



# **Biodeterioro algal en monumentos históricos mayas de la zona tropical húmeda: Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México)**

Mónica Ramírez Vázquez

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



---

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología

TESIS DOCTORAL

"BIODETERIORO ALGAL EN MONUMENTOS HISTÓRICOS MAYAS DE LA ZONA TROPICAL HÚMEDA: PALENQUE, YAXCHILÁN Y BONAMPAK (CHIAPAS, MÉXICO)"

Mónica Ramírez Vázquez

Directoras de Tesis

Dra. Ma. C. Hernández Mariné

Dra. Mònica Roldán Molina

2012



Este trabajo se realizó en la Unidad de Botánica del Departamento de Fisiología Vegetal y Productos Naturales de la Universidad de Barcelona.

Con el apoyo del Programa Alban E06D100109MX (Programa de becas de alto nivel de la Unión Europea para América Latina).

Beca de colaboración con la Universidad de Barcelona. Unidad de Genómica. Servicios Científico-Técnicos. Parc Científic de Barcelona.



## **Contenido**

### 1. Introducción

- 1.1. Patrimonio cultural
- 1.2. Degradación de los monumentos (piedra)
- 1.3. Factores abióticos
- 1.4. Factores bióticos
- 1.5. Biodeterioro
- 1.6. Biofilms fotosintéticos
- 1.7. Bioreceptividad

### 2. Objetivos

### 3. Materiales y métodos

- 3.1. Descripción del área de estudio y recolección de material
  - 3.1.1. Palenque
  - 3.1.2. Yaxchilán
  - 3.1.3. Bonampak
- 3.2. Técnicas empleadas
  - 3.2.1. Microscopia estereoscópica o de disección
  - 3.2.2. Microscopia óptica
  - 3.2.3. Microscopia de barrido láser confocal
  - 3.2.4. Microscopia electrónica de barrido, microanálisis de energía dispersada de rayos X y electrones retrodifundidos
  - 3.2.5. Microscopia electrónica de transmisión
  - 3.2.6. Difracción de rayos X
  - 3.2.7. Extracción de DNA, PCR y análisis filogenético

## 4. Resultados

4.1. Los biofilms formados por cianobacterias de un monumento maya en la zona arqueológica de Palenque, México.

4.2. Enfoque polifásico y las estrategias adaptativas de *Nostoc* cf. *commune* (Nostocales, Nostocaceae) en los monumentos mayas.

## 5. Discusión

## 6. Conclusiones

## 7. Referencias

## 8. Anexos

8.1. Criterios moleculares, fenotípicos y ecológicos para la caracterización de un nuevo género de Chroococcales (Cianobacteria) de ambientes aerofíticos con baja iluminación.

8.2. Biofilms fotosintéticos: colonización y biodeterioro en tres zonas arqueológicas mayas.

## 9. Agradecimientos

## **1. Introducción**

### **1.1. Patrimonio Cultural**

*Patrimonio cultural*, se aplica al conjunto de todos los bienes materiales y valores culturales que son expresión de la identidad de un pueblo. Es decir, la *herencia cultural* propia del pasado con la que un pueblo vive hoy y es transmitida de generación en generación (Allsopp *et al.* 2004).

Según la World Heritage Convention (1972) forman parte de esta herencia el conjunto de bienes materiales e inmateriales, muebles e inmuebles, que poseen un especial interés histórico, artístico, estético, plástico, arquitectónico, urbano o arqueológico (<http://whc.unesco.org/?cid=175>. Última fecha de acceso: 20/12/2010. <http://whc.unesco.org/archive/convention-es.pdf>. Última fecha de acceso: 20/12/2010).

Dicha Convención considera "Patrimonio Cultural":

- los monumentos: obras arquitectónicas, de escultura o de pinturas monumentales, elementos o estructuras de carácter arqueológico, inscripciones, cavernas y grupos de elementos, que tengan un valor universal excepcional desde el punto de vista de la historia, del arte o de la ciencia (Fig. 1a).



- los conjuntos: grupos de construcciones, aisladas o reunidas, cuya arquitectura, unidad e integración en el paisaje les dé un valor universal excepcional desde el punto de vista de la historia, del arte o de la ciencia (Fig. 1b).

Las zonas arqueológicas mayas, son declaradas por la UNESCO Patrimonio cultural mundial. Es donde se hallan los vestigios de los primeros asentamientos de las civilizaciones mesoamericanas antes del establecimiento español en el siglo XVI. La cultura maya fue de las más importantes y poderosas culturas mesoamericanas tanto por la extensión y diversidad geográfica (montañas, pantanos, planicies, selvas tropicales, bosques de altura), así como por las manifestaciones culturales (arquitectura, escultura, pintura, astronomía, matemáticas) (Ruz 1997).

En las construcciones mayas los materiales usados fueron la roca caliza, mortero y estuco (Hohmann-Vogrin 2001). La caliza es una roca sedimentaria compuesta mayoritariamente por carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), generalmente calcita. También puede contener carbonato de magnesio y pequeñas cantidades de minerales tales como el cuarzo o arcillas. Este tipo de roca es altamente porosa y proclive a una disolución (Pettijohn 1975).

El deterioro de los materiales porosos usados en la construcción, como piedra, ladrillo, hormigón o mortero, es causado por factores mecánicos, físicos, químicos y biológicos. Por ello, cuando un material

se está deteriorando, la identificación de la causa de la decadencia no es fácil y a menudo requiere un estudio multidisciplinario y el uso de diferentes herramientas para su estudio (Kumar & Kumar 1999; Fernádes 2006; Doehne & Price 2010).

### **1.2. Degradación de los monumentos**

El desgaste de las rocas es un fenómeno natural como resultado de los agentes atmosféricos, mientras que la degradación es "cualquier modificación química o física de las propiedades intrínsecas de las rocas que conduce a una pérdida de valor " o la "disminución de la condición, la calidad o la capacidad funcional" (Warscheid & Braams 2000).

En la caracterización de las rocas es importante tener en cuenta no solo la composición química; otras variables como la porosidad, la forma y el tamaño de poro y su distribución, así como el tamaño de grano para entender su comportamiento frente a los factores externos (Buj & Gisbert 2010; Doehne & Price 2010).

La alteración de edificios y obras de arte expuestos a la intemperie es parte del mismo proceso natural de intemperismo, como resultado de la interacción de factores físicos, químicos y biológicos; que cuando se manifiestan de manera simultánea el efecto es sinérgico (Fig. 1c).

Aunque se trata de un suceso conocido desde la antigüedad, la protección y conservación del Patrimonio cultural y el estudio de las causas de su deterioro han cobrado interés en las últimas décadas, siendo el principal objetivo en numerosos estudios histórico-culturales, así como desde el punto de vista económico y turístico (Saiz-Jiménez 1994; Caneva *et al.* 2005).

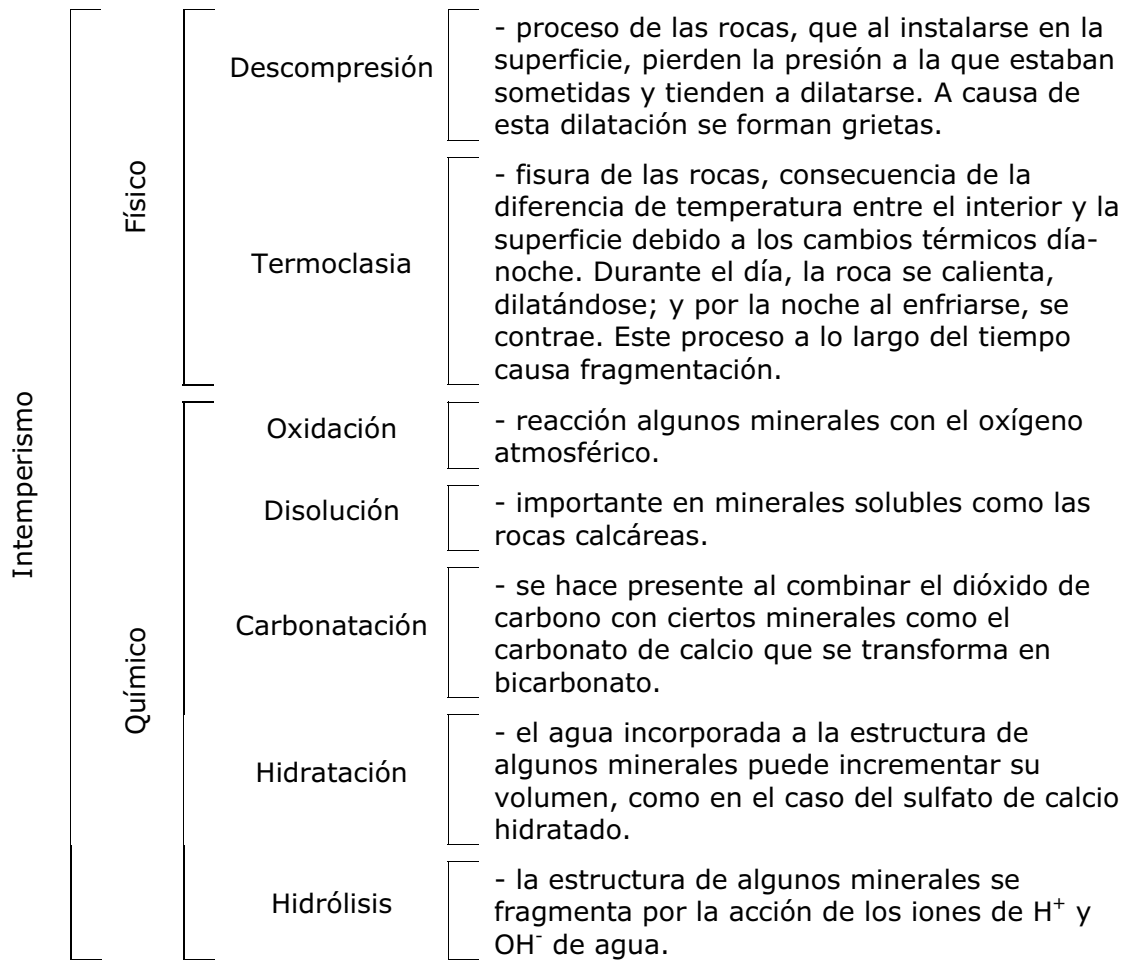
### **1.3. Factores abióticos**

Los factores abióticos, combinados con otros agentes, están directamente relacionados en el proceso de degradación de la roca. Los agentes físicos afectan la estabilidad de la roca y los químicos actúan como corrosivo y facilitan la formación de minerales, que a su vez por reacciones de oxido-reducción e hidratación favorecen la disolución de los carbonatos (Warsheid & Braams 2000).

Los mecanismos implicados en el proceso de deterioro de monumentos son parte de las mismas transformaciones naturales a las que están sometidas las rocas: intemperismo, erosión y sedimentación. El intemperismo es la acción geológica de la roca, *in situ*; es un proceso estático por el cual la roca se rompe en pequeños fragmentos, se disuelve, se descompone y da lugar a la formación de nuevos minerales como consecuencia de su exposición a los agentes atmosféricos. Puede incluir la participación de agentes biológicos. El

intemperismo puede reducir la consistencia de las masas pétreas y facilitar la erosión (López 1993; Tarbuck & Lutgens 1999).

El intemperismo físico favorece la desintegración o ruptura de la roca sin afectar a su composición química o mineralógica. La principal causa del intemperismo físico es debida a algunos cambios en las condiciones ambientales, por ejemplo, ciclos de lluvia y sequía o formación de hielo en el interior de los poros de la roca, la cual, debido al aumento de tamaño ejerce presión sobre las paredes y llega a fragmentarlas. El intemperismo químico produce la transformación química de la roca. Los factores más importantes son los atmosféricos, en los cuales están implicados el vapor de agua, el oxígeno y el dióxido de carbono, entre otros. La siguiente tabla resume los diferentes efectos relacionados con la meteorización en rocas (Basado en López 1993; Tarbuck & Lutgens 1999).



Son también comunes otras causas de deterioro, siendo las más importantes la contaminación atmosférica, la presencia de sales y el biodeterioro (Saiz-Jimenez, 2001; Smith *et al.*, 2008; Walker & Pace, 2007; (Doehne & Price, 2010) (Fig. 1d).

#### 1.4. Factores bióticos

La importancia de los microorganismos en el biodeterioro de materiales está relacionada con las drásticas modificaciones que se

pueden producir en los valores de pH y concentraciones de óxido-reducción en la interfase entre el sustrato y el medio circundante. Estos cambios crean áreas muy particulares, potencialmente vulnerables (Videla 2002; Doehne & Price 2010).

El tipo de alteración, tanto física como química, que realizan los seres vivos se conoce como intemperismo biológico. El ejemplo más evidente son las raíces de las plantas que se introducen entre las grietas actuando de cuñas (Ruz 1997). Al mismo tiempo segregan sustancias que alteran químicamente las rocas. Los animales (lombrices, hormigas, etc.) también juegan un rol importante en este proceso.

A continuación se describe las alteraciones de los diferentes organismos involucrados en el deterioro de las rocas.

*Bacterias no autotótrofas.* El papel de algunas bacterias no autótrofas en el deterioro de roca no es tan evidente como el que realizan las plantas, aunque hay datos que indican que contribuyen a su degradación. Un ejemplo es la presencia de bacterias halofílicas en pinturas murales y obras de arte que utilizan las sales solubilizadas como recurso (McNamara *et al.* 2006; Gorbushina 2007; Piñar *et al.* 2009; Büdel *et al.* 2004). Otro proceso, como producto del metabolismo de bacterias sulfurosas, es la formación de sulfato de calcio debido al ataque ácido que altera la roca original (Caneva *et al.*

1991; Allsopp *et al.* 2004). Por otro lado las bacterias nitrificantes como *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* han sido encontradas en roca deteriorada, por lo que se han propuesto como agentes responsables de la oxidación del amoníaco produciendo nitratos. Los nitratos reaccionan con el carbonato de calcio de las rocas dando lugar a nitrato de calcio que es soluble (Mansch & Bock 1998). Los productos obtenidos son entonces lavados por la lluvia, lo que deja un polvo suelto de partículas de sílice (Caneva *et al.* 1991).

Otras bacterias presentes en monumentos pétreos utilizan el carbono de los sustratos calizos como recurso energético, formando ácidos orgánicos como glucónico o láctico que se depositan sobre la superficie colonizada modificando sus propiedades químicas (Wakefield & Jones 1998; Ortega-Morales 1999).

*Microorganismos fotosintéticos.* En las comunidades microbianas fotosintéticas se encuentran cianobacterias y algas, ambas productores primarios por su capacidad de nutrición autotrófica. Presentan diversas morfologías, unicelulares, filamentosas, coloniales, etc. y gran capacidad de adaptación (Kumar & Kumar 1999). Las algas aerofíticas se pueden encontrar con mayor frecuencia en rocas donde hay luz y una fuente de agua. El agua puede estar presente en forma líquida o gaseosa. En los trópicos húmedos y subtrópicos, no se requiere de una obvia fuente de agua,

con el grado de humedad en el aire es suficiente para su desarrollo y crecimiento (Reisser & Houben 2001). Allsopp (2004) explica que los microorganismos fotosintéticos colonizadores podrían causar daño mecánico y la ampliación de las grietas en la roca como consecuencia de su crecimiento. Cuando los microorganismos fotosintéticos crecen dentro de la roca (organismos endolíticos, criptoendolíticos y casmoendolíticos) (Golubic 1981), es posible que causen directamente perturbaciones en la estructura. Por otra parte, el deterioro estético es quizá el tipo más importante de los daños causados por dichos microorganismos. Esto también ocurre en otros materiales como madera, superficies pintadas y en cualquier superficie expuesta a un nivel mínimo de luz y agua. Las grandes manchas antiestéticas (crecimientos) de color verde, rosado, marrón dan una apariencia de descuido a los edificios. Un ejemplo son las manchas rosadas en los frescos de la Capilla de San Brizio (Catedral de Orvieto, Italia) que resultó ser una alteración biológica causada por bacterias (Capitelli *et al.* 2009). El desarrollo de manchas ocasionadas por el crecimiento de cianobacterias y algas puede ser muy rápido, incluso semanas, particularmente en los trópicos húmedos (Kumar & Kumar 1999; Allsopp *et al.* 2004) (Fig 2a).

Algunos autores opinan que la alteración que ocasionan en los materiales de construcción se limita al aspecto poco estético que



forman los biofilms (Tiano 1994). Sin embargo, experiencias de campo acompañadas de estudios de la piedra mediante técnicas mecánicas y químicas indican que el daño puede ser superior (Krumbein 1972; Ortega-Calvo *et al.* 1991; Wakefield & Jones 1998), siendo las algas verdes y las cianobacterias los principales grupos responsables de este proceso (Bellinzoni *et al.* 2003).

Otro efecto que ocasionan los microorganismos fotosintéticos es la formación de ácido carbónico como resultado de la reacción entre el dióxido de carbono, producto de la respiración, y el agua en las proximidades de la célula (Doehne & Price 2010). La producción de ácidos orgánicos como el láctico, oxálico, succínico, acético o pirúvico también están relacionados con la disolución de calcita en rocas calcáreas (Di Bonaventura *et al.* 1999; Ortega-Morales 1999, 2000; Videla 2000). Un caso especial es el de las cianobacterias, que crecen sobre los morteros u otros sustratos, asociadas con la precipitación de carbonato de calcio dentro o sobre sus vainas (Bellezza *et al.*, 2006). Esto da como resultado la presencia de manchas blancas o grises en la superficie de la roca, formadas por organismos, vivos o muertos y sus vainas calcificadas (Wakefield & Jones 1998) (Fig. 2b).

*Hongos.* La roca inorgánica, por sí misma, no favorece el crecimiento de hongos, ya que estos carecen de clorofila y, por tanto, de la capacidad para fabricar sus propios alimentos. Para el

crecimiento de los hongos es necesario que la roca contenga productos orgánicos de desecho como algas, bacterias (o células muertas de estos organismos), o bien hojas en descomposición y/o excremento de aves para proporcionarles la fuente de nutrientes.

Una vez establecidos, los hongos degradan químicamente la roca y, en ocasiones, mecánicamente (Kumar & Kumar 1999). Los hongos también tienen la capacidad de resistir condiciones de desecación y algunas veces altos niveles de radiación ultravioleta. El ácido cítrico y ácido oxálico producidos por algunos géneros, tales como *Botrytis*, *Mucor* y *Penicillium*, provocan la disolución y el desgaste de la roca (Caneva *et al.* 1991; Kumar & Kumar 1999; Allsopp *et al.* 2004) (Fig. 2c).

*Líquenes.* Algunos líquenes son capaces de provocar daños de forma activa. Los líquenes son complejas asociaciones de un hongo (micobionte) y un organismo fotosintético (fotobionte) que actúan como un solo organismo. Los líquenes se encuentran en una amplia variedad de hábitats, incluso con baja humedad y temperaturas extremas. Son muy resistentes y capaces de soportar periodos prolongados de desecación. En presencia de agua la reabsorben y se hidratan rápidamente (Allsopp *et al.* 2004). El talo puede adoptar diversas formas, dependiendo de los socios simbiotes. Los líquenes costrosos se adhieren fuertemente a la roca y son difíciles de

eliminar. Los talos foliáceos y fruticosos penetran menos y las hifas son los dispositivos de anclaje en el sustrato (De los Ríos *et al.* 2002; Camara *et al.* 2008; Nascimbene & Salvadori 2008). Los líquenes de naturaleza endolítica colonizan diversos tipos de sustratos y también se presentan en rocas calcáreas. A menudo sólo son vistos cuando los cuerpos fructíferos emergen de la roca (Guillite 1995; Ariño *et al.* 1995; Nascimbene & Salvadori 2008).

El aumento de la permeabilidad de la roca se debe a la penetración de sus estructuras de fijación, permitiendo así la entrada de agua y provocando mayor erosión. Los líquenes también excretan ácidos orgánicos (oxálico entre otros) como desechos metabólicos. Se ha sugerido que los líquenes pueden proteger las superficies de algunas rocas de daños no biológicos y que no deberían ser retirados del sustrato sin una revisión cuidadosa. Extraerlos puede dar lugar a la remoción de la roca, dejando la superficie resultante más porosa y más susceptible a la recolonización y al deterioro por sustancias químicas y/o biológicas (Caneva *et al.* 1991). Aunque muchos líquenes contribuyen a acelerar la descomposición (Ariño *et al.*, 1995, 1996; De los Ríos *et al.* 2004; Caneva *et al.* 2005), en algunas situaciones la presencia de organismos puede ayudar a estabilizar las superficies de piedra. Si bien la presencia de líquenes saxícolas en losas o paredes puede explicar algunos procesos de deterioro, se ha

destacado el efecto de bioprotección que puede tener la cobertura líquénica en medios en que los factores ambientales, lluvia, vientos o presencia de sales, puedan tener efectos dañinos. En losas romanas de zonas cercanas al mar, sometidas al efecto abrasivo de la arena y la sal arrastradas por el viento, se ha demostrado el efecto protector de la cobertura líquénica. Las losas sin cobertura muestran mayor desgaste que las protegidas (Ariño *et al.* 1995).

En los sustratos porosos la presencia de los líquenes retrasa la absorción de agua y previene parcialmente los procesos de disolución y precipitación. En experimentos puntuales de laboratorio, ha sido demostrado que los líquenes pueden llegar a disminuir la tasa de disolución de calcita entre el 40 al 70% (Davis & Lüttge, 2005). Los líquenes cambian el comportamiento termal, hídrico y mecánico de la roca, incrementando la duración de la humedad y liberando ácidos orgánicos. Por otro lado, la presencia de líquenes podría tener un efecto beneficioso, ya que evita los cambios bruscos de humedad y temperatura en la piedra (Kumar & Kumar 1999; Warscheid & Braams 2000; Caneva *et al.* 2005; Scheerer *et al.* 2009) (Fig. 2d).

*Musgos y hepáticas.* Los musgos y hepáticas crecen abundantemente en los edificios y en sitios arqueológicos donde el sustrato y condiciones ambientales son favorables. Estos organismos requieren para su desarrollo agua suficiente, iluminación adecuada

para permitir la actividad fotosintética y buena porosidad del sustrato, que permita tanto la retención de humedad como la penetración de raíces y rizoides (Caneva *et al.* 1991). El efecto que ocasionan estos organismos es doble, estético y mecánico, debido a la penetración de sus rizoides. Los musgos se desarrollan sólo cuando hay depósitos de materia orgánica, que puede ser el resultado de la acumulación de algas muertas u otros organismos. Cuando los musgos mueren los depósitos de humus se amplían, y estos causan daños indirectos en el monumento, ya que favorecen el crecimiento de plantas vasculares. Los musgos y hepáticas también causan alteraciones químicas en las superficies de roca. Debido a la elevada acidez de sus rizoides, estos organismos tienen la capacidad de extraer minerales (cationes) de las rocas. También producen ácido carbónico como resultado de los procesos de respiración celular que son perjudiciales para la roca (Kumar & Kumar 1999) (Fig. 2e).

*Plantas vasculares.* Los mecanismos de deterioro de monumentos de roca por plantas consisten en procesos físicos y químicos. Los cambios indeseables en monumentos pueden percibirse a simple vista debido a los daños mecánicos que causan las raíces de las plantas, las cuales tienden a aprovechar las zonas con menor resistencia, tales como el yeso o el mortero. El daño se ocasiona por el crecimiento radial y el engrosamiento de las raíces de las plantas

en el interior de la roca. Los árboles y las plantas leñosas causan daños mayores que las plantas herbáceas debido al tamaño y a la expansión de sus sistemas radiculares, que puede medir varios metros y penetrar profundamente provocando desprendimientos y/o daños en la estructura de los edificios (Kumar & Kumar, 1999). Las raíces de las plantas también producen ácido carbónico a través de la respiración celular y dan lugar a productos químicos que actúan mediante dos mecanismos principales: la acidez de las puntas de las raíces y la acidez y capacidad de quelación de los exudados (Caneva *et al.* 1991; Allsopp *et al.* 2004) (Fig. 2f). La presencia de plantas también influye en el microclima de la superficie de la roca mediante el incremento de la humedad relativa y la retención de agua que, a su vez, favorece el crecimiento de otros microorganismos. Un cambio en el microclima de la superficie de la roca no es necesariamente nocivo; ya que podría proteger del intemperismo. La cobertura de las superficies con hojas también podría reducir la evaporación y por consiguiente disminuir la tasa y el impacto de los procesos de cristalización (Caneva *et al.* 1991).

*Animales.* Los animales también tienen relevancia en el proceso de deterioro en rocas. Por ejemplo, varias especies de abejas, cuyo hábitat natural es una madriguera en el suelo blando o roca, son capaces de colonizar mortero; cuando las condiciones son

especialmente adecuadas, un número considerable de estos insectos pueden construir madrigueras individuales con el consiguiente debilitamiento de los muros (Allsop *et al.* 2004).

Otros estudios registran la presencia de arañas y caracoles sin aparente efecto deteriorante. Estos organismos viven de comer algas y líquenes, como una actividad de micropastoreo, aunque también se refugian en las cavidades y fisuras de las superficies en condiciones adversas. En otras casos se hace referencia a los efectos negativos producidos por caracoles, que son capaces de excavar en la roca, formando grandes agujeros (Allsop *et al.* 2004) (Fig. 3a-b).

Otro ejemplo lo presentan los excrementos de las aves y los murciélagos que también deterioran la roca por su alto contenido en ácidos orgánicos (úrico, fosfórico, nítrico, etc.), los cuales actúan como corrosivos. Los daños indirectos son causados por la contribución de sustancias orgánicas que sirven de sustrato nutritivo para microflora heterótrofa (bacterias y hongos) (Caneva *et al.* 1991) (Fig. 3c-d).

### **1.5. Biodeterioro**

El proceso de deterioro de los monumentos pétreos, causado por la acción de organismos y/o microorganismos (biodeterioro o deterioro biológico), implica la acción de deslucir monumentos y restar así

parte de su valor o de la suntuosidad que antes tenían, ya sea causada por la actividad metabólica de los organismos o bien por su simple presencia (Kumar & Kumar 1999).

Se considera colonización biológica la presencia de uno o varios tipos de organismos sobre la piedra, mientras que el término *biodeterioro* se define como "cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de organismos y/o microorganismos pertenecientes a varios grupos sistemáticos" (Hueck 1965, 1968; Caneva *et al.* 1991; Kumar & Kumar 1999; Allsopp *et al.* 2004). En la mayoría de los trabajos realizados ha sido posible confirmar que la alteración de los monumentos de piedra y obras de arte está muchas veces asociada a la presencia de microorganismos (bacterias, algas, hongos y líquenes) (Caneva *et al.* 1991; Saiz-Jimenez 1994; Tiano 1994; Warshed & Braams 2000; Gaylarde, 2001; Roldán & Hernández-Mariné, 2009).

El crecimiento de poblaciones de microorganismos en las superficies de la roca modifica su apariencia por alteraciones visuales (Ortega-Calvo *et al.* 1995; Kumar & Kumar 1999) y se considera biodeteriogénica por el cambio de color producido por las pátinas (Figura 1e). Las pátinas coloreadas también pueden ser producidas por pigmentos orgánicos producidos por microorganismos unidos a



las partículas de sustrato (Urzi & Realini 1998; Gorbushina 2007). Este tipo de alteraciones ha recibido especial atención de parte de restauradores, conservadores, arqueólogos y personal de otras disciplinas involucradas en la conservación del Patrimonio Cultural (Saiz-Jiménez 2001).

En el caso de los organismos fotosintéticos su presencia en la superficie de la roca no implica automáticamente una acción destructiva, aunque sí supone una alteración desde el punto de vista estético, que en algunos casos puede ser un inconveniente, sobre todo en materiales considerados de valor artístico o cultural (Saiz-Jiménez 2001). El deterioro estético puede ser conceptualmente subjetivo aunque no por eso es menos importante. Los recubrimientos cromáticos de las superficies son considerados antiestéticos y por ello es preferible eliminar cualquier crecimiento biológico visible, creando así una impresión de orden y limpieza (Caneva *et al.* 1991) (Fig. 1f).

Muchos organismos identificados en edificios y monumentos, tales como bacterias, algas, musgos, helechos y plantas, se consideran responsables de la colonización y deterioro de la roca (Saiz-Jiménez & Ariño 1995; Warshed & Braams 2000), tanto sobre rocas naturales como sobre sustratos artificiales, por ejemplo, cemento, ladrillos y mortero. Estos organismos pueden colonizar

cualquier tipo de material en un rango amplio de pH (4-10) (Allsopp *et al.* 2004). Si bien la microflora presente en edificios es sin duda un ecosistema muy complejo, su desarrollo dependerá de las condiciones medioambientales así como de las características particulares del sustrato colonizado.

### **1.6 Biofilms fotosintéticos**

Un biofilm se define como un ecosistema organizado, formado por uno o varios microorganismos asociados a diferentes tipos de superficies (vivas o inertes), con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de organización ocurre cuando las células se adhieren a una superficie o sustrato, bajo ciertas condiciones ambientales, formando una comunidad de crecimiento protegido, que se caracteriza por la excreción sustancias poliméricas extracelulares (EPS, extracellular polymeric substances), las cuales incrementan su resistencia, y permiten a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles (Costerton *et al.* 1987; Kumar & Kumar 1999; Ortega-Morales *et al.* 2000; Decho 2000). Dentro de los biofilms se forman canales por donde circulan agua, enzimas y nutrientes. Allí las células establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas (quorum sensing), que regulan la expresión de genes de manera

diferente en las distintas partes de la comunidad (Davies *et al.* 1998;).

La formación de un biofilm puede ser debida a la llegada de una o diversas especies, que se establecen y multiplican cuando las condiciones ambientales son idóneas para la multiplicación celular (Korber *et al.* 1994; Roldán *et al.* 2004a). Los biofilms pueden formar biocenosis complejas, incluyendo diversos tipos de organismos tales como bacterias y cianobacterias, hongos, levaduras, y algas (Cooksey 1992; Jones 1995). Generalmente los biofilms suelen ser específicos de cada hábitat (Büdel *et al.* 1999; Garcia-Pichel *et al.* 1996), debido a que las diferencias en el microclima y la biorreceptividad influyen en la distribución de algas y cianobacterias (Miller *et al.* 2006) (Fig. 3e).

Los productos metabólicos de un organismo pueden servir para el crecimiento de otros, de la misma manera que la adhesión de unas especies pueden servir de base para la unión de otras (Costerton *et al.* 1987; Wolfaardt *et al.* 1994). Por otra parte, la competencia por los nutrientes y la acumulación de productos tóxicos generados por los colonizadores primarios pueden limitar la diversidad de especies del biofilm o bien, favorecer el desarrollo de otros organismos (Krumbein *et al.* 1991; Tomaselli *et al.* 2000).

Los biofilms compuestos de microorganismos fotosintéticos se desarrollan preferentemente sobre sustratos húmedos y porosos,

tales como la superficie de rocas calcáreas. Este tipo de desarrollo superficial, llamado crecimiento epilítico, incluye tanto morfologías unicelulares como filamentosas.

Los microorganismos fotosintéticos, formadores de biofilms, generalmente, presentan una gruesa vaina, a veces coloreada, que los aísla y protege del medio externo (García-Pichel 1991; Ortega-Calvo 1993a).

Las condiciones microclimáticas adversas pueden inducir formas de resistencia o producir variaciones en el color del biofilm. Un ejemplo son las grandes manchas negras de la zona arqueológica de Palenque constituidas por biofilms dominados por *Scytonema guyanense*, *Nostoc commune* o *Gloeocapsa calcicola* (Ramírez *et al.* 2010) (Fig. 3f). Otro ejemplo se presenta en los restos arqueológicos en Roma, donde se encontró una pátina de color rojo-naranja sobre mármol, producida por la presencia de cistes de resistencia de *Haematococcus pluvialis* (Pietrini *et al.*, 1985).

Las comunidades casmoendolíticas, que en ocasiones también forman biofilms, son las que viven en el interior de la piedra (Golubic *et al.* 1981). Estas comunidades se desarrollan tanto en las grietas como en los poros de la piedra (Aboal *et al.* 2003). Su establecimiento y desarrollo suele ser consecuencia de la búsqueda, por parte de las células, de un ambiente protegido de las agresiones

del medio externo, frecuentemente sometido a desecación, alta radiación y temperatura. En el interior del sustrato, estos factores externos están amortiguados y se mantiene la humedad durante periodos de tiempo más largos. Los microorganismos en este tipo de comunidades suele ser bastante específicos, compuestos principalmente por bacterias y cianobacterias (Bell 1993; Warsched & Braams 2000; McNamara & Mitchell 2005).

Es importante señalar que las cianobacterias generalmente tienen baja saturación en la absorción de algunos elementos presentes en el sustrato como el fósforo, y muchas de ellas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico cuando no se encuentra en el medio. Por otro lado, son capaces de fijar dióxido de carbono y pueden utilizar el bicarbonato disponible en el medio a concentraciones muy bajas (Sharif *et al.* 2008). De ahí la importancia del tipo de sustrato en el desarrollo de cianobacterias y su preferencia por sustratos calcáreos o de pH básico.

### **1.7. Bioreceptividad**

La bioreceptividad se define como el conjunto de propiedades de los materiales que contribuyen al establecimiento, anclaje y desarrollo de una fauna y/o flora específica (Guillite, 1995; Miller *et al.* 2006). La colonización y desarrollo de biofilms fotosintéticos en las rocas causa

diversos efectos. La bioreceptividad primaria o inicial indica el potencial de un material de ser colonizado. A medida que la colonización avanza, la superficie de los monumentos se ve modificada, presentando disgregación o alteración de algunos minerales o la creación de zonas con mayor humedad, debido a la presencia de microorganismos. El proceso de colonización está relacionado con la bioreceptividad de las superficies o material pétreo (Guillite 1995)

En general, el comportamiento de los materiales de construcción naturales está fuertemente influenciado por los cambios en las condiciones termo-higrométricas y está vinculado a la estructura del poro. Las rocas, según su naturaleza, pueden tener diferentes grados de porosidad. Cuando los poros son pequeños es fácil la condensación de agua, mientras que los poros grandes conducen a altas tasas de absorción de agua y también de evaporación (Miller *et al.* 2006; Cámara *et al.* 2009).

El mármol es un ejemplo donde la baja porosidad condiciona el modo de penetración (Tomaselli *et al.* 2000), determinando así su alta resistencia al ataque de microorganismos, debido a la dificultad de penetrar en el interior. Sin embargo, en rocas carbonadas, la colonización microbiana se ha visto más relacionada con una disolución química que con una penetración a través de

M. Ramírez-Vázquez

discontinuidades entre los cristales y, por tanto, con un menor desprendimiento de fragmentos minerales (Cámara *et al.* 2008).

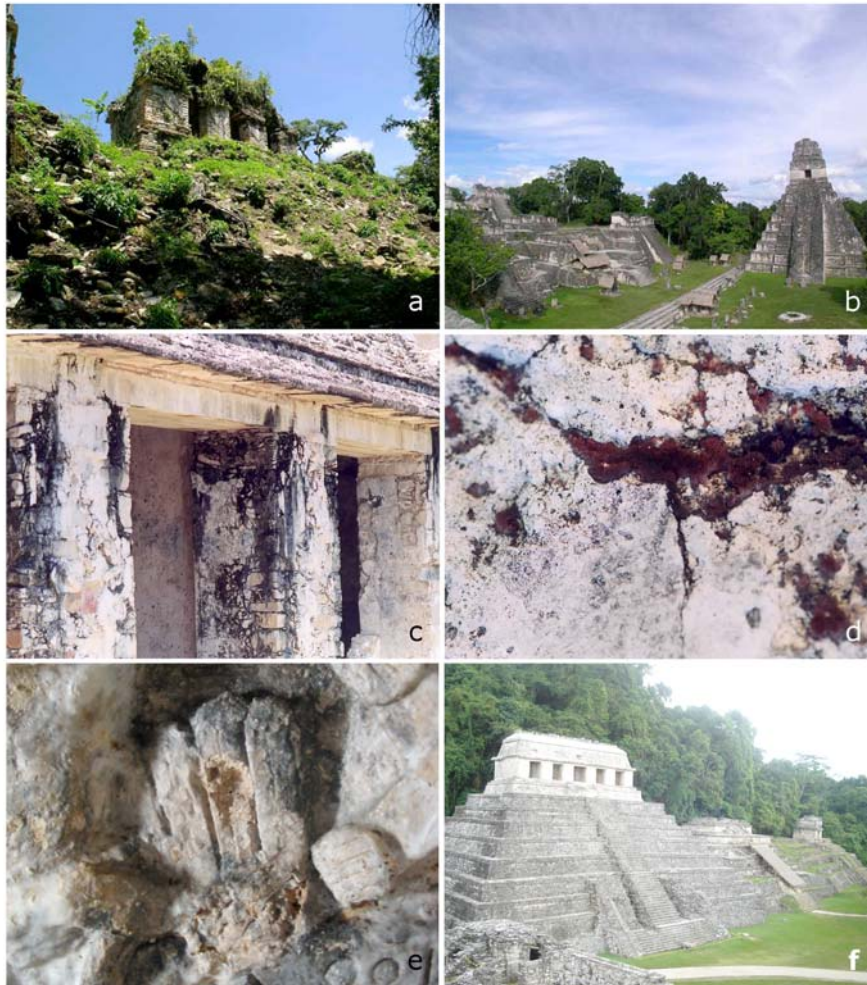


Figura 1. a) Vista de un edificio de reciente excavación en la zona arqueológica de Toniná (Chiapas, México). b) Panorámica de la zona arqueológica de Tikal (Guatemala). c) Aspecto de las pilastras en el conjunto Palacio (Palenque), las manchas negras corresponden a biofilms principalmente formados por *Scytonema guyanense*. d) Detalle de deterioro de roca en condiciones externas. e) detalle de deterioro de una escultura en estuco con patinas verdes (Tumba de Pakal, Palenque). f) Templo de las Incripciones después de una limpieza (agua a presión).





Figura 2. a) Crecimiento de *Nostoc* cf. *commune* y *Trentepohlia aurea* sobre muros de la zona arqueológica de Bonampak. b) Formación de calcificaciones en filtraciones de agua en el Palacio, Palenque. c) Presencia de hongos sobre dinteles en la zona arqueológica de Yaxchilán. d) Formación de líquenes sobre *Trentepohlia aurea* en el edificio de la cruz foliada, Palenque. e) Musgos, hepáticas y hongos sobre biofilms de *Scytonema guyanense* y *Nostoc* cf. *commune* en la zona arqueológica de Bonampak. f) Vegetación de la Selva Lacandona.

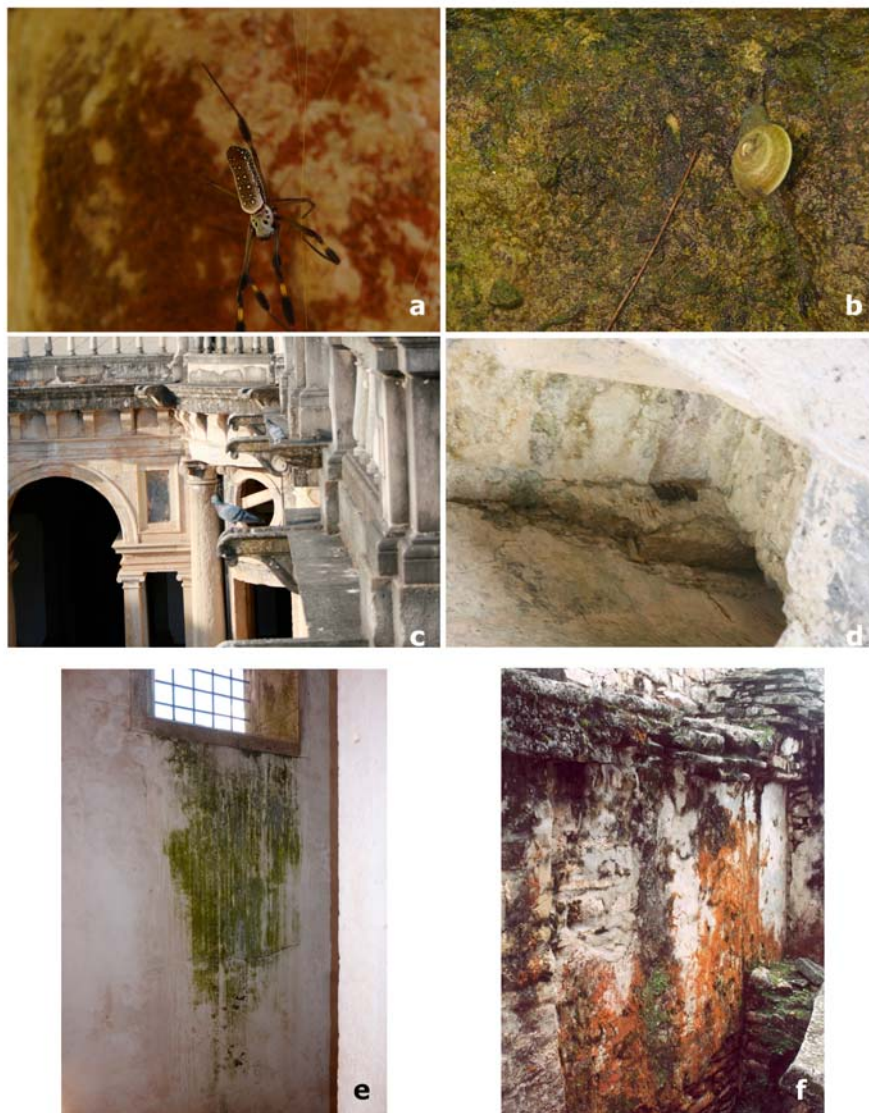


Figura 3. a-b) araña y caracol en el edificio del Templo de las cruces en la zona arqueológica de Palenque. c) Palomas en el Castelo de Tomar, Portugal. d) Murciélagos en el conjunto Palacio, Palenque. e) biofilm en el interior del Castelo de Tomar, Portugal. f) Biofilms de *Scytonema guyanense* y *Trentepohlia aurea* en el conjunto Palacio, Palenque.



## 2. Objetivos

La presente memoria describe la composición taxonómica y la dinámica de los biofilms presentes en monumentos históricos así como la relación con las condiciones ambientales (elevada humedad y exposición solar). El estudio se basa en la caracterización de los biofilms presentes en tres zonas arqueológicas de la región tropical húmeda del sureste mexicano, siendo los principales objetivos:

- Describir los biofilms que se desarrollan en condiciones cambiantes de humedad y radiación en los monumentos históricos mayas de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak, declaradas como Patrimonio Cultural.
- Identificar los microorganismos fotosintéticos presentes en los monumentos mayas de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak mediante un estudio polifásico que incluye la citomorfología, ultraestructura y las características moleculares y ecológicas de los microorganismos fotosintéticos mayoritarios.
- Revelar las estrategias adaptativas de los microorganismos fotosintéticos mayoritarios.
- Comparar los biofilms fotosintéticos de los distintos monumentos estudiados entre sí y su relación con los factores ambientales.
- Comparar los biofilms fotosintéticos de los distintos monumentos estudiados entre sí y su relación con la composición del sustrato.

- Evaluar la relación de los diferentes biofilms fotosintéticos con las superficies colonizadas y su posible impacto.
- Proponer mecanismos de control para el mantenimiento y conservación de los edificios estudiados basados en los factores que favorecen el establecimiento y desarrollo de los microorganismos fotosintéticos implicados en el supuesto biodeterioro de los monumentos mayas.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Descripción del área de estudio y recolección de material**

En México se han registrado alrededor de 110 mil zonas arqueológicas de diferentes grupos culturales de las cuales aproximadamente 176 están abiertas al público (<http://www.inah.gob.mx/index.php/zonas-arqueologicas>). En la mayoría de ellas se realizan trabajos permanentes de exploración, rescate y mantenimiento para la conservación de este patrimonio (A. Villalobos, com. personal).

