

CYANIDIUM SP. COLONIZADORA DE CUEVAS TURÍSTICAS

Y. del Rosal¹, V. Jurado², M. Roldán³, M. Hernández-Mariné⁴ y C. Saiz-Jiménez²

¹ Instituto de Investigación Cueva de Nerja, Fundación Cueva de Nerja, 29787 Nerja, Málaga; yolanda@cuevadenerja.es

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, código postal Sevilla; yjurado@irnase.csic.es; saiz@irnase.csic.es

³ Servicio de Microscopía, Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona; monica.roldan@uab.es

⁴ Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona; marionahernandez@ub.edu

Introducción

Las cuevas albergan variados grupos de microorganismos, entre los que se encuentran los de metabolismo fotosintético, que se desarrollan en las zonas iluminadas.^{1,2} En general, estos microorganismos forman parte de comunidades estructurales complejas denominadas biofilms, que también pueden estar formados por microorganismos heterótrofos e incluso pequeños invertebrados. De forma natural, los organismos fotosintéticos colonizan las zonas más externas de las cuevas pero en las cuevas turísticas, el sistema de iluminación eléctrica permite su desarrollo en las zonas más profundas, alrededor de los focos de luz. En estos medios es común la presencia de una flora que se relaciona con la otros ambientes aerofíticos, cuyo desarrollo depende de la biorreceptividad del sustrato y de las condiciones ambientales disponibles. La disponibilidad de algunos requisitos como agua, radiación fotosintética activa (PAR) o propiedades del sustrato determinan el tipo de microorganismo presente y su abundancia.

En este trabajo se muestran los resultados del análisis de biofilms fotosintéticos de dos cuevas turísticas del sur de España (Málaga), que han permitido identificar una especie del género *Cyanidium* sp. El género *Cyanidium* pertenece al grupo de las Cyanodiophyceae, algas rojas unicelulares primitivas de pequeño tamaño y gran resistencia. Este género incluye grupos morfológicamente similares³, descritos a partir de hábitats extremófilos geotermales y de hábitats no termófilos ni ácidos, como rocas de acantilados y cuevas, donde habitan morfoespecies mesófilas identificadas morfológicamente y corroboradas molecularmente.^{4,5}

Material y Método

Los biofilms analizados se desarrollaban en espeleotemas de la Cueva de Nerja (Nerja, Málaga) y de la Cueva del Tesoro (Rincón de la Victoria, Málaga), ubicadas en la costa y separadas entre sí por unos 45 km aproximadamente. En la Cueva de Nerja, la monitorización ambiental ha permitido conocer los datos de temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono del aire de las Galerías Turísticas, que registran una media anual de 18,2 °C, 82 % y 667 ppm respectivamente⁶. El estudio ambiental de la Cueva del Tesoro determinó un gradiente de temperatura, humedad relativa y concentración de dióxido de carbono en el aire que aumentaba desde las zonas más externas hacia las más internas, con datos que oscilaban entre 15,8-22,7 °C, 85-100 % y 375-20.000 ppm respectivamente.⁷

El estudio morfológico de los biofilms fotosintéticos se basó en la combinación de técnicas de microscopía. Las características de especies individuales se observaron mediante microscopía convencional, microscopía confocal y técnicas de microscopía electrónica. La identificación taxonómica se basó en Ettl y Gärtner⁵ y Albertano et al.³ La observación directa de material de campo y de cultivos de enriquecimiento 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. La microscopía confocal se empleó para observar los microorganismos vivos y las imágenes se obtuvieron mediante un equipo Leica TCS-SP5 CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) y un objetivo Plan-Apochromatic 63 (NA 1.4, glicerol). Los biofilms fueron observados mediante multicanales de detección⁸ y la fluorescencia de los pigmentos de clorofila y ficobilinas permitió identificar a los microorganismos en el interior de los biofilms y establecer su relación con el sustrato. La observación de las muestras mediante microscopio

