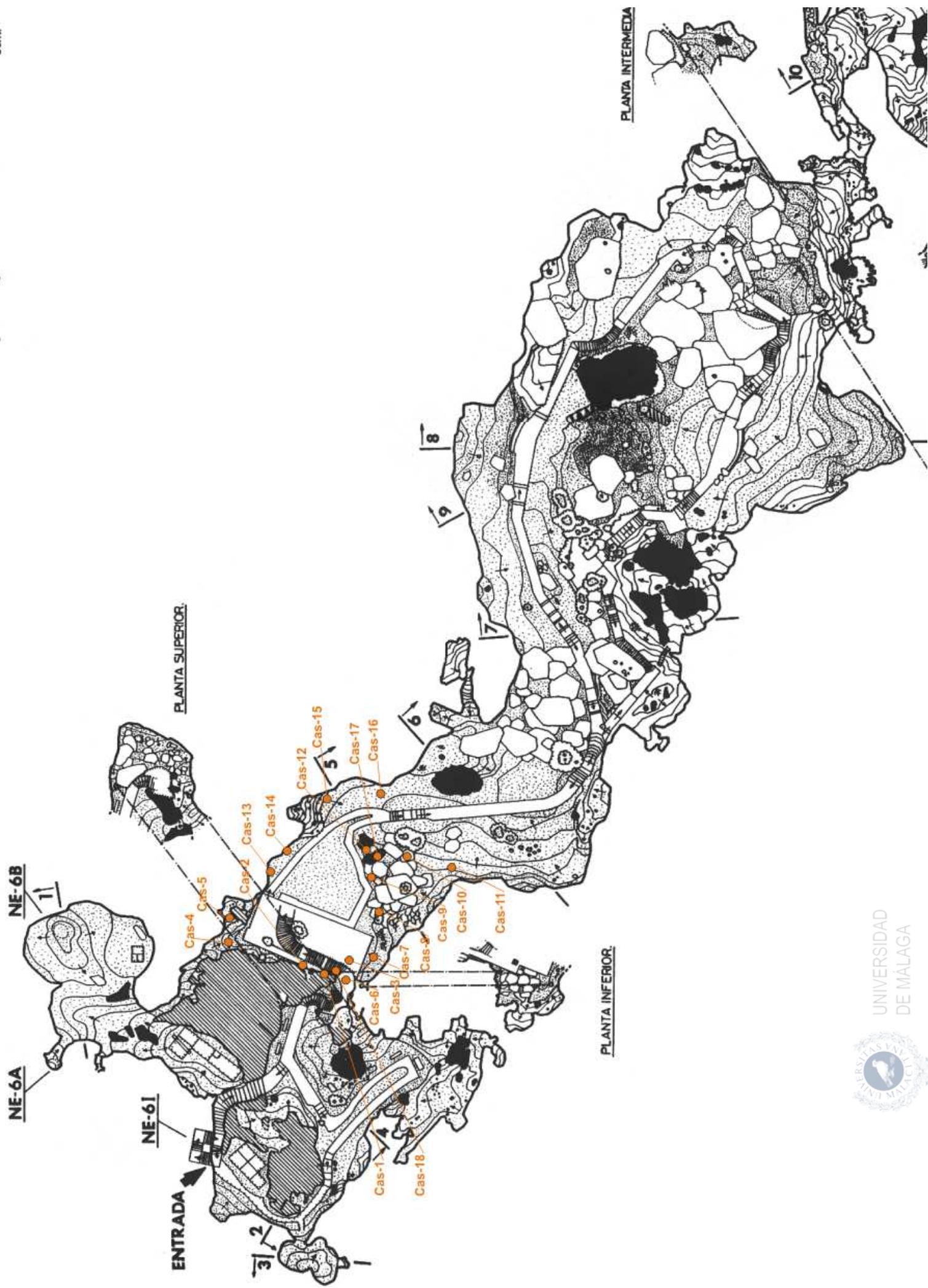
Tor-4 (Ne.4)

