



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Poblaciones bacterianas en cuevas graníticas de Galicia y meteorización de las rocas

Poboacións bacterianas en covas graníticas de Galicia e meteorización das rochas

Bacterial populations in the granitic caves of Galicia and rock weathering



Marta Fernández Franco

Fecha de defensa: 27 de julio de 2017

Tutor académico: Juan Ramón Vidal Romani

ÍNDICE

Resumen / resumo / summary

Introducción	1
Objetivos	4
Material y métodos	5
Características de las muestras.....	5
Análisis de las muestras	6
16S DNA metabarcoding.....	7
Resultados	9
16S DNA metabarcoding.....	9
Diferencias en las poblaciones bacterianas	10
Discusión	12
Discusión de los datos.....	12
Limitaciones	15
Líneas futuras de investigación.....	16
Conclusiones / conclusiones / conclusions	18
Agradecimientos	20
Bibliografía.....	21

RESUMEN

Las cuevas desarrolladas en rocas magmáticas (plutónicas o volcánicas) son poco conocidas y, menos aún, estudiadas. Son cuevas formadas por procesos diferentes a los que controlan la formación las cuevas desarrolladas en rocas solubilizables (cuevas de carbonatos). Sin embargo, este tipo de cavidades desarrolladas en rocas magmáticas es de gran interés; y no solo desde un punto de vista geológico, sino también biológico, pues en ellas se forma un tipo de depósitos (bioespeleotemas) directamente relacionados con la actividad microbiológica desarrollada en la propia cavidad, con un único condicionante: el que exista una presencia de agua que debe ser siempre en pequeñas cantidades. Este trabajo se centra, específicamente, en un tipo de bioespeleotema asociado a pequeños flujos de agua relacionados con fisuras de la roca. Dicho depósito es conocido en la literatura científica como Pigotita y, aunque hasta ahora había sido considerado únicamente como un mineral, en realidad se trata de un biomineral caracterizado por una estructura formada por la actividad microbiológica. En las cuevas, los depósitos de pigotita recubren superficies (a veces de gran extensión) y se caracterizan por sus colores abigarrados: amarillos, pardos, castaños y rojizos. Se analizan 6 muestras de este tipo de depósitos, procedentes de dos cuevas diferentes desarrolladas en rocas graníticas: la *Cova dos Morcegos*, situada en el Monte de O Pindo (A Coruña), y la *Cova A Porteliña*, situada en Freixo, Valadares, (Vigo Pontevedra). En cada una de ellas, se tomaron 3 muestras de pigotita, que fueron tratadas en el laboratorio y de las que, posteriormente, se hizo una extracción de material genético del que fue secuenciado genéticamente el RNAr 16S. Se analizan los resultados obtenidos comparándolos con los resultados publicados para otras cuevas descritas en la bibliografía, aunque en ningún caso correspondan a muestras de pigotita, como ocurre en este trabajo.

Palabras clave: cueva, granito, espeleotema, pigotita, secuenciación, RNAr 16S.

SUMMARY

The caves developed in magmatic rocks (plutonic or volcanic) are little known and even less studied. They are caves formed by processes different from those that control the formation of caves developed in solubilizable rocks (carbonate caves). However, this type of cavities developed in magmatic rocks is of great interest and not only from a geological point of view but also biological. They form a type of deposits directly related to the microbiological activity developed in the cavity itself with a single conditioner: that there is a presence of water that must always be in small quantities. This end-of-grade paper specifically focuses on a type of biospeleothems associated with small water flows related to rock fissures. The deposit is known in the scientific literature as Pigotite. Although until now Pigotite had only been considered as a mineral it is actually a biomineral characterized by a structure formed by microbiological activity. In caves Pigotite deposits cover surfaces sometimes of great extension and are characterized by their variegated colors: yellow, brown, brown and reddish. Six samples of this type of deposits were analyzed from two different caves developed in granitic rocks: the Cova dos Morcegos, located in Monte de O Pindo (A Coruña) and Cova A Porteliña, located in Freixo, Valadares (Vigo, Pontevedra). In each of them, 3 samples of pigotite were taken, which were treated in the laboratory and from which an extraction of genetic material was carried out which it was 16S rRNA gene sequenced. The obtained results are analyzed comparing them with the results published for other caves described in the bibliography although in no case correspond to samples of pigotita as it happens in this work.

Keywords: cave, granite, speleothem, pigotite, sequencing, rRNA 16S.

RESUMO

As covas desenvolvidas en rochas magmáticas (plutónicas ou volcánicas) son pouco coñecidas e, aínda menos, estudadas. Son covas formadas por procesos diferentes aos que controlan a formación das cuevas desenvolvidas en rochas solubilizables (covas de carbonatos). Con todo, este tipo de cavidades desenvolvidas en rocas magmáticas é de gran interese; e non só dende un punto de vista xeolóxico, senón tamén biolóxico, pois nelas fórmase un tipo de depósitos (bioespeleotemas) directamente relacionados coa actividade microbiolóxica desenvolvida na propia cavidade, cun único condicionante: a existencia de auga, aínda que debe ser sempre en pequenas cantidades. Este traballo céntrase, especificamente, nun tipo de bioespeleotema asociado a pequenos fluxos de auga relacionados con pequenas fendas na rocha. O tipo de bioespeleotema estudado é coñecido na literatura como Pigotita e, aínda que ata agora fora considerado unicamente como un mineral, na realidade trátase dun biomineral caracterizado por unha estrutura formada pola actividade microbiolóxica. Nas covas, os depósitos de Pigotita recubren superficies (ás veces de grande extensión) e caracterízanse polas súas cores heteroxéneas: amarelas, pardas, castañas e avermelladas. Analízanse 6 mostras deste tipo de depósitos, procedentes de dúas covas diferentes desenvolvidas en rochas graníticas: a Cova dos Morcegos, situada no Monte de O Pindo (A Coruña), e a Cova da Porteliña, situada en Freixo, Valadares, (Vigo, Pontevedra). En cada unha delas, tomáronse 3 mostras de Pigotita, que foron tratadas no laboratorio e das que, posteriormente, fíxose unha extracción de material xenético do que foi secuenciado xenéticamente o RNAr 16S. Analízanse os resultados obtidos comparándoos resultados publicados para outras covas descritas na bibliografía, aínda que en ningún caso correspondan a mostras de pigotita, como si acontece neste traballo.

Palabras clave: cova, granito, espeleotema, pigotita, secuenciación, RNAr 16S.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos años, nos encontrábamos con que se ignoraba que hubiese paisajes graníticos subterráneos, llegando a dar por sentada su inexistencia, a pesar de poder encontrar algunas referencias acerca de ellos (Chabert y Courbon, 1997). Esto puede deberse al pequeño tamaño de dichas cavidades en comparación con las desarrolladas en rocas solubles (carbonatos, sulfatos, etc.), las cuales fueron más estudiadas (Vidal Romaní y Vaqueiro Rodríguez, 2007). Habitualmente, en textos geomorfológicos, la única excepción de cuevas en los macizos de rocas no solubles correspondería con las cuevas en rocas volcánicas (*volcanic tubes*), cuyo origen es totalmente diferente.

Este trabajo analiza este tipo de medios subterráneos que, con la excepción de algunas publicaciones especializadas (Twidale, 1985; Twidale y Vidal Romaní, 2005), han sido poco estudiados.

