

Impacto de un evento de inundación en la comunidad bacteriana de un ecosistema subterráneo somero (Cueva del Pindal, Asturias)

Tamara MARTÍN POZAS ⁽¹⁾, Soledad CUEZVA ROBLEÑO ⁽²⁾, Ángel FERNÁNDEZ CORTÉS ⁽³⁾,
María GONZÁLEZ-PUMARIEGA SOLÍS ⁽⁴⁾, Elsa DUARTE MATÍAS ⁽⁵⁾,
Marco De la RASILLA VIVES ⁽⁵⁾, Juan Carlos CAÑAVERAS JIMÉNEZ ⁽⁶⁾,
David BENAVENTE ⁽⁶⁾, José Luis GOY GOY ⁽⁷⁾, Javier ELEZ VILLAR ⁽⁷⁾, Cesáreo SAIZ
JIMÉNEZ ⁽⁸⁾, Caridad ZAZO CARDEÑA ⁽¹⁾, Sergio SÁNCHEZ MORAL ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Museo Nacional de Ciencias Naturales, MNCN-CSIC. Madrid.

tmpozas@mncn.csic.es, carizazo@mncn.csic.es, ssmilk@mncn.csic.es

⁽²⁾ Departamento de Geología, Geografía y CC. Ambientales, Universidad de Alcalá de Henares.
soledad.cuezva@uah.es

⁽³⁾ Departamento de Biología y Geología, Universidad de Almería. acortes@ual.es

⁽⁴⁾ Consejería de Cultura del Principado de Asturias. maria.glez-pumariegasolis@asturias.org

⁽⁵⁾ Departamento de Historia. Universidad de Oviedo. mrasilla@uniovi.es

⁽⁶⁾ Departamento de Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. Universidad de Alicante.
jc.canaveras@ua.es, david.benavente@ua.es

⁽⁷⁾ Departamento de Geología, Universidad de Salamanca. josegoy@usal.es

⁽⁸⁾ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, IRNAS-CSIC. Sevilla. saiz@irnase.csic.es

Resumen

La Cueva del Pindal (Ribadedeva, Asturias) y su arte rupestre paleolítico forman parte de la Lista del Patrimonio Mundial de la UNESCO desde 2008. Actualmente está abierta al público con visitas limitadas y en ella se desarrolla un proyecto de investigación sobre actividad microbiana en ecosistemas naturales subterráneos y su aplicación al diseño de estrategias de conservación. El sistema kárstico del Pindal se desarrolla en un macizo calcáreo modelado en forma de terrazas marinas (rasas), situadas entre 30 y 68 metros s.n.m que constituyen el área de captación hídrica preferente y en las que se observan numerosas estructuras exokársticas tipo dolina y polje. Sobre una de las dolinas, situada casi en la vertical de la cavidad, se instaló una explotación ganadera en 1995. El 23 de octubre de 2019 tras un episodio extremo de precipitaciones (209 l/m²) se produjo una fuerte acumulación de agua en la dolina y una entrada masiva de agua y sedimentos en la cueva. El 31 de octubre se realizó un muestreo específico para conocer los cambios provocados en el ecosistema subterráneo. La inundación provocó un fuerte incremento de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio disponibles en los sedimentos y modificaciones muy significativas en la composición de las comunidades microbianas presentes en los sedimentos: aparición de nuevos filos bacterianos (*Firmicutes* y *Bacteroidetes*), incluyendo grupos de bacterias patógenas oportunistas (*Corynebacterium*, *Thauera*, *Clostridiales*) y la casi total desaparición de otros (*Rokubacteria* y *Nitrospirae*). Los resultados confirman que el agua y sedimentos arrastrados al interior de la cueva en la inundación fueron acompañados de residuos procedentes de la explotación ganadera, demostrando el alto grado de vulnerabilidad de este tipo de ambientes. Tras el estudio e

informe correspondiente, la actividad ganadera cesó en 2021 y continúa el estudio de las poblaciones microbianas para conocer su evolución a medio-largo plazo.

Palabras clave: Cueva del Pindal, arte rupestre, conservación, microbiología, inundación.

Impact of a flood event on the bacterial community of a shallow subterranean ecosystem (Pindal Cave, Asturias)

Abstract

Pindal Cave (Ribadedeva, Asturias) and its paleolithic cave art have been part of the UNESCO World Heritage List since 2008. The cave is currently open to the public with limited visits and a research project on the microbial activity in underground ecosystems is being carried out. The Pindal karstic system develops in a calcareous massif modeled in the form of wave cut platform (rasas), located between 30 and 68 meters a.s.l. These rasas constitute the preferred water catchment area in which numerous sinkhole and polje-type exokarstic structures can be observed. On one of the sinkholes, located almost vertically in the cavity, a livestock farm was installed in 1995. On October 23, 2019, after an extreme episode of rainfall (209 l/m²), there was a strong accumulation of water in the sinkhole and a massive entry of water and sediment into the cave. On October 31, a specific sampling was carried out to study the changes caused in the underground ecosystem. The flood caused a strong increase in organic matter, nitrogen, available phosphorus and potassium in the sediments and very significant changes in the composition of the microbial communities present in the sediments: appearance of new bacterial phyla (Firmicutes and Bacteroidetes), including groups of opportunistic bacterial pathogens (Corynebacterium, Thauera, Clostridiales) and the almost complete disappearance of others (Rokubacteria and Nitrospirae). The results confirm that water and sediments dragged into the cave in the flood were accompanied by manure from the livestock exploitation, demonstrating the high degree of vulnerability of this type of environment. After the study and corresponding report, the livestock activity ceased in 2021 and the study of the microbial populations continues to know their evolution in the medium-long term.