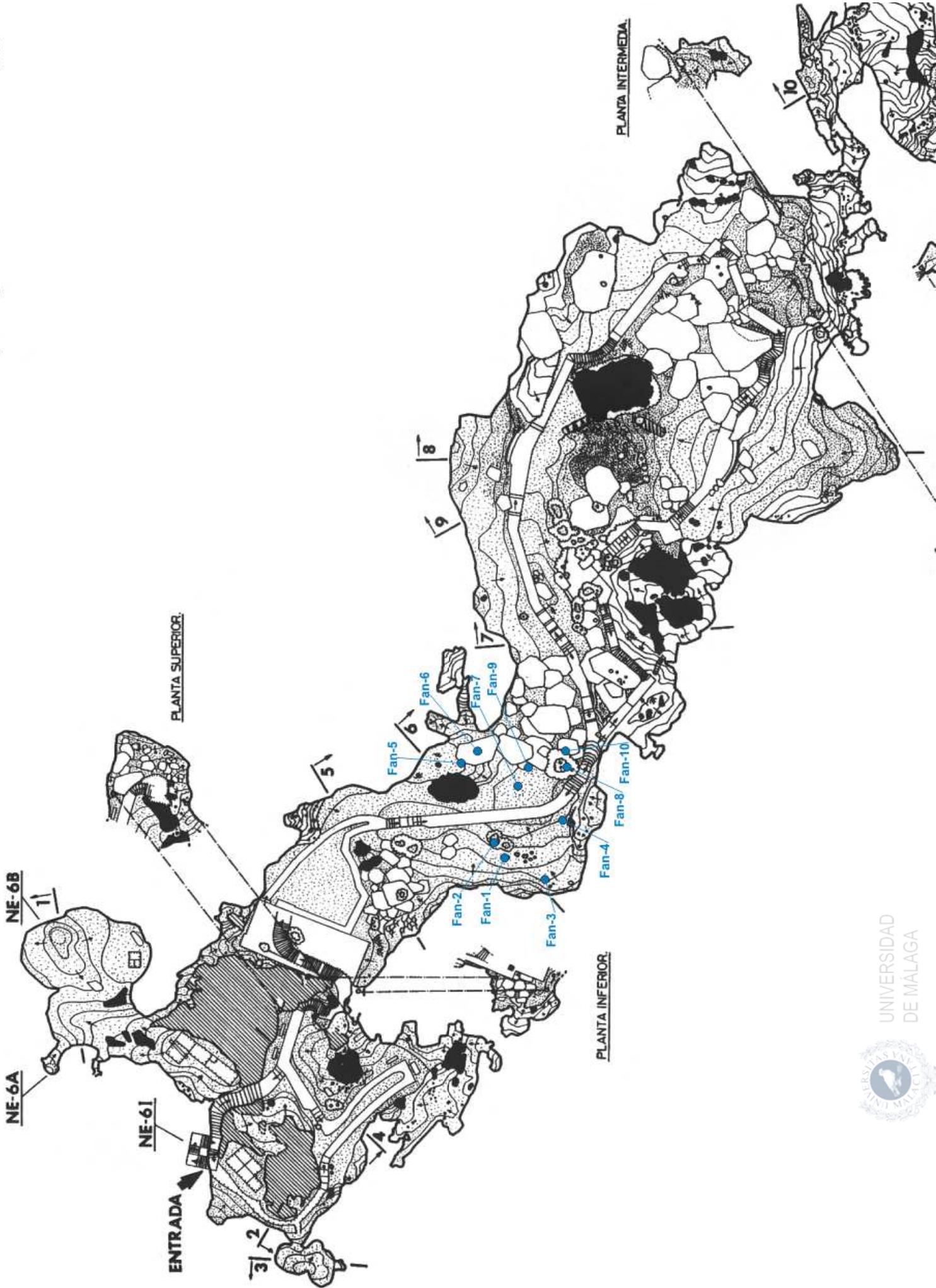


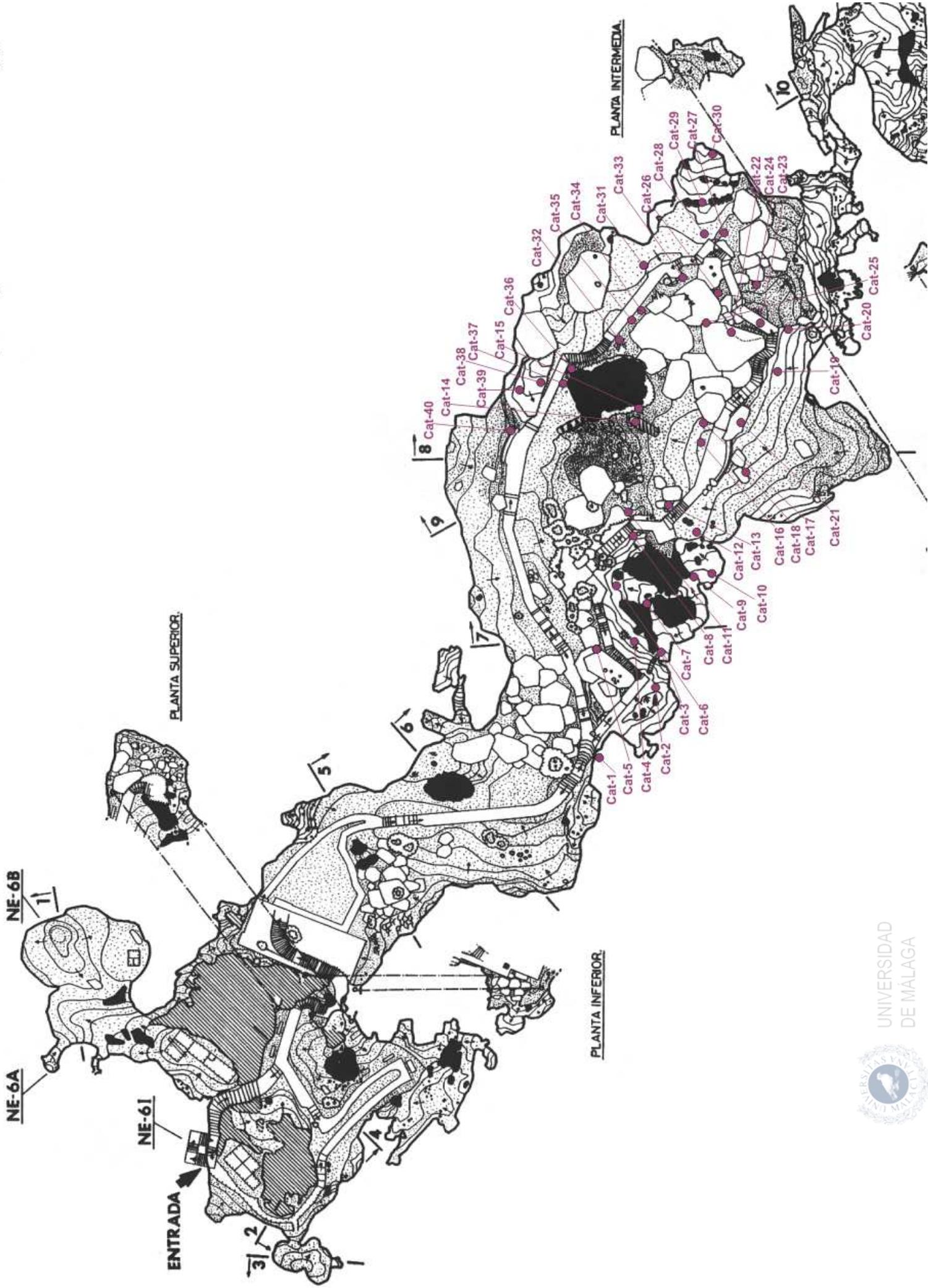




UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA







PLANTA SUPERIOR

PLANTA INTERMEDIA

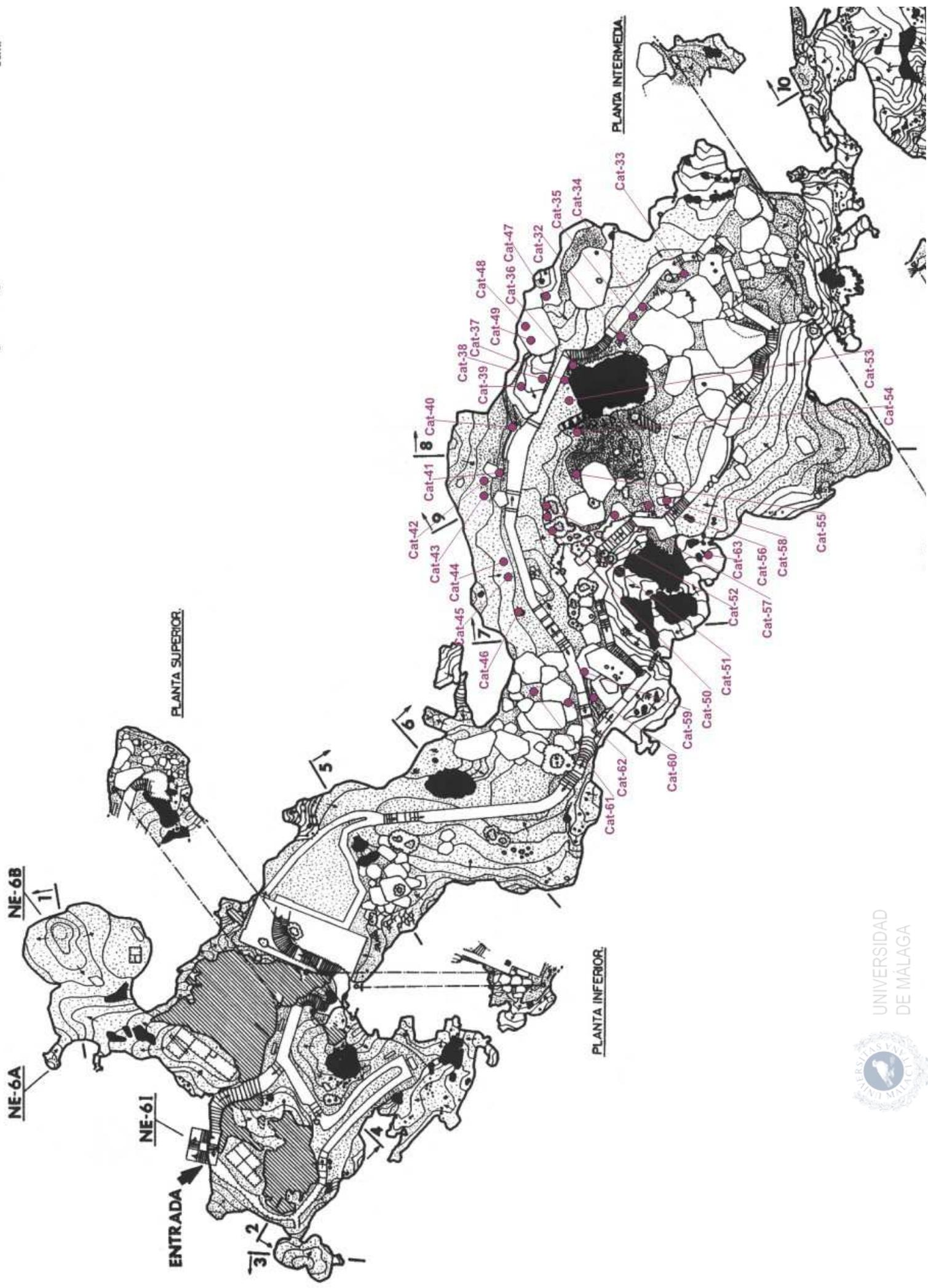
PLANTA INFERIOR

NE-6B

NE-6A

NE-6I

ENTRADA



NE-6A

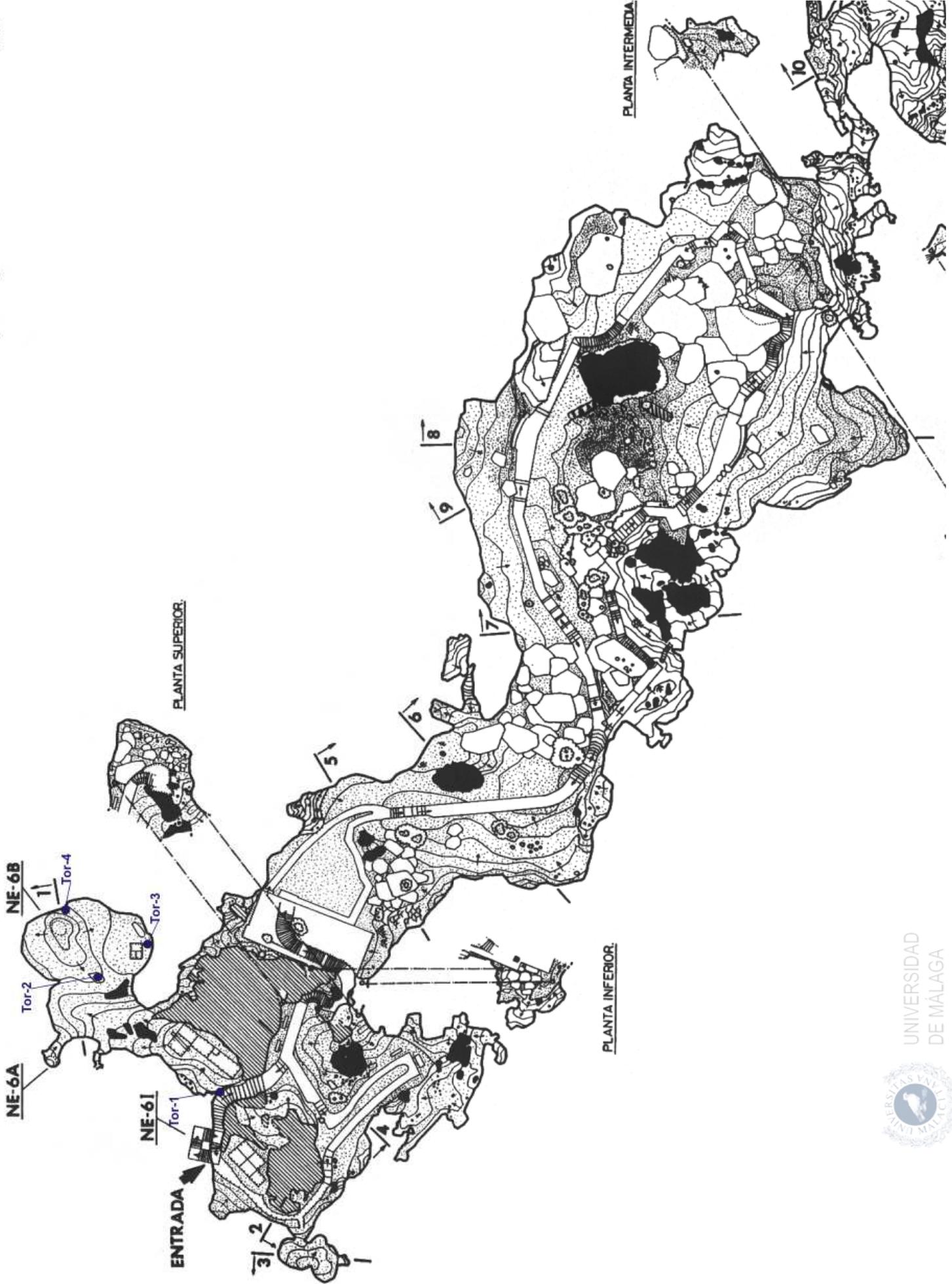
NE-6B

ENTRADA

PLANTA SUPERIOR

PLANTA INFERIOR

PLANTA INTERMEDIA



ANEXO 2

Coeficientes estadística

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.1.1	(Constante)	,550	,083		6,640	,000					
	RH.z.0	,973	,182	1,254	5,354	,000	,668	,682	,543	,188	5,324
	T.z.0	-,020	,166	-,027	-,120	,905	,537	-,021	-,012	,202	4,948
	CO2.z.0	-,580	,132	-,726	-4,409	,000	,224	-,609	-,447	,380	2,634
Ne.1.1	(Constante)	,392	,096		4,066	,000					
	RH.z.1	,978	,212	1,296	4,620	,000	,702	,664	,536	,171	5,840
	T.z.1	-,205	,220	-,273	-,931	,360	,544	-,176	-,108	,156	6,410
	CO2.z.1	-,369	,139	-,475	-2,650	,013	,261	-,454	-,308	,419	2,885
Ne.1.1	(Constante)	,432	,092		4,692	,000					
	RH.z.2	,845	,185	1,139	4,569	,000	,743	,628	,482	,180	5,571
	T.z.2	-,067	,188	-,089	-,356	,724	,619	-,063	-,038	,178	5,608
	CO2.z.2	-,319	,121	-,427	-2,642	,013	,346	-,423	-,279	,426	2,347
Ne.1.1	(Constante)	,428	,088		4,878	,000					
	RH.z.3	,732	,167	1,009	4,393	,000	,770	,607	,448	,198	5,061
	T.z.3	,008	,178	,010	,044	,965	,652	,008	,004	,181	5,510
	CO2.z.3	-,267	,114	-,355	-2,355	,025	,358	-,379	-,240	,458	2,185
Ne.1.1	(Constante)	,354	,080		4,406	,000					
	RH.z.4	,935	,170	1,162	5,496	,000	,796	,686	,497	,183	5,457
	T.z.4	-,113	,174	-,147	-,653	,518	,652	-,111	-,059	,161	6,194
	CO2.z.4	-,291	,105	-,355	-2,776	,009	,303	-,430	-,251	,500	2,001
Ne.1.1	(Constante)	,336	,077		4,346	,000					
	RH.z.5	,951	,171	1,181	5,551	,000	,799	,684	,497	,177	5,646
	T.z.5	-,127	,180	-,162	-,704	,486	,655	-,118	-,063	,151	6,631
	CO2.z.5	-,290	,113	-,343	-2,570	,015	,346	-,398	-,230	,451	2,218
Ne.1.1	(Constante)	,358	,076		4,689	,000					
	RH.z.6	,901	,173	1,135	5,208	,000	,788	,655	,481	,179	5,572
	T.z.6	-,108	,173	-,140	-,624	,537	,657	-,103	-,058	,170	5,897
	CO2.z.6	-,278	,108	-,332	-2,573	,014	,329	-,394	-,238	,514	1,947

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.1.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,813	,660	,629	,4735391	,660	21,368	3	33	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,798	,636	,596	,4802821	,636	15,751	3	27	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,802	,643	,610	,4863671	,643	19,240	3	32	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,810	,656	,625	,4780445	,656	20,988	3	33	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,849	,721	,697	,4334489	,721	29,355	3	34	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,848	,719	,695	,4377169	,719	29,886	3	35	,000	
Ne.1.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,832	,693	,667	,4544031	,693	27,074	3	36	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.1.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.1.2	(Constante)	,497	,083		5,978	,000					
	RH.z.0	,636	,182	1,052	3,494	,001	,514	,520	,456	,188	5,324
	T.z.0	-,022	,166	-,039	-,133	,895	,403	-,023	-,017	,202	4,948
	CO2.z.0	-,406	,132	-,651	-3,075	,004	,134	-,472	-,401	,380	2,634
Ne.1.2	(Constante)	,442	,096		4,599	,000					
	RH.z.1	,543	,211	,935	2,573	,016	,519	,444	,387	,171	5,840
	T.z.1	-,038	,220	-,066	-,173	,864	,413	-,033	-,026	,156	6,410
	CO2.z.1	-,293	,139	-,490	-2,109	,044	,141	-,376	-,317	,419	2,385
Ne.1.2	(Constante)	,457	,093		4,892	,000					
	RH.z.2	,387	,188	,687	2,061	,048	,542	,342	,291	,180	5,571
	T.z.2	,094	,191	,164	,492	,626	,489	,087	,069	,178	5,608
	CO2.z.2	-,225	,122	-,397	-1,835	,076	,231	-,308	-,259	,426	2,347
Ne.1.2	(Constante)	,483	,090		5,351	,000					
	RH.z.3	,303	,171	,535	1,770	,086	,578	,294	,238	,198	5,061
	T.z.3	,201	,183	,346	1,097	,281	,546	,188	,147	,181	5,510
	CO2.z.3	-,224	,117	-,381	-1,917	,064	,245	-,317	-,258	,458	2,185
Ne.1.2	(Constante)	,432	,089		4,841	,000					
	RH.z.4	,345	,189	,561	1,826	,077	,599	,299	,240	,183	5,457
	T.z.4	,161	,193	,274	,837	,409	,555	,142	,110	,161	6,194
	CO2.z.4	-,201	,117	-,321	-1,722	,094	,241	-,283	-,227	,500	2,001
Ne.1.2	(Constante)	,424	,083		5,107	,000					
	RH.z.5	,342	,184	,556	1,854	,072	,607	,299	,234	,177	5,646
	T.z.5	,213	,193	,359	1,104	,277	,566	,183	,139	,151	6,631
	CO2.z.5	-,259	,121	-,401	-2,134	,040	,246	-,339	-,269	,451	2,218
Ne.1.2	(Constante)	,398	,082		4,867	,000					
	RH.z.6	,324	,185	,538	1,748	,089	,597	,280	,228	,179	5,572
	T.z.6	,139	,185	,239	,754	,456	,563	,125	,098	,170	5,897
	CO2.z.6	-,149	,116	-,235	-1,289	,205	,289	-,210	-,168	,514	1,947

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.1.2.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,662	,438	,387	,4748150	,438	8,567	3	33	,000
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,624	,389	,321	,4788533	,389	5,737	3	27	,004
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,601	,361	,301	,4937192	,361	6,035	3	32	,002
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,636	,404	,350	,4914723	,404	7,470	3	33	,001
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,641	,411	,359	,4816511	,411	7,903	3	34	,000
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,665	,442	,394	,4707879	,442	9,248	3	35	,000
Ne.1.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,623	,388	,337	,4863661	,388	7,609	3	36	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.1.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.2.1	(Constante)	-.495	,081		-6,114	,000					
	RH.z.0	-.402	,174	-.566	-2,310	,028	,510	-.389	-.248	,193	5,192
	T.z.0	,348	,159	,507	2,192	,036	,610	,372	,236	,216	4,631
	CO2.z.0	,623	,127	,827	4,900	,000	,765	,667	,527	,407	2,460
Ne.2.1	(Constante)	-.372	,107		-3,463	,002					
	RH.z.1	-.445	,232	-.595	-1,922	,067	,484	-.372	-.253	,181	5,522
	T.z.1	,549	,241	,725	2,276	,033	,625	,429	,300	,171	5,845
	CO2.z.1	,494	,156	,609	3,169	,004	,714	,551	,418	,471	2,122
Ne.2.1	(Constante)	-.432	,100		-4,322	,000					
	RH.z.2	-.305	,205	-.460	-1,493	,147	,514	-.272	-.191	,172	5,814
	T.z.2	,415	,209	,600	1,985	,057	,610	,351	,253	,178	5,608
	CO2.z.2	,419	,132	,598	3,173	,004	,692	,514	,405	,459	2,177
Ne.2.1	(Constante)	-.425	,100		-4,246	,000					
	RH.z.3	-.294	,194	-.453	-1,518	,140	,490	-.271	-.195	,185	5,396
	T.z.3	,436	,207	,641	2,107	,044	,608	,364	,271	,178	5,603
	CO2.z.3	,370	,129	,530	2,868	,008	,668	,470	,368	,484	2,067
Ne.2.1	(Constante)	-.427	,097		-4,427	,000					
	RH.z.4	-.310	,206	-.437	-1,506	,143	,467	-.265	-.184	,177	5,654
	T.z.4	,391	,212	,563	1,843	,075	,585	,319	,225	,160	6,254
	CO2.z.4	,443	,125	,603	3,544	,001	,708	,543	,433	,516	1,940
Ne.2.1	(Constante)	-.412	,089		-4,624	,000					
	RH.z.5	-.321	,200	-.459	-1,603	,119	,444	-.277	-.189	,170	5,883
	T.z.5	,319	,212	,463	1,503	,143	,561	,261	,178	,147	6,791
	CO2.z.5	,517	,129	,702	4,017	,000	,728	,585	,475	,457	2,189
Ne.2.1	(Constante)	-.414	,086		-4,834	,000					
	RH.z.6	-.332	,193	-.484	-1,721	,095	,420	-.291	-.203	,175	5,713
	T.z.6	,317	,201	,465	1,578	,124	,532	,269	,186	,160	6,255
	CO2.z.6	,532	,125	,714	4,252	,000	,717	,601	,501	,491	2,035