Las primeras descripciones de estas cavidades subterráneas y la realización de las primeras topografías conocidas son resultado del trabajo de los espeleólogos.

La clasificación de estas cuevas se define tres tipos (Vidal Romaní y Vaqueiro Rodríguez, 2007). Pero, en una tesis de publicación reciente, se presenta una clasificación de cuevas magmáticas en Galicia exhaustiva (Vaqueiro Rodríguez, 2017), siendo en este trabajo donde se describen por primera vez las dos cuevas estudiadas en este TFG. Se sitúan al NO de la península Ibérica, en las dos ubicaciones señaladas (Figura 1).

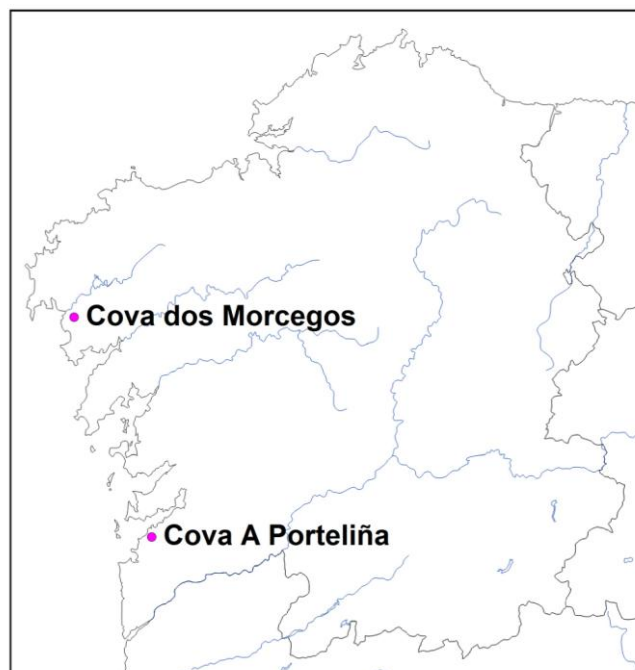


Figura 1: lamina con la localización de las dos cuevas objeto de estudio. Imagen cedida por CETRA (Club Espeleológico A Trapa, 2017).

Ambas cuevas graníticas, la *Cova dos Morcegos* (O Pindo, A Coruña) y la *Cova A Porteliña* (Valadares, Pontevedra), se desarrollaron a lo largo de planos de planos de fractura principales, por lo que se asignan al tipo de cuevas de fisura (Vidal Romaní y Vaqueiro Rodríguez, 2007).

Tanto por las diferencias estructurales como por su localización, se presumía inicialmente que las condiciones dentro de las cuevas difieren. Además, también se espera que exista variación en las condiciones dentro de una misma cueva según diferentes factores como, por ejemplo, la distancia con respecto a la entrada de la que depende el grado de iluminación.

El estudio de este tipo de cavidades presenta un interés adicional al constatarse que, en algunos casos, sirven de refugio, ocasional o permanente, a determinadas especies de animales (Hoskin, 2013) localizadas en ellas. Aunque, sin duda, la asociación de vida más notable corresponde a los microorganismos, en concreto, a las bacterias, que han colonizado estas cavidades y que son, además, responsables de un tipo de biometeorización muy específica (Vidal Romaní et al., 2014a).

Dentro de estas cuevas, nos encontramos con la formación de espeleotemas o depósitos de sedimentos relacionados con la evaporación de agua y los microorganismos troglobios (biominerales). Es importante que los flujos de agua sean lentos y en pequeña cantidad para que los espeleotemas se mantengan (Vidal Romaní et al., 2014b).

Los espeleotemas estudiados, que corresponden a diferentes localizaciones de las dos cuevas, se agruparían, según criterios mineralógicos (Vidal Romaní et al., 2014b), dentro del tipo pigotita, que es una sal compuesta por aluminio y ácidos orgánicos que se forma en la superficie del granito, apareciendo de forma típica en cuevas graníticas (López Galindo, 2013) (Figura 2).

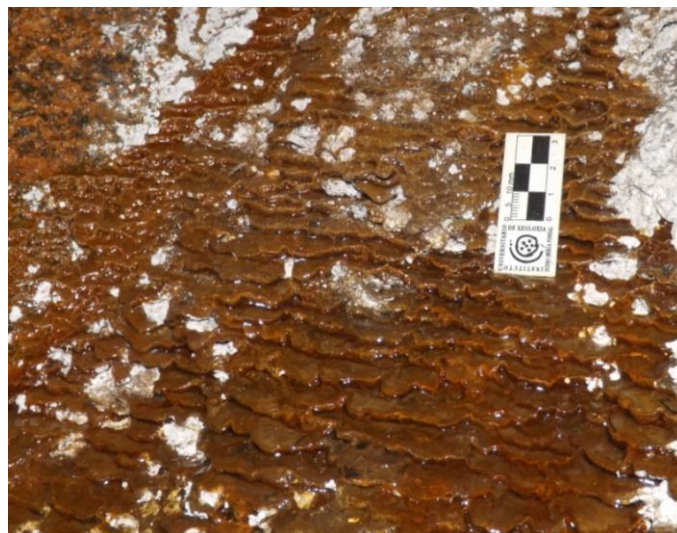


Figura 2: espeleotema de pigotita localizado en *Cova dos Morcegos* con escala. Imagen cedida por J.R. Vidal Romaní.

En todos los casos, los espeleotemas están formados por tres tipos de componentes: (1) inorgánico, asociado a la disgregación fisicoquímica de la roca en consecuencia de la acción del agua, (2) biológico, consistente en los microorganismos que viven en las cuevas usando los sedimentos como sustrato, y (3) biomineral, resultado de la interacción entre el sustrato mineral inorgánico y los productos metabólicos de la actividad orgánica troglobiótica, que pasa a formar parte del agua retenida en los espeleotemas (Vidal Romaní et al., 2014a).

Asociada a otros tipos de espeleotemas (espeleotemas de opalo A biogénico), nos encontramos con una mayor variedad de formas biológicas, desde ácaros y colémbolos a polen y esporas. Pero, en el caso de la pigotita, hasta ahora solo se han identificado bacterias, posiblemente, debido a que el flujo continuo de agua impide el asentamiento de otro tipo de microorganismos.

Este estudio se centrará en el componente biológico. A pesar de lo que se creía inicialmente, esta actividad biológica de las bacterias es esencial para la formación de los espeleotemas, llegando a denominarse por ello como bioespeleotemas (Vidal Romaní et al., 2014a).

En los últimos años se ha producido un incremento de las publicaciones en revistas de impacto que describen la vida microbiana de las cuevas. En concreto, destaca el aumento de las publicaciones basadas en métodos independientes de cultivo, o de genética molecular, considerablemente por encima de los métodos dependientes de cultivo o clásicos (Figura 3), siendo estos últimos mucho menos precisos.