Keywords: Pindal Cave, rock art, conservation, microbiology, flooding

Introducción

La Cueva del Pindal (Asturias) fue el primer descubrimiento de arte parietal paleolítico en Asturias en 1908. Desde 2008 forma parte de la Lista del Patrimonio Mundial de la UNESCO, inscrita como Cueva de Altamira y Arte Rupestre Paleolítico del Norte de

España. El Área de Protección fue delimitada en 2009 por el Principado de Asturias. El conjunto de arte en El Pindal incluye numerosas figuras pintadas y grabados, con un panel principal, situado a unos 250 m de la entrada, en el que destacan la figura prominente de una cierva, un pequeño mamut, trazos breves y signos complejos y un grupo magdalenense de pinturas rojas -bisontes, caballo, claviformes pirenaicos y series de puntos- rodeado de bisontes y caballos grabados (González-Pumariega, 2011). En la actualidad la cueva del Pindal está abierta al público con visitas guiadas limitadas, 5 días a la semana durante todo el año.

En el año 2001 se realizó un estudio puntual del estado de conservación de varias cuevas de Asturias (Sánchez-Moral *et al.*, 2002) entre las que se encontraba la Cueva del Pindal. En dicho estudio, se llevó a cabo un mapeo de los niveles de colonización microbiológica y del estado de conservación de la roca soporte. Las conclusiones de dicho estudio fueron que el estado de conservación del arte rupestre era relativamente bueno y se veía afectado por procesos naturales de lavado por escorrentía parietal. La amplia entrada con luz natural, favorecía el desarrollo de briofitos y colonias microbianas en los primeros 50 metros, pero hacia el interior, la roca soporte, los suelos acondicionados para las visitas y los sedimentos internos naturales se mantenían en un buen estado de conservación. Posteriormente, desde 2017 la cueva se estudia en un proyecto de investigación sobre actividad microbiana en ecosistemas naturales subterráneos y su aplicación al diseño de estrategias de conservación (proyecto SUBSYST). Este estudio incluye monitorización medioambiental y seguimiento isotópico de gases, junto a un detallado estudio para caracterizar las poblaciones microbianas presentes en diferentes sustratos de la cavidad y los procesos de interacción microbio-mineral en la interfaz aire-roca/espeleotema/sedimento.

En las primeras observaciones realizadas en el marco de ese proyecto se pudo advertir, en comparación con 2001, una extraordinaria proliferación de colonias microbianas y depósitos tipo *moonmilk* sobre los sedimentos, espeleotemas y roca soporte de la zona interna de la cueva. Tras dos años de estudio, el 23 de octubre de 2019 se produjo un evento de inundación por un episodio de precipitaciones registrado entre los días 19 y 23 de octubre en el que se acumuló un total de 209 l/m² con un máximo de 113,6 litros en 24 horas (18h del 22 a 18h del 23 de octubre). Desde el Museo Arqueológico de Asturias se solicitó la prestación de un servicio consistente en realización urgente de análisis químicos y microbiológicos de los sedimentos tras la inundación con el objetivo de conocer las consecuencias del evento y los daños producidos. La llegada masiva de agua y sedimentos arrastrados desde el exterior modificó de forma sustancial las condiciones ambientales en toda la zona interna afectada, surgiendo la necesidad y oportunidad de estudiar específicamente su impacto en las comunidades microbianas del ecosistema subterráneo.

En este trabajo se presentan los resultados de los análisis geoquímicos y microbiológicos realizados en las muestras de sedimentos recogidas en la Cueva del Pindal, en la campaña realizada solo unos días después de la inundación (31 de octubre de 2019) y su comparación con muestras tomadas previamente. Asimismo, se describen las principales características

geomorfológicas y de captación hídrica del sistema kárstico como principales factores condicionantes del origen de la inundación.

Material y métodos

Aspectos climáticos y geomorfológicos

El clima de la región tiene estaciones bien diferenciadas, con una temperatura media del aire de unos 12 °C y un nivel anual de precipitaciones unos 1150 mm. La cueva tiene una longitud de 590 m (314 m abiertos al turismo), con un patrón de desarrollo E-O y 110° N (ONO-ESE) y una única entrada a 24 m s.n.m. Para la obtención de un mapa geomorfológico del entorno de la cueva se combinó fotointerpretación clásica de pares estéreo de vuelos de 1956 y mapeo en entorno basado en SIG. El modelo de elevación digital (MED, píxel de 1 m) se obtuvo interpolando las primeras llegadas terrestres de LIDAR en formato ráster (datos originales de LIDAR del IGN) y los mapas se proyectan en el sistema geográfico ETRS89 h30. Del mismo MED se obtuvo la red de drenaje en un Sistema de Información Geográfica (Tarboton, 1997).

Estrategia de muestreo y metodología analítica

El 31 de octubre se realizó una campaña de urgencia en la Cueva del Pindal en la que se procedió al muestreo de sedimentos y aire de la cueva. Para la localización de las muestras se empleó el balizado de iluminación de la cueva, desde la entrada (Baliza 1) hasta el final de la zona visitable (Baliza 18). En ese momento la cueva ya había desaguado y los efectos de la inundación, una semana después del evento, eran aún evidentes. La acumulación de agua afectó a gran parte de la cavidad (desde Baliza 6 a Baliza 14) y conllevó la llegada de nuevos materiales arenosos al cauce interior y la decantación de materiales limosos que se situaron sobre los ya existentes. Las muestras de sedimentos se tomaron en tres puntos (figura 1 y tabla 1) para su posterior análisis y comparación con materiales muestreados en marzo de 2019, antes de que se produjera la inundación.