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.2.1.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,808	,653	,618	,4446390	,653	18,794	3	30	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,775	,600	,548	,5121925	,600	11,504	3	23	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,738	,544	,495	,5100453	,544	11,121	3	28	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,722	,521	,472	,5238844	,521	10,532	3	29	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,743	,552	,507	,5012192	,552	12,332	3	30	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,753	,567	,525	,4855360	,567	13,535	3	31	,000
Ne.2.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,746	,556	,515	,4863944	,556	13,369	3	32	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.2.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.2.2	(Constante)	-,107	,103		-1,038	,308					
	RH.z.0	,259	,222	,313	1,169	,251	,737	,209	,137	,193	5,192
	T.z.0	,253	,202	,315	1,248	,222	,730	,222	,146	,216	4,631
	CO2.z.0	,169	,162	,192	1,045	,305	,659	,187	,123	,407	2,460
Ne.2.2	(Constante)	,004	,125		,035	,972					
	RH.z.1	,078	,269	,093	,291	,773	,701	,061	,040	,181	5,522
	T.z.1	,507	,280	,597	1,813	,083	,752	,354	,247	,171	5,845
	CO2.z.1	,090	,181	,099	,500	,622	,593	,104	,068	,471	2,122
Ne.2.2	(Constante)	-,094	,115		-,814	,423					
	RH.z.2	,243	,236	,313	1,026	,314	,718	,190	,130	,172	5,814
	T.z.2	,354	,242	,439	1,466	,154	,730	,267	,185	,178	5,608
	CO2.z.2	,011	,152	,013	,070	,945	,551	,013	,009	,459	2,177
Ne.2.2	(Constante)	-,056	,115		-,485	,631					
	RH.z.3	,124	,223	,158	,556	,582	,703	,103	,068	,185	5,396
	T.z.3	,514	,238	,625	2,161	,039	,749	,372	,264	,178	5,603
	CO2.z.3	-,021	,148	-,025	-,144	,887	,526	-,027	-,018	,484	2,067
Ne.2.2	(Constante)	-,091	,117		-,774	,445					
	RH.z.4	-,027	,250	-,032	-,110	,913	,666	-,020	-,013	,177	5,654
	T.z.4	,608	,257	,725	2,366	,025	,740	,397	,290	,160	6,254
	CO2.z.4	,055	,151	,063	,366	,717	,545	,067	,045	,516	1,940
Ne.2.2	(Constante)	-,088	,111		-,792	,434					
	RH.z.5	-,114	,249	-,136	-,459	,650	,640	-,082	-,056	,170	5,883
	T.z.5	,613	,264	,738	2,322	,027	,725	,385	,283	,147	6,791
	CO2.z.5	,133	,160	,150	,832	,412	,600	,148	,102	,457	2,189
Ne.2.2	(Constante)	-,060	,112		-,541	,592					
	RH.z.6	-,017	,251	-,020	-,069	,945	,653	-,012	-,008	,175	5,713
	T.z.6	,601	,261	,703	2,301	,028	,722	,377	,281	,160	6,255
	CO2.z.6	,049	,163	,052	,299	,767	,537	,053	,037	,491	2,035

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.2.2.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,766	,587	,546	,5664476	,587	14,219	3	30	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,757	,573	,518	,5940290	,573	10,305	3	23	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,743	,552	,504	,5893024	,552	11,520	3	28	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,753	,566	,522	,6027203	,566	12,626	3	29	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,741	,549	,504	,6069290	,549	12,183	3	30	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,734	,539	,494	,6041854	,539	12,064	3	31	,000
Ne.2.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,723	,522	,478	,6328644	,522	11,664	3	32	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.2.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.3.1	(Constante)	,132	,088		1,504	,142					
	RH.z.0	,590	,192	,587	3,077	,004	,863	,472	,254	,188	5,324
	T.z.0	,367	,175	,385	2,093	,044	,842	,342	,173	,202	4,948
	CO2.z.0	-,087	,139	-,084	-,625	,536	,660	-,108	-,052	,380	2,634
Ne.3.1	(Constante)	,150	,095		1,574	,128					
	RH.z.1	,518	,209	,504	2,477	,020	,883	,437	,211	,174	5,731
	T.z.1	,459	,218	,453	2,107	,045	,876	,382	,179	,156	6,403
	CO2.z.1	-,048	,139	-,045	-,345	,733	,658	-,068	-,029	,427	2,343
Ne.3.1	(Constante)	,110	,094		1,170	,251					
	RH.z.2	,490	,189	,473	2,597	,014	,877	,423	,202	,182	5,490
	T.z.2	,512	,192	,489	2,662	,012	,879	,431	,207	,179	5,599
	CO2.z.2	-,050	,124	-,048	-,406	,688	,658	-,073	-,032	,433	2,310
Ne.3.1	(Constante)	,090	,089		1,015	,318					
	RH.z.3	,471	,168	,459	2,800	,009	,885	,444	,205	,199	5,015
	T.z.3	,491	,180	,470	2,727	,010	,886	,434	,200	,180	5,541
	CO2.z.3	,010	,116	,009	,085	,933	,669	,015	,006	,462	2,166
Ne.3.1	(Constante)	,024	,086		,279	,782					
	RH.z.4	,603	,184	,541	3,283	,002	,898	,496	,232	,184	5,437
	T.z.4	,380	,188	,357	2,025	,051	,883	,332	,143	,160	6,238
	CO2.z.4	,060	,114	,053	,532	,599	,655	,092	,038	,503	1,987
Ne.3.1	(Constante)	,054	,089		,610	,546					
	RH.z.5	,518	,199	,473	2,605	,014	,874	,408	,199	,177	5,642
	T.z.5	,410	,209	,389	1,965	,058	,871	,319	,150	,149	6,694
	CO2.z.5	,083	,131	,072	,631	,532	,680	,108	,048	,454	2,204
Ne.3.1	(Constante)	,061	,092		,666	,510					
	RH.z.6	,560	,209	,517	2,683	,011	,860	,413	,220	,180	5,546
	T.z.6	,358	,210	,342	1,699	,098	,845	,276	,139	,165	6,051
	CO2.z.6	,060	,135	,051	,441	,662	,632	,074	,036	,509	1,966

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.3.1.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,880	,775	,754	,5001807	,775	37,820	3	33	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,901	,812	,791	,4714436	,812	37,490	3	26	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,902	,813	,795	,4942354	,813	44,927	3	31	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,910	,829	,812	,4807369	,829	51,545	3	32	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,914	,835	,820	,4651047	,835	55,830	3	33	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,895	,801	,784	,5037109	,801	45,653	3	34	,000
Ne.3.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,875	,766	,746	,5452546	,766	38,115	3	35	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.3.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.3.2	(Constante)	,300	,086		3,496	,001					
	RH.z.0	,730	,188	,725	3,875	,000	,862	,559	,314	,188	5,324
	T.z.0	,350	,172	,367	2,035	,050	,826	,334	,165	,202	4,948
	CO2.z.0	-,253	,136	-,244	-1,854	,073	,594	-,307	-,150	,380	2,634
Ne.3.2	(Constante)	,272	,103		2,645	,014					
	RH.z.1	,630	,226	,613	2,784	,010	,871	,479	,256	,174	5,731
	T.z.1	,368	,236	,364	1,561	,131	,844	,293	,144	,156	6,403
	CO2.z.1	-,108	,151	-,101	-,713	,482	,614	-,139	-,066	,427	2,343
Ne.3.2	(Constante)	,270	,094		2,872	,007					
	RH.z.2	,566	,189	,565	2,999	,005	,871	,474	,241	,182	5,490
	T.z.2	,472	,192	,467	2,454	,020	,860	,403	,197	,179	5,599
	CO2.z.2	-,157	,124	-,155	-1,270	,214	,601	-,222	-,102	,433	2,310
Ne.3.2	(Constante)	,252	,090		2,796	,009					
	RH.z.3	,502	,171	,507	2,931	,006	,875	,460	,226	,199	5,015
	T.z.3	,489	,183	,485	2,669	,012	,870	,427	,206	,180	5,541
	CO2.z.3	-,097	,118	-,094	-,826	,415	,610	-,145	-,064	,462	2,166
Ne.3.2	(Constante)	,192	,085		2,240	,032					
	RH.z.4	,714	,182	,658	3,932	,000	,901	,565	,282	,184	5,437
	T.z.4	,342	,185	,330	1,842	,075	,865	,305	,132	,160	6,238
	CO2.z.4	-,093	,113	-,084	-,827	,414	,576	-,143	-,059	,503	1,987
Ne.3.2	(Constante)	,192	,084		2,297	,028					
	RH.z.5	,706	,187	,661	3,783	,001	,896	,544	,278	,177	5,642
	T.z.5	,309	,196	,300	1,579	,124	,859	,261	,116	,149	6,694
	CO2.z.5	-,062	,123	-,055	-,504	,618	,616	-,086	-,037	,454	2,204
Ne.3.2	(Constante)	,220	,087		2,541	,016					
	RH.z.6	,732	,197	,683	3,717	,001	,878	,532	,290	,180	5,546
	T.z.6	,301	,198	,291	1,518	,138	,837	,249	,118	,165	6,051
	CO2.z.6	-,119	,127	-,102	-,937	,355	,553	-,156	-,073	,509	1,966

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.3.2.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,885	,783	,763	,4909980	,783	39,700	3	33	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,883	,780	,754	,5101925	,780	30,687	3	26	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,894	,800	,780	,4946435	,800	41,285	3	31	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,899	,809	,791	,4894983	,809	45,155	3	32	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,911	,830	,815	,4599160	,830	53,763	3	33	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,903	,816	,800	,4728176	,816	50,317	3	34	,000
Ne.3.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,887	,787	,769	,5139334	,787	43,112	3	35	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.3.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.7.1	(Constante)	,450	,069		6,513	,000					
	RH.z.0	,553	,151	1,083	3,649	,001	,206	,536	,470	,188	5,324
	T.z.0	-,062	,138	-,128	-,448	,657	,089	-,078	-,058	,202	4,948
	CO2.z.0	-,518	,110	-,987	-,4726	,000	-,245	-,635	-,608	,380	2,634
Ne.7.1	(Constante)	,357	,086		4,162	,000					
	RH.z.1	,515	,188	1,035	2,736	,011	,218	,473	,432	,174	5,731
	T.z.1	-,174	,196	-,354	-,885	,384	,065	-,171	-,140	,156	6,403
	CO2.z.1	-,359	,126	-,691	-,2857	,008	-,214	-,489	-,451	,427	2,343
Ne.7.1	(Constante)	,397	,079		5,051	,000					
	RH.z.2	,426	,158	,912	2,697	,011	,262	,436	,389	,182	5,490
	T.z.2	-,049	,161	-,104	-,304	,764	,154	-,054	-,044	,179	5,599
	CO2.z.2	-,360	,104	-,762	-,3475	,002	-,172	-,529	-,501	,433	2,310
Ne.7.1	(Constante)	,384	,076		5,060	,000					
	RH.z.3	,382	,144	,851	2,645	,013	,304	,424	,380	,199	5,015
	T.z.3	-,044	,155	-,096	-,284	,778	,179	-,050	-,041	,180	5,541
	CO2.z.3	-,313	,099	-,666	-,3151	,004	-,147	-,487	-,453	,462	2,166
Ne.7.1	(Constante)	,348	,073		4,785	,000					
	RH.z.4	,488	,154	,976	3,160	,003	,349	,482	,418	,184	5,437
	T.z.4	-,102	,158	-,214	-,648	,521	,198	-,112	-,086	,160	6,238
	CO2.z.4	-,342	,096	-,667	-,3570	,001	-,184	-,528	-,473	,503	1,987
Ne.7.1	(Constante)	,320	,068		4,685	,000					
	RH.z.5	,540	,152	1,085	3,547	,001	,381	,520	,457	,177	5,642
	T.z.5	-,137	,160	-,286	-,859	,396	,215	-,146	-,111	,149	6,694
	CO2.z.5	-,343	,100	-,654	-,3420	,002	-,129	-,506	-,440	,454	2,204
Ne.7.1	(Constante)	,342	,061		5,639	,000					
	RH.z.6	,557	,138	1,123	4,035	,000	,399	,563	,477	,180	5,546
	T.z.6	-,126	,139	-,264	-,907	,371	,241	-,152	-,107	,165	6,051
	CO2.z.6	-,395	,089	-,733	-,4426	,000	-,173	-,599	-,523	,509	1,966

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.7.1.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,674	,454	,404	,3947334	,454	9,134	3	33	,000
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,592	,351	,276	,4250270	,351	4,683	3	26	,010
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,595	,354	,292	,4140633	,354	5,671	3	31	,003
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,582	,339	,277	,4125623	,339	5,477	3	32	,004
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,649	,421	,369	,3910902	,421	8,004	3	33	,000
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,660	,436	,386	,3857990	,436	8,769	3	34	,000
Ne.7.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,715	,511	,469	,3605885	,511	12,201	3	35	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.7.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.7.2	(Constante)	,517	,064		8,129	,000					
	RH.z.0	,480	,140	1,088	3,442	,002	,147	,514	,472	,188	5,324
	T.z.0	-,126	,127	-,302	-,989	,330	,007	-,170	-,136	,202	4,948
	CO2.z.0	-,396	,101	-,871	-,3915	,000	-,256	-,563	-,536	,380	2,634
Ne.7.2	(Constante)	,439	,079		5,547	,000					
	RH.z.1	,445	,174	,996	2,557	,017	,172	,448	,416	,174	5,731
	T.z.1	-,175	,182	-,397	-,964	,344	,020	-,186	-,157	,156	6,403
	CO2.z.1	-,301	,116	-,646	-,2595	,015	-,230	-,454	-,422	,427	2,343
Ne.7.2	(Constante)	,470	,071		6,575	,000					
	RH.z.2	,385	,144	,927	2,678	,012	,221	,433	,396	,182	5,490
	T.z.2	-,083	,146	-,199	-,569	,574	,103	-,102	-,084	,179	5,599
	CO2.z.2	-,303	,094	-,722	-,3215	,003	-,191	-,500	-,475	,433	2,310
Ne.7.2	(Constante)	,457	,068		6,700	,000					
	RH.z.3	,365	,130	,916	2,815	,008	,265	,445	,409	,199	5,015
	T.z.3	-,096	,139	-,236	-,690	,495	,119	-,121	-,100	,180	5,541
	CO2.z.3	-,265	,089	-,636	-,2976	,006	-,174	-,466	-,432	,462	2,166
Ne.7.2	(Constante)	,415	,066		6,303	,000					
	RH.z.4	,434	,140	,998	3,105	,004	,301	,476	,428	,184	5,437
	T.z.4	-,138	,143	-,334	-,970	,339	,139	-,167	-,134	,160	6,238
	CO2.z.4	-,271	,087	-,608	-,3130	,004	-,195	-,478	-,431	,503	1,987
Ne.7.2	(Constante)	,398	,062		6,437	,000					
	RH.z.5	,466	,138	1,089	3,379	,002	,325	,501	,459	,177	5,642
	T.z.5	-,169	,145	-,410	-,1167	,251	,151	-,196	-,158	,149	6,694
	CO2.z.5	-,260	,091	-,578	-,2868	,007	-,141	-,441	-,389	,454	2,204
Ne.7.2	(Constante)	,423	,056		7,504	,000					
	RH.z.6	,461	,128	1,079	3,593	,001	,341	,519	,458	,180	5,546
	T.z.6	-,134	,129	-,324	-,1034	,308	,183	-,172	-,132	,165	6,051
	CO2.z.6	-,312	,083	-,671	-,3755	,001	-,183	-,536	-,479	,509	1,966