Respecto a la cultura maya, ésta se desarrolló en un área de más de 350 mil kilómetros cuadrados, desde el sur de México (Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo) a Centroamérica (Guatemala, Belice, Honduras y parte de El Salvador). Como ejemplos de esta cultura tenemos las ciudades de Chichen Itzá, Kabah y Uxmal (Yucatán), Calakmul y Edzná (Campeche), Bonampak, Piedras Negras, Yaxchilán y Palenque (Chiapas), Tulum y Cobá (Quintana Roo), entre otras (Fig. 4a).

El material estudiado procede de tres zonas arqueológicas del Periodo Clásico Maya: Palenque (El Palacio) (Fig. 4b-c), Yaxchilán (Edificio 16) (Fig. 4d-e) y Bonampak (Estructuras 4, 6 y 8) (Fig. 4f-g) en el estado de Chiapas. Se trata de la región más húmeda de México y una de las de mayor precipitación pluvial. El clima es semicálido húmedo con lluvias intensas de junio a noviembre (INEGI 2005).

La elección de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak se basa en el hecho de que son sitios monumentales

declarados Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO y de gran importancia turística. Además de compartir época y estilo arquitectónico (Período Clásico Maya), comparten área geográfica de condiciones ambientales similares (Selva Lacandona). Una de las diferencias entre ellas es el número de intervenciones, el mantenimiento y la restauración llevadas a cabo en cada una.

Los criterios para la selección de los puntos de muestreo en cada zona arqueológica se basaron en el tiempo de exposición solar que recibían los biofilms (Novelo *et al.*, 2006), en el aspecto general y el tipo de sustrato colonizado (roca, mortero y estuco). Fueron seleccionados 5 puntos en Palenque (Fig. 5a), 2 en Yaxchilán (Fig. 5b.) y 3 en Bonampak (Fig. 5c). Las recolecciones tuvieron lugar en enero y agosto del 2007 y 2008, dos meses después del inicio de las épocas seca y lluviosa.

### **3.1.1. Palenque**

La zona arqueológica de Palenque se encuentra en el norte del Estado de Chiapas (17°29'30"N y 92°50'20"O) (Figs. 4b-c). La población más cercana, Santo Domingo de Palenque, se localiza a ocho kilómetros de la zona arqueológica. Esta región presenta lluvias intensas de junio a noviembre. La temperatura más baja se da en los meses de octubre a febrero (<32 °C) y las más elevadas (>40 °C) de marzo a junio. La evaporación es elevada durante los meses de marzo a agosto (SMN-CNA, 2005).

El área descubierta de la zona arqueológica hasta 2005 es aproximadamente de 2.5 km<sup>2</sup>, pero se estima que se ha explorado

menos de un 10% de la superficie total que alcanzó la ciudad, permaneciendo aún más de mil estructuras cubiertas por la selva.

La zona arqueológica de Palenque cuenta con varias construcciones que destacan por su gran magnitud, entre ellas: el templo de las inscripciones, el templo del sol, el templo de la cruz foliada y el conjunto Palacio.

*El conjunto Palacio.* Es sin duda una de las construcciones más importantes de la zona arqueológica de Palenque. El conjunto sobresale por su magnitud y ubicación, ya que se encuentra justo en el centro de la zona arqueológica. Este complejo arquitectónico está sobre una plataforma trapezoidal de 100 m de largo por 80 m de ancho. Más que un edificio, se trata de varios edificios interconectados, llamados "casas" que fueron construidos, remodelados y modificados a lo largo de cuatrocientos años. Su nombre se debe al conjunto de patios, crujiás y a la torre de cuatro cuerpos que lo caracteriza. Contiene esculturas y bajorrelieves en estuco de alto valor artístico (Stierlin, 2001).

### **3.1.2. Yaxchilán**

La zona arqueológica de Yaxchilán es considerada monumento natural por la Comisión Nacional de áreas naturales protegidas (CONANP). Yaxchilán se localiza a orillas del río Usumacinta (16°50'28"N y 91°00'36"O) en el estado de Chiapas (Fig. 4d-e) . La zona arqueológica de Yaxchilán es conocida por la gran cantidad de esculturas y dinteles encontrados en la zona. Fue una ciudad importante durante el periodo clásico maya y potencia dominante del área del Usumacinta. La primera mención publicada de la ciudad



parece ser una breve mención hecha por Juan Galindo en 1833 (Soustelle, 1988).

*Edificio 16.* Esta pequeña construcción forma parte de los más de 40 edificios en la zona arqueológica. Es una construcción de dimensión mediana, su importancia radica en los dinteles originales que aún conserva.

### **3.1.3. Bonampak**

Bonampak se sitúa a unos 30 km al sur de la Ciudad de Yaxchilán (16°40'34"N y 91°08'46"O). Se trata de una pequeña zona arqueológica, que fue dependiente de Yaxchilán (Fig. 4f-g) . Todas las estructuras del sitio parecen haber sido construidas entre los años 580 y 800. La zona arqueológica fue descubierta por Giles Healy y Carlos Frey en 1946. Bonampak ocupa varios edificios de mediano tamaño, que circundan una plaza, algunos de ellos poseen estelas muy bien labradas. Sin embargo, su fama es por los murales que se localizan en uno de sus edificios (Soustelle, 1988).

*Las estructuras 4, 6 y 8.* Son pequeñas construcciones que circundan a la plaza principal, algunos de ellos con dinteles labrados.

### **3.2. Técnicas empleadas**

En cada punto de muestreo de las zonas arqueológicas estudiadas se registraron los siguientes datos ambientales: luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), humedad relativa ambiental (HR%) (HOBO Micro Station, Onset Computer Corporation) y humedad relativa del biofilm (Protimetro, Surveymaster BLD 5360, General Electric).

Las diferentes técnicas de microscopía son el pilar en el estudio de biofilms fototróficos. El conjunto de estas técnicas aportan información complementaria sobre estas comunidades y son necesarias para la identificación de los microorganismos que las forman, el estudio de su distribución en el sustrato y la monitorización de su crecimiento.

Han sido utilizadas las siguientes técnicas de microscopía: microscopía estereoscópica, de campo claro, de barrido láser confocal (Confocal Scanning Laser Microscopy, CLSM), electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) y electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Otras técnicas que se incorporan en este estudio es la difracción de rayos X (XRD), extracción de DNA y la reacción de la polimerasa (PCR).

### **3.2.1. Microscopía estereoscópica**

El microscopio estereoscópico ha sido utilizado para observar el aspecto general de los biofilms. Este tipo de microscopios permite tener una primera aproximación sobre la estructura tridimensional de los biofilms a estudiar y la localización de las zonas de estudio con el resto de técnicas de microscopía.

### **3.2.2. Microscopía óptica**

Para la identificación del material fue utilizado un microscopio óptico Axioplan (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), y las imágenes fueron captadas con una cámara digital AxioCam MRc5.

Las especies fueron determinadas utilizando los siguientes trabajos taxonómicos:

- Para cianobacterias, Geitler, 1930-1932, Desikachary, 1959; Anagnostidis *et al.*, 1983; Anagnostidis & Komárek, 1985; Albertano, 1994, 1998; Ariño *et al.*, 1997; Asencio & Aboal, 1996; Belleza *et al.*, 2003; Büdel, 1999; Chu, 1991; Couté *et al.*, 1999; Crispim *et al.*, 2003, 2004; Daroenko & Hoffmann, 2003; Gaylarde & Gaylarde, 1999; Komárek, 1993; Komárek & Anagnostidis, 1988, 2005; Frémy, 1929; Gardner, 1929; Golubic, 1965; Grilli-Caiola *et al.*, 1987; Bornet, 1959; Hoffmann, 1986; Skuja, 1949; Santa'Anna, 1988.
- Para clorófitos, van Der Hoek, 1995; Chapman, 1983; Rifón-Lastra & Nogueroles-Seoane, 2001; Rindi & Guiry, 2002, 2003; Rindi *et al.*, 2003, 2004, 2005.

### **3.2.3. Microscopia de barrido láser confocal (CSLM)**

El microscopio de barrido láser confocal (del inglés Confocal Scanning Laser Microscopy, CSLM) es una herramienta muy útil para el estudio de biofilms fotosintéticos (Roldán *et al.*, 2004). Actualmente existe gran actividad investigadora con el fin de conseguir mejores prestaciones y desarrollar nuevas técnicas. La mayoría de los estudios sobre biofilms, previos a la llegada del CSLM, han consistido en la cuantificación e identificación de los microorganismos constituyentes. Estos estudios requieren la destrucción del biofilm de tal manera que se pierde la información de su estructura espacial, mientras que el CSLM proporciona información de la arquitectura y de las heterogeneidades en el interior de los biofilms (Davey & O'Toole,

2000), evitando los inconvenientes de otros procesos (Neu & Lawrence, 1997; Lawrence & Neu, 1999).

El CSLM permite realizar secciones ópticas horizontales o sagitales de biofilms intactos, vivos y gruesos, la caracterización y reconstrucción de su estructura tridimensional (Caldwell *et al.*, 1992; Roldán *et al.*, 2003). La combinación de esta técnica con el análisis digital de las imágenes permite determinar el grosor del biofilm, el material inorgánico y la fluorescencia natural de los pigmentos fotosintéticos o de otras moléculas, las interacciones entre los organismos y las superficies a las cuales se adhieren. También es posible analizar la distribución de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la viabilidad de los microorganismos presentes (Lawrence & Neu, 1999; Neu & Kuhlicke, 2001; Neu *et al.*, 2002). La técnica aporta información fundamental para poder resolver los problemas de biodeterioro y facilita elegir los métodos de control más adecuados.

*Preparación de las muestras.* Es preferible la observación del material recién recolectado, sin embargo, si se deben observar gran número de muestras o bien retrasar su observación, es preferible fijar una parte para preservar la integridad y arquitectura del material. Para ello se ha usado una solución de paraformaldehído al 3% en tampón fosfato (PB) y 0.1M Sacarosa 60 mM, mantenido a 4 °C (Schüßler *et al.*, 1997).

*Montaje de las muestras.* Las muestras estudiadas presentan un problema adicional para su observación en el CLSM. Se trata de substratos rígidos, opacos y gruesos, con los que no siempre es posible realizar el montaje convencional entre porta y cubreobjetos,

preservando de forma óptima la estructura tridimensional de la muestra. Por ello las muestras se montaron en placas Mat-teck (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA), a las que se añadieron pequeñas cantidades de PBS para evitar su deshidratación durante la observación al microscopio.

*Observación de las muestras y captación de imágenes.* Para la observación de las muestras se ha utilizado un microscopio confocal espectral Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany), equipado con cuatro láseres y cinco canales de detección. Se ha utilizado objetivos Plan Apocromáticos: 40x (1.25 AN), 63x (1.4 AN).

La fluorescencia natural de los pigmentos (clorofilas y ficobiliproteínas) fue utilizada como marcador para conocer la distribución de las microalgas y las cianobacterias dentro de los biofilms, permitiendo visualizar la morfología y el estado de los microorganismos. En algunos casos fue requerido el uso de otros marcadores como la lectina Concanavalina A (Con-A Alexa-Fluor 488, Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) para marcar los polisacáridos extracelulares (EPS o mucílago) que forman parte de la matriz del biofilm (Schübler *et al.*, 1997). El DNA, tanto en células vivas como muertas, se observó con el fluorocromo Hoechst 33258 (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR).

La autofluorescencia de clorofila *a* fue observada en el canal azul (excitación=594 nm, emisión=670-790 nm) y en el canal rojo las ficobilinas (excitación=561 nm, emisión=575-625 nm). La línea 488 nm de láser Ar fue empleada en el canal verde para observar los EPS marcados con Con-A (emisión=500-550 nm) y en el canal gris para la

observación de la reflexión (emisión=480-495 nm). El marcaje mediante Con-A permite conocer los mecanismos de adhesión entre los mismos microorganismos y entre estos y el substrato.

Para determinar la relación espacial de los pigmentos fotosintéticos y los EPS, las imágenes en los diferentes canales fueron adquiridos de la misma zona de forma secuencial, para evitar el solapamiento de las diferentes señales de fluorescencia. Se realizaron secciones ópticas horizontales (x-y) a lo largo del eje z de la muestra, de tal manera que, posteriormente, estas secciones fueron recopiladas para hacer la reconstrucción tridimensional xyz (3D) de la muestra. Los límites superior e inferior de la captación se adquirieron utilizando la autofluorescencia de los pigmentos (y en algunos casos la fluorescencia de la Con-A) como marcador de referencia, tomando como límites las secciones primera y última que mostraban fluorescencia. El número de secciones que se captaron, así como la distancia entre sección y sección, fueron elegidas en función de cada muestra, cumpliendo el criterio de Nyquist para la obtención de reconstrucciones fieles a la realidad. Las imágenes se adquirieron en formatos de 512 x 512 píxeles y de 1024 x 1024 píxeles.

*Procesamiento de imágenes.* El procesamiento de imágenes se realizó con el programa informático *Imaris* versión 6.1 (Bitplane AG Zürich, Switzerland) y el propio de Leica (Las AF, versión 2.5). Una de las funciones empleadas del programa *Imaris* fué "extended projection", en la cual la imagen es dividida en tres secciones, que representan la proyección de intensidad máxima de fluorescencia para los planos x-y, x-z, y-z. Una vez integradas las imágenes procesadas en los diferentes planos focales es posible obtener una imagen de la información tridimensional (Roldán *et al.*, 2004).

*Determinación de pigmentos fotosintéticos.* El equipo Leica TCS-SP5 está acoplado a un detector espectral que permite obtener un espectro real de la emisión de un fluorocromo (Roldán *et al.*, 2004). Para obtener el espectro de fluorescencia de las diferentes especies de cianobacterias y microalgas, se definió un rango de longitudes de onda dentro de los cuales se adquirieron las imágenes, el número total de imágenes captadas y el intervalo entre captación. Como resultado se obtuvo una serie de imágenes ( $x-y-\lambda$ ) que muestran la intensidad de fluorescencia para cada intervalo.

La variación de intensidad fue representada con una escala pseudocolor. Los colores cálidos, como el amarillo y el rojo, representaban las intensidades máximas, mientras que los colores fríos, como el azul, representaban las intensidades más bajas. Para el análisis de la fluorescencia se eligieron regiones de interés (ROIs) de  $1\mu\text{m}^2$  para cada serie de imágenes  $x-y-\lambda$  de la zona tilacoidal de las cianobacterias y de los cloroplastos de las algas. Al realizar un gráfico de las intensidades se obtiene el espectro real de emisión de cada muestra. A partir del  $x-y-\lambda$  *stack* se seleccionaron 20 ROIs y se calculó la media y el error estándar (Roldán *et al* 2004).

#### **3.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Microanálisis de Energía Dispersada de Rayos X (EDS) y Electrones Retrodispersados (BSE)**

La Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) se emplea para la caracterización de la superficie de sustratos colonizados, del aspecto general y la morfología de los biofilms

estudiados, y la relación que existe entre ellos (Jembrih *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2004; Welton *et al.*, 2005; Schreiner *et al.*, 2007).

Los electrones retrodispersados (Backscattered Electrons, BSE), son electrones de alta energía que se escapan a través de la superficie de muestra después de haber interactuado con los núcleos de los elementos presentes en la muestra. La relación entre el número de electrones que retrodispersan y los que llegan del haz, es el coeficiente de retrodispersión. El coeficiente de electrones retrodispersados depende del número atómico de los elementos presentes en la muestra y esto es lo que se conoce como contraste químico o composicional (Jembrih *et al.*, 2000; Welton *et al.*, 2005)

El microanálisis de energía dispersada de rayos X (Energy Dispersive X-ray, EDS) es un análisis que permite, de forma rápida, obtener información sobre la composición química del material y su distribución en diferentes capas (Jembrih *et al.*, 2000; Schreiner *et al.*, 2007).

Las muestras fueron examinados en un Microscopio Electrónico de Barrido (Quanta 200, FEI + EDAX) con electrones retrodispersados (BSE) y de EDS. Los espectros de rayos X fueron adquiridos con una tensión de aceleración de 20 kV, a una distancia de detección al espécimen de 10 mm y un tiempo de adquisición de 30 segundos.

La microscopía electrónica de barrido, especialmente en combinación con EDS, ha contribuido y facilitado en gran medida al análisis de los objetos del patrimonio cultural. Esta técnica es indispensable en la detección de procesos de degradación de distintos materiales. El modo BSE fue utilizado principalmente para diferenciar entre organismos y substrato (orgánico/inorgánico).



*Preparación y montaje de las muestras.* El material fue previamente fijado en una solución de paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.2% en tampón cacodilato 0.1M. Para la observación y análisis, las muestras fueron deshidratadas en un gradiente de etanol, y sometidas a punto crítico. Posteriormente, el material se colocó en porta-muestras con cinta bioadhesiva y se recubrió con carbón para los análisis de EDS y BSE. Finalmente, las muestras se cubrieron con oro-paladio para la evaluación de las relaciones entre especies y entre las especies y el sustrato (Hernández-Mariné *et al.*, 2004).

### **3.2.5. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)**

La microscopia electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM) ofrece información morfológica sobre el tamaño, forma y disposición de los orgánulos dentro de las células de los organismos a escalas nanométricas. La técnica consiste en un haz de electrones que pasa a través la muestra, produciendo una imagen con diferentes intensidades de iluminación, que dependerán de la disposición de los metales pesados absorbidos de forma selectiva en la muestra (Hernández-Mariné *et al.*, 2004).

*Preparación y montaje de las muestras.* El material procedente de cultivos fue fijado en una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1M y, posteriormente, en osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en el mismo tampón para un contraste adecuado bajo el haz de electrones. A continuación, el material ha de pasar por un proceso de deshidratación (acetona), inclusión en resina Spurr y seccionamiento en cortes ultrafinos. Posteriormente, las secciones se contrastan con

acetato de uranilo y citrato de plomo (Hayat, 1989; Bettarel *et al.*, 2000; Hernández-Mariné *et al.*, 2004).

Los cortes fueron examinados en el equipo JEOL 1010 TEM a 100 kV de aceleración.

### **3.2.6. Difracción de rayos X**

La técnica de difracción de rayos X (XRD) es muy útil para la determinación de la estructura cristalográfica y los componentes químicos de los materiales. Se representa mediante un difractograma característico para cada mineral (Jembrih *et al.*, 2000; Welton *et al.*, 2005).

Este análisis se realizó a partir de la muestra pulverizada de la roca original de la zona arqueológica de Palenque y fue empleado el difractómetro X'Pert PRO MPD AlphaI PAN analytical geometric Bragg-Brentano (Almelo, The Netherlands) (radio 1/4 240 mm, radiación Cu).

### **3.2.7. Extracción de DNA, PCR y análisis filogenético**

*Extracción de DNA.* El DNA genómico de muestras de campo preservadas en seco fue extraído y amplificado utilizando la modificación del procedimiento descrito por Berrendero *et al.* (2008). Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido. El DNA se extrajo utilizando un kit UltraClean microbiano (MoBio Laboratories, Laboratorio de Conda SA). El gen RNAr 16S fue amplificado con los siguientes primers (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Edwards *et al.*, 1989) y B23S específicos para cianobacterias (5'-

CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3') (Lepere *et al.*, 2000). La reacción de cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un Perkim-Elmer GenAmp PCR System 2400. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25  $\mu$ l que contenían 10pmol de cada primer, 6  $\mu$ l de extracción de DNA, 200  $\mu$ M dNTP, 1  $\mu$ g de BSA, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5  $\mu$ l de tampón de la polimerasa 10x, 5  $\mu$ l Eppendorf Taqmaster PCR-enhancer, 0.75 U Ultratools DNA polimerasa (Biotools).

*PCR.* Primero se llevo a cabo la desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido por tres ciclos a 94°C durante 45 segundos cada uno, un ciclo de 45 segundos a 57°C, uno de 2 minutos a 68°C, uno de 7 minutos a 68°C (GKelis *et al.*, 2005). La concentración de los productos amplificados fue comprobada en un gel de agarosa al 1.5%. Los productos de PCR fueron clonados en pGEMR-T Easy Vector Systems (Promega) y transformados en *E. coli*. Los productos fueron purificados mediante el Real Spin Kit de Limpieza (REAL). Finalmente, los productos con el gen RNAr 16S fueron secuenciados en ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y las secuencias analizadas con Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3.1. Las secuencias se obtuvieron para las dos direcciones de forma independiente.

*Análisis filogenético.* Las secuencias de los nucleótidos obtenidos fueron comparadas con un BLAST a partir de la información de las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

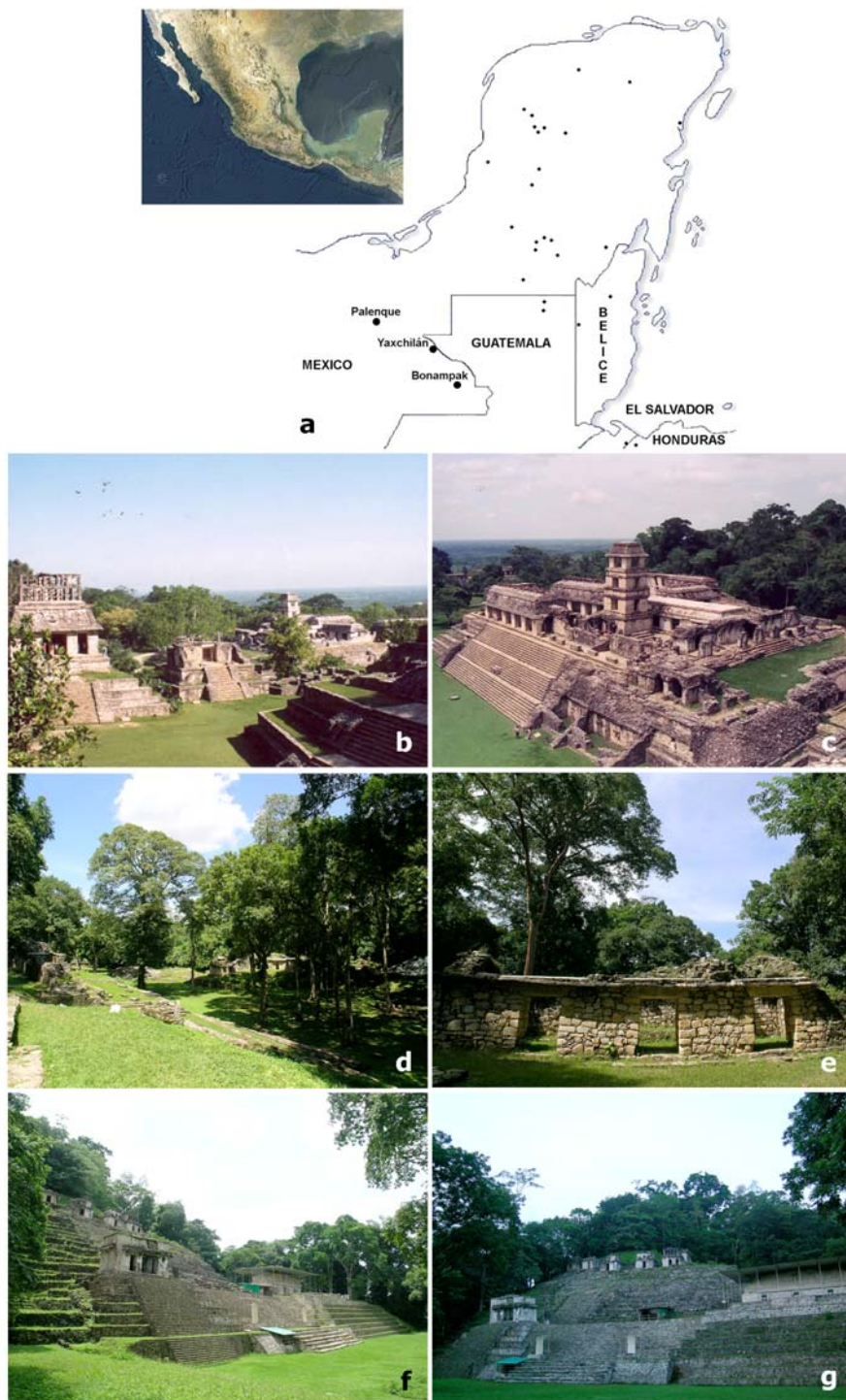


Figura 4. a) Región maya. b) Vista general de la zona arqueológica de Palenque. c) Vista de Conjunto Palacio. d) Panorámica de la zona arqueológica de Yaxchilán. e) Edificio 16 de la zona arqueológica de Yaxchilán. f) Vista general de la zona arqueológica de Bonampak. g) de derecha a izquierda las estructuras 4, 5, 6, 7 y 8.



#### **4.1. Los biofilms formados por cianobacterias de un monumento maya en la zona arqueológica de Palenque, México**

Los edificios de la zona arqueológica de Palenque, México, son colonizados por cianobacterias y microalgas formadoras de biofilms, que a su vez causan daños estéticos y estructurales. En el conjunto Palacio, uno de los edificios emblemáticos de la zona arqueológica, fueron seleccionados cuatro sitios de muestreo diferentes en función del aspecto general de los biofilms, las características microambientales y el tipo de sustrato. Se han estudiado los microorganismos fotosintéticos, su relación con la bioreceptividad del sustrato y la estructura tridimensional de los biofilms, mediante técnicas de microscopía. Se identificaron los microorganismos fotosintéticos más abundantes y formadores de los principales biofilms. *Scytonema guyanense*, *Asterocapsa divina* y *Trentepohlia aurea*, respectivamente. Estas especies son capaces de soportar la heterogeneidad temporal, relacionada con la alternancia de épocas seca y lluviosa. La morfología de los biofilms y las diferentes etapas de desarrollo de las especies se ven afectadas por variantes relacionadas con el tiempo de exposición solar, la bioreceptividad del sustrato (mortero, estuco, roca) y la humedad ambiental relativa. Los biofilms formados por *A. divina* han sido localizados en escurrimientos y filtraciones de agua o en áreas de elevada humedad. Los biofilms de *S. guyanense* son de color oscuro principalmente en áreas expuestas, donde la intensidad de luz es elevada. Los biofilms de *T. aurea*, a diferencia de los anteriores, están en espacios protegidos de la desecación y de la iluminación directa.

El conocimiento del desarrollo de las especies capaces de soportar la heterogeneidad temporal y de cómo los biofilms contribuyen a la biodegradación o bioprotección del sustrato se puede utilizar para desarrollar protocolos de mantenimiento y conservación del patrimonio cultural.

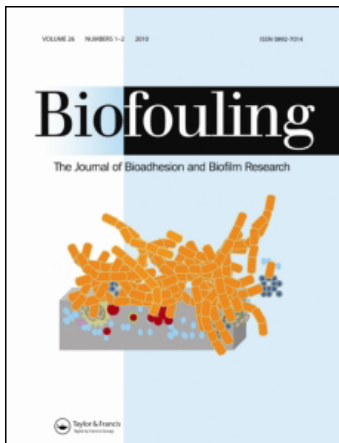
This article was downloaded by: [Consorti de Biblioteques Universitaries de Catalunya]

On: 9 April 2010

Access details: Access Details: [subscription number 919083124]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



## Biofouling

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713454511>

### Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico

M. Ramírez <sup>a</sup>; M. Hernández-Maríné <sup>a</sup>; E. Novelo <sup>b</sup>; M. Roldán <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Facultat de Farmàcia, Unitat de Botànica, Universitat de Barcelona, Spain <sup>b</sup> Dep. Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico <sup>c</sup> Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Facultat de Ciències, Spain

First published on: 24 February 2010

**To cite this Article** Ramírez, M. , Hernández-Maríné, M. , Novelo, E. and Roldán, M.(2010) 'Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico', Biofouling, 26: 4, 399 – 409, First published on: 24 February 2010 (iFirst)

**To link to this Article:** DOI: 10.1080/08927011003660404

**URL:** <http://dx.doi.org/10.1080/08927011003660404>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.



## Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico

M. Ramírez<sup>a</sup>, M. Hernández-Mariné<sup>a\*</sup>, E. Novelo<sup>b</sup> and M. Roldán<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Facultat de Farmàcia, Unitat de Botànica, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Dep. Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apto Postal 70-474, 04510 México, D.F, Mexico; <sup>c</sup>Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Facultat de Ciències, 08193 Bellaterra, Spain

(Received 15 October 2009; final version received 26 January 2010)

Surfaces of buildings at the archaeological site of Palenque, Mexico, are colonized by cyanobacteria that form biofilms, which in turn cause aesthetic and structural damage. The structural characterization and species composition of biofilms from the walls of one of these buildings, El Palacio, are reported. The distribution of photosynthetic microorganisms in the biofilms, their relationship with the colonized substratum, and the three-dimensional structure of the biofilms were studied by image analysis. The differences between local seasonal microenvironments at the Palenque site, the bioreceptivity of stone and the relationship between biofilms and their substrata are described. The implications for the development and permanence of species capable of withstanding temporal heterogeneity in and on El Palacio, mainly due to alternating wet and dry seasons, are discussed. Knowledge on how different biofilms contribute to biodegradation or bioprotection of the substratum can be used to develop maintenance and conservation protocols for cultural heritage.

**Keywords:** cyanobacteria; biofilm structure; Mayan monuments; biodeterioration; bioprotection

### Introduction

The Mayan Empire spanned 350,000 km<sup>2</sup>, encompassing modern day Mexico, Guatemala, Honduras, El Salvador, and Belize. The Palenque archaeological site, discovered in 1785 (Ruz 1997), is a prime example of a Mayan sanctuary from the classical period, reaching its height between 600 and 900 AD. Palenque was declared a National Park by the National Commission of Protected Natural Areas (CONANP) in 1981 and was added to UNESCO's World Heritage List in 1987. The region is humid tropical, with precipitation as the main hydro-climatological variable (Snow 1976), and alternating wet and dry seasons. The quarry stones of the building are mainly calcareous, and all Mayan structures were originally coated with stucco (Gaylarde et al. 2001).

Under suitable conditions, both natural and artificial substrata can become colonized by communities of microorganisms enclosed in exopolysaccharide matrices called biofilms (Warscheid and Braams 2000; Di Pippo et al. 2009). The composition and local distribution of biofilms are determined by the spatial and temporal variation of several biotic and physico-chemical factors, including microclimate. The capacity for a given stratum to be colonized is known as bioreceptivity, a term coined by Guillitte (1955). The bioreceptivity of building materials varies widely and is

chiefly dictated by surface roughness, initial porosity, moisture, and mineralogical nature (Guillitte 1995). The biofilms that grow in areas exposed to light tend to contain photosynthetic organisms. Cultural heritage sites made of natural materials (eg stone) are highly susceptible to damage caused by biofilms, namely, through chemical and physical deterioration (Ortega-Calvo et al. 1991; Morton and Surman 1994; Wakefield and Jones 1998; Gorbushina 2007) as well as surface discoloration.

Many of the illuminated surfaces on Mayan monuments are covered by biofilms formed by subaerial phototrophic species that resist environmental changes, including extended droughts, high temperature, or prolonged solar exposure (Novelo and Ramírez 2006). Survival strategies related to desiccation are well known (Potts 1999; Wynn-Williams 2000), and include the use of water retained within the substrata and the formation of protective, drought-resistant compounds (Gorbushina and Krumbein 2000). It can be assumed that just as some photosynthetic microorganisms cope with high solar irradiance by synthesizing ultraviolet radiation (UVR) screens (Castenholz and Garcia-Pichel 2000; Fleming and Castenholz 2007), others, avoiding water stress inside rock substrata, will ultimately be limited by light penetration (Bell 1993; Walker and Pace 2007). The most abundant species are cyanobacteria and a few

\*Corresponding author. Email: marionahernandez@ub.edu

green algae; their presence is generally dictated by local humidity and desiccation (Saiz-Jiménez and Videla 2002; Crispim et al. 2003; Videla et al. 2003; Caneva et al. 2005; Ortega-Morales et al. 2005; Gaylarde et al. 2006; McNamara et al. 2006; Novelo and Ramírez 2006).

The organic matter produced by phototrophs is often exploited by non-photosynthetic microorganisms such as fungi or bacteria, which subsequently flourish. Reported examples include Proteobacteria and Actinobacteria, mainly among epilithic communities, and Acidobacteria, Actinobacteria and low GC Firmicutes, primarily in endolithic communities (Wakefield and Jones 1998; Caneva et al. 2005; McNamara and Mitchell 2005). The environmental conditions associated with these biofilms were reasonably well understood, but little was known about their structure or how they respond to seasonal changes.

The aim of this work was to obtain information on the distribution, 3D structure, and adaptation to seasonal changes of Palenque phototrophic biofilms, particularly, to determine the conditions under which each morphospecies thrives. A multistep approach was employed, including light microscopy (LM), scanning electron microscopy in back-scattered electron mode (SEM-BSE), energy dispersive X-ray microanalysis (EDX), X-ray diffraction (XRD), and the non-destructive technique of confocal laser scanning microscopy (CLSM). In CLSM, samples are observed without the need to remove fluorescently or otherwise-labeled items from the substratum. Fluorescence of photosynthetic pigments was used to compare the architecture of the biofilms and determine morphospecies, the depth at which they thrive, and whether they were alive (Roldán et al. 2004; De los Ríos and Ascaso 2005; Horat et al. 2006). Phenotypic information on morphospecies, spatiotemporal variability, and the physiological status of the cells were also determined (Neu et al. 2004; Roldán et al. 2006).

## Methods

### *Site description and sample collection*

Palenque is located in the state of Chiapas, in southeast Mexico (17°29'00" N, 92°03'00" W). The region is tropical with rainfall fluctuating between heavy rains, from August to November, and a dry season, from December to April (<http://smn.cna.gob.mx/productos/emas/#>). Samples of epilithic biofilms were collected from an archaeological site, in a monument known as El Palacio (Figure 1). Taxonomic studies were begun in 2003 (Novelo and Ramírez 2006) and the samples were collected in August 2007 and January 2008. The samples were taken from four sites (Figure 2) on the building walls, each of which faces



Figure 1. Location of sampling sites (I, II, III and IV) at El Palacio (Palenque Archaeological Site).

different abiotic conditions: Site I (exposed to light, alternately wet and dry); Site II (protected from both light and direct rainfall); Site III (partially exposed to light, with persistent moisture); and Site IV (partially exposed to light, alternately wet and dry).

The moisture and temperature of the biofilm surfaces were measured with a Surveymaster BLD 5360 protimeter (General Electric, USA).

Small flakes and splinters of substrata were collected from all four sites, whose biofilms varied in shape, color, and texture (Figure 2). The color of each biofilm was dictated by its constituent algae and cyanobacteria and by its substratum. The samples were divided into aliquots that were either cultured, observed directly, or fixed for CLSM and SEM studies.

## Microscopy

### *Light microscopy*

An Axioplan microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) was used, and images were recorded with an AxioCam MRc5 digital camera. The constituent algae, cyanobacteria and their extracellular polymeric substances (EPS) were identified through direct observation of fresh, cultured and preserved samples, based on specialized literature (Geitler 1932; Ettl and Gärtner 1995; Komárek and Anagnostidis 1999).

### *CLSM*

Samples for CLSM were observed either live or fixed (with 3% paraformaldehyde in 0.1 M PBS buffer and 60 mM sucrose). Images were captured with a Leica TCS-SP5 AOBs CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) using Plan-Apochromatic 40 × (NA 1.25, oil) and 63 × (NA 1.4, oil) objectives. The biofilms were observed with multi-channel detection. Con A-Alexa 488 (0.8 mM)

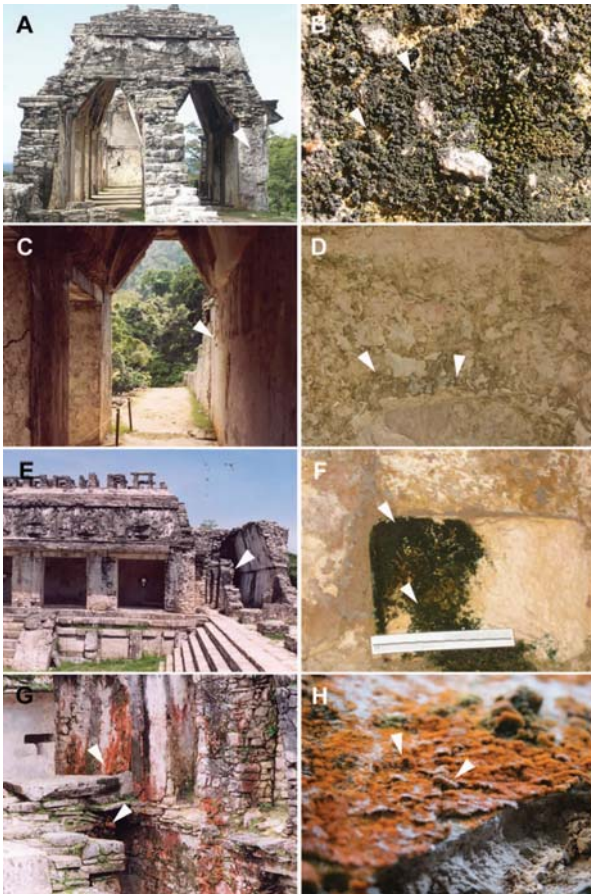


Figure 2. Detail of the sampling sites. (A) Sampling site I. General view of an exposed pilaster. (B) Detail of the black patchy biofilm in I. (C) Sampling site II. Ornamented stucco protected from both strong light and direct rainfall. (D) Detail of the green flakes in II. (E) Sampling site III. Partly protected niche, with persistent moisture. (F) Detail of the patchy black crust in III. (G) Sampling site IV. General view of the partly exposed mortar. (H) Detail of the orange patchy biofilm in IV.

targets EPS and was recorded in the green channel (excitation, 488 nm; emission, 495–540 nm).

The autofluorescence of photosynthetic pigments in different regions of the visible spectrum was observed. The color differentiation stems from the specific pigment composition of cyanobacteria and green algae. Chlorophylls in the photosynthetic microorganisms (algae and cyanobacteria) autofluoresce at 670–790 nm (excitation, 594 nm) and were recorded in the blue channel. Phycobilins in cyanobacteria autofluoresce at 570–615 nm (excitation, 561 nm) and were registered in the red channel. Some cyanobacteria appear magenta because they were visualized in both the blue and red channels.

The fluorescence of chlorophylls and phycobiliprotein pigments was assessed to trace the internal distribution of microalgae and cyanobacteria inside

the biofilm and substratum. The presence or absence of pigment fluorescence inside sheaths was used as the basis for discriminating between live and dead cells, respectively, and therefore was a direct method for monitoring the temporal dynamic in field material. The fluorescence intensity observed by CLSM indicates the relative activity of pigments (either chlorophylls or phycobilins) and therefore, for a given morphospecies, enabled comparison and discrimination of different physiological states for images captured under equivalent conditions. Physiological changes are often accompanied by changes in morphology, internal structure of cells (Roldán et al. 2006), different phases of the life cycle, and sheaths or external deposits. Samples in which most of the cells were dividing, and whose cells had compact cytoplasm (eukaryotic cells) or centropasm (prokaryotic cells) with small or no inclusions, were considered to be in the exponential growth phase. In contrast, samples in which only a few cells were dividing, and whose cells had large inclusions related to cell shape, were considered either to grow slowly or to be in a stationary phase. Dry-season biofilms were characterized as having empty sheaths and some colorless or collapsed cells (Figure 5). Samples observed by CLSM were subsequently broken, and then studied by LM. The results were contrasted with those from previous samples.

The substrata and other solid inorganic material were visualized by reflection and were recorded in the grey channel (excitation, 488 nm; emission, 480–495 nm). Three-dimensional data were collected from XY images every 0.5  $\mu\text{m}$  in Z (depth), with a 1 Airy unit confocal pinhole. To characterize the biofilms, different projections (Roldán et al. 2004) were generated from the XYZ series using Imaris v. 6.1.0 software (Bitplane, Zürich, Switzerland).

#### SEM-BSE and EDX

Samples for SEM were fixed in 0.2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in a gradient of ethanol, critical-point dried, and then sputter-coated with carbon. They were examined by SEM-BSE and by EDX (Quanta 200, FEI + EDAX). Selected samples were subsequently sputter-coated with gold, which improved the photographs for assessing the relationships among species and between species and substratum.

#### X-ray diffraction

Stone samples scratched off from underneath the biofilms on El Palacio walls were analyzed using an X'Pert PRO MPD Alpha PAN analytical geometric Bragg-Brentano diffractometer (Almelo, The

Netherlands) (radius = 240 mm, Cu radiation). The crystallographic structure and chemical composition were determined.

## Results

### Environmental conditions and substrata

The climatic conditions of the sampling sites vary by season and are characteristic of a tropical rainforest climate (<http://smn.cna.gob.mx/productos/emas/#>). The conditions for each biofilm at the sampling time are shown in Table 1. The temperature at the biofilm surface ranged from 25 to 31°C. The decrease in humidity during the dry season was also confirmed by measurements taken at the biofilm surfaces. The El Palacio substratum is complex, containing different morphotypes of calcium carbonate characterized by pure calcite, dolomite, small amounts of aragonite, and traces of quartz. Several building elements (eg mortar, stucco and limestone) were found in the samples examined. Those substrata would comprise the same primary materials (lime and sand), although the elemental distribution in each site varied slightly as a function of local levels of magnesium, silicates, and aluminum (Figure 3).

### Organisms and biofilms

At the sampling sites the photosynthetic microorganisms formed patches that were light green to orange-green or blackish. Examples of building colonization are shown in Figure 2. Cyanobacteria comprised the largest proportion of the photosynthetic community, except for the green alga *Trentepohlia aurea* (Linnaeus) Martius. The cyanobacteria and algae identified by LM and SEM are summarized in Table 2 in the supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage].

Table 1. Particular conditions for each biofilm.

Sampling site	Material	BT (°C)	BRH (%)
I	Limestone and mortar	(w) 30	100
		(d) 25	18
II	Stucco	(w) 31	81
		(d) 25	17
III	Stucco and limestone	(w) 30	89
		(d) 27	65
IV	Mortar	(w) 30	96
		(d) 27	20

w, wet season, 06.08.2007; d, dry season, 14.01.2007; BT, biofilm temperature; BRH, biofilm relative humidity.

### Sampling site I (exposed to light; alternately wet and dry)

The sample was taken from a southwest-facing exterior wall. The substratum was a porous, heterogeneous repaired mortar that contained limestone as well as non-lime materials such as sand. It has been heavily restored and showed formation of shrinkage cracks (Table 1, Figures 2C,D and 4A).