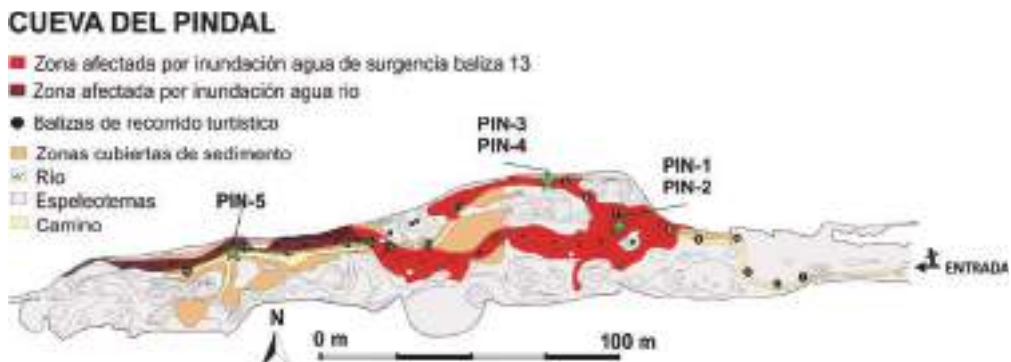


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo de sedimentos del 31 de octubre de 2019.

Muestra	Zona	Descripción
PIN-1	Baliza 7	Sedimentos de desborde del cauce por inundación reciente
PIN-2	Baliza 7	Sedimentos arenosos del cauce previos a inundación
PIN-3	Baliza 9	Sedimentos de decantación producto de la inundación
PIN-4	Baliza 9	Sedimentos previos a la inundación, situados bajo PIN-3
PIN-5	Baliza 17	Sedimentos de desborde del cauce por inundación reciente

Tabla 1. Listado y descripción de las muestras de sedimentos del 31 de octubre de 2019.

El análisis mineralógico se realizó mediante Difracción de Rayos X (DRX) en un difractómetro Philips PW-1710 del MNCN-CSIC.

El análisis biogeoquímico se llevó a cabo en el Servicio de Análisis del IRNAS-CSIC mediante métodos detallados por Martín-Pozas *et al.* (2022).

Se tomaron cuatro muestras de sedimentos para un análisis microbiológico en los mismos puntos donde se había muestreado previamente en noviembre de 2017. El muestreo de



Figura 2. Localización de los puntos de muestreo microbiológico de octubre de 2019 (después de la inundación) y noviembre de 2017 (antes de la inundación).

2017 se había realizado en dos puntos: uno totalmente colonizado por *moonmilk* y otro sin colonizaciones microbianas visibles, según se muestra en la figura 2.

La primera zona de muestreo, denominada *Moonmilk Area* se correspondía con una zona de sedimento totalmente cubierta con *moonmilk* de calcita, un depósito mineral secundario originado por el metabolismo de actinobacterias (Martin-Pozas *et al.*, 2022). La segunda zona de muestreo o *Soil Area* se correspondía con una zona de sedimento desnuda, sin presencia de *moonmilk*. En ambas zonas se tomaron muestras a dos profundidades (0-1.5 y 1.5-3 cm), usando una espátula de acero estéril. Inmediatamente después, las muestras se suspendieron en DNA / RNA Shield™ en tubos de polipropileno estériles. Durante el transporte, todas las muestras se almacenaron a 4 °C, en oscuridad y se congelaron (-80 °C) para la posterior extracción de ADN.

En el Laboratorio de Monitorización Geoambiental del MNCN-CSIC, se extrajo el ADN de las diferentes muestras utilizando el kit DNeasy Power Soil de Qiagen. Para el análisis de utilizaron técnicas de secuenciación masiva (NGS) por amplificación de las regiones V3 y V4 del gen 16S rARN empleando los primers específicos para bacterias, Bakt 341F y Bakt 805R (Herlemann *et al.*, 2011). La preparación de las librerías de amplicones para la secuenciación en la plataforma Illumina MiSeq PE300 y el análisis bioinformático mediante el software (QIIME II) se realizaron siguiendo los métodos detallados en Martin-Pozas *et al.* (2020).

Resultados

Características geomorfológicas e hidrológicas del sistema kárstico

El sistema kárstico del Pindal se desarrolla en un macizo calcáreo (calizas de Barcaliente, Carbonífero) modelado en forma de terraza marina (rasa) por procesos morfogenéticos litorales (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2008). Este nivel de terraza marina se sitúa a una cota media de 30-68 metros sobre el nivel del mar actual y constituye el área de captación preferente para las aguas de escorrentía procedentes de otro nivel de rasa superior (140-170 m) desarrollado sobre materiales cuarcíticos de muy baja permeabilidad (Cuarcita de Barrios, Ordovícico). La cueva es la principal forma endokárstica del sistema y como puede verse en el mapa geomorfológico (figura 3a), en las superficies de las rasas de 30-68 m se observan numerosas estructuras exokársticas tipo dolina y poljé, relacionadas directamente con la formación de la propia cueva.