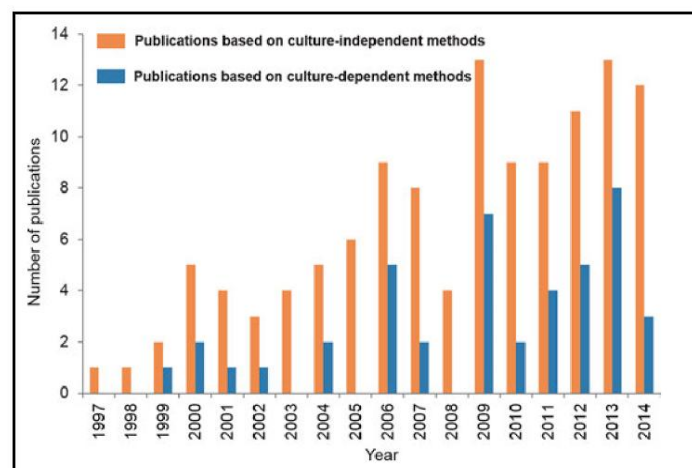


Figura 3: Resumen del número de publicaciones en revistas de impacto que describen la vida microbiana de las cuevas (Summer Engel, 2015).

En este trabajo, también se llevará a cabo un análisis para determinar la composición bacteriana de las muestras obtenidas en la cueva. Para ello, se realizará una secuenciación del RNAr 16S.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Identificación de las asociaciones de bacterias que hay en este tipo de medios pseudocársticos mediante el análisis de muestras tomadas en *Cova dos Morcegos* y *Cova A Porteliña*.
2. Determinar si hay diferencias en las poblaciones bacterianas entre cuevas distintas y dentro de una misma cueva.
3. Tras determinar si hay diferencias, comprobar si existe alguna relación con la posición de la muestra con respecto a la entrada de la cueva.
4. Buscar una posible relación entre la formación de bioespeleotemas y la meteorización de la roca en las cavidades estudiadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

Las seis muestras estudiadas se obtuvieron a partir de espeleotemas de las dos cuevas mencionadas en la introducción: *Cova dos Morcegos* y *Cova A Porteliña*. En cada una de las cuevas se seleccionaron tres localizaciones distintas, a diferente distancia de la boca de la cueva, variando así las diversas condiciones ambientales a las que se encontraban expuestos, como la luminosidad, la temperatura y la humedad, para la toma de las muestras (Figura 4).

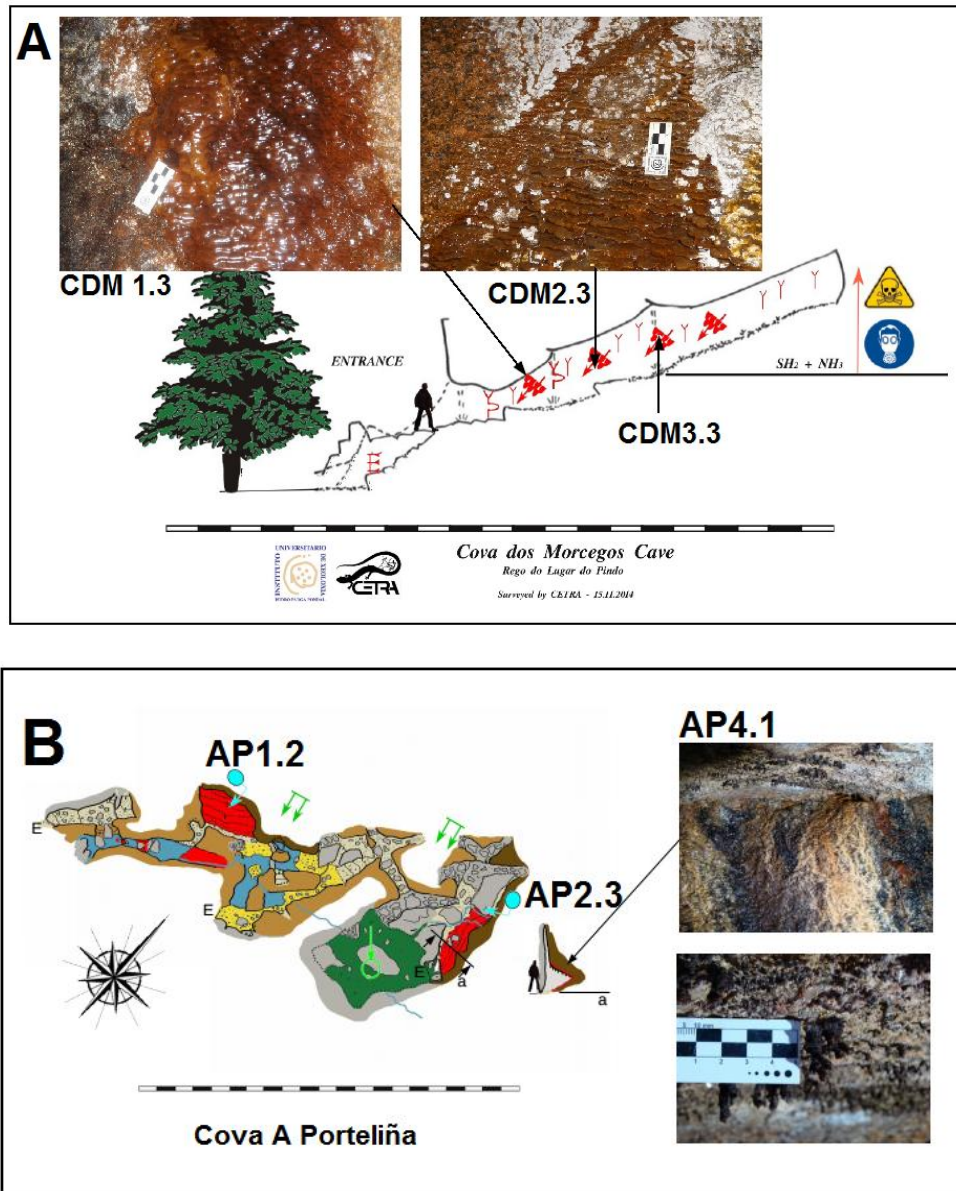


Figura 4: planos de *Cova dos Morcegos* (A) y *Cova da Porteliña* (B), con la localización de las respectivas muestras. En tres de las muestras se añade la imagen tomada *in situ*. Ambas cartografías fueron realizadas por CETRA (Club Espeleológico A Trapa, s.f.).

Todas las muestras se tomaron bajo condiciones de esterilidad para evitar la posible contaminación del medio. Cabe destacar que, al decidirse la realización de la secuenciación de las muestras, este paso es importante para evitar la contaminación de DNA exógeno que pueda interferir en el análisis.

Además, las muestras se transportaron de manera individual en recipientes estériles y en hielo.

Las muestras procedentes de *Cova dos Morcegos* se identificaron como: CDM1.3, CDM2.3 y CDM3.3.

Las muestras procedentes de *Cova A Porteliña* se identificaron como: AP1.2, AP2.3 y AP4.1

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Las muestras analizadas se asocian, en todos los casos, con el agua que fluye dentro de la cavidad, la cual parece que depende únicamente del régimen pluviométrico. Dado que los flujos de agua no se encuentran de forma prolongada y son siempre muy escasos, no se pudo llevar a cabo el análisis del agua (Vidal Romaní et al., 2014a). Por lo tanto, fue necesario recurrir a otras técnicas de análisis.

En una primera aproximación, las muestras se observan bajo el estereomicroscopio *SMZ1500* (Nikon), el cual se conecta a una cámara *DS-Fi1* (Nikon), y se obtiene una información inicial acerca de la textura, la estructura y la morfología de las muestras. A esta escala solo sería posible identificar algunos organismos de mayor tamaño, siendo necesario recurrir a otras técnicas para tener una visión más ampliada.

