

MYCETOZOA: EXTRAÑAS FORMAS DE VIDA EN CUEVAS DE GIPUZKOA. NUEVOS HALLAZGOS EN KARSTS EN CALIZA URGONIANA EN AIZKORRI (IGITEGI), IZARRAITZ (AIXA) Y UDALAITZ (MONTXON KOBÁ).

Mycetozoa: strange forms of life in Gipuzkoa caves. New discoveries in Urgonian limestone Karsts of Aizkorri (Igitegi), Izarraitz (Aixa) and Udalaiz (Montxon cave).



Carlos GALÁN & Marian NIETO.

Sociedad de Ciencias Aranzadi. Laboratorio de Bioespeleología. San Sebastián - Spain.

E-mail: cegalham@yahoo.es **Octubre 2010.**

MYCETOZOA: EXTRAÑAS FORMAS DE VIDA EN CUEVAS DE GIPUZKOA. NUEVOS HALLAZGOS EN KARSTS EN CALIZA URGONIANA EN AIZKORRI (IGITEGI), IZARRAITZ (AIXA) Y UDALAITZ (MONTXON Koba).

Mycetozoa: strange forms of life in Gipuzkoa caves. New discoveries in Urganian limestone
Karsts of Aizkorri (Igitegi), Izarraitz (Aixa) and Udalaiz (Montxon cave).

Carlos GALÁN & Marian NIETO.

Sociedad de Ciencias Aranzadi. Laboratorio de Bioespeleología. Alto de Zorroaga. E-20014 San Sebastián - Spain.

E-mail: cegalham@yahoo.es

Octubre 2010.

RESUMEN

Se describen nuevos hallazgos de Mycetozoa en cuevas de Gipuzkoa (País Vasco) formadas en caliza Urganiana (de edad Cretácico temprano). Los Mycetozoa se localizan en zona oscura formando eflorescencias sobre las paredes de roca y espeleotemas, de color amarillo-oro y brillo metálico. Se presentan ejemplos de las cuevas de Igitegi, Aixa y Montxon koba, localizadas respectivamente en los macizos de Aizkorri, Izarraitz y Udalaiz. Mycetozoa constituye un phylum independiente de protozoos, situado entre las amebas. Los plasmodios crecen sobre superficies de alteración, formando masas gelatinosas hialinas, con cuerpos fructíferos complejos de gran belleza. Predominan ampliamente los de color amarillo-oro, pero hay también ejemplos de colores blanco y azul-violeta, probablemente distintas especies de una misma familia. Las espeleotemas y el sustrato de roca soportan procesos activos de alteración por acción de bacterias quimiolitótrofas.

Palabras clave: Geoespeleología, bioespeleología, microbiología, karst, cuevas, espeleotemas, microorganismos, Mycetozoa.

ABSTRACT

New discoveries of Mycetozoa in caves of Gipuzkoa (Basque Country) are described. The caves are formed in Urganian limestone (early Cretacic age). Mycetozoa coatings are located in the dark zone, forming efflorescences on the limestone walls and speleothems, in yellow-gold and metallic bright. We present examples of Igitegi, Aixa y Montxon caves, located respectively in Aizkorri, Izarraitz and Udalaiz massifs. Mycetozoa is an independent phylum of protozoa, situated between the amoebas. The plasmodiums grow on weathering surfaces, forming hyaline gelatinous coatings, with complex and beautiful yellow fructiferous corps. Coatings yellow-gold coloured are widely predominant, but there are also white and blue-violet examples, probably different species of the same family. The speleothems and the rock substrate support active weathering processes by action of chemolithotrophic bacteria.

Key words: Geospeleology, biospeleology, microbiology, karst, caves, speleothems, micro-organisms, Mycetozoa.

INTRODUCCION

En un trabajo reciente describimos el hallazgo de llamativos recubrimientos amarillos de Mycetozoa en una cueva en el valle del Leizarán, formada en caliza y dolomía de edad Jurásico (Lías) (Galán et al, 2010). La roca-caja en que se desarrolla esta cavidad es una caliza dolomítica rica en hierro y sulfuros. Pensamos que la litología era un factor importante para explicar la presencia de Mycetozoa, cuyos plasmodios se encuentran sobre el sustrato rocoso alimentándose de bacterias quimiolitótrofas.

Pero investigaciones más extensas en otras cuevas del territorio de Gipuzkoa han permitido nuevos hallazgos de Mycetozoa en cuevas de diferentes litologías, en calizas arrecifales del denominado complejo Urganiano, de edad Cretácico temprano (Aptiense-Albiense). Aunque los ejemplos no son tan llamativos como los del primer caso reportado, muestran muchas similitudes con éste. Los recubrimientos orgánicos predominantes son amarillos, pero entre ellos se distingue al microscopio otros ejemplos de colores blancos y azules, con morfología algo diferente y probablemente correspondientes a otras especies de Mycetozoa del mismo grupo o familia.

En algunas de las muestras estudiadas se encuentran pequeñas aglomeraciones de agujas de yeso sobre un sustrato de alteración con óxidos de hierro y componentes detríticos. Los recubrimientos orgánicos ocurren sobre paredes y bóvedas de la roca-caja y sobre espeleotemas, principalmente coladas y mantos estalagmíticos. La superficie de éstos muestra también procesos de alteración similares a los que ocurren durante la formación de moonmilk (= mondmlch ó leche de luna). Pensamos que varios de estos aspectos pueden estar relacionados.

Cabe destacar que, al igual que en el caso previamente citado de la cueva del Leizarán, los recubrimientos en las cuevas dan la impresión a simple vista de tratarse de pequeñas motas o plaquitas, amarillas y brillantes, de minerales secundarios. Es a través de su observación al microscopio que se detecta su carácter orgánico.

Hemos encontrado ejemplos en distintas cuevas repartidas en diversos macizos kársticos del territorio. Muchos de ellos son poco conspicuos y resultan por tanto difíciles de identificar en campo. Los casos que presentamos, de tres cavidades distintas, resultan apreciables (similares al primer reporte) y serán ilustrados con fotografías. El más destacable de ellos (y que resulta más patente en campo) corresponde al sistema de la cueva de Igitegi, en el macizo de Aizkorri, y en él centramos las investigaciones más detalladas, con toma de muestras, estudio en laboratorio y microfotografía.

Los recubrimientos orgánicos de Mycetozoa (protozoos Amoebozoa) están constituidos por plasmodios hialinos con cuerpos fructíferos de vivos colores, los cuales, a la luz de las lámparas Led's, brillan en la oscuridad de las cuevas como pequeñas motas amarillas, de tonalidades metálicas doradas, con un llamativo efecto estético. Se presentan sobre pequeñas superficies en paredes, bóvedas y sobre coladas estalagmíticas, a veces en agregados bastante densos. En las fotografías digitales tomadas en las cuevas el destello del flash da muchos reflejos blancos y plateados, pero en las cuevas destacan por sus tonos amarillo-dorados.

Su aspecto aparente es sólido e inicialmente pensamos que podría tratarse de espeleotemas. Pero al tomar las muestras se aprecia que los recubrimientos son delicados, frágiles y disgregables, y se disponen a modo de películas sobre una interfase de alteración, húmeda y blanda, lo que sugiere un carácter orgánico, el cual se constata claramente al examinarlos al microscopio. Cabe destacar que no existían reportes previos de Mycetozoa para cuevas de Gipuzkoa, salvo los del trabajo previamente reseñado (Galán et al, 2010), y que igualmente Mycetozoa es un grupo extraordinariamente raro -a nivel mundial- en cuevas. En el presente trabajo describimos los taxa de Mycetozoa hallados y el contexto ecológico en que se encuentran, ilustrándolo con fotografías. A la vez, serán discutidas sus probables relaciones con otros micro-organismos y con procesos de creación y destrucción de depósitos de minerales secundarios en el interior de las cuevas.

MATERIAL Y METODOS

El presente estudio se desarrolló en el marco de prospecciones geo y bioespeleológicas efectuadas durante 2010, tomándose diversas fotografías y muestras de roca con los recubrimientos orgánicos. Los trabajos de campo fueron hechos por Carlos Galán y Marian Nieto, con la colaboración en las salidas de: Iñigo Herraiz, Alberto Camaraza, Olatz Zubizarreta, Daniel Arrieta, Ivonne Riuter, Michel Molia y José M. Rivas. Fotos digitales fueron tomadas con una cámara Nikon de 6 megapixels de resolución. En laboratorio las muestras fueron examinadas con microscopio binocular estereoscópico Nikon y Wild Heerbrugg, con magnificaciones de hasta 200 aumentos, y con un microscopio óptico Olympus. Imágenes-micro fueron obtenidas con la cámara digital directamente a través del ocular. Análisis por espectrometría Raman fueron efectuados por Carolina Vera Martín en Inasmet-Tecnalia. Fueron tomados datos geológicos complementarios en las distintas cavidades estudiadas.

RESULTADOS

MICROORGANISMOS EN CUEVAS: CONTEXTO GLOBAL

Los principales reportes de microorganismos en cuevas corresponden a bacterias y hongos. No obstante, los microbiólogos han estudiado también algunos grupos de algas, protozoos y virus. La característica general de todos estos organismos es su pequeño tamaño, siendo de entre 1 y 3 μm como promedio para bacterias y mucho mayores para algas y hongos cuyo tamaño celular oscila en general entre 2 μm y más de 200 μm de diámetro (Northup & Lavoie, 2001). Los Mycetozoa aquí reportados tienen cuerpos fructíferos del orden de 80 μm de diámetro para formas cilíndricas individuales, pero forman agrupaciones de tamaños milimétricos que se extienden sobre superficies de hasta 50 cm de extensión.

En las cuevas, los microorganismos participan en el ciclo de elementos tales como el carbono y el nitrógeno, proveyendo de nutrientes a los invertebrados cavernícolas, así como en la formación de muy diversos minerales secundarios (= espeleotemas). Su papel más importante reside en su capacidad de sintetizar factores de crecimiento tal como vitaminas y oligoelementos, indispensables en la dieta de los troglóbios (Galán, 1993; Galán & Herrera, 1998). Los animales han perdido esta capacidad y ante la ausencia de plantas verdes en el medio hipógeo estas sustancias esenciales son aportadas por bacterias y hongos (Ginet & Decú, 1977; Gounot, 1960). Los microorganismos en cuevas a través del mundo han sido estudiados desde comienzos del siglo 20, y muchos trabajos pioneros fueron efectuados en Europa (Caumartin, 1963; Juberthie & Decú, 1994). En conjunto, la acción de los microorganismos en las cavernas consiste en determinar los cambios que sufre la materia orgánica, ya sea en el sentido de su mineralización, ya en el de su síntesis (Galán, 1993).

Los microorganismos, de modo general, requieren para crecer la presencia de agua, una fuente de energía, y nutrientes como C y N. Pueden tolerar un amplio rango de condiciones físicas, por lo que ocurren en muchos habitats distintos, incluyendo medios extremos hostiles para los humanos. Los microorganismos, particularmente las bacterias, son metabólicamente muy diversos en cuanto a los modos en que utilizan las distintas fuentes de energía. Los heterótrofos utilizan sustratos orgánicos, los fotoautótrofos obtienen su energía de la luz solar, y los quimioautótrofos o quimiolitótrofos obtienen energía de compuestos inorgánicos en ausencia de luz. El carbono para la síntesis celular es obtenido generalmente de sustratos orgánicos; pero muchos microorganismos, incluyendo los fotoautótrofos, son capaces de fijar CO_2 . Algunos microorganismos en las entradas de las cuevas y zonas en penumbra utilizan la luz solar como fuente de energía, pero otros usan fuentes de energía química. En general, los heterótrofos son hallados donde hay suficiente materia orgánica, mientras que los quimiolitótrofos son hallados en ausencia de materia orgánica donde existen fuentes de energía química tales como hierro y manganeso (Northup & Lavoie, 2001).

Los microorganismos pueden entrar a las cuevas a través de flujos de agua, gravedad, o corrientes de aire, viajando a través de las fisuras, rocas porosas, delgadas fisuras en la roca suprayacente, y también pueden ser aportados por el ingreso de animales.



Figura 1. Cueva de Aixa. Boca de acceso (imagen superior) y recubrimientos orgánicos de Mycetozoa en la primera sala, en oscuridad total. Los tonos amarillos de los cuerpos fructíferos aparecen en la imagen con tonos blanco-plateados, por efecto de los destellos del flash. No obstante, hay también Mycetozoa blancos.



Figura 2. Cueva de Aix. Recubrimientos orgánicos de Mycetozoa en la tercera sala, sobre paredes y bóvedas (imagen superior) y sobre espeleotemas (coladas estalagmíticas, imagen inferior).