electrónico de barrido se basó en Roldán y Hernández-Mariné² y se empleó un Quanta 200, FEI y EDAX que también permitió utilizar técnicas complementarias de espectroscopía de rayos X y electrones retrodispersados. La ultraestructura celular se observó mediante un equipo de microscopía electrónica de transmisión JEOL 1010 TEM (Jeol, Japan) a 80 kV de aceleración según Hernández-Mariné et al.⁹ Finalmente, se identificaron los microorganismos mediante el empleo de técnicas de biología molecular. La extracción de ADN se llevó a cabo según Cañaveras et al.¹⁰ Para el análisis de la diversidad microbiana se emplearon las secuencias de los genes ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) para bacterias y ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) para hongos y algas.

Resultado

Las variables ambientales en las zonas de estudio se correspondieron con los registros generales descritos para la cavidad. El rango de radiación fotosintética activa (PAR) osciló entre 0,15-10,5 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. En los biofilms, *Cyanidium* sp. se observó como único organismo fotosintético o junto a *Chroococcidiopsis* sp., con frecuencia por debajo de éste. Estos biofilms formaban una fina pátina color verde azulado intenso, de aspecto pulverulento y fácil disgregación, que recubría irregularmente la superficie del sustrato y penetraba entre los cristales a una profundidad no superior a 1 mm (Figura 1). Este desarrollo casmoendolítico contribuye al cambio de color y a la bioerosión del sustrato colonizado. La composición del sustrato, formado por cristales de calcita, con o sin magnesio y mezclas con arena y arcilla, no pareció ser determinante en la presencia de *Cyanidium* sp. aunque se observó menor desarrollo en las muestras con mayor proporción cristales (Figura 2).

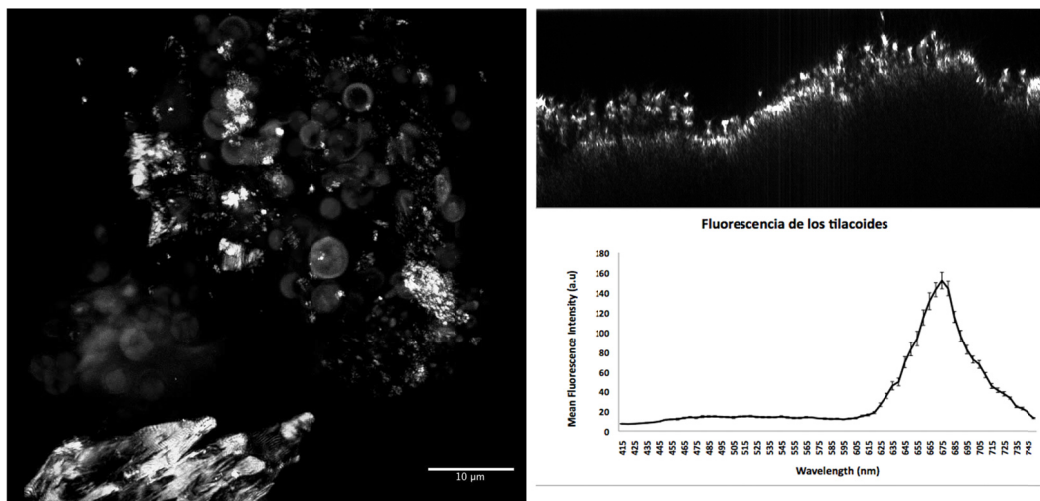


Figura 1. Izquierda, distribución de los organismos en la superficie y entre gránulos de sustrato inorgánico (color blanco). Derecha, plano único perpendicular al sustrato que muestra la irregularidad del biofilm (arriba) y espectro de emisión de los pigmentos fotosintéticos de *Cyanidium* sp. con máximos a 650 y 670 nm, correspondientes a la ficocianina y la aloficocianina y un shoulder a 690 nm, debido a la clorofila *a* (debajo).