Sobre una de las dolinas, situada casi en la vertical de la cavidad, se instaló una explotación ganadera en 1995 que ha seguido funcionando hasta 2021 (figura 3c). Uno de los principales cauces que drenan la Rasa de Pimiango desemboca de forma natural en esa dolina (figura 3a), de forma que el área de descarga de esa cuenca de drenaje se encuentra justo en la finca ganadera y dentro de los límites hidrológicos del *impluvium* de la cueva.

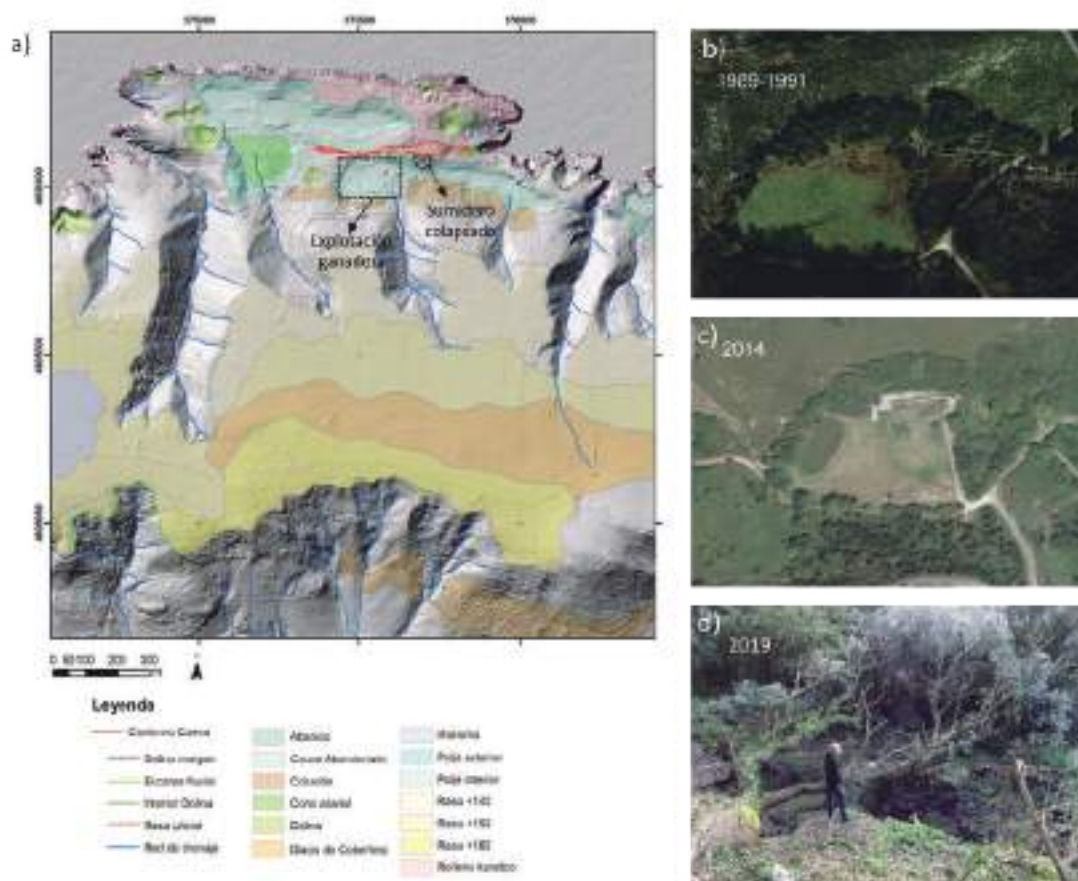


Figura 3. a) Esquema geomorfológico de la localización de la Cueva del Pindal. b-c) Fotografías aéreas de la zona de la dolina sobre la que actualmente se sitúa la explotación ganadera. d) Fotografía en superficie del colapso del sumidero natural situado al noreste de la dolina.

Los terrenos kársticos son excepcionalmente susceptibles a inundaciones debido a una combinación de características de bajo almacenamiento y alta difusividad de estos acuíferos (Parise *et al.*, 2015). En el caso de la Cueva del Pindal el agua de escorrentía circula directamente hacia la rasa del Pindal, en cauces de escaso recorrido y más o menos torrenciales en función de la intensidad de las precipitaciones. Una vez alcanza ese nivel, se acumula preferentemente en las diferentes depresiones kársticas (dolinas) y allí, se une a la caída directamente sobre la zona de *impluvium* infiltrándose en el macizo carbonatado (figura 3).

Esa infiltración se ve favorecida por el buzamiento subvertical y el alto grado de fracturación de la caliza de Barcaliente, pero de forma general, la percolación se produce de forma progresiva por el efecto filtrante que ejercen los materiales arcillosos que cubren el fondo

de las dolinas. Las intensas precipitaciones caídas durante los días previos y el propio día 23, favorecieron una importante acumulación de agua en la dolina que finalmente provocó el colapso de su sumidero natural (figura 3d). Este colapso puede aún verse en la zona externa y provocó la entrada súbita de un gran volumen de agua afectada por su mezcla con la balsa de purines y la llegada de lodos-sedimentos procedentes en gran parte de la explotación ganadera.

Composición mineral

Los sedimentos acumulados tras la reciente inundación estaban compuestos mayoritariamente por cuarzo (SiO₂) con proporciones entre el 95 y el 99% y proporciones menores de calcita y filosilicatos, de forma similar a la de los materiales ya existentes. Esta composición indica que la rasa de Pimiango, desarrollada sobre cuarcitas, es la principal y casi exclusiva área fuente de sedimentos detríticos para la superficie kárstica desarrollada en la franja litoral.