Entre las posibilidades para mejorar esta visión, se encuentra el estudio de las muestras bajo microscopio electrónico de barrido (MEB). Este permitiría tanto una mayor precisión a la hora de observar tanto la textura y la estructura de las muestras, como la observación de algunos microorganismos llegando a su identificación en ciertos casos (Vidal Romaní et al., 2014a).

Debido a las características de las muestras, la observación bajo MEB no fue posible en consecuencia de, fundamentalmente, dos factores:

1. Entre los pasos de la preparación de las muestras para llevar a cabo la observación bajo MEB, se encuentra uno de desecación previa. Como se mencionó anteriormente, los espeleotemas de pigotita se encuentran directamente relacionados con el agua, siendo esencial para estudiarlas al SEM: la deshidratación de la muestra, lo que la transformará en una masa de polvo, con muy poca cohesión (López Galindo, 2013). Por lo tanto, en la mayoría de los

casos, esto no permite llevar a cabo la desecación sin alterar la integridad de la muestra.

2. En los casos que se llegó a desecar la muestra, surge un problema en otro paso posterior: el de metalización de la muestra para que sea conductora en su totalidad. Al poseer una superficie de elevada porosidad, la muestra absorbe ilimitadamente el material empleado para metalizarla (Au o C), dificultando su posterior observación como la misma metalización.

Tras descartar, debido a los inconvenientes mencionados, la observación bajo MEB, se procede a llevar a cabo la secuenciación 16S rRNA para poder determinar, incluso a nivel de género o especie en algunos casos, cuales son las bacterias presentes. Esta técnica supone una ventaja, ya que no precisa el cultivo en laboratorio ni depende de la existencia de pruebas bioquímicas identificativas, lo cual no siempre es posible llevar a cabo debido a las condiciones específicas del microorganismo, para llevar a cabo la identificación (Janda y Abbott, 2007).

16S DNA METABARCODING

Las muestras ambientales se enviaron a AllGenetics & Biology, SL para inferir su secuenciación, mediante el método *DNA metabarcoding*, basado en la amplificación, secuenciación y análisis de regiones genómicas diana (*AllGenetics*).

Una vez en el laboratorio, las muestras se aislaron de forma inmediata, siendo posteriormente trituradas mediante herramientas esterilizadas por UV y utilizando los reactivos suministrados en el *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio).

La amplificación se llevó a cabo a partir un fragmento del RNAr 16S de, aproximadamente, 530 pares de bases (bp), y usando los primers D Bact 0341 b S 17 (5' CCT ACG GGN GGC WGC AG 3') and S D Bact 0785 a A 21 (5' GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC 3') (Herlemann et al., 2011). Para cada muestra, se añadieron secuencias adaptadoras (Illumina) y diferentes oligonucleótidos marcados a los primer forward y reverse, con el fin de poder identificar las lecturas correspondientes a cada una de las muestras tras la secuenciación (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012). Además, se añadió un control negativo, sin muestra pero tratado como si fuese una muestra normal, para comprobar que no hubo contaminación durante la extracción de DNA.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador *iCycler iQ* (BioRad).

Como los productos de PCR contienen restos que pueden producir ruido de fondo, se llevó a cabo un paso de purificación previa a la secuenciación en un gel de agarosa (*Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"*). Así, los productos resultantes de la PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con *REAL Safe* (Durviz), para realizar la electroforesis. Posteriormente, se pudieron ver y

seleccionar las bandas de interés bajo luz UV. Para llevar a cabo la extracción del DNA se utilizó el *PCRExtract Mini Kit (5 Prime)*. Los productos se cuantificaron por fluorimetría (*Qubit dsDNA BR Assay kit*, Thermo Fisher Scientific) y se agruparon en cantidades equimolares (*cluster*) que se secuenciaron en el sistema *MiSeq v3 300PE* (Illumina).

Las lecturas obtenidas a partir de cada *cluster* se procesaron usando la herramienta bioinformática *Qiime v. 1.9.0* (Caporaso et al., 2010), la cual realiza un análisis estándar de la comunidad microbiana.

Tras una serie de pasos consistentes en aumentar la calidad de las lecturas y reducir el impacto de posibles artefactos que se formaron durante el proceso en el estudio, las lecturas de rRNA 16S fueron agrupadas en OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) usando el enfoque *open-reference* en *Qiime*. Cada OTU se asignó a un taxón microbiano usando el clasificador Bayesiano *Ribosomal Database Project (RDP)* (Wang, Garrity, Tiedje y Cole, 2007) y la base de datos de referencia *Greengenes* (DeSantis et al., 2006). En este paso se eliminaron las OTUs que se encontraban presentes en el control negativo y aquellas representadas por lecturas con frecuencias inferiores a 0.005%.

RESULTADOS

16S DNA METABARCODING

Los resultados se obtienen en abundancia de OTUs (en porcentaje) en diferentes niveles taxonómicos para cada muestra. En estos estudios, la abundancia de OTUs se define como el número de lecturas o secuencias obtenidas asignadas a una OTU dividido entre el total de lecturas de una muestra.

Los datos de abundancia de OTUs se pueden visualizar mediante la representación en gráfico de barras y gráfico de áreas, asignando colores a cada una de las OTUs, para facilitar su interpretación y comparación (Figura 5).