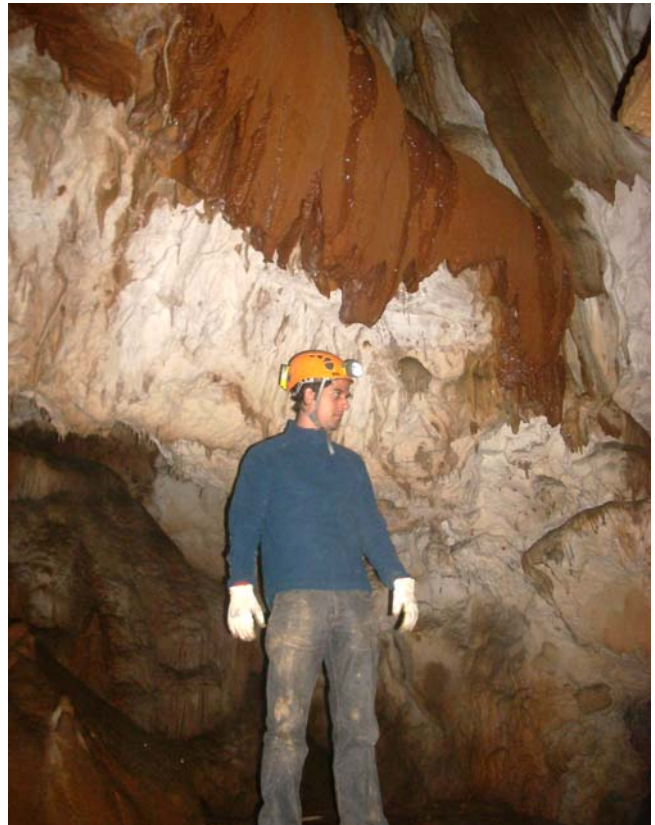


Figura 3. Montxon koba. Boca de acceso y plasmodios de Mycetozoa a 200 m de la entrada (arriba, centro izquierda e inferior). Nótese los recubrimientos densos amarillos en la bóveda de la galería (flechas rojas). La imagen central derecha muestra coladas estalagmáticas de color ocre-rojizo (con oxi-hidróxidos de hierro) que contrastan con espeleotemas blancas.

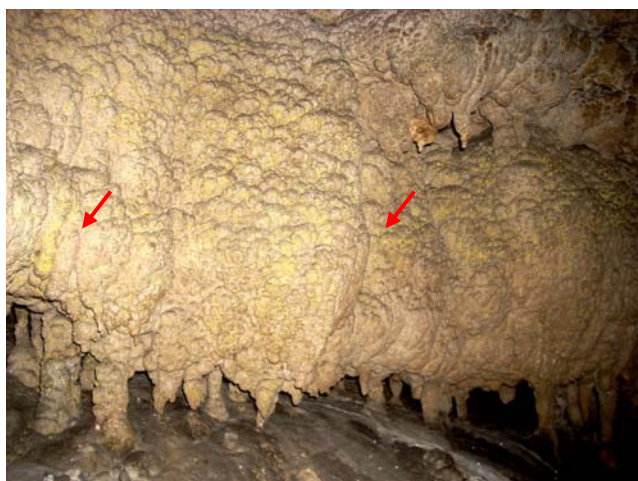


Figura 4. Montxon koba. Mycetozoa sobre coladas estalagmíticas (imagen superior), bóvedas y entre espeleotemas (izquierda) (flechas rojas). En las imágenes de la derecha, coladas y gours de tonos ocre-rojizos por la presencia de óxidos de hierro.

Los estudios microbiológicos en cuevas han identificado una amplia variedad de microorganismos, han aportado datos sobre cómo interactúan y se adaptan al ambiente hipógeo, y sobre su papel en la creación y destrucción de minerales secundarios.

La geomicrobiología de cuevas ha contribuido a la comprensión de las interacciones que ocurren entre los microorganismos y el medio ambiente hipógeo, el cual es en general muy limitado en nutrientes, conteniendo una amplia variedad de interfaces redox. Las interacciones entre los microorganismos de las cuevas y los ambientes minerales conducen a la disolución de la roca caja, o a la precipitación de minerales secundarios (= espeleotemas). Así por ejemplo, muchos de los tipos de moonmilk son formados como parte del ciclo de vida de microorganismos (Caumartin & Renault, 1958; Williams, 1959; James et al, 1982; Hill & Forti, 1997). La precipitación de minerales secundarios en cuevas ocurre a través de procesos activos o pasivos. En las cuevas, la mineralización inducida por microorganismos ha sido documentada para la formación de carbonatos, moonmilk, silicatos, arcillas, oxi-hidróxidos de hierro y manganeso, sulfatos y nitratos, a escalas que van desde rangos microscópicos a macro-relieves en el karst.

Los procesos metabólicos de bacterias oxidantes de sulfuros, hierro y manganeso pueden generar considerable acidez, disolviendo las paredes de las cuevas y las espeleotemas. Ejemplos de corrosión influenciada por microorganismos incluye residuos de corrosión, moonmilk, y espeleogénesis o ampliación de cuevas por ácido sulfúrico, existiendo buenos ejemplos en las cuevas de Lechuguilla y Spider en Nuevo México, en los Alpes Italianos, en Movile Cave en Rumania, y Cueva de Villa Luz en México (Northup & Lavoie, 2001; Northup et al, 2000).

En casi todos estos casos se trata de procesos inducidos por bacterias, y más raramente hongos y algas. Uno de los más visibles grupos de bacterias observados en cuevas son las colonias de actinomicetes, que generalmente forman manchas blancas y son responsables del distintivo olor que presentan las cuevas y suelos húmedos. De naturaleza filamentosa, los actinomicetes están ampliamente distribuidos en cuevas debido a sus bajas temperaturas y elevada humedad. Ellos han sido implicados en el biodeterioro de pinturas rupestres, p.ej. en Altamira, Lascaux y otras cuevas europeas (Groth & Saiz-Jimenez, 1999). Dos géneros muy comunes reportados de cuevas son *Streptomyces* y *Nocardia*.

Las bacterias están envueltas en todas las fases del ciclo del nitrógeno en cuevas. Los estudios se han concentrado en el papel de las bacterias nitrificantes, tales como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, en la generación de saltpetre (= nitro, salitre, nitrato de Chile), un componente esencial de la pólvora. Los primeros oxidan el amonio a nitritos y los últimos oxidan los nitritos a nitratos. También son halladas en cuevas bacterias que fijan el nitrógeno atmosférico. Así, los procesos de amonificación, nitrificación, desnitrificación, y fijación de N, han sido todos ellos documentados en cuevas.

Los estudios sobre bacterias del azufre se han extendido en épocas recientes considerablemente, debido al descubrimiento de nuevas cuevas que contienen sulfuros, especialmente Movile Cave (Rumania), cuyo ecosistema y red trófica está basada en procesos quimiolitotróficos que involucran bacterias del azufre y otros componentes (Sarbu et al, 1996).

Estudios isotópicos han establecido también el importante papel que juegan las bacterias en la producción de compuestos del azufre, en la ampliación de galerías y en la formación de cuevas con intervención de ácido sulfúrico producido por bacterias (ver al respecto la revisión de Northup et al, 2000). Tanto bacterias sulfito/sulfuro oxidantes (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*) como sulfato-reductoras han sido halladas en cuevas.

Varios estudios han propuesto la participación microbial en la formación de depósitos de hierro y manganeso en cuevas. Las bacterias oxidantes de hierro y manganeso reportadas de cuevas incluyen los géneros *Leptothrix*, bacterias del azufre *Gallionella*, y *Clonothrix*. Las Cyanobacteria, antiguamente clasificadas como algas verde-azules, son bacterias fotosintéticas que producen oxígeno. Son frecuentes en las entradas de las cuevas y zonas en penumbra, solas o en simbiosis con hongos para formar líquenes. Algunas están adaptadas a bajas condiciones de luz y tienen la habilidad de fijar el nitrógeno atmosférico, permitiendo entonces la colonización de áreas pobres en nitrógeno. Dos cianobacterias descritas de cuevas, *Geitleria calcarea* y *Scytonema julianum*, pueden ser incrustadas por carbonato cálcico. Los géneros más frecuentes incluyen a *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, y *Gleocapsa*.

Una amplia variedad de micelios y esporas de hongos han sido hallados en cuevas, generalmente sobre materiales orgánicos tales como madera, semillas, carcasas o guano, frecuentemente como tapetes miceliales (Culver, 1982; Rutherford & Huang, 1994). No obstante, no existen hongos autóctonos cavernícolas en las cuevas típicas, debido al bajo contenido de nutrientes (Caumartin, 1963). Los hongos son importantes descomponedores y producen una gran variedad de enzimas extracelulares (proteinasas, lipasas, y quitinasas) que degradan los detritos orgánicos. La mayoría de los hallados en cuevas son mohos (Zygomycetes) y hongos imperfectos (Deuteromycetes como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Trichoderma*). Algunos hongos (Basidiomycetes) han sido hallados en cuevas sobre materia muerta y varios hongos formadores de micorrizas han sido hallados sobre raíces. Los hongos filamentosos han sido implicados en la formación de láminas micríticas en espeleotemas y pueden servir como sitios de nucleación (Went, 1969).

Los Mycetozoa constituyen un phylum peculiar de protistas, denominados informalmente "mohos mucilaginosos" o "amebas gigantes", que no son bacterias ni hongos, sino que están incluidos entre las amebas (protozoos Amoebozoa). Se caracterizan por presentar como aparato vegetativo un plasmodio (masa multinucleada, ameboidea y fagocítica), la cual se propaga formando masas gelatinosas que desarrollan cuerpos fructíferos con esporas. Situados entre los animales y los vegetales, se alimentan de bacterias y pueden desplazarse sobre el sustrato (Galán et al, 2010). Son quizás el grupo de microorganismos menos estudiados en cuevas, y son muy escasos los reportes de su presencia en ellas. Los raros casos citados de cavernas corresponden a zonas de penumbra en las bocas o bajo claraboyas, sobre suelos orgánicos, guano, carcasas o semillas (Culver, 1982; Nieves-Rivera, 2003; Hoffman et al, 1986; Reeves et al, 2000). Los géneros *Dictyostelium* and *Polysphondylium* han sido hallados en varias cuevas,

sobre suelos ricos en poblaciones de bacterias (Northup et al, 2000), además del reporte previo para Gipuzkoa de especies no identificadas a nivel específico, del orden Trichiida (Trichiales), o tal vez Physarida (Physarales) (Galán et al, 2010). Posiblemente se trata de especies nuevas, cuyo ciclo biológico y modo de ocurrencia resultan inhabituales, ya que los plasmodios de Mycetozoa se encuentran en zona de oscuridad total, creciendo y fructificando sobre espeleotemas y paredes expuestas de roca, donde el contenido orgánico es excepcionalmente bajo. En este caso los organismos parecen alimentarse de bacterias, probablemente del grupo Xanthobacter o algún género afín.

Los taxa de Mycetozoa reportados en este trabajo se encuentran en las cuevas bajo condiciones ecológicas similares al caso anterior, en zonas en oscuridad total y sobre sustrato rocoso o estalagmítico, de alta humedad. Detalles adicionales sobre sus características y modos de ocurrencia serán dados en los siguientes apartados.

Otros Protozoa hallados en cuevas son quimioheterótrofos. Algunos son parásitos de vertebrados e invertebrados cavernícolas, mientras que otros son de vida libre, generalmente acuáticos. La mayoría de las especies hasta ahora identificadas en cuevas corresponden a formas comunes en la litera del bosque y cuerpos de agua epígeos (Gittleson & Hoover, 1969). Algunas de ellas, de presencia regular, son consideradas troglófilas.

Tras esta breve revisión es de destacar que aunque los Mycetozoa son un grupo común en habitats de superficie, sobre todo en bosques templado-húmedos (donde forman pequeñas masas gelatinosas sobre las hojas muertas, madera, corteza de árboles y plantas vivas), resultan extremadamente raros en el medio hipógeo y más aún en zonas profundas en oscuridad total. El presente trabajo, sin constituir un estudio microbiológico exhaustivo, solo pretende aportar algunos datos generales sobre la ocurrencia de especies de este grupo en cuevas de Gipuzkoa, sus características y el contexto en que se presentan.

DESCRIPCION DE LAS CAVIDADES Y HABITATS DE MYCETOZOA

Las cavidades estudiadas están situadas en distintos macizos kársticos del territorio de Gipuzkoa, todos ellos en calizas arrecifales Urgonianas (de edad Cretácico temprano, Aptiense-Albiense). La litología es poco variable y las principales propiedades distintivas de cada hallazgo serán comentadas para cada cueva a continuación.

La cueva de **Aixa** (= Aixako zuloa, nº Cat 1083) se localiza en la parte N del macizo de Izarraitz, en la proximidad de la localidad de Itziar (Término municipal de Deba), a una altitud de 193 m snm, en coordenadas UTM: E 553265; N 4791790. Tiene 8 km de desarrollo de galerías y -167 m de desnivel.

La cueva-sumidero de Aix se localiza en el fondo de una gran dolina, a 1 km al W de Itziar. Descubierta en 1971, es explorada inicialmente por el C.D.Eibar. La topografía inicial, de 5 km de galerías y -167 m de desnivel es efectuada conjuntamente por la S.C. Aranzadi y el C.D.Eibar, concluyéndose en 1987. Una prueba de coloración con fluoresceína sódica efectuada en 1972 demuestra la conexión hídrica entre el río subterráneo de Aix y la surgencia de Erribera goikoa, situada a una distancia en planta de 1,9 km y a 2 m snm en la orilla del Deba (Galán, 1992).