#### Wet season

The biofilm comprised two layers: an external crust formed of abundance of filaments of *Scytonema guyanense* (Mont.) Bornet et Flahaut (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage] and Figure 4A and B) and a few mosses, and a lower layer chiefly comprising coccoid cyanobacteria, dead cells, and inorganic material (Figure 5A). In August 2007, 2 months after the start of the wet season, heavy rain and strong runoff cleaned part of the dry aerial biofilm. Abundant hormogonia of *S. guyanense* started to develop, mixed with the remains of the previous dry season. The aerial biofilm was shiny and dark green due to its hydrated sheaths, which remained expanded throughout the wet season. The surface of this biofilm was easily removed from the base, which remained attached to the substratum. At the base, under the canopy of filamentous forms, CLSM revealed colonies of the coccoid cyanobacteria *Gloeocapsa calcicola* Gardner and *Gloeocapsa quaternata* Kützing (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]), sheath remnants, and

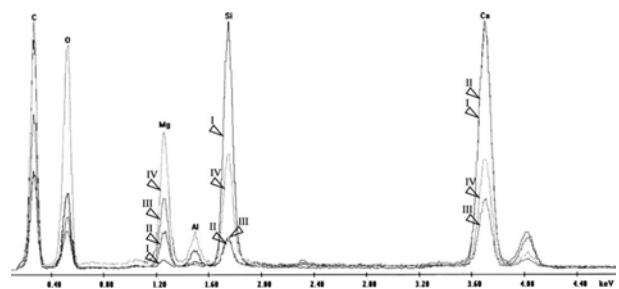


Figure 3. Overlap of individual EDX analyses from the four sampling sites at El Palacio. Note the same elements in different proportions. Sampling site I showed the highest concentration of silicon. Sites II and III still retained some of the original stucco and the substratum material primarily contained calcium carbonate and small amounts of magnesium and silicon. Sampling site IV, with the highest magnesium concentration, was on calcite dolomite rock, representing the original building material.

cells that had little fluorescence mixed with strongly fluorescent colonies of *Asterocapsa divina* Komárek and thin *Leptolyngbya* cf. *compacta* (Kützing ex Hansgirg) Komárek et Anagnostidis filaments (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]). SEM-BSE showed inorganic material attached to the soft base of the biofilm, which appeared to be limestone with irregular “rice-grains” or crystals of calcite, and a few wart-like colonies of *A. divina*.

#### Dry season

At the beginning of the dry season the sheaths of *S. guyanense* dried out and shrank, carrying away small substratum particles with them. Under shelter of the remains, inside the desiccated sheaths, some filaments of *S. guyanense* produced hormogonia. The protected biofilm base comprised remains and colonies of fluorescent *A. divina* (Figure 4C), which had thin, colorless envelopes (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]); *Gloeocapsa* spp.; other coccoid cyanobacteria; and the filamentous *L.* cf. *compacta*, which was also abundant and fluorescent. The base varied little between the start of the wet and dry seasons, except for the mucilage covering the coccoid cyanobacteria, which was soft and watery at the beginning of the dry season (only 2 months after the last rainfall). Throughout this season, more inorganic material and dead cells were observed, although there was little difference in the total thickness of the fluorescent portion of the base (data not shown). Fluorescence from chlorophylls and from phycobiliproteins was detected inside the substratum at depths up to approximately 50  $\mu\text{m}$ . This depth was considered the maximum at which the phototrophs were alive.

#### Sampling site II (protected from both strong light and direct rainfall)

The sample was collected from a southeast-facing interior wall with bas-reliefs, close to Site I (Figure 2C and D). The substratum was stucco with a high calcium matrix, and characterized by its strength and hard surface (Table 1), although some laminations were observed.

#### Wet season

Irregular pale green stains formed mainly of *G. calcicola* were distributed on and in the substratum (Figure 5B). Chlorophyll and phycobiliproteins were present.

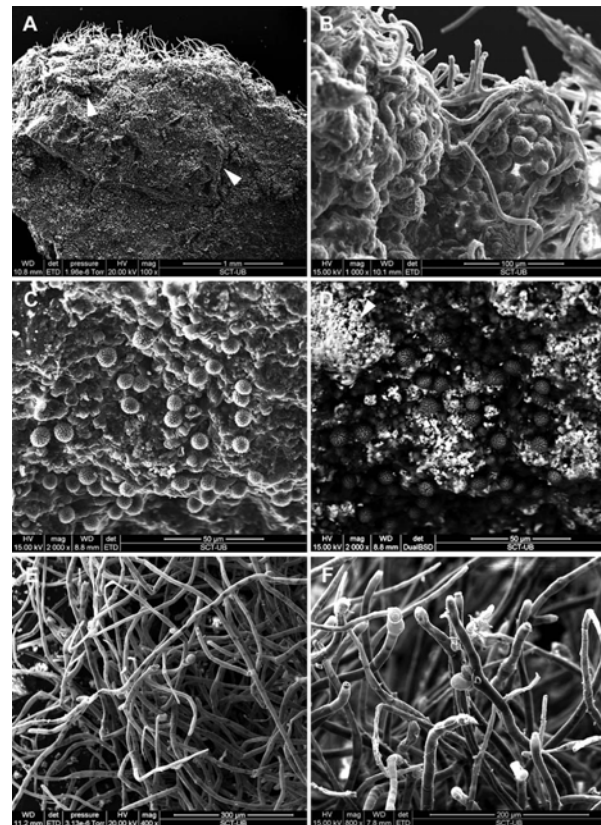


Figure 4. SEM-BSE images. (A) Low magnification overview of biofilms colonizing the surface of the sampling site I in the wet season. White arrows show shrinkage cracks. (B) Sampling site I showing filamentous *S. guyanense* and coccoid cyanobacteria in the dry season. (C) *A. divina* surface community at sampling site III, the cells were covered by wart-like ornamentation in the dry season. (D) BSE image of C showing *A. divina* with entrapped inorganic granules (in white). (E) Creeping filaments of *T. aurea* at the sampling site IV in the wet season. (F) Detail of *T. aurea* in E showing apical sporangia in the dry season.

#### Dry season

At the beginning of the dry season, stucco flakes or dust particles regularly fell off the carved decoration. Viable fluorescent cells were observed at depths up to nearly 100  $\mu\text{m}$ . Fluorescent spots were all established just inside the substratum and were fewer in number and weaker in intensity than those present during the wet season. Coccoid cyanobacteria were not assembled in continuous layers, and it was not clear to what extent they contributed to the observed spalling.

#### Sampling site III (partially exposed to light, with persistent moisture)

The sample was obtained from a northeast-facing protected niche that did not receive direct insolation

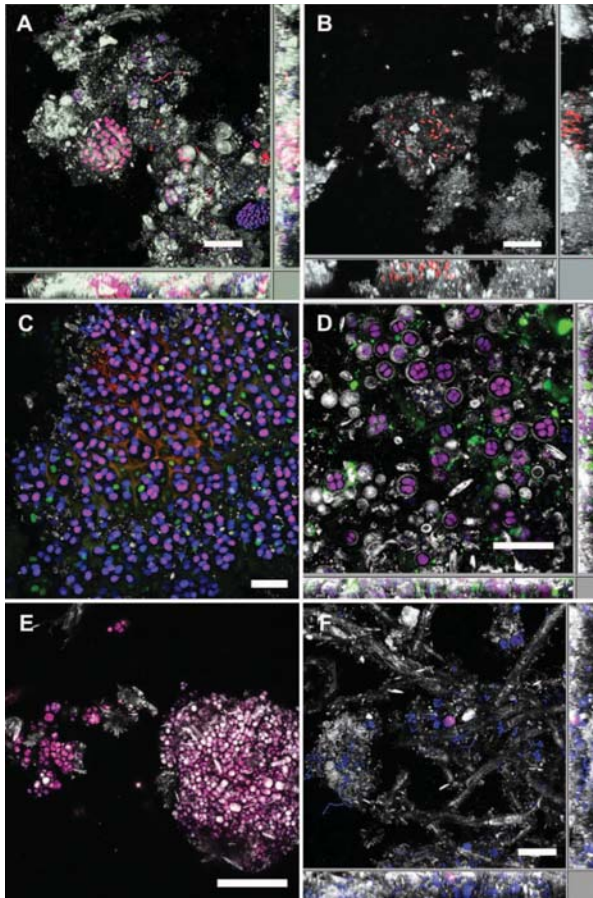


Figure 5. CLSM images from phototrophic biofilms. Color allocation: white = reflection from minerals; blue = autofluorescence of chlorophylls; red = autofluorescence of phycobilins; magenta = colocalized autofluorescence of cyanobacteria in the red (phycobilins) and blue channels (chlorophylls); green = extracellular polymeric substances dyed with Con A-Alexa 488. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (A) A few filaments of *S. guyanense* and a basal layer formed by coccal cyanobacteria, a mass of dead cells and inorganic materials, in the dry season. Thickness biofilm = 42  $\mu\text{m}$ . (B) *G. calcicola* distributed on and inside the substratum in the wet season. The low autofluorescence of chlorophyll (blue) is related to unhealthy cells. Biofilm thickness = 64.5  $\mu\text{m}$ . (C) *A. divina* in the wet season with mucilaginous envelopes. Biofilm thickness = 62.3  $\mu\text{m}$ . (D) *A. divina* biofilm attached to the substrata in the dry season. Celled groups covered with wart-like ornamentation and calcium carbonate. Biofilm thickness = 21.8  $\mu\text{m}$ . (E) Several stages of *A. divina* at the beginning of the dry season. Biofilm thickness = 51  $\mu\text{m}$ . (F) Filaments of *T. aurea* with low autofluorescence and desiccated sheaths in the upper part of the biofilm. Coccolid and colonial cyanobacteria at the bottom layer of the biofilm in the dry season. Biofilm thickness = 38.5  $\mu\text{m}$ .

(Figure 2E and F). The substratum appeared to be a mixture of stucco remains and limestone with a fine texture; the site receives water from the back and

retains humidity throughout most of the dry season (Table 1).

#### Wet season

Small patches of colonized stucco were examined by EDX: the material primarily contained calcium carbonate with small amounts of magnesium and silicate (Figure 3). In August (at the beginning of the wet season) the area was covered by a continuous, thin, compact dark-green layer, formed by *A. divina* growing as a firmly surface-bound layer. Various stages of *A. divina* coexisted simultaneously: some had small, abundant cells with little EPS (status nanocytosus) (Komárek 1993); some had large cells with abundant soft sheaths (Figure 5C); and, finally, others consisted of masses with little fluorescence, mixed with calcified sheaths and inorganic remains. Short filaments of *S. guyanense*, colonial cyanobacteria, *L. cf. compacta*, *Schizothrix* sp. and *T. aurea* were present, but scarcely developed. The mucilaginous biofilm was easily removed from the substratum, with no concomitant detachment of substratum particles.

#### Dry season

The layer formed by *A. divina* was lighter and less shiny than in the wet season, despite the fact that the inner walls had remained damp for extended periods of time. The colonies formed a thin biofilm tightly attached to the substrata in which CLSM revealed groups containing few cells that were enveloped by firm sheaths of mucilage (Figure 5D), sometimes mixed with calcium carbonate, and covered by wart-like ornamentation (Figure 4C and D). The living fluorescent colonies were hidden inside the substratum at a depth of approximately 50  $\mu\text{m}$ , surrounded by clumps of calcite needles and other small, irregular inorganic substances (Figure 5E). When the biofilm was scratched off, it carried along particles of the substratum.

#### Sampling site IV (partially exposed to light; alternately wet and dry)

The sampling site was protected by lateral walls, but lacked a roof. The mortar was porous and reflected restorations covering the original dolomite containing calcium and magnesium carbonates (Table 1).

#### Wet season

The biofilm produced extensive, orange, felt-like patches on mortar or calcareous rock surfaces in the internal, southwest-facing and partially protected

lower walls (Figure 2G and H). The upper external layer comprised entangled filaments formed by elongated cylindrical *T. aurea* cells (Figure 4E). The lower layer comprised *T. aurea*, colonies of *Nostoc commune* Vaucher ex Bornet et Flahaut and other coccoid and colonial cyanobacteria (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]). In contrast, the lower cells were short and green (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]). *T. aurea* at the lower part had developed round masses as well as short, irregularly-branched creeping filaments, in which sporangia and swarms were being produced (Figure 4F). Heavy rains at the beginning of the wet season washed away the desiccated filaments that had remained from the dry season, while the lower layer became soft, gelatinous, and embedded in the stone cracks.

#### Dry season

In January, at the beginning of the dry season, the outer filaments of *T. aurea* had grayish desiccated sheaths whose cells lacked fluorescence (Figure 5F) and which, by LM, appeared hyaline or empty. However, under the canopy, it formed gametangia or sporangia (Figure 4F), in creeping or erect filaments, respectively. Remains of organic matter, and fragments of calcareous material, were intermixed with fluorescent multicellular aggregates of *A. divina*, *Gloeocapsa* spp., and other cyanobacteria (Table 2, supplementary material [Supplementary material is available via a multimedia link on the online article webpage]). The prostrate cells of *T. aurea* penetrated this soft base and adhered to the rock surface; as such, removal entailed damaging the substratum and dragging along small inorganic fragments. The filaments that penetrated the substratum maintained their pigment fluorescence up to a depth of approximately 30  $\mu\text{m}$  (Figure 5F). Lastly, SEM and EDX of the underside of 1 mm flakes did not reveal any cyanobacteria or *T. aurea*.

The humidity at the biofilm surfaces varied considerably between the wet and dry seasons, except in Site III, which was protected. During the dry season, in which conditions were unfavorable, phototrophic microorganisms were hidden under the remains from the previous wet season and were protected by their respective resilience strategies (Potts 1999). During the wet season the dominant species grew quickly and developed structured biofilms that differed in thickness and coverage and that were generally stratified. The lower portions of the biofilms contained coccoid and colonial cyanobacteria, whereas the upper portions

encompassed different taxa (Figure 6): filamentous cyanobacteria such as *S. guyanense* (A), coccoid cyanobacteria (B), and *A. divina* (C), or the green alga *T. aurea* (D).

#### Discussion

The biofilms that develop on the stone, stucco and mortar of El Palacio walls not only detract from aesthetics, but can also compromise conservation efforts. Strong seasonal changes in rainfall and relative humidity define a strict growth sequence and determine the shape and composition of the biofilms. Other factors that are important in the development of organisms and of biofilms include bioreceptivity and the relative orientation of each site to the sun.

All the biofilms contained the same species, although the relative amounts of these differed by site and by season. In Sites I and IV, which were exposed to heavy rains in the wet season, the filamentous *S. guyanense* and *T. aurea* dominated. However, in Sites II and III, which were relatively protected from the elements, colonial cyanobacteria, mainly *A. divina*, dominated and produced a mucilaginous

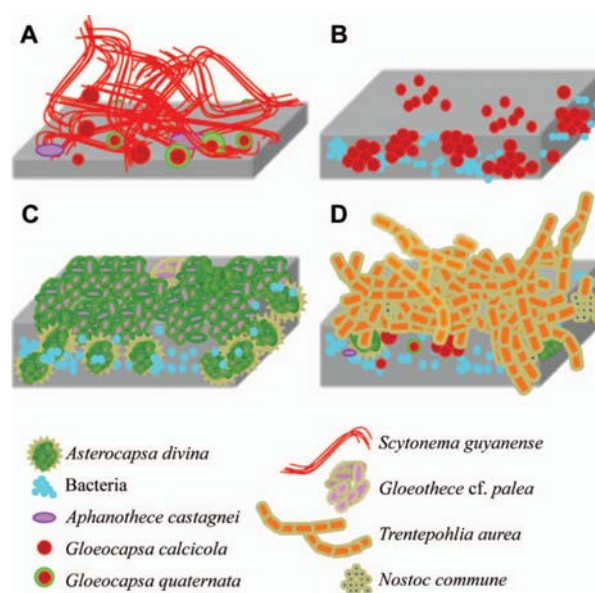


Figure 6. Schematic representation of biofilm structure, main species and distribution at each sampling site at El Palacio. (A) Sampling site I. Biofilm formed by *S. guyanense*, *Leptolyngbya* sp., *Chroococcus* sp., *Aphanothece castagnei*, *Gloeotheca palea*, *G. quaternata*. (B) Sampling site II. Biofilm formed by coccoid cyanobacteria; *G. calcicola*, *G. quaternata* and *Chroococcus* sp. (C) Sampling site III. Biofilm mainly formed by *A. divina* and some coccoid cyanobacteria. (D) Sampling site IV. *T. aurea*, intermixed with aggregates of *A. divina*, *G. calcicola*, *G. quaternata* and the filamentous *S. guyanense* and *Nostoc commune*.

film associated with inorganic particles. These three species are tolerant to desiccation and also contribute strongly to biofilm growth in habitats similar to the Palenque site. However, their strategies to overcome the dry season appear to be different (Büdel 1999; Rindi and Guiry 2002).

*A. divina*, described from Mexico (Komárek 1993) and reported from caves (Aboal et al. 2003), presented two morphological stages in its life cycle (Komárek 1993) related to micro-environmental conditions (Montejano et al. 2008). A stage characterized by solitary cells or small colonies that divided generally by regular binary fission was present at all sites throughout the year. However, the other stage, in which cells in colonies undergo multiple fission, marked by a quick increase in cell number (Komárek and Anagnostidis 1999; Šmarda and Hindák 2006), was only recorded at Site II at the beginning of the wet season. The best local growth conditions for *A. divina* comprised the calcareous substratum and protective conditions at Site III, plus the residual moisture during the dry season. Moreover, thick walled stages facilitated survival in the dried state, due to the carbohydrate- and calcite-enriched sheaths. These resistant forms were less fluorescent and therefore, were deemed inactive (Grilli-Caiola et al. 1996; Häubner et al. 2006). Signs of decay in the *A. divina* samples observed by CLSM, namely, inorganic spots mixed with living cells and EPS, appeared to be associated with desiccation-rewetting cycles (Beech et al. 2005).

*S. guyanense* has been reported as being cosmopolitan and well adapted to tropical climates and strong light (Sant'Anna 1988; Büdel 1999; Novelo and Ramírez 2006). In Sampling Site I at El Palacio, it showed a defined succession pattern, reflected by strong variations in coverage. Extensive growth during the first heavy rains produced blackish, mucilaginous biofilms, which fell off easily when completely hydrated. The hot and dry conditions of the dry season were probably lethal for surface communities of *S. guyanense*, which lost fluorescence and eventually dried out. Once dry, the biofilm adhered tightly to the rock and was difficult to remove. Only hormogonia and short filaments maintained fluorescence; these remained viable and ultimately recovered quickly at the beginning of the wet season. These had been sheltered from intense solar radiation and desiccation by their own remains or were mixed with the lower mucilaginous communities, which retained humidity (Wynn-Williams 2000). Furthermore, the porous mortar surface would have facilitated water circulation, and consequently, their rapid development. The population reappeared at the same location and with the same appearance every year (Novelo and Ramirez 2006).

*T. aurea*, like other species of this genus, is considered to have high tolerance and adaptability to severe conditions such as strong light (Abe et al. 1998) or long, dry periods, after which it rapidly reabsorbs water (Howland 1929). At El Palacio, *T. aurea* grew on stable rock and cement, comprising the upper layer located in the cyanobacterial lower cover, although it only slightly penetrated the rock substratum. In western Ireland *T. aurea* grows on cement (Rindi and Guiry 2004), and in India, on rock surfaces and tree bark (Gupta and Agrawal 2004). Moreover, it has previously been identified on limestone Mayan monuments (Novelo and Ramírez 2006). *T. aurea* grown in culture develops reproductive structures only after a drastic change in culture conditions (Rindi and Guiry 2004). The same behavior was observed in the field: the alga formed sporangia and gametangia according to the seasonal changes in the subaerial environment studied. Cells in these life cycle stages were protected by remains from the previous season, which helped *T. aurea* overcome the dry season.

The stratification of biofilms is dictated by several factors, including the quantity of light. The stress of low light reduces biofilm stratification, as well as thickness and species diversity (Albertano and Kovacik 1996; Hernández-Mariné et al. 2001); consequently, only certain species can survive under these conditions (Horat et al. 2006; Walker and Pace 2007). Unicellular cyanobacteria that are rich in the accessory pigment phycoerythrin (the magenta in Figure 5) are able to colonize shaded environments. The commonality of this pattern in Sites II and III, and at the lower of biofilms in Sites I and IV, could be rationalized by the fact that excess of light is one of the limiting factors at these locations. However, other factors define the tops of biofilms. Species diversity is higher for the surfaces that receive less sunlight (whether due to shading or orientation) and remain wet for a long time (Barberousse et al. 2006; Häubner et al. 2006). As reflected by their clear stratification, Sites I and IV, which had the greatest moisture levels in the wet season, had more species than Sites II and III. These results are comparable with those of extreme habitats ranging from Antarctic communities (Büdel et al. 2008) to deserts (García-Pichel and Belnap 1996; Wynn-Williams 2000). In all cases the survival rate of each species, and the extent to which they enabled other, more vulnerable species to grow in the same biofilm, depends on their particular strategies for adapting to environmental changes and to their relative position in the biofilm. Generation of protective pigments by dark sheathed filamentous cyanobacteria allows them to be preponderant over algae in Latin America (Crispim et al. 2003). In the case of El Palacio, persistence of the photosynthetic



microorganisms at the biofilm base apparently depended on their ability to tolerate an annual desiccation period whereas the upper portion depended on the rate of growth when favorable conditions were established.

The spatial patterns of photosynthetic biofilms on the walls of El Palacio mainly derive from abiotic factors, chiefly, light, humidity and bioreceptivity, although the microorganisms can alter their environment and create an additional level of structural heterogeneity. Nevertheless, the influence of environmental conditions on the location of these microorganisms inside biofilms is difficult to gauge, as is the role played by the microorganisms, which, by changing the surrounding conditions, enable other microorganisms to become established in specific positions inside the biofilm (Kumar and Kumar 1999). Substratum bioreceptivity (Guillette 1995) may have influenced biofilm development at Sites I and IV, whose high mortar porosity would facilitate growth (Crispim et al. 2003). Indeed, at these sites, *S. guyanense* and *T. aurea* formed massive biofilms and exhibited more morphospecies (six each) than did the less porous Sites II and III (four and five, respectively).

The consequences of photosynthetic biofilms on biodeterioration and bioprotection are difficult to ascertain. Biofilms can be both detrimental and beneficial, depending on the substratum and microorganisms involved (Hoppert et al. 2004). Thin superficial biofilms can cause discoloration of stone surfaces (Hernández-Mariné et al. 2003) and mechanical and biochemical deterioration (Ortega-Calvo et al. 1991; Kumar and Kumar 1999), or favor the acceleration of weathering processes (Warscheid and Braams 2000) as observed in Sites II and III of El Palacio. Negative effects reported for *Trentepohlia* spp. include pitting (Gaylarde et al. 2006) and progressive mechanical degradation of buildings (Wakefield et al. 1996; Nogueroles-Seoane and Rifón-Lastra 1997). In contrast, *S. guyanense* protected the rock surface at Site I from direct solar exposure and, to a certain extent, reduced erosion from rain and wind and prevented the development of other organisms. This bioprotection could be related to the shield provided by the dark color of the sheaths. Indeed, no endolithic layers were observed under their canopies. This effect has already been reported in lichens (Ariño et al. 1995; Hoppert et al. 2004).

Further work on how biofilms induce biodegradation or bioprotection of their respective substrata will enable the development of maintenance and conservation protocols for cultural heritage sites.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to Servei de Microscopia, Universitat Autònoma de Barcelona and to Serveis

Científicotècnics (SCT), Microscòpia Electrònica de Ras-treig, Universitat de Barcelona. This work was supported by Programme Alban (scholarship No. E06D100109MX), a European Union program for high level scholarships for Latin America. The authors thank Coordinación Nacional de Conservación del Patrimonio Cultural del Instituto Nacional de Antropología e Historia (CNPC-INAH), Mexico, for their assistance in sample collection, and G. Vidal and E. Loyo, for their help in fieldwork. Lastly, the authors thank Universidad Nacional Autónoma de México for financial support (PAPIIT-IN214606-3) of the studies performed from 2005-2008.

#### References

- Abe K, Mihara H, Hirano M. 1998. Characteristics of growth and carotenoid accumulation of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* in liquid culture. *J Mar Biotechnol* 6:53–58.
- Aboal M, Asencio AD, López-Jiménez E. 2003. Morphological, ultrastructural and ecological study of *Asterocapsa divina* Komárek (Chroococaceae, Cyanobacteria) from a cave of Southeastern Spain. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 109:57–65.
- Albertano P, Kovacik L. 1996. Light and temperature responses of terrestrial sciaphilous strains of *Leptolyngbya* sp. in cross-gradient cultures. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 83:17–28.
- Ariño X, Ortega-Calvo JJ, Gómez-Bolea A, Saiz-Jimenez C. 1995. Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cadiz, Spain): biodeterioration vs. bioprotection. *Sci Total Environ* 167:353–363.
- Barberousse H, Lombardo RJ, Tell G, Couté A. 2006. Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. *Biofouling* 22:69–77.
- Beech IB, Sunner JA, Hiraoka K. 2005. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int Microbiol* 8:157–168.
- Bell RA. 1993. Cryptoendolithic algae of hot semiarid lands and deserts. *J Phycol* 29:133–139.
- Büdel B. 1999. Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. *Eur J Phycol* 34:361–370.
- Büdel B, Bendix J, Bicker FR, Green TGA. 2008. Dewfall as a water source frequently activates the endolithic cyanobacterial communities in the granites of Taylor Valley, Antarctica. *J Phycol* 44:1415–1424.
- Caneva G, Salvadori O, Ricci S, Ceschin S. 2005. Ecological analysis and biodeterioration processes over time at the hieroglyphic stairway in the Copán (Honduras) Archaeological Site. *Plant Biosyst* 139:295–310.
- Castenholz RW, Garcia-Pichel F. 2000. Cyanobacterial responses to UV-radiation. In: Whitton BA, Potts M, editors. *The ecology of cyanobacteria*. The Netherlands: Kluwer Academic Publisher. p. 591–611.
- Crispim CA, Gaylarde PM, Gaylarde CC. 2003. Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Curr Microbiol* 46:79–82.
- De los Ríos A, Ascaso C. 2005. Contributions of *in situ* microscopy to the current understanding of stone biodeterioration. *Int Microbiol* 8:181–188.
- Di Pippo F, Bohn A, Congestri R, De Philippis R, Albertano P. 2009. Capsular polysaccharides of cultured phototrophic biofilms. *Biofouling* 25:495–504.
- Ettl H, Gärtner G. 1995. *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtentalgen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- Fleming ED, Castenholz RW. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ Microbiol* 9:1448–1455.
- García-Pichel F, Belnap J. 1996. Microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crust. *J Phycol* 32:774–782.
- Gaylarde PM, Englert G, Ortega-Morales BO, Gaylarde CC. 2006. Lichen-like colonies of pure *Trentepohlia* on limestone monuments. *Int Biodeterior Biodegr* 58:119–123.
- Gaylarde PM, Gaylarde CC, Guíamet P, Gomez de Saravia S, Videla H. 2001. Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. *Biofouling* 17:41–45.
- Geitler L. 1932. Cyanophyceae. In: Kolkwitz R, editor. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Vol 14. Leipzig (Akadem): Verlagsgesellschaft. p. 1–1196.
- Gorbushina AA. 2007. Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9:1613–1631.
- Gorbushina AA, Krumbein WE. 2000. Subaerial microbial mats and their effects on soil and rock. In: Riding RE, Awramik SM, editors. *Microbial sediments*. Berlin, Germany: Springer Verlag. p. 161–170.
- Grilli-Caiola M, Bill D, Friedmann EI. 1996. Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *Eur J Phycol* 31:97–105.
- Guillitte O. 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci Total Environ* 167:215–220.
- Gupta S, Agrawal SC. 2004. Vegetative survival and reproduction under submerged and air-exposed conditions and vegetative survival as affected by salts, pesticides and metals in aerial green alga *Trentepohlia aurea*. *Folia Microbiol* 49:37–40.
- Häubner N, Schumann R, Karsten U. 2006. Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on facades – response to temperature and water stress. *Microb Ecol* 51:285–293.
- Hernández-Mariné M, Clavero E, Roldán M. 2003. Why there is such luxurious growth in the hypogean environments. *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 109:229–239.
- Hernández-Mariné M, Roldán M, Clavero E, Canals A, Ariño X. 2001. Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Puigmolto sinkhole. *Nova Hedwigia* 123:235–251.
- Hoppert M, Flies C, Pohl W, Günzl B, Schneider J. 2004. Colonization strategies of lithobiontic microorganisms on carbonate rocks. *Environ Geol* 46:421–428.
- Horat T, Neu TR, Bachofen R. 2006. An endolithic microbial community in dolomite rock in Central Switzerland: characterization by reflection spectroscopy, pigments analyses, scanning electron microscopy, and laser scanning microscopy. *Microb Ecol* 51:353–364.
- Howland LJ. 1929. The moisture relations of terrestrial algae. IV. Periodic observations of *Trentepohlia aurea* Martius. *Ann Bot* 43:174–202.
- Komárek J. 1993. Validation of the genera *Gloeocapsopsis* and *Asterocapsa* (Cyanoprokaryota) with regard to species from Japan, Mexico and Himalayas. *Bull Nat Sci Mus Tokyo B* 19:19–37.
- Komárek J, Anagnostidis K. 1999. Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. In: Ettl H, Gärtner G, Heynig H, Mollenhauer E, editors. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 19(1). Germany. Gustav Fisher, Jena. p. 1–548.
- Kumar R, Kumar AV. 1999. Biodeterioration of stone in tropical environments. *Research in Conservation*. Los Angeles: Getty Conservation Institute.
- McNamara CJ, Mitchell R. 2005. Microbial deterioration of historic stone. *Front Ecol Environ* 38:445–451.
- McNamara CJ, Perry TD, IV, Bearce KA, Hernández-Duque G, Mitchell R. 2006. Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb Ecol* 51:51–64.
- Montejano G, León-Tejera H, Hindák F. 2008. New observations on the life cycle of *Asterocapsa divina* (Cyanoprokaryota, Chroococcaceae). *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 126:65–71.
- Morton LHG, Surman SB. 1994. Biofilms in biodeterioration. *Int Biodeterior Biodegr* 34:203–221.
- Neu TR, Woelfl S, Lawrence JR. 2004. Three-dimensional of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J Microbiol Methods* 56:161–172.
- Noguerol-Seoane A, Rifon-Lastra A. 1997. Epilithic phycoflora on monuments. A survey of San Esteban de Ribas de Sil Monastery (Ourense, NW Spain). *Cryptogam Algal* 18:351–361.
- Novelo E, Ramírez M. 2006. Algae and cyanobacterial diversity and distribution patterns on mayan buildings in Palenque, Chiapas. *Cyanobacterial diversity and ecology on historic monuments in Latin America*. *Rev Latinoam Microbiol* 48:188–195.
- Ortega-Calvo JJ, Hernández-Marine M, Saiz-Jimenez C. 1991. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *Int Biodeterior* 28:165–185.
- Ortega-Morales BO, Gaylarde CC, Englert GE, Gaylarde PM. 2005. Analysis of salt-containing biofilms on limestone buildings of the Mayan culture at Edzna, Mexico. *Geomicrobiol J* 22:261–268.
- Potts M. 1999. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur J Phycol* 34:319–328.
- Rindi F, Guiry MD. 2002. Diversity, life history, and ecology of *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) in urban habitats in western Ireland. *J Phycol* 38:39–54.
- Rindi F, Guiry MD. 2004. Composition and spatial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43:225–235.
- Roldán M, Thomas F, Castel S, Quesada A, Hernández-Marine M. 2004. Noninvasive pigment identification in single cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl Environ Microbiol* 70:3745–3750.
- Roldán M, Oliva F, Gonzalez del Valle MA, Saiz-Jimenez C, Hernández-Marine M. 2006. Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Appl Environ Microbiol* 72:3026–3031.
- Ruz A. 1997. La civilización de los antiguos mayas. In: Saiz-Jiménez C, Videla HA, editors. 2002. *Biodeterioro de monumentos históricos de Iberoamérica España*. RTXV-E CYTED, Mexico (D.F.): Fondo de Cultura Económica.
- Sant'Anna CL. 1988. Scytonemataceae (Cyanophyceae) from the state of São Paulo, southern Brazil. *Nova Hedwigia* 46:519–539.
- Šmarda J, Hindák F. 2006. Light and electron microscope studies of *Asterocapsa salina* spec. nova (Cyanophyta/Cyanoprokaryota). *Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud* 121:43–57.

- Snow JW. 1976. The climate of northern South America. In: Schwerdtfeger W, editor. *Climates of central and South America*. Amsterdam: Elsevier. p. 295–403.
- Videla HA, Guiamet P, Gomez de Saravia S. 2003. Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. *Rev Museo La Plata* 44:1–11.
- Wakefield R, Jones M, Wilson M, Young M, Nicholson K, Urguhart C. 1996. Investigations of decayed sandstone colonized by a species of *Trentepohlia*. *Aerobiologia* 12:19–25.
- Wakefield RD, Jones MS. 1998. An introduction to stone colonizing microorganisms and biodeterioration of building stone. *Q J Eng Geol* 31:301–313.
- Walker JJ, Pace NR. 2007. Endolithic microbial ecosystems. *Ann Rev of Microbiol* 61:331–347.
- Warscheid T, Braams J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodeterior Biodegr* 46:343–368.
- Wynn-Williams DD. 2000. Cyanobacteria in deserts – life at the limit? In: Whitton BA, Potts M, editors. *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p. 341–366.

## **4.2. Enfoque polifásico y las estrategias adaptativas de *Nostoc cf. commune* (Nostocales, Nostocaceae) en los monumentos mayas.**

Uno de los problemas principales a que se enfrentan los estudios sobre el biodeterioro producido por los biofilms fotosintéticos en monumentos históricos es la escasa información referente a la identidad taxonómica y la biología de los microorganismos que los forman. Saber quienes son y cómo optimizan los recursos disponibles del medio circundante y las diferentes estrategias que adoptan durante su ciclo de vida para sobrevivir a condiciones cambiantes, es información valiosa en el diseño de mecanismos adecuados para su control en el patrimonio cultural.

*Nostoc commune* es una especie de distribución cosmopolita y ha sido registrada en varias zonas arqueológicas del sureste mexicano. En este trabajo se caracteriza el fenotipo de morfoespecies de *N. commune* complementado con un estudio filogenético que indica que pertenece a un clado en el que también están situadas especies de *Nostoc sensu stricto*. Por ello las cepas fueron determinadas como *N. cf. commune*. Dicha especie fue aislada de biofilms provenientes de la zona arqueológica de Bonampak (Chiapas, México). La región es tropical húmeda y se caracteriza por la alternancia de estaciones, húmeda y seca. El material fue recolectado en dos sitios. En el Sitio I, protegido de la luz solar directa por un muro, *N. cf. commune* crece sobre mortero y forma biofilms acompañado de *Trentepohlia aurea*. En el Sitio II, expuesto y donde la evaporación es elevada, *N. cf. commune* crece sobre estuco, acompañado de *Scytonema guyanense*. *N. cf. commune* varía en

aparición de manera alternada, dependiendo del grado de pluviosidad. Su ciclo de vida consta de cuatro etapas, dos de desarrollo estacional a) etapa de crecimiento durante la estación húmeda y b) etapa de latencia durante la estación seca. Y dos etapas de transición c) preparación para la estación seca y d) rehidratación y recuperación.

En el Sitio II, donde las condiciones de sequía son extremas, *N. cf. commune* cuenta con estrategias de adaptación frente a la sequía, siendo una de ellas la reducción del número de células en el interior de las colonias. Las formas de resistencia que sobreviven durante la época seca, se rehidratan al inicio de la estación lluviosa y forman propágulos que se desarrollan hasta adoptar la forma colonial, rodeadas por una envoltura gelatinosa. Los acinetos se observaron sólo en el Sitio II y en cultivos. La ultraestructura muestra disposición paralela de los tilacoides verticilados y conexiones intercelulares.

También se detectaron y analizaron los espectros de fluorescencia de los diferentes pigmentos fotosintéticos mediante microscopia confocal espectral. *N. cf. commune* presenta clorofila *a*, ficocianina, y aloficocianina en ambos sitios. Los espectros de las células vegetativas, recogidos en el Sitio II, en la época seca, diferían en su espectro de fluorescencia. Se identificó un máximo alrededor del 564 nm, que se atribuye a la ficoeritrina, lo que se puede entender como un aumento de la tolerancia frente a los efectos perjudiciales de la radiación. Esta información indica que tanto la distribución como la persistencia de *N. cf. commune* podrían derivarse de diferentes estrategias de adaptación que incrementan su resistencia.

## Polyphasic approach and adaptative strategies of *Nostoc* cf. *commune* (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments

M. RAMÍREZ<sup>a,b</sup>, M. HERNÁNDEZ–MARINÉ<sup>a</sup>, P. MATEO<sup>c</sup>, E. BERRENDERO<sup>c</sup> & M. ROLDÁN<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Facultat de Farmàcia, Unitat de Botànica, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>c</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>d</sup>Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Facultat de Ciències, 08193 Bellaterra, Spain

**Abstract:** An aerophytic *Nostoc*, from a Mayan monument, has been characterized by phenotypic and molecular approaches, and identified as a morphospecies of *Nostoc commune*. Phylogenetic analysis indicates that it belongs to a *Nostoc sensu stricto* clade, which contains strains identified as *N. commune*. *Nostoc* cf. *commune* is found in two close areas: Site I (protected from direct sunlight by a wall), where it forms biofilms on mortar with *Trentepohlia aurea*; and Site II, where it grows on exposed stucco with the accompanying organism *Scytonema guyanense*. Over the year, in a habitat dictated by alternating wet and dry seasons, the organisms vary in appearance. Its life cycle comprises two seasonally–determined developmental stages (growth during the wet season and dormancy during the dry season) and two transitional stages (preparation for the dry season, and rehydration and recovery). At the beginning of the wet season the resistant stages from the previous dry season are rehydrated and form propagula, that adopt a colonial shape surrounded by a gelatinous sheath. As conditions become drier, clearly more in Site II, *N. cf. commune* employs adaptative strategies against the drought, such as reducing the number of cells inside thick ensheathed colonies. Akinetes were observed, although only in Site II and in cultures of an isolated strain. Their fine structure shows parallel arrays of whorled thylakoids and septal intercellular connections. Spectral confocal laser scanning microscopy was used to analyze the fluorescence spectra of the photosynthetic pigments. *N. cf. commune* shows phycocyanin, allophycocyanin and chlorophyll *a* in both sites. Moreover, spectra of vegetative ensheathed cells, collected at Site II at the dry season, differed in their fluorescence spectrum: they feature a peak at 564 nm, attributed to phycoerythrin, which increases cell tolerance against the detrimental effects of strong light. These findings indicate that both the distribution and persistence of *N. cf. commune* might stem from cumulative adaptative strategies that increase its resistance to extreme desiccation.

**Key words:** Adaptative strategies, biofilms, cellular differentiation, confocal, cyanobacteria, *Nostoc*, phycobilins, phylogenetic relationships, subaerial, taxonomy, ultrastructure

### Introduction

Species of the genus *Nostoc* are conspicuous components of terrestrial microbial populations worldwide (DODDS et al. 1995), represented by roughly 60 recognizable (plus many unclear ones) morphospecies and strains (KOMÁREK 2010). *Nostoc commune* VAUCHER ex BORNET et FLAHAULT is especially widespread globally (POTTS 2000; WRIGHT et al. 2001; NOVIS & SMISSEN 2006). Its persistence and success in terrestrial environments have been attributed to its ability to tolerate desiccation after an extended drought period, and to rapidly rehydrate and recover metabolic activity

once favorable conditions have been reestablished (DODDS et al. 1995; POTTS 2000; FUKUDA et al. 2008).

Local environmental conditions (e.g. availability of water) strongly influence the complex life cycle of *N. commune*, determining the presence and sequence of phases as well as the differentiation of specialized cells (MOLLENHAUER 1988). Adaptation to drying and subsequent recovery of physiological capacities and active growth upon rehydration require protection of cell components and repair processes. Responses to drying and rewetting include: changes in the glycan layer, which protects and provides a repository for

water (HILL et al. 1997; POTTS 2000; TAMARU et al. 2005); induction of photoprotective pigments, carotenoids and external ultraviolet light (UV) (GARCIA-PICHEL & CASTENHOLZ 1991; EHLING-SCHULZ et al. 1997); accumulation of non-reducing disaccharides, such as trehalose, to stabilize drying cells (BILLI & POTTS 2002; SAKAMOTO et al. 2009); preservation of cell fine structure and cellular integrity during desiccation and upon rehydration (PEAT & POTTS 1987); and deactivation of PSII with diminution of photosynthesis and loss of PSI activity and dissipation of light energy absorbed by pigment-protein complexes (ARÁOZ & HÄDER 1999; SATOH et al. 2002; HIRAI et al. 2004; FUKUDA et al. 2008). As light-harvesting pigments, cyanobacteria contain chlorophyll *a*, carotenoids and phycobiliproteins: phycoerythrin (PE,  $\lambda_{em} \sim 575$  nm), phycocyanin (PC,  $\lambda_{em} \sim 645$  nm) and allophycocyanin (APC,  $\lambda_{em} \sim 658$  nm) (KERÄNEN et al. 1999, WOLF & SCHÜSSLER, 2005). The energy transfer between these pigments can be influenced by environmental factors such as temperature and light intensity (WEN et al. 2005; KUMAR & MURTHY 2007). In addition to the absorption properties of the screening pigments the acclimation processes involve modulation of light harvesting apparatuses in function of light quality and intensity and nutrient availability (VENUGOPAL et al. 2006). The emission spectrum of photosynthetic organisms reflects their pigment composition and indicates its energy transfer pathways (STRASSER & BUTLER 1977).

We observed and isolated ensheathed colonies from Mayan monuments exhibiting *Nostoc* morphology, in an area of contrasting wet and dry seasons (Bonampak, Chiapas, Mexico).

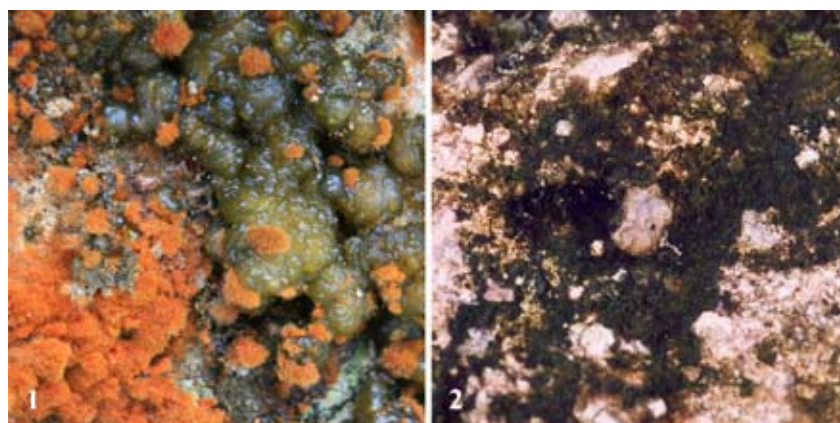
We identified the field material and the cultured strain as a morphospecies of *Nostoc commune* (GEITLER 1932; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989; MOLLENHAUER et al. 1994). Herein we report on the characterization, based on phenotypical, ecological and molecular data, with the aim of establishing if and how environmental conditions affect morphology and pigment composition and to determine life cycle stages.

## Material and Methods

**Site description and sample collection.** The archeological site Bonampak was declared a Natural Monument in 1992 by the Mexican National Commission of Protected Natural Areas (CONANP). Bonampak is located in the Mexican state of Chiapas, (16°42'14" N, 91°03'54" W). The region is tropical, with heavy rainfall from August to November and a dry season from December to April (<http://smn.cna.gob.mx/emas/>).

Biofilms of *Nostoc* cf. *commune* were collected at Bonampak in January 2008, two months after the beginning of the dry period and in August 2008, two months after the beginning of the wet period, from two sites on the building walls. Site I (Fig. 1) was protected from direct sunlight by a wall, and Site II (Fig. 2) was exposed to direct sunlight. At Site I the main biofilm-accompanying organism was *Trentepohlia aurea* (L.) MARTIUS and the substratum was limestone and mortar, whereas at Site II, *Scytonema guyanense* (MONT.) BORN. et FLAHL. thrived on stucco.