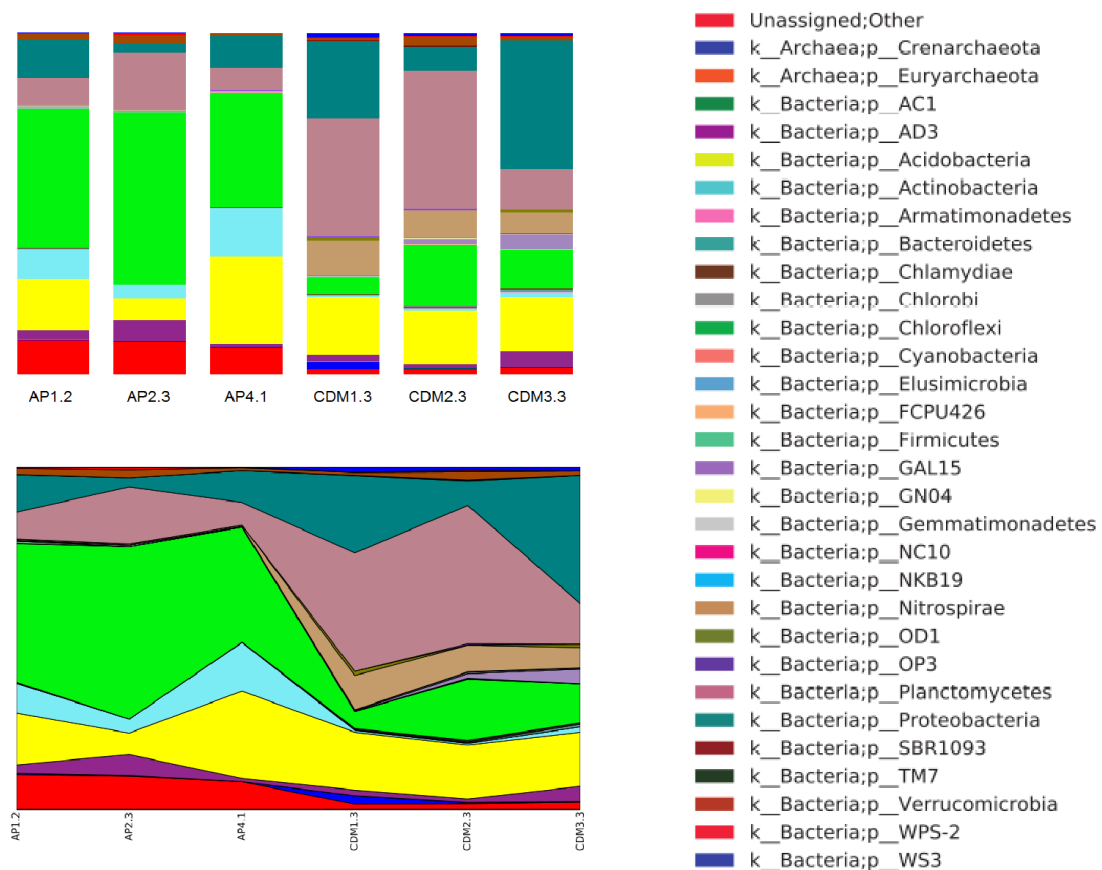


Figura 5: Diversidad bacteriana a nivel de filo en gráfico de barras (arriba) y gráfico de área (abajo), con leyenda de colores a la derecha, en las seis muestras analizadas de *Cova dos Morcegos* (CDM) y *Cova A Porteliña* (AP).

Aunque, mediante ordenador, las herramientas permiten saber cual es la abundancia y OTU asociada a cada color al situar el cursor a lo largo del gráfico, también se dispone de tablas con todos los datos numéricos referentes a las diferentes muestras y niveles taxonómicos para llevar a cabo el estudio (Tabla 1). Es importante tener en cuenta estos datos numéricos para no pasar por alto información que podría parecer no destacable observando únicamente los gráficos.

Taxón		Total	AP1.2	AP2.3	AP4.1	CDM1.3	CDM2.3	CDM3.3
Reino	Filo							
Sin asignar	Sin asignar	5,5%	10,1%	9,7%	8,0%	1,5%	1,6%	2,1%
Archaea	Crenarchaeota	0,6%	0,3%	0,2%	0,0%	2,4%	0,3%	0,1%
Archaea	Euryarchaeota	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,1%
Bacteria	AC1	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	AD3	2,8%	2,5%	6,1%	1,0%	1,6%	1,0%	4,4%
Bacteria	Acidobacteria	15,9%	15,1%	6,3%	25,6%	16,9%	15,7%	15,9%
Bacteria	Actinobacteria	4,9%	8,7%	4,1%	14,2%	0,6%	0,5%	1,5%
Bacteria	Armatimonadetes	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	Bacteroidetes	0,2%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,2%	0,7%
Bacteria	Chlamydiae	0,2%	0,3%	0,0%	0,1%	0,3%	0,3%	0,4%
Bacteria	Chlorobi	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%
Bacteria	Chloroflexi	26,5%	40,6%	50,4%	33,6%	5,0%	17,9%	11,4%
Bacteria	Cyanobacteria	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,0%
Bacteria	Elusimicrobia	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	FCPU426	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	Firmicutes	0,2%	0,6%	0,0%	0,1%	0,0%	0,2%	0,0%
Bacteria	GAL15	1,0%	0,0%	0,4%	0,0%	0,1%	1,3%	4,2%
Bacteria	GN04	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	Gemmatimonadetes	0,2%	0,3%	0,0%	0,1%	0,2%	0,4%	0,3%
Bacteria	NC10	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,1%
Bacteria	NKB19	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Bacteria	Nitrospirae	4,1%	0,3%	0,3%	0,3%	10,1%	7,8%	6,0%
Bacteria	OD1	0,4%	0,1%	0,0%	0,0%	1,2%	0,1%	1,0%
Bacteria	OP3	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,4%	0,0%
Bacteria	Planctomycetes	19,7%	7,9%	16,7%	6,7%	34,6%	40,5%	11,8%
Bacteria	Proteobacteria	15,1%	11,0%	2,7%	9,3%	22,7%	7,1%	37,6%
Bacteria	SBR1093	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	0,2%	0,0%
Bacteria	TM7	0,0%	0,1%	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%
Bacteria	Verrucomicrobia	1,5%	1,6%	2,2%	0,8%	0,8%	2,3%	1,1%
Bacteria	WPS-2	0,3%	0,4%	0,7%	0,2%	0,1%	0,4%	0,0%
Bacteria	WS3	0,6%	0,0%	0,0%	0,0%	1,4%	0,9%	1,0%

Tabla 1: Datos numéricos de abundancia de OTUs por filo en las seis muestras tomadas en *Cova dos Morcegos* (CDM) y *Cova A Porteliña* (AP).

DIFERENCIAS EN LAS POBLACIONES BACTERIANAS

Debido a la presencia de un sesgo que se menciona en el apartado posterior, solo se podrá llevar a cabo la comparación de los porcentajes de abundancia de un determinado filo entre las diferentes muestras.

Sabiendo esto, se propone llevar a cabo un test estadístico para determinar, inicialmente, si existen diferencias en el porcentaje de abundancia de las muestras según la cueva o si son homogéneas: la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Se lleva a cabo este test no paramétrico, y no una prueba t de Student, porque los tamaños muestrales son pequeños y no podemos garantizar la normalidad de las variables.

Siendo X (*Cova A Porteliña*) e Y (*Cova dos Morcegos*) dos variables aleatorias independientes, se especifica que:

$$H_0 : X = Y$$

$$H_1 : X \neq Y$$

Al realizar los cálculos correspondientes al estadístico, nos encontramos con que, en todos los casos, el p-valor = 0.1.

Esto puede deberse al reducido número de datos, que conlleva a que el test carezca de valor: son pocos datos para que el resultado tenga un mínimo de credibilidad.

En consecuencia de este bajo número de datos, se omitirá la realización de test estadísticos en este trabajo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN DE LOS DATOS

Para reducir la complejidad a la hora de llevar a cabo la discusión de los resultados, este trabajo se centrará únicamente en los datos relativos a los filos. Además de encontrarnos con un elevado número de datos numéricos según nos acercamos al nivel de especie, también se dificulta la interpretación de las gráficas dadas: cuanto más bajo es el nivel taxonómico (este nivel disminuye al acercarse a especie) el número de OTUs se incrementan, y en consecuencia los colores de la leyenda, complicando su interpretación (Figura 6).

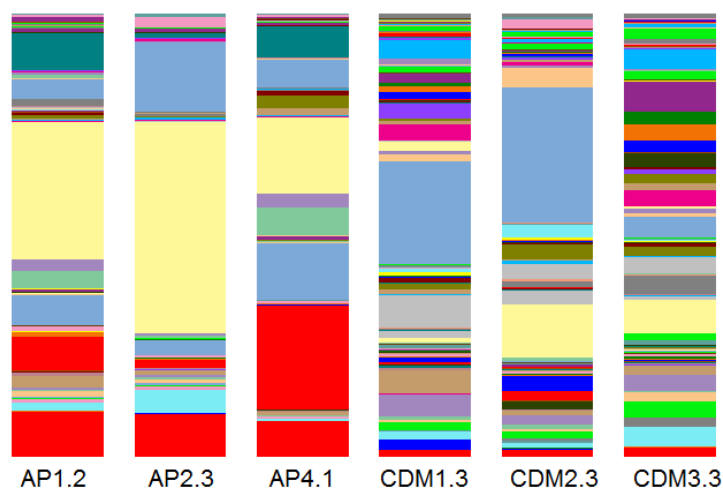


Figura 6: representación de la abundancia de OTUs al nivel taxonómico más bajo para ejemplificar la dificultad de su interpretación. La leyenda de colores está ausente debido a su densidad. Los datos corresponden a las seis muestras analizadas de *Cova dos Morcegos* (CDM) y *Cova A Porteliña* (AP).