La boca es amplia (Figura 1) y el caudal que ingresa en la cavidad se sume a los pocos metros de la entrada, para reaparecer luego en las galerías inferiores. La cueva posee inicialmente tres grandes salas fósiles interconectadas por redes laberínticas menores. Tres accesos distintos permiten alcanzar el río subterráneo a través de pasos estrechos y cortas verticales: dos de ellos conectan con el curso principal y el tercero con un afluente que a su vez conecta mediante un P20. La galería activa es un meandro estrecho y muy alto que, tras 600 m de recorrido, finaliza en un sifón en la cota -167 m. Un poco antes de este punto existe una ampliación de la galería, sujeta a inundación periódica y con grandes rellenos de barro, que da acceso a una red fósil ascendente, con nuevas comunicaciones con las partes anteriores (incluyendo un P90 sobre el meandro). En este sector el G.E.Besaide (de Arrasate) ha topografiado 3 km adicionales, con un desarrollo total de 8 km. Existen varias pequeñas continuaciones, laberínticas, que de momento no cuentan con topografía y que según estimaciones pudieran sumar 2 km adicionales.

En la cavidad los recubrimientos orgánicos de Mycetozoa se encuentran en la primera y tercera sala, sobre paredes de roca y sustrato estalagmítico, a entre 80 y 400 m de distancia a la boca de acceso (Figuras 1 y 2). Ambos son de color amarillo-oro. Los de la primera sala se encuentran sobre paredes y bóvedas que poseen numerosas gotitas de agua de condensación, las cuales dan reflejos blancos y plateados en las fotos, bajo los destellos del flash, enmascarando en parte los recubrimientos dorados. Los de la tercera sala ocurren sobre mantos y coladas estalagmíticas, en parte sometidas a procesos de alteración. La superficie del sustrato tiene una interfase de consistencia blanda que recuerda al moonmilk, con partículas detríticas arcillosas.

La cueva de **Montxon** (= Montxon koba, nº Cat 365) se localiza en el extremo SE del macizo de Udalaiz, en la proximidad del manantial de Beneras (Término municipal de Arrasate), a una altitud de 345 m snm, en coordenadas UTM: E 541125; N 4770620. Consta de una galería única (con pequeños laterales) de 1.147 m de desarrollo y -20 m de desnivel.

Su boca se abre en el punto más bajo de una depresión cerrada, alargada, situada al E de la carretera Arrasate-Elorrio, al lado del caserío Montxon (Figura 3). La cavidad es de trazado subhorizontal y es recorrida por un pequeño arroyo subterráneo que se sume y reaparece repetidas veces a lo largo de la galería. Poco antes de su obstrucción final, una corta escalada (+12 m) prosigue en galería ascendente hasta una segunda boca de exiguas dimensiones abierta en un prado, cerca de la surgencia impenetrable de Mietz erreka o Beneras, la cual drena la mitad N del karst de Udalaiz. El río subterráneo se dirige directamente hacia la surgencia.



Figura 5. Cueva de Igitegi. Una de las bocas de acceso (arriba) y Mycetozoa en el fondo de la sala mayor.



Figura 5. Cueva de Igitegi. Recubrimientos orgánicos de Mycetozoa sobre las paredes de roca al lado de espeleotemas.



Figura 7. Otros ejemplos de recubrimientos de Mycetozoa sobre bóvedas y paredes en las galerías de la Cueva de Igitegi.

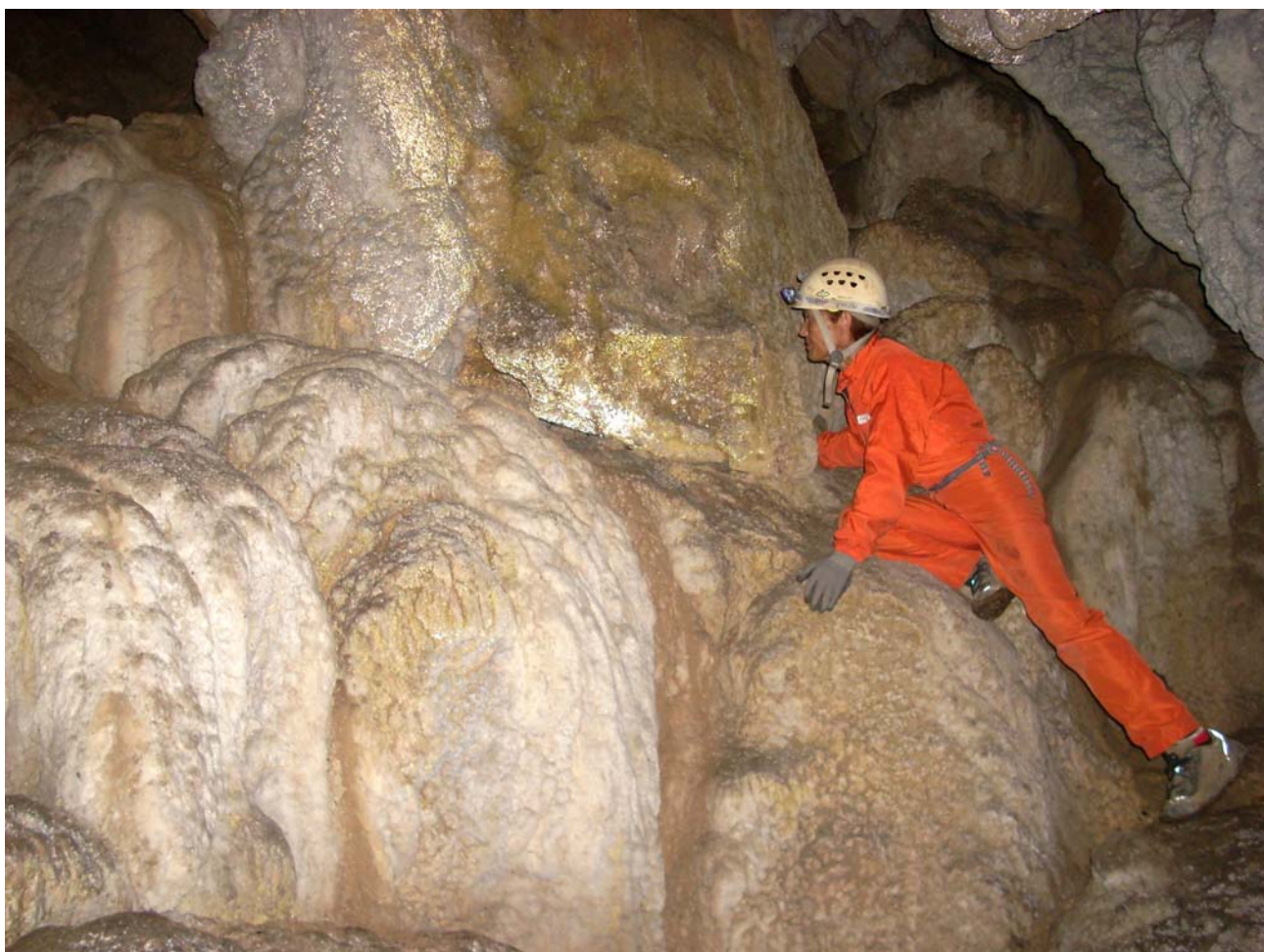


Figura 8. Cueva de Igitegi. Mycetozoa sobre coladas estalagmíticas, cuya superficie es de tipo moonmilk.

En la cavidad los recubrimientos orgánicos de Mycetozoa se localizan en zona oscura, sobre paredes de roca y espeleotemas, a entre 100 y 250 m de la boca de acceso (Figuras 3 y 4). Como en el caso anterior destacan por formar recubrimientos de tonos amarillos. En algunos casos se encuentran en zonas próximas a bóvedas y paredes recubiertas de espeleotemas de calcita, donde son frecuentes gotas de agua de condensación y donde también puede haber recubrimientos blancos de Mycetozoa. En otros casos se encuentran en las bóvedas más elevadas de la galería, donde forman densos recubrimientos amarillos (Figura 3). Un tercer tipo lo constituye su ocurrencia sobre y entre espeleotemas botroidales de tipo coliflor que recubren las paredes; en este caso los films orgánicos son amarillo-opacos, sin el brillo contrastante de los que se encuentran en zonas más húmedas (Figura 4). Sólo en algunos puntos y menos significativamente, se encuentran asociados a coladas parcialmente sometidas a procesos de alteración. La roca-caja de la cavidad es rica en minerales de hierro, aspecto que se aprecia con facilidad por el contraste de color de sus espeleotemas, donde junto a formas cristalinas blancas existen coladas y gours de llamativos colores ocre-rojizos.

La cueva de **Igitegi** (= Iritegi, nº Cat 360) se localiza en la base de la peña de Aitzabal, en el cañón existente bajo el santuario de Arantzazu, en la parte central del macizo de Aizkorri (Término municipal de Oñati), a una altitud de 575 m snm, en coordenadas UTM: E 548460; N 4758940. Tiene 1.515 m de desarrollo y -60 m de desnivel. Actualmente constituye un sistema que interconecta una sima superior (Aixen koba) y dos cuevas (Igitegi y Tortuga), esta última de 450 m de desarrollo. El sistema Igitegi-Aixen-Tortuga alcanza así 2 km de desarrollo, aunque el tránsito entre Tortuga e Igitegi solo es posible de realizar en periodos de aguas bajas.

Igitegi presenta dos bocas amplias, próximas entre sí, situadas a +5 m sobre el cauce del río Arantzazu. Estas conducen a un nivel fósil, con amplios salones y galerías ascendentes, con caos de bloques, pero con el conjunto recubierto por numerosas espeleotemas y pavimentos estalagmíticos. A través de varios puntos y simas se puede acceder a tramos discontinuos de un nivel inferior, que corresponde al curso actual del río hipógeo, con numerosos rellenos sedimentarios (Figuras 5 a 9).

La cueva Tortuga es la cabecera del sistema, y antiguo sumidero del río Billotza. Tras una sala caótica en penumbra, unos pasos estrechos entre bloques conducen a la galería principal, con un cauce activo de régimen temporal, pulidas paredes de roca y suelo recubierto de pequeños cantos rodados. El cauce presenta varias salas y ampliaciones laterales, ascendentes y fósiles. El curso principal, que se desarrolla bajo Aixen koba, presenta un complicado recorrido donde en algunos puntos diversos bloques casi obstruyen el paso. Posteriormente se amplía la galería, con rellenos arcillosos y algunos cortos escalones verticales. Varias zonas de bóvedas bajas pueden quedar inundadas y sumergidas en épocas de lluvia, por lo que el recorrido hasta el nivel inferior de Igitegi sólo es practicable en sequía (Figuras 10 a 13).

La entrada de Aixen koba se localiza entre las dos cuevas anteriores, a +40 m sobre el cauce epígeo en la confluencia de la regata Billotza con el río Arantzazu. La boca es una amplia dolina embudiforme, de fuerte declive y unos 25 m de desnivel, con su fondo obstruido por derrumbe (Figura 15). Lateralmente una corta escalada, de +6 m, permite acceder a una sala fósil, de la cual parten tres simas hacia un nivel inferior de grandes salones con caos de bloques y espeleotemas. En varios puntos conecta a través de simas con el cauce hipógeo Tortuga-Igitegi. El desarrollo total del sistema alcanza 2 km de galerías y -60 m de desnivel.

En los salones de Igitegi habita una colonia mixta de quirópteros *Miniopterus schreibersi* (murciélago de cueva) y *Rhinolophus ferrumequinum* (murciélago grande de herradura) de más de 100 ejemplares (Galán, 1970, 1997). La primera especie sólo se encuentra en la cueva en período primaveral, con máximos de hasta 125 ejemplares, concentrados en la parte alta del salón mayor. Se ha verificado que no inverna en la cavidad y que emigra fuera de la zona poco antes de la fecha de parto (hacia junio), para formar Wochenstube en otras latitudes; las hembras parten de la cueva en mayor proporción que los machos, quedándose algunos de ellos durante el verano. Esta es una de las pocas localidades de esta especie en Gipuzkoa. Diseminados en la cueva se encuentran hasta 25 ejemplares (de ambos sexos) de *R. ferrumequinum*, especie de hábitos sedentarios, que hiberna y cría en la cueva. En Igitegi, por esta razón, hay pequeños depósitos dispersos de guano de quirópteros, de cierta entidad, lo que puede incidir en el enriquecimiento con nitratos de los ambientes hipógeos, particularmente suelos.

En el sistema de cuevas de Igitegi, los recubrimientos orgánicos de Mycetozoa más apreciables se localizan en las salas y galerías próximas a la boca de Igitegi, sobre paredes de roca y espeleotemas (principalmente coladas), en zona oscura, a entre 50 y 200 m de distancia a la boca, zona ésta que es precisamente la más utilizada por los quirópteros. Pero también están presentes en Tortuga, donde estos faltan. Los recubrimientos, como en los casos anteriores, son de color amarillo-oro y brillo metálico. Se encuentran tanto en zonas con agua de condensación como sobre coladas y espeleotemas más secas, con cierto grado de alteración, en algunos casos con la consistencia plástica del moonmilk.

Existen además recubrimientos blancos de Mycetozoa y, bajo examen al microscopio, se detectó también la presencia de algunos escasos cuerpos fructíferos de color azul-violeta, probablemente correspondientes a una tercera especie de Mycetozoa.

En las muestras examinadas al microscopio se aprecian fases de alteración de la roca-caja, con aparentes granos detríticos de cuarzo, arcillas y minerales ferruginosos, así como micro-concentraciones de agregados fibrosos de yeso, de estructura acicular.

Adicionalmente, en la proximidad de las bocas de Igitegi y Aixen koba, en zona de penumbra y comienzo de la zona oscura, se encontraron recubrimientos blancos de micelios de hongos, sobre restos vegetales de madera muerta. En la galería del río de Tortuga es frecuente encontrar semillas (arrastradas por las crecidas), con plántulas germinadas, y micelios de hongos sobre restos de madera. Aixen koba posee en zona oscura raros ejemplos de vermiculaciones de moonmilk junto a Mycetozoa (Figuras 14 y 15).