The moisture and temperature of the biofilm surfaces were measured with a Surveymaster BLD 5360 protimeter (General Electric, USA) (Table 1). Small flakes and splinters of substrata were collected from both sites. The samples were divided into aliquots that were either preserved dry in silica gel, observed



Figs 1–2. Detail of the sampling Sites in Bonampak (Chiapas, México): (1) site I, protected from direct sunlight. Wet season. Mortar with tough green colonies of *N. cf. commune*, accompanied by *Trentepohlia aurea*. (2) Site II, exposed to direct sunlight. Stucco with blackened dry flakes of *N. cf. commune* accompanied by *Scytonema guyanense*.

directly by light microscopy, or fixed for confocal laser scanning microscopy (CLSM). The preserved, dry materials were cultured (starting 28 January, 2010 using 1% solidified BG11 medium (STANIER et al. 1971) and incubated in subdued daylight (west-facing window) at room temperature.

**Light microscopy.** The samples were visualized using an Axioplan microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an MRc5 AxioCam photomicrographic system. Cell measurements were made based on the optical images from field and cultured material. Characteristics previously considered as taxonomically important at generic and specific levels were considered (FRÉMY 1930; GEITLER 1932; KANTZ & BOLD 1969; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989).

**Confocal laser scanning microscopy (CLSM).** Samples were observed either live (cultures) or fixed (field material) with 3% paraformaldehyde in 0.1 M PBS and 60 mM saccharose. Images were captured with a Leica TCS-SP5 CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) using Plan-Apochromatic 63x (NA 1.4, oil) objectives with different zoom ranges. Chlorophyll *a* and phycobiliproteins emitted at 650 to 790 nm (excitation: 561 nm) and were visualized in the red channel. The structure of the colony was evaluated using the XYZ mode of the CLSM microscope, acquiring optical sections in XY planes. Three-dimensional images were captured every 0.25  $\mu\text{m}$  with a 1 Airy unit confocal pinhole. Stacks were subsequently processed with Imaris v. 6.1.0 software (Bitplane AG Zürich, Switzerland) to obtain maximum intensity projections (ROLDÁN et al. 2004a).

The pigments of the material were identified in field samples and in various cultured samples using a lambdascan function of CSLM, fluorescence-based method that enables three-dimensional localization of the phototrophic microorganisms and simultaneous analysis of the fluorescent pigments from a single cell (ROLDÁN et al. 2004b). The field samples were mounted on Mat-Teck culture dishes (Mat Teck Corp., Ashland, Massachusetts, United States), and the cultured samples, onto microscope slides and examined with the same confocal microscope using a Plan-Apochromatic 63x (NA 1.4, oil) objective (2x zoom). Series of images ( $xy\lambda$ ), called lambdastacks, were taken to determine the spectra emission of photosynthetic pigments and to establish their maxima. The excitation wavelength used was the 488 nm line of an Ar laser. The emission detection was set from 515 to 775 nm and optimal confocal pinhole. For each  $xy$  focal plane, confocal microscopy measured the emission variation every 15 nm (lambda step size = 7.5 nm). The emission spectra analysis was processed using Leica LAS AF. A Region of Interest (ROI) was delimited to determine the mean fluorescence intensity (MFI) in the selected area versus the emission wavelength. To analyze cells, 15 ROIs

Table 1. Temperature and relative humidity in the sampling sites at the time of sample collection.

Sampling site	Material	BT (°C)	BRH (%)
I	Limestone and mortar	(w) 26	97
		(d) 23	54
II	Stucco	(w) 29	45
		(d) 26	32

w=wet season, 08.08.2008; d=dry season, 17.01.2008; BT=biofilm temperature; BRH=biofilm relative humidity.

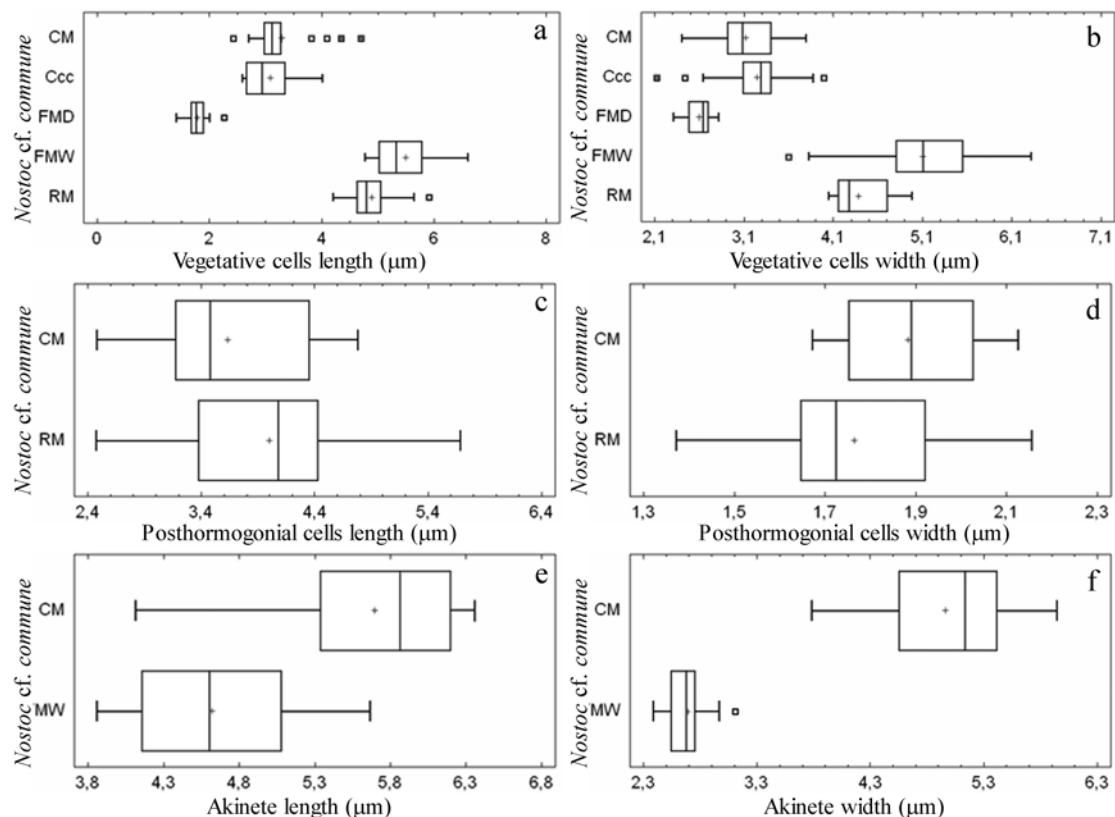
of 1  $\mu\text{m}^2$  were selected in the thylakoid region; MFI and maxima were calculated in these ROIs. The mean and standard error were calculated for all the ROIs examined.

**Transmission electron microscopy (TEM).** Cultured material was fixed in a mixture of glutaraldehyde (2.5%) in 0.1M cacodylate buffer and post fixed in 1% OsO<sub>4</sub> in the same buffer. They were then dehydrated with acetone and embedded in Spurr resin. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate and lead citrate. The sections were examined using a JEOL 1010 TEM at 100 kV accelerating voltage.

**Isolation of DNA, PCR amplification and sequencing.** Genomic DNA from dried field samples was extracted and amplified following a modification of the procedure described by BERRENDERO et al. (2008). Samples were frozen in liquid nitrogen. The DNA was extracted using the UltraClean Microbial DNA isolation Kit (MoBio Laboratories, Lab Conda S.A.). The 16S rRNA gene was amplified using the primers pA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (EDWARDS et al. 1989) and cyanobacteria-specific B23S (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3') (LEPÈRE et al. 2000). Polymerase chain reaction was performed in a Perkin-Elmer GenAmp PCR System 2400. The PCR reactions were conducted in 25  $\mu\text{l}$  volumes and contained 10 pmol of each primer, 6  $\mu\text{l}$  of DNA extraction, 200  $\mu\text{M}$  dNTP, 1  $\mu\text{g}$  BSA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5  $\mu\text{l}$  of 10x polymerase buffer, 5  $\mu\text{l}$  Eppendorf Taqmaster PCR-enhancer, 0.75 U Ultratools DNA polymerase (Biotools). The PCR comprised an initial denaturation step at 94 °C for 5 min; three cycles at 94 °C for 45 sec each; one, at 57°C for 45 sec; one, at 68 °C for 2 min; and one, at 68 °C for 7 min (GKELIS et al. 2005). The concentration of amplified products was checked on 1.5% agarose gel. The PCR products were cloned into the pGEM<sup>R</sup>-T Easy Vector Systems (PROMEGA) and transformed into competent *E. coli*. The products were purified using the Real Clean Spin Kit (REAL). The 16S rRNA gene was sequenced with Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's



Table 2. Median value and range of morphometrical characteres considered to be of taxonomic importance at generic and specific levels for *Nostoc cf. commune*. Vegetative cells length and width: from field material (dry and wet season) (FMD, FMW), rewetted material (RM), cultured material (CM) and “Cocoid cells” (Ccc). Posthormogonial cells length and width from RM and CM. Akinetes length and width from FMW and CM. n=50.



instructions. The sequences were obtained for both strands independently.

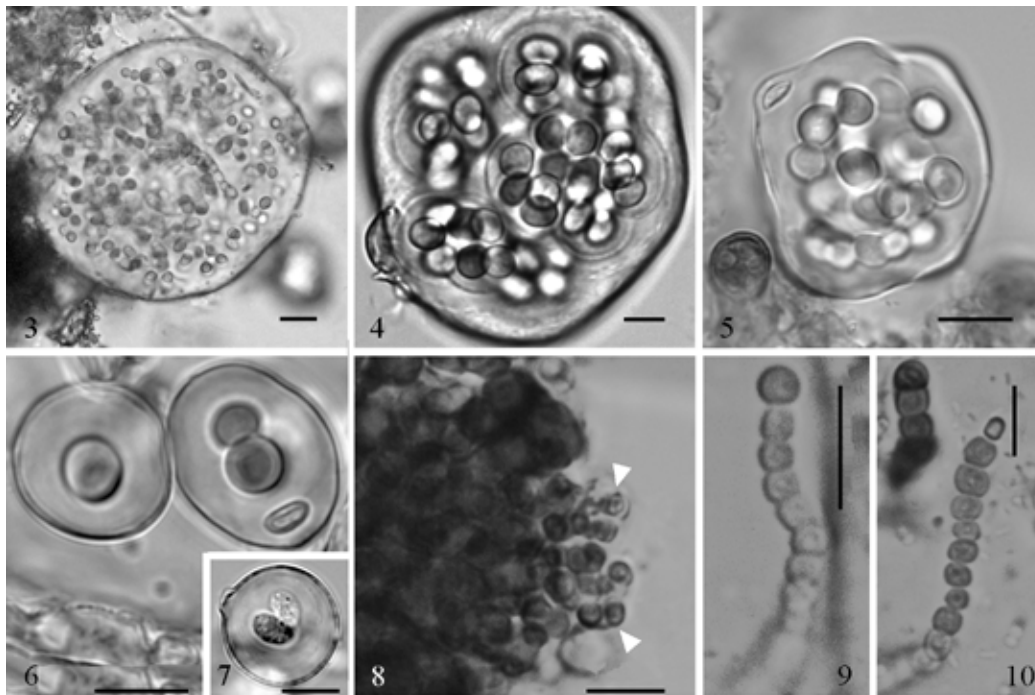
**Phylogenetic analysis.** Nucleotide sequences obtained from DNA sequencing were compared with sequence information available in the National Center for Biotechnology Information database using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Multiple sequence alignment was performed using CLUSTALW (THOMPSON et al. 1994) of the current version of the BioEdit program (HALL 1999). The alignment was later visually checked and corrected with BioEdit. Trees based on the 16S rRNA gene were constructed using the neighbour joining (NJ) (SAITOU & NEI 1987), maximum parsimony (MP), and maximum likelihood (ML) methods. NJ and MP were constructed using the MEGA 4 program (TAMURA et al. 2007), while ML was inferred using PhyML software (<http://atgc.lirmm.fr/phyml/>) (GUINDON & GASCUEL 2003). Distances for the NJ tree were estimated by the algorithm of TAJIMA & NEI (1984) model; nucleotide positions containing gaps and missing data were initially retained for all such sites in the analyses, and then excluded as necessary in the pairwise distance estimation (pairwise deletion option). Maximum parsimony was performed with the close-neighbour-interchange search algorithm with random tree addition; missing information and

alignment gap sites were treated as missing data in the calculation of tree length. Bootstrap analysis of 1,000 replicates was performed for NJ and MP trees. For ML, the general time-reversible model (GTR) was selected, assuming a discrete gamma distribution with four categories of site-to-site variability of change (gamma shape parameter: 0.168) with the nearest-neighbour-interchange algorithm, using 100 bootstrap samples. Similarity values were calculated using the web-based tool EzTaxon ([www.eztaxon.org](http://www.eztaxon.org)). The nucleotide sequences obtained in this work have been deposited in the GenBank database (Fig. 21).

## Results

**Morphology and life cycle.** The field life cycle of *N. cf. commune* encompasses four distinct phases, which are coupled to climatological events: development during the wet season; preparation for drying; survival from desiccation; and rewetting combined with increasing the number of propagula.

The morphometric results of vegetative cells, posthormogonial cells and akinetes are shown



Figs 3–10. Microphotographs of *Nostoc* cf. *commune*, Site II: (3) wet season. Filaments inside the colonial sheath. (4) Transition to the dry season. Small colonies with layered sheaths inside the mother colony. (5–6) Ensheated coccoid cells. (7) Ensheated granulated akinetes. (8–10) Two years old rewetted material. (8) Colonies with tightly packed contorted trichomes, built by large spherical or irregular cells, and thin trichomes (arrow) released by disintegration of the outer layer of the sheath. (9–10) Post-hormogonial filaments bearing terminal heterocytes. Scale bars 10  $\mu$ m.

in Table 2. During the wet season the thalli of the *N. cf. commune* from the two Sites were similar. They comprised conspicuous agglomerations of olive–green colonies, with swollen sheaths covering clusters of seriate filaments entangled to different degrees (Fig. 3; Table 2a, b). During the transition to the dry season, the colonies shrank and the cells formed layered sheaths surrounded by a pellicle (Figs 4–7). These colonies contained groups of cells in the aseriate stage or, in colonies from Site II, even just one or two single cells per colony, called coccoid cells (ABDELAHAD & BAZICHELLI 1989). The few remaining cells were bigger than those from the wet season. At Site I, in the dry season, the thalli were strongly attached to other components of biofilms and to the substrata, whereas at Site II, they were friable, dry black–green flakes. Ensheathed ellipsoidal akinetes (Fig. 7; Table 2e, f) were observed once at Site II.

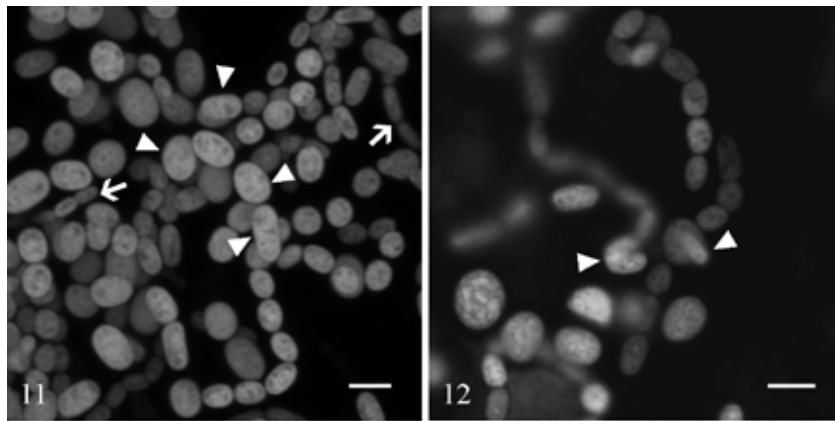
After rewetting two year old material from Site II, the thalli comprised irregularly shaped colonies, surrounding tightly ensheated contorted filaments, composed of large spherical or irregular cells. During the first two weeks, disintegration of colonies released hormogonial filaments (Fig. 8). Post-hormogonial filaments comprised barrel–

shaped cells with terminal heterocytes (Figs 9–10; Table 2c, d).

The results (Table 2) showed little variability of measured cell size, except for coccoid cells (Table 2a, b).

The only cultures that survived were those grown from dry season samples taken from Site II. Four weeks into growth, blue green vegetative filaments developed, comprising thin, elongated cells. This later fully differentiated into vegetative filaments with diversely sized round or barrel–shaped cells. Aseriate stages were also present. The sheath covering these trichomes was colorless, and neither diffiuent nor layered. No heterocytes were observed. Within six months, akinetes formed: these had smooth colorless to yellowish epispore, were oblong to barrel–shaped, and larger than the vegetative cells (Fig. 11; Table 2e, f). The akinetes germinated, producing chains of small, oblong cells, which emerged from the open akinete wall. All growth stages (germinating akinetes, post-hormogonial cells, vegetative cells and chains of akinetes) coexisted in a single Petri dish, under the same culture conditions (Fig. 12).

**Pigments.** Upon excitation at 488 nm, living *N. cf. commune* cells gave overlapping



Figs. 11–12. Confocal images: (11) projection of the general view of cultured material: post-hormogonial (head arrow), seriate and aseriate filaments and chain of akinetes (arrow). (12) Germinating akinetes. Single section of hormogonia emerging from the akinete envelope (arrow). Scale bars 10  $\mu$ m.

fluorescence emission spectra. Fig. 13 shows lambda scans of vegetative cells of several sizes of field samples collected from Site I (Fig. 14) and from Site II (Fig. 15).

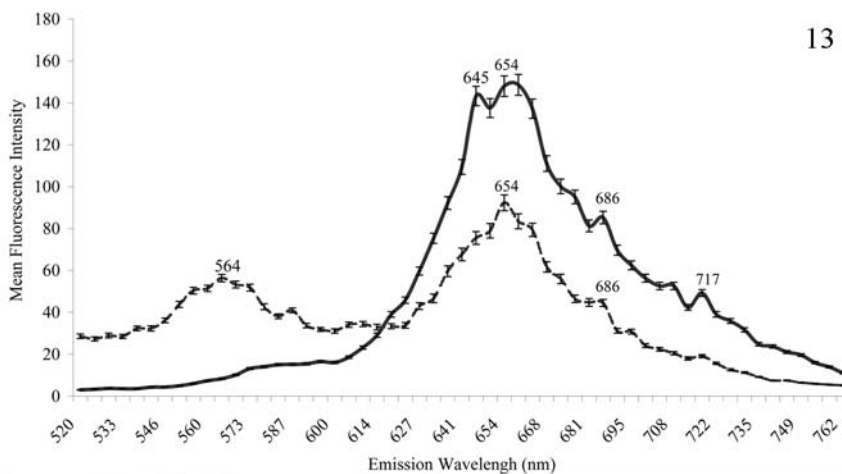
Vegetative cells from Site I had a peak at 645 nm and a plateau from 645 to 654 nm. In this case, small peaks at 686 nm and 717 nm were observed. In contrast to vegetative cells growing in Site I (protected from light), the cells from Site II (exposed to light) showed two clear maxima, at 564 nm and 654 nm. There were also shoulders at 686 nm and 717 nm.

The fluorescence maximum in the spectrum of cells from cultured material had a broad emission peak at 661 nm with shoulders at 651 nm and 678 nm; no clear peak or shoulder was identified at 684 nm, the maximum for chlorophyll *a*. The position of maximum emission for each cell varied slightly with cell size or growth state (data not shown), but did show any clear trend. The fluorescence spectra from Site I and cultured material did not exhibit any intrinsic differences except for lower mean fluorescence intensity (MFI) in field samples. However, the maximum at 564 nm was only observed in samples from the dry season at Site II (Fig. 13).

**TEM.** The multilayered cell wall was surrounded by a sheath that was either non-lamellated or slightly lamellated, and non-diffluent (Figs. 16–20). Fibrils and vesicles, located close to the cell wall and apparently liberated from it, contributed to sheath formation. Chains of elongated post-hormogonial cells had thylakoids located peripherally or distributed parietally, with whorls pushing through the center (Fig. 16). Larger vegetative cells, mostly rounded,

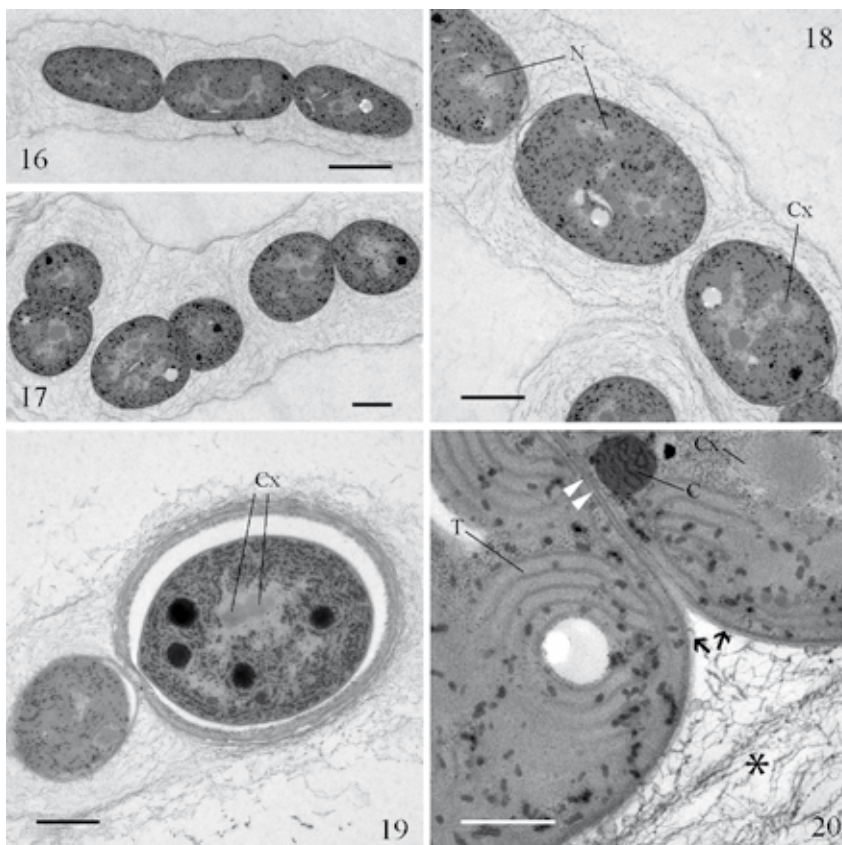
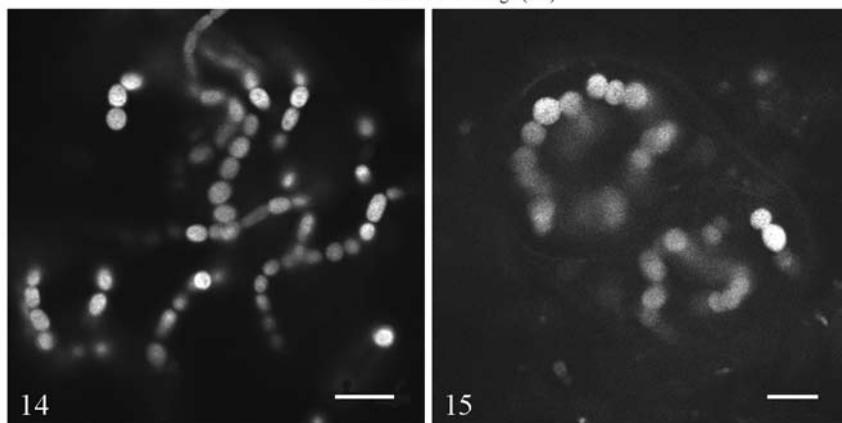
featured thylakoids distributed throughout the cell with nucleoid spaces containing large trapezoidal carboxisomes (Figs. 17–18). Akinetes featured a thick external layer, storage of endogenous polyglucoside granules, and cyanophycin granules (a multi-L-arginyl-poly-L-aspartate peptide) distributed throughout (Fig. 19). However, no black spots, characteristic of lipid deposits, or poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules were observed. Cross walls were formed by centripetal growth (Fig. 20). The cells were held together, forming trichomes. The septa between some older vegetative cells were crossed by intercellular connections (Fig. 20), although the plasma membrane was discontinuous throughout these gaps.

**Phylogenetic analysis.** The 16S rRNA sequence data of field samples of *Nostoc* cf. *commune* were obtained from three individual clones. The almost complete sequence (1460–1462 bp) was determined for two clones, and near complete sequence data (1141 bp) was obtained for the third clone. We detected microheterogeneities among 16S rRNA sequence determined from individual clones (sequence similarity of 99.4–99.5%), probably related to multiple copies of 16S rRNA operon (BOYER et al. 2001). The phylogenetic trees were built using NJ, MP and ML methods. Since similar clustering was obtained by the three methods, we represented the NJ tree with the indication of bootstrap values for the three approaches (Fig. 21). Our sequences clustered into a well-defined group with high bootstrap support containing strains of *N. commune*, *N. punctiforme*, *N. calcicola*, lichen phycobionts as well as other soil and rivers representatives of *Nostoc* with



13

Figs 13–15. Lambda scans of vegetative cells from field material: (13) spectral profile representing mean fluorescence intensity versus emission wavelength (515–775 nm) for single cells of *Nostoc* cf. *commune* at Site I and Site II (excitation wavelength = 488 nm). Peaks at 645 and 654 nm from phycocyanin and allophycocyanin, respectively, and at 686 from chlorophyll *a*. Site I (thick line). Site II (dotted line). In addition, the maximum at 564 from phycoerythrin. Data are the mean  $\pm$  standard error from the different sample examined. (14–15) Confocal scanning laser microscopy images corresponding to the maxima emission signal of photosynthetic pigments (14) Site I. (15) Site II. Scale bar 10  $\mu$ m.



Figs 16–20. TEM micrographs of cultured material: (16) elongated post-hormogonial cells with near-peripheral thylakoids. (17) Aseriate vegetative filaments. (18) Mature vegetative filaments with thylakoids distributed throughout the whole cell. (19) Glancing section of a vegetative cell and akinete. (20) Longitudinal section of a vegetative cell through the septum showing intercellular connections (white head arrows), continuous outer layer (black head arrows) and fibrillar sheath (asterisk). N, nucleoid areas C, cyanophycin granule; Cx, carboxisome; T, thylakoids. Scale bar 1  $\mu$ m (Figs 16–19); scale bar 0.2  $\mu$ m (Fig. 20).

sequence similarity ranging from 96.4 to 100 % (Table 3).

## Discussion

Field samples and the cultured material have been included in the form–species *N. commune* (WRIGHT et al. 2001) according to phenotypic and ecological criteria (FRÉMY 1930; GEITLER 1932; KANTZ & BOLD 1969; MOLLENHAUER 1988; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989; MOLLENHAUER et al. 1994; NOVIS & SMISSEN 2006). Nearly all the forms seen in the field were observed in cultured material, except for tough colonies and coccoid cells.

Stages in the life cycle of the genus *Nostoc* depend on environmental conditions (KANTZ & BOLD 1969; MOLLENHAUER 1988; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989; MOLLENHAUER et al. 1994; DODDS et al. 1995; POTTS 2000; WOLF & SCHÜSSLER 2005). Changes in morphology, cell structure (ROLDÁN et al. 2006), and external sheaths or deposits are coupled to physiological changes. Mass formation of akinetes and subsequent hormogonia development, observed in the cultured sample, occur very rarely in the field, as reported for *N. commune* (GEITLER 1932; KANTZ & BOLD 1969; ABDELAHAD & BAZZICHELLI 1989). Formation of akinetes is not the only mechanism to ensure persistence of cyanobacterial populations. Indeed, the rarity of akinetes in Bonampak, where *N. cf. commune* is subject to regular cycles of desiccation and rewetting, indicates that other persistent forms exist. Isolated or double cells, surrounded by a thick extracellular matrix, have been found and cited repeatedly with different names: *cocci*, *young spores*, *unicellular hormogonium* or *coccoid cells* (ABDELAHAD & BAZZICHELLI 1989). Reducing the number of cells inside each colony, down to only one coccoid cell, surrounded by a thick complex sheath enables some cells to survive. The abundance of these cells, suggests that they are a drought–resistant form that can overcome the dry season (DODDS et al. 1995; POTTS 2000; SATOH et al. 2002; HIRAI et al. 2004; TAMARU et al. 2005; FUKUDA et al. 2008).

Spectral detection in confocal microscopy enables *in vivo* fingerprinting of the photosynthetic pigments in a single cell (from thick intact samples). The type and spatial localization of pigments can then be correlated to the cell type (ROLDÁN et al. 2004a). Lambda scans of vegetative

cells correlated well with published spectra of extracted pigments (ONG & GLAZER 1988) and *in vivo* pigments, using similar tools and conditions (ROLDÁN et al. 2004b; WOLF & SCHÜSSLER 2005). The emission peaks and the shape of the spectra varied slightly with sample state due to environmental conditions. In these samples, the fluorescence peaks at 645 nm and 654 nm, always present, were assigned to PC and APC, respectively (KERÄNEN et al. 1999). Furthermore, chlorophyll *a* was clearly seen at the emission wavelengths of 678 nm and 686 nm (KERÄNEN et al. 1999; WOLF & SCHÜSSLER 2005; KUMAR & MURTHY 2007). In the field material, the emission spectra of both PC and APC also have a shoulder above 720 nm (KERÄNEN et al. 1999). Samples from Site II exhibited lower PC fluorescence ( $\lambda_{em} \sim 645$  nm) than those from Site I, indicating that energy transfer from phycobilisomes to the photosystems was suppressed in the former (KUMAR & MURTHY 2007). The fluorescence spectra of ensheathed vegetative *N. cf. commune* cells, collected at Site II in the dry season, differed from those of samples collected at Site I and those of cultured material—namely, in showing a peak at 564 nm, which was attributed to PE (BORDOWITZ & MONTGOMERY 2010). Although Sites I and II are very close (less than 50 m apart), the biofilms at Site I (for example, those with *Trentepohlia aurea*) are subject to less extreme conditions. Striking changes in the fluorescence properties—and therefore, presumably in the synthesis of PE by vegetative cells, in light–exposed habitats during the dry season—could be an adaptation to high irradiation energies and protection from photodamage of PSII, given that much of the energy absorbed by PE is lost as fluorescence (ARÁOZ & HÄDER 1999; FUKUDA et al. 2008). Factors that may affect PE production, such as developmental stage–specific changes in pigment composition (MILLIE et al. 2002; WOLF & SCHÜSSLER 2005), were ruled out upon comparison of vegetative cells and akinetes. The production of PE, is another strategy which increases cell tolerance against the detrimental effects of strong




Fig. 21. Neighbour–joining phylogenetic tree based on analysis of 16S rRNA genes showing the position of the sequences obtained in the present study (in bold). Numbers at nodes indicate bootstrap values greater than or equal to 50% for distance and parsimony analyses. Scale bar 0.02 substitutions per nucleotide position. GeneBank sequence accession numbers are given in parentheses.

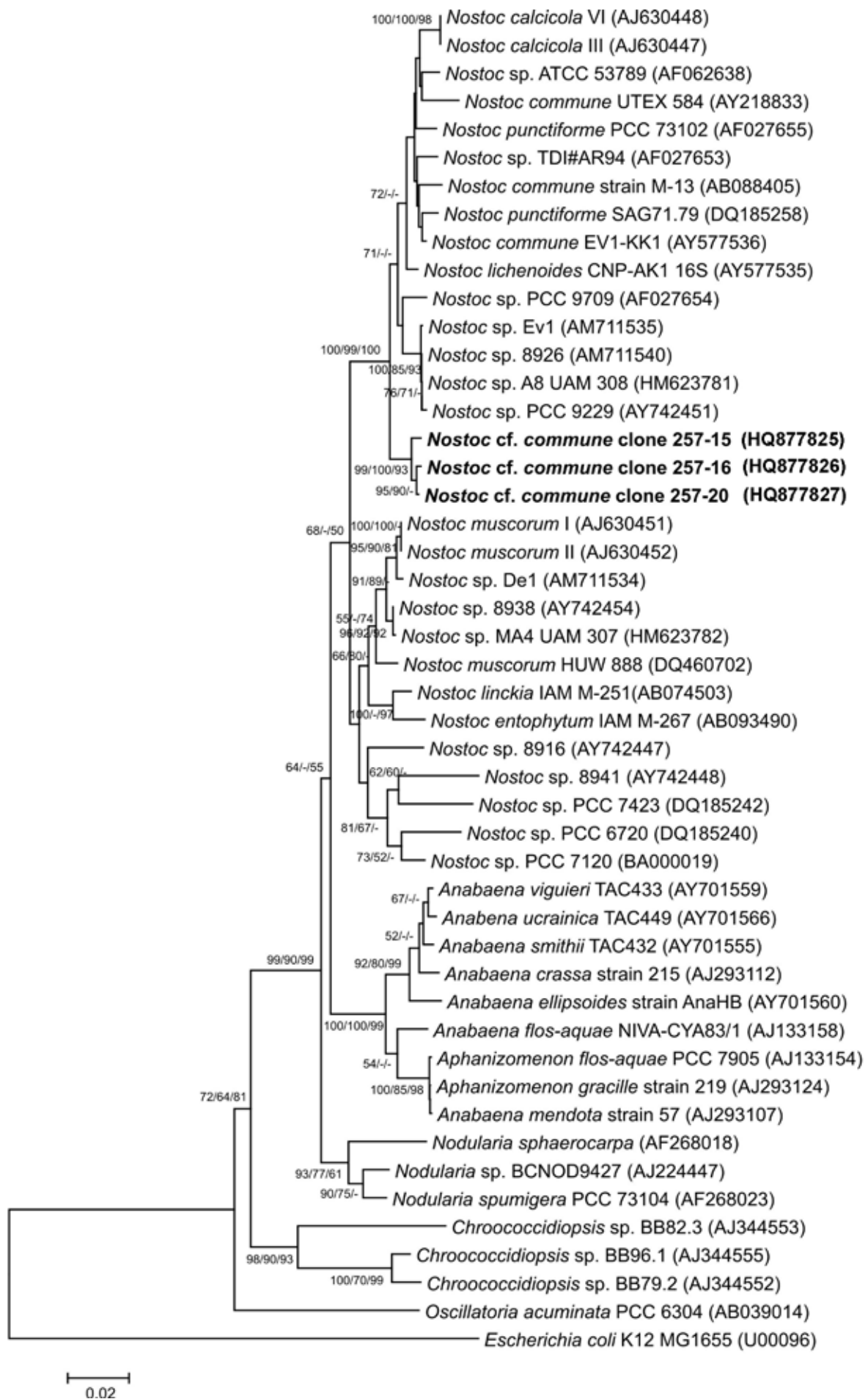


Table 3. A reduced similarity matrix generated using the 16S rRNA gene sequences. Only the new sequences from this study and their nearest relatives are presented in this table.

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>Nostoc</i> sp. A8 UAM 308																	
2. <i>Nostoc punctiforme</i> SAG71.79	98.0																
3. <i>Nostoc calcicola</i> VI	98.3	98.3															
4. <i>Nostoc calcicola</i> III	98.3	98.5	100														
5. <i>Nostoc</i> sp. ATCC53789	97.3	98.5	98.8	98.8													
6. <i>Nostoc punctiforme</i> PCC73102	98.1	98.7	98.7	98.7	98.8												
7. <i>Nostoc</i> sp. PCC9709	98.7	97.7	98.2	98.2	97.1	98.0											
8. <i>Nostoc</i> sp. TDI#AR94	98.1	98.7	98.5	98.5	98.4	98.6	98.3										
9. <i>Nostoc</i> sp. 8926	100.0	98.0	98.4	98.4	98.4	97.3	98.1	98.7	98.1								
10. <i>Nostoc</i> sp. PCC9229	99.9	97.8	98.2	98.2	97.1	97.9	98.5	97.9	99.9								
11. <i>Nostoc</i> sp. Ev1	99.9	98.0	98.4	98.4	97.2	98.0	98.6	98.0	99.9	99.8							
12. <i>Nostoc commune</i> UTEX584	96.6	98.3	98.1	98.1	98.3	97.5	96.9	97.6	96.6	96.4	96.6						
13. <i>Nostoc commune</i> strain M-13	97.4	98.6	98.3	98.3	98.7	98.2	97.5	98.5	97.4	97.3	97.4	98.1					
14. <i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> clone 257-15	98.2	96.8	97.3	97.3	96.9	97.3	97.6	96.9	98.2	98.1	98.2	96.5	97.4				
15. <i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> clone 257-16	98.3	97.0	97.5	97.5	97.0	97.3	97.8	97.1	98.3	98.1	98.4	96.6	97.4	99.4			
16. <i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> clone 257-20	98.3	97.1	97.6	97.6	97.1	97.4	97.9	97.2	98.4	98.2	98.4	96.6	97.5	99.5	99.5		
17. <i>Nostoc commune</i> EV1-KK1	99.0	99.4	98.4	98.4	98.7	99.1	98.7	99.2	99.0	98.8	98.6	98.3	99.1	98.7	98.3	98.4	
18. <i>Nostoc lichenooides</i> CNP-AK1	98.7	98.6	98.6	98.6	98.4	98.7	98.1	98.7	98.7	98.6	98.6	97.9	98.9	98.7	98.3	98.4	98.3

light. However, PE—the synthesis of which poses a considerable metabolic cost for cells (ARÁOZ & HÄDER 1999)—was only synthesized in the light-intensive, drought conditions of Site II, during the dry season.

The distribution of thylakoids in Nostocales is stable (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989). However, the increase in cell volume that accompanies the transition from hormogonia to full-developed vegetative cells implies larger photosynthetic membranes, which expand from the periphery of the hormogonia to fill nearly all of the cell lumen in old aseriate cells or akinetes, where the only gaps are occupied by nucleoid material and carboxisomes. These variations, clearly seen in the TEM micrographs, apparently induced a shift in the localization of the fluorescence signal in the CLSM images: in post-hormogonia, the signal was parietal, but in mature vegetative cells, it was evenly distributed throughout the cell. Intercellular connections between vegetative cells have been observed by conventional TEM and freeze fracture replica in the genus *Nostoc* (GORELOVA & BAULINA 2009) and it has been suggested that they are structures for intercellular communication (GORELOVA & BAULINA 2009; FLORES & HERRERO 2010).

The sequences obtained indicated that our samples belong to a *Nostoc sensu stricto* clade, which contains strains identified as *N. commune* and *N. punctiforme* PCC 73102 and terrestrial representatives of *Nostoc* (NOVIS & SMISSEN 2006; ŘEHÁKOVÁ et al. 2007), together with two strains of *N. calcicola* (HROUZEK et al. 2005; RAJANIEMI et al. 2005; PAPAETHIMIOU et al. 2008). Similar clustering has been found in other *Nostoc* studies: cluster I of PAPAETHIMIOU et al. (2008), cluster A of HROUZEK et al. (2005), and cluster A of MATEO et al. (in press). However, sequence similarity of 96.4 – 100% found between the components of the cluster indicates high genetic divergence regarding components of this group. DNA–DNA homology studies have been used to measure the degree of relatedness between organisms with high 16S rRNA sequence similarity. STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) suggested a threshold of 97 % 16S rRNA gene sequence similarity to separate species, on the grounds of when two strains have genetic identity below 97.5%, they consistently have DNA–DNA hybridization values below 70%, which has been used as a criterion for recognizing bacterial species (WAYNE et al. 1987). Our sequences had 98.3–98.7 % similarity with *N.*

*commune* EV1–KK1 isolated from a cement basin in České Budějovice, Czech Republic, and whose identity as that taxon was confirmed by Dr. JIŘÍ KOMÁREK (Academy of Science, Třeboň, Czech Republic) (ŘEHÁKOVÁ et al. 2007). According to this threshold these sequences may be from the same genospecies. However, more recently, STACKEBRANDT & EBERS (2006) suggested an increase from 97.0 to 98.7–99.0% 16S rRNA gene sequence similarity for the threshold to delineate separate species, which is at the borderline for our sequences. DNA–DNA hybridization studies could confirm species identity. The fact that akinetes able to develop into hormogonia were very abundant in culture but were only scarce in the field, combined with discrepancies in molecular criteria, suggested that the cultured material might not actually be *N. commune*. Nevertheless, the field material was ruled out as being *N. punctiforme*, based on colony morphology: *N. punctiforme* forms punctiforme masses of closely appressed cells and features akinetes that divide without forming filaments (KANTZ & BOLD 1969). Moreover, *N. punctiforme* may not have the capacity to tolerate desiccation cycles (MEEKS et al. 2001) as much as *N. cf. commune*.

*Nostoc* species are common in biofilms on ancient Mayan buildings in Mexico (GAYLARDE et al. 2001; RAMÍREZ et al. 2010). The distribution and success of *Nostoc cf. commune* in Bonampak (Chiapas, Mexico) comes as a result of its environmental plasticity, such as the resistant stages and the changes in pigment composition.

#### Acknowledgements

The authors are indebted to Servei de Microscopia, Universitat Autònoma de Barcelona and to Serveis Científicotècnics (SCT), Universitat de Barcelona. Mónica Ramirez was supported by Programme Alban (scholarship No. E06D100109MX), a European Union program for high level scholarships for Latin America. The authors thank Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH).