Como se mencionó anteriormente, se debe tener en cuenta la existencia de sesgos. Los sesgos tienen origen en la diferente especificidad de los primers durante la PCR, pudiendo causar que especies con una baja representación en el DNA de la muestra original aparezcan con mayor abundancia en los resultados finales: aunque los primers puedan llevar a cabo la amplificación de DNA de todos los genomas bacterianos, las secuencias no tendrán una perfecta homología con el primer, por lo que la eficiencia será menor. En consecuencia, no es posible inferir correctamente la abundancia de especies en la muestra de DNA original. Por lo tanto, teniendo en cuenta esto, también se espera que, dentro del mismo estudio, el sesgo consecuencia del PCR se desvíe siempre en la misma dirección. Entonces, sí que será posible comparar cómo la abundancia de una OTU dado varía en diferentes muestras (Schloss, Gevers y Westcott, 2011).

Por ello, aunque se podrá comparar la abundancia de una misma OTU, en este caso filo, entre muestras, no será posible determinar que esa abundancia sea idéntica a la existente en la muestra original.

Entre los datos obtenidos, se encuentran OTUs no clasificadas. Eso se debe a que la identificación a partir de la secuenciación de 16S RNAr depende de las bases de datos públicas y privadas (Janda y Abbott, 2007), por lo que puede haber una ausencia de información.

Centrándose en los porcentajes de abundancia de determinados filos, cabe destacar la presencia de Actinobacterias. Este filo se encuentra ampliamente distribuido en cuevas, pudiendo llegar a formar más del 10-30% de abundancia, y con una posible relación con temperaturas bajas y estables y humedad alta. Los miembros de este filo tan diverso son los responsables del característico olor asociado a las cuevas (Summers Engel, 2015). Según esto, es probable que el sesgo actuase sobre los datos relativos a este grupo, reduciendo el porcentaje de abundancia respecto a la muestra real. Además, la diferencia entre ambas cuevas, e incluso dentro de una misma, podría relacionarse con las condiciones de temperatura y humedad mencionadas.

Dentro del filo Nitrospora, los resultados finales podrían acercarse a la realidad de la muestra, puesto que suelen acercarse al 12-25% de abundancia, pudiendo ser incluso menor (Summers Engel, 2015).

Respecto al filo Proteobacteria, se ha encontrado que representa el 50% de todos los grupos bacterianos en un estudio llevado a cabo en 60 cuevas (Summers Engel, 2015). Por lo tanto, cabría esperar una elevada abundancia, lo cual sin embargo no sucede con los resultados obtenidos en nuestro caso.

Descartando escasas excepciones, otros filos no detallados, como Chlorobi, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, suelen constituir una pequeña fracción (Summers Engel, 2015). Por lo tanto, los porcentajes de abundancia relativamente altos en el caso de los filos Chloroflexi y Planctomycetes pueden ser resultado del sesgo comentado, aunque no se pueda afirmar de forma definitiva.

Respecto a la diferencia entre cuevas, en una aproximación inicial se puede apreciar la existencia de una variación del porcentaje de abundancia de un mismo filo, ya no solo entre cuevas, sino también entre las muestras de una única cueva. Esto último puede deberse a las diferencias ambientales y geológicas que se dan en las diferentes localizaciones de la cueva, permitiendo las variaciones en la diversidad bacteriana.

Debido a que no se puede realizar un test estadístico fiable en consecuencia del bajo número de datos, las comparaciones realizadas no podrán considerarse determinantes.

Aparentemente, destaca la diferencia de los porcentajes de abundancias entre las dos cuevas de los filos: Cloroflexi, destacando en AP respecto a CDM, y Planctomycetes y Proteobacteria, que destacan en CDM respecto a AP.

Teniendo presente que los resultados finales de abundancia no tienen porqué corresponderse con los de las muestras originales debido a los sesgos, también cabe destacar la variación de abundancia de otros filos que pasan desapercibidos observando las gráficas, pero no los datos numéricos. Por ejemplo, en el caso del filo Actinobacteria, hay una abundancia relativamente mayor en las muestras de AP respecto a las de CDM. En el caso del filo Nitrospirae, se encontraría una abundancia mayor en CDM respecto a AP.

En los filos restantes, aparentemente, la diferencia entre cuevas no es tan acusada. Aunque sí que nos podemos encontrar con diferencias puntuales en ciertas muestras, incluso en comparación con otras muestras de la misma cueva. Esto sucede en el caso de los filos Crenarchaeota (destaca la muestra CDM1.3), AD3 (destacan las muestras AP2.3 y CDM3.3 respecto a las otras de las respectivas cuevas), GAL15 (destaca la muestra CDM3.3). Cabe mencionar que esta comparación es un poco subjetiva, puesto que, al no conocer los porcentajes de abundancia existentes en la muestra original, es complicado determinar cuándo una muestra realmente difiere.

Una vez determinadas estas diferencias, se procede a comprobar si existe alguna relación entre estas diferencias y la posición de la muestra con respecto a la entrada de la cueva.

En el caso de la *Cova A Porteliña*, la distancia con respecto a la entrada de la cueva no se puede definir de forma clara, puesto que la cueva es de escaso fondo y se encuentra situada sobre un mismo plano. Por lo tanto, la iluminación sería similar para todas las muestras.

En cambio, para la *Cova dos Morcegos* sí que podemos apreciar de forma más definida una localización de las muestras desde más cerca de la entrada, mejor iluminada, hasta más lejos de la entrada, en condiciones de mayor oscuridad, encontrándose en el siguiente orden: CDM1.3, CDM2.3 y CDM3.3.

Para facilitar la interpretación de la variación de los filos con respecto a la entrada, es útil el uso del gráfico de área (Figura 4), teniendo en cuenta que en él se encuentran representados los datos referentes a ambas cuevas, tanto *A Porteliña* como *Cova dos Morcegos*.

Estudiando los resultados referentes a *Cova dos Morcegos*, en algunos filos, como Acidobacteria o Proteobacteria, se observa un descenso del porcentaje de abundancia a medida que la localización de la muestra se encuentra hacia el interior de la cueva. Esto puede estar relacionado, por ejemplo, con la disminución de la

iluminación conforme se avanza hacia el interior de la cueva: en el caso del filo Proteobacteria nos encontramos con organismos fotosintéticos (Bryant y Frigaard, 2006).

A medida que el porcentaje de abundancia de estos filos disminuye conforme la localización de la muestra se aleja de la entrada, se incrementa el de otros filos, como Chloroflexi. Esto puede ser el resultado de un proceso de competencia entre bacterias (Hibbing, Fuqua, Parsek, y Peterson, 2010).