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.7.2.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,617	,380	,324	,3638425	,380	6,754	3	33	,001
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,558	,312	,232	,3929091	,312	3,928	3	26	,019
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,568	,323	,257	,3763673	,323	4,927	3	31	,007
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,570	,325	,261	,3699494	,325	5,128	3	32	,005
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,611	,373	,316	,3539169	,373	6,548	3	33	,001
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,611	,374	,318	,3494596	,374	6,763	3	34	,001
Ne.7.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,656	,431	,382	,3350761	,431	8,833	3	35	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.7.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.8.1	(Constante)	,057	,133		,430	,671					
	RH.z.0	-,119	,145	-,150	-,816	,422	,157	-,158	-,130	,749	1,335
	T.z.0	,430	,230	,582	1,871	,073	,568	,345	,298	,262	3,821
	CO2.z.0	,054	,222	,071	,245	,809	,503	,048	,039	,304	3,291
Ne.8.1	(Constante)	,083	,124		,671	,508					
	RH.z.1	-,071	,150	-,084	-,474	,640	,280	-,091	-,071	,703	1,422
	T.z.1	,559	,220	,726	2,541	,017	,629	,439	,378	,271	3,688
	CO2.z.1	-,052	,212	-,064	-,245	,809	,499	-,047	-,036	,325	3,075
Ne.8.1	(Constante)	,025	,123		,207	,837					
	RH.z.2	,020	,132	,029	,148	,884	,333	,028	,024	,671	1,491
	T.z.2	,472	,204	,656	2,317	,028	,538	,407	,373	,323	3,098
	CO2.z.2	-,132	,192	-,174	-,685	,499	,345	-,131	-,110	,400	2,502
Ne.8.1	(Constante)	,132	,123		1,074	,292					
	RH.z.3	,036	,123	,052	,292	,772	,348	,054	,044	,702	1,425
	T.z.3	,635	,210	,873	3,031	,005	,538	,491	,452	,268	3,733
	CO2.z.3	-,323	,194	-,440	-,1666	,107	,300	-,295	-,248	,318	3,143
Ne.8.1	(Constante)	,172	,125		1,372	,181					
	RH.z.4	,021	,123	,029	,173	,864	,284	,033	,025	,757	1,321
	T.z.4	,808	,211	1,020	3,827	,001	,500	,586	,560	,301	3,319
	CO2.z.4	-,490	,186	-,659	-,2635	,014	,179	-,446	-,385	,342	2,924
Ne.8.1	(Constante)	,188	,125		1,505	,144					
	RH.z.5	,080	,126	,106	,634	,531	,318	,119	,094	,784	1,275
	T.z.5	,733	,205	,940	3,578	,001	,501	,560	,529	,317	3,156
	CO2.z.5	-,426	,176	-,605	-,2414	,023	,193	-,415	-,357	,348	2,869
Ne.8.1	(Constante)	,197	,137		1,435	,162					
	RH.z.6	,068	,144	,083	,470	,642	,239	,085	,074	,807	1,240
	T.z.6	,582	,213	,699	2,736	,010	,431	,447	,432	,382	2,615
	CO2.z.6	-,294	,185	-,395	-,1592	,122	,174	-,279	-,251	,406	2,465

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.8.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,585	,342	,266	,7209056	,342	4,510	3	26	,011	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,634	,402	,335	,6724236	,402	6,040	3	27	,003	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,550	,302	,225	,6804508	,302	3,896	3	27	,020	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,597	,356	,289	,6844865	,356	5,343	3	29	,005	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,633	,401	,336	,6870358	,401	6,237	3	28	,002	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,623	,388	,322	,6859354	,388	5,912	3	28	,003	
Ne.8.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,502	,252	,177	,7904973	,252	3,367	3	30	,031	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.8.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.8.2	(Constante)	-.055	,116		-.473	,640					
	RH.z.0	-.046	,126	-.043	-.368	,716	,393	-.072	-.037	,749	1,335
	T.z.0	1,011	,200	,990	5,063	,000	,857	,705	,506	,262	3,821
	CO2.z.0	-.144	,193	-.135	-.745	,463	,673	-.145	-.075	,304	3,291
Ne.8.2	(Constante)	-.069	,098		-.704	,488					
	RH.z.1	,041	,118	,036	,343	,735	,508	,066	,030	,703	1,422
	T.z.1	1,011	,174	,974	5,797	,000	,887	,745	,507	,271	3,688
	CO2.z.1	-.142	,168	-.130	-.847	,405	,681	-.161	-.074	,325	3,075
Ne.8.2	(Constante)	-.065	,095		-.681	,502					
	RH.z.2	,116	,102	,121	1,142	,264	,590	,215	,099	,671	1,491
	T.z.2	,895	,157	,875	5,707	,000	,884	,739	,497	,323	3,098
	CO2.z.2	-.083	,148	-.077	-.559	,581	,649	-.107	-.049	,400	2,502
Ne.8.2	(Constante)	,011	,099		,115	,909					
	RH.z.3	,136	,099	,143	1,375	,180	,578	,247	,120	,702	1,425
	T.z.3	,916	,169	,917	5,437	,000	,869	,710	,475	,268	3,733
	CO2.z.3	-.154	,156	-.153	-.988	,331	,660	-.180	-.086	,318	3,143
Ne.8.2	(Constante)	,045	,102		,445	,660					
	RH.z.4	,122	,100	,125	1,222	,232	,520	,225	,109	,757	1,321
	T.z.4	1,152	,171	1,088	6,723	,000	,847	,786	,597	,301	3,319
	CO2.z.4	-.371	,151	-.374	-2,461	,020	,555	-.422	-.219	,342	2,924
Ne.8.2	(Constante)	,038	,104		,359	,722					
	RH.z.5	,162	,105	,158	1,538	,135	,516	,279	,140	,784	1,275
	T.z.5	1,097	,171	1,041	6,421	,000	,841	,772	,586	,317	3,156
	CO2.z.5	-.323	,147	-.339	-2,192	,037	,560	-.383	-.200	,348	2,869
Ne.8.2	(Constante)	,042	,110		,381	,706					
	RH.z.6	,154	,115	,148	1,332	,193	,466	,236	,133	,807	1,240
	T.z.6	,977	,170	,927	5,736	,000	,815	,723	,573	,382	2,615
	CO2.z.6	-.217	,148	-.230	-1,466	,153	,539	-.258	-.147	,406	2,465

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.8.2.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,860	,740	,710	,6265895	,740	24,669	3	26	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,891	,793	,770	,5326670	,793	34,548	3	27	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,892	,795	,772	,5239846	,795	34,953	3	27	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,882	,779	,756	,5504617	,779	34,034	3	29	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,883	,779	,755	,5572084	,779	32,875	3	28	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,876	,767	,742	,5724708	,767	30,724	3	28	,000
Ne.8.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,837	,700	,670	,6329868	,700	23,354	3	30	,000

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.8.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.9.1	(Constante)	-,116	,118		-,981	,335					
	RH.z.0	,196	,123	,195	1,597	,122	,523	,299	,172	,781	1,280
	T.z.0	,822	,212	,830	3,881	,001	,812	,606	,418	,253	3,945
	CO2.z.0	-,139	,226	-,123	-,616	,543	,624	-,120	-,066	,290	3,450
Ne.9.1	(Constante)	-,038	,135		-,281	,781					
	RH.z.1	,263	,151	,255	1,739	,094	,569	,323	,217	,721	1,387
	T.z.1	,571	,241	,555	2,367	,026	,742	,421	,295	,282	3,552
	CO2.z.1	,076	,251	,065	,302	,765	,614	,059	,038	,332	3,013
Ne.9.1	(Constante)	,012	,131		,094	,926					
	RH.z.2	,205	,129	,232	1,590	,124	,585	,298	,190	,673	1,486
	T.z.2	,509	,212	,490	2,405	,024	,762	,427	,287	,345	2,902
	CO2.z.2	,214	,211	,185	1,014	,320	,648	,195	,121	,428	2,336
Ne.9.1	(Constante)	-,017	,127		-,138	,891					
	RH.z.3	,155	,117	,176	1,332	,194	,540	,244	,148	,714	1,400
	T.z.3	,565	,209	,557	2,695	,012	,789	,454	,300	,291	3,437
	CO2.z.3	,180	,201	,171	,896	,378	,692	,167	,100	,341	2,928
Ne.9.1	(Constante)	-,017	,132		-,132	,896					
	RH.z.4	,154	,120	,172	1,277	,212	,510	,239	,150	,761	1,314
	T.z.4	,670	,216	,635	3,097	,005	,776	,512	,364	,329	3,044
	CO2.z.4	,073	,199	,071	,366	,717	,642	,070	,043	,368	2,714
Ne.9.1	(Constante)	-,085	,140		-,605	,550					
	RH.z.5	,121	,134	,123	,905	,373	,453	,172	,109	,787	1,270
	T.z.5	,704	,223	,637	3,151	,004	,770	,519	,379	,355	2,817
	CO2.z.5	,103	,206	,097	,500	,621	,645	,096	,060	,382	2,620
Ne.9.1	(Constante)	-,082	,130		-,627	,536					
	RH.z.6	,112	,131	,111	,854	,400	,425	,157	,100	,810	1,235
	T.z.6	,662	,199	,601	3,334	,002	,762	,526	,390	,422	2,372
	CO2.z.6	,159	,182	,153	,871	,391	,640	,160	,102	,445	2,248

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.9.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,836	,699	,664	,6398861	,699	20,086	3	26	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,773	,597	,551	,7302514	,597	12,842	3	26	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,793	,629	,586	,7120434	,629	14,665	3	26	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,808	,652	,615	,6935555	,652	17,502	3	28	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,792	,627	,585	,7138692	,627	15,096	3	27	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,780	,609	,565	,7572264	,609	13,998	3	27	,000	
Ne.9.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,776	,603	,562	,7385250	,603	14,673	3	29	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.9.1.

Coeficientes											
Zona	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad		
	B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV	
Ne.9.2	(Constante)	,060	,122		,489	,629					
	RH.z.0	,066	,127	,061	,520	,608	,435	,101	,054	,781	1,280
	T.z.0	1,071	,219	1,008	4,890	,000	,835	,692	,507	,253	3,945
	CO2.z.0	-,290	,234	-,239	-1,239	,227	,621	-,236	-,129	,290	3,450
Ne.9.2	(Constante)	,058	,125		,465	,646					
	RH.z.1	,122	,140	,118	,875	,389	,509	,169	,100	,721	1,387
	T.z.1	,820	,223	,794	3,683	,001	,805	,586	,421	,282	3,552
	CO2.z.1	-,072	,232	-,062	-,313	,757	,630	-,061	-,036	,332	3,013
Ne.9.2	(Constante)	,118	,129		,915	,369					
	RH.z.2	,078	,127	,085	,616	,543	,521	,120	,070	,673	1,486
	T.z.2	,817	,208	,757	3,924	,001	,814	,610	,444	,345	2,902
	CO2.z.2	,013	,208	,011	,064	,950	,617	,012	,007	,428	2,336
Ne.9.2	(Constante)	,142	,125		1,139	,264					
	RH.z.3	,070	,115	,076	,606	,549	,494	,114	,064	,714	1,400
	T.z.3	,835	,206	,794	4,049	,000	,826	,608	,428	,291	3,437
	CO2.z.3	-,012	,198	-,011	-,059	,953	,663	-,011	-,006	,341	2,928
Ne.9.2	(Constante)	,153	,125		1,222	,232					
	RH.z.4	,073	,113	,079	,647	,523	,465	,123	,069	,761	1,314
	T.z.4	,975	,204	,889	4,779	,000	,826	,677	,510	,329	3,044
	CO2.z.4	-,137	,188	-,128	-,729	,472	,609	-,139	-,078	,368	2,714
Ne.9.2	(Constante)	,097	,127		,764	,451					
	RH.z.5	,062	,121	,061	,508	,616	,426	,097	,054	,787	1,270
	T.z.5	1,000	,203	,882	4,931	,000	,829	,688	,525	,355	2,817
	CO2.z.5	-,111	,187	-,103	-,596	,556	,614	-,114	-,063	,382	2,620
Ne.9.2	(Constante)	,068	,121		,566	,576					
	RH.z.6	,078	,121	,075	,644	,525	,412	,119	,068	,810	1,235
	T.z.6	,921	,184	,810	5,011	,000	,822	,681	,526	,422	2,372
	CO2.z.6	-,029	,169	-,027	-,172	,865	,602	-,032	-,018	,445	2,248

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.9.2.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,848 ^a	,720	,688	,6619129	,720	22,276	3	26	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,812 ^a	,660	,621	,6731656	,660	16,814	3	26	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,817 ^a	,667	,628	,7000068	,667	17,346	3	26	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,829 ^a	,686	,653	,6825788	,686	20,436	3	28	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,832 ^a	,693	,659	,6737505	,693	20,320	3	27	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,833 ^a	,694	,660	,6873390	,694	20,376	3	27	,000	
Ne.9.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,825 ^a	,680	,647	,6831930	,680	20,587	3	29	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.9.2.