Parámetros biogeoquímicos

Fecha	Muestra	Zona	pH	CaCO ₃ (%)	Mat.Org (%)	N (%)	P- (mg/kg)	K-disp (mg/kg)	NO ₃ ⁻ (mg/kg)	NH ₄ ⁺ (mg/kg)	Cl (mg/kg)	TOC (%)
31-oct-19	Pin 1	Bal 7	7.23	4.40	6.42	0.26	14.1	153	0.70	3.10	24.5	3.56
	Pin 2	Bal 7	7.83	1.10	0.34	0.02	3.0	20	0.50	0.80	11.5	0.19
	Pin 3	Bal 9	7.54	3.20	6.44	0.30	22.5	137	5.10	5.20	131.5	3.53
	Pin 4	Bal 9	7.56	3.50	8.12	0.29	18.1	112	7.20	3.60	54.5	4.34
	Pin 5	Bal 17	7.71	3.50	2.14	0.09	6.3	83	2.90	1.80	17.0	1.06
12-mar-19	9A1	Bal 9	7.34	2.30	9.25	0.33	18.2	102	42.80	7.20	165.5	4.73
	9A2	Bal 9	-	1.40	9.94	0.35	20.2	130	46.80	6.80	-	5.80
	9B1	Bal 9	7.62	1.50	9.11	0.33	12.1	100	41.70	7.30	148.5	4.46
	9B2	Bal 9	-	1.60	10.30	0.38	12.7	99	55.20	7.70	-	6.23
	9C1	Bal 9	7.64	2.40	8.37	0.29	12.9	100	37.00	6.70	156.0	4.32
	9C2	Bal 9	7.61	2.10	10.20	0.39	8.2	99	-	-	209.5	6.80
	16B1	Bal 16	7.54	0.20	4.85	0.18	16	75	4.20	6.60	39.0	2.31
	16B2	Bal 16	7.54	0.14	2.28	0.08	15	51	1.90	4.30	22.5	0.75
	16C1	Bal 16	7.50	0.17	4.97	0.18	23	91	3.10	6.00	30.5	2.57
	16C2	Bal 16	7.52	0.15	2.58	0.09	16	56	3.50	3.60	20.5	0.80

Tabla 2. Resultados de los análisis de pH, carbonato cálcico, cloruros, materia orgánica y macronutrientes (N, P, K) de las muestras de sedimentos. Datos destacados en **negrita**.

Fecha	MUESTRA	Zona	Ba	Co	Cu	Fe	Mn	Na	Ni	Pb	S	Sr	Zn
31-oct-19	Pin 1	Bal 7	75	5.9	12.4	14594	667	242	15	24	326	97	55
	Pin 2	Bal 7	11	1.1	1.0	1818	81	28	3	5	48	33	7
	Pin 3	Bal 9	88	7.8	14.6	16394	680	406	17	26	353	103	65
	Pin 4	Bal 9	81	4.4	15.1	13601	279	398	14	36	360	149	70
	Pin 5	Bal 17	50	4.0	6.1	8697	392	165	10	15	97	78	28
12-mar-19	9A1	Bal 9	63	3.1	11.6	12950	200	391	10	34	454	118	51
	9A2	Bal 9	77	4.1	13.9	13705	201	464	11	35	474	135	38
	9B1	Bal 9	65	3.7	12.3	14107	237	391	10	37	425	113	42
	9B2	Bal 9	63	3.6	12.3	12919	166	442	11	29	546	121	26
	9C1	Bal 9	58	3.8	12.2	13644	247	354	10	36	375	99	42
	9C2	Bal 9	51	2.9	11.3	12389	128	394	9	26	519	104	20
	16B1	Bal 16	38	3.2	9.0	8758	250	183	7	24	268	95	28
	16B2	Bal 16	30	1.5	5.2	5133	113	136	4	13	114	65	14
	16C1	Bal 16	56	5.0	10.4	10735	344	228	10	26	224	117	29
	16C2	Bal 16	35	2.1	6.6	6196	159	145	5	14	195	70	17

Tabla 3. Resultados de los análisis de elementos traza y metales de las muestras de sedimentos (concentración en ppm). Datos destacados en **negrita**.

El resultado de la caracterización biogeoquímica de los sedimentos muestreados en octubre de 2019 comparados con los realizados en muestras de marzo de 2019 en los mismos puntos de muestreo, queda reflejado en las tablas 2 y 3.

El estudio comparativo permite concluir que las muestras correspondientes a sedimentos depositados por efecto de la inundación (PIN-1, 3 y 4) presentan valores muy elevados de materia orgánica, nitrógeno en sus diversas formas, P-K disponibles y metales pesados. Esas concentraciones son muy superiores a los de las zonas más internas (Bal 17) no afectadas directamente por la inundación (PIN-2 y 5). Los datos analíticos muestran la fuerte influencia de la explotación ganadera en la composición de los sedimentos acumulados en algunas zonas del interior de la cavidad, especialmente en los contenidos de materia orgánica disponible. Las altas concentraciones de algunos micronutrientes metálicos se asocian al alto contenido en materia orgánica del agua que llega a la cavidad. La materia orgánica del suelo presenta una elevada afinidad por ciertos metales (Co, Cu, Mo, Ni, Pb y Zn) por la formación de complejos organometálicos que pueden migrar fácilmente con el agua de infiltración.