Entros filos, como Actinobacteria o Planctomycetes, no se observa una tendencia clara de incremento o descenso del porcentaje de abundancia según la posición de la muestra en la cueva.

Finalmente, respecto a la relación entre la formación de bioespeleotemas y la meteorización de la roca, cabe destacar el papel de la erosión de la roca a consecuencia de la formación de los espeleotemas planares. El agua arrastra granos de roca producto de la erosión hasta que el flujo de agua disminuye y los deposita, comenzando la evaporación del agua. Es en ese punto donde, alrededor de las gotas adheridas a superficies, se aglomeran los granos, dando como resultado lo que se conoce como *microgour fields* (Vidal Romaní et al., 2014a; Vaqueiro Rodríguez, 2017), cuya estructura recuerda a la de los depósitos en cuevas cársticas asociados a flujos lentos de agua. Los microorganismos se establecen en los “bordes” de estos *microgour*.

LIMITACIONES

Entre las limitaciones de este estudio, se podría pensar en el bajo tamaño muestral (aunque sea mayor que en muchos de los estudios, que se suelen centrar en una única muestra). A pesar de que esto facilita la interpretación individual de los resultados, el estudio podría continuarse seleccionando un mayor número de muestras de diferentes espeleotemas, lo que mejoraría la precisión de los resultados y permitiría el uso de test estadísticos. Aún así, es necesario tener en cuenta otros factores a la hora de decidir el tamaño de muestreo, como los económicos (este tipo de análisis tiene un elevado coste, lo que es prácticamente la verdadera limitación). También supondría una limitación la conservación de la cueva. Teniendo en cuenta el carácter destructivo de este tipo de análisis y la reducción del volumen que tienen las zonas de depósito, un muestreo intensivo puede llevar a la destrucción o deterioro del ecosistema. De todas formas, tratándose de un estudio preliminar para saber cuáles son las comunidades bacterianas presentes, esto no se ha considerado como limitación, con carácter excepcional debido a su interés científico.

Se debe tener en cuenta que las acciones humanas llegar a alterar los ecosistemas de las cuevas, interfiriendo en su estudio posterior. Además de los

ataques vandálicos hacia las cuevas, con realización de pintadas, otras acciones que podrían no parecer agresivas inicialmente lo son en realidad. Dentro de estas últimas, nos encontraríamos el caso de cuevas orientadas al turismo, en las cuales se llegaron a encontrar nuevas comunidades microbianas fotótrofas asociadas a la luz artificial (Summers Engel, 2015).

Otra limitación surge del paso de realización de la PCR, originando el sesgo ya mencionado debido a la diferente especificidad durante el proceso. A consecuencia de ello, no se puede llevar a cabo una comparación del porcentaje de abundancias de la muestra original, que podría aportar más información científica.

Además, debido a la dependencia de las bases de datos a la hora de asignar las OTUs, nos encontraremos con una limitación que se refleja en la cantidad de OTUs que no se pudieron llegar a asignar, por tratarse, tal vez, de especies desconocidas hasta el momento.

LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Continuando la investigación, se podría llevar a cabo la correlación de los datos de secuenciación obtenidos con el estudio de las diferentes condiciones que nos encontramos entre cuevas (como los puntos preferentes de condensación de humedad) e, incluso, dentro de una misma cueva.

Para mejorar la determinación de la relación de la composición de las muestras con la distancia de estas con respecto a la entrada, se podría llevar un estudio ampliado tomando más muestras a lo largo de una misma cueva para comprobar si esa variación es aleatoria o producto de la distancia a la entrada. Posteriormente, también se podría comparar con el estudio de otras cuevas de estructura similar para constatar si existe un patrón común en diferentes cuevas.

Además, teniendo en cuenta que los depósitos de sedimentos de los cuales se extrajeron los datos moleculares no corresponden a un determinado episodio de tiempo, sino son consecuencia de un proceso que se llevó a cabo a lo largo de cientos, o incluso miles de años, estos podrían aportar información paleoclimática y paleoambiental muy valiosa mediante el estudio de la relación de la abundancia de especies y la estructura de las comunidades con las fluctuaciones ambientales (Epure et al., 2017).

El estudio más detallado de las comunidades microbianas presentes en las cuevas podría llegar a tener beneficios en diferentes ámbitos. Por ejemplo, en el caso de las Actinobacterias, se ha visto que intervienen en el biodeterioro de las pinturas de cuevas que fueron estudiadas extensamente, como las de Altamira, y en la producción de cerca del 75% de los componentes antibióticos (Summers Engel, 2015). Un mayor conocimiento podría ser clave para la conservación de bienes

culturales o en el encontrar nuevas fuentes de metabolitos bioactivos con aplicaciones en medicina, agricultura e industria alimentaria.

Otra posible línea de investigación sería su interés potencial para la búsqueda de vida en exoplanetas. Teniendo en cuenta que las condiciones de radiación y oxidación podrían dificultar la vida, por ejemplo en Marte, es interesante el estudio de la formación de cuevas en otros planetas a partir de los datos de vida microbiana que obtenemos en diversos ambientes hostiles de la Tierra, como el que lleva a cabo Penelope Boston (*NEC bios*). Por ejemplo, en el estudio del ecosistema ácido de Río Tinto, que es un buen análogo geoquímico de Marte, se encuentran metabolismos interesantes consistentes en la oxidación de hierro (CSIC, 2017), permitiendo la vida en condiciones que, previamente, no parecerían posibles.

Sin embargo, la principal ventaja del estudio en cuevas terrestres fue permitir eludir el problema de la esterilización de los yacimientos superficiales por la radiación ultravioleta, pues en las cuevas no existiría por la protección que le da la cubierta rocosa a los microorganismos

CONCLUSIONES / CONCLUSIÓNS / CONCLUSIONS

Conclusiones

1. Aunque no se pueden determinar las abundancias en las muestras originales, se identifican los filos de bacterias presentes mediante la secuenciación del RNAr 16S de las muestras tomadas en *Cova dos Morcegos* y en *Cova A Porteliña*. Por lo tanto, se trata de un análisis inicial muy prometedor, ya que es la primera vez que se ha podido comprobar la constancia de estas bacterias en este tipo de depósitos que, inicialmente, se pensaba que eran exclusivamente minerales.
2. A pesar de que no se pueda apoyar con test estadísticos, se constata que hay diferencias en las poblaciones bacterianas entre las dos cuevas estudiadas y dentro de una misma cueva.
3. Se observan diferencias dentro de *Cova dos Morcegos* conforme la localización de la muestra se aleja de la entrada, pudiendo deberse a la presencia/ ausencia de luz y a fenómenos de competencia entre bacterias.
4. La actividad bacteriana parece contribuir, localmente, a la destrucción de la roca. Sin embargo, este biodeterioro no es un proceso generalizado, sino muy localizado y extremadamente relacionado con la presencia de agua.