Coeficientes											
Zona	Coeficientes no estandarizados			Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
	B	Error típ.	Beta	Orden cero			Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV	
Ne.10.1	(Constante)	,235	,093		2,534	,016					
	RH.z.0	-,665	,141	-,920	-4,714	,000	-,618	-,629	-,599	,425	2,354
	T.z.0	,186	,157	,261	1,187	,243	-,276	,200	,151	,336	2,980
	CO2.z.0	,115	,155	,160	,737	,466	-,291	,125	,094	,343	2,916
Ne.10.1	(Constante)	,230	,098		2,344	,026					
	RH.z.1	-,738	,180	-,927	-4,096	,000	-,658	-,599	-,537	,335	2,982
	T.z.1	,263	,186	,359	1,409	,169	-,356	,249	,185	,264	3,787
	CO2.z.1	-,005	,201	-,007	-,027	,978	-,443	-,005	-,004	,232	4,311
Ne.10.1	(Constante)	,219	,095		2,311	,028					
	RH.z.2	-,539	,156	-,838	-3,450	,002	-,604	-,527	-,450	,288	3,468
	T.z.2	,392	,165	,614	2,376	,024	-,371	,392	,310	,254	3,930
	CO2.z.2	-,252	,143	-,375	-1,766	,087	-,518	-,302	-,230	,377	2,656
Ne.10.1	(Constante)	,165	,089		1,854	,073					
	RH.z.3	-,519	,119	-,852	-4,374	,000	-,662	-,612	-,513	,362	2,759
	T.z.3	,370	,132	,577	2,796	,009	-,361	,443	,328	,323	3,093
	CO2.z.3	-,309	,146	-,377	-2,116	,042	-,543	-,350	-,248	,433	2,310
Ne.10.1	(Constante)	,182	,087		2,089	,045					
	RH.z.4	-,465	,117	-,767	-3,978	,000	-,647	-,575	-,459	,358	2,796
	T.z.4	,395	,127	,615	3,117	,004	-,328	,483	,360	,342	2,927
	CO2.z.4	-,388	,150	-,480	-2,579	,015	-,582	-,415	-,298	,385	2,601
Ne.10.1	(Constante)	,195	,080		2,430	,021					
	RH.z.5	-,479	,114	-,714	-4,205	,000	-,658	-,597	-,444	,386	2,588
	T.z.5	,498	,124	,725	4,013	,000	-,297	,579	,424	,341	2,934
	CO2.z.5	-,583	,167	-,641	-3,497	,001	-,607	-,526	-,369	,331	3,018
Ne.10.1	(Constante)	,274	,090		3,040	,005					
	RH.z.6	-,651	,137	-,905	-4,759	,000	-,632	-,638	-,579	,409	2,445
	T.z.6	,458	,168	,650	2,722	,010	-,282	,428	,331	,259	3,860
	CO2.z.6	-,244	,180	-,303	-1,352	,186	-,409	-,229	-,164	,293	3,408

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.10.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,671	,450	,402	,5678293	,450	9,277	3	34	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,696	,485	,434	,5668779	,485	9,421	3	30	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,687	,472	,421	,5519551	,472	9,253	3	31	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,749	,560	,519	,5245604	,560	13,593	3	32	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,758	,574	,534	,5162670	,574	14,379	3	32	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,802	,643	,610	,4723569	,643	19,252	3	32	,000	
Ne.10.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,716	,512	,468	,5440529	,512	11,558	3	33	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.10.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.11.1	(Constante)	-.443	,067		-6,569	,000					
	RH.z.0	-.528	,117	-1,047	-4,512	,000	-.281	-.612	-.597	,325	3,074
	T.z.0	,410	,118	,800	3,478	,001	,139	,512	,460	,331	3,018
	CO2.z.0	,099	,118	,193	,838	,408	-.002	,142	,111	,332	3,015
Ne.11.1	(Constante)	-.478	,066		-7,231	,000					
	RH.z.1	-.485	,126	-1,009	-3,859	,001	-.176	-.570	-.560	,308	3,243
	T.z.1	,331	,133	,718	2,483	,019	,178	,407	,361	,252	3,971
	CO2.z.1	,146	,125	,325	1,166	,253	,128	,205	,169	,271	3,692
Ne.11.1	(Constante)	-.498	,062		-8,011	,000					
	RH.z.2	-.539	,116	-1,264	-4,652	,000	-.261	-.635	-.634	,251	3,979
	T.z.2	,369	,121	,855	3,054	,005	,062	,475	,416	,237	4,223
	CO2.z.2	,155	,097	,362	1,593	,121	,064	,271	,217	,358	2,790
Ne.11.1	(Constante)	-.516	,058		-8,919	,000					
	RH.z.3	-.555	,087	-1,273	-6,372	,000	-.411	-.743	-.733	,331	3,019
	T.z.3	,402	,092	,854	4,361	,000	,065	,605	,502	,345	2,900
	CO2.z.3	,151	,105	,269	1,446	,158	-.054	,244	,166	,383	2,612
Ne.11.1	(Constante)	-.513	,057		-8,998	,000					
	RH.z.4	-.530	,081	-1,239	-6,563	,000	-.411	-.752	-.744	,361	2,772
	T.z.4	,360	,088	,771	4,080	,000	,091	,579	,463	,360	2,779
	CO2.z.4	,184	,102	,336	1,803	,081	-.011	,299	,204	,371	2,698
Ne.11.1	(Constante)	-.457	,060		-7,581	,000					
	RH.z.5	-.526	,085	-1,148	-6,203	,000	-.379	-.734	-.727	,401	2,495
	T.z.5	,317	,098	,653	3,246	,003	,129	,492	,380	,339	2,952
	CO2.z.5	,244	,123	,401	1,985	,055	,071	,327	,233	,337	2,970
Ne.11.1	(Constante)	-.434	,060		-7,237	,000					
	RH.z.6	-.544	,091	-1,101	-5,942	,000	-.295	-.714	-.699	,403	2,479
	T.z.6	,305	,115	,609	2,643	,012	,178	,413	,311	,261	3,828
	CO2.z.6	,268	,120	,484	2,235	,032	,199	,358	,263	,296	3,383

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.11.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,464	,405	,352	,4091661	,405	7,701	3	34	,000	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,589	,347	,283	,3777125	,347	5,484	3	31	,004	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,637	,406	,350	,3648702	,406	7,294	3	32	,001	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,751	,564	,524	,3482422	,564	14,204	3	33	,000	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,759	,576	,537	,3433989	,576	14,920	3	33	,000	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,740	,547	,506	,3548033	,547	13,281	3	33	,000	
Ne.11.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,727	,529	,487	,3596731	,529	12,730	3	34	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.11.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.11.2	(Constante)	-.437	,069		-6,320	,000					
	RH.z.0	-.730	,120	-1,246	-6,077	,000	-.504	-.722	-.711	,325	3,074
	T.z.0	,396	,121	,665	3,274	,002	-.071	,490	,383	,331	3,018
	CO2.z.0	,176	,121	,295	1,454	,155	-.156	,242	,170	,332	3,015
Ne.11.2	(Constante)	-.410	,075		-5,494	,000					
	RH.z.1	-.839	,142	-1,309	-5,899	,000	-.397	-.727	-.727	,308	3,243
	T.z.1	,433	,151	,704	2,867	,007	,018	,458	,353	,252	3,971
	CO2.z.1	,263	,141	,440	1,861	,072	-.005	,317	,229	,271	3,692
Ne.11.2	(Constante)	-.481	,069		-6,930	,000					
	RH.z.2	-.841	,129	-1,505	-6,504	,000	-.386	-.755	-.755	,251	3,979
	T.z.2	,550	,135	,972	4,080	,000	-.009	,585	,473	,237	4,223
	CO2.z.2	,215	,108	,384	1,980	,056	-.007	,330	,230	,358	2,790
Ne.11.2	(Constante)	-.533	,070		-7,645	,000					
	RH.z.3	-.632	,105	-1,243	-6,019	,000	-.469	-.723	-.715	,331	3,019
	T.z.3	,412	,111	,749	3,701	,001	-.024	,542	,440	,345	2,900
	CO2.z.3	,170	,126	,259	1,347	,187	-.119	,228	,160	,383	2,612
Ne.11.2	(Constante)	-.529	,073		-7,200	,000					
	RH.z.4	-.572	,104	-1,144	-5,488	,000	-.439	-.691	-.687	,361	2,772
	T.z.4	,339	,114	,622	2,981	,005	,002	,461	,373	,360	2,779
	CO2.z.4	,205	,132	,321	1,561	,128	-.066	,262	,195	,371	2,698
Ne.11.2	(Constante)	-.478	,077		-6,235	,000					
	RH.z.5	-.564	,108	-1,054	-5,230	,000	-.446	-.673	-.667	,401	2,495
	T.z.5	,343	,124	,604	2,756	,009	,014	,433	,352	,339	2,952
	CO2.z.5	,163	,156	,229	1,042	,305	-.071	,178	,133	,337	2,970
Ne.11.2	(Constante)	-.458	,079		-5,838	,000					
	RH.z.6	-.557	,120	-.966	-4,643	,000	-.333	-.623	-.614	,403	2,479
	T.z.6	,470	,151	,804	3,110	,004	,105	,471	,411	,261	3,828
	CO2.z.6	,023	,157	,036	,149	,883	,010	,026	,020	,296	3,383

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.11.2.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,732	,535	,494	,4197942	,535	13,050	3	34		
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,728	,530	,484	,4270787	,530	11,636	3	31	,000	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,755	,569	,529	,4073980	,569	14,104	3	32	,000	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,731	,534	,492	,4201358	,534	12,611	3	33	,000	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,695	,482	,435	,4428391	,482	10,252	3	33	,000	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,680	,463	,414	,4512102	,463	9,471	3	33	,000	
Ne.11.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,637	,406	,354	,4713225	,406	7,757	3	34	,000	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.11.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.12.1	(Constante)	-.129	.161		-.802	.428					
	RH.z.0	-.411	.360	-.395	-1,141	.262	.198	-.195	-.171	.187	5,360
	T.z.0	.052	.326	.053	.160	.874	.227	.028	.024	.206	4,852
	CO2.z.0	.785	.256	.718	3,062	.004	.456	.470	.458	.407	2,458
Ne.12.1	(Constante)	-.045	.184		-.245	.808					
	RH.z.1	-.224	.421	-.207	-.532	.599	.317	-.100	-.085	.166	6,024
	T.z.1	.091	.418	.087	.218	.829	.353	.041	.035	.158	6,310
	CO2.z.1	.700	.272	.617	2,576	.016	.531	.438	.410	.441	2,266
Ne.12.1	(Constante)	-.056	.172		-.324	.748					
	RH.z.2	-.242	.359	-.242	-.674	.505	.270	-.117	-.101	.174	5,732
	T.z.2	.064	.352	.064	.181	.858	.294	.031	.027	.180	5,563
	CO2.z.2	.638	.229	.623	2,780	.009	.492	.436	.416	.447	2,239
Ne.12.1	(Constante)	-.063	.169		-.371	.713					
	RH.z.3	-.219	.330	-.227	-.664	.511	.233	-.113	-.100	.193	5,170
	T.z.3	.059	.342	.061	.173	.864	.276	.030	.026	.181	5,513
	CO2.z.3	.587	.223	.580	2,630	.013	.465	.411	.395	.464	2,154
Ne.12.1	(Constante)	-.037	.181		-.203	.841					
	RH.z.4	-.339	.387	-.313	-.876	.387	.186	-.147	-.133	.181	5,517
	T.z.4	.201	.391	.197	.514	.611	.260	.086	.078	.157	6,353
	CO2.z.4	.527	.241	.481	2,190	.035	.413	.347	.333	.479	2,086
Ne.12.1	(Constante)	.033	.174		.190	.850					
	RH.z.5	-.406	.390	-.379	-1,041	.305	.172	-.171	-.158	.175	5,726
	T.z.5	.284	.405	.278	.700	.489	.256	.116	.106	.147	6,817
	CO2.z.5	.479	.259	.429	1,853	.072	.374	.295	.282	.432	2,313
Ne.12.1	(Constante)	-.016	.160		-.100	.921					
	RH.z.6	-.283	.367	-.270	-.773	.445	.210	-.126	-.113	.176	5,667
	T.z.6	.145	.361	.144	.401	.690	.261	.066	.059	.166	6,017
	CO2.z.6	.574	.230	.516	2,491	.017	.435	.379	.365	.501	1,996

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.12.1.