La influencia de la explotación ganadera, no sólo es reciente, sino que todo indica que ha sido prolongada en el tiempo y afectaba fundamentalmente a la zona de la Baliza 9 (y 7 en menor medida), donde el agua se remansaba fácilmente. Los sedimentos de inundación reciente de la zona de la Baliza 7 y 9 presentaron contenidos altos y diferenciados en compuestos nitrogenados orgánicos y elementos metálicos (por ejemplo Zn) similares a los previos de baliza 9. La zona de entrada del agua contaminada por la explotación ganadera debe corresponder directamente con un punto de surgencia situado en la pared Sur de la cueva a la altura de la Baliza 13. Desde ahí, su área de influencia se extiende

progresivamente hacia la pared N y hacia la salida afectando, en mayor o menor medida a gran parte de los sedimentos acumulados en el interior, desde la Baliza 6 hasta la zona de las Balizas 14-15-16. La composición de los sedimentos de la zona de la Baliza 17 indica que su procedencia es diferente y la recarga externa debe producirse hacia el NW de la explotación ganadera.

Estudio de las comunidades microbianas antes y después de la inundación

El estudio microbiológico, centrado en bacterias, muestra una gran modificación en la composición de las comunidades microbianas entre las muestras previas y posteriores al evento del 23 de octubre, (figura 4). El cambio más notable consistió en la aparición de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, ausentes en las muestras previas a la inundación. Asimismo, se observó un incremento importante de la proporción de *Proteobacteria* y la casi total desaparición de los filos *Rokubacteria* y *Nitrospirae* después de la inundación. A continuación, se describen los resultados obtenidos para los filos bacterianos más significativos:

Acidobacteria. Este grupo estuvo bien representado en las muestras de la campaña de noviembre de 2017, principalmente en los sedimentos no colonizados por el moonmilk. Sin embargo, tras el evento producido en octubre de 2019 el porcentaje de acidobacterias

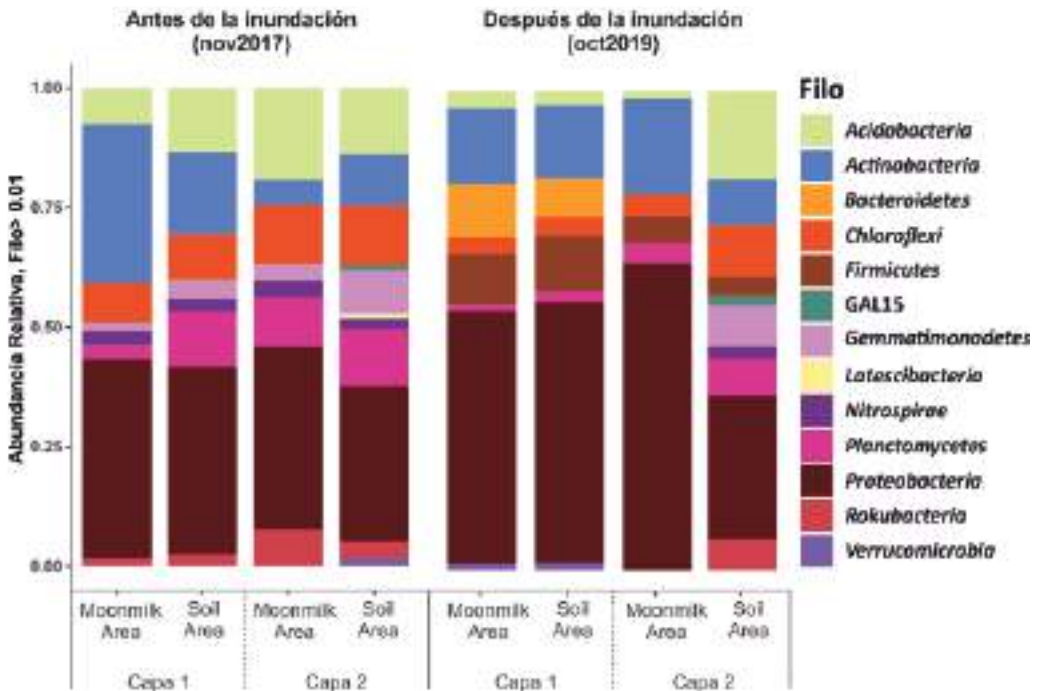


Figura 4. Abundancia relativa de los filos dominantes presentes en la Baliza 9, antes y después de la inundación. Los filos con una abundancia relativa inferior a 0.01 no aparecen representados en la gráfica.

se vio reducido sensiblemente, salvo en la muestra más profunda de *Soil Area*, la cual presentó unos porcentajes similares a la muestra más profunda de *Soil Area* de 2017 (figura 4).

Actinobacteria. Este filo fue tan abundante como el filo *Proteobacteria* en la muestra de *moonmilk* de 2017 pero con una reducción significativa de actinobacterias por debajo del material carbonatado. En la campaña de 2019, el porcentaje de actinobacterias disminuyó mucho en la muestra superficial de zona *Moonmilk Area* como consecuencia de la destrucción de ese depósito, pero se mantuvo con valores similares en las muestras de la zona superficial de la zona *Soil Area*, mientras que la muestra más profunda de *Moonmilk Area* mantuvo unos valores similares a los obtenidos en la capa de *moonmilk* de la campaña de 2017 (figura 4).