Conclusions

1. Although the abundances cannot be determined in the original samples, the bacteria phylum present are identified by 16S rRNA sequencing of the samples taken in *Cova dos Morcegos* and in *Cova A Porteliña*.
2. Although it cannot be supported with statistical tests, it is verified that there are differences in the bacterial populations. These differences are found between the two caves studied and within the same cave.
3. Differences are observed inside *Cova dos Morcegos* depending on the location of the sample is away from the entrance. This may be due to the presence or absence of light and the phenomena of competition between bacteria.
4. Bacterial activity appears to contribute, locally, to the destruction of the rock. However, this biodeterioration is not a generalized process, but it's very localized and extremely related to the presence of water

Conclusións

1. Aínda que non se poden determinar as abundancias na mostra orixinal, identifícanse os fillos de bacterias presentes mediante a secuenciación do RNAr 16S das mostras tomadas na Cova dos Morcegos e na Cova A Porteliña.
2. A pesar de que non se poida apoiar con test estatísticos, conséntase que hai diferenzas nas poboacións bacterianas entre as dúas covas estudadas e dentro dunha mesma cova.
3. Obsérvanse diferenzas dentro da *Cova dos Morcegos* conforme a localización da mostra se afasta da entrada, podendo deberse á presenza/ ausencia de luz e a fenómenos de competencia entre bacterias.
4. A actividade bacteriana parece contribuír, localmente, á destrución da rocha. Con todo, este biodeterioro non é un proceso xeneralizado, senón moi localizado e extremadamente relacionado coa presenza de auga.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutor de TFG, el Dr. Juan Ramón Vidal Romani, por permitirme participar en el desarrollo de un tema tan interesante y novedoso como es la formación de bioespeleotemas en cuevas graníticas: gracias por su guía, su ayuda en la búsqueda de información y su esfuerzo para que fuese partícipe de todo el proceso experimental.

Gracias al Club Espeleológico A Trapa (CETRA), por su apoyo en la exploración de las cuevas estudiadas y, en especial, al Dr. Marcos Vaqueiro, por toda su disposición a ayudar en la realización de este trabajo.

También agradecer a todos los/as profesores/as que me aportaron sus conocimientos y solucionaron mis dudas a lo largo de estos 4 años. En especial, a mi tutor de grado, José Díaz.

Agradecer a mis compañeros/as de clase por todos los buenos momentos que me regalaron. En especial, a Naomi e Isma, que me acompañaron desde el primer herbario y me enseñaron que discutir no tiene porqué ser malo, y a los del seminario de siempre: Sergio, Sofía C., Sofía L., Inés Romero, Javi, Patricia, Dani, Laura, Lucía V., Miguel, Nacho, Inés Rguez., Pablo e Iago.

A mi mejor amiga, Lauea, por soportarnos mutuamente.

Gracias a todos mis amigos/as por su apoyo, en especial, a Santi, Marcos, Á. (ayuda informática), J., Elisa (conexión desde Kaunas) y W (el primero en saber que sería bióloga, incluso antes que yo).

A mi equipo de baloncesto.

Y, sobre todo, agradecer a mis padres, mi hermana, mis abuelos, mi tía, mis primos, Ángeles e Ignacio y al resto de mi familia.

BIBLIOGRAFÍA

- AllGenetics. Recuperado el 2 de julio de 2017, de <http://www.allgenetics.eu/>
- Bryant, D.A., Frigaard, N.U. (2006). *Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated*. Trends in Microbiology 14 (11): 488-496.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., González Peña, A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J., Knight, R. (2010). *Qiime allows analysis of high-throughput community sequencing data*. Nature Methods 7: 335-336.
- Chabert, C., Courbon, J. (1997). *Atlas des cavités non calcaries du monde*. Ed. Pré de Madame Carle, Paris. 109 págs.
- Club Espeleológico A Trapa. (s.f). *Cartografía Cova A Porteliña*.
- Club Espeleológico A Trapa. (s.f). *Cartografía Cova dos Morcegos*.
- Club Espeleológico A Trapa (2017). *Lámina con la localización de Cova dos Morcegos y Cova A Porteliña*.
- CSIC. (2017, 7 junio). *Algunos de estos microbios tienen un metabolismo que extrae la energía de la oxidación del hierro*. Recuperado el día 7 de julio de 2017, de <https://twitter.com/CSIC/status/872375134828580864>
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L. (2006). *Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB*. Applied Environmental Microbiology 72: 5069-5072.
- Epure, L., Muntean, V., Constantin, S. Moldovan, O.T. (2017). *Ecophysiological groups of bacteria from cave sediments as potential indicators of paleoclimate*. Elsevier, Quaternary International: 20-32.
- Herlemann, D., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J., Andersson, A. (2011). *Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea*. The ISME Journal 5: 1571-1579.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010). *Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle*. Nature Reviews Microbiology 8: 15-25.
- Hoskin, C.J. (2013). *A new frog species (Microhylidae: Cophixalus) from boulder-pile habitat of Cape Melville, north-east Australia*. Zootaxa, 3722: 61-72.

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”. Recuperado el 6 de julio de 2017, de <https://www.iib.uam.es/portal/>

Janda, J.M., Abbot, S.L. (2007). *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 2761-2764.

López Galindo, M.J. (2013). *Biometeorización de rocas ígneas (Espeleotemas Silíceos desde una Perspectiva Geobiológica)* (Tesis Doctoral). Universidade da Coruña, España.

NEC bios. Recuperado el 7 de julio de 2017, de https://www.nasa.gov/offices/oct/early_stage_innovation/niac/bios/nec_bios_all.html

Rodríguez-Santiago, B., Armengol, L. (2012). *Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y post-natal*. *Diagnóstico Prenatal*, 23 (2): 56-66.

Schloss, P.D., Gevers, D., Westcott, S.L. (2011). *Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies*. *PLoS One*, 6: e27310.

Summers Engel, A. (2015). *Life in Extreme Environments 3: Microbial Life of Cave Systems*. Recuperado de <https://books.google.es/books?id=bBhBDAAAQBAJ&pg=PP1&hl=es&pg=PP1#v=onepage&q&f=false>

Twidale, C.R. (1982). *Granite landforms*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 372 págs.

Twidale, C.R., Vidal Romaní, J.R. (2005). *Landforms and Geology of Granite Terrains*. Ed. Balkema, Amsterdam. 352 págs.

Vaqueiro Rodríguez, M. (2017). *Cavidades naturales en rocas magmáticas: las cuevas en rocas plutónicas* (Tesis Doctoral). Universidade da Coruña, España.

Vidal Romaní, J.R. (s.f.). *Fotografía de pigotita en Cova dos Morcegos, O Pindo*.

Vidal Romaní, J.R. (s.f.). *Fotografía de pigotita en Furna da Lameira, Isla de Ons* (Portada).

Vidal Romaní, J.R., Vaqueiro Rodríguez, M. (2007). *Types of granite cavities and associated speleothems: genesis and evolution*. *Nature Conservation*, 63: 41-46.

Vidal-Romaní, J.R., González López, L., Vaqueiro, M., Sanjurjo-Sánchez, J. (2014a). *Bioweathering related to groundwater circulation in cavities of magmatic rock massifs*. *Environmental Earth Sciences*, 73: 2997-3010.

Vidal Romaní, J.R., Vaqueiro Rodríguez, M., Sanjurjo Sánchez, J., González López, L. (2014b). *Morphologic types of speleothems in magmatic rocks caves*. En S.

Schnabel y A. Gómez Gutiérrez (eds.), Avances de la Geomorfología en España 2012-2014: *Libro de Actas de la XIII Reunión Nacional de Geomorfología* (490-493). Cáceres: Universidad de Extremadura.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. (2007). *Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy*. Applied Environmental Microbiology 73: 5261-5267.