Las temperaturas en las cavidades reseñadas oscilan, a tenor de la altitud, entre 13°C en Aixen y 9-10°C en el sistema de Igitegi. En todos los casos la humedad relativa de la atmósfera subterránea es próxima al 100%, con frecuentes valores de sobresaturación y condensación.



Figura 9. Cueva de Igitegi. Detalles de Mycetozoa. El flash enmascara un poco los tonos amarillo-oro de los recubrimientos.



Figura 10. Cueva Tortuga (sistema de Igitegi). Diversidad de galerías, salas y espeleotemas, algunas con superficies tipo moonmilk.



Figura 11. Bóvedas bajas, scallops y cantos rodados en el cauce subterráneo de Tortuga.



Figura 12. Galería del río subterráneo de Tortuga en aguas bajas, con bóvedas sifonantes y algunos Mycetozaa.

DESCRIPCION Y PECULIARIDADES DE LOS MYCETOZOA HALLADOS EN LAS CUEVAS

De modo general, la morfología de los taxa hallados es similar a la descrita previamente para los Mycetozoa de la cueva del Leizarán (Galán et al, 2010). Los plasmodios cilíndricos individuales tienen un diámetro promedio de 80 μm , y se encuentran dispersos o concentrados en agrupaciones de aspecto arborescente, de hasta 400 μm de extensión, formando películas aplanadas que macroscópicamente parecen pequeñas plaquitas. Las agrupaciones mayores forman plasmodios que cubren varios mm de superficie, y los mayores conjuntos de ellos forman manchas amarillas sobre las paredes de hasta 50 cm.

La diversidad morfológica de los cuerpos fructíferos es considerable, como puede apreciarse en las micrografías (Figuras 16 a 19). La estructura vegetativa plasmodial es una masa de aspecto gelatinoso, hialina y amorfa, casi transparente, por lo que resulta difícil de distinguir. En ella se observa áreas con ramificaciones y pseudópodos más espesos cuya estructura forma túbulos festoneados y entrelazados. Sobre estas masas mucilaginosas plasmodiales, poco conspicuas, se encuentran los cuerpos fructíferos de coloraciones vivas, predominantemente amarillo a amarillo-oro. Los más viejos (= que han madurado más) toman colores amarillo-bronce hasta marrón. Las fructificaciones no cubren toda la superficie de los plasmodios, sino que están esparcidas de modo irregular. Todo el conjunto es delicado y disgregable.

Los Mycetozoa constituyen un phylum independiente de protozoos Amoebozoa, completamente separado de los hongos, aspecto plenamente confirmado por recientes datos moleculares (Baptiste et al, 2002; Yoon et al, 2008). Aunque informalmente son llamados “mohos mucilaginosos” (= slime molds), en realidad son amebas gigantes o sociales. Su estructura vegetativa unicelular es denominada plasmodio. Está constituida por una masa de citoplasma multinucleado, que carece de una pared rígida limitante y que se desplaza de manera ameboidea sobre el sustrato, ingiriendo bacterias y microorganismos más pequeños. Su aspecto es el de una sustancia mucosa. Mientras las condiciones son favorables para el crecimiento vegetativo, el plasmodio continúa aumentando de volumen, lo que va acompañado de repetidas divisiones de los núcleos. El organismo puede así convertirse en una masa de citoplasma con miles de núcleos y con un peso de varios gramos.

Gran parte de lo que se conoce de la biología del grupo proviene de estudios sobre el ciclo de vida de *Physarum polycephalum*, cuyos plasmodios llegan a crecer hasta más de 100 decímetros en diámetro (Olive & Stoianovich, 1975). Los plasmodios son móviles, pueden contener hasta 10.000 núcleos activos a la vez y su citoplasma puede contener ramificaciones en forma de canales y túbulos más espesos. No obstante, nunca poseen membranas celulares internas y los núcleos permanecen indiferenciados, incluso cuando el plasmodio se rompe para formar cuerpos fructíferos (= esporóforos) (Marwan et al, 2005; Gloeckner et al, 2008). Estas estructuras fructíferas, macroscópicas, frecuentemente coloridas, pueden tener apariencias altamente complejas, con múltiples capas parecidas a tejidos, estructuras internas, y diferentes ornamentaciones.

A medida que el cuerpo fructífero se desarrolla, pequeñas secciones uninucleadas del plasmodio quedan rodeadas por paredes, formando un gran número de esporas uninucleadas. Las esporas formadas están rodeadas de filamentos (= capilicios) que contribuyen a su dispersión. Si las condiciones son desfavorables las esporas permanecen en anabiosis, en caso contrario germinan y el ciclo comienza de nuevo. Las esporas germinadas producen gametos ameboides uniflagelados que se fusionan por pares para formar cigotos biflagelados. Después, el cigoto ameboide pierde sus flagelos y se desarrolla formando un nuevo plasmodio, que puede fusionarse con otros. Los núcleos vegetativos de un plasmodio son diploides y la meiosis tiene lugar justamente antes de la formación de las esporas (Stanier et al, 1996). Su alimentación se realiza por fagocitosis: las partículas de alimento, usualmente bacterias, son fagocitadas e introducidas en vacuolas, para ser digeridas mediante enzimas hidrolíticas. Este es otro aspecto que los separa claramente de los hongos, cuya nutrición se realiza por absorción.

La sistemática del phylum es bastante compleja, con gran número de especies, muchas de ellas de posición incierta entre los grupos superiores. Los taxa reportados en esta nota se incluyen en la clase Myxogastria y parecen corresponder al orden Trichiida (Trichiales), o tal vez a Physarida (Physarales), pero su ajustada identificación requiere de un estudio especializado. En las Figuras 16 a 19 se ilustra en detalle la morfología de los Mycetozoa hallados en la cueva de Igitegi.

Puede apreciarse que en realidad las masas plasmodiales hialinas son poco visibles, mientras que los coloridos cuerpos fructíferos tienen morfologías muy variables, aunque con un patrón semejante. A menudo se agrupan como borlas, cilindros, masas festoneadas aplanadas, formas bifidas, arborescentes, etc. En la especie predominante los cuerpos fructíferos son amarillos. En menor proporción los hay también blancos. Ambos son de similar diámetro. Un tercer tipo, sólo de tamaño levemente inferior y mucho más escasos, son los de color azul a azul-violeta. También la coloración de las fotografías varía a tenor de la intensidad de luz utilizada. Dado que en la sistemática del grupo se atribuye un valor diagnóstico a la coloración de las esporas, pensamos que se trata de tres especies distintas, aunque de morfología muy similar, probablemente pertenecientes a un mismo grupo o familia.

Otro aspecto que llama nuestra atención, según la bibliografía revisada, es su modo de ocurrencia. En la cueva no se presentan sobre restos orgánicos, sino sobre paredes de roca y espeleotemas, y no en zona de penumbra sino en zona oscura de alta humedad. Es generalmente aceptado que los plasmodios presentan fototaxia y en su hábitat típico de bosque se desplazan a zonas oscuras reptando; posteriormente los plasmodios migran a zonas expuestas a la luz e inician la formación de la estructura fructífera en zonas iluminadas. En nuestro caso los plasmodios ocurren en zona oscura en el interior de las cuevas, donde son frecuentes gotitas de agua de condensación sobre las paredes y bóvedas. Lo destacable es que los plasmodios no abandonan esta zona sino que es precisamente en ella donde generan los cuerpos fructíferos coloridos. Estas peculiares características nos inclinan a suponer, con las debidas reservas, que probablemente se trate de taxa nuevos, de Mycetozoa cavernícolas, cuya fructificación y ciclo de vida difiere del que es habitual en este grupo de organismos.



Figura 13. Sala en la zona profunda de Tortuga (sistema de Igitegi) con recubrimientos amarillo-oro de Mycetozoa.



Figura 14. Plasmodios brillantes de Mycetozoa y recubrimientos vermiculados gris-claro de moonmilk de calcita sobre la roca-caja gris-oscuro en la zona profunda de Aixen koba.



Figura 15. Detalle de los recubrimientos orgánicos de Mycetozoa y vermiculaciones de moonmilk sobre la roca-caja (gris-oscuro) y boca de acceso de Aixen koba, en el sistema de Igitegi.

Otra peculiaridad de su ocurrencia, es que a menudo (en las tres cavidades citadas) se presentan sobre paredes y bóvedas de roca con cierto grado de alteración, habiéndose observado en varios casos, bajo los plasmodios mucilaginosos, zonas alteradas con partículas detríticas arcillosas, films de productos de alteración de colores rojizos a marrones (que sugieren la presencia de óxidos e hidróxidos de hierro, y tal vez de manganeso), y curiosos depósitos vermiculados de tipo moonmilk. Sobre coladas estalagmíticas y otras espeleotemas es frecuente también apreciar cierto grado de alteración de la superficie de calcita, cuya parte superficial llega a tener una consistencia blanda y plástica que la asemeja al moonmilk. En las muestras de la cueva de Igitegi examinadas al microscopio se aprecian fases de alteración de la roca-caja, con aparentes granos detríticos, arcillas y minerales ferruginosos, así como micro-concentraciones de agregados fibrosos de yeso, de estructura acicular (Figura 18).

En los Mycetozoa descritos de la cueva del Leizarán (Galán et al, 2010) se encontraron diversas evidencias de la presencia de bacterias quimiolitótrofas, probablemente del grupo Xanthobacter, sobre el cual se estarían alimentando los plasmodios de Mycetozoa. En este caso no se ha abordado el estudio de bacterias, pero es de suponer -por el tipo de alimentación de los Mycetozoa- que deben estar presentes poblaciones de bacterias de grupos capaces de corroer superficialmente la roca-caja y producir residuos de corrosión, entre ellos materiales ferruginosos, de propiciar la deposición de yeso, y/o de alterar la calcita para producir recubrimientos blandos de tipo moonmilk.

En general es conocida la intervención de distintos microorganismos, especialmente bacterias, en la alteración del sustrato rocoso y en la génesis de diversas espeleotemas, especialmente moonmilk. Muchas bacterias, como producto de su metabolismo, generan ácidos que atacan el sustrato rocoso, produciendo corrosión de la roca. De igual modo es frecuente que las bacterias generen polímeros extracelulares, usualmente ácidos, que contienen grupos funcionales que fácilmente enlazan iones metálicos y contribuyen a la corrosión y a la ruptura de carbonatos y silicatos (Ford & Mitchell, 1990; Little et al, 1986).

La presencia de Mycetozoa podría ser un indicador de diversos tipos de actividad bacteriana, la cual estaría involucrada en procesos activos de corrosión y/o de creación o destrucción de depósitos de minerales secundarios en las cuevas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La vida sobre la Tierra ha sido microscópica durante gran parte de sus 3.700 millones de años (Schopf & Walter, 1983). No obstante, la actividad metabólica de los microorganismos ha dejado su impronta sobre cada concebible estructura planetaria, desde el fraccionamiento isotópico de depósitos minerales en el subsuelo hasta la oxigenación de la atmósfera (Newman & Banfield, 2002). Tales actividades metabólicas continúan siendo de importancia crítica en el mantenimiento de la biosfera, donde los microorganismos sostienen a las formas superiores de vida a través de la producción primaria, fijación de nitrógeno y mineralización del carbono orgánico. Pese a esta evolución planetaria conjunta de la bio y geo-esfera, los investigadores tienden a ignorar en gran medida el papel de la actividad de los microorganismos en los ambientes geológicos. Esto ha sido debido, por una parte, a la habilidad para explicar muchas reacciones geoquímicas a través de procesos químicos puramente inorgánicos y, por otra parte, a la inhabilidad para obtener cultivos de microorganismos procedentes de estos sitios (Amann et al, 1995). Estas limitaciones están siendo recientemente removidas con el desarrollo de la geoquímica a escala molecular, a la vez que la biología molecular está permitiendo a los investigadores examinar tales ambientes sin la necesidad de efectuar cultivos (Barton & Northup, 2007).

Todo ello facilita las interacciones entre microbiólogos y geólogos para entender la historia natural de la vida y los cambios biogénicos identificados bajo condiciones geológicas, con los consiguientes hallazgos y novedosos resultados. La investigación en este límite entre la geología y la biología, se va extendiendo a todas las áreas de la geología, incluyendo la espeleología física, y va aportando detalles de múltiples procesos que previamente eran desconocidos (Cunningham et al, 1995; Northup et al, 1997).

Hasta hace poco, aunque muchos investigadores detectaban la presencia de microorganismos en ambientes con minerales secundarios en cuevas, el papel que jugaban pasaba desapercibido y se creía que su presencia era sólo el resultado de su transporte pasivo dentro de las cuevas a través de corrientes de aire o ingreso de animales. Los investigadores sugerían que debido al aislamiento geológico de las fuentes de energía alóctonas de superficie, las especies de microorganismos estarían limitadas y serían poco capaces de sostener su existencia en estos ambientes extremos, bajo condiciones casi de inanición (Palmer, 1991). No obstante, ciertos procesos geoquímicos eran difíciles de explicar por procesos puramente inorgánicos.