#### References

- ABDELAHAD, N. & BAZZICHELLI, G. (1989): Ultrastructure and development of “coccoid cells” of *Nostoc commune* (Cyanophyta). – Br. Phycol. J. 24: 217–222.
- ARÁOZ, R. & HÄDER, D.P. (1999): Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV–B in the cyanobacterium *Nostoc*. – Plant Physiol. Biochem. 37:



- 223–229.
- BERRENDERO, E., PERONA, E. & MATEO, P. (2008): Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 447–460.
- BILLI, D. & POTTS, M. (2002): Life and death of dried prokaryotes. – *Res. Microbiol.* 153: 7–12.
- BORDOWITZ, J.R. & MONTGOMERY, B.L. (2010): Exploiting the autofluorescent properties of photosynthetic pigments for analysis of pigmentation and morphology in live *Fremyella diplosiphon* cells. – *Sensors* 10: 6969–6979.
- BOYER, S.L., FLECHTNER, V.R. & JOHANSEN, J.R. (2001): Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. – *Mol. Biol. Evol.* 18: 1057–1069.
- DODDS, W.K., GUDDER, D.A. & MOLLENHAUER D. (1995): The ecology of *Nostoc*. – *J. Phycol.* 31: 2–18.
- EDWARDS, U., ROGALL, T., BLOCKERL, H., EMDE, M. & BOTTGER, E.C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. – *Nucleic Acids Res.* 17: 7843–7853.
- EHLING-SCHULZ, M., BILGER, W. & SCHERER, S. (1997): UVB induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. – *J. Bacteriol.* 179: 1940–1945.
- FLORES, A. & HERRERO, A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. – *Nature Reviews Microbiology* 8: 39–50.
- FREMY, P. 1930. Les Myxophycées de l’Afrique Equatoriale Française. *Arch. Bot. – Caen. Mem.* 3: 1–508.
- FUKUDA, S., YAMAKAWA, R., MANABU, H., YASUHIRO, K., KOIKE, H. & SATOH, K. (2008): Mechanisms to avoid photoinhibition in a desiccation-tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. – *Plant Cell Physiol.* 49: 488–492.
- GAYLARDE, P.M., GAYLARDE, C.C., GUIAMET, P.S., GOMEZ de SARAVIA, S.G. & VIDELA, H.A. (2001): Biodeterioration of Mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. – *Biofouling* 17: 41–45.
- GARCIA-PICHEL, F. & CASTENHOLZ, R.W. (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. – *J. Phycol.* 27: 395–409.
- GEITLER, L. (1932): Cyanophyceae. – In: Rabenhorst’s *Kryptogamenflora*, 14. – 1196 pp., Akad. Verlagsges, Leipzig.
- GKELIS, S., RAJANIEMI, P., VARDAKA, E., MOUSTAKA-GOUNI, M., LANARAS, T. & SIVONEN, K. (2005): *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. – *Microb. Ecol.* 49: 176–82.
- GORELOVA, O.A. & BAULINA, O.I. (2009): Ultrastructure of cyanobacterium *Nostoc* sp. f. *Blasia* cell forms in persisting populations. – *Microbiology* 78: 609–617.
- GUINDON, S. & GASCUEL, O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. – *Syst. Biol.* 52: 696–704.
- HALL, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- HILL, D.R., KEENAN, T.W., HELM, R.F., POTTS, M., CROWE, L.M. & CROWE J.H. (1997): Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. – *J. Appl. Phycol.* 9: 237–248.
- HIRAI, M., YAMAKAWA, R., NISHIO, J., YAMAJI, T., KASHINO, Y., KOIKE, H., SATOH, K. (2004): Deactivation of photosynthetic activities is triggered by loss of a small amount of water in a desiccation-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*. – *Plant Cell Physiol.* 45: 872–878.
- HROUZEK, P., VENTURA, S., LUKEŠOVÁ, A., MUGNAI, M.A., TURICCHIA, S. & KOMÁREK, J. (2005): Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and morphological variability. – *Algological Studies* 117: 251–264.
- KANTZ, T. & BOLD, H.C. (1969): *Phycological Studies. IX. Morphological and taxonomic investigations of Nostoc and Anabaena in culture.* University of Texas Publication no. 6924. – 67 pp., University of Texas Press, Austin.
- KERÄNEN, M., ARO, E. & TYYSTJÄRVI, E. (1999): Excitation-emission map as a tool in studies of photosynthetic pigment-protein complexes. – *Photosynthetica* 37: 225–237.
- KOMÁREK, J. (2010): Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. – *Hydrobiologia* 639: 231–243.
- KOMÁREK, J. & K. ANAGNOSTIDIS (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. Nostocales. – *Algological Studies* 56: 247–345.
- KUMAR, D. & MURTHY, S. (2007): Photoinhibition induced alterations in energy transfer process in phycobilisomes of PSII in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. – *J. Biochem. & Mol. Biol.* 40: 664–648.
- LEPÈRE, C., WILMOTTE, A. & MEYER, B. (2000): Molecular Diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S

- rDNA sequences. – Systematics and Geography of Plants 70: 275–283.
- MATEO, P., PERONA, E., BERRENDERO, E., LEGANÉS, F., MARTÍN, M. & GOLUBIĆ, S. Life cycle as stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. – FEMS Microbiol. Ecol. (in press)
- MEEKS, J.C. & ELHAI, J. (2002): Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. – Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 94–121.
- MILLIE, D.F., SCHOFIELD, O.M.E., KIRKPATRICK, G.J., JOHNSEN, G. & EVENS, T.J. (2002): Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgae. – Eur. J. Phycol. 37: 313–322.
- MOLLENHAUER, D. (1988): *Nostoc* species in the field. – Algological Studies 50–53: 315–326.
- MOLLENHAUER, D., BÜDEL, B. & MOLLENHAUER, R. (1994): Approaches to species delimitations in the genus *Nostoc* Vaucher 1803 ex Bornet et Flahault 1888. – Algological Studies 75: 189–209.
- NOVIS, P.M. & SMISSEN, R.D. (2006): Two genetic and ecological groups of *Nostoc commune* in Victoria Land, Antarctica, revealed by AFLP analysis. – Antarct. Sci. 18: 573–581.
- ONG, L.J. & GLAZER, A.N. (1988): Structural studies of phycobiliproteins in unicellular marine cyanobacteria. – In: STEVENS, S.E. Jr & BRYANT, D.A. (eds.): Light–Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models. – pp.102–121, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.
- PAPAEFTHIMIOU, D., HROUZEK, P., MUGNAI, M.A., LUKESOVA, A., TURICCHIA, S., RASMUSSEN, U. & VENTURA, S. (2008): Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 553–564.
- PEAT, A. & POTTS, M. (1987): The ultrastructure of immobilised desiccated cells of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. – FEMS Microbiol. Letters 43: 223–227.
- POTTS, M. (2000): Chapter 17: *Nostoc*. – In: WHITTON, B.A. & POTTS, M. (eds): The ecology of cyanobacteria. – pp.465–504. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- RAMÍREZ, M., HERNÁNDEZ–MARINÉ, M., NOVELO, E. & ROLDÁN, M. (2010): Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. – Biofouling 26: 399–409.
- RAJANIEMI, P., HROUZEK, P., KAŠTOVSKÁ, K., WILLAME, R., RANTALA, A., HOFFMANN, L., KOMÁREK, J. & SIVONEN, K. (2005): Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 11–26.
- ŘEHÁKOVÁ, K., JOHANSEN, J.R., CASAMATTA, D.A., XUESONG, L. & VINCENT, J. (2007): Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov. – Phycologia 46: 481–502.
- ROLDÁN, M., CLAVERO, E., CASTEL, S. & HERNÁNDEZ–MARINÉ, M. (2004a): Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. – Algological Studies 111: 127–143.
- ROLDÁN, M., THOMAS, F., CASTEL, S., QUESADA, A. & HERNÁNDEZ–MARINÉ, M. (2004b): Non invasive pigment identification in single-cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. – Appl. Environ. Microbiol. 70: 3745–3750.
- ROLDÁN, M., OLIVA, F., GONZÁLEZ del VALLE, M. A., SAIZ–JIMENEZ, C., & HERNÁNDEZ–MARINÉ, M. (2006): Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms?. – Appl. Environ. Microbiol. 72: 3026–3031.
- SAITOU, N. & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
- SAKAMOTO, T., YOSHIDA, T., ARIMA, H., HATANAKA, Y., TAKANI, Y. & TAMARU, Y. (2009). Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. – Phycological Research 57: 66–73.
- SATOH, K., HIRAI, M., NISHIO, J., YAMAJI, T., KASHINO, Y. & KOIKE, H. (2002): Recovery of Photosynthetic Systems during Rewetting is Quite Rapid in a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc commune*. – Plant Cell Physiol. 43: 170–176.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B.M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. – Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846–849.
- STACKEBRANDT, E. & EBERS, J. (2006): Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. – Microbiol. Today 33: 152–155.
- STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, R. & COHEN–BAZIRE, G. (1971): Purification and properties of unicellular blue–green algae (Order Chroococcales). – Bacteriol. Rev. 35: 171–205.
- STRASSER, R. J. & BUTLER, W.L. (1977): Fluorescence emission spectra of Photosystem I, Photosystem II and the light-harvesting chlorophyll a/b complex of higher plants. – Biochim. Biophys. Acta 462: 307–313.
- TAJIMA, F. & NEI, M. (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. – Mol. Biol. Evol. 1: 269–285.

- TAMARU, Y., TAKANI, Y., YOSHIDA, T. & SAKAMOTO, T. (2005): Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. – *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7327–7333.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. – *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. – *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- VENUGOPAL, V., PRASANNA, R., SOOD, A., JAISWAL, P. & KAUSHIK, B.D. (2006): Stimulation of pigment accumulation in *Anabaena azollae* strains: effect of light intensity and sugars. – *Folia Microbiol.* 51: 50–56.
- WAYNE, L.G., BRENNER, D.J., COLWELL, R.R., GRIMONT, P.A.D., KANDLER, O., KRICHEVSKY, M.I., MOORE, L.H., MOORE, W.E.C., MURRAY, R.G.E., STACKEBRANDT, E., STARR, M.P. & TRUPER, H.G. (1987): Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463–464.
- WEN, X., GONG, H. & LU, C. (2005): Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina maxima*. – *Plant Physiol. Biochem.* 43: 389–395.
- WOLF, E. & SCHÜSSLER, A. (2005): Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. – *Plant Cell Environ.* 28: 480–491.
- WRIGHT, D., PRICKETT, T., RICHARD, F., HELM, R.F. & POTTS, M. (2001): Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1839–1852.

---

© Czech Phycological Society (2011)

Received Sept 2010

Accepted Dec 2010

## 5. Discusión

En esta memoria se caracterizan los organismos y los biofilms que se desarrollan en monumentos arqueológicos mayas, haciendo uso de diferentes técnicas complementarias de microscopía: óptica, confocal (CSLM), electrónica de transmisión (TEM), electrónica de barrido (SEM) y aplicaciones complementarias: electrones retrodifundidos (BSE), microanálisis de energía dispersa (EDS) y difracción de rayos X (XRD). También se han aplicado técnicas de extracción de DNA, PCR y análisis filogenético.

Los análisis de los elementos del sustrato realizados mediante EDS en las zonas arqueológicas estudiadas; Palenque, Bonampak y Yaxchilán (Chiapas), mostraron los mismos elementos, principalmente calcio, magnesio y sílice. Sin embargo, la diferencia se observó en las proporciones de estos elementos. En Palenque y Bonampak las proporciones de calcio y magnesio corresponden a dolomitas, mientras que en Yaxchilán la ausencia de magnesio indica calcitas. La técnica XRD lo corroboró (Ramírez *et al.* en preparación).

Esta composición concuerda con la de la mayoría de los edificios mayas del sureste mexicano, en que han sido empleadas las calizas como elemento constructivo y en la preparación del mortero y del estuco (Hohmann-Vogrin 2001; McNamara *et al.* 2003). Las calizas y dolomitas son rocas sedimentarias. Las calizas están compuestas mayoritariamente por carbonato cálcico y las dolomitas contienen carbonato de calcio y una proporción de magnesio. Este tipo de roca es altamente porosa y puede presentar una elevada disolución (Pettijohn 1975). En el área maya de Chiapas, la presencia de

dolomitas y calcitas microcristalinas, enriquecidas con magnesio, provienen de una plataforma carbonatada marina. Debido a esto, los materiales se conservan mejor en esta área de la región maya que en otras zonas arqueológicas, como Calakmul (Campeche), donde las estelas hechas de elementos calcáreos, que no son ricos en magnesio, están más deterioradas (UNAM-INAH 2011). Yaxchilan fué construido con calizas carentes de magnesio, procedentes de una cantera distinta a las de Palenque y Bonampak.

La superficie de las rocas es un hábitat terrestre extremo cuyos pobladores se encuentran sometidos a temperaturas variables, irregularidad en el abastecimiento de agua y en la disponibilidad de compuestos orgánicos e inorgánicos y, variable radiación solar (Kapusta & Kovacik 2000; Rindi & Guiri 2003; Uher *et al.* 2005; Gorbushina & Broughton 2009). Por ello, las condiciones subaéreas no suelen ser favorables para el crecimiento de muchos de estos organismos. En hábitats extremos se han identificado adaptaciones especiales y/o han desarrollado ciertas características específicas, tanto morfológicas como fisiológicas, así como mecanismos de resistencia (Nurul 1972; Kumar & Kumar 1999; Walker & Pace 2007).

Tanto en las superficies de roca como colonizando sustratos artificiales los organismos se agrupan formando biofilms. En su mayoría están compuestos por diversos grupos de microorganismos que se entremezclan, dependiendo de las condiciones ambientales (Büdel 1999). Algunos de los biofilms, especialmente los que se encuentran en ambientes extremos, pueden estar formados por una única especie (Potts 2000). Las cianobacterias y las algas aerofíticas son importantes componentes de los biofilms fotosintéticos y se

encuentran en casi todas las condiciones terrestres, siempre que haya una fuente de iluminación. El proceso también depende de la bioreceptividad del substrato (Guillitte 1995), favoreciendo o evitando el desarrollo de los microorganismos y de la capacidad de colonización de los propios organismos, directamente sobre la roca o aprovechando la presencia o el efecto de colonizadores previos (Miller *et al.* 2009).

Los microorganismos fotosintéticos (microalgas, cianobacterias, líquenes, etc.) pueden desarrollarse en superficies de piedra, incluso en ausencia de materia orgánica, colonizando más fácilmente las superficies porosas. Estos organismos juegan un rol importante como organismos pioneros en la colonización de materiales pétreos y otras superficies expuestas (Ortega-Calvo *et al.* 1991; Tiano *et al.* 1995; Lamenti *et al.*; 2000; Tomaselli *et al.* 2000; Bellinzoni *et al.* 2003; Miller *et al.* 2009; Warscheid & Braams 2000; Crispim & Gaylarde 2005; Gorbushina 2007).

En el caso de los monumentos mayas, la principal variable climatológica, que actúa sobre los edificios y organismos, es la alternancia de una época seca con otra lluviosa. Esta característica climatológica define una secuencia de crecimiento de los microorganismos y el desarrollo de los biofilms y, puede considerarse un factor de estrés sobre los organismos que necesitan adaptarse y resistir en la época seca.

#### *Biofilms fotosintéticos*

En Palenque y Bonampak se encuentran los mismos organismos: *Trentepohlia aurea*, *Scytonema guyanense* y *Nostoc cf. commune* y

las chroococcales *Aphanothece castagnei*, *Asterocapsa divina*, *Gloeocapsa calcicola*, *G. quaternata* y *Gloeothece palea*. En Yaxchilán se encuentran *Chroococidiopsis* sp. y *Leptolyngbya* sp.

*Nostoc* cf. *commune*, *Chroococidiopsis* sp., *Gloeothece* sp. *Leptolyngbya* spp. y *Cyanothece* sp. fueron confirmadas mediante extracción de DNA, amplificación de PCR y análisis de las secuencias (Ramírez *et al.* en preparación).

Las especies dominantes en los biofilms presentan distintas estrategias para mantenerse durante la época seca.

En la época de lluvias, las poblaciones de *T. aurea* forman zoósporas móviles, que favorecen la dispersión a nuevos espacios y la formación de nuevos biofilms (Rindi & Guiry 2002). Las formas procedentes de reproducción sexual sobreviven durante la época seca, protegidas por los restos de los biofilms desarrollados durante la época lluviosa.

Las adaptaciones de *N.* cf. *commune* representan un caso extremo. Incrementan el tamaño de algunas células y reducen su número, sacrificando un gran número de ellas para aumentar las posibilidades de supervivencia. Otras estrategias son la formación de gruesas vainas y la producción de ficoeritrina. La elaboración de ficoeritrina representa un elevado coste proteico para la célula, pero sirve de protección contra el exceso de luz (Ramírez *et al.* 2010).

La producción de vainas gruesas como defensa contra la desecación también se presenta en las chroococcales (Grilli-Caiola *et al.* 1996). En el caso de *A. divina* los cambios en las vainas incluyen ornamentaciones y cambios en la coloración.

Los resultados de CSLM y de SEM revelaron que la mayoría de los microorganismos que constituyen los biofilms son epilíticos, creciendo sobre las superficies. Solo algunos grupos, como las chroococcales presentaron crecimiento casmoendolítico, es decir, crecieron dentro de los poros y las grietas del sustrato (Golubic *et al.* 1981; Büdel *et al.* 2009; Ramírez *et al.* 2010). No se han identificado microorganismos endolíticos, capaces de penetrar en el sustrato de manera activa.

En los biofilms la presencia de EPS, permite al conjunto actuar como una forma de crecimiento protegido (Costerton *et al.* 1987). Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) precondicionan las superficies para facilitar la colonización (Roldán *et al.* 2004a). Mediante CSLM se observó que todos los biofilms fotosintéticos estudiados se caracterizaban por la producción de una matriz de EPS, en la que muchas de las células de cianobacterias mostraron capas múltiples. Las formas de resistencia de los propios organismos formadores del biofilm también aprovechan la protección del biofilm, como en el caso de los propágulos de *S. guyanense*. La formación de la matriz de EPS permite a otros microorganismos, que carecen de vaina, unirse al conjunto de manera directa (Rindi & Guiry 2003; Gorbushina 2007). También los EPS pueden incrementar la degradación del sustrato, interactuando químicamente con los minerales y conducir a su disolución (Ortega-Morales *et al.* 1999, 2000). Debido a la alternancia de la época lluviosa y seca y la elevada irradiancia en los ambientes estudiados, los EPS son determinantes, ya que permiten a los microorganismos estar protegidos de la radiación solar y de otros factores de estrés como la



deseccación, fluctuaciones de temperatura y la falta de nutrientes (Ramírez *et al.* 2010, 2011) y facilitan la rehidratación.

En las zonas arqueológicas estudiadas existen tres situaciones distintas con respecto a la conservación del sustrato, relacionado con el desarrollo de los biofilms y con las estrategias de mantenimiento de los monumentos.

En Bonampak se encuentran biofilms con un desarrollo exuberante, la influencia antropogénica es mínima debido al alejamiento de sitios habitados y a la dificultad de acceso, lo que se traduce en escasa afluencia turística. El sustrato está relativamente bien conservado y las intervenciones han sido muy escasas. En esta zona, las especies dominantes que constituyen los biofilms son *S. guyanense* y *N. cf. commune*. Se considera que estos biofilms actúan como protectores contra el intemperismo y la colonización de otros agentes (Kulik 1995). Palenque es una zona con características abióticas similares a Bonampak y la misma composición de especies, pero el crecimiento de los biofilms es menos exuberante. Esto es debido a la limpieza habitual y a las intervenciones químicas para eliminar los biofilms. En algunos de los edificios más importantes de Palenque y con mayor afluencia turística se utilizaron los biocidas formol y una mezcla de diuron y bromacil (P. Torres Soria, restaurador, comunicación personal) para frenar el deterioro. Sin embargo, se ha detectado crecimiento casmoendolítico y el sustrato aparece notablemente deteriorado (fisuras, grietas, etc.). Por último, en Yaxchilán se observa un desarrollo desequilibrado con la presencia de dos especies, *Chroococidiopsis* sp. y *Leptolyngbya* sp., atribuible a que el sustrato de esta zona es muy pobre en nutrientes y el

tamaño de poro de sustrato es demasiado grande para que el agua quede retenida. Esto ha ocasionado que únicamente estas especies resilientes sean capaces de crecer en este ambiente poco favorable. En esta zona se observa gran deterioro del sustrato, atribuible sobre todo a la intensidad de lluvias.

#### *Biodeterioro en la superficies arqueológicas mayas*

El conocimiento de la diversidad de los biofilms fotosintéticos en condiciones reales y sus estrategias de adaptación debería permitir la predicción del potencial de biodeterioración, así como los cambios de las características del sustrato causados por la presencia de estos biofilms. La mayoría de los daños en la piedra en zonas tropicales se deben principalmente a las constantes lluvias que provocan que las sales sean disueltas y se presente una acelerada erosión de los minerales (Riederer, 1984). Los biofilms estudiados mostraron una afinidad por los sustratos más porosos (Ramírez *et al.* en preparación), y las superficies más húmedas.

En Palenque y Bonampak los biofilms de *S. guyanense*, *N. cf. commune* y *T. aurea* son superficiales, mientras que las cianobacterias cocoides *G. calcicola*, *G. quaternata*, *Gl. palea*, *Chroococidiopsis* sp. y filamentos de *Leptolyngbya* sp. se encontraron adheridos estrechamente a las partículas del sustrato y también, en algunos casos dentro de poros y grietas. La hidratación y retracción intermitente de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) debido a la presencia de cianobacterias, formando finas capas debajo de la superficie, favorecen la separación y desprendimiento de

los estratos superficiales (Ramírez *et al.* 2010), y contribuyen al deterioro de los monumentos.

Los biofilms dominados por *Scytonema guyanense* forman biofilms gruesos y crecen superficialmente en el sustrato durante la época lluviosa. Durante el periodo seco se encuentran en forma de costras adheridas fuertemente al sustrato. El color oscuro o negro puede atribuirse a la presencia de escitonemina, formada como protección frente a las radiaciones UV (García-Pichel & Castenholz, 1991). Cabe resaltar la función de protección que ejercen estos biofilms sobre el sustrato, reduciendo la permeabilidad y la infiltración de agua hacia el interior y evitando el intemperismo (García-Valles *et al.* 1996; Ramírez *et al.* 2010).

Las especies presentes en Yaxchilán, *Chroococcidiopsis* sp. y *Leptolyngbya* sp., se refugian en los poros y grietas del sustrato. Ambas son consideradas de elevado potencial de biodeterioración (Büdel *et al.* 2004). La condición casmoendolítica de *Chroococcidiopsis* sp. podría favorecer la acidificación del sustrato y estar asociado a su desprendimiento y/o a la exfoliación de las superficies colonizadas (Büdel *et al.* 2004).

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos durante este trabajo han dado lugar a las siguientes conclusiones generales

Los conjuntos arqueológicos mayas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México) se encuentran situados en la zona tropical presentando temperatura y humedad relativa elevadas; la principal variable climatológica es la alternancia de una época seca con otra lluviosa.

Se han estudiado los microorganismos fotosintéticos de los conjuntos arqueológicos mayas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México), los biofilms que forman, y su interacción con las superficies colonizadas.

Las diferentes técnicas de microscopía empleadas y aplicaciones complementarias han permitido analizar la composición química del sustrato, examinar las superficies colonizadas, evaluar la penetración de los microorganismos fotosintéticos en los sustratos y describir la estructura de los principales biofilms.

Las tres zonas arqueológicas –Palenque, Yaxchilán y Bonampak- son diferentes en cuanto a materiales empleados en la construcción, bioreceptividad y factores ambientales. Todos ellos están relacionados con la colonización de los microorganismos fotosintéticos.

Los análisis químicos del sustrato realizados mediante EDS y XRD en las zonas arqueológicas estudiadas Palenque, Bonampak y Yaxchilán (Chiapas) mostraron los mismos elementos, principalmente calcio, magnesio y sílice. En Palenque y Bonampak los análisis EDS

revelaron la composición de calcio y magnesio y XRD confirmó la presencia de dolomita. En cambio, en Yaxchilán se identificó calcita.

El biodeterioro en monumentos arqueológicos es producto de varios eventos combinados que favorecen el desarrollo de biofilms. La caliza es un material poroso que tiende a la disgregación. Las algas y cianobacterias incorporan parte de este material en su metabolismo y en consecuencia se favorece la formación de fisuras o desprendimiento del sustrato.

Se han encontrado microorganismos fotosintéticos formando biofilms en todos los sitios muestreados. Se desarrollan epilítica o casmoendolíticamente en el interior de las grietas y fisuras.

En Palenque y Bonampak se identificaron los mismos organismos, *Trentepohlia aurea*, *Scytonema guyanense* y *Nostoc* cf. *commune* y las chroococcales *Aphanothece castagnei*, *Asterocapsa divina*, *Gloeocapsa calcicola*, *G. quaternata* y *Gloeothece palea*, su abundancia relativa variaba dependiendo de las características locales. En Yaxchilán se encuentran *Chroococciopsis* sp. y *Leptolyngbya* sp.

*N.* cf. *commune*, *Chroococciopsis* sp., *Gloeothece* sp. y *Leptolyngbya* spp. fueron confirmadas mediante extracción de DNA, amplificación de PCR y análisis de las secuencias. *Cyanothece* sp. no fué identificado en la observación microscópica. Los restantes microorganismos fototróficos no coinciden con las identificaciones mediante técnicas moleculares.

Las especies de cianobacterias y algas presentan un patrón de desarrollo relacionado con la radiación solar, las condiciones ambientales y el tipo de sustrato colonizado.

Los fuertes cambios estacionales determinan la apariencia general, la distribución de los biofilms y la abundancia relativa de cada organismo. En Palenque, en los sitios expuestos a la luz directa y fuertes lluvias, *S. guyanense* y *T. aurea* son las especies dominantes, aunque *T. aurea* prefiere sitios con menor insolación que *S. guyanense*. En los sitios relativamente más protegidos se encuentra *A. divina* y otras chroococcales. En Bonampak la especie dominante es *N. cf. commune*. En Yaxchilán se desarrollan *Chroococciopsis* sp. y *Leptolyngbya* spp.

La observación mediante SEM y CSLM, mostró la localización de los organismos y su distribución en profundidad. *T. aurea*, *S. guyanense* y *N. cf. commune* crecían epilíticamente. Las cianobacterias cocales estaban irregularmente distribuidas bajo la cobertura de los biofilms. En áreas descubiertas penetraban en el interior del sustrato, formando capas a profundidades no superiores a 2 mm. Se puso de manifiesto el crecimiento casmoendolítico de cianobacterias cocales en varios puntos de muestreo de Palenque y Yaxchilán, ocupando el interior de grietas y fisuras.

Las estrategias de supervivencia durante la época desfavorable son distintas. En la época de lluvias las poblaciones de *T. aurea* forman zoósporas móviles que favorecen la dispersión a nuevos espacios y la formación biofilms. Las formas procedentes de reproducción sexual sobreviven durante la época seca.

Los biofilms dominados por *S. guyanense* se benefician de los periodos de hidratación formando biofilms gruesos que dan lugar a costras adheridas al sustrato durante la época seca, que contribuyen

a la protección de propágulos (células individuales con gruesas vainas y acinetos) que resistirán la época desfavorable.

*N. cf. commune* varía en apariencia de manera alternada, dependiendo de la pluviosidad. Su ciclo de vida consta de cuatro etapas; dos de desarrollo estacional: a) etapa de crecimiento durante la estación húmeda y b) etapa de latencia durante la estación seca. Y dos etapas de transición: c) preparación para la estación seca y d) rehidratación y recuperación

La identificación subcelular de los pigmentos fotosintéticos mostró variabilidad a lo largo del año. La intensidad de fluorescencia de la clorofila *a*, ficocianina, y aloficocianina era menor en la época seca, comparada con la época húmeda. Ninguna cianobacteria presentaba ficoeritrina, excepto *N. cf. commune*, en un sitio, en la época seca, lo que se considera una estrategia de adaptación frente a los efectos perjudiciales de la radiación.

Los biofilms estudiados afectan negativamente a la estética, por formar pátinas de coloración variable, dependiendo del tipo de microorganismo que las producía y de las condiciones ambientales.

La evaluación de otros daños atribuidos específicamente a los biofilms fotosintéticos puede ser motivo de controversia, ya que gran parte del deterioro de las rocas en las zonas arqueológicas de regiones tropicales se produce sinérgicamente con otros factores físicos y químicos. En algunas situaciones, los biofilms pueden contribuir a la conservación de la roca. Los biofilms formados por *S. guyanense* actuaban como una estructura de protección del sustrato ya que evitaban la erosión de la roca debida a la lluvia. En la época

seca se observaba un desprendimiento espontáneo de los biofilms, permitiendo la sucesión a biofilms formados por *N. cf. commune*.

Es factible realizar una estrategia para el control de los biofilms basada en el monitoreo y evaluación de las épocas de desarrollo algal y de los tipos de estructuras de resistencia asociadas a los ciclos de desarrollo. En el caso de *T. aurea*, en Palenque y Bonampak, es menos agresivo realizar la limpieza de las pátinas coincidiendo con el inicio y final de la época lluviosa, debido a que es más fácil el desprendimiento y sus estructuras reproductoras no están todavía desarrolladas. En la estación seca se encuentran fuertemente adheridas al sustrato.

En Yaxchilán el tratamiento es muy difícil, ya que los microorganismos fotosintéticos penetran profundamente en la piedra y no es factible la limpieza mecánica, debido a la pérdida de sustrato por arrastre.

En las zonas arqueológicas estudiadas tenemos tres situaciones distintas con respecto al desarrollo de los biofilms y, por tanto, el nivel de deterioro. En Bonampak, zona prácticamente sin intervenciones, se encuentran biofilms con un desarrollo exuberante, ya que la influencia antropogénica es mínima debido al alejamiento de sitios habitados y a la dificultad de acceso, lo que se traduce en escasa afluencia turística. Sin embargo, el sustrato está relativamente bien conservado. En esta zona, las especies que constituyen los biofilms son *S. guyanense* y *N. cf. commune*. Dichos biofilms actúan como protectores contra el intemperismo y la colonización de otros agentes. Palenque es una zona con características abióticas similares a Bonampak y la misma



composición de especies, pero el crecimiento de los biofilms es menos exuberante. Esto es debido a la limpieza habitual y otras intervenciones realizadas en alguno de los edificios, para frenar el deterioro, ya que se trata de uno de los monumentos más importantes de la zona y con mayor afluencia turística. Sin embargo, se ha detectado crecimiento casmoendolítico y el sustrato aparece notablemente deteriorado (fisuras, grietas, etc.). Por último, en Yaxchilán, cuyo sustrato es poco favorable para el crecimiento, sólo se desarrollan dos especies resilientes, *Chroococidiopsis* sp. y *Leptolyngbya* spp. En esta zona observamos gran deterioro del sustrato atribuible sobre todo a la intensidad de lluvias.

Las acciones de limpieza en estas zonas arqueológicas sin un estudio previo de los biofilms presentes y las especies dominantes en el sustrato son demasiado costosas y poco duraderas en el tiempo, provocando un deterioro adicional de dichos monumentos. La realización de un enfoque polifásico de cada una de las zonas estudiadas, que permita conocer las especies presentes, el ciclo de vida y sus estrategias de supervivencia, permitirá realizar un programa de control a medida para cada zona de estudio y paliar el biodeterioro de forma más efectiva que la actual y reduciendo los costos económicos.

## 7. Referencias

- Abdelahad N. & Bazzichelli G. (1989): Ultrastructure and development of "coccoid cells" of *Nostoc commune* (Cyanophyta). Br. Phycol. J. 24:217-222.
- Abe K., Mihara H. & Hirano M. (1998): Characteristics of growth and carotenoid accumulation of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* in liquid culture. J. Mar. Biotechnol. 6:53-58.
- Aboal M., Asencio A.D. & López-Jiménez E. (2003): Morphological, ultrastructural and ecological study of *Asterocapsa divina* Komárek (Chroococcaceae, Cyanobacteria) from a cave of Southeastern Spain. Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud 109:57-65.
- Albertano P. & Kovacik L. (1996): Light and temperature responses of terrestrial sciaphilous strains of *Leptolyngbya* sp. in cross-gradient cultures. Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud. 83:17-28.
- Allsopp D., Seal K. & Gaylarde C. (2004): Introduction to Biodeterioration. Cambridge. New York, U.S.A. 237 pp.
- Aráoz R. & Häder D.P. (1999): Phycoerythrin synthesis is induced by solar UV-B in the cyanobacterium *Nostoc*. Plant Physiol. Biochem. 37:223-229.
- Ariño X., Ortega-Calvo J.J., Gómez-Bolea A. & Saiz-Jimenez C. (1995): Lichen colonization of the Roman pavement at Baelo Claudia (Cadiz, Spain): biodeterioration vs. bioprotection. Sci. Total Environ. 167:353-363.
- Barberousse H., Lombardo R.J., Tell G. & Couté A. (2006): Factors involved in the colonisation of building façades by algae and cyanobacteria in France. Biofouling 22:69-77.
- Beech I.B., Sunner J.A. & Hiraoka K. (2005): Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. Int. Microbiol. 8:157-168.

- Bell R.A. (1993): Cryptoendolithic algae of hot semiarid lands and deserts. *J. Phycol.* 29:133-139.
- Bellinzoni A.M., Caneva G. & Ricci S. (2003): Ecological trends in travertine colonisation by pioneer algae and plant communities. *Int. Biodeter. Biodegr.* 51:203-210.
- Berrendero E., Perona E. & Mateo P. (2008): Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:447-460.
- Billi D. & Potts M. (2002): Life and death of dried prokaryotes. *Research in Microbiology* 153:7-12.
- Bordowitz J.R. & Montgomery B.L. (2010): Exploiting the autofluorescent properties of photosynthetic pigments for analysis of pigmentation and morphology in live *Fremyella diplosiphon* cells. *Sensors* 10:6969-6979.
- Boyer S.L., Flechtner V.R. & Johansen J.R. (2001): Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 18:1057-1069.
- Büdel B. (1999): Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. *Eur. J. Phycol.* 34:361-370.
- Büdel B., Weber B., Köhl M., Pfanz H., Sültemeyer D. & Wessels D. (2004): Reshaping of sandstone surfaces by cryptoendolithic cyanobacteria: bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes. *Geobiology* 2:261-268.
- Büdel B., Bendix J., Bicker F.R. & Green T.G.A.J. (2008): Dewfall as a water source frequently activates the endolithic cyanobacterial communities in the granites of Taylor Valley, Antarctica. *J. Phycol.* 44:1415-1424.
- Büdel B., Darienko T., Deutschewitz K., Dojani S., Friedl, T., Mohr K.I., Salisch M., Reisser W. & Weber B. (2009): Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in

- Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microb. Ecol.* 57:229-247.
- Buj O. & Gisbert J. (2010): Influence of pure morphology on the durability of sedimentary building stones from Aragon (Spain) subjected to standard salt decay tests. *Environ. Earth Sci.* 61:1327-1336.
- Cámara B., De los Ríos A., García-del-Cura M.A., Galván V. & Ascaso C. (2008). Dolostone bioreceptivity to fungal colonization. *Materiales de Construcción.* 58:113-124.
- Caneva G., Nugari M.P. and Salvadori O. (1991): *Biology in the Conservation of Works of Art.* ICCROM. Rome, Italy. 182 pp.
- Caneva G., Salvadori O., Ricci S. & Ceschin S. (2005): Ecological analysis and biodeterioration processes over time at the hieroglyphic stairway in the Copán (Honduras) Archaeological Site. *Plant Biosyst.* 139:295-310.
- Cappitelli F., Abbruscato P., Foladori P., Zanardini E., Ranalli G., Principi P., Villa F., Polo A. & Sorlini C. (2009): Detection and Elimination of Cyanobacteria from Frescoes: The Case of the St. Brizio Chapel (Orvieto Cathedral, Italy). *Microb. Ecol.* 57:633-639.
- Castenholz R.W. & Garcia-Pichel F. (2000): Cyanobacterial responses to UV-radiation. In: Whitton B.A. & Potts M. (Eds.). *The ecology of cyanobacteria.* Kluwer Academic Publisher, Netherlands pp. 591-611.
- Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey K.G., Ladd P.I., Nickel J.C., Dasgupta M. & Marrie T.J. (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-64.
- Cooksey K.E. (1992). Bacterial and algal interactions in biofilms. In: Melo L.F., Bott T.R., Fletcher M. & Capdeville B. (Eds). *Biofilms- Science and Technology.* Kluwer Academic Press. Netherlands. 163-173 pp.

- Crispim C.A., Gaylarde P.M. & Gaylarde C.C. (2003). Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Curr. Microbiol.* 46:79-82.
- Crispim C.A. & Gaylarde C.C. (2005): Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microb. Ecol.* 49:1-9.
- Danin A. & Caneva G. (1990): Deterioration of limestone walls in Jerusalem and marble monuments in Rome caused by cyanobacteria and cyanophilous lichens. *Int. Biodeterior.* 26:397-417.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W. & Greenberg E.P. (1998): The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science.* 280:295-298.
- Davis K.J. & Lüttge A. (2005): Quantifying the relationship between microbial attachment and mineral surface dynamics using vertical scanning interferometry (VSI). *Am J Sci.* 305:727-751.
- Decho A.W. (2000): Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. *Cont Shelf Res.* 20:1257-1273.
- De Los Ríos, A., Wierzchos, J., Ascaso, C. (2002): Microhabitats and chemical microenvironments under saxicolous lichens growing on granite. *Microbial. Ecol.* 43:181-188.
- De Los Ríos, A., Galván, V., Ascaso, C. (2004): In situ microscopical diagnosis of biodeterioration processes at the convent of Santa Cruz la Real, Segovia, Spain. *Int. J. Biodet. Biodegr.* 54:113-120.
- De Los Ríos A. & Ascaso C. (2005): Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration. *Int. Microbiol.* 8:181-188.
- Di Bonaventura M.P., Del Gallo M., Cacchio P., Ercole C. & Lepidi A. (1999): Microbial formation of oxalate films on monument surfaces: Bioprotection or biodeterioration?. *Geomicrobiol. J.* 16:55-64.

- Di Pipo F., Bohn A., Congestri R., De Philippis R. & Albertano P. (2009): Capsular polysaccharides of cultured phototrophic biofilms. *Biofouling* 25:495-504.
- Dodds W.K., Gudder D.A. & Mollenhauer D. (1995): The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.* 31:2-18.
- Doehne E. & Price C. (2010): Stone conservation: An overview of current research. *Research in Conservation*, Getty Conservation Institute. Los Angeles, California. 160 pp.
- Ettl H. & Gärtner G. (1995). *Syllabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 721 pp.
- Edwards U., Rogall T., Blockerl H., Emde M. & Bottger E.C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* 17:7843-7853.
- Ehling-Schulz M., Bilger W. & Scherer S. (1997): UVB induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* 179:1940-1945.
- Fernandes P. (2006): Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:291-296.
- Fleming E.D. & Castenholz R.W. (2007): Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 9:1448-1455.
- Flores A. & Herrero A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:39-50.
- Fremy P. (1930): *Les Myxophycées de l'Afrique Equatoriale Française*. *Arch. Bot. Caen. Mem.* 3. 508 pp.
- Fukuda S., Yamakawa R., Manabu H., Yasuhiro K., Koike H. & Satoh K. (2008): Mechanisms to avoid photoinhibition in a desiccation-

tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. Plant. Cell. Physiol. 49:488-492.

García-Pichel F. & Castenholz R.W. (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. J. Phycol. 27:395-409.

García-Pichel F. & Belnap J. (1996): Microenvironments and microscale productivity of cyanobacterial desert crust. J. Phycol. 32:774-782.

García-Valles M., Vendrell-Saz M., Molera J. & Blázquez F. (1998): Interaction of rock and atmosphere: patinas on Mediterranean monuments. Environ. Geol. 36:137-149.

Gaylarde P.M., Gaylarde C.C., Guimet P., Gomez de Saravia S. & Videla H. (2001): Biodeterioration of mayan buildings at Uxmal and Tulum, Mexico. Biofouling 17:41-45.

Gaylarde P.M., Englert G., Ortega-Morales B.O. & Gaylarde C.C. (2006): Lichen-like colonies of pure *Trentepohlia* on limestone monuments. Int. Biodet. Biodegr. 58:119-123.

Geitler L. (1932): Cyanophyceae. In: Rabenhorst's Kryptogamenflora, 14. Akad. Verlagsges, Leipzig. 1196 pp.

Gkelis S., Rajaniemi P., Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Lanaras T. & Sivonen K. (2005): *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. Microb. Ecol. 49:176-82.

Golubic S., Friedmann E.I., & Schneider J. (1981): The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms. J Sedim. Petrol. 51:475-478.

Gorbushina A.A. (2007): Life on the rocks. Environ. Microbiol. 9:1613-1631.

Gorbushina A.A. & Krumbein W.E. (2000): Subaerial microbial mats and their effects on soil and rock. In: Riding R.E. & Awramik S.M. (Eds.). Microbial sediments, Springer Verlag, Berlin, Germany, pp 161-170.

- Gorbushina A.A. & Broughton W.J. (2009): Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:431-450.
- Gorelova O.A. & Baulina O.I. (2009): Ultrastructure of cyanobacterium *Nostoc* sp. f. *Blasia* cell forms in persisting populations. *Microbiology* 78:609-617.
- Grilli-Caiola M., Billi D. & Friedmann E.I. (1996) Effect of desiccation on envelopes of the cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. (Chroococcales). *Eur. J. Phycol.* 31:97-105.
- Guillitte O. (1995): Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci. Total. Environ.* 167:215-220.
- Guindon S. & Gascuel O. (2003): A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biology.* 52: 696-704.
- Gupta S. & Agrawal S.C. (2004): Vegetative survival and reproduction under submerged and air-exposed conditions and vegetative survival as affected by salts, pesticides and metals in aerial green alga *Trentepohlia aurea*. *Folia Microbiol.* 49:37-40.
- Hall T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Häubner N., Schumann R. & Karsten U. (2006): Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on Facades-Response to temperature and water Stress. *Microb Ecol* 51:285-293.
- Hernández-Mariné M., Roldán M., Clavero E., Canals A. & Ariño X. (2001): Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Puigmolto sinkhole. *Nova Hedwigia* 123:235-251.
- Hernández-Mariné M., Clavero E. & Roldán M. (2003): Why there is such luxurious growth in the hypogean environments. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 109:229-239.



- Hill D.R., Keenan T.W., Helm R.F., Potts M., Crowe L.M. & Crowe J.H. (1997): Extracellular polysaccharide of *Nostoc commune* (Cyanobacteria) inhibits fusion of membrane vesicles during desiccation. *J. Appl. Phycol.* 9:237-248.
- Hirai M., Yamakawa R., Nishio J., Yamaji T., Kashino Y., Koike H. & Satoh K. (2004): Deactivation of photosynthetic activities is triggered by loss of a small amount of water in a desiccation-tolerant cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant. Cell. Physiol.* 45:872-878.
- Hohmann-Vogrin A. (2001): Unidad de Espacio y Tiempo: La Arquitectura Maya. In: E. Eggebricht & M. Seidel (Eds). *Los Mayas: Una civilización milenaria*. 191 pp.
- Hoppert M., Flies C., Pohl W, Günzl B. & Schneider J. (2004): Colonization strategies of lithobiontic microorganisms on carbonate rocks. *Environ Geol* 46:421-428.
- Horat T., Neu T.R. & Bachofen R. (2006): An endolithic microbial community in dolomite rock in Central Switzerland: Characterization by reflection spectroscopy, pigments analyses, scanning electron microscopy, and laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.* 51:353-364.
- Howland L.J. (1929): The moisture relations of terrestrial algae. IV. Periodic observations of *Trentepohlia aurea* Martius. *Ann Bot* 43:174-202.
- Hrouzek P., Ventura S., Lukešová A., Mugnai M.A., Turicchia S. & Komárek J. (2005): Diversity of soil *Nostoc* strains: phylogenetic and morphological variability. *Algol. Studies* 117:251-264.
- Hueck-van der Plas E.H. (1965). The biodeterioration of materials as a part of hylobiology. *Mater. Organismen.* 1:5-34.
- Hueck-van der Plas E.H. (1968). The microbiological deterioration of porous building materials. *Int. Biodet. Bull.* 4:11-28.
- Jones M.V. (1995). Fungal biofilms; eradication of a common problema. In: Wimpenny J., Handley P., Gilbert P. & Lappin-Scott

- H.M. (Eds). The Life and Death of Biofilm. Cardiff: Bioline, 157-160 pp.
- Kantz T. & Bold H.C. (1969): Phycological Studies. IX. Morphological and taxonomic investigations of *Nostoc* and *Anabaena* in culture. University of Texas Publication no. 6924. University of Texas Press, Austin.
- Kapusta M. & Kováčik, L. (2000): Epilithic phyco-flora on the selected antropogenic objects in Bratislava (Slovakia). Bull. Slov. Bot. Spolocn. 22:15-22.
- Keränen M., Aro E. & Tyystjärvi E. (1999): Excitation-emission map as a tool in studies of photosynthetic pigment-protein complexes. Photosynthetica 37:225-237.
- Komárek J. (1993): Validation of the genera *Gloeocapsopsis* and *Asterocapsa* (Cyanoprocarvota) with regard to species from Japan, Mexico and Himalayas. Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, Ser. B, 19:19-37.
- Komárek J. (2010): Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. Hydrobiol. 639:231-243.
- Komárek J. & Anagnostidis K. (1999): Cyanoprokaryota 1. Chroococcales. In: Ettl H, Gärtner G, Heynig H, Mollenhauer E (Eds). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 19(1), Gustav Fisher, Jena, Germany, pp 1-548.
- Komárek J. & K. Anagnostidis (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. Nostocales. Arch. Hydrobiol. 82 / Algol. Stud. 56:247-345.
- Korber D.R., James G.A. & Costerton J.W. (1994): Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 60:1663-1669.
- Krumbein W.E. (1972): Role des microorganismes dans la genese, la diagènes et la degradation des roches en place. Rev. Ecol. Biol. Sol. 9:283-319.