Resumen del modelo										
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	.511	.261	.194	.9340301	.261	3,895	3	33	.017
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	.541	.292	.216	.9619077	.292	3,854	3	28	.020
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	.510	.260	.193	.9468811	.260	3,867	3	33	.018
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	.483	.233	.166	.9497541	.233	3,448	3	34	.027
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	.438	.192	.122	.9951584	.192	2,766	3	35	.056
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	.408	.167	.097	1,0036708	.167	2,400	3	36	.084
Ne.12.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	.453	.205	.141	.9682107	.205	3,185	3	37	.035

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.12.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.12.2	(Constante)	-.129	.147		-.874	.388					
	RH.z.0	-.190	.329	-.231	-.576	.569	-.011	-.100	-.100	.187	5,360
	T.z.0	.131	.298	.167	.439	.664	.031	.076	.076	.206	4,852
	CO2.z.0	.081	.234	.094	.345	.732	.041	.060	.060	.407	2,458
Ne.12.2	(Constante)	-.010	.166		-.061	.952					
	RH.z.1	-.260	.381	-.312	-.682	.501	.031	-.128	-.127	.166	6,024
	T.z.1	.310	.378	.384	.819	.420	.094	.153	.153	.158	6,310
	CO2.z.1	-.007	.246	-.008	-.027	.979	.050	-.005	-.005	.441	2,266
Ne.12.2	(Constante)	-.025	.149		-.169	.866					
	RH.z.2	-.223	.312	-.293	-.713	.481	-.053	-.123	-.122	.174	5,732
	T.z.2	.272	.306	.360	.889	.380	.013	.153	.153	.180	5,563
	CO2.z.2	-.089	.199	-.115	-.448	.657	-.070	-.078	-.077	.447	2,239
Ne.12.2	(Constante)	-.032	.145		-.220	.827					
	RH.z.3	-.247	.281	-.336	-.877	.387	-.078	-.149	-.148	.193	5,170
	T.z.3	.290	.292	.393	.994	.327	-.004	.168	.167	.181	5,513
	CO2.z.3	-.104	.190	-.134	-.544	.590	-.086	-.093	-.092	.464	2,154
Ne.12.2	(Constante)	-.016	.146		-.110	.913					
	RH.z.4	-.447	.312	-.551	-1,433	.161	-.097	-.235	-.235	.181	5,517
	T.z.4	.442	.315	.579	1,403	.169	.005	.231	.230	.157	6,353
	CO2.z.4	-.086	.194	-.105	-.445	.659	-.056	-.075	-.073	.479	2,086
Ne.12.2	(Constante)	-.068	.140		-.484	.632					
	RH.z.5	-.367	.313	-.458	-1,171	.249	-.047	-.191	-.191	.175	5,726
	T.z.5	.372	.326	.488	1,144	.260	.037	.187	.187	.147	6,817
	CO2.z.5	-.039	.208	-.046	-.187	.853	.002	-.031	-.031	.432	2,313
Ne.12.2	(Constante)	-.109	.133		-.821	.417					
	RH.z.6	-.158	.306	-.201	-.516	.609	.026	-.084	-.084	.176	5,667
	T.z.6	.198	.301	.264	.659	.514	.070	.108	.108	.166	6,017
	CO2.z.6	-.015	.192	-.018	-.077	.939	.031	-.013	-.013	.501	1,996

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.12.2.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	.108	.012	-.078	.8536169	.012	.129	3	33	.942	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	.161	.026	-.079	.8705010	.026	.248	3	28	.862	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	.168	.028	-.060	.8232305	.028	.319	3	33	.812	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	.190	.036	-.049	.8100758	.036	.423	3	34	.738	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	.250	.062	-.018	.8024284	.062	.777	3	35	.515	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	.199	.039	-.041	.8067210	.039	.493	3	36	.689	
Ne.12.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	.112	.013	-.067	.8074943	.013	.157	3	37	.924	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.12.2.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.13.1	(Constante)	-.024	,180		-,134	,894					
	RH.z.0	,293	,287	,253	1,022	,315	-,017	,181	,176	,486	2,058
	T.z.0	-,288	,310	-,253	-,931	,359	-,213	-,165	-,161	,402	2,487
	CO2.z.0	-,160	,301	-,157	-,533	,598	-,173	-,095	-,092	,341	2,931
Ne.13.1	(Constante)	-,072	,191		-,379	,707					
	RH.z.1	,229	,323	,197	,708	,484	-,048	,130	,128	,427	2,345
	T.z.1	-,133	,365	-,120	-,365	,718	-,157	-,068	-,066	,304	3,289
	CO2.z.1	-,222	,342	-,218	-,650	,521	-,173	-,120	-,118	,292	3,423
Ne.13.1	(Constante)	,009	,186		,046	,964					
	RH.z.2	,151	,327	,132	,462	,648	-,060	,084	,083	,392	2,552
	T.z.2	-,315	,354	-,284	-,891	,380	-,171	-,160	-,159	,315	3,174
	CO2.z.2	,020	,318	,020	,062	,951	-,109	,011	,011	,295	3,387
Ne.13.1	(Constante)	-,020	,175		-,113	,910					
	RH.z.3	,328	,250	,315	1,310	,200	-,012	,229	,222	,498	2,007
	T.z.3	-,194	,293	-,174	-,661	,513	-,214	-,118	-,112	,416	2,401
	CO2.z.3	-,352	,316	-,316	-,1,114	,274	-,229	-,196	-,189	,358	2,791
Ne.13.1	(Constante)	-,056	,178		-,317	,753					
	RH.z.4	,450	,288	,417	1,564	,128	-,015	,270	,263	,396	2,522
	T.z.4	-,085	,302	-,075	-,281	,781	-,213	-,050	-,047	,392	2,552
	CO2.z.4	-,546	,373	-,498	-,1,461	,154	-,233	-,254	-,245	,243	4,117
Ne.13.1	(Constante)	-,235	,189		-,1,248	,222					
	RH.z.5	,587	,272	,525	2,158	,039	-,005	,361	,343	,427	2,342
	T.z.5	,206	,317	,179	,649	,521	-,191	,116	,103	,333	3,003
	CO2.z.5	-,1,079	,427	-,844	-,2,529	,017	-,301	-,414	-,402	,226	4,417
Ne.13.1	(Constante)	-,178	,174		-,1,021	,315					
	RH.z.6	,387	,255	,336	1,517	,139	-,061	,259	,237	,500	2,002
	T.z.6	,330	,350	,287	,944	,352	-,206	,165	,148	,265	3,773
	CO2.z.6	-,952	,368	-,834	-,2,586	,014	-,354	-,416	-,405	,235	4,249

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.13.1.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,277	,077	-,012	1,0493609	,077	,860	3	31	,472	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,217	,047	-,051	1,0549180	,047	,478	3	29	,700	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,196	,038	-,058	1,0612982	,038	,400	3	30	,754	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,326	,106	,020	1,0059377	,106	1,227	3	31	,316	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,355	,126	,041	,9948814	,126	1,485	3	31	,238	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,466	,217	,142	,9411929	,217	2,872	3	31	,052	
Ne.13.1	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,465	,216	,143	,9494087	,216	2,939	3	32	,048	

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.13.1.

Coeficientes											
Zona		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.	Correlaciones			Estadísticos de colinealidad	
		B	Error típ.	Beta			Orden cero	Parcial	Semiparcial	Tolerancia	FIV
Ne.13.2	(Constante)	,009	,179		,048	,962					
	RH.z.0	,165	,285	,144	,580	,566	-,038	,104	,101	,486	2,058
	T.z.0	-,412	,308	-,366	-1,337	,191	-,222	-,234	-,232	,402	2,487
	CO2.z.0	,070	,299	,070	,234	,816	-,108	,042	,041	,341	2,931
Ne.13.2	(Constante)	-,054	,193		-,278	,783					
	RH.z.1	,136	,327	,116	,416	,681	-,091	,077	,075	,427	2,345
	T.z.1	-,276	,369	-,246	-,749	,460	-,198	-,138	-,136	,304	3,289
	CO2.z.1	-,043	,346	-,042	-,124	,902	-,159	-,023	-,023	,292	3,423
Ne.13.2	(Constante)	,008	,186		,043	,966					
	RH.z.2	,101	,328	,088	,309	,759	-,111	,056	,055	,392	2,552
	T.z.2	-,304	,354	-,272	-,858	,398	-,209	-,155	-,153	,315	3,174
	CO2.z.2	-,001	,318	-,001	-,002	,998	-,154	,000	,000	,295	3,387
Ne.13.2	(Constante)	-,017	,178		-,093	,927					
	RH.z.3	,189	,255	,180	,739	,465	-,097	,132	,127	,498	2,007
	T.z.3	-,202	,299	-,180	-,677	,504	-,247	-,121	-,116	,416	2,401
	CO2.z.3	-,269	,322	-,239	-,834	,411	-,250	-,148	-,143	,358	2,791
Ne.13.2	(Constante)	-,046	,183		-,250	,804					
	RH.z.4	,269	,296	,247	,909	,370	-,102	,161	,155	,396	2,522
	T.z.4	-,088	,310	-,077	-,283	,779	-,233	-,051	-,048	,392	2,552
	CO2.z.4	-,431	,384	-,390	-1,123	,270	-,258	-,198	-,192	,243	4,117
Ne.13.2	(Constante)	-,202	,196		-1,028	,312					
	RH.z.5	,426	,283	,377	1,506	,142	-,082	,261	,246	,427	2,342
	T.z.5	,186	,329	,160	,564	,577	-,210	,101	,092	,333	3,003
	CO2.z.5	-,948	,444	-,735	-2,137	,041	-,319	-,358	-,350	,226	4,417
Ne.13.2	(Constante)	-,143	,180		-,793	,434					
	RH.z.6	,263	,264	,229	,997	,326	-,100	,174	,162	,500	2,002
	T.z.6	,289	,361	,252	,800	,430	-,201	,140	,130	,265	3,773
	CO2.z.6	-,802	,380	-,705	-2,108	,043	-,329	-,349	-,342	,235	4,249

Descriptivos de las variables que integran los modelos propuestos para la zona Ne.13.2.

Resumen del modelo											
Zona	Variables predictoras	R	R ²	R ² corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio					
						Cambio R ²	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. Cambio en F	
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.0, T.z.0, RH.z.0	,261	,068	-,022	1,0445025	,068	,754	3	31		,528
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.1, T.z.1, RH.z.1	,212	,045	-,054	1,0665112	,045	,454	3	29		,716
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.2, T.z.2, RH.z.2	,217	,047	-,048	1,0623259	,047	,495	3	30		,689
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.3, T.z.3, RH.z.3	,294	,087	-,002	1,0264582	,087	,981	3	31		,414
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.4, T.z.4, RH.z.4	,306	,093	,006	1,0226392	,093	1,066	3	31		,378
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.5, T.z.5, RH.z.5	,412	,170	,090	,9784995	,170	2,117	3	31		,118
Ne.13.2	(Constante), CO2.z.6, T.z.6, RH.z.6	,398	,159	,080	,9811647	,159	2,012	3	32		,132

Significación de los modelos y bondad de ajuste de los mismos para la zona Ne.13.2.

ANEXO 3

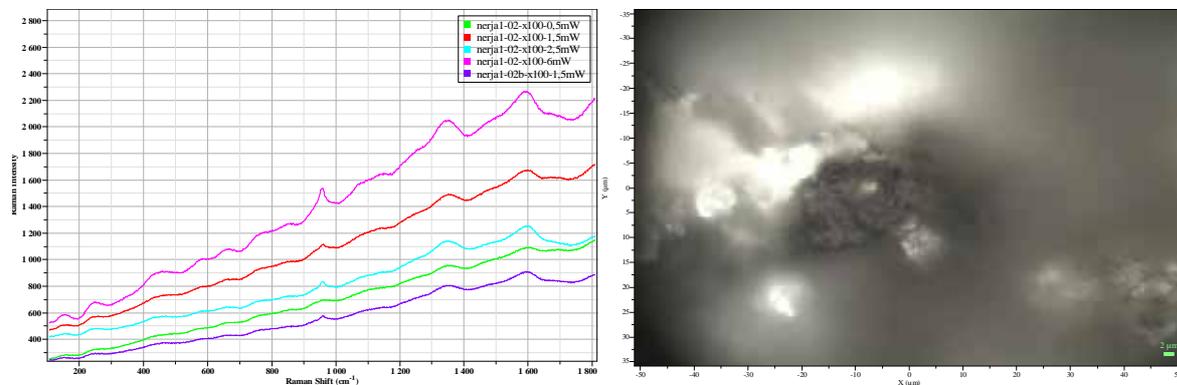
Análisis microscopía Raman

El análisis de microscopía Raman fue realizado por la Unitat Raman de los Centres Científics i Tecnològics Universitat de Barcelona (UB). Este análisis empleó para la descripción de la capa de sustrato negra observada bajo el biofilm fotosintético de la zona Ne.1

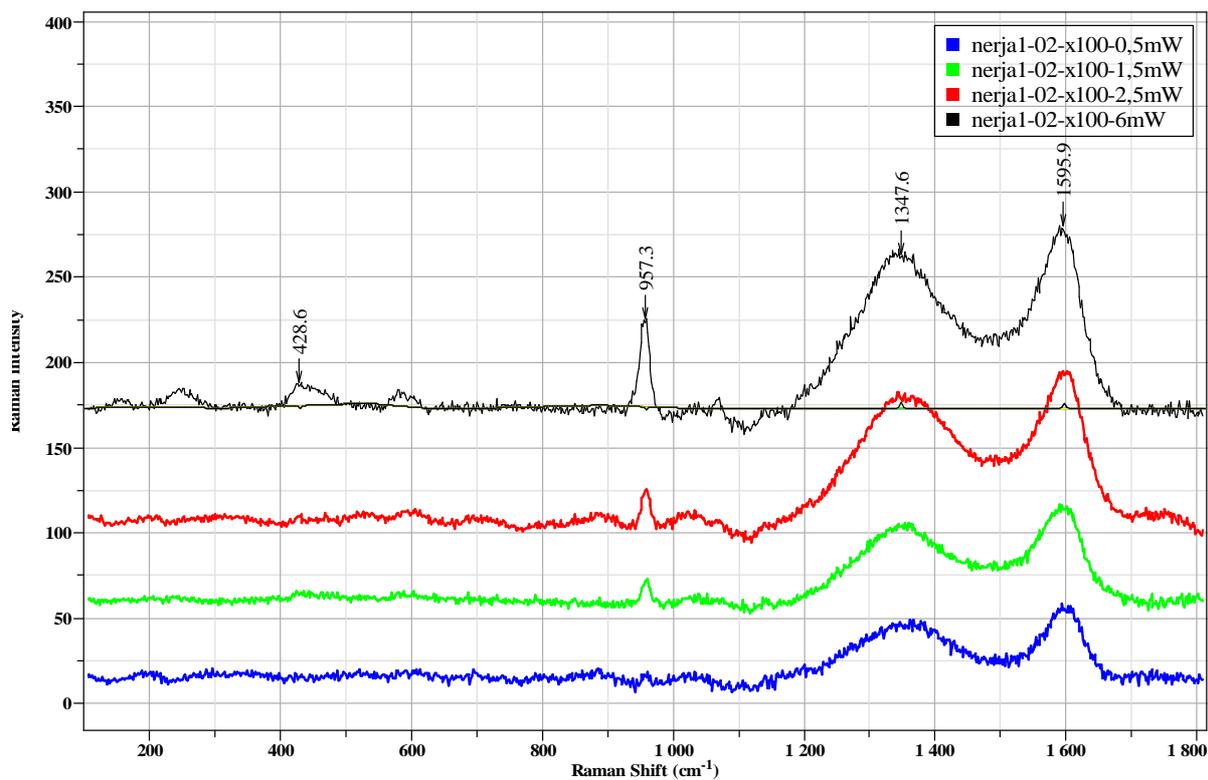
Conclusiones del estudio:

1. Las regiones negras/oscuras presentan unos espectros típicos del carbono amorfo tipo *black carbon*.
2. Esas regiones muestran también la banda típica del fosfato correspondiente a la hidroxiapatita.
3. Las zonas menos oscuras o blancas indican muy poco carbono amorfo o en algunos casos nada. Pero se puede a veces detectar en estas regiones la banda de la hidroxiapatita en cantidad menor que en las zonas oscuras.
4. La zona 08 no presenta bandas correspondiendo al carbono amorfo y tampoco a la hidroxiapatita.
5. La zona 09 no presenta bandas correspondiendo al carbono amorfo. A potencia muy alta, se puede detectar un poco de hidroxiapatita.