Con la reciente introducción de nuevas técnicas de biología molecular (purificación de DNA y filogenética molecular), química y mineralogía (difracción de rayos X, espectrometría Raman, espectroscopía por fotoelectrones de rayos X, microscopía de fuerzas atómicas, y otras técnicas analíticas basadas en dispersión de energía), se ha incrementado el número de ambientes y procesos que pueden ser estudiados exitosamente por los biólogos y geólogos. Tales técnicas permiten a los investigadores examinar complejas interacciones entre los componentes químicos y la fisiología microbiana, en los que intervienen cambios redox y de pH en ambientes geológicos que previamente habían sido considerados abióticos (Banfield & Nelson, 1997; Newman & Banfield, 2002). Los nuevos trabajos, además de arrojar nueva luz sobre las interacciones y procesos involucrados, aportan nuevos significados a la geomicrobiología de cuevas, a la vez que extienden entre los espeleólogos nuevas visiones que les permitirán reconocer estructuras geomicrobiológicas potencialmente interesantes durante sus exploraciones subterráneas (Davis, 2000).

Es en este marco que nos ha parecido de interés difundir el hallazgo de taxa de Mycetozoa en cuevas de Gipuzkoa, aunque sea a un nivel descriptivo muy elemental. Sus principales caracteres biológicos y el contexto ecológico en que se encuentran soportan la presunción, dados sus requerimientos tróficos, de la presencia de otros microorganismos, fundamentalmente bacterias.

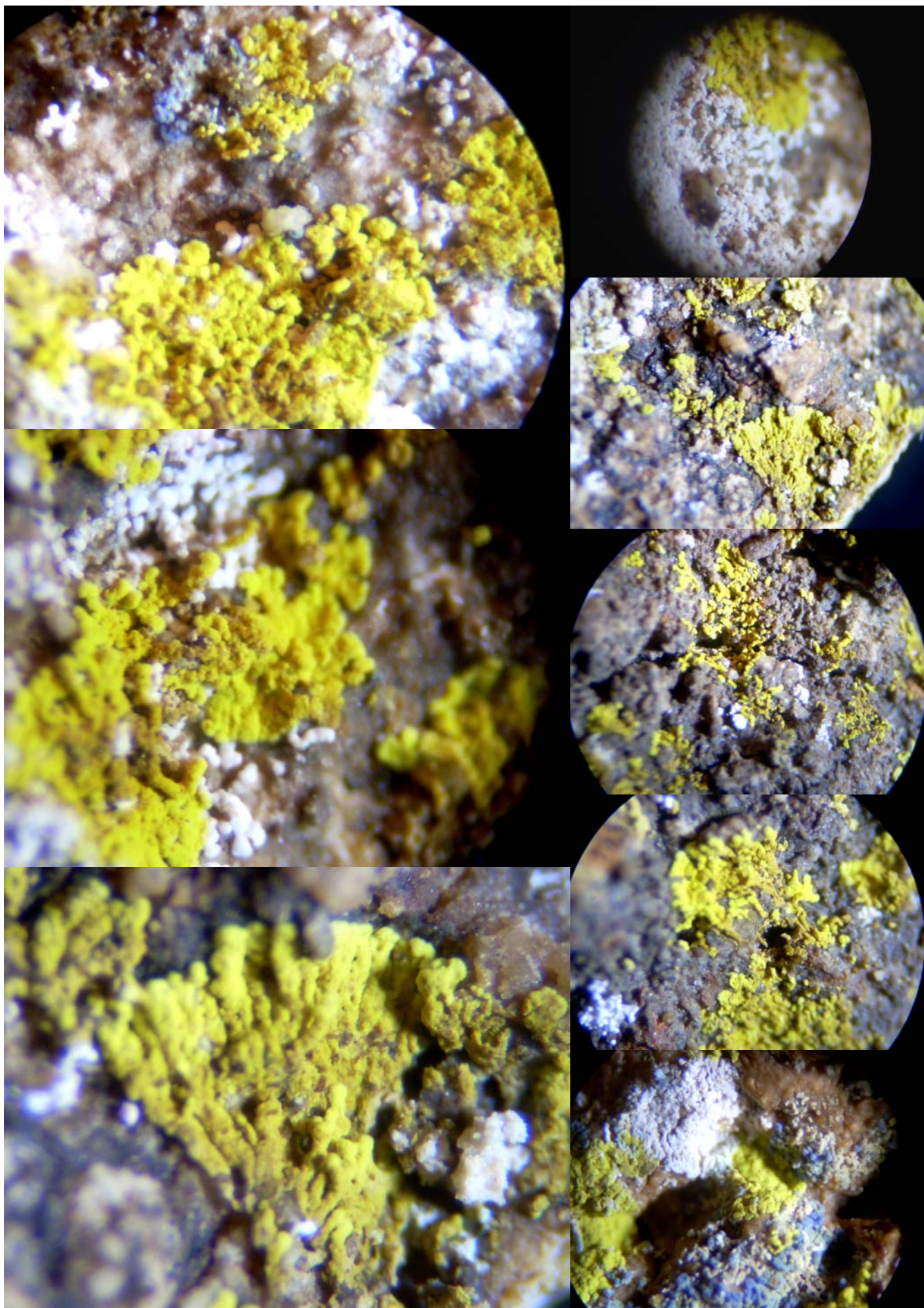


Figura 16. Micrografías de Mycetozoa de la cueva de Igitegi. Aspecto general de los plasmodios con cuerpos fructíferos, predominantemente amarillos pero también blancos y algunos escasos azules. Escala: ancho imágenes del lado izquierdo aproximadamente 3 mm.

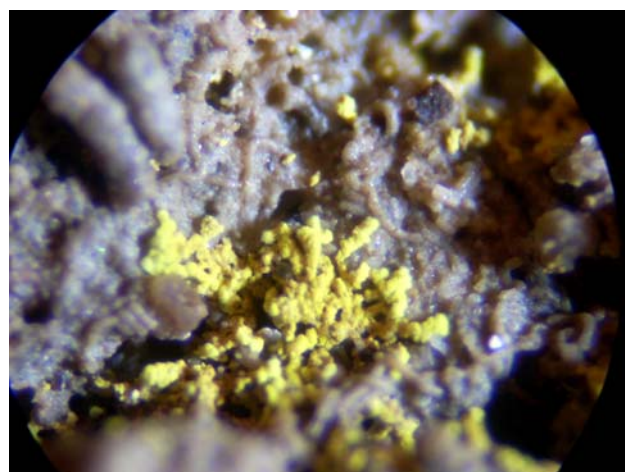
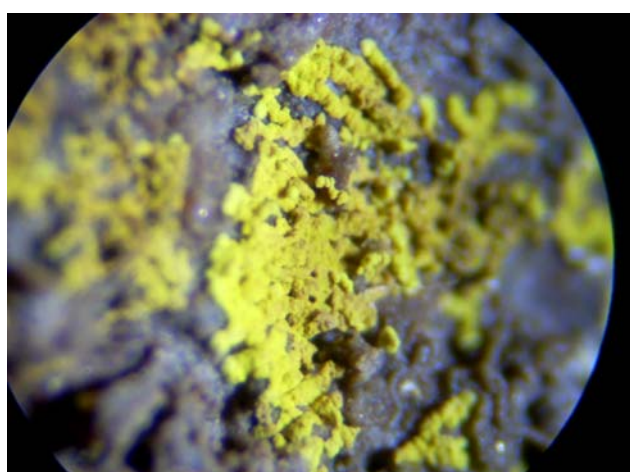
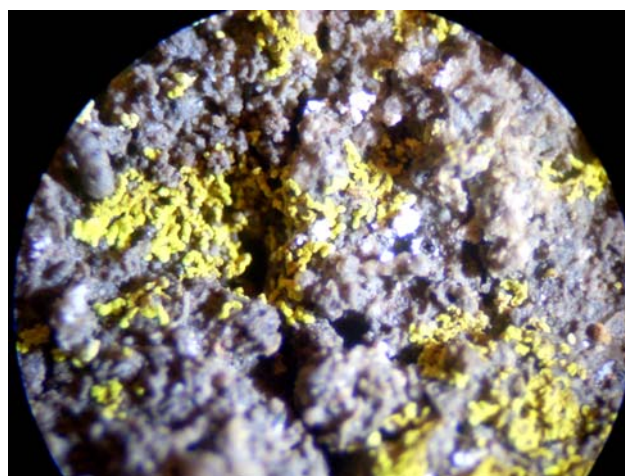
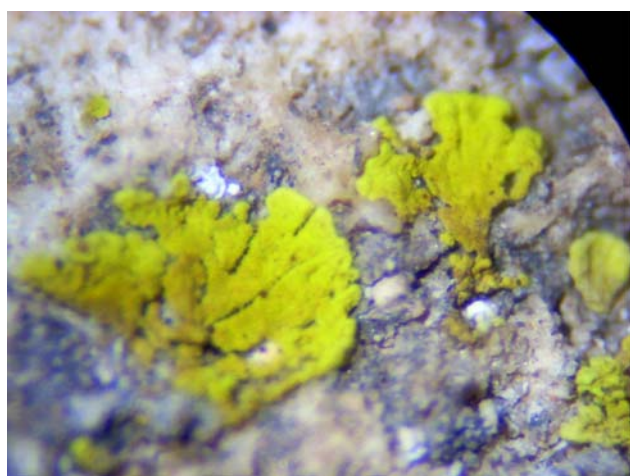
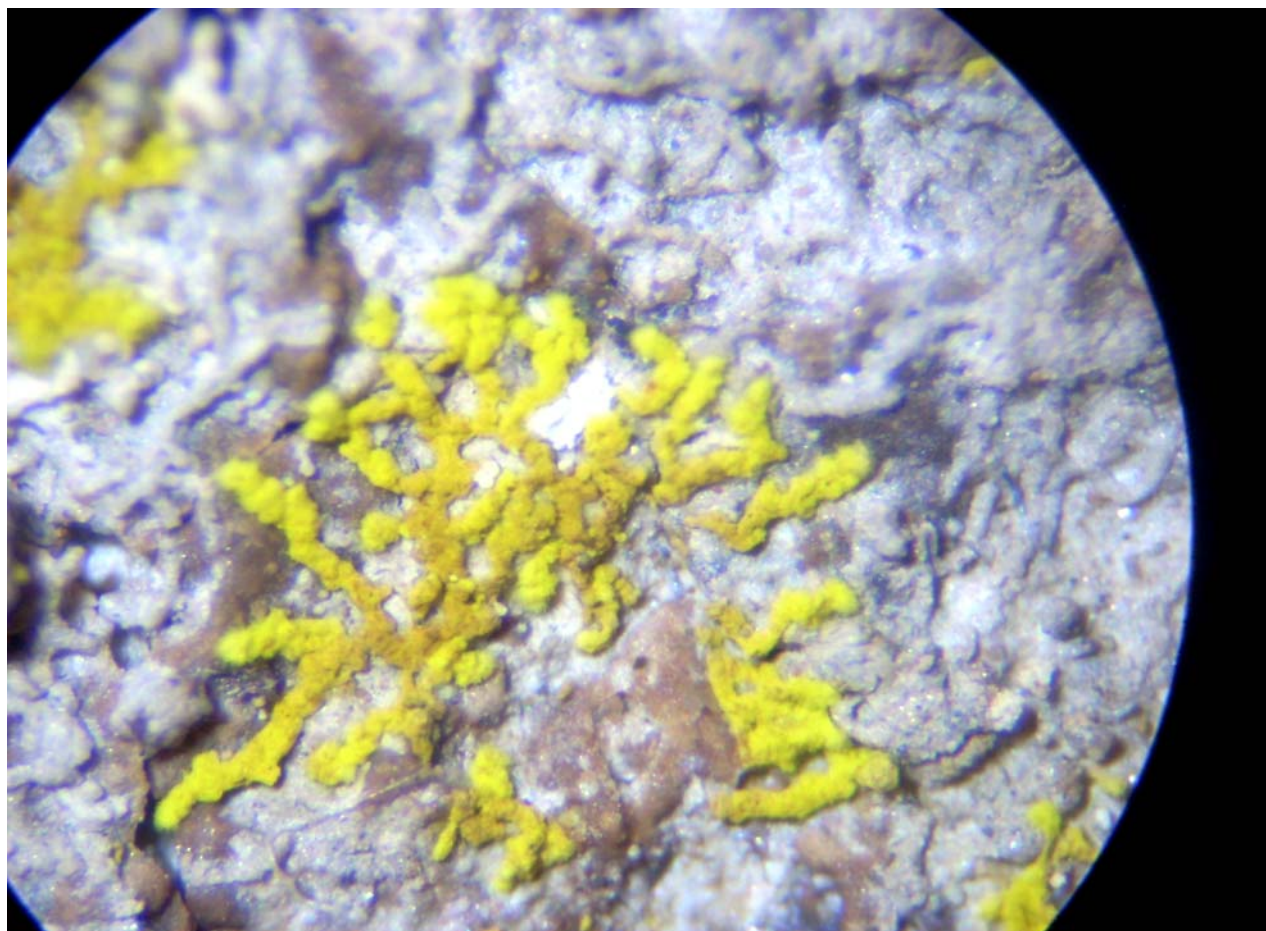


Figura 17. Las micrografías muestran la diversidad morfológica de los Mycetozoa de la cueva de Igitegi. Puede apreciarse en los plasmodios formas cilíndricas, vermiformes, bifurcadas, etc. En la imagen superior, de 2 mm de ancho, algunas partes parecen contener encostramientos de calcita.