- Krumbein W.E., Urzì C.E. & Gehrmannc C. (1991): Biocorrosion and biodeterioration of antique and medieval glass. *Geomicrobiol. J.* 9:139-160
- Kulik M.M. (1995): The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *Eur. J. Plant. Pathol.* 101:585-599.º
- Kumar R. & Kumar A.V. (1999) Biodeterioration of stone in tropical environments. *Research in Conservation, Getty Conservation Institute, Los Angeles.* 88 pp.
- Kumar D. & Murthy S. (2007): Photoinhibition induced alterations in energy transfer process in phycobilisomes of PSII in the cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40:664-648.
- Lamenti G., Tiano P. & Tomaselli L. (2000): Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *J. Appl. Phycol.* 12:427-433.
- Lepère C., Wilmotte A. & Meyer B. (2000): Molecular Diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Syst. Geog. Plants.* 70:275-283.
- López R.E. (1993): *Geología general y de México.* Ed. Trillas. México, D.F. 288 pp.
- Maillard J.Y. (2002): Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 92:16S-27S.
- Mansch R. & Bock E. (1998). Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation.* 9:47-64.
- Marsh P.D. (1995): Dental plaque. In: Lapin-Scott H.M. & Costerton J.W. (Eds). *Microbial biofilms.* Cambridge University Press. New York. 282-300 pp.
- Mateo P., Perona E., Berrendero E., Leganés F., Martín M. & Golubić S. (2011): Life cycle as stable trait in the evaluation of diversity of *Nostoc* from biofilms in rivers. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:185-198.

- McNamara C.J., Perry T.D. & Zinn M. (2003): Microbial processes in the deterioration of Mayan archaeological buildings in southern Mexico. In: Koestler R.J., Koestler V.H., Charola A.E. & Nieto-Fernandez F.E. (Eds). Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. New York, NY: The Metropolitan Museum of Art.
- McNamara C.J. & Mitchell R. (2005): Microbial deterioration of historic stone. *Front. Ecol. Environ.* 3:445–451.
- McNamara C.J., Perry IV T.D., Bearce K.A., Hernández-Duque G. & Mitchell R. (2006): Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from a Maya archaeological site. *Microb. Ecol.* 51:51-64.
- Meeks J.C. & Elhai J. (2002): Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:94-121.
- Millie D.F., Schofield O.M.E., Kirkpatrick G.J., Johnsen G. & Evens T.J. (2002): Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgae. *Eur. J. Phycol.* 37:313-322.
- Miller A.Z, Dionísio A. & Macedo M.F. (2006): Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 57:136–142.
- Miller A.Z., Dionísio A., Laiz L., Macedo M.F. & Saiz-Jimenez C. (2009): The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. *Ann. Microbiol.* 59:705-713.
- Mollenhauer D. (1988): *Nostoc* species in the field. *Arch. Hydrobiol.* 80/Algol. Stud. 50-53:315-326.
- Mollenhauer D., Büdel B. & Mollenhauer R. (1994): Approaches to species delimitations in the genus *Nostoc* Vaucher 1803 ex Bornet et Flahault 1888. *Arch. Hydrobiol.* 105/Algol. Stud. 75:89-209.

- Montejano G., León-Tejera H. & Hindák F. (2008): New observations on the life cycle of *Asterocapsa divina* (Cyanoprokaryota, Chroococcaceae). *Algol. Stud.* 126:65-71.
- Morton L.H.G. & Surman S.B.(1994): Biofilms in biodeterioration. *Int. Biodet. Biodeg.* 34:203-221.
- Nascimbenea J. & Salvadori O. (2008): Lichen recolonization on restored calcareous statues of three Venetian villas. *Int. Biodeter. Biodegr.* 62:313-318.
- Neu T.R, Woelfl S. & Lawrence J.R. (2004): Three-dimensional of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *J. Microbiol. Meth.* 56:161-172.
- Noguerol-Seoane A. & Rifon-Lastra A. (1997): Epilithic phycoflora on monuments. A survey of San Esteban de Ribas de Sil Monastery (Ourense, NW Spain). *Cryptogam. Algol.* 18:351-361.
- Novelo E. & Ramírez M. (2006) Algae and cyanobacterial diversity and distribution patterns on Mayan buildings in Palenque, Chiapas. *Cyanobacterial Diversity and Ecology on Historic Monuments in Latin America. Rev. Latinoam. Microbiol.* 48:188-195.
- Novis P.M. & Smissen R.D. (2006): Two genetic and ecological groups of *Nostoc commune* in Victoria Land, Antarctica, revealed by AFLP analysis. *Antarctic Science* 18:573-581.
- Nurul I. (1972): New and rare species of some green algae from Bangladesh. *Nova Hedwegia.* 23:655-677.
- Ong L.J. & Glazer A.N. (1988): Structural studies of phycobiliproteins in unicellular marine cyanobacteria. In: Stevens, S.E. Jr & Bryant, D.A. (eds.): *Light-Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models*: 102–121. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.
- Ortega-Calvo J.J., Hernández-Mariné M. & Saiz-Jimenez C. (1991): Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *Int. Biodet.* 28:165-185.

- Ortega-Calvo J.J., Hernández-Mariné M. & Saiz-Jimenez C. (1992): Experimental strategies for investigating algal deterioration of stone. Proceedings of the 7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. In: Delgado J., Henriques F. & Telmo F. (Eds) Lisbon, Laboratorio Nacional de Engenharia Civil. pp. 541–549.
- Ortega-Calvo J.J., Sanchez-Castillo P.M., Hernández-Mariné M. & Saiz-Jimenez C. (1993a): Isolation and characterization of epilithic chlorophyta and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo). *Nova Hedwigia* 57:239–253.
- Ortega-Calvo J.J., Hernández-Mariné M. & Saiz-Jimenez C. (1993b): Cyanobacteria and algae on historic buildings and monuments. In: Garg K. L., Garg N. & Mukerji K. G. (Eds). *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, Calcutta, Naya Prokash. 173–203 pp.
- Ortega-Calvo J.J., Ariño X., Hernández-Mariné M. & Saiz-Jimenez C. (1995): Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci. Total Environ.* 167:329–341.
- Ortega-Morales O., Hernández-Duque G., Borges-Gomez L. & Guezennec J. (1999): Characterization of Epilithic Microbial Communities Associated with Mayan Stone Monuments in Yucatan, Mexico. *Geomicrobiol. J.* 16:221-232.
- Ortega-Morales O., Guezennec J., Hernandez-Duque G., Gaylarde C.C. & Gaylarde P.M. (2000): Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico. *Curr. Microbiol.* 40:81–85.
- Ortega-Morales B.O., Gaylarde C.C., Englert G.E. & Gaylarde P.M. (2005): Analysis of salt-containing biofilms on limestone buildings of the Mayan culture at Edzna, Mexico. *Geomicrobiol J.* 22:261-268.
- Papaefthimiou D., Hrouzek P., Mugnai M.A., Lukesova A., Turicchia S., Rasmussen U. & Ventura S. (2008): Differential patterns of evolution and distribution of the symbiotic behaviour in nostocacean cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:553–564.

- Peat A. & Potts M. (1987): The ultrastructure of immobilised desiccated cells of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. FEMS Microbiol. Letters 43:223-227.
- Pettijohn, F. J. (1975): Sedimentary rocks. New York, USA. Harper & Row, Publishers. 628 p.
- Piñar G., Ripka K., Weberc J. & Sterflinger K. (2009): The micro-biota of a sub-surface monument the medieval chapel of St. Virgil (Vienna, Austria). Int Biodet. Biodegr. 63:851-859.
- Potts M. (1999): Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. Eur. J. Phycol. 34:319-328.
- Potts M. (2000): Chapter 17: *Nostoc*. In: Whitton, B.A. & Potts, M. (eds): The ecology of cyanobacteria: 465-504. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 704 pp.
- Prakash B., Veeregowda B.M. & Krishnappa G. (2003): Biofilms: a survival strategy of bacteria. Curr. Sci. 85:1299-1307.
- Ramírez M., Hernández-Mariné M., Novelo E. & Roldán M. (2010): Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. Biofouling 26:399-409.
- Ramírez M., Hernández-Mariné M., Mateo P., Berrendero E. & Roldán, M. (2011): Polyphasic approach and adaptative strategies of *Nostoc cf. commune* (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments. Fottea 11:73-86.
- Rajaniemi P., Hrouzek P., Kaštovská K., Willame R., Rantala A., Hoffmann L., Komárek J. & Sivonen K. (2005): Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:11-26.
- Reisser W. & Houben P. (2001): Different strategies of aeroterrestrial algae in reacting to increased levels of UV and ozone. In: Elster, J., Seckbach, J., Vincent, W. F. & Lhotsky. Algae and extreme environments. Ecology and Physiology. Nova Hedwigia 123:291-296.

- Řeháková K., Johansen J.R., Casamatta D.A., Xuesong L. & Vincent J. (2007): Morphological and molecular characterization of selected desert soil cyanobacteria: three species new to science including *Mojavia pulchra* gen. et sp. nov. *Phycologia* 46:481-502.
- Riederer J. (1984): The restoration of archeological monuments in the tropical climate. In: ICOM Committee for Conservation Preprints, 7th Triennial Meeting, Copenhagen. pp. 21-22.
- Rindi F. & Guiry M.D. (2002): Diversity, life history, and ecology of *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta) in urban habitats in western Ireland. *J. Phycol.* 38:39-54.
- Rindi F. & Guiry M.D. (2003): Composition and distribution of subaerial algal assemblages in Galway City, western Ireland. *Cryptogamie Algol.* 24:245-267.
- Rindi F. & Guiry M.D. (2004): Composition and spacial variability of terrestrial algal assemblages occurring at the bases of urban walls in Europe. *Phycologia* 43:225-235.
- Roldán M., Clavero E., Castel S. & Hernández-Mariné M. (2004a): Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. *Arch. Hydrobiol. 150/Algol. Stud.* 111:127-143.
- Roldán M., Thomas F., Castel S., Quesada A. & Hernández-Mariné M. (2004b): Non invasive pigment identification in single-cells from living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3745-3750.
- Roldán M., Oliva F., González del Valle M. A., Saiz-Jimenez C., & Hernández-Mariné M. (2006): Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms?. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:3026-3031.
- Roldán M. & Hernández-Mariné M. (2009): Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *Int. J. Speleol.* 38-41-53.
- Ruz A. (1997): La civilización de los antiguos mayas. - Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 71 pp.



- Saitou, N. & Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Saiz-Jiménez C. (1994). Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In: Leewelly C, Dashek W.V. & O'Rear C.E. (Eds.). *Biodeterioration Research* 4:578-604. Plenum Press. New York.
- Saiz-Jiménez C. & Ariño X. (1995). Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos. *Materiales de Construcción.* 240:5-16.
- Saiz-Jiménez C. (2001). The biodeterioration of buildings materials. In: Stocker II. (Ed.). *A Practical Manual on Microbiologically Influenced Corrosion.* 2:4.1-4.20. NACE. Houston.
- Saiz-Jiménez C. & Videla HA (Eds.) (2002). *Biodeterioro de monumentos históricos de Iberoamérica*, RTXV-E CYTED, España. 201 pp.
- Sakamoto T., Yoshida T., Arima H., Hatanaka Y., Takani Y. & Tamaru Y. (2009). Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycological Research* 57:66-73.
- Sant'Anna C.L. (1988): Scytonemataceae (Cyanophyceae) from the state of São Paulo, southern Brazil. *Nova Hedwigia* 46:519-539.
- Scheerer S., Ortega-Morales O. & Gaylarde C. (2009). Chapter 5 Microbial Deterioration of Stone Monuments—An Updated Overview. *Adv. Appl. Microbiol.* 66:97-139.
- Šmarda J & Hindák F. (2006): Light and electron microscope studies of *Asterocapsa salina* spec. nova (Cyanophyta/Cyanoprokaryota). *Arch. Hydrobiol.* 164/Algol. Stud. 121:43-57.
- Snow J.W. (1976): The climate of northern South America. In: Schwerdtfeger W. (Ed). *Climates of central and South America*, Elsevier, Amsterdam, pp 295–403.

- Satoh K., Hirai M., Nishio J., Yamaji T., Kashino Y. & Koike H. (2002): Recovery of Photosynthetic Systems during Rewetting is Quite Rapid in a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc commune*. *Plant Cell Physiol.* 43:170-176.
- Sharif D.I., Gallon J., Smith C.J. & Dudley E.D. (2008): Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeotheca* PCC6909. *The ISME Journal.* 2:1171–1182.
- Stackebrandt E. & Goebel B.M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846-849.
- Stackebrandt E. & Ebers J. (2006): Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* 33:152-155.
- Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel R. & Cohen-Bazire G. (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35:171-205.
- Strasser R. J. & Butler W.L. (1977): Fluorescence emission spectra of Photosystem I, Photosystem II and the light-harvesting chlorophyll a/b complex of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 462:307-313.
- Tajima F. & Nei M. (1984): Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1:269-285.
- Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T. & Sakamoto T. (2005): Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. - *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7327-7333.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Tarbut E.J. & Lutgens F.K. (1999): *Ciencias de la Tierra. Una introducción a la Geología Física.* Prentice Hall. Madrid. 540 pp.

- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994): CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids Res.* 22:4673-4680.
- Tiano P. (1994): Biodeterioration of stone monuments: a critical review. In: Garg, K. L., Garg & K. G. (Eds.). *Recent Advances in Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 1. Naya Prokash, Calcutta. 301-322 pp.
- Tiano P., Acolla P. & Tomaselli L. (1995): Phototrophic biodeteriogens on lithoid surfaces: an ecological study. *Microb. Ecol.* 29:299-309.
- Tomaselli L. (2003): Biodeterioration processes on inorganic substrata. *Coalition* 6:5-9.
- Tomaselli L., Lamenti G., Bosco M. & Tiano P. (2000): Biodiversity of photosynthetic micro-organisms dwelling on stone monuments. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 46:51-258.
- Uher B., Aboal M. & Kovacic L. (2005): Epilithic and chasmoendolithic phycoflora of monuments and buildings in South-Eastern Spain. *Cryptogam. Algol.* 26:275-358.
- Urzi C. & Realini M. (1998): Colour changes of Noto's calcareous sandstone as related with its colonization by microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42:45-54.
- Videla H., Guiamet P. & Gómez de Saravia S. (2000): Biodeterioration of Mayan archeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Int. Biodet. Biodegr.* 46:335-341.
- Videla H. (2002): Biodeterioro del patrimonio cultural, biocorrosión y corrosión atmosférica. Similitudes y diferencias. In: Sáiz-Jiménez C. & Videla H. (eds). *Biodeterio de Monumentos de Iberoamérica*. Programa CYTED. España. 201 pp.
- Videla H.A., Guiamet P. & Gomez de Saravia S. (2003): Biodeterioro de materiales estructurales de sitios arqueológicos de la civilización maya. *Rev. Museo La Plata* 44:1-11.

- Venugopal V., Prasanna R., Sood A., Jaiswal P. & Kaushik B.D. (2006): Stimulation of pigment accumulation in *Anabaena azollae* strains: effect of light intensity and sugars. *Folia Microbiol.* 51:50-56.
- Wakefield R.D. & Jones M.S. (1998): An introduction to stone colonizing microorganisms and biodeterioration of building stone. *Q. J. Eng. Geol.* 31:301-313.
- Wakefield R., Jones M., Wilson M., Young M., Nicholson K. & Urguhart C. (1996): Investigations of decayed sandstone colonized by a species of *Trentepohlia*. *Aerobiologia* 12:19-25.
- Walker J.J. & Pace N.R. (2007): Endolithic microbial ecosystems. *Ann. Rev. Microbiol.* 61:331-347.
- Warscheid T. & Braams J. (2000): Biodeterioration of stone: A review. *Int. Biodet. Biodeg.* 46:343-368.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. & Truper H.G. (1987): Report of the ad-hoc-committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.
- Wen X., Gong H. & Lu C. (2005): Heat stress induces an inhibition of excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Plant Physiol Biochem.* 43:389-395.
- Wolf E. & Schübler A. (2005): Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. *Plant Cell Environ.* 28:480-491.
- Wolfaardt G.M., Lawrence J.R., Roberts R.D., Caldwell S.E. & Caldwell D.E. (1994). Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:434-446.

Wright D., Prickett T., Richard F., Helm R.F. & Potts M. (2001): Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1839-1852.

Wynn-Williams D.D. (2000): Cyanobacteria in deserts-life at the limit? In: Whitton B.A. & Potts M. (Eds.). *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht Luwer Academic Publishers, pp. 341-366.

Páginas de internet

Convention Concerning the Protection of the World Cultural and Natural Heritage

<http://whc.unesco.org/?cid=175>, en español

<http://whc.unesco.org/archive/convention-es.pdf>)

## 8. Anexos

En los anexos se incluyen dos manuscritos.

### Anexo I

Manuscrito que lleva por título "**Combined molecular, phenotypic and ecological criteria for the characterization of new genus of Chroococcales (Cyanobacteria) from low light aerophytic environments**", cuyos autores son

M. Roldán, M. Ramírez, J. del Campo, M. Hernández-Mariné, J. Komárek

Mónica Ramírez colaboró en el aislamiento de la cepa y en la obtención de información mediante diversas técnicas y en la ejecución de la parte gráfica. Está prácticamente terminado, pendiente de la revisión final por parte de uno de los autores, Jiri Komárek. Se enviará a la revista *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*

### Anexo II

Manuscrito que lleva por título "**Biofilms fotosintéticos: colonización y biodeterioro en las zonas arqueológicas mayas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México)**" cuyos autores son

M. Ramírez, M. Hernández-Mariné, P Mateo, E. Berrendero y M. Roldán

M. Ramírez-Vázquez

Mónica Ramírez es la autora principal del trabajo. P Mateo y E. Berrendero han participado en la identificación molecular y las dos autoras restantes, codirectoras de la tesis de M. Ramírez, han colaborado en las diversas etapas de elaboración del manuscrito.

### **Criterios moleculares, fenotípicos y ecológicos para la caracterización de un nuevo género de Chroococcales (Cianobacteria) de ambientes aerofíticos con baja iluminación.**

Se describe una cianobacteria aislada de una cueva turística (Collbató, Barcelona, España). Formaba pequeños paquetes mucilaginosos adheridos a los espeleotemas y paredes. Las células eran casi esféricas rodeadas por una vaina delgada. Diversos rasgos fenotípicos apuntaban semejanza al género *Gloeocapsopsis* Komarek (1993). Difería de las especies descritas en el anterior género en tamaño, forma, tipo de envolturas y ecología. La microscopía láser confocal espectral y la microscopía electrónica de transmisión se emplearon para identificar respectivamente los pigmentos, y para describir la ultraestructura y la disposición de los tilacoides. Se identificaron los pigmentos ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina y clorofila *a*. Las reconstrucciones tridimensionales, generadas a partir de la fluorescencia natural de *Z-stacks*, mostraron que las membranas tilacoidales estaban conectadas entre sí, dando lugar a ramificaciones que ampliaban la superficie fotosintética. Esta disposición no había sido descrita anteriormente. Los análisis filogenéticos indicaban un máximo de 95% de homología con las secuencias disponibles en las bases de datos. Las características fenotípicas y genéticas apoyaban su clasificación como un taxón independiente a nivel genérico en el orden Chroococcales, familia Chroococcaceae. Por ello proponemos el nombre *Gloecalita cavernicola* gen nov. sp. nov. para dicha cianobacteria.





**Combined molecular, phenotypic and ecological criteria for the characterization of new genus of Chroococcales (Cyanobacteria) from low light aerophytic environments**

M. Roldán<sup>1, 2</sup>, M. Ramírez<sup>2</sup>, J. del Campo<sup>3</sup>, M. Hernández-Mariné<sup>2</sup>, J. Komárek<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Facultat de Ciències, 08193, Bellaterra, Spain

<sup>2</sup>Dep. Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, Unitat de Botànica. Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institut de Biologia Evolutiva, CSIC-UPF, Passeig Marítim de la Barceloneta, 37-49, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>4</sup>Institute of Botany, Czech Academy of Sciences, Dukelska 135, CZ-37982 Tržebon, Czech Republic

Correspondence to: Mariona Hernández-Mariné. E-mail: marionahernandez@ub.edu Phone: +34 93-4024490. Fax: +34 93-4035879

M. Ramírez-Vazquez

***RUNNING HEADLINE: Characterization of a new genus of  
Chroococcales from dim light environments***

**Abstract**

We describe a cyanobacterium with nearly spherical cells and thin outlined sheaths, which forms small packets immersed in a diffluent mucilaginous layer. Colonies grew adhered to calcite speleothems and walls in a show cave in Collbató (Barcelona, Spain). Several phenotypic traits suggest that though it could belong to the genus *Gloeocapsopsis* Komarek (1993), it differs from previously described species in regard to size, shape, envelopes and ecological requirements and mostly from *G. crepidinum*, the type of the genus. Spectral confocal laser and transmission electron microscopy were used to identify pigments and to describe the whole fine structure and the thylakoid arrangement, respectively. The pigments identified were phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin and chlorophyll *a*. The three-dimensional reconstructions, generated from the natural fluorescence Z-stacks, evidenced a large surface area of nearly flat arms-like thylakoidal membranes, connected to each other, forming a unified structure in a way that has never been described previously. Phylogenetic analyses indicate that the cyanobacterium had a maximum of 95% homology to database sequences. The phenotypic and genetic traits supported it being classified as an independent taxon in the order Chroococcales and the family Chroococcaceae. Hence, we proposed the name *Gloecalita cavernicola* gen nov. sp. nov.

Key words: cave, Chroococcales, CSLM, cyanobacteria, phylogenetic analyses, TEM.

## ***Introduction***

Cyanobacteria are a dominant component of diversely structured photosynthetic biofilms living in low-light environments. Examples of these communities can be found in natural or artificially illuminated show caves and catacombs, in which they are affected by the physical, chemical and biological conditions (Hernández-Mariné et al. 2001, Lamprinou et al. 2009, Roldán et al. 2004a, Roldán & Hernández-Mariné 2009, Urzi et al. 2010). These parameters are interdependent, and determine which organisms can thrive (Decho et al. 2010).

Molecular methods can be used for the taxonomic classification of these cyanobacteria especially for groups that have very few morphologically differentiating characters (Wilmotte et al. 1992, Garcia-Pichel et al. 1998, Komárek & Anagnostidis 1998, Nübel et al, 2000, Abed et al. 2002, Berrendero et al. 2008, Oren 2011). In addition, the genetically identified items need to combine with phenotypic and ecological data (Hoffmann et al. 2005, Johansen & Casamatta 2005, Komárek and Kaštovský 2003, Komárek et al. 2004, Komárek 2010, Komárková et al 2010). The specific phenotypic traits used depend on the organism and tools employed to characterize it. These traits can be used to differentiate among genera or morphospecies.

Features that are in agreement with phylogenetic relationships in simple cyanobacteria include the type of cell division and the thylakoid arrangement (Komárek & Kaštovský 2003; Komárek &

Anagnostidis 1998). Photosynthetic pigments may also be used as a taxonomic marker in cyanobacteria (Bryant 1982, Wilmotte 1994, Roldán et al. 2004b), although this depends on whether information on the pigment type is available at the genus or species level, and even changes in pigments depending on the life cycle stage (Wolf & Schübler 2005) or environmental conditions (Ramírez et al. 2011).

During an intervention intended to clean speleothems from an illuminated tourist cave, colonies of a coccoid cyanobacteria CO3 were detected and isolated. The assembly was characterized by more or less spherical cells with outlined sheaths. The cells divide irregularly into different planes and do not return to their original shape before the next division (Komárek 1993, Komárek & Anagnostidis 1998). Based on these features, the field specimens and one isolate were tentatively assigned to the gloeocapsoid group and related to the genus *Gloeocapsopsis*.

The genus *Gloeocapsopsis* Geitler ex Komárek (cyanobacteria) was segregated from *Gloeocapsa* by Geitler (1925). The type species of the genus, *G. crepidinum* (Thuret) Geitler ex Komárek 1993, was described by Geitler (1925) but not validated due to the lack of diagnosis (Komárek 1993). Komárek et Anagnostidis (1986) recombined three *Gloeocapsa* into the genus *Gloeocapsopsis*, which was later validated by Komárek (1993). *Gloeocapsopsis* was separated from related genera such as *Chroococcus* and *Gloeocapsa* based on the type of cell division and reproductive strategy and by lacking spherical and widened envelopes (Komárek 1993). Later, the

genus *Gloeocapsopsis* in Europe was revised (Komárek & Anagnostidis 1998) based on cell cycle, morphology and ecology.

Morphological differences separate CO3 from the currently described taxa. Combined phenotypic and genetic traits support classifying it as an independent taxon in the order Chroococcales. Hence, we propose the name *Gloeocalita cavernicola* (Hernández-Mariné M. & Roldán M.) gen nov. sp. nov. Isolate CO3 is deposited at the Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA), and at the Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)// any other.

## **Methods**

### *Site and habitat description, sampling and growth conditions*

A coccoid cyanobacterium was collected in Salpetre cave in Collbató (Catalonia, Spain. 41° 34' 31.72" and 1° 50' 10.14"). The cave has been exploited since the 16<sup>th</sup> century for potassium nitrate, and later in 1934 it was artificially illuminated and made into a tourist attraction. Subspherical colonies were collected at the bottom of the cave from a speleothem illuminated during show time by white fluorescents bulbs, with a photosynthetic photon flux density (PPFD) below 2.5  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The cave shows relative micro-environmental stability throughout the annual cycle (data-logger Testo 177- H1). The mean air temperature was 14.7°C, with an annual variation of 4.1°C; the mean stone temperature was 15.5°C, with an annual variation of 1.2°C; the mean ambient humidity (RH 94.0) was high, from 90.5 to 96.9%, in the sampling zone; and the

mean environmental CO<sub>2</sub> concentration was 588.2 ppm (data-logger Testo 400).

Small speleothem samples of 3 mm<sup>-3</sup> containing visible microbial growth were collected. The samples were immediately placed in Petri dishes on a 2 mm layer of BG11 medium (Stanier et al. 1971) solidified with agar (1% Merck). This setup kept the samples alive and protected the biofilm architecture for transport to the laboratory, and in the lab until isolation and processing. One strain (CO3), was isolated from the natural biofilms and grown on 1% agarized BG11 medium at 17°C under 10 μmol photon m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> with a light:dark cycle of 12:12 h.

### *Microscopy*

Material was examined using an Axioplan microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and photographed with an AxioCam MRc5 digital camera system. Cell measurements were taken from microphotographs.

For Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) samples were mounted on Mat-Teck culture dishes (Mat Teck Corp., Ashland, Massachusetts, United States) and were observed either live (cultures) or fixed (field material) with 3% paraformaldehyde in 0.1 M PBS and 60 mM saccharose. Images were taken with a Leica TCS-SP5 CLSM (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) equipped with a 63x / 1.4 (oil HC x PL APO lambda blue) objective using different zoom ranges. The samples were observed with multi-



channel detection. Autofluorescence from photosynthetic pigments was viewed in the red channel (590 to 800 nm emission) using the 561 nm excitation laser line. Con A-Alexa 488 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) [0.8 mM] targets cell-associated mucilage (when present) and is recorded in the green channel (excitation, 488 nm; emission, 495 to 530 nm). Three-dimensional images were collected from *xy* images in *z* (depth) with pinholes of 1 Airy unit, in accordance with the Nyquist criterion. Stacks were subsequently processed with the Imaris v. 6.1.0 software (Bitplane AG Zürich, Switzerland) to obtain maximum intensity projections. The isosurface module of Imaris was used to reconstitute the 3-D models.

The presence of the major light-harvesting pigments, chlorophyll *a* (Chl *a*), phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC), was determined by the same CLSM.

Lambda stacks (*xyλ*) were taken using the same objective in order to determine the emission spectra of the photosynthetic pigments of the samples (Roldán et al. 2004b). The excitation wavelength used was the 488 nm line of an Ar laser. Emission detection was set from 520 to 780 nm. The confocal pinhole for each lambda stack was fixed at 2 Airy units. For each *xy* focal plane, confocal microscopy was used to measure the emission variation every 10 nm (lambda step size = 5.2 nm). The emission spectrum analysis was processed using the CLSM software version 2.0. A Region of Interest (ROI) was delimited to determine the mean fluorescence intensity (MFI) in the selected area in relation to the wavelength. To analyze cells, 50 ROIs of 1  $\mu\text{m}^2$  were used and the FI was calculated in the selected ROIs in relation to the

wavelength. The mean and standard errors were calculated for all the ROIs examined.

For transmission electron microscopy (TEM), samples were fixed in glutaraldehyde (2.5%) in 0.1M cacodylate buffer for 2 to 4h, washed in this buffer, postfixed in osmium tetroxide, dehydrated by a graded acetone series and embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections, cut from the block, were then stained with 2% uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL 1010 TEM at 100 kV accelerating voltage.

### *Molecular analysis*

#### Sampling and extraction protocol

15 ml of the culture were spun in a centrifuge for 10 minutes at 3000 rpm and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 567  $\mu$ l TE buffer by repeated pipetting. 30  $\mu$ l of 10 % SDS and 3  $\mu$ l of proteinasa K (20mg/ml) were added at a final concentration of 100  $\mu$ g/ml of PK in 0.5% SDS, mixed thoroughly and incubated for 1 hour at 37°C. 100  $\mu$ l NaCl 5M were added and mixed thoroughly. Extractions were performed by adding 80  $\mu$ l of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer and 800  $\mu$ l of phenolchloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) (pH 8.0). CTAB extraction buffer was prepared by mixing equal volumes of 10% (wt/vol) CTAB (Sigma, Poole, United Kingdom) in 0.7 M NaCl with 240 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0. Samples were lysed for 10 min at 65° C, and the aqueous phase containing nucleic acids was separated by centrifugation (4500

rpm) for 5 min at 4°C. The aqueous phase was then extracted, and phenol was removed by mixing with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) followed by repeated centrifugation (4500 rpm) for 5 min at 4°C. Total nucleic acids were subsequently precipitated from the extracted aqueous layer with 0.6 volumes of isopropanol (600µl in 1ml of supernatant) followed by centrifugation (14000) for 1 min at RT. The supernatant was carefully removed and a small white pellet was the observed result. 1ml of 70% ethanol was added to remove residual CTAB, then the solution was spun for 5 min at 14,000 rpm to repellet it at 4°C. The supernatant was carefully removed, the pellet was dried and redissolved in 100 µl of TE. Samples were kept at -80°C.

#### 16S rDNA gene amplification and sequencing

Amplification and sequencing analyses were performed as previously described (Ferrera et al. 2004). 16S rDNA genes were amplified using the primers 27F and 1492R. Amplified rDNA gene products were ethanol-precipitated and resuspended in 20 µl of sterile water. CO3 culture was completely sequenced using the primers 358f, 517r, 907f and 1492r by MACROGEN Geomics Sequencing Services. The resulting sequence was double checked using the CHECK\_CHIMERA (Maidak et al. 2001) and by BLAST search with different sequence regions.

#### Sequence dataset retrieval

Environmental 16S rDNA sequences of cyanobacteria were obtained from GenBank in a two-step screening. First, sequences found by the

NCBI Taxonomy Application were retrieved and checked by BLAST (Altschul et al. 1997) to confirm their placement. Second, we used these and other published sequences from cultures or environmental surveys that belong to the target groups (but are not labeled as such in GenBank) to retrieve additional sequences by BLAST. Neighbor Joining phylogenetic trees were constructed with a wide taxon coverage to determine whether or not ambiguous divergent sequences belonged to a given group. Related sequences from cultured organisms were also retrieved from GenBank and pruned to keep only a few representatives for phylogeny.

#### Phylogenetic analyses

16S rDNA sequences were aligned using MAFFT (Kato et al. 2002) with a close relative as out-group. Alignments were checked with Seaview 3.2 (Galtier et al. 1996) and highly variable regions of the alignment were removed using Gblocks (Castresana 2000). Maximum likelihood (ML) phylogenetic trees with complete sequences were constructed with RAxML (Stamatakis 2006) using the evolutionary model GTRMIXI. Phylogenetic analyses were carried out in the freely available University of Oslo Bioportal ([www.bioportal.uio.no](http://www.bioportal.uio.no)). Repeated runs on different starting trees were carried out to select the tree with the best topology (the one with the best likelihood of 1000 alternative trees). A bootstrap ML analysis was carried out with 1000 pseudo-replicates and the consensus tree was computed with MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Trees were edited with FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The new sequence associated with this study is deposited in GenBank (Accession numbers: (what we usually do is to send sequence and

ask for the accession number when the manuscript is accepted).

## **Results**

### *Morphological characteristics, ultrastructure and photosynthetic pigment composition*

CO3 was identified here with an integrated approach that brings together morphological characters and molecular phylogeny based on the analysis of the complete 16S rRNA gene sequences.

Optical and CLSM observations showed that the whole colony was immersed in a diffluent mucilaginous layer (Figs. 1, 2), which grew adhered to calcite speleothems in Collbató, alone or intermixed with coccoid and filamentous cyanobacteria and moss protonemata. Cells were arranged in small, bright, bluish-green aggregates. Envelopes followed the outline of individual cells or the siblings after the division (Fig. 1D). Under CLSM some cells exhibited strong green Con-A fluorescence in the outer sheath layers (Figs. 2A, C) while others were devoid of it (Fig. 2B). Their thickness varied, apparently depending on the cell's position within the colony, from a thick diffluent, slightly lamellate slime to almost no apparent individual sheath. This label indicates that there are relatively high amounts of  $\alpha$ -mannopyranosyl and  $\alpha$ -glucopyranosyl residues in the cell sheaths. Cells divided irregularly in various planes (Figs. 1A, B, 2B). The cell shape was more or less spherical, slightly elongated in pre-divisional cells or irregular in outline, but never pear-shaped. The cells displayed different cell dimensions, ranging from 2.6 to 4.3  $\mu\text{m}$

(mean =  $3.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ,  $n=54$ ) in diameter. Neither nanocyte formation nor resting stages were observed.

The pigment fluorescent cellular content was not homogeneous (Figs. 2A-C). Three-dimensional models showed that the thylakoids form a structure consisting of interconnected layers oriented at different angles, which leave elongated or star-shaped non-fluorescent areas (Fig. 2D). Determining the *in vivo* pigment spectral profile from cultured material showed a small shoulder at 579 nm corresponding to PE and an emission peak at 662 nm corresponding to phycobiliproteins and Chl *a* (Fig. 3).

TEM microscopy showed that the sheath near the cell consisted of thin, poorly compacted fibres that emanated from the outer membrane, perpendicularly to it, although they almost immediately became arranged in parallel (Fig. 4A, B). The slightly layered appearance was due to irregularly compacted zones, which were thicker in dividing cells. The cell wall had a total width of about 33 nm and, as is usual for cyanobacteria, consisted in three layers, in which the electron-dense peptidoglycan layer measured about 6.6 nm. The thylakoids were arranged in irregular arrays, which intersected at several angles (Fig. 4B). The thylakoid arrays crossed each other leaving a central irregular area, depending on the position of the thylakoids and the orientation of the image, where the nucleoid was located. Binary fission occurred via a constrictive pinching mechanism (Fig. 4C, D). The division process was initiated by a symmetric invagination of both the cytoplasmic membrane and peptidoglycan layer whilst ingrowing of the outer membrane was delayed. The

thylakoids were pushed away by the ingrowing layers (Fig. 4D). Sections through cells showed also carboxysomes, numerous glycogen granules between thylakoid membranes and polyphosphate bodies. Cyanophycin granules were not observed.

### *Molecular analyses*

Fifty chroococcalean cyanobacterial sequences from the public domain were added to the analysis for reference purposes; the 16S rRNA gene sequence of AB364957 *Pseudomonas aeruginosa* was used as an outgroup to root the phylogenetic tree (Fig. 5). In the maximum likelihood phylogenetic tree, CO3 shows the highest homology with AM710384 *Chroococcus* sp. JJCM (95% of similarity). CO3 is divergent enough from any other cyanobacterium available in the public databases to suggest it is a new and differentiated taxon.

### **Discussion**

The strain isolated from Collbató could be assigned to the genus *Gloeocapsopsis*, as it fits into the characters used by Komárek (1993) to validate the genus. CO3 matches some features of previously described species, but differs from them in morphological and/or ecological characteristics and substrate chemistry (based on Komarek and Anagnostidis 1998 and in references cited therein). *G. crepidinum* (Thuret) Geitler ex Komárek, the type species, is halophilic and lives on marine coastal rocks (Silva et al. 2005, Ramos et al. 2010). *G. aurea* Mataloni & Komárek is common in Antarctica seepages (Komárek & Elster 2008). *G. chroococcoides* (Nováček)

Komárek and *G. dvorakii* (Nováček) Komárek et Anagnostidis are bigger and live on serpentines, and the latter also lives on moist limestone (Hauer 1997). The small *G. cyanea* (Krieger) Komárek et Anagnostidis lives at the entrances of caves like CO<sub>3</sub>, but its envelopes are rough on the outside and form packet-like arrangements. *G. magma* (Brébisson) Komárek et Anagnostidis has red envelopes and is slightly larger. Moreover, it lives in non-alkaline, alpine regions all over the world in clear unpolluted water with low conductivity and low nutrient content (Komárek 1993, Mataloni & Komárek 2004). *G. pleurocapsoides* (Nováček) Komárek et Anagnostidis is bigger and has resting cells. In addition, *G. dvorakii* and *G. pleurocapsoides* have pear shaped cells while *G. polyedrica* (Ercegović) Komárek et Anagnostidis is polyedrical or oval and lives on limestone rocks.

The presence of nanocytous stages has been reported for *G. crepidinum* (Geitler 1925) although reports of *G. crepidinum* populations with a baeocyte formation probably correspond to a *Myxosarcina* species (Komárek & Anagnostidis 1999). The release of small cells could be interpreted as baeocyte formation in *G. aurea* (Mataloni and Komárek 2004); however, the authors stated that this feature does not seem to express an evolutionary relationship since sarcinoid non-baeocytic and baeocytic types could be closely related.

A character that was rarely considered before TEM was introduced is the thylakoid arrangement (Lang & Whitton 1973, Komárek 2010), which is one of the phenotypic characteristics consistent with molecular criteria (Komárek & Kaštovský 2003). Once the fine



structure is understood it is possible to envision the thylakoid arrangement as an autapomorphic character that could help to compare organisms with molecular similarities (Komárek & Kaštovský 2003). A large number of coccoid cyanobacteria have a concentric-like thylakoids arrangement, although few studies to date have employed advanced bioimaging protocols for evaluating of fine spatial arrangements in cellular organization (Mullineaux 1999, Nevo et al. 2007, Liberton et al. 2010). No information on the distribution of thylakoids in the genus *Gloeocapsopsis* is available, although drawings of *G. pleurocapsoides* (Nováček in Komárek & Anagnostidis 1999, Fig. 362) and *G. magma* (Hollerbach in Komárek & Anagnostidis 1999, Fig 364 b) show an elongated central area which is similar to the "coffee seed" shape observed in the CO3 images. However, other references (Komarek 1993, Rifón-Lastra & Noguero 2002), which describe the content as homogeneous or granular, do not support this similarity. Moreover, *G. aurea* (Mataloni & Komárek 2003), *G. crepidinum*, *G. chroococcoides*, *G. cyanea* and *G. polyedrica* (Komárek & Anagnostidis 1998), whose content is also described as granular or homogeneous, seems to correspond to an almost concentric type.

It is difficult to observe the thylakoid organization by optical microscopy or even with TEM, nevertheless the optical images and the TEM figures provide a valid approach for determining the internal structure, which could be understood better using the CLSM serial sections to reconstruct entire cells. The three-dimensional reconstructions, generated from the natural fluorescence Z-stacks, evidenced a large surface area of nearly flat arms-like thylakoidal

membranes, connected to each other, forming a unified structure in a way never previously described. The membrane arrangement accounted for the changing directions of the thylakoids seen in the TEM images. This organization, within a small cell volume, could be an advantage for living in dim caves and indicates that CO3 could differentiate in this key character of related strains with a *Gloeocapsopsis*-like morphology. Moreover, it is possible that this thylakoid structure is shared with *G. pleurocapsoides* and *G. magma*.

Although not discussed here, phycoerythrin enables organisms to adapt to different qualities of light and absorb extra energy in a low-light environment (Albertano & Hernández Mariné 2001) and has been identified as part of the CO3 description. The pigments detected can be used to monitor biodeteriogens in dim caves (Roldán et al. 2006).

The closest relative sequence to CO3 is *Chroococcus* sp. JJCM (AM710384), a packet-forming organisms isolated from plankton of a reservoir, which was originally determined as *Chroococcus* cf. *minor* and later corrected to *Eucapsis* sp. (Komárková et al. 2010); its colonies are composed of tight packet groups without mucilage, whereas *Chroococcus* species and CO3 are covered by mucilage in the same culture conditions (Komárková et al. 2010). There is 95% sequence similarity between CO3 and *Chroococcus* sp. JJCM (AM710384), which is good evidence of an independent evolutionary history (Johansen & Casamatta 2005, Stackebrandt & Goebel 1994). A threshold of 97 % 16S rRNA gene sequence similarity is suggested to separate species, which is a criterion that has been used for

recognizing bacterial species. In the future, *Chroococcus* sp. JJCM (AM710384) and CO3 could be included in the same genus due to their sequence similarity (Ludwig et al 1998); however, phenotypic markers would have to be compared, and currently there is no available information. *Chroococcus* sp. JJCM (AM710384) is also related to *Chroococcus* sp. 019 Hegewald 1952 (Komárková et al. 2010). A matrix shows similarities below 92% among the sequences of the two strains in relation to strains of the genus *Chroococcus*, although the sequence of *Chroococcus* sp. 019 is not yet submitted to GenBank (Komárková et al. 2010). Strains identified as *Chroococcus* sp. (VP2-02, 9E-05, 9E-04, 2T05h), isolated from Spanish fountains, cluster to AM710384 (99% bootstrap support) (Cuzman et al 2010).

CO3 has the same morphology and habitat as a cyanobacterium reported under the name of *Gloeocapsa* NS4 (Cox et al. 1981), which was isolated at Juentica cave (Asturias, Spain). There is not molecular information to place it in a phylogenetic concept, although the ecology, type of cell division and figures of thylakoid arrangement, lead us to believe that they both belong to the same taxon.

A recent study described an intertidal cyanobacterium, LEGE 06123 (Ramos et al 2010), that matches the morphological description and habitat of *G. crepidinum*. Phylogenetically LEGE 06123 is closely related to three cyanobacteria isolated from hot springs; shows 97% similarity with one, 5.2 s.c.1 *Chroogloeocystis siderophila* Brown, Mummey et Cooksey (Brown et al. 2005) with which shares morphological, ecophysiological and ultrastructural characteristics

(Ramos et al. 2010). They have a similar parietal type of thylakoid arrangement, in which thylakoids are distributed concentrically along the inside of the cytoplasmic membranes and are occasionally convoluted towards the centre of the cell. Baeocytes have not been observed in either. Considering these morphological and molecular characteristics, CO3 is very different from the proposed species type of the genus *Gloeocapsopsis*.

Overall, the evidence from the polyphasic taxonomic study based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, morphological features and pigment compositions indicates that strain CO3 should be classified as an independent taxon in the order Chroococcales and the family Chroococcaceae, for which the name *Gloecalita cavernicola* gen. nov., sp. nov. is proposed.

Greek root "Gloe" (sticky related to the formation of biofilms) and the substrate (living on /related to calcite) was incorporated into the generic name of this isolate. Ca.ver.ni'.co.la femin. adj. cavernicola = inhabiting caves from latin word caverna = cave, suggested the species epithet).

#### Description

Cellulae in coloniis microscopicis vagina circumdatae; cellulae rotundae vel leviter oblongae, amplitudine differenti, ab 2.6 ad 4,3 mm de diametro; cyaneus continens leve caeruleum graniferum, aut facies mediam partem oblongam sine colore. Tegumentum mucilaginosum (o mucidum" ?) translucidum rare lamellosum. Divisio

cellularum in diversis planis. Post divisionem cellularum lineamenta propriarum ambitum cellularum secutae sunt. Habitatio (Habitat?): Spain, Barcelona, Collbató caverna ( o spelunca?). Crescit adhaerens calcareo substrato, species aerophytica.