Antes de la inundación el género más abundante, con diferencia, fue *Crossiella*, sobre todo en las muestras de *moonmilk*. Tras el evento, en octubre de 2019, la proporción de

Crossiella disminuyó drásticamente, hasta prácticamente desaparecer en las muestras de la zona *Soil Area*. En su lugar, el género *Corynebacterium* aumentó mucho en las muestras superficiales. Dentro de este género, existen especies patógenas, como *Corynebacterium diphtheriae*, que se asocian a menudo al ganado vacuno.

Bacteroidetes. En 2017, este filo aparecía en muy bajas proporciones en todas las muestras. Sin embargo, tras la inundación, resultó ser uno de los más abundantes. Los géneros más representados en los lodos de inundación fueron *Fermentimonas*, del orden *Bacteroidales* y *Chryseobacterium*, del orden *Flavobacteriales*. En las muestras de sedimento antiguo, de la segunda capa, la representación del filo *Bacteroidetes*, fue casi nula. Los *Bacteroidetes* son una parte importante del microbioma del tracto intestinal de mamíferos. Recientemente se han hallado varias especies de la familia *Flavobacteriaceae* en muestras de estiércol procedente de granjas lecheras (Pandey et al., 2018).

Chloroflexi. Las secuencias más abundantes se encontraron en las muestras de 2017. En octubre de 2019 el porcentaje se redujo, salvo en la muestra profunda de *Soil Area*, que mostró unos porcentajes similares a los encontrados en la muestra profunda de *Soil Area* de 2017. Las clases más abundantes fueron *Anaerolineae*, *Dehalococcoidia*, TK10, JG30-KF-CM66 y KD4-9.

Firmicutes. Del mismo modo que con el filo *Bacteroidetes*, el filo *Firmicutes* apenas aparecía representado por el género *Bacillus* en las muestras de 2017. Por el contrario, en las muestras de 2019 apareció como uno de los filos más abundantes en los sedimentos de inundación. Los órdenes más abundantes fueron *Clostridiales* y *Bacillales*. Dentro del orden *Clostridiales*, los grupos más representados fueron el género *Proteiniclasticum*, de la familia *Clostridiaceae*, y las familias *Christensenellaceae*, *Family X* y *Ruminococcaceae*. Todos ellos cuentan con una abundancia relativa superior al 1% en los lodos de decantación

e inferior en los sedimentos antiguos. Los miembros de la familia *Clostridiaceae* se encuentran en multitud de hábitats desde heces y estiércol, lodos de depuradoras hasta sedimentos marinos y de agua dulce (Pandey *et al.*, 2018). La familia incluye especies altamente patógenas dentro del género *Clostridium sensu stricto*, que ha sido encontrado en todas las muestras de sedimentos de decantación. La familia *Ruminococcaceae* está presente en el intestino de muchos mamíferos y en residuos procedentes de granjas bovinas (Pandey *et al.*, 2018).

Nitrospirae. En 2017, *Nitrospira* se encontró representado en proporciones similares y superiores al 1% en todas las muestras de 2017. El filo *Nitrospirae* está presente en multitud de hábitats: suelos, cuevas, océanos, aguas termales y plantas de tratamiento de aguas residuales. El género *Nitrospira* desempeña un papel fundamental en el ciclo del nitrógeno. Todos los miembros de este género son capaces de llevar a cabo el proceso de nitrificación. Su versatilidad metabólica permite a *Nitrospira* colonizar una amplia gama de hábitats y soportar condiciones oligotróficas y grandes cambios en las condiciones ambientales (Daims y Wagner, 2018) pero la inundación provocó que en el muestreo de 2019 la proporción de *Nitrospira* cayera por debajo del 1% en todas las muestras salvo en la muestra profunda de *Soil Area*.

Proteobacteria. El filo *Proteobacteria* fue el grupo más abundante en todas las muestras. En 2017 la proporción de *Alphaproteobacteria* se mantuvo constante en todas las muestras y el género más abundante en todas las muestras fue *Pedomicrobium* del orden *Rhizobiales*. En 2019 se observó un aumento de la abundancia relativa de *Alphaproteobacteria*, especialmente en la muestra profunda de *Moonmilk Area*, donde un 20% de las secuencias se correspondían con miembros sin cultivar de la familia *Beijerinckiaceae*.

En 2017, las *Deltaproteobacteria* fueron más abundantes en las muestras más profundas, lo contrario a lo que ocurría en 2019. El género NB1-j y el orden *Myxococcales* fueron los grupos de *Deltaproteobacteria* más abundantes en todas las muestras de 2017. Sin embargo, 2019 NB1-j no superaba el 1% (salvo en la muestra profunda de *Soil Area*), mientras que la presencia del orden *Myxococcales* era muy similar a la encontrada en 2017. Ambos grupos se clasifican dentro de las *Deltaproteobacteria* no reductoras de sulfato.

En 2017, la clase *Gammaproteobacteria* fue la más abundante dentro del filo *Proteobacteria*, representada en su mayor parte por un miembro no cultivado, wb1-P19, de la familia *Nitrosococcaceae* que disminuyó mucho tras la inundación, aumentando el género *Thauera* considerablemente en los sedimentos de decantación. Las especies del género *Thauera* son un grupo de bacterias heterótrofas desnitrificantes, Todos los genomas del género *Thauera* se han aislado a partir de muestras de suelos, sedimentos, lodos, estiércol y plantas de tratamiento de aguas residuales (Yokoyama *et al.*, 2016).