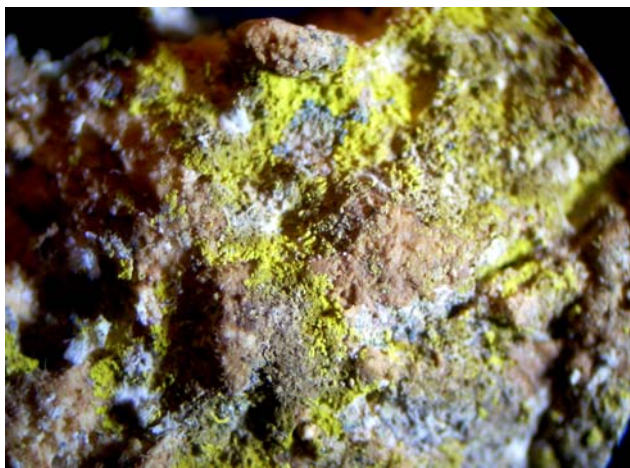
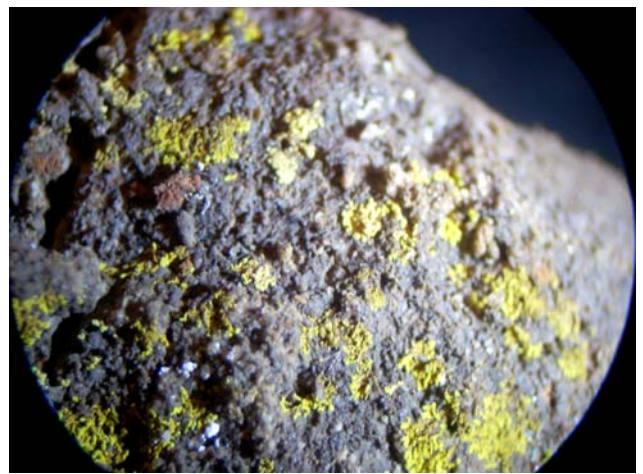
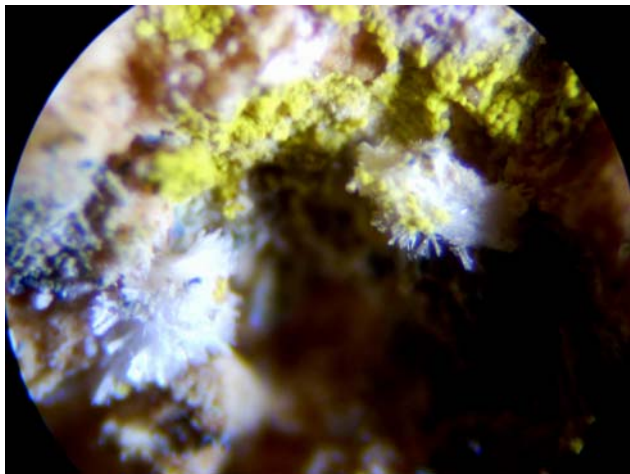
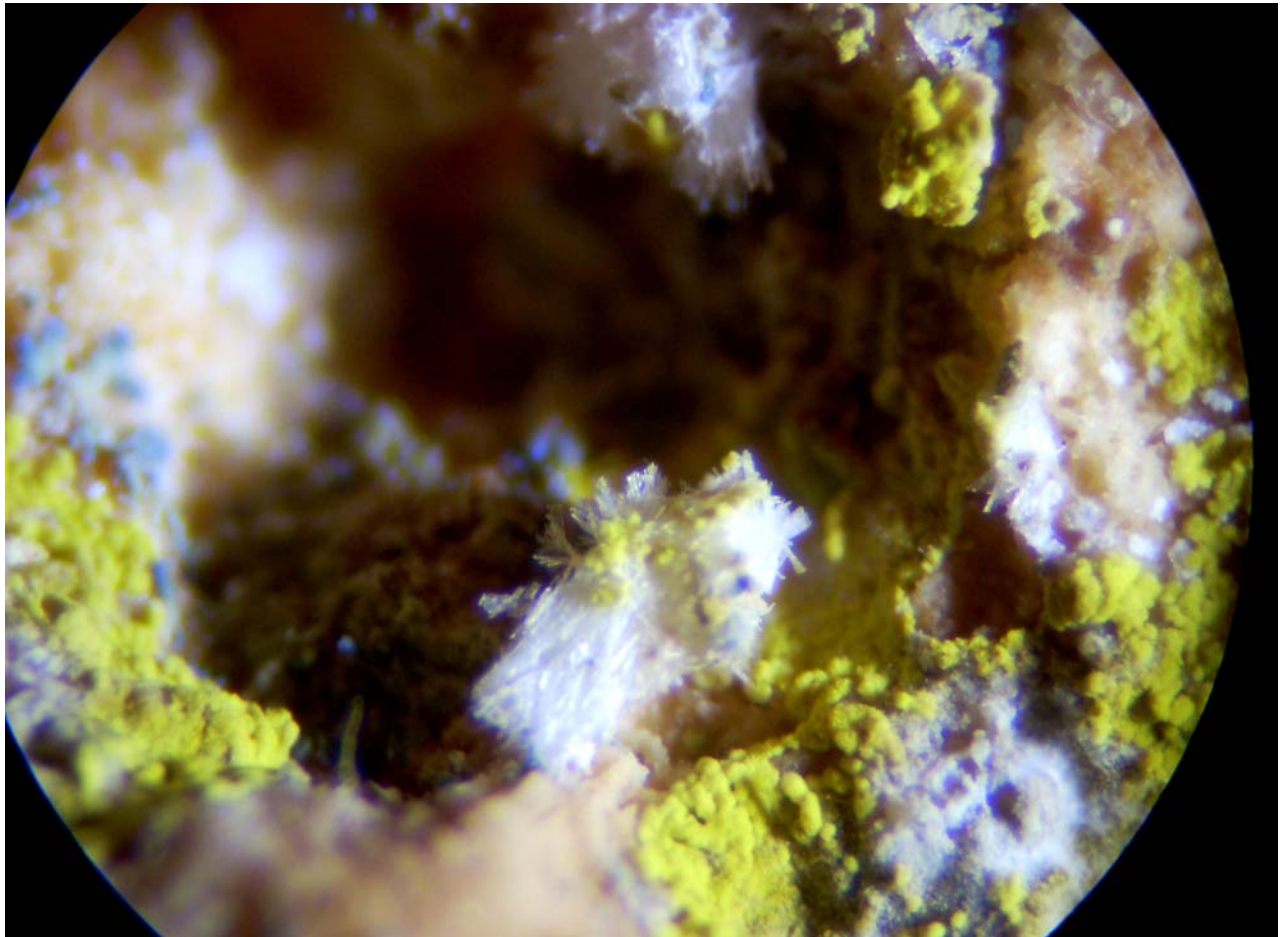


Figura 18. Micrografías de Mycetozoa de la cueva de Igitegi. En las imágenes superior y lado izquierdo se aprecian agregados fibrosos de cristales aciculares de yeso. En las del lado derecho algunos ejemplos de residuos de corrosión.

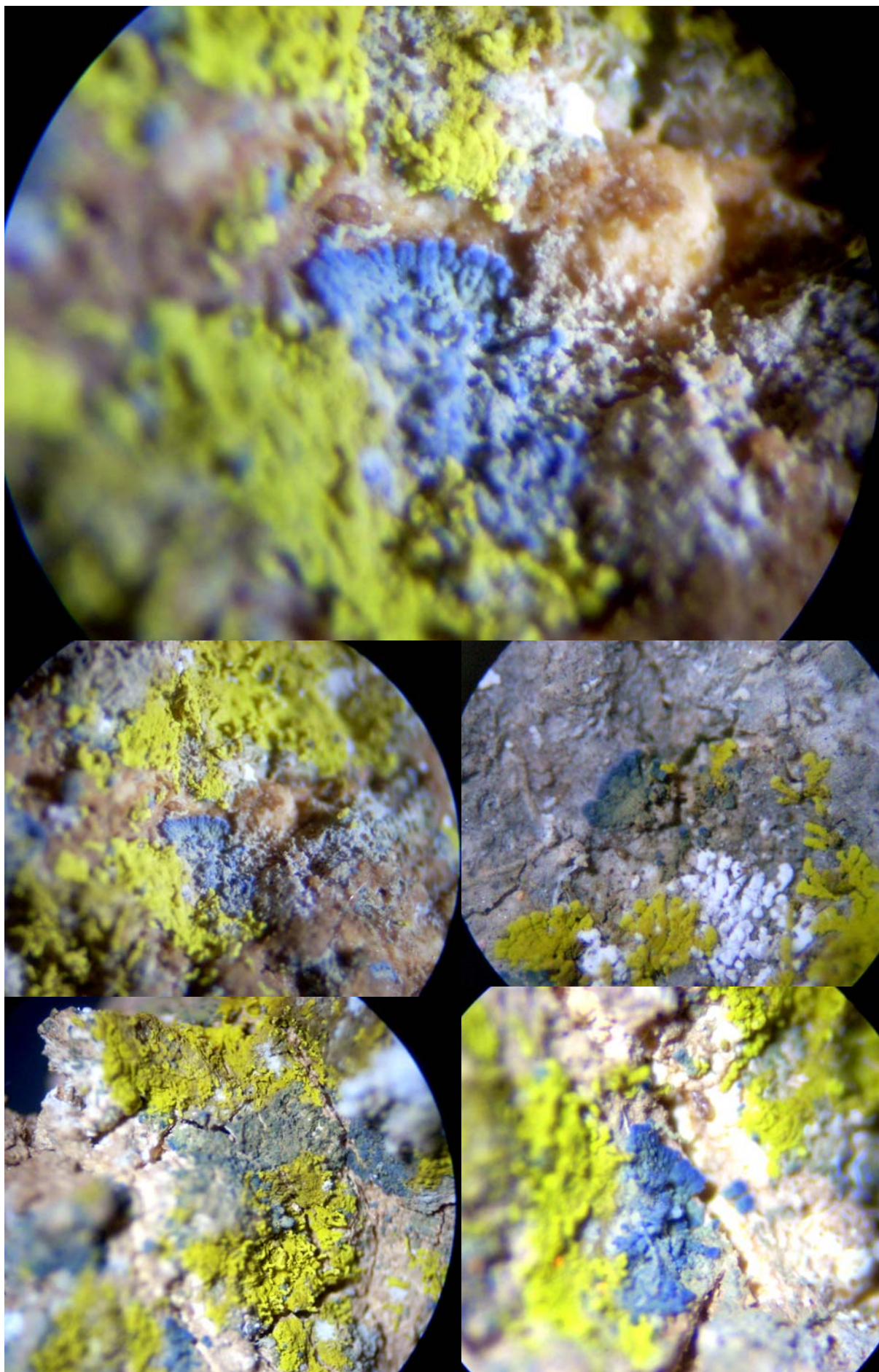


Figura 19. Micrografías de Mycetozoa de la cueva de Igitegi. Detalles de cuerpos fructíferos azules (y también algunos blancos) entre los amarillos predominantes. Es probable que se trate de especies distintas de un mismo grupo o familia.

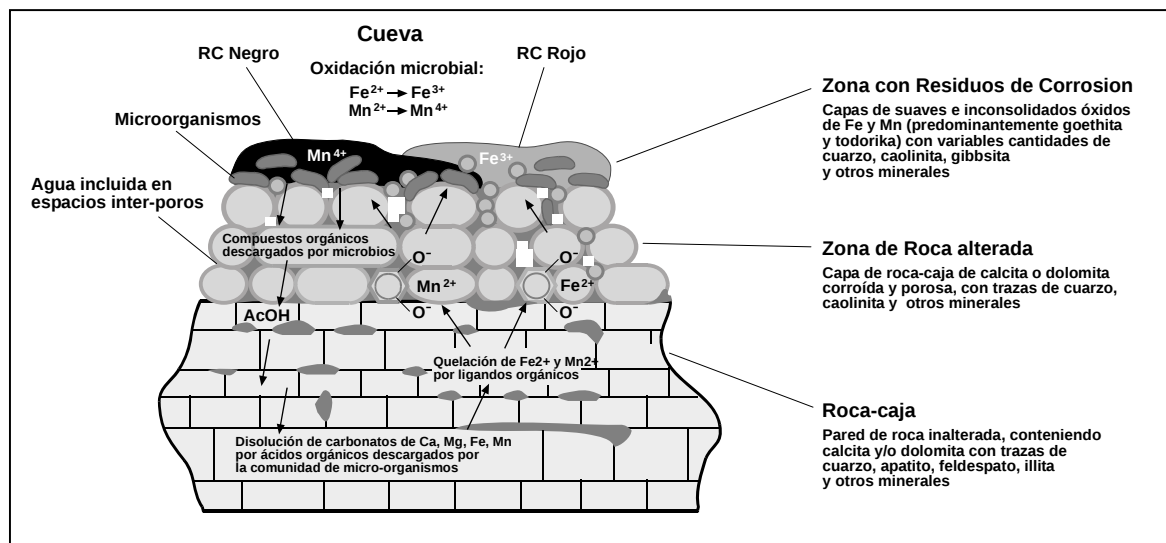
Pensamos que ellas sí pueden tener que ver con algunos de los rasgos que presentan los sustratos geológicos en que ocurren los Mycetozoa. Entre ellos podemos señalar los siguientes: (1) Procesos de alteración y corrosión de la superficie de la roca-caja y espeleotemas. (2) Depósitos con residuos de la alteración anterior, entre ellos, componentes detríticos y materiales ferruginosos. (3) Generación de micro-crecimientos de yeso. (4) Generación de interfases de tipo moonmilk, bien por alteración de la calcita pre-existente o bien por neo-formación mediada por actividad bacteriana. Comentaremos brevemente algunas inferencias que es posible efectuar, recordando nuevamente que su confirmación requiere un estudio específico más exhaustivo.