A nivel celular el organismo presenta células azuladas, esféricas o levemente apiramidadas, con un cloroplasto ovoidal y sin pirenoide (Figura 3). La reproducción es asexual, cada célula forma cuatro autosporas que se disponen en forma de tetraedro dentro de la membrana maternal. El tamaño de las células es de 2-(3,5)- 5,5 (n=50) μm de diámetro y de las autosporas de 1,7- 2-3 μm de diámetro cada una. La liberación de las autosporas se produce por rotura de la membrana maternal, de tamaño alrededor de 25 nm de diámetro, que pasará a formar parte del biofilm (Figura 3). El espectro de emisión de los pigmentos de *Cyanidium* sp. indica la presencia de clorofila *a* y ficobilinas (ficocianina y aloficocianina) (Figura 1). El análisis de las secuencias del ARNr 16S (Ne2ARNCya-K41, Ne2ARNCya-K26, Ne2ARNCya-K51, Ne2ARNCya-K49) dio resultados prácticamente idénticos para todos ellos, por lo que pueden relacionarse las cepas de la Cueva de Nerja con el *Cyanidium* sp. de Monte Rotaro (Italia)¹¹⁵ y con el de Atacama (Chile)⁴, con similitudes del 95,1 % y 95,5 %, respectivamente. Con la cepa de la cueva Sybil (Italia)¹⁰ la similitud fue menor, del 92,5%.^{3,4} La similitud con *Cyanidium caldarium* extremófilo fue del 50,4%.

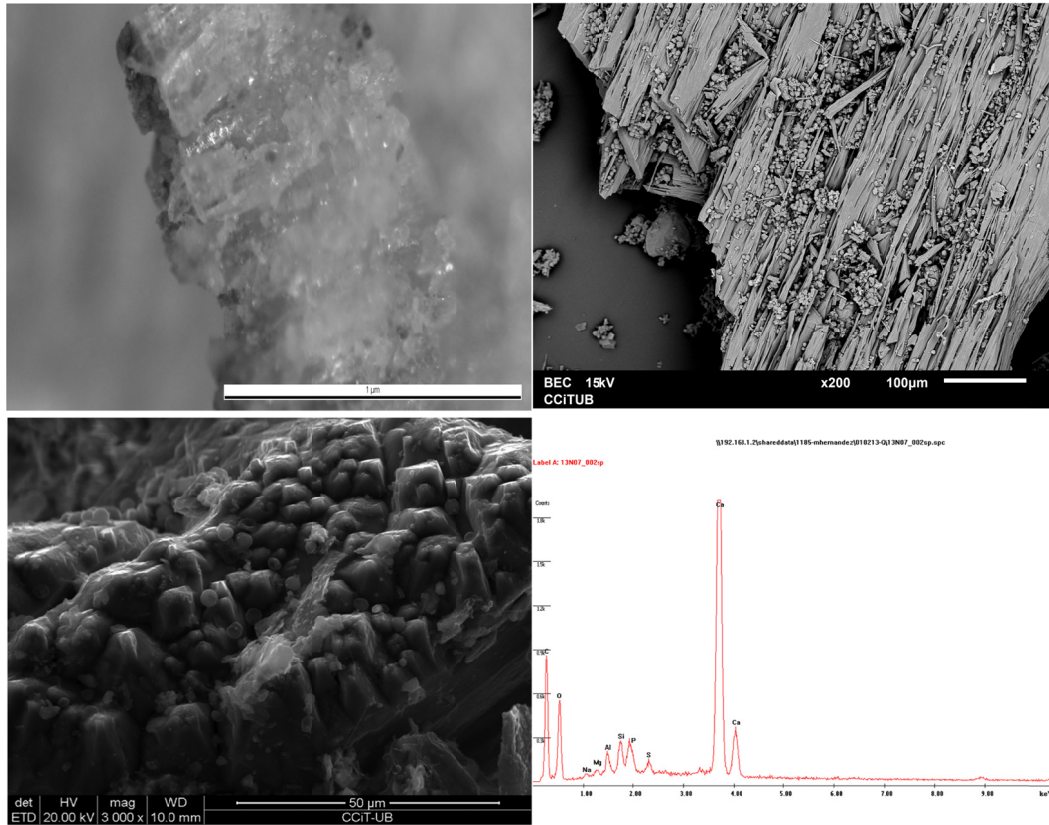


Figura 2. Arriba, desarrollo casmoendolítico de *Cyanidium* sp. entre las láminas de calcita y sobre el sustrato. Debajo, espectro que muestra la composición química del organismo y del sustrato (derecha) y zona analizada (izquierda).