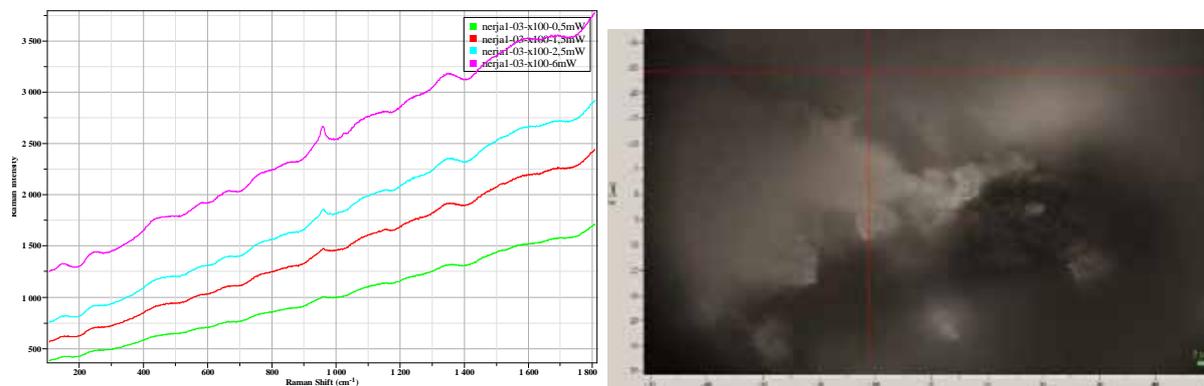
Espectros originales nerja1-02:



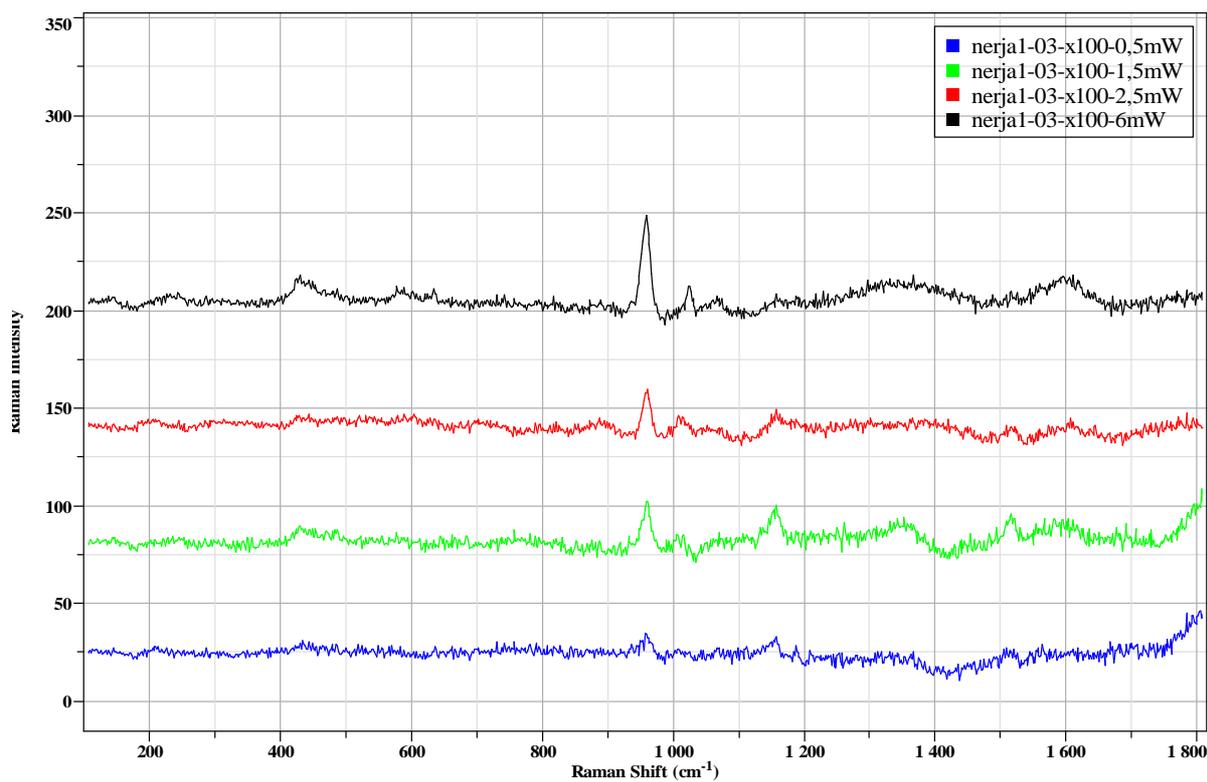
Espectros corregidos nerja1-02:



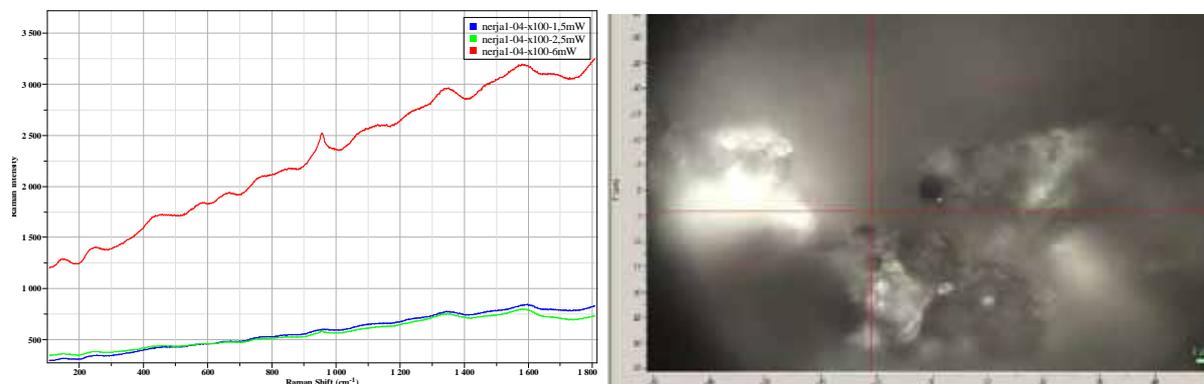
Espectros originales nerja1-03:



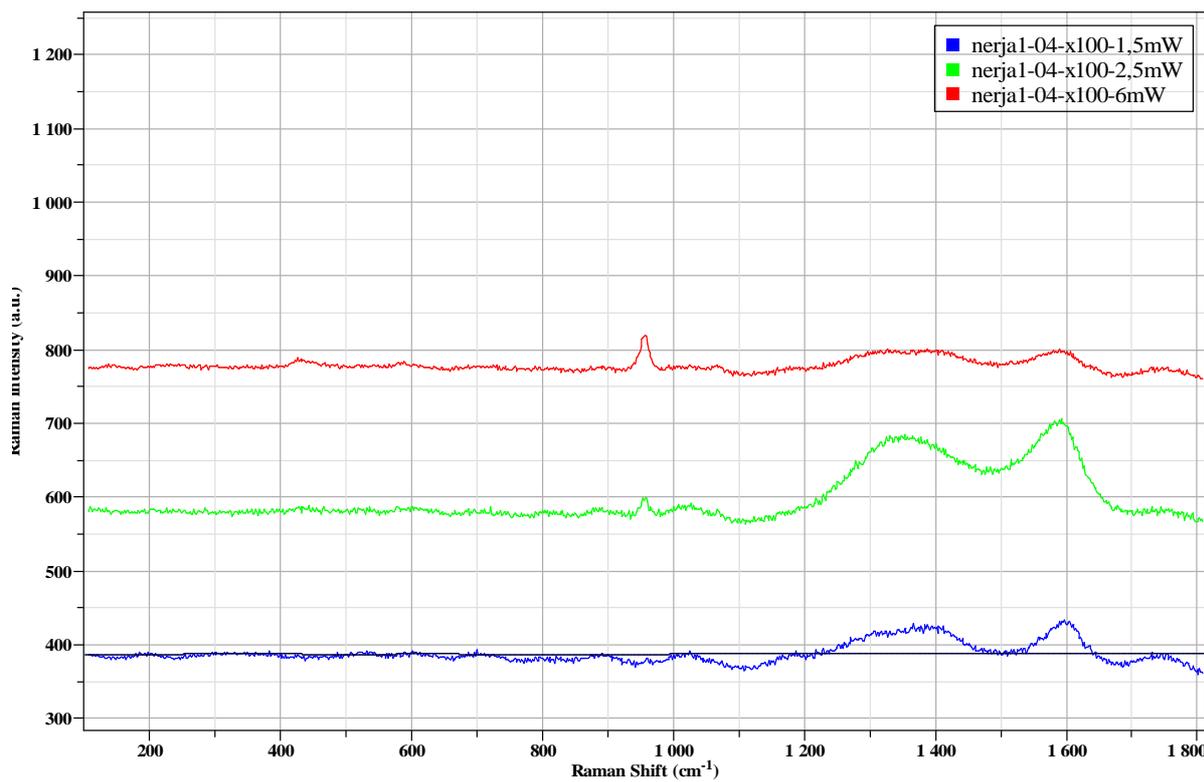
Espectros corregidos nerja1-03 (baseline sustraction):



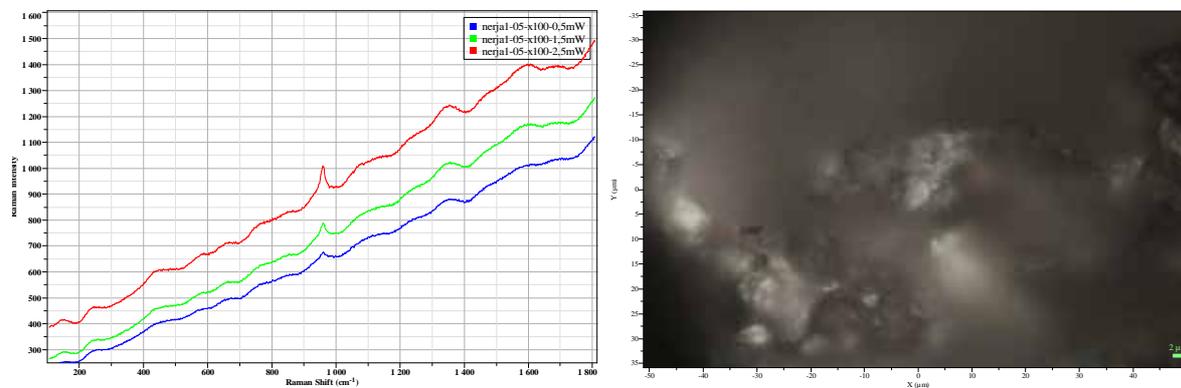
Espectros originales nerja1-04:



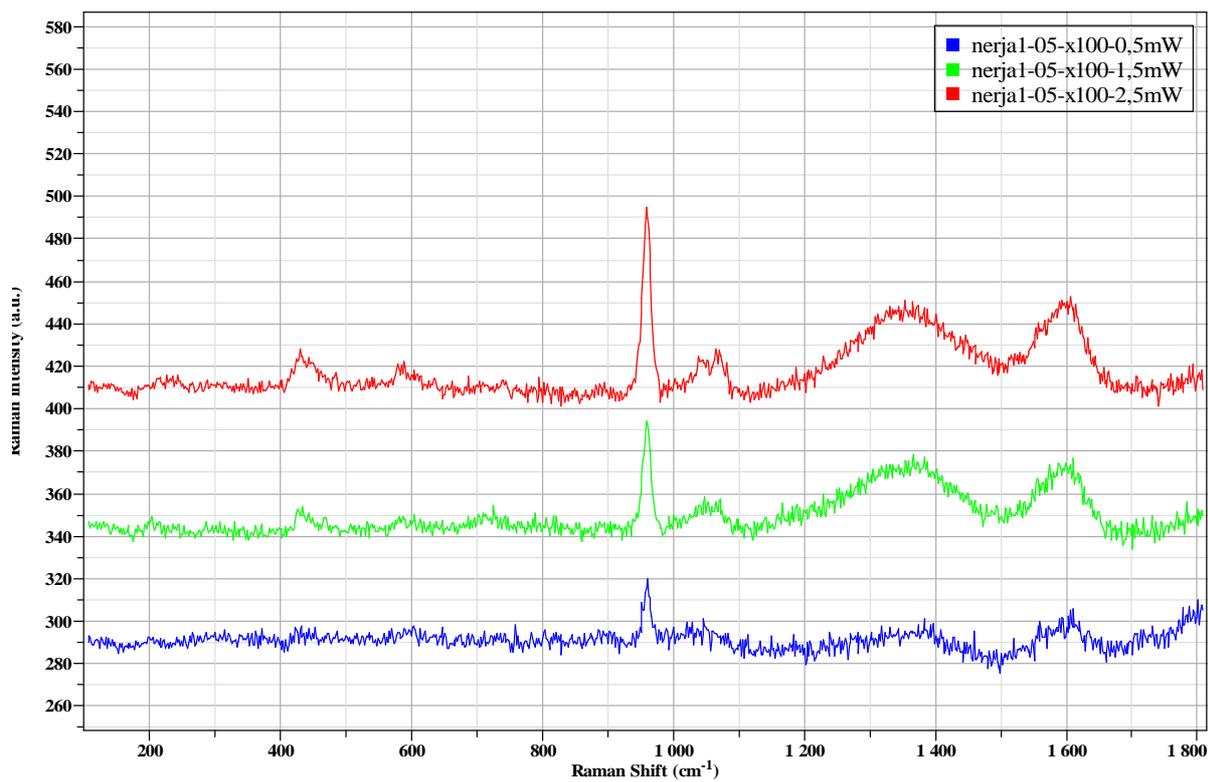
Espectros corregidos nerja1-04 (baseline sustraction):