Los ambientes hipógeos tienen un alto potencial para las interacciones geo-microbiológicas. Los investigadores frecuentemente han asumido que los residuos de corrosión de la roca son esencialmente componentes insolubles que quedan después de la disolución de la roca-caja y que han sido así formados por procesos inorgánicos. La corrosión de la roca resulta por ejemplo del ascenso de corrientes de aire donde la convección Rayleigh-Benard puede inducir la circulación de aire que se enfría al alcanzar la bóveda de la cueva, resultando en la condensación de gotitas de agua que absorben CO₂, formando ácido carbónico que corroe el sustrato rocoso.

El descubrimiento de comunidades de bacterias y algas en los residuos de corrosión (Cunningham et al, 1995; Northup et al, 1995) ha conducido a otra explicación: que los microbios pueden ser activos participantes en la producción de residuos de corrosión, en conjunto con procesos abióticos. Potencialmente, los microorganismos pueden oxidar compuestos reducidos desde la atmósfera o la pared de roca, produciendo ácidos como subproductos, los cuales atacan la roca, contribuyen a la corrosión y a la alteración de carbonatos y silicatos. Costerton et al (1987) han mostrado que los biofilms microbiales pueden afectar grandemente a los sustratos sobre los cuales crecen, por alteración de las interfases bajo los films, incrementando así la corrosión y degradación de muchos materiales. Incluso la roca-caja puede ser alterada hasta una profundidad de 10 cm o más (Hill, 1987).

Entre los residuos de la corrosión de este tipo pueden ser encontrados fragmentos insolubles de cuarzo y arcillas (illita, caolinita, esmectita), y diversas fases de oxi-hidróxidos de hierro (principalmente hematita y goethita) y manganeso (todorokita). Junto a las arcillas puede estar presente hidróxido de aluminio (gibbsita) y otros minerales (ankerita, halloysita hidratada, endellita, etc.) (Cunningham et al, 1995; Northup et al, 2000). La todorokita, goethita y hematita representan los subproductos oxidados de Mn y Fe reducidos presentes habitualmente como trazas o cantidades minoritarias entre los minerales carbonatados originales.

Figura 20. Dibujo esquemático de una sección de pared de la roca-caja desde el ambiente aeróbico de la cueva hasta condiciones más reductoras encontradas en el interior de la pared de roca. (Fuente: Northup et al, 2000, modificado). RC = Residuos de Corrosión.



La Figura 20 representa una sección esquemática desde el ambiente aeróbico de la cueva hacia condiciones más reductoras en el interior de la roca-caja caliza. La remoción de carbonato es acompañada de disolución microbially asistida de la caliza y dolomía en la zona de roca descompuesta. La presencia en los residuos de corrosión de bacterias pertenecientes a grupos que utilizan la oxidación de Fe o Mn como vías metabólicas (*Leptothrix*, *Pedomicrobium manganicum*, y otras bacterias oxidantes de hierro) conduce a soportar esta hipótesis. El cuarzo y la illita en los sustratos de roca reaccionan para formar arcillas más ácido-estables, tal como caolinita. El exceso de aluminio sería incorporado en los residuos como gibbsita. A medida que el Fe y Mn son oxidados, se forman todorokita y fases férricas amorfas, que posteriormente pueden formar goethita y hematita.

En nuestro caso la presencia adicional de plasmodios de Mycetozoa sobre el sustrato, puede incorporar al mismo una amplia variedad de subproductos de la actividad metabólica de los Mycetozoa. La descarga de productos de desecho, a tenor de su composición, puede promover o inhibir la alteración de la roca y formación de minerales secundarios de modos similares a los de la propia acción bacteriana. De hecho es bajo y entre los plasmodios que se encuentran zonas con residuos de alteración, sobre todo ferruginosos y arcillosos, además de micro-fragmentos de agregados aciculares de yeso.

Existe una amplia bibliografía sobre la formación de cuevas por disolución con aguas cargadas de ácido sulfúrico, entre ellas los recientes datos sobre cuevas de gran desarrollo, como las de Lechuguilla (en Nuevo México) o la Toca de Boa Vista (en Bahía, Brasil), ambas superando los 100 km de desarrollo. En estos casos se trata de una espeleogénesis hipogénica, asociada a procesos hidrotermales profundos. Pero además, los microorganismos en cuevas también pueden jugar un papel en relación a sulfuros. Ha resultado de particular interés el reconocimiento de la actividad de bacterias en procesos de espeleogénesis a menor escala, conducida por ácido sulfúrico, y en la formación de depósitos isotópicamente ligeros de azufre y yeso. Tales isótopos ligeros son usados preferencialmente por enzimas celulares; y así, este fraccionamiento usualmente indica actividad biológica (Barton & Northup, 2007). Hill (1987) suministró los primeros valores $\delta^{34}\text{S}$ para todo un rango de ambientes geológicos, incluyendo análisis de isótopos de azufre sobre depósitos de azufre y yeso de varias cuevas. La comparación entre los datos observados y los valores teóricos le condujeron a concluir que había ocurrido un fraccionamiento biológico en las vías seguidas para formar los depósitos en cuevas. Posteriormente (Hill, 1994) estableció que tal fraccionamiento proviene de la reducción inicial de sulfato a sulfuro de hidrógeno; que los depósitos en cueva de azufre elemental no son biogénicos; mientras que los depósitos de yeso sí lo son. Posteriormente muchos otros autores han aportado datos sobre procesos en cuevas en los que está implicado el ácido sulfúrico, aunque la causa y efecto del metabolismo microbioal en la espeleogénesis permanece esquiva.

No ocurre lo mismo con los carbonatos, donde existe un cuadro mucho más claro de su biogeoquímica y de la deposición del CaCO_3 en reacciones desde rango molecular hasta a escala ambiental. Los microorganismos pueden provocar, controlar, inducir, o coordinar, de diferentes modos, la precipitación de CaCO_3 .

Los microorganismos pueden promover la precipitación de carbonatos a través de controles biológicos al alterar los índices de saturación de las soluciones o al remover inhibidores cinéticos de la cristalización, tales como iones magnesio, sulfato o fosfato, lo que influye en la morfología de los cristales de calcita generados. No obstante es menos claro su papel en inducir la deposición y el desarrollo de espeleotemas. Castanier et al (1999) han sugerido que los procesos bacteriales autotróficos pueden causar el agotamiento de CO_2 en torno a las células, favoreciendo la precipitación de iones calcio como CaCO_3 . Otros investigadores han propuesto que los procesos heterotróficos de fijación y descarga de nitrógeno juegan un papel crítico al elevar el pH local, favoreciendo otra vez la precipitación de carbonatos (Cacchio et al, 2004). En cianobacterias, la fijación de CO_2 incrementa la concentración de iones bicarbonato, los cuales pueden ser excretados en el medio extracelular, causando la precipitación de CaCO_3 si están presentes iones calcio (Badger & Price, 2003). Mientras estas reacciones fotosintéticas no son posibles en ambientes de cuevas, las anhidrasas carbónicas responsables de la toma de CO_2 son comunes entre especies bacteriales (Merlin et al, 2003). McConnaughey & Welan (1997) también han sugerido que la calcificación bacteriana puede generar energía para el uptake de nutrientes en ambientes empobrecidos y puede explicar la ubiqüista naturaleza de la precipitación de calcita.

Un problema intelectual se plantea cuando los microorganismos llevan a cabo la precipitación de calcita, ya que tal actividad conduce a su encostramiento por el crecimiento cristalino y a la muerte de los organismos (Barton et al., 2001). Es difícil entender en tal actividad alguna ventaja evolutiva. Es conocido que los iones bicarbonato pueden servir como tampón, lo que permite a los microorganismos llevar a cabo procesos celulares que de otro modo producirían condiciones muy ácidas; si los iones bicarbonato sirven para esta función, bajo tales condiciones el Ca^{2+} rápidamente se acumularía a niveles tóxicos. No obstante existe evidencia de que las bacterias tienen bombas de proteínas antiportadoras de Ca^{2+} que selectivamente detoxifican el exceso de calcio de las células por bombeo hacia el medio extracelular (Cai & Lytton, 2004). Anderson et al (1992) han demostrado que bajo concentraciones tóxicas de calcio, *Pseudomonas fluorescens* precipita calcita activamente. Otros trabajos han demostrado que las especies de bacterias aisladas de espeleotemas, despliegan una alta tasa de precipitación de carbonatos (Cacchio et al, 2004), entre ellas *Pseudomonas* y *Bacillus*. Usando fraccionamiento isotópico de oxígeno y carbono, los citados autores demuestran que existen tres tipos de procesos distintos involucrados en la precipitación de calcita, aparte de que existe un balance entre la precipitación mediada biológicamente y los procesos inorgánicos (Fouke et al, 2000; Palmer, 1996). También ha sido documentada la deposición microcristalina de calcita en estalactitas y en precipitados subacuáticos asociados con biofilms microbiales (Contos et al, 2001).

La más convincente evidencia de acción microbioal en la formación de espeleotemas es la relativa al moonmilk. Su delicada estructura fibrosa y facilidad de alteración por procesos constructivos y destructivos ha dificultado su análisis. Entre los mecanismos propuestos para la formación del moonmilk mediada por bacterias se encuentran los dos siguientes: (a) Corrosión bioquímica de la roca-caja por ácidos orgánicos producidos por microorganismos (*Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*). (b) Precipitación activa de moonmilk por bacterias como *Macromonas bipunctata* (Hill & Forti, 1997; Forti, 2000). Estos autores destacan que los microorganismos podrían también intervenir en la deposición de moonmilks constituidos por diferentes minerales; no sólo de calcita o hidromagnesita, sino también en moonmilks constituidos por yeso, sílice amorfo, etc.

Recientemente Cañaveras et al (1999, 2006) han demostrado que el moonmilk contiene numerosos filamentos de especies de Proteobacteria con fenotipos que precipitan calcita. La evidencia morfológica sugiere que el moonmilk se forma por colonización microbioal, seguida de deposición de calcita a lo largo de las superficies bacteriales, ruptura microestructural, y acumulación de fibras colapsadas. A medida que el proceso se repite a través de oscilaciones estacionales, los depósitos de moonmilk se hacen más gruesos, formando los significativos depósitos hallados en muchas cuevas. Los investigadores han identificado también la presencia de *Crenarchaeota*, un grupo de Archaea, en tales depósitos (Gonzalez et al., 2006). Estos trabajos presentan un detallado cuadro de las relaciones fisiológicas y geoquímicas en la formación de depósitos biogénicos en los ambientes de cuevas.



Figura 21. Cueva de Igitegi. Detalle de coladas estalagmíticas con plasmodios de Mycetozoa y residuos de corrosión (óxidos de Fe y Mn, probablemente) entre las formas botroidales. Las imágenes inferiores son detalles del recuadro de la imagen superior.

Mientras una gran cantidad de trabajo ha sido dedicada a entender la actividad microbial involucrada en procesos constructores de carbonatos, hay un creciente interés en abordar su acción en procesos destructivos, fundamentalmente porque ciertas moléculas biológicas tienen una suficientemente alta afinidad con los iones Ca^{2+} para promover su activa disolución. Estas estructuras incluyen exopolisacáridos (un componente mayor de los biofilms), sideróforos y otros quelantes secretados, e incluso las paredes celulares (Perry et al, 2004; Barton & Northup, 2007). A través de sus procesos metabólicos, las bacterias pueden secretar un gran número de ácidos orgánicos, los cuales disuelven activamente los carbonatos. Inversamente, un número de estructuras microbiales, incluyendo lípidos y fosfolípidos, inhiben la disolución; mientras que los ácidos húmicos derivados del suelo, los cuales forman una significativa porción del carbono orgánico hallado en las aguas de goteo en las cuevas, también inhiben la disolución de calcita. Por todo ello, los factores que gobiernan el control microbial en procesos constructivos o destructivos de la calcita envuelven un complejo balance entre condiciones locales, geoquímica y fisicoquímica del ambiente local, y los procesos metabólicos microbiales que predominan bajo tales condiciones (Pohl and Schneider, 2002).

Adicionalmente, las bacterias han mostrado ser activos agentes de disolución de la roca-caja y destrucción por ejemplo de pinturas rupestres en cuevas (Northup & Lavoie, 2001). Muchas bacterias sulfuro-oxidantes producen ácido sulfúrico como producto de desecho, el cual reacciona con la caliza para formar yeso, un mineral que es altamente soluble en agua. Así, bajo determinadas condiciones, la acción bacterial puede formar precipitados de yeso, a la vez que en general ataca y disuelve el sustrato de roca.

En nuestro caso, los cuatro grandes rasgos encontrados en los sustratos en que ocurren los Mycetozoa, pueden ser explicados por intervención de actividad bacterial, que como hemos expuesto resumidamente más arriba, puede involucrar una gran diversidad de procesos y resultados, constructivos y destructivos, mediados por microorganismos, a los que presumiblemente se debe sumar el propio aporte de la actividad metabólica de los plasmodios de Mycetozoa.