### ***Conclusion***

In the present study a new perspective of traditional morphological characteristics combined with molecular phylogeny provided complementary data for determining the taxonomy of a gloeocapsoid species. It should be highlighted that the autapomorphic characters, and the advanced bioimaging protocols used to determine these characters, are very important for identifying the species in the Chroococcales group. The polyphasic approach suggests that CO3 belongs to a new genus and represents a new species of this genus.

### ***Acknowledgments***

This study was supported by grants CGL06-07424 and AV0Z60050516. We are grateful to the Scientific and Technical Services of the University of Barcelona, and Autonomous University of Barcelona. Lastly, the authors thank Vanessa Balagué, Antonia Navarro, M<sup>a</sup> José Garcia M and the Ajuntament of Collbató.

### ***References***

Albertano P, Hernández-Mariné M. 2001. Algae in habitats with reduced and extreme radiation Nova Hedwigia Beiheft 123: 225-227

Abed RMM, Garcia-Pichel F. Hernández-Mariné M. 2002. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomiconema excentricum* gen. nov., sp. nov. – Archives of Microbiology. 177:361-370

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389–3402

Berrendero, E, Perona, E & Mateo, P. (2008): Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water.- Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 447-460.

Brown II, Mummey D, Cooksey KE. 2005. A novel cyanobacterium exhibiting an elevated tolerance for iron. Microbiology Ecology 52:307–314

Bryant D.1982. Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin: Properties and Occurrence in Cyanobacteria. J. Gen. Microbiol 128: 835-844.

Castresana J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol Biol Evol 17: 540–552

Cox G.C., Benson D. & Dwarto D.M. 1981. Ultrastructure of cave-wall cyanophyte - *Gloeocapsa* NS4. Archives of Microbiology 130: 165-174.

Cuzman O A., Ventura S., Sili C., Mascalchi C., Turchetti T., Luigi P. D'Acqui L.P. & Tiano P. 2010. Biodiversity of Phototrophic Biofilms Dwelling on Monumental Fountains. Microbial Ecology 60: 81-95

Decho A. W., Norman R.S. & Visscher P.T. 2010. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats Trends in Microbiology 18: 73-80.

Ferrera I., Massana R., Casamayor E.O., Balagué V., Sánchez O., Pedrós-Alió C., Mas J. 2004. High-diversity biofilm for the oxidation of sulfide-containing effluents. Appl Microbiol Biotechnol 64: 726–

734.

Galtier N., Gouy M., Gautier C. 1996. SeaView and Phylo\_Win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci* 12:543–548

Garcia-Pichel F., Nübel U. & Muyzer G. 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 169: 469-482

Geitler L. 1925. Synoptische Darstellung der Cyanophyceen in morphologischer und systematischer Hinsicht. *Beith. Bot. Zentralhl.* 41:163-294

Hauer T. 2007. Rock-inhabiting cyanoprokaryota from South Bohemia (Czech Republic). *Nova Hedwigia.* 85: 379-392

Hernández-Mariné M, Roldán M, Clavero E, Canals A, Ariño X. 2001. Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Puigmolto sinkhole. *Nova Hedwigia* 123: 235–251.

Hernández-Mariné M, Clavero E, Roldán M. 2003. Why there is such luxurious growth in the hypogean environments. *Arch Hydrobiol Algal Stud* 109:229–239.

Hoffmann L., Komárek J., Kastowsky J. 2005. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. *Arch Hydrobiol Algal Stud* 117: 95–115.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755

Johansen. J. R., Casamatta. D. A. 2005. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Arch Hydrobiol Algolog Stud*, 117: 71-93

Katoh K, Misawa K, Kuma L, Miyata Y (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066.

Komárek J. 1993. Validation of the genera *Gloeocapsopsis* and *Asterocapsa* (Cyanoprocarvota) with regard to species from Japan, Mexico and Himalayas. Bulletin of the National Science Museum Series B. Botany. 19: 19-37.

Komárek J. 2003. Problem of a taxonomic category "species" in cyanobacteria. Arch Hydrobiol Algal Stud 109: 281–297.

Komárek J. 2010. Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). Hydrobiologia 639: 245-259

Komárek J., Anagnostidis K. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 – Chroococcales. Arch Hydrobiol Algal Stud 43:157–226

Komárek, J., Anagnostidis, J. 1998. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Gustav Fischer Verl, Jena 548 pp.

Komárek J., Cepák V., Kašrovský J., Sulek J. 2004. What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity. Arch Hydrobiol Algal Stud 113:1-36.

Komárek J., Elster J. 2008 Ecological background of cyanobacterial assemblages of the northern part of James Ross Island, Antarctica. Pol Polar Res 29: 17-32.

Komárek J. & Kašrovský J, 2003. Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines in cyanobacteria. Arch Hydrobiol Algal Stud 109: 305–326.

Komárek J. 2010. Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. Hidrobiologia 639:231-243.

Komárková J., Jezberová J., Komárek O and Zapomelová E. 2010. Variability of Chroococcus (Cyanobacteria) morphospecies with regard to phylogenetic relationships Hydrobiologia 639: 69-83



Lamprinou, V., Pantazidou, A., Papadogiannaki, G., Radea, C. & Economou-Amili, A. 2009. Cyanobacteria and associated invertebrates in Leontari cave. *Fottea* 9, 155-164.

Lang, N.J., Whitton, B.A. 1973. Arrangement and structure of thylakoids in: *The biology of blue-green algae*, p 66-79, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 1973. 17 fig.

Liberton Michelle, Jotham R. Austin, II, R. Howard Berg, and Himadri B. Pakrasi 2010. Unique thylakoid membrane architecture of a unicellular N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium revealed by electron tomography. *Plant Physiology Preview*. Published on December 20, , as DOI:10.1104/pp.110.165332

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K.-H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* 19: 554-568.

Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Parker CT, Saxman PR, Farris RJ, Garrity GM, Olsen GJ, Schmidt TM & Tiedje JM. 2001. The RDP-ii (ribosomal database project). *Nucleic Acid Res* 29: 173–174.

Mataloni, G. & Komárek, J. 2004. *Gloeocapsopsis aurea*, a new subaerophytic cyanobacterium from maritime Antarctica. *Polar Biol.* 27: 623-628.

Nevo R., Charuvi D., Shimoni E., Schwarz R., Kaplan A., Ohad I., Reich Z. 2007  
Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *Embo J* 26: 1467-1473

Nübel U., Garcia-Pichel F. & Muyzer G. 2000. The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. *Internat. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50: 1265–1277.

Mullineaux CW (1999) The thylakoid membranes of cyanobacteria: structure, dynamics and function. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 671-677.

Nevo R, Charuvi D, Shimoni E, Schwarz R, Kaplan A, Ohad I, Reich Z (2007) Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *Embo J* 26: 1467-1473.

Oren A. 2011. Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy / International Journal of Systematic Bacteriology / International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 61, 10–15.

Ramírez M., Hernández–Mariné M., Mateo P., Berrendero E. & Roldán M. 2011. Polyphasic approach and adaptative strategies of *Nostoc cf. commune* (Nostocales, Nostocaceae) growing on Mayan monuments. *Fottea* 11: 73-86.

Ramos V, Seabra R, Brito A, Santos A, Santos C, Lopo M, Moradas-Ferreira P, Vasconcelos VM and Tamagnini P. 2010. Characterization of an intertidal cyanobacterium that constitutes a separate clade together with thermophilic strains. *Eur. J. Phycol.* (2010), 45(4): 394–403 .

Rifón-Lastra, A. & Nogueroles-Seoane, A. 2002. Tres nuevas citas de Chroococcales (Cyanophyta) para la Península Ibérica: *Hormothecce cylindrocellulare* (Geitler) Komárek & Anagnostidis, *Gloeocapsopsis pleurocapsoides* (Nováček) Komárek & Anagnostidis y *Chroococcus montanus* Hansgirg. *Anales Jard. Bot. Madrid* 59: 332-334.

Roldán M., Clavero E., Castel S. & Hernández-Mariné M. 2004a. Biofilms fluorescence and image analysis in hypogean monuments research. *Algological studies* 111: 127-143.

Roldán M., Hernández-Mariné M. 2009. Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *Int J Speleol.* 38: 37-49.

Roldán M., Thomas F., Castel S., Quesada A., Hernández-Mariné M. 2004b. Non invasive pigment identification in living phototrophic biofilms by confocal imaging spectrofluorometry. *Appl Environ Microbiol.* 70 : 3745-3750.

Roldán M., Oliva, F., Gonzalez del Valle, M. A., Saiz-Jimenez, C., Hernández-Mariné, M. 2006: Does green light influence the fluorescence properties and structure of phototrophic biofilms? *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3026–3031.

Stanier, R. Y., Kurisawa R., Mandel R., Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol Rev* 35: 171–205.

Silva e Silva L. H., Damazio C. M., Iespa A. A. C. 2005. Composição cianobacteriana em trombólitos da lagoa Pitanguinha (Holoceno), Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *GAEA* 1:75-81.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690

Stackebrandt E., Goebel B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bact.* 44:846–49.

Urzi C., Albertano P. 2001. Studying phototrophic and heterotrophic microbial communities on stone monuments. *Methods in Enzymology* 336: 340-355

Urzi C., De Leo F., Bruno L. & Albertano P. 2010. Microbial Diversity in Paleolithic Caves: A Study Case on the Phototrophic Biofilms of the Cave of Bats (Zuheros, Spain). *Microb Ecol* 60:116–129.

Wilmotte A. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant DA. [Ed.] *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht, pp. 1-25.

Wilmotte A. Turner S., Van De Perr Y. & Pace NR. 1992. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (cyanobacteria) with narrow trichomes. II: Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J Phycol.* 28: 828-838

Wolf, E. & Schübler, A. 2005. Phycobiliprotein fluorescence of *Nostoc punctiforme* changes during the life cycle and chromatic adaptation: characterization by spectral confocal laser scanning microscopy and spectral unmixing. *Plant, Cell and Environment* 28: 480–491.

FIGURE CAPTIONS

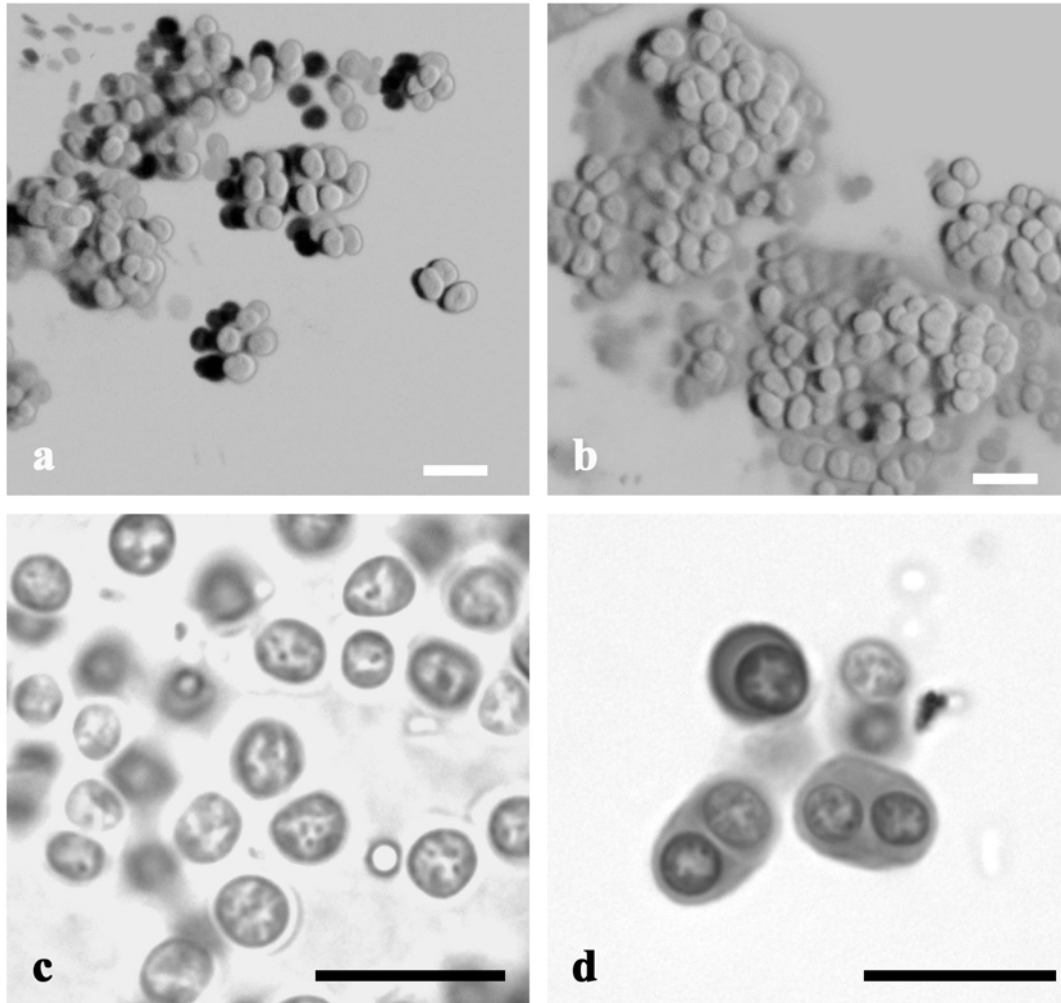


Figure 1. a-b. Confocal three-dimensional images of *Gloecalita cavernicola* gen nov. sp. nov. General view of colonies, showing the irregular division planes. The cells were solitary or arranged in amorphous colonies composed of a few cells. Neither nanocyte formation nor resting stages were observed. c-d. Optical microphotographs. c. The cells or siblings were enveloped by concentric sheaths; no lamellate vesicles were observed. d. Sheaths stained with methylene blue. Scale bar: 10  $\mu$ m.

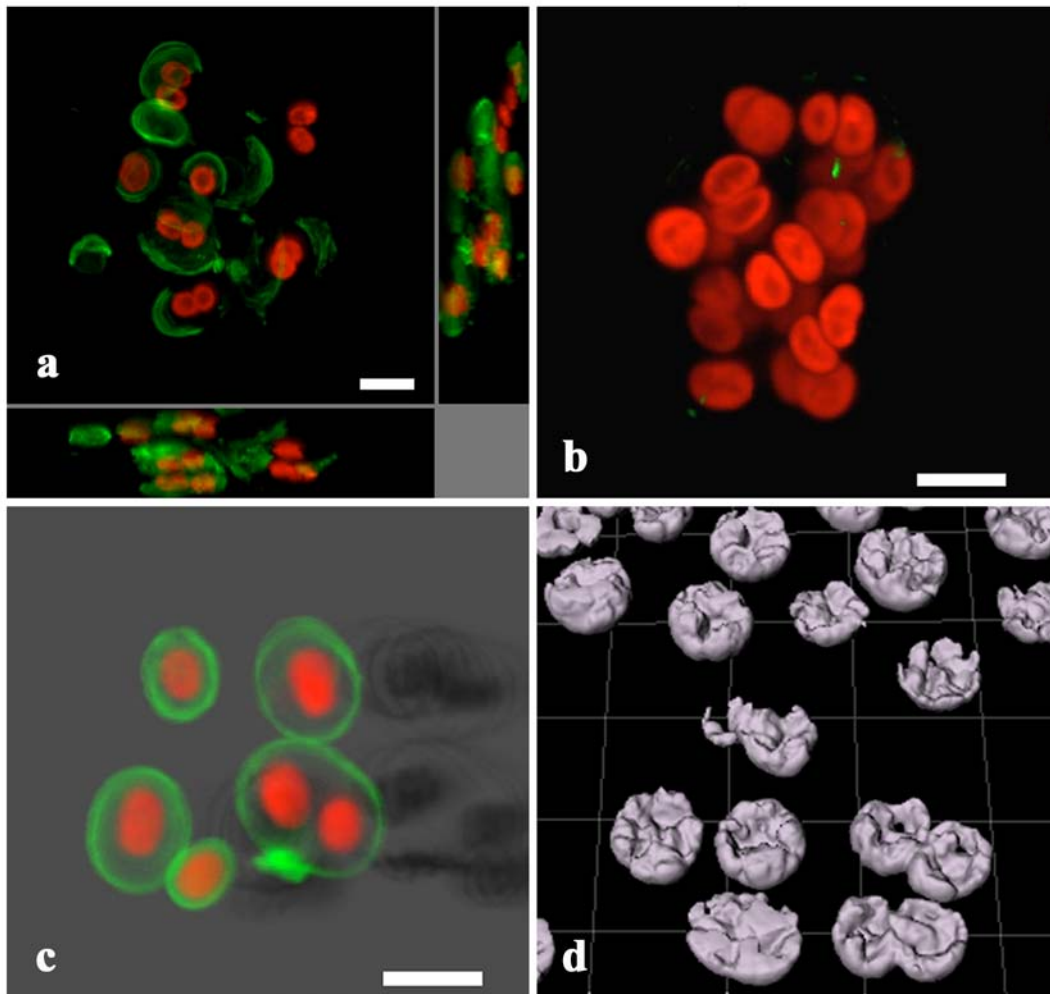


Figure 2. Confocal three-dimensional images. a. Three dimensional extended projection in x-y, x-z and y-z views of optical sections in the z-direction of the biofilm. The colonies grew directly on the surface as flat biofilms, alone with or without sheaths. The thickness of the biofilm = 18.5 – 27  $\mu\text{m}$ . b. Maximum intensity projection showing the shape of the thylakoidal region. c. Simulated fluorescence projection showing the sheaths followed the outline of individual cells or siblings after cell division. Some cells exhibited strong green fluorescence in the outer sheath layers. d. Isosurface reconstruction of thylacoid fluorescence. The 3D representation was composed from 15 slices acquired in steps of 160 nm. Colour key: red = autofluorescence of photosynthetic pigments; green = EPS labelled concanavalin A-Alexa 488. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

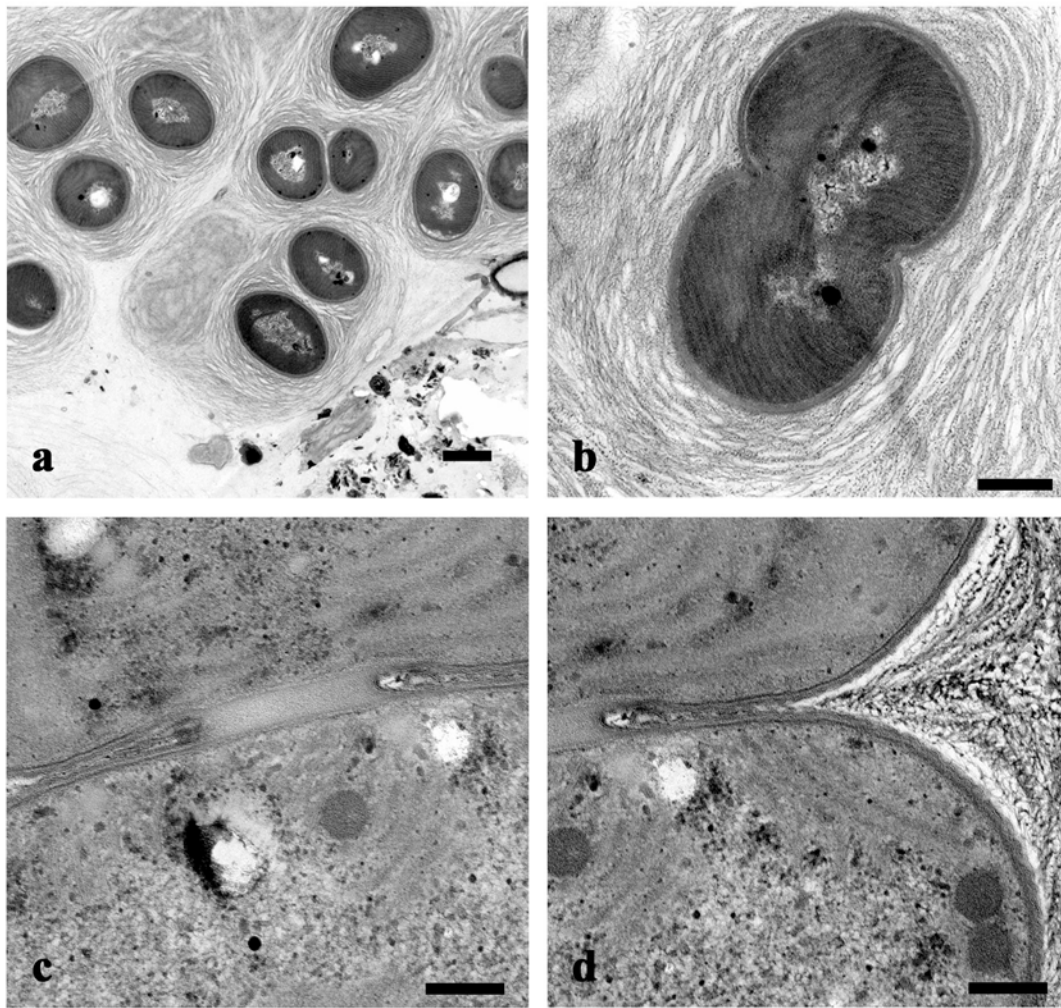


Figure 3. TEM micrographs. a. Groups of more than four cells were not covered by a common sheath. b-d. Binary fission occurred via a constrictive pinching mechanism in which all cell wall layers were involved. Lipid or cyanophycin granules were scarce. The thylakoids were pushed away by the in-growing layers. Thylakoids were radially distributed and arranged perpendicular to the cell walls of the peripheral region. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$  (Fig. a), 0.5  $\mu\text{m}$  (Fig. b), 0.2  $\mu\text{m}$  (Figs. c, d).

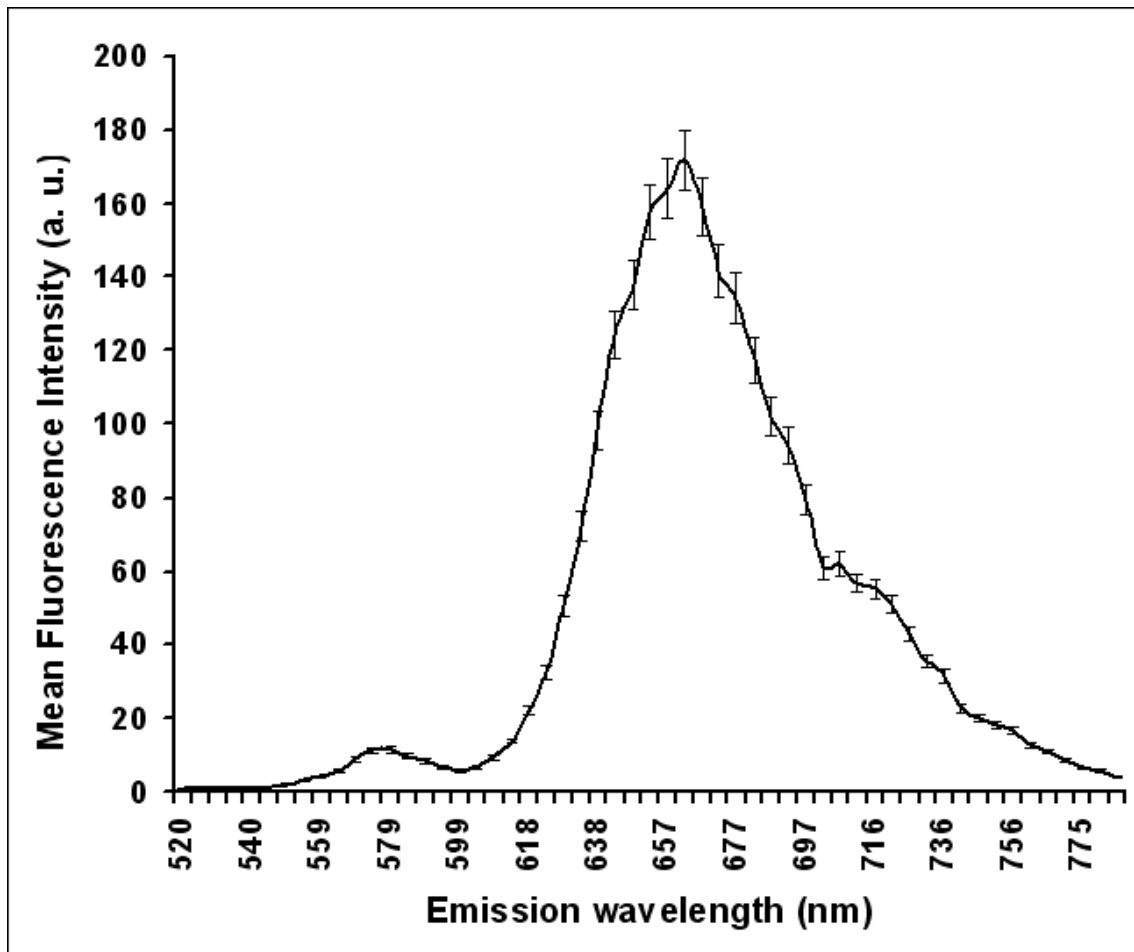


Figure 4. Spectral profiles were derived from a  $\lambda_{exc}$  of 488 nm from an *in vivo* Lambda Scan of *Gloecalita cavernicola* gen nov. sp. nov. The maximum autofluorescence emitted by PE (562-574 nm), PC (648 nm), APC (659 nm) and Chl *a* (676 nm). The Chl *a* fluorescence is much higher than the fluorescence from other pigments in culture conditions. The data used represent the mean  $\pm$  SE from  $n = 50$  cells from the three fields examined.



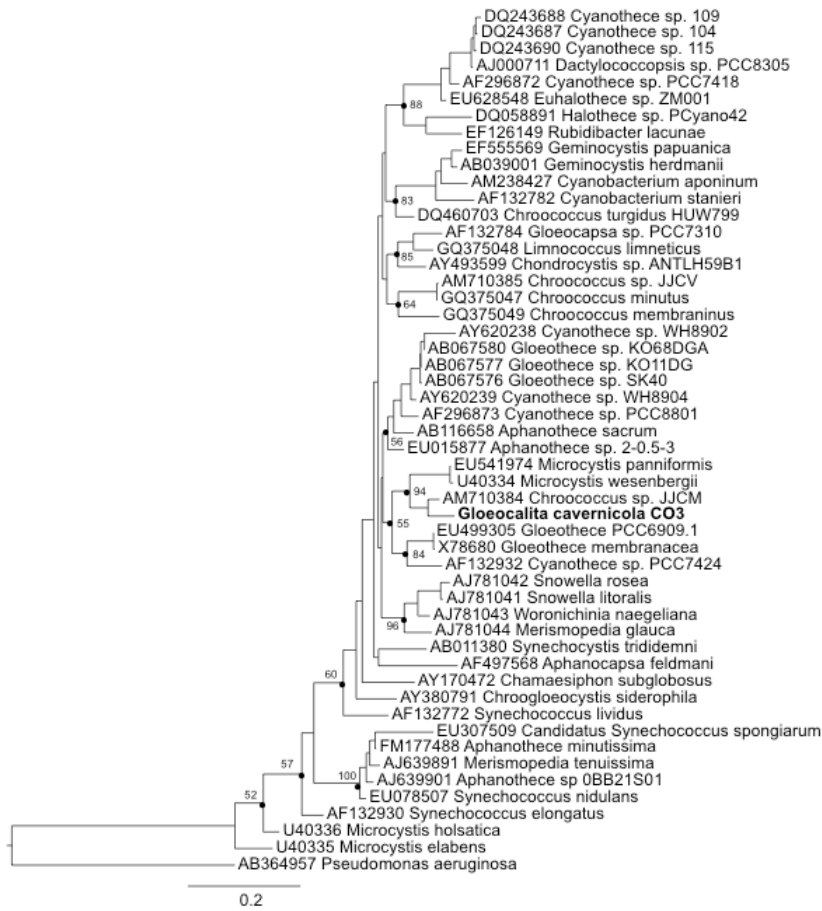


Figure 5. Maximum Likelihood phylogenetic tree of cyanobacteria constructed with 52 complete 16S rDNA sequences (1427 informative positions). ML bootstrap values below 50 are shown for the deeper clades. The scale bar indicates 0.2 substitutions per position.

**Biofilms fotosintéticos: colonización y biodeterioro en las zonas arqueológicas mayas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México)**

Se han estudiado los biofilms fotosintéticos de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México). Se describen los microorganismos que los forman, su distribución dentro del biofilm, la interacción de dichas especies con el sustrato y el biodeterioro que ocasionan. Se emplearon técnicas de microscopía: óptica, confocal (CLSM) y electrónica de barrido (SEM-BSE) acoplada con espectroscopía de energía dispersada (EDS); así como el análisis molecular de las cianobacterias y microalgas. Las cianobacterias y microalgas encontradas tienen en común resistencia alta a la desecación, a la elevada irradiancia y al suministro esporádico de nutrientes. La mayoría de los microorganismos de estas zonas cuentan con estructuras morfológicas y características fisiológicas que facilitan la supervivencia en condiciones adversas.

## **Biofilms fotosintéticos: colonización y biodeterioro en las zonas arqueológicas mayas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México)**

<sup>1</sup>M. Ramírez, <sup>1</sup>M. Hernández-Mariné, <sup>2</sup>P. Mateo, <sup>2</sup>E. Berrendero y <sup>3</sup>M. Roldán

<sup>1</sup>Facultat de Farmàcia, Unitat de Botànica, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici C, Facultat de Ciències, 08193, Bellaterra, Spain

Correspondence to: M.Hernández-Mariné.

E-mail: marionahernandez@ub.edu. Phone: +34934024490.

Fax: +34934035879

### **Resumen**

Se han estudiado los biofilms fotosintéticos de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak (Chiapas, México). Se describen los microorganismos que los forman, su distribución dentro del biofilm, la interacción de dichas especies con el sustrato y el biodeterioro que ocasionan. Se emplearon técnicas de microscopía: óptica, confocal (CLSM) y electrónica de barrido (SEM-BSE) acoplada con espectroscopía de energía dispersada (EDS); así como el análisis molecular de las cianobacterias y microalgas. Las cianobacterias y microalgas encontradas tienen en común resistencia alta a la desecación, a la elevada irradiancia y al suministro esporádico de nutrientes. La mayoría de los microorganismos de estas zonas cuentan con estructuras morfológicas y características fisiológicas que

facilitan la supervivencia en condiciones adversas.

## **Introducción**

Los monumentos históricos forman parte importante de la cultura de un país. Son obras de arte que han permanecido a lo largo de los años y en la actualidad mantienen su valor. En 1981 el área donde se localiza el sitio arqueológico de Palenque fue declarada "Parque Nacional" por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) y en 1987 "Patrimonio de la Humanidad" por UNESCO. Los sitios arqueológicos de Yaxchilán y Bonampak fueron declaradas Monumentos Naturales por decreto presidencial en 1992. Bonampak se encuentra localizado en zona de influencia de la Reserva de la Biosfera de Montes Azules, decretada como tal en 1978.

Desde su descubrimiento, los sitios arqueológicos del sureste mexicano se han visto afectados negativamente por factores físicos, químicos y/o biológicos. En el caso de deterioro en monumentos causado por agentes biológicos, éste se debe principalmente al metabolismo de microorganismos que se organizan formando comunidades complejas adheridas o en forma de agregados que tienen un papel importante para la supervivencia y la reproducción de los microorganismos implicados. El conjunto recibe el nombre de biofilms. Están compuestos por bacterias, cianobacterias, microalgas y hongos, que se desarrollan adheridos a una superficie (material de construcción, paredes rocas, etc.). Los biofilms están formados por las células de los microorganismos colonizadores embebidas en una matriz mucilaginosa. Dicha matriz está formada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que son secretadas por las propias

células. El conjunto muestra características únicas, como la resistencia a los antibióticos, a la luz ultravioleta, a los biocidas químicos y incrementa la producción de metabolitos secundarios (Prakash *et al.* 2003). También los biofilms presentes en monumentos históricos responden a través de estrategias o mecanismos a aquellos factores físicos que afecten o alteren su permanencia en las áreas colonizadas (Warscheid & Braams 2000; Walker & Pace 2007) y pueden dar refugio a las especies que los forman contra la competencia, la predación o las condiciones desfavorables (Korber *et al.* 1994).

Los microorganismos regulan una serie de procesos celulares mediante moléculas llamadas "quorum sensing" (QS). QS es una forma de comunicación intercelular que les permitan actuar de forma coordinada. Su formación depende de la densidad de la población (Miller & Bassler 2001; Sharif *et al.* 2008). Los microorganismos en el biofilm se encuentran en diferentes fases de crecimiento y la actividad de las moléculas QS permite una mayor accesibilidad a los nutrientes y una mejor adaptación a su microambiente. Por ello serán más resistentes y tendrán una respuesta más rápida a las condiciones variables (Costerton *et al.* 1999; Dobretsov *et al.* 2009). El biodeterioro se entiende como una alteración irreversible de materiales debido a la actividad física y/o metabólica de una o más poblaciones de microorganismos. La piedra puede estar colonizada tanto en superficie (epilítica) como en zonas más internas y contener microorganismos de grupos muy diversos entre los que se encuentran bacterias, cianobacterias, algas, hongos tanto de vida libre como liquenizados (Cámara *et al.* 2008). En términos generales, en los monumentos de roca el biodeterioro puede clasificarse en tres

categorías: biofísica, bioquímica y deterioro estético. Dependiendo de los biodeteriólogos involucrados, la naturaleza, y las condiciones ambientales, estos procesos pueden ocurrir simultáneamente o individualmente. El deterioro biofísico de la roca puede ocurrir debido a la presión ejercida sobre la superficie material que rodea el crecimiento o por el movimiento de la superficie del material durante el crecimiento del organismo. Estructuras, como hifas y sistemas radiculares penetran profundamente en la roca generando rupturas y grietas que conllevan daños físicos en la roca. La fragmentación también puede ocurrir debido a la fluctuación de periodos vinculados a ciclos de humedad y desecación. Una vez que la roca es dañada como resultado de procesos biofísicos, es más susceptible a otros factores de deterioro, especialmente los bioquímicos (Kumar & Kumar 1999).

El deterioro bioquímico puede ser el resultado de dos procesos: de asimilación, donde el organismo utiliza la roca como una fuente de nutrientes y procesos de desasimilación, donde el organismo produce una variedad de metabolitos que reaccionan químicamente con la superficie de la roca. El deterioro de la roca debido a la corrosión por metabolitos se produce por la presencia de ácidos orgánicos e inorgánicos. Estos ácidos descomponen la roca en sales y quelatos, en algunos casos pueden ser disueltos y eliminados. Hay que resaltar que un aumento del volumen de sales solubles o quelatos también puede causar tensiones en los poros, formando grietas en el material. Las sales insolubles y quelatos pueden concentrarse o precipitarse en la superficie de roca en forma de costras (Kumar & Kumar 1999).

El objetivo de este trabajo es describir los biofilms fotosintéticos de la zonas arqueológicas mayas de Palenque, Yaxchilán y

Bonampak, evaluar su impacto e identificar los microorganismos fotosintéticos implicados en el proceso de deterioro y su relación con las superficies colonizadas. Esto contribuirá a establecer mecanismos de control para el mantenimiento y conservación de los edificios estudiados.

### **Área de estudio**

El estudio se realiza en el estado de Chiapas. El clima es semicálido húmedo con alternancia de un periodo seco y otro lluvioso (INEGI, 2005). Esta región es una de las regiones más húmedas de México y una de las de mayor precipitación pluvial (SMN-CNA, 2005).

Las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak eran importantes metrópolis político-religiosas de la civilización maya y se sitúan en la exuberante selva Lacandona (Marquina 1951; Ruz 1997).

El material utilizado en la construcción de los monumentos arqueológicos fue principalmente roca caliza. Las calizas son rocas sedimentarias, que contienen más del 80% de carbonato de calcio. La mayoría de ellas son altamente porosas y combinadas con agua se disuelven fácilmente (Pettijohn 1975; Hohmann-Vogrin 2001).

### **Materiales y métodos**

#### **Recolección de material biológico**

Fueron seleccionados diversos puntos de muestreo en cada zona arqueológica: 5 en Palenque (El Palacio) (Fig.1); 2 en Yaxchilán (Edificio 16) (Fig.2) y 3 en Bonampak (Estructuras 8, 6 y 4) (Fig.3).

Parte del material fue preservado con dos tipos de fijadores. En 2% paraformaldehído+0.2% glutaraldehído en tampón cacodilato para la observación de microscopía óptica y electrónica de barrido; y en 3% de paraformaldehído en tampón fosfato 0.1M sacarosa 60mM para la revisión de microscopía confocal con el fin de evitar la autofluorescencia debida al glutaraldehído. Otra parte se preservó en seco (deshidratado con sílica gel) para realizar los cultivos y estudios moleculares.

### **Técnicas empleadas de para la identificación microorganismos y observación de superficies colonizadas**

Para la observación de las muestras se emplearon varias técnicas de microscopía óptica y de alta resolución. Para microscopía óptica se utilizó un microscopio Zeiss Axioplan equipado con un sistema microfotográfico MRc5 AxioCam (Unidad Botánica, Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona). Para examinar la topología de las superficies, la distribución del material inorgánico-orgánico y obtener datos cualitativos de los principales componentes químicos de las superficies (Hernández-Mariné *et al.* 2004). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM-BSE) Quanta 2000 (FEI) equipado con detector LFD (EDAX) (Servicios Científicotécnicos, Universidad de Barcelona),

Para microscopía de barrido láser confocal (CSLM) se empleó un Leica TCS SP5 (Servicio de Microscopía, Universidad Autónoma de Barcelona), para determinar la localización tridimensional de los microorganismos fototróficos, la viabilidad y la relación espacial entre ellos (Hernández-Mariné *et al.* 2004). La autofluorescencia de la



clorofila *a* fue observada en el canal azul (excitación=594 nm, emisión=670-790 nm) y en el canal rojo las ficobiliproteínas (excitación=561 nm, emisión=575-625 nm). La línea 488 nm de láser argón fue empleada en el canal verde para observar los EPS marcados con Con-A (emisión=500-550 nm) y en el canal gris para la observación del sustrato (emisión=480-495 nm). El marcaje mediante Con-A permite observar los mecanismos de adhesión entre los mismos microorganismos y entre estos y el sustrato.

También se realizó la difracción de rayos X (XRD) del material original para dilucidar estructuras cristalinas del sustrato. Para esta técnica se utilizó un difractómetro de geometría Bragg-Brentano PANalytical X'Pert PRO MPD Alpha1) (Servicios Científicotécnicos, Universidad de Barcelona).

#### *Extracción de DNA.*

La extracción de ADN, PCR y análisis moleculares se realizaron en la Universidad Autónoma de Madrid.

El DNA genómico de muestras de campo seco fue extraído y amplificado a partir de la modificación del procedimiento descrito por Berrendero *et al.* (2008). Las muestras provenientes de material seco fueron congeladas en nitrógeno líquido. El DNA se extrajo utilizando un kit UltraClean microbiano (MoBio Laboratories, Laboratorio de Conda SA). El gen RNAr 16S fue amplificado con los siguientes primers (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Edwards *et al.* 1989) y B23S específico para cianobacterias (5'-CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT-3') (Lepère *et al.* 2000).

*La reacción de cadena de la polimerasa (PCR)* se llevó a cabo en un Perkin-Elmer GenAmp PCR System 2400. Las reacciones de PCR

se realizaron volúmenes de 25 µl que contenía 10 pmol de cada primer, 6 µl de extracción de DNA, 200 µM dNTP, 1 µg de BSA, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2.5 µl de tampón de la polimerasa 10x, 5 µl Eppendorf Taqmaster PCR-enhancer, 0.75 U Ultratools DNA polimerasa (Biotools).

*PCR.* Primero se llevo a cabo la desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, tres ciclos a 94°C durante 45 segundos cada uno, un ciclo a 57°C durante 45 segundos, uno a 68°C durante 2 minutos y uno a 68°C durante 7 minutos (GKelis *et al.* 2005). La concentración de los productos amplificados fue comprobada en un gel de agarosa al 1.5%. Los productos de PCR fueron clonados en pGEMR-T Easy Vector Systems (Promega) y transformados en *E. coli*. Los productos fueron purificados mediante el Real Spin Kit de Limpieza (REAL). Finalmente, los productos con el gen RNAr 16S fueron secuenciados en ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y las secuencias analizadas con Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3.1. Las secuencias se obtuvieron para las dos direcciones de forma independiente.

*Análisis filogenético.* Finalmente, las secuencias de los nucleótidos obtenidos fueron comparadas con un BLAST a partir de la información de las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## Resultados y discusión

### *Análisis de superficies*

Los análisis de los elementos del sustrato realizados mediante BSE y EDS en las zonas arqueológicas estudiadas mostraron los mismos elementos, principalmente calcio, magnesio y sílice (Figs. 5-7). Sin embargo, la diferencia se observó en las proporciones de estos elementos. En Palenque y Bonampak las proporciones de calcio y magnesio corresponden a dolomitas (Figs. 5,7), mientras que en Yaxchilán la ausencia de magnesio indica calcitas (Fig.6).

La composición de minerales encontrada en estas zonas arqueológicas concuerda con la de la mayoría de los edificios mayas del sureste mexicano, en que han sido empleadas las calizas como elemento constructivo y en la preparación del mortero y del estuco (Hohmann-Vogrin 2001; McNamara *et al.* 2003). Las calizas y dolomitas son rocas sedimentarias. Las calizas están compuestas mayoritariamente por carbonato cálcico y las dolomitas contienen carbonato de calcio y una proporción de magnesio. Este tipo de roca es altamente porosa y puede presentar una elevada disolución (Pettijohn 1975). En el área maya de Chiapas, la presencia de dolomitas y calcitas microcristalinas, enriquecidas con magnesio, provienen de una plataforma carbonatada marina. Debido a esto, los materiales se conservan mejor en esta área de la región maya que en otras zonas arqueológicas, como Calakmul (Campeche), donde las estelas hechas de elementos calcáreos, que no son ricos en magnesio, están más deterioradas (UNAM-INAH 2011). Sin embargo, Yaxchilán fue construido con calizas carentes de magnesio,

procedentes de una cantera distinta a las de Palenque y Bonampak. Se trata de un sustrato pobre en nutrientes y poros de gran tamaño que no permiten la retención de agua en la mayor parte de las superficies.

La textura de las rocas ha sido propuesta como una de las propiedades con mayor influencia sobre la biorreceptividad (Guillitte 1995), es decir, sobre la potencialidad de una roca para ser colonizada por distintos microorganismos. En el campo del biodeterioro de monumentos, las propiedades físico-químicas del material pétreo, tales como la rugosidad, porosidad y naturaleza mineralógica, son consideradas factores determinantes en su colonización microbiana (Guillite & Dreesen 1995; Prieto *et al.* 2006; Cámara *et al.* 2008). Debido a su composición, porosidad y rugosidad, el mortero es un material fácilmente colonizable por las cianobacterias que forman biofilms y también facilita la adhesión de propágulos transportados por el viento y la acumulación de nutrientes. Este tipo de sustrato se identificó en PA5 (Fig.1) y en la BO3 (Fig.3). Dichas zonas presentaron una gran colonización. Por otra parte, la mayoría de los daños en la piedra en zonas tropicales se deben principalmente a la acción de la humedad. Las constantes lluvias provocan que las sales de la piedra sean disueltas, lo que debilita su estructura por una acelerada erosión de los minerales y favorece así el crecimiento de microorganismos y la vegetación en las superficies (Riederer 1984). El mortero es un sustrato con una gran capacidad de retención de agua, lo que equivale a aumentar la duración del período favorable al crecimiento (Saiz-Jiménez & Ariño 1995; Roldán & Hernández-Mariné 2009).