Espectros originales nerja1-05:

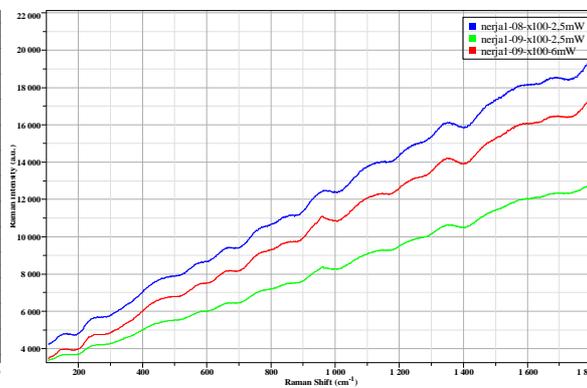
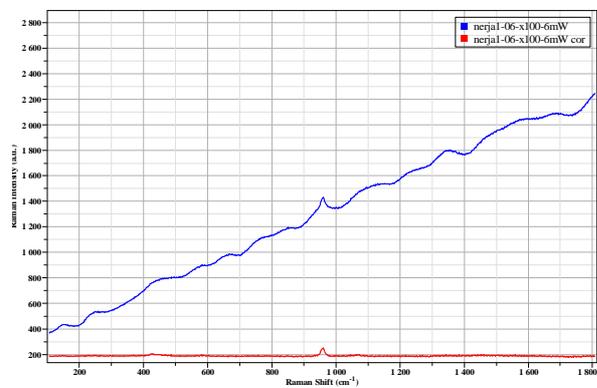


Espectros corregidos nerja1-04 (baseline sustraction):



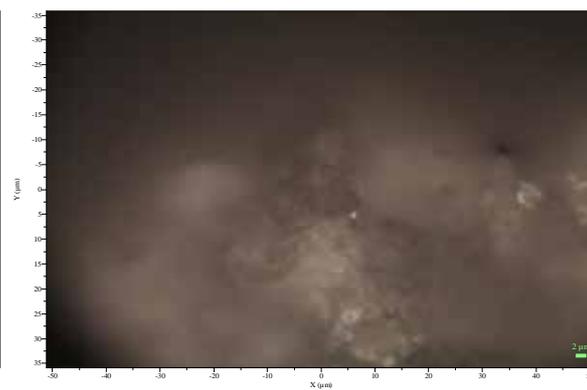
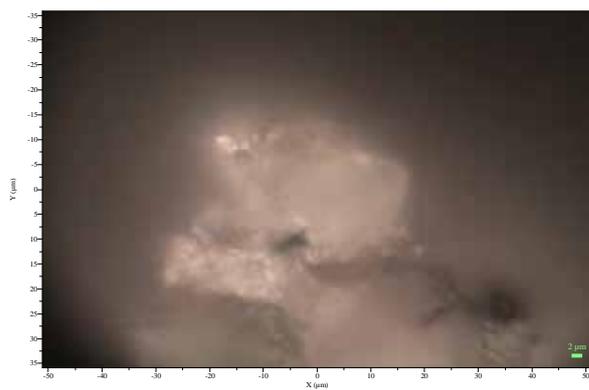
Espectros originales nerja1-06:

Espectros originales nerja1-08 & 09:



nerja1-08

nerja1-09:



ANEXO 4

Análisis molecular

El análisis molecular se realizó en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS-CSIC) de Sevilla. Se emplearon técnicas de análisis molecular para la identificación de bacterias, cianobacterias y eucariotas fotosintéticas. Las muestras analizadas mediante biología molecular se obtuvieron en las zonas Ne.1, Ne.2, Ne.4, Ne.8, Ne.10, Ne.11, Ne.11(b) y Ne.13 (Tabla 1).

Tabla 1. Puntos de muestreos y el tipo de análisis efectuado.

Muestras	Cianobacteria 106F/781R (A+B)		Arqueas 109F/915R		Bacterias 616F/1522R		Eucariotas EUKA/EUKB	
	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN
Ne1	+	+	+	+	+	+	+	-
Ne2	+	+	-	-	+	+	+	-
Ne8	+	+	-	-	+	+	-	-
Ne10	+	+	-	-	+	+	+	+
Ne11	+	-	+	-	+	+	+	-
Ne11Bmix	+	+	-	-	+	+	-	-
Ne13	+	+	-	+	+	+	+	+
Torca	+	+	+	+	+	+	-	-

* Se obtuvo muy poca cantidad de biomasa, por ello solo se realizó la extracción de ADN.

Resultados del análisis molecular de las muestras

Ne.1

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne1ARNBact-K16	35,7	88	<i>Rhodothermus marinus</i> (CP003029)	Bacteroidetes
Ne1ARNBact-K29	7,1	88	<i>Aliifodinibus sediminis</i> (NR118429)	
Ne1ARNBact-K15	7,1	84	<i>Aliifodinibus sediminis</i> (NR118429)	
Ne1ARNBact-K44	14,3	94	<i>Salinisphaera dokdonensis</i> (NR116116)	Gamma proteobacteria
Ne1ARNBact-K33	7,1	91	<i>Arhodomonas</i> sp. (JX099567)	Actinobacteria
Ne1ARNBact-K28	14,3	88	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	Alphaproteobacteria
Ne1ARNBact-K43	14,3	93	<i>Tepidamorphus gemmatus</i> (NR117452)	

Identificación de arqueas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne1ARNArch-K38	55	93	<i>Natronomonas moolapensis</i> (HF582854)	Euryarchaeota Halobacteria
Ne1ARNArch-K32	40	93	<i>Natronomonas moolapensis</i> (HF582854)	
Ne1ARNArch-K44	2,5	93	<i>Natronomonas moolapensis</i> (HF582854)	
Ne1ARNArch-K36	2,5	95	<i>Halococcus morrhuae</i> (NR113433)	

Ne. 2

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne2ARNBact-K56	7,1	89	<i>Aliifodinibus roseus</i> (NR118428)	Bacteroidetes
Ne2ARNBact-K58	7,1	89 88	<i>Aliifodinibus sediminis</i> (NR118429) <i>Aliifodinibus roseus</i> (NR118428)	
Ne2ARNBact-K67	14,3	95	<i>Salinisphaera halophila</i> (NR118239)	Gamma proteobacteria
Ne2ARNCya-K33	14,3	99	<i>Arthrobacter castelli</i> (NR042249)	Actinobacteria
Ne2ARNCya-K23	7,1	97	<i>Arthrobacter castelli</i> (NR042249)	
Ne2ARNBact-K45	14,3	92	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	
Ne2ARNBact-K33	7,1	91	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	
Ne2ARNBact-K12	7,1	92	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	
Ne2ARNBact-K17	7,1	91	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	
Ne2ARNBact-K27	7,1	92	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR044203)	
Ne2ARNCya-K11	7,1	87	<i>Nitriiruptor alkaliphilus</i> (NR 044203)	

Ne.8

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne8ARNBact-K33	91	93 93 93	<i>Parvibaculum indicum</i> (NR116565) <i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i> (NR104742) <i>Lutibaculum baratangense</i> (NR116954)	Alpha-proteobacteria
Ne8ARNBact-K23	9	90 90 90	<i>Tepidamorphus gemmatus</i> (NR117452) <i>Lutibaculum baratangense</i> (NR116954) <i>Rhodobium orientis</i> (NR029128)	Alpha-proteobacteria

Ne.10

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne10ARNBact-K31	25	99	<i>Pirellula</i> sp. (X86390)	Planctomycetes
Ne10ARNBact-K7	25	96	<i>Pirellula</i> sp. (X86390)	Planctomycetes
Ne10ARNCya-K40	25	95	<i>Nitriiliruptor alkaliphilus</i> (NR 044203)	Actinobacteria
Ne10ARNCya-K63	25	95	<i>Serinicoccus profundus</i> (NR116387)	Actinobacteria

Ne.11 (gelatinoso)

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne11BmixARNBactK24	16,7	89 90	<i>Reyranella massiliensis</i> (NR116005) <i>Pedomicrobium americanum</i> (NR104908)	Alphaproteobacteria
Ne11BmixARNBactK37	16,7	91 91	<i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> (NR108192) <i>Solirubrobacter soli</i> (NR041365)	Actinobacteria
Ne11BmixARNBactK19	16,7	91 91	<i>Blastochloris viridis</i> (NR117911) <i>Blastochloris sulfoviridis</i> (AB033757)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)
Ne11BmixARNBactK39	16,7	90 90 90	<i>Shinella zoogloeoides</i> (AB698675) <i>Chelativorans</i> sp. (NR102912) <i>Mesorhizobium</i> sp. (D84623)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)
Ne11BmixARNBactK15	16,7	99	<i>Propionibacterium acnes</i> (CP003084)	Actinobacteria
Ne11BmixARNBactK20	16,7	91 91	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> (KM374752) <i>Mesorhizobium shangrilense</i> (KM374753)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)

Ne.11

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne11ARNBact-K8	9,5	92	<i>Aquamicrobium aerolaum</i> (NR116910)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)
Ne11ARNBact-K36	4,8	80	<i>Caloramator uzoniensis</i> (AY102936)	Firmicutes
Ne11ARNBact-K38	4,8	88	<i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	Chloroflexi
Ne11ARNBact-K24	4,8	94	<i>Acidibacter ferrireducens</i> (NR126260)	Gammaproteobacteria
Ne11ARNBact-K33	4,8	92	<i>Patulibacter americanus</i> (AJ871305)	Actinobacteria
Ne11ARNBact-K26	4,8	89 89	<i>Devosia</i> sp. (EF554909) <i>Nordella oligomobilis</i> (NR114615)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K28	4,8	86	<i>Pirellula staleyii</i> (NR074521)	Planctomycetes
Ne11ARNBact-K16	4,8	92 91	<i>Oceanicella actignis</i> (JQ864436) <i>Pleomorphobacterium xiamenense</i> (NR109312)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K37	4,8	99	<i>Brevundimonas abyssalis</i> (NR114308)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K35	4,8	96	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> (CP005587)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K10	4,8	90	<i>Fodinicurvata fenggangensis</i> (NR044596)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K4	4,8	91	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> (NR116910)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K32	4,8	89	<i>Chelatococcus</i> sp. (GQ871857)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)
Ne11ARNBact-K2	4,8	84 84	<i>Phycisphaera mikurensis</i> (NR074491) <i>Algisphaera agarilytica</i> (NR125472)	Planctomycetes
Ne11ARNBact-K19	4,8	84 84	<i>Phycisphaera mikurensis</i> (NR074491) <i>Algisphaera agarilytica</i> (NR125472)	Planctomycetes
Ne11ARNBact-K9	4,8	97 97 97	<i>Carbophilus carboxidus</i> (NR104931) <i>Mesorhizobium ciceri</i> (NR074211) <i>Aminobacter aminovorans</i> (NR025301)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K1	4,8	97 97	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (NR104954) <i>Hyphomicrobium vulgare</i> (NR104697)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K23	4,8	95	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (NR104954)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)
Ne11ARNBact-K20	4,8	90 90	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> (NR116910) <i>Sinorhizobium arboris</i> (NR113890)	Alphaproteobacteria
Ne11ARNBact-K22	4,8	91	<i>Aquamicrobium aerolatum</i> (KM374752)	Alphaproteobacteria (Rhizobiales)

Ne.13

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
Ne13ADNBact-K40	26,7	98 97 97	<i>Actinobispora</i> sp. (EU274329) <i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (NR108504) <i>Pseudonocardia bannensis</i> (NR108389)	Actinobacteria
Ne13ADNBact-K15	6,7	88	<i>Rubrobacter bracaensis</i> (HE672088)	
Ne13ADNBact-K39	6,7	95 95	<i>Amycolatopsis echigonensis</i> (NR041404) <i>Amycolatopsis rubida</i> (NR025072)	

Ne13ADNBact-K23	6,7	90	<i>Taonella mepensis</i> (JN693496)	Alpha-proteobacteria
Ne13ADNBact-61	6,7	95 95	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> (AB649022) <i>Sphingomonas alpina</i> (HF930755)	
Ne13ADNBact-K77	6,7	93	<i>Azospirillum</i> sp. (DQ387440)	
Ne13ARNBact-K18	6,7	98	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AY429705)	
Ne13ARNBact-K57	6,7	92 92	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> (AB649022) <i>Sphingomonas vermicomposti</i> (NR104550)	
Ne13ADNBact-K60	6,7	84	<i>Fibrobacter intestinalis</i> (NR042150)	Fibrobacteres
Ne13ADNBact-K11	6,7	88	<i>Sphaerobacter thermophiles</i> (CP001824)	Chloroflexi
Ne13ADNBact-K79	6,7	82	<i>Nitrosococcus halophilus</i> (NR114774)	Gamma-proteobacteria
Ne13ADNBact-K87	6,7	95 95	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634) <i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	Acidobacteria

Ne. 4 (Torca)

Identificación de bacterias

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
TorcaARNBact-K27	60	93 93 93	<i>Methylobacteria halotolerans</i> (NR125613) <i>Parvibaculum indicum</i> (NR116565) <i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i> (NR104742)	Alpha-proteobacteria (Rhizobiales)
TorcaARNBactK22	20	90 90 90	<i>Methylobacteria halotolerans</i> (NR125613) <i>Methylobacteria solikamskensis</i> (NR125614) <i>Dichotomicrobium thermohalophilum</i> (NR104742)	Alpha-proteobacteria (Rhizobiales)
TorcaARNBactK1	20	93	<i>Tepidamorphus gemmatus</i> (NR117452)	Alpha-proteobacteria (Rhizobiales)

Identificación de arqueas

Clon representativo	Abundancia de clones (%)	Similitud (%)	Identificación (número de acceso)	Rango taxonómico
TorcaARNAArch-K24	53,5	92	<i>Natronomonas moolapensis</i> (NR102519)	Euryarchaeota Halobacteria
TorcaARNAArch-K4	41,9	92	<i>Natronomonas moolapensis</i> (NR102519)	
TorcaARNAArch-K39	2,3	96 96 96	<i>Halococcus thailandensis</i> (NR113139) <i>Halococcus morrhuae</i> (NR113433) <i>Halococcus dombrowskii</i> (NR113431)	
TorcaARNAArch-K3	2,3	93	<i>Natronomonas moolapensis</i> (NR102519)	