Además del reporte central de la ocurrencia de recubrimientos orgánicos amarillo-dorados de Mycetozoa, que destaca por sus llamativos efectos estéticos, existen otros curiosos ejemplos de alteración observados en la roca-caja. Entre ellos, el más llamativo o novedoso para nosotros, por no haberlo observado antes ni encontrar en la literatura reportes que se le asemejen, es el de la formación de recubrimientos blancos de tipo moonmilk (asociados a los Mycetozoa), aparentemente de calcita, el cual deja diseños moteados y vermiculados en relieve positivo sobre la superficie gris de la caliza en Aizen Koba, también de contrastantes diseños.

Para concluir, destacamos que la presencia de Mycetozoa cavernícolas, además de novedosa, muestra a su vez que la investigación detallada puede poner al descubierto que distintos taxa de dicho phylum pueden ocurrir y estar más ampliamente extendidos en otras cuevas de Gipuzkoa. Así, lo que inicialmente suscitó nuestra curiosidad creyendo que se trataba de un tipo peculiar de minerales o espeleotemas, ha conducido al descubrimiento de interesantes microorganismos e interacciones que se sitúan en el límite entre el mundo de los microorganismos y la geología y mineralogía de espeleotemas.

La Naturaleza nos muestra así que las cavernas albergan un amplio espectro de organismos y fenómenos, cuyo potencial para la investigación es notable y de considerable interés.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todos aquellos integrantes y colaboradores de la Sociedad de Ciencias Aranzadi que han aportado su ayuda en la realización de las prospecciones en cuevas que sustentan este trabajo. De modo especial a: Iñigo Herráiz, Aize García, Alberto Camaraza, Olatz Zubizarreta, Daniel Arrieta, Ivonne Riuter, Michel Molia y José M. Rivas. Agradecemos también por su colaboración en los análisis por espectroscopía Raman a Carolina Vera Martín y al Departamento de Biomateriales y Nanotecnología de Inasmet-Tecnalia. Por último, a Imanol Goikoetxea, por su continuado apoyo y útiles sugerencias.

BIBLIOGRAFIA

- Amann, R.L., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Anderson, S., Appanna, V.D., Huang, J. & T. Viswanatha. 1992. A novel role for calcite in calcium homeostasis. *FEBS*, 308: 94-96.
- Badger, M.R. & G.D. Price. 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54: 609-622.
- Banfield, J.F. & K.H. Nealson. 1997. Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals. In Ribbe, P.H., ed., *Reviews in Mineralogy*, v. 35, Mineralogical Society of America, Washington, D.C., 448 p.
- Bapteste, E., Brinkmann, H., Lee, J.A., Moore, D.V., Sensen, C.W., Gordon, P., Durufle, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Muller, M. & H. Philippe. 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: Dictyostelium, Entamoeba, and Mastigamoeba. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99: 1414-1419.
- Barton, H.A. & D.E. Northup. 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69 (1): 163-178.
- Barton, H.A., Spear, J.R., & N.R. Pace. 2001. Microbial life in the underworld: Biogenicity in secondary mineral formations. *Geomicrobiology Journal*, 18: 359-368.
- Cacchio, P., Contento, R., Ercole, C., Cappuccio, G., Martinez, M.P., & A. Lepidi. 2004. Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the Cervo Cave (L'Aquila -Italy): *Geomicrobiology Journal*, 21: 497-509.
- Cai, X., & J. Lytton. 2004. The cation/ Ca^{2+} exchanger superfamily: Phylogenetic analysis and structural implications. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 1692-1703.

- Cañaveras, J.C. et al. 1999. Microbial communities associated with hydro-magnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal*, 16: 9-25.
- Cañaveras, J.C., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Lario, J., Laiz, L., Gonzalez, J.M. & C. Saiz-Jimenez. 2006. On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften*, 93: 27-32.
- Castanier, S., Le Metayer-Level, G., & J.P. Perthuisot. 1999. Carbonates precipitation and limestone genesis: the microbiogeologists point of view. *Sedimentary Geology*, 126: 9-23.
- Caumartin, V. 1963. Review of the microbiology of underground environments. *National Speleological Society Bulletin*, 25: 1-14.
- Caumartin, V. & P. Renault. 1958. La corrosion biochimique dans un reseau karstique et la genese du Mondmilch. *Notes Biospeleologiques*, 13: 87-109.
- Contos, A.K., James, J.M., Heywood, B., Pitt, K. & P. Rogers. 2001. Morphoanalysis of bacterially precipitated subaqueous calcium carbonate from Weebubbe Cave, Australia. *Geomicrobiology Journal*, 18: 331-343.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M. & Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* 41: 435-464.
- Culver, D.C. 1982. Cave life. Evolution and ecology. Harvard University Press. Cambridge. 190 pp.
- Cunningham, K.I., Northup, D.E., Pollastro, R.M., Wright, W.G., & E.J. LaRock. 1995. Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. *Environmental Geology*, 25: 2-8.
- Davis, D.G. 2000. Extraordinary features of Lechuguilla Cave, Guadalupe Mountains, New Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62: 147-157.
- Ford, T. & R. Mitchell. 1990. The ecology of microbial corrosion. In: Marshall, K.C. (ed.). *Advances in microbial ecology II*. Plenum Press, New York, NY: 231-262.
- Forti, P. 2000. I depositi chimici presenti nella grotta Serafino Calindri. *Sottoterra*, 110: 31-41.
- Fouke, B., J. Farmer, D. Des Marais, J. Pratt, N. Sturchio, P. Burns & M. Discipulo. 2000. Depositional facies and aqueous-solid geochemistry of travertine-depositing hot-springs (Angel Terrace, Mammoth Hot Springs, Yellowstone National Park, USA). *Journal of Sedimentary Petrology*, 70: 565-585.
- Galán, C. 1970. Aporte al conocimiento de los Quirópteros Cavernícolas del País Vasco. *Munibe*, S.C.Aranzadi, 22(1-2): 61-66.
- Galán, C. 1992. Estudio hidrogeológico de los macizos kársticos de Izarraitz y Arno (Gipuzkoa, País Vasco). Pág. Web aranzadi-science.org, Archivo PDF: 37 pp.
- Galán, C. 1993. Fauna hipógea de Gipuzkoa: su ecología, biogeografía y evolución. *Munibe (Cienc.Nat.)*, S.C.Aranzadi, 45: 1-163.
- Galán C. 1997. Fauna de Quirópteros del País Vasco. *Munibe (Ciencias Naturales)*, S.C. Aranzadi, 49: 77-100.
- Galán, C. & F.F. Herrera. 1998. Fauna cavernícola: ambiente y evolución (Cave fauna: environment and evolution). *Bol. Soc. Venez. Espeleol.*, 32: 13-43.
- Galán, C., Nieto, M. & C. Vera Martin. 2010. Recubrimientos de microorganismos (Mycetozoa) y espeleotemas en una cueva en caliza Jurásica de la cuenca del río Leizarán (Gipuzkoa, País Vasco). Pag web aranzadi-science.org, Archivo PDF, 26 pp.
- Ginet, R. & V. Decú. 1977. Initiation á la biologie et á l'écologie souterrain. Ed.Delarge, Paris, 345 p.
- Gittleson, S.M. & R.L. Hoover. 1969. Cavernicolous protozoa: Review of the literature and new studies in Mammoth Cave Kentucky. *Annales de Spéléologie*, 24(4): 737-76.
- Gloeckner, G., Golderer, G., Werner-Felmayer, G., Meyer, S., & W. Marwan. 2008. A first glimpse at the transcriptome of *Physarum polycephalum*. *BMC Genomics* 9: 6.
- González, J.M., M.C. Portillo & C. Saiz-Jimenez. 2006. Metabolically active *Crenarcheota* in Altamira Cave. *Naturwissenschaften*, 93 : 42-45.
- Gounot, A. 1960. Recherches sur le limon argileux souterrain et sur son role nutritif pour les *Niphargus* (Amphipodes, Gammarides). *Ann.Spéleol.*, 15: 501-526.
- Groth, I. & C. Saiz-Jimenez. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, 16(1): 1-8.
- Hill, C.A. 1987. Geology of Carlsbad Cavern and other caves in the Guadalupe Mountains, New Mexico and Texas. Socorro, N.M., New Mexico Bureau of Mines and Mineral Resources Bulletin, 117: 1-150.
- Hill, C.A. 1994. Sulfur redox reactions-hydrocarbons, native sulfur, Mississippi Valley-type deposits, and sulfuric acid karst, Delaware Basin, New Mexico and Texas. In: Sasowsky, I.D. & M.V. Palmer. *Breakthroughs in Karst Geomicrobiology and Redox Chemistry*. Karst Waters Institute, Special Publication, 1: 25-28.
- Hill, C.A. & Forti, P. 1997. Cave minerals of the world. 2nd ed. Huntsville, Ala., National Speleological Society, 463 p.
- Hoffman, A., Palacios-Vargas, J. & J.B. Morales-Malacara. 1986. Manual de bioespeleología (con nuevas aportaciones de Morelos y Guerrero, México). México, D.F., Universidad Nacional de México.
- James, T.Y. et al. 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443: 818-822.
- Juberthie C. & V. Decú. (Editors). 1994. *Encyclopedia Biospeologica*. Vol. 1. Moulis & Bucharest. Société de Biospéologie.
- Little, B.J., Wagner, P. & Gerchakov, S.M. 1986. A quantitative investigation of mechanisms for microbial corrosion. In: Dexter, S.C. (Ed.). *Biologically induced corrosion*. National Association of Corrosion Engineers: 209-214.
- Marwan, W., Sujatha, A. & C. Starostzik. 2005. Reconstructing the regulatory network controlling commitment and sporulation in *Physarum polycephalum* based on hierarchical Petri net modelling and simulation. *Journal of Theoretical Biology*, 236: 349-365.
- McConnaughey, T.A & J.F. Whelan. 1997. Calcification generates protons for nutrient and bicarbonate uptake. *Earth Science Reviews*, 42: 95-117.
- Newman, D.K. & J.F. Banfield. 2002. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin geochemical systems. *Science*, 296: 1071-1077.
- Nieves-Rivera, A.M. 2003. Mycological Survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. *Journal of Cave and Karst Studies*, 65 (1): 23-28.
- Northup, D.E. & K.H. Lavoie. 2001. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*, 18(3): 199-222.
- Northup, D.E., Carr, D.L., Crocker, M.T., Hawkins, L.K., Leonard, P. & Welbourn, W.C. (1995). Biological investigations in Lechuguilla Cave. *NSS Bulletin*, 56: 54-63.
- Northup, D.E., Reysenbach, A-L., and Pace, N.R., 1997, Microorganisms and speleothems, in Hill, C.A., and Forti, P., eds., *Cave Minerals of the World*, 2nd ed, National Speleological Society, Huntsville, p. 261-266.
- Northup, D.E., Dahm, C.N., Melim, L.A., Spilde, M.N., Crossey, L.J., Lavoie, K.H., Mallory, L.M., Boston, P.J., Cunningham, K.I. & S.M. Barns. 2000. Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *Journal of Cave and Karst Studies*, 62: 80-90.
- Olive, L.S. & C. Stoianovitch. 1975. *The Mycetozoa*. New York: Academic Press.
- Palmer, A.N. 1991. Geology and origin of Lechuguilla Cave. *Speleo Projects*, Basel, Switzerland, 144 p.
- Palmer, M.V. 1996. Influence of carbon dioxide outgassing rates and accessory ions on CaCO₃ crystal shapes. *Geological Society of America*, 28 Annual Meeting, Abstracts with Programs, 28: 48 p.

- Perry, T.D., Duckworth, O.W., McNamara, C.J., Martin, S.T., & R. Mitchell. 2004. Effects of the biologically produced polymer alginic acid on macroscopic and microscopic calcite dissolution rates. *Environmental Science and Technology*, 38: 3040-3046.
- Pohl, W. & J. Schneider. 2002. Impact of endolithic biofilms on carbonate rock surfaces in *Natural Stone: Weathering Phenomena, Conservation Strategies and Case Studies*. Eds. Siegesmund, S., Weiss, T. & Vollbrecht, A. Geological Society, London, 205: 177-194.
- Reeves, W.K., Jensen, J.B. & J.C. Ozier. 2000. New faunal and fungal records from caves in Georgia, USA. *Journal of Caves and Karst Studies*, 62: 169-179.
- Sarbu, S.M., T.C. Kane & B.K. Kinkle. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science*, 272:1953-54.
- Rutherford, J.M. & L.H. Huang. 1994. A study of fungi of remote sediments in West Virginia caves and a comparison with reported species in the literature. *National Speleological Society Bulletin*, 56(1):38-45
- Schopf, J.W. & M.R. Walter. 1983. Archean Microfossils: New evidence of ancient microbes. In: Schopf, J.W., ed., *Earth's Earliest Biosphere: Its origins and evolution*. Princeton University Press, Princeton, N.J., p. 214-239.
- Stanier, R., J. Ingraham, M. Wheelis & P. Painter. 1996. *Microbiología* (Segunda Edición). Ed.Reverté, Barcelona, 750 pp.
- Went, F.W. 1969. Fungi associated with stalactite growth. *Science*, 166: 385-86.
- Williams, A.M. 1959. The formation and deposition of moonmilk. *Trans. Cave Res. Group*, 5(2): 133-138.
- Yoon, H.S., Grant, J., Tekle, Y.I., Wu, M., Chaon, B.C., Cole, J.C., Logsdon, J.M. Jr., Patterson, D.J., Bhattacharya, D. & L.A. Katz. 2008. Broadly sampled multigene trees of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, 18: 8-14.