Rokubacteria. Este grupo corresponde al filo *Candidatus Rokubacteria* y apareció representado en todas las muestras de 2017, especialmente en aquellas sin presencia de *moonmilk*, con una proporción superior al 1%. Sin embargo, en 2019 su representación disminuyó en todas las muestras salvo en la capa más profunda de la zona *Moonmilk Area*. Este filo recién descrito se encuentra en diferentes hábitats como suelos y aguas y es frecuente en cuevas (De Mandal *et al.*, 2017).

Conclusiones

Los resultados de los análisis y las observaciones de campo realizadas en la cavidad y su entorno antes y después de su inundación, permiten extraer las siguientes conclusiones:

Los **análisis biogeoquímicos** indican que los sedimentos depositados por efecto de la inundación presentan valores muy elevados de materia orgánica, nitrógeno en sus diversas formas, fósforo y potasio disponibles y metales pesados. Esas concentraciones son muy superiores a los de las zonas más internas no afectadas directamente por la inundación. Los residuos de origen animal acumulados en balsas se convierten en reservorios diversos componentes contaminantes: compuestos nitrogenados, fosfatos, potasio, sulfatos, boro, metales pesados (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, Pb), así como antibióticos y desinfectantes, junto a una amplia gama de poblaciones microbianas, incluidos los patógenos, que pueden causar contaminación y presentar riesgos para la salud pública.

El **estudio microbiológico** comparativo de muestras previas y posteriores al evento del 23 de octubre, ha permitido comprobar que la inundación ha provocado modificaciones muy significativas en la composición de las comunidades microbianas presentes en los sedimentos de la cueva. El cambio más notable ha consistido en la aparición de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, ausentes en las muestras previas a la inundación. Ambos filos bacterianos son parte importante del tracto intestinal humano y de otros mamíferos y son dominantes en muestras líquidas y sólidas de estiércol procedente de granjas lecheras. Asimismo, se ha observado la casi total desaparición de los filos *Rokubacteria* y *Nitrospirae* después de la inundación.

Los datos analíticos del estudio comparativo con muestras previas a la inundación revelan que la fuerte influencia de la explotación ganadera en la composición de los sedimentos de la cavidad se viene produciendo desde hace tiempo y se traduce en contenidos muy elevados de materia orgánica disponible que favorecen el desarrollo y expansión de las poblaciones microbianas de la cueva.

Agradecimientos

Este trabajo ha contado con la financiación de la Consejería de Cultura, Política Lingüística y Turismo del Principado de Asturias para la realización de los análisis de las muestras de octubre de 2019 y con el soporte del proyecto PID2019-110603RB-I00, MCIN/AEI/FEDER

UE/10.13039/501100011033 para el resto de la investigación. Cuenta con el apoyo de la Plataforma Temática Interdisciplinar CSIC Patrimonio Abierto: Investigación y Sociedad (PTI-PAIS).

Referencias

- Daims, H., Wagner, M. (2018). Nitrospira. *Trends in Microbiology*, 26, 462–463. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.001>.
- De Mandal, S., Chatterjee, R., Kumar, N.S. (2017). Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiology*, 17, 90. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>.
- González-Pumariega, M. (2011). La cueva de El Pindal, 1911-2011. Estudio de su arte rupestre cien años después de Les Cavernes de la Région Cantabrique. Ménsula, Pola de Siero. 212 pp.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., et al. (2011). Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME Journal*, 5, 1571–1579. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.
- Jiménez Sánchez, M., Moreno, A., Stoll, H., et al. (2008). Dataciones cronológicas con U-Th en la Cueva del Pindal (Asturias, N España): implicaciones geomorfológicas. In: *Trabajos de Geomorfología en España*, 2006-2008, pp. 49-52.
- Martin-Pozas, T., Sánchez-Moral, S., Fernández-Cortés, A., et al. (2020). Biologically mediated release of endogenous N₂O and NO₂ gases in a hydrothermal, hypoxic subterranean environment. *Science of the Total Environment*, 747, 141218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141218>.
- Martin-Pozas, T., Cuezva, S., Fernandez-Cortés, A., et al. (2022). Role of subterranean microbiota in the carbon cycle and greenhouse gas dynamics. *Science of the Total Environment*, 831, 154931. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154921>.
- Pandey, P., Chiu, C., Mia, M., et al. (2018). 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *Plos ONE*, 13, e0190126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190126>.
- Parise, M., Ravbar, N., Živanović, V., et al. (2015). Hazards in karst and managing water resources quality. In: *Stevanović, Z. (ed.) Karst Aquifers – Characterization and Engineering*. Springer, Cham, pp. 601–687.
- Sánchez-Moral, S., Cañaveras, J.C. Soler, V. (2002). Estudio previo puntual del estado de conservación de las cuevas de Candamo, El Buxu, Tito Bustillo, El Pindal y La Loja. *Informe científico-técnico para la Dirección General de Cultura del Principado de Asturias*. 29 pp.
- Tarboton, D.G. (1997). A new method for the determination of flow directions and upslope areas in grid digital elevation models. *Water Resources*, 33, 309-319. <https://doi.org/10.1029/96WR03137>.
- Yokoyama, K., Yumura, M., Honda, T., et al. (2016). Characterization of denitrification and net N₂O-reduction properties of novel aerobically N₂O-reducing bacteria. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62, 230–239. <https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1178076>.