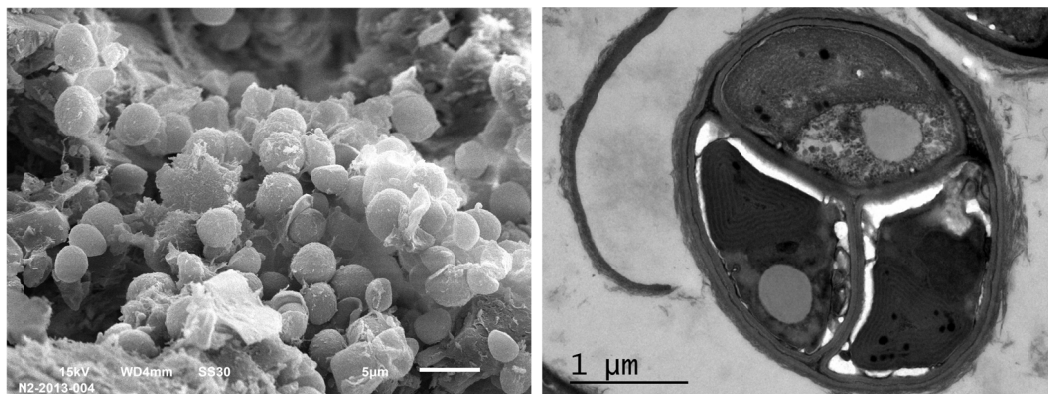


Figura 3. Aspecto de biofilm con *Cyanidium* sp. y restos de vainas maternas (izquierda) y célula de *Cyanidium* sp. con tres autosporas en el plano y gruesa membrana. También se observa un único cloroplasto ovoide, una mitocondria, una vacuola y el núcleo (derecha).

Discusión y conclusiones

La intensidad de la iluminación, natural o artificial y la aparente ausencia de estacionalidad son características que influyen en la distribución y composición de los biofilms fotosintéticos en cuevas naturales y artificiales, junto con la temperatura, la humedad, y la disponibilidad de agua líquida.^{1,12,2}

Las citas del género *Cyanidium*, identificados mediante la morfología y procedentes de hábitats no extremófilos son muy escasas.^{13,14,15} Las primeras morfoespecies del género *Cyanidium* que no habitaban ecosistemas ácidos o calderas volcánicas fueron descritas a partir de muestras procedentes de

cuevas (*C. chilense*)¹⁴ y de fisuras de rocas costeras¹⁵, ambas en Chile. Posteriormente, mediante análisis molecular se han descrito tres especies de *Cyanidium* aerofíticos no extremófilos, dos de ellos *Cyanidium* sp. Monte Rotaro¹¹ y *Cyanidium* sp. Sybil cave,¹¹ habitantes de las cuevas italianas de Monte Rotaro y Sybil Cave y el tercero, *Cyanidium* sp. Atacama,⁴ en una cueva de la costa chilena. La morfoespecie de *Cyanidium* mesófilo descrita en la Cueva de Nerja presentó una similitud del 95 % con las morfoespecies descritas en Monte Rotaro y Atacama. La información sobre la fisiología y requerimientos de los *Cyanidium* extremófilos es abundante.^{16,17} Se conoce que no resisten la desecación, por lo que se consideran organismo relictos que no pueden dispersarse el aire¹⁸ y, en ambientes extremadamente secos, colonizan las capas subsuperficiales. Se desconoce si las morfoespecies de *Cyanidium* no extremófilos comparten las mismas características, aunque es probable en base a la semejanza de los ambientes donde han sido descritos.

En relación con la limpieza de los espeleotemas, el desarrollo casmoendolítico de las morfoespecies descritas en las cuevas de Nerja y Tesoro desaconseja su limpieza mecánica, que destruiría la superficie mineral sin eliminar los organismos de las zonas profundas. Este desarrollo también complica la eficacia de los biocidas, en caso de ser empleados. Por tanto, para conseguir limitar su crecimiento es preciso conocer su relación con el sustrato y la dependencia de los factores ambientales.

¹ P. Albertano, in B.A. Whitton (Ed.), *Ecology of Cyanobacteria II. Their Diversity in Space and Time*, Durham, Springer, **2012**, pp. 317-343.

² M. Roldán, M. Hernández-Mariné, *International Journal of Speleology*, **2009**, *38*, 41-53.

³ P. Albertano, C. Ciniglia, G. Pinto, A. Pollio, *Hydrobiologia*, **2000**, *433*, 137-143.

⁴ A. Azúa-Bustos, C. González, R.A. Mancilla, L. Salas, R.E. Palma, J.J. Wynne, C.P. McKay, R. Vicuña, *Microb. Ecol.*, **2009**, *58*, 485-496.

⁵ H. Ettl, G. Gärtner, *Syllabus der Boden, Luft und Flechtenalgen*, Stuttgart /Jena / New York, G.Fischer, **1995**.

⁶ C. Liñán, Y. del Rosal, F. Carrasco, in J.M. Calaforra, J.J. Durán (Eds.), *Actas del I Congreso Iberoamericano y V Congreso español sobre cuevas turísticas. Iberoamérica subterránea*, Madrid, ACTE, **2014**, pp. 229-238.

⁷ M. Hoyos, V. Soler, J.C. Cañaveras, S. Sánchez, E. Sanz, *Estudio de la delimitación de las áreas de protección de las cuevas del Tesoro-Higuerón-Rincón de la Victoria (Rincón de la Victoria, Málaga)*, informe inédito, **1996**.

⁸ M. Roldán, F. Thomas, S. Castel, A. Quesada, M. Hernández-Mariné, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2004**, *70*, 3745-3750.

⁹ M. Hernández-Mariné, E. Clavero, M. Roldán, *Limnetica*, **2004**, *23(1-2)*, 179-186.

¹⁰ J.C. Cañaveras, A. Fernández-Cortés, J. Elez, S. Cuezva, V. Jurado, A. Zelia Miller, M. A. Rogerio-Candelera, D. Benavente, M. Hernandez-Mariné, C. Sáiz-Jiménez, S. Sánchez-Moral, *Science of the Total Environment*, **2015**, *518-519*, 65-77.

¹¹ C. Ciniglia, H.S. Yoon, A. Pollio, G. Pinto, D. Bhattacharya, *Mol. Ecol.*, **2004**, *13*, 1827-1838.

¹² M. Hernández-Mariné, E. Clavero, E., M. Roldán, *Arch. Hydrobiol. Algological Studies*, **2003**, *109*, 229-240.

¹³ M.E. García-Fernández, M. Aboal, *Acta Botanica Malacitana*, **2011**, *36*, 164-169.

¹⁴ G.H. Schwabe, *Verhn. Deutsch. Wiss. Ver. Santiago de Chile*, **1936**, *3*, 113-174.

¹⁵ G.H. Schwabe, *Mitt. Ditsch. Ges. Nat.- Völk. Ostasiens*, **1944**, *21*, 129-239 y 240-300.

¹⁶ D.J. Skorupa, V. Reeb, R.W. Castenholz, D. Bhattacharya, T.R. McDermott, *Lett. Appl. Microbiol.*, **2013**, *57(5)*, 459-466.

¹⁷ H.S. Yoon, K.M. Muller, R.G. Sheath, F.D. Ott, D. Bhattacharya, *Journal of Phycology*, **2006**, *42*, 482-492.

¹⁸ D.W. Smith, T.D. Brock. *J. Gen. Microbiol.*, **1973**, *79(2)*, 219-231.