### *Organismos*

Las observaciones realizadas hasta el momento en microscopía han permitido identificar 12 especies de cianobacterias y una Chlorophyta (Fig. 4). *Gloeocapsa calcicola*, *Scytonema guyanense* y *Asterocapsa divina* han sido las cianobacterias más frecuentes. *S. guyanense* ha sido abundante en las paredes expuestas de los edificios como BO2 (Fig.3). Esta especie presenta vainas gruesas que le permite conservar la humedad, además de contener escitonemina o aminoácidos tipo micosporina (MMAs, micosporine-like amino acids), responsables de la coloración oscura y utilizados como respuesta de fotoprotección contra las longitudes de onda cortas, para así evitar daños por la radiación solar (García-Pichel & Castenholz 1991; Büdel *et al.* 1997; Whitton & Potts 2000). *A. divina* requiere condiciones de humedad elevada (Ramírez *et al.* 2010). Su crecimiento es raramente uniforme, frecuentemente formando manchas en áreas húmedas y su presencia es más aparente en los lugares sombreados como en PA4 (Fig.1) que en los expuestos a insolación, debido a que los últimos se secan más rápidamente (Saiz-Jiménez & Ariño 1995; Ramírez *et al.* 2010).

### *Distribución de los biofilms y biodeterioro*

Las técnicas de microscopía han permitido examinar las superficies colonizadas y describir la estructura de los principales biofilms formados por los microorganismos fotosintéticos y evaluar su penetración (Figs. 5-8) en el sustrato de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak.

Los biofilms con menor número de especies son aquellos que están en zonas interiores de los edificios así como en aquellos que han sido limpiados ya sea mecánica o químicamente como en PA1 (Fig. 1) y en YA2 (Fig. 2). La mayoría de los biofilms formados por cianobacterias mostraron una afinidad por la alta porosidad en el sustrato y por las superficies degradadas.

Los biofilms de *Scytonema guyanense*, *Nostoc cf. commune* y *Trentepohlia aurea* son superficiales al sustrato. En Palenque y Bonampak suelen encontrarse en superficies que presentan pequeño tamaño de poro. Forman biofilms complejos en los que los organismos se encuentran distribuidos en diferentes capas. Los dominados por *S. guyanense* (Fig. 8, d-f) aprovechan los periodos de hidratación debidos a las intensas lluvias, formando biofilms gruesos. Durante el periodo seco forman costras adheridas fuertemente al sustrato, al que posiblemente protegen del intemperismo.

Las cianobacterias cocoides como *Gloeocapsa calcicola*, *G. quaternata*, *Gloeotheca palea* presentes en Palenque y Bonampak (Fig. 8, 10) y *Chroococciopsis* sp. y los filamentos de *Leptolyngbya* sp. en Yaxchilán forman biofilms adheridos estrechamente a partículas del sustrato y, en algunos casos, dentro de los poros y grietas preexistentes (Fig. 9). La colonización casmoendolítica por parte de estas Chroococcales contribuye a aumentar la capacidad del sustrato como bioreceptor por la mayor retención de agua y ensanchamiento de las grietas preexistentes. Se encuentran en zonas protegidas, paredes interiores con humedad persistente o formando películas por debajo de la superficie, que contribuyen a exfoliar y desprender finas láminas. En primer lugar, se produce un deterioro mecánico mediante la formación de películas microbianas. Los granos

de minerales y partículas, junto con los EPS de los organismos, acumulan agua y a ellos se adhieren partículas de diferentes tamaños. En el interior del sustrato, mediante contracciones y expansiones de las películas, se incrementan los cambios mecánicos producidos por los ciclos hidratación-deseccación contribuyendo a la destrucción gradual de los materiales (Saiz-Jiménez & Ariño 1995; Prieto & Silva 2005; Prieto *et al.* 2006). Su localización subsuperficial o en grietas y fisuras dificulta la erradicación con tratamientos superficiales.

En Yaxchilán sólo se encontraron *Chroococcidiopsis* sp. y filamentos de *Leptolyngbya* sp. adheridos fuertemente a la superficie o creciendo entre los poros y grietas del sustrato (Fig. 9). La condición casmoendolítica de *Chroococcidiopsis* sp. podría favorecer la acidificación del sustrato y estar asociado al fenómeno de desprendimiento o exfoliación de láminas en las zonas colonizadas (Büdel *et al.* 2004). La baja diversidad de organismos es coherente con la estructura del sustrato, que presenta poros grandes (Fig. 4), ligados a una baja capacidad de retención de agua y esto, unido al ambiente extremófilo durante una parte del año, determinar la escasa colonización de microorganismos fotosintéticos (Warscheid *et al.* 1993; Warscheid & Braams 2000).

También se han observado biofilms de color naranja-rojizos, dominados por el clorófito filamentoso *T. aurea*, especialmente abundante sobre el mortero de PA5 (Fig. 1) y en BO3 (Fig. 3). En Palenque, ocasionalmente, se han observado hifas acompañando a esta Chlorophyta.

## Conclusiones

En las zonas arqueológicas estudiadas existe una abundante colonización por comunidades fototróficas, que demuestra que estas superficies son biorreceptivas al crecimiento de este tipo de microorganismos. En Palenque y Bonampak se encuentra mayor número de especies que ocupan diferentes nichos ecológicos. En Bonampak, zona prácticamente sin intervenciones, se encuentran biofilms con un desarrollo exuberante. Sin embargo, el sustrato está relativamente bien conservado. Esto podría ser atribuido a la presencia de *S. guyanense* y *N. cf. commune*, especies que forman biofilms superficiales, que podrían tener una función protectora contra el intemperismo y la colonización de otros agentes. Palenque es una zona con características abióticas similares y la misma composición de especies, pero el crecimiento de los biofilms es menos exuberante. Esto es debido a la limpieza habitual con biocidas y otras intervenciones realizadas en alguno de los edificios, ya que se trata de uno de los monumentos más importantes de la zona. Sin embargo, se ha detectado un importante crecimiento casmoendolítico. Este tipo de colonización contribuye a aumentar la capacidad del sustrato como bioreceptor y éste aparece notablemente deteriorado. Por último, en Yaxchilán, cuyo sustrato es poco favorable para el crecimiento, sólo se observó crecimiento en oquedades o casmoendolítico profundo de dos especies resilientes, *Chroococcidiopsis* sp. y *Leptolyngbya* sp.

Estos resultados indican que se deberá realizar un programa de control a medida para cada zona de estudio. En la zona de Bonampak donde existen biofilms formados por *S. guyanense* y *N. cf. commune*



no se recomienda ninguna intervención debido a que estos biofilms tienen una función protectora del sustrato. En Palenque y Bonampak, los biofilms formados por *T. aurea* deberán eliminarse de forma mecánica en el inicio o final de la época lluviosa debido a que es más fácil el desprendimiento y sus estructuras reproductoras no están todavía desarrolladas. Por último, en Yaxchilán es poco viable realizar un tratamiento efectivo. Los microorganismos fotosintéticos penetran profundamente en la piedra y no es factible la limpieza mecánica, debido a la pérdida de sustrato por arrastre. Este tipo de crecimiento en grietas y fisuras hace más difícil su erradicación con tratamientos superficiales. En estos casos, la utilización de biocidas conjuntamente a permeabilizantes o quórum sensing podría aumentar la efectividad del tratamiento.

## Referencias

- Berrendero E., Perona E. & Mateo P. (2008): Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:447-460.
- Büdel B., Karsten U. & Garcia-Pichel F. (1997): UV-absorbing scytonemin and mycosporine-like amino acid derivatives in exposed, rock inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112:165-172.
- Büdel B., Weber B., Köhl M., Pfanz H., Sültemeyer D. & Wessels D. (2004): Reshaping of sandstone surfaces by cryptoendolithic cyanobacteria: bioalkalization causes chemical weathering in arid landscapes. *Geobiology* 2:261-268.
- Edwards U., Rogall T., Blockerl H., Emde M. & Bottger E.C. (1989): Isolation and direct complete nucleotide determination of entire

genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucl. Acids Res. 17:7843-7853.

Cámara B., De los Ríos A., García-del-Cura M.A., Galván V. & Ascaso C. (2008): Dolostone bioreceptivity to fungal colonization. *Materiales de Construcción*. 58:113-124.

Costerton J.W., Stewart P.S., & Greenberg E.P. (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (Wash DC)* 284:1318-1322

Dobretsov S., Teplitski M. & Paul V. (2009): Quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 25:413-427.

García-Pichel F. & Castenholz R.W. (1991): Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J. Phycol.* 27:395-409.

Gkelis S., Rajaniemi P., Vardaka E., Moustaka-Gouni M., Lanaras T. & Sivonen K. (2005): *Limnothrix redekei* (Van Goor) Meffert (Cyanobacteria) strains from Lake Kastoria, Greece form a separate phylogenetic group. *Microb. Ecol.* 49:176-82.

Guillite O. & Dreesen R. (1995): Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials. *Sci. Total Environ.* 167:365-374.

Hernández Mariné M., Clavero E. & Roldán M. (2004): Microscopy methods applied to research on cyanobacteria. *Limnetica* 23:179-186

Hohmann-Vogrin A. (2001): Unidad de Espacio y Tiempo: La Arquitectura Maya. In: E. Eggebricht & M. Seidel (Eds). *Los Mayas: Una civilización milenaria*. 191 pp.

Korber D.R., James G.A. & Costerton J.W. (1994): Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1663-1669.

- Kumar R. & Kumar A. (1999): Biodeterioration of stone in tropical environments. An overview. The Getty Conservation Institute. Los Angeles, 95 pp.
- Lepère C., Wilmotte A. & Meyer B. (2000): Molecular Diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Syst. Geog. Plants.* 70:275-283.
- Marquina, I. (1951). *Memorias del Instituto Nacional de Antropología e Historia I: Arquitectura Prehispánica.* México, D.F. INAH-SEP. 1055 pp.
- McNamara C.J., Perry T.D. & Zinn M. (2003): Microbial processes in the deterioration of Mayan archaeological buildings in southern Mexico. In: Koestler R.J., Koestler V.H., Charola A.E. & Nieto-Fernandez F.E. (Eds). *Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art.* New York, NY: The Metropolitan Museum of Art.
- Miller M.B. & Bassler B.L. (2001): Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55:165-99.
- Prakash B., Veeregowda B.M., Krishnappa G. (2003): Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* 85:1299-1307.
- Pettijohn, F. J. (1975): *Sedimentary rocks.* New York, USA. Harper & Row, Publishers. 628 pp.
- Prieto B. & Silva B. (2005): Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *Int. J. Biodet. Biodegr.* 56:197-252.
- Prieto P., Silva B., Aira N. & Álvarez L. (2006): "Toward a definition of a bioreceptivity index for granitic rocks: Perception in the change in appearance of the rock". *Int. J. Biodet. Biodegr.* 58:150-154.
- Ramírez M., Hernández-Mariné M., Novelo E. & Roldán M. (2010): Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. *Biofouling* 26:399-409.

- Roldán M. & Hernández-Mariné M. (2009): Exploring the secrets of the three-dimensional architecture of phototrophic biofilms in caves. *Int. J. Speleol.* 38:41-53.
- Riederer J. (1984): The restoration of archeological monuments in the tropical climate. In: ICOM Committee for Conservation Preprints, 7th Triennial Meeting, Copenhagen. pp. 21-22.
- Ruz A. (1997): La civilización de los antiguos mayas. - Fondo de Cultura Económica, México, D.F. 71 pp.
- Saiz-Jiménez C. & Ariño X. (1995). Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos. *Materiales de Construcción.* 240:5-16.
- Sharif D.I., Gallon J., Smith C.J. & Dudley E. (2008): Quorum sensing in Cyanobacteria: N-octanoyl-homoserine lactone release and response, by the epilithic colonial cyanobacterium *Gloeothece* PCC6909. *The ISME Journal* 2:1171-1182.
- Walker J.J. & Pace N.R. (2007): Endolithic microbial ecosystems. *Ann Rev Microbiol* 61:331-347.
- Warscheid Th., Becker Th., Braams J., Brüggerhoff S., Gehrman C., Krumbein W.E. & Petersen K. (1993): Studies on the temporal development of microbial infection of different types of sedimentary rocks and its effect on the alteration of the physico-chemical properties in building material. In: *Conservation of Stone and Other Materials Vol. I* (ed. Thiel, M.-J.), pp. 303-310. E & FN, London.
- Warscheid T. & Braams J. (2000): Biodeterioration of stone: a review. *Int Biodegr Biodet* 40:343-368.
- Whitton B.A and M. Potts. (2000). *The Ecology of Cyanobacteria.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 669 pp.

Figura 1. Descripción de los puntos de muestreo en Palenque. Se observa deterioro estético en todos los puntos de muestreo.

Edificio	Punto de muestreo	Descripción del punto de muestreo	Detalle del biofilm	Descripción del biofilm
Palacio	PA1	Detalle decorativo, medallón que presenta fisuras y desprendimiento de material. Se forman pequeñas hojuelas del recubrimiento dejando expuesto el material. Es un área semi-expuesta, la radiación solar no es directa. La humedad se mantiene alta por largos periodos de tiempo.		Película verde oliva fuertemente adherida. De textura áspera.
Palacio	PA2	Pilastra con mancha que forma escurrimiento. No hay fisuras. Durante la época seca se dificulta el desprendimiento del biofilm lo que conlleva al desprendimiento del sustrato. Es un área cubierta, la luz solar llega indirecta y la humedad es permanente a lo largo del año.		Crecimiento continuo de textura rugosa (granulosa).
Palacio	PA3	Pilastra con manchas sobre el recubrimiento y decorados. Hay algunas fisuras y pérdida de material cuando el biofilm está seco. Área expuesta, radiación solar directa, evaporación elevada.		Biofilm mucilaginoso de coloración verde oscuro a marrón, epilítico y entre fisuras.
Palacio	PA4	Muro interior con aplanados. Desprendimiento de material original. Es un punto semi-expuesto, radiación solar directa. Mantiene la humedad relativa elevada la mayor parte del año.		Biofilm continuo de color negro, textura suave y de fácil desprendimiento.
Palacio	PA5	Muro exterior. Sobre material de construcción, roca y mortero. Se trata de un área expuesta, con radiación solar directa.		Biofilm grueso y continuo. En ocasiones mucilaginoso y de color anaranjado a marrón.

Figura 2. Descripción de los puntos de muestreo en Yaxchilán. Se observa deterioro estético en todos los puntos de muestreo.

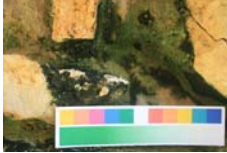

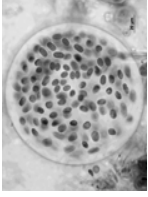
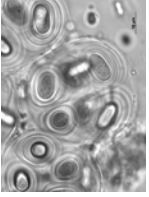
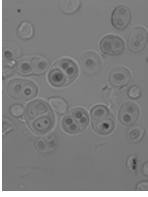
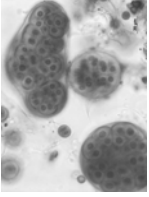
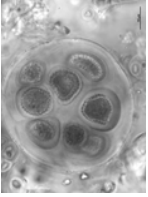
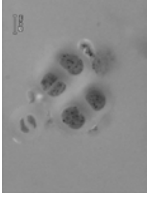
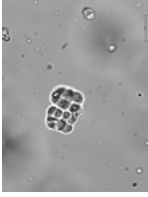
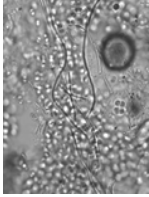
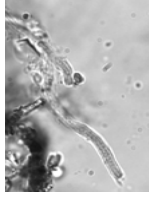
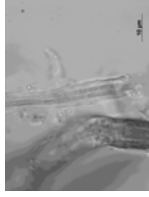
<b>Edificio</b>	<b>Punto de muestreo</b>	<b>Descripción del punto de muestreo</b>	<b>Detalle del biofilm</b>	<b>Descripción del biofilm</b>
Edificio 16	YA1	Acabado decorativo, sobre dintel y juntas de muro (mortero). Deterioro estético. Área semi-expuesta con evaporación baja.		Película verde botella, que parece una pasta. Forma granos finos al tacto. No desprende material.
Edificio 16	YA2	Juntas de muro (mortero). Con pérdida de material durante la época seca. Punto semi-expuesto y evaporación baja.		Crecimiento continuo, verde intenso. Adherido fuertemente al sustrato con desprendimiento de material. En la época más seca hay presencia de hongos.

Figura 3. Descripción de los puntos de muestreo en Bonampak. Se observa deterioro estético en todos los puntos de muestreo.




<b>Edificio</b>	<b>Punto de muestreo</b>	<b>Descripción del punto de muestreo</b>	<b>Detalle del biofilm</b>	<b>Descripción del biofilm</b>
Estructura 8	BA1	Muro exterior, material de construcción. En la época seca hay pérdida de material. Área expuesta cubierta por el dosel de los árboles, radiación solar indirecta y baja evaporación.		Crecimiento continuo verde oscuro a negro, de textura suave. Fuertemente adherida al sustrato que desprende material.
Estructura 6	BA2	Muro exterior, en junta y recubrimiento. Pérdida de material. Área expuesta con radiación solar directa y evaporación elevada.		Crecimiento continuo de color negro y de textura pastosa. Desprendimiento difícil que arrastra sustrato.
Estructura 4	BA3	Muro exterior, detrás de estructura 4. Área semi-expuesta con radiación solar indirecta. Humedad elevada la mayor parte del año.		Crecimiento globoso de color pardo y naranja intenso. Desprendimiento fácil del sustrato.

Figura 4. Especies identificadas en las Zonas arqueológicas de Palenque, Bonampak y Yaxchilán.

Taxa	Morfométricos					Localización			Figura
	1	2	3	4	5	Palenque (PA)	Bonampak (BO)	Yaxchilán (YA)	
<b>Cyanobacteria</b>									
Chroococcales									
Synechococcaceae									
Aphanotheceidae									
<i>Aphanothece castagnei</i> (Brébisson) Rabenhorst	x			x	x	x			
Ancho de las células de 2.6-(4.6)-6.6 μm; largo de 4.1-(5.6)-7.2 μm.									
<i>Gloeothece palea</i> (Kütz.) Rabenhorst	x	x	x	x	x				
Ancho de las células 2.3-(2.4)-2.6 μm; con vaina 4.6-(7.9)-11.2 μm. Largo de 2.6-(4.9)-7.26 μm; con vaina 6.6-(9.2)-11.8 μm.									
Microcystaceae									
<i>Gloeo capsa calcicola</i> Gardner	x	x	x	x	x	x	x	x	
Diámetro de las células 2.6-(3.3)-4.2 μm; con vaina 9.2-(13.8)-18.5 μm.									
<i>Gloeo capsa quaternata</i> Kützing	x	x	x	x	x	x	x	x	
Ancho de las células 2.3-(2.9)-3.5 μm; con vaina 5-(5.7)-6.5 μm. Largo 3.2-(5.3)-7.5 μm; con vaina 6-(7.2)-8.5 μm.									
Chroococcaceae									

<i>Asterocapsa divina</i> Komárek	Diámetro de las colonias 13.3-(63.9)-114.5 $\mu\text{m}$ . Diámetro de las células 6.6-(9.9)-13.3 $\mu\text{m}$ ; largo 9.9-(12.4)-14.9 $\mu\text{m}$ . Diámetro de las células con vaina 9.9-(25.7)-41.5 $\mu\text{m}$ .	x	x	x	x	
<i>Chroococcus</i> cf. <i>schizodermaticus</i> W. et G.S. West	Diámetro de las colonias 7-(13.5)-20 $\mu\text{m}$ . Diámetro de las células 4-(8.5)-13 $\mu\text{m}$ ; largo 5-(10.5)-16 $\mu\text{m}$ .	x				
Xenococcaceae						
<i>Chroococcidiopsis</i> sp.	Diámetro de las colonias 8.47-(8.07)-7.60 $\mu\text{m}$ . Diámetro de las células 2.72-(2.23)-1.99 $\mu\text{m}$ .				x	
Oscillatoriales						
Pseudoanabaenaceae						
Leptolyngbyoideae						
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>compacta</i> (Kützing ex Hansgirg) Komárek et Anagnostidis	Diámetro del filamento 1.5-(1.7)-2 $\mu\text{m}$ . Diámetro células del tricoma 1.3-(1.6)-2 $\mu\text{m}$ ; largo 1.9-(2.6)-3.3 $\mu\text{m}$ ;	x	x	x	x	
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Diámetro de filamento 1.16-(1.03)-0.92 $\mu\text{m}$ . Diámetro células del tricoma 1.24-(0.92)-0.71 $\mu\text{m}$ ; largo 2.21-(2.01)-1.79 $\mu\text{m}$ .				x	
Schizotrichaceae						
<i>Schizothrix</i> sp.	Diámetro de tricomas 2.4-(4.1)-5.7 $\mu\text{m}$ . Diámetro de las células 3.7-(7.3)-11 $\mu\text{m}$ .				x	



Nostocales							
Scytonemataceae							
<i>Scytonema guyanense</i> (Mont.) Bornet et Flahaut		x	x	x	x		
	Diámetro de las células del tricoma 4.9-(9.5)-14.1 µm; largo 3.4-(9.2)-14.9 µm. Diámetro del heterocisto 3.4-(9.2)-14.9 µm; largo 5.5-(10.8)-16.1 µm. Diámetro del filamento 8.3-(10.5)-12.7 µm.						
Nostocaceae							
<i>Nostoc</i> cf. <i>commune</i> Vaucher ex Bornet et Flahaut		x	x	x	x		
	Diámetro de las células 5.8-(6.6)-7.4 µm; largo 4.9-(7.4)-9.9 µm. Diámetro del heterocisto 6.6-(7.4)-8.3 µm; largo 7.4-(7.8)-8.3 µm.						
<b>Chlorophyta</b>							
Trentepohliophyceae							
Trentepohliales							
<i>Trentepohlia aurea</i> (Linn) Martius		x	x	x	x		
	Diámetro de las células juveniles 3.9-(16.7)-29.5 µm; largo 3.9-(13.6)-23.2 µm. Diámetro de las células maduras 9.9-(18.2)-26.5 µm; largo 18.2-(35.2)-52.1 µm. Diámetro del esporociste 15.8-(22.1)-28.2 µm; largo 17.8-(25.5)-33.2 µm.						

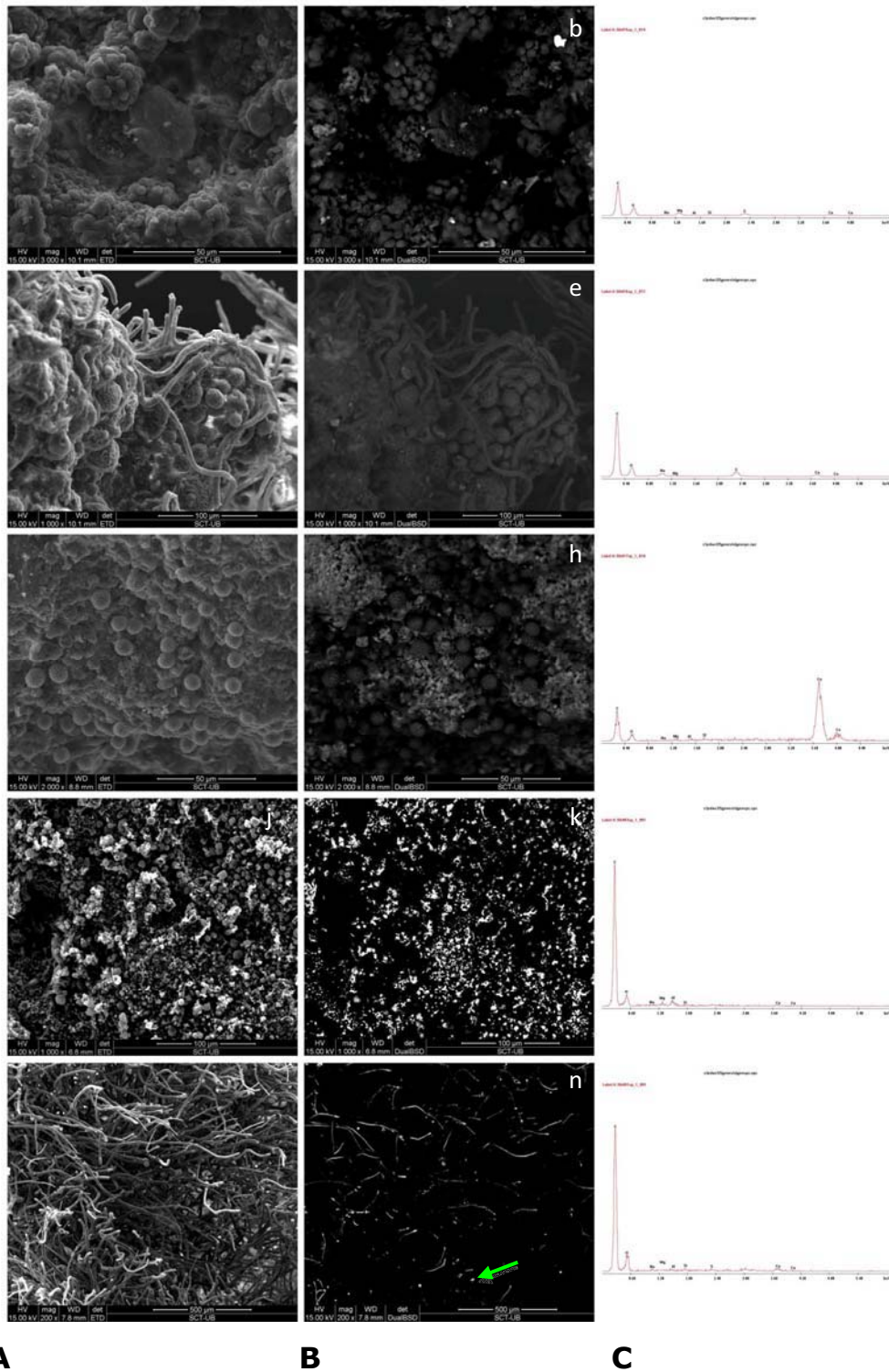


Figura 5. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM-BSE-EDS). Detalle de las superficies colonizadas en los sitios muestreados de el Palacio, Palenque. (A = microorganismos; B = sustrato; C = composición química). (a-c) PA1. Chroococcales con restos de sustrato. (d-f) PA2. Los filamentosos son las formas dominantes. No se observan depósitos de material inorgánico. (g-i) PA3. Células solitarias y colonias de Chroococcales. Se revelan material inorgánico alrededor de los microorganismos. (j-l) PA4. Colonias de *Leptolyngbya* sp. y otros microorganismos casmoendolíticos. (m-o) PA5. Filamentos de *Trentepohlia aurea*. No se observa sustrato.

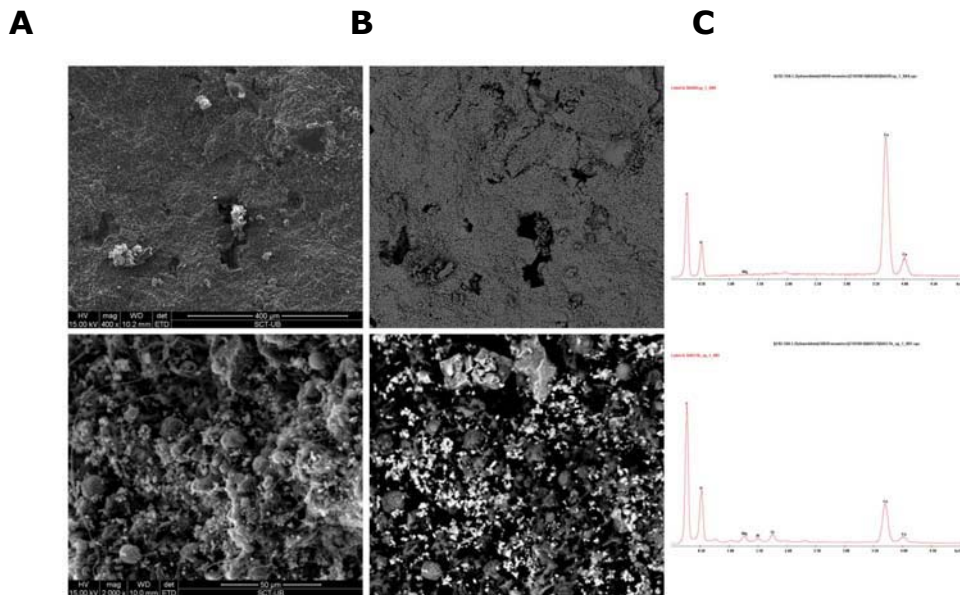


Figura 6. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM-BSE-EDS). Detalle de las superficies colonizadas en los sitios muestreados del Edificio 16, Yaxchilán. (A = microorganismos; B = sustrato; C = composición química). (a-c) YA1. La superficie del sustrato no presenta colonización (d-f) YA2. Microorganismos aislados y en grupos en las grietas, fisuras y poros de la roca.

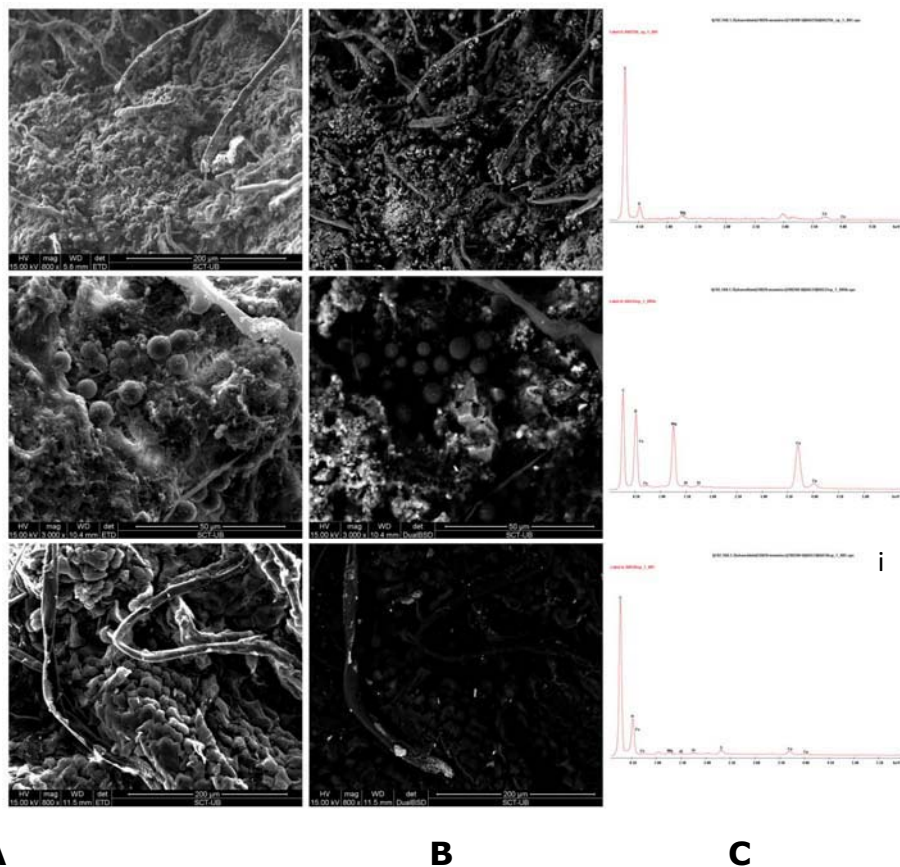


Figura 7. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM-BSE-EDS). Detalle de las superficies colonizadas en los sitios muestreados de Bonampak. (A = microorganismos; B = sustrato; C = composición química). (a-c) BO1. Filamentos de *Scytonema guyanense* y *Trentepohlia aurea* con restos de sustrato. (d-f) BO2. Chroococcales con restos de sustrato y depósitos de material inorgánico sobre los microorganismos. (g-i) BO3. filamentos de *Trentepohlia aurea* con restos de sustrato.

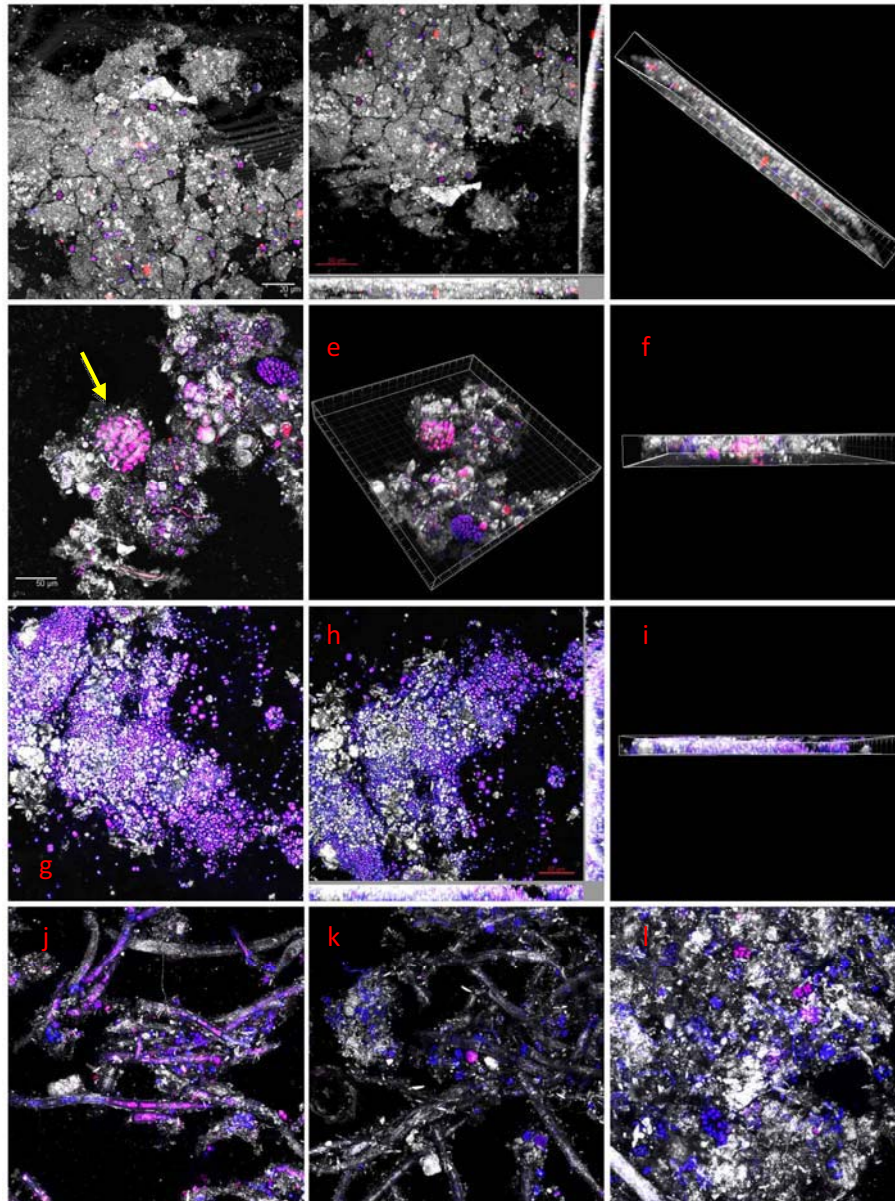


Figura 8. Imágenes de Microscopía Láser Confocal (CSLM). Distribución de biofilms fotosintéticos en el Palacio, Palenque. (fluorescencia = ● clorofila *a*; ● ficobiliproteínas; ● sustrato). Los filamentos de *Scytonema guyanense* y *Trentepohlia aurea* son comunes. Su distribución en el sustrato es superficial. (a-c) PA1. Chroococcales en las fisuras de la roca, No se observan cianobacterias filamentosas. (d-f) PA2. Diversidad de microorganismos casmoendolíticos. Estadios de Chroococcales y filamentos. (g-i) PA3. *Asterocapsa divina* entre restos de material. (j-l) PA5. Filamentos de *Trentepohlia aurea* y chroococcales en el interior de la roca.

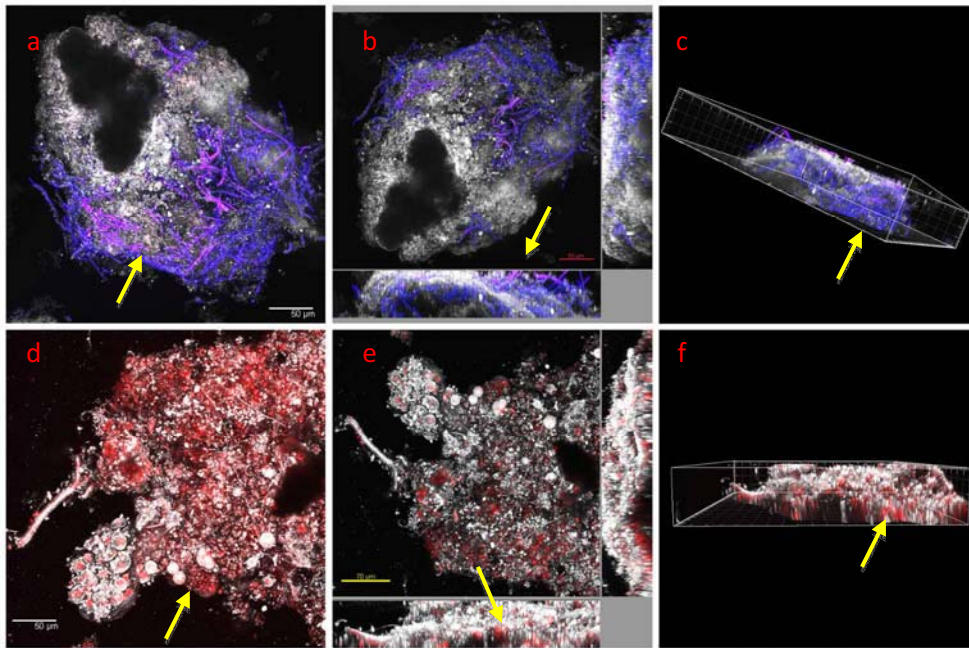


Figura 9. Imágenes de Microscopía Láser Confocal (CSLM). Distribución de biofilms fotosintéticos en Yaxchilán. (Fluorescencia = ● clorofila *a*; ● ficobiliproteínas). (a-c) YA1. Distribución de los filamentos de *Leptolyngbya* cf. *compacta* en la parte superficial del sustrato. (d-f) YA2. Células solitarias marcadas en color rojo. Esto indica la ausencia de clorofila *a*, que puede corresponder a restos de células muertas.

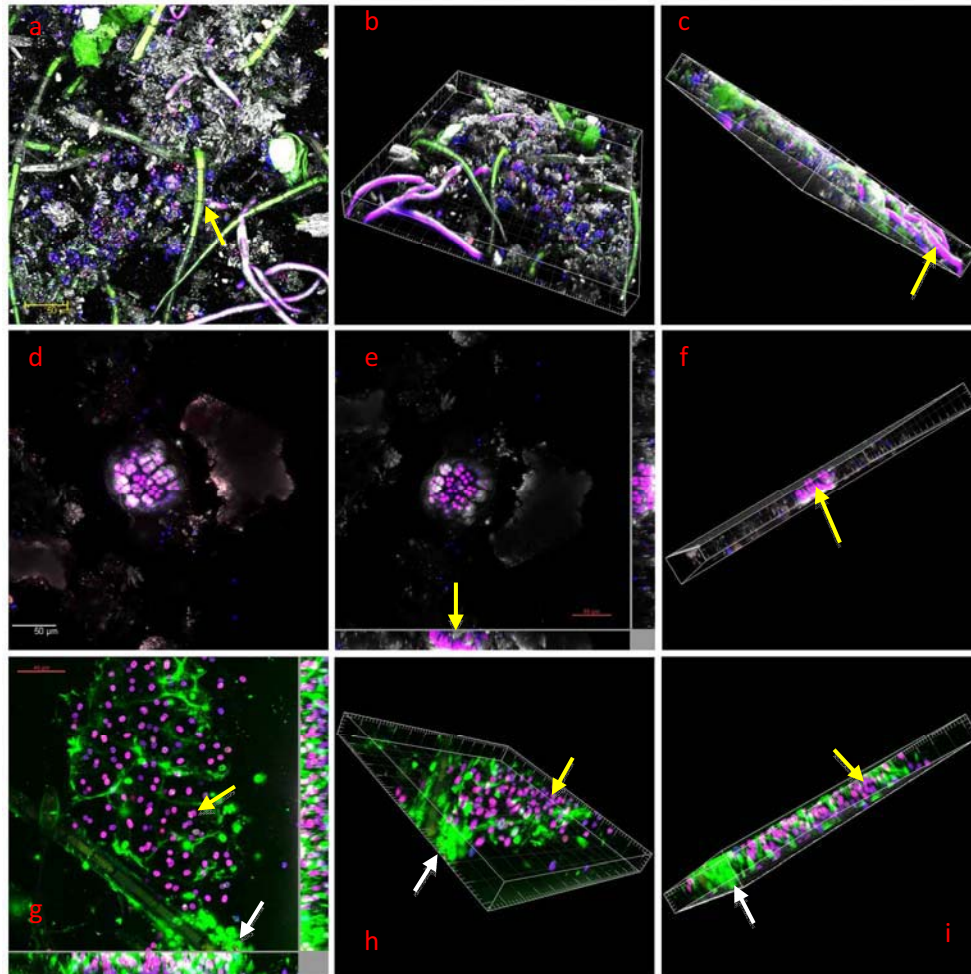


Figura 10. Imágenes de Microscopía Láser Confocal (CLSM). Distribución de biofilms en Bonampak. (Fluorescencia = ● clorofila a; ● ficobiliproteínas. ● (EPS) sustancias poliméricas extracelulares marcadas con Concanavalina A) (a-c) BO1. Crecimiento epifítico de filamentos de *Scytonema guyanense*, *Trentepohlia aurea*, *Leptolyngbya cf. compacta* y Chroococcales. (d-f) BO2. Colonias de Chroococcales en fisuras de la roca. (g-i) BO3. Filamentos de *Trentepohlia aurea* y colonias de *Asterocapsa divina* con envueltas mucilaginosas.

## 9. Agradecimientos

Después de un largo proceso ... finalmente el ciclo se cierra. Durante este tiempo he tenido la fortuna de conocer a mucha gente que sin duda han dejado una huella importante en mi vida, por eso en este pequeño espacio quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todos.

Primero quiero agradecer a la Dra. Mariona Hernández por ser la "madre académica" que todo doctorando quiere tener, por su infinita paciencia y su gran calidad humana. A la Dra. Mònica Roldán por ser un gran ejemplo, por su tiempo dedicado y las facilidades para llevar a término este proceso pero sobre todo por su sincera amistad.

Gracias también a todos los profesores y personal de la Unidad de Botánica por su buena disposición en todo momento y por hacerme sentir como en casa: Dr. Blanche, Dr. Molero, Dra. Rovira, Dra. Bosch, Dr. Simon, Dra. Suárez, Dr. Seoane, Dr. Benedí, Dr. Vallès, Dr. Martín, Dra. Barceló, Dra. Gómez, Dra. Ribera y Dr. Rull. A Pep Vicens y Marius Mumbrú. A Pili y Sonia.

A los compañeros de Botánica: Noe Salvador, Reneé, Noemí Montes, Mane, Sergi, Sònia García por compartir el día a día. De manera especial a Jaume, Kiko, Giancarlo y mi querida Esperançeta.

Este trabajo no sería el mismo sin la valiosa **Ayuda Técnica** de muchas personas. La grata compañía en las largas horas de microscopio que en ocasiones estaban acompañadas de un café con charlas llenas de conocimientos y experiencias.

### **Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona**

*Microscopia electrónica de transmisión:* Núria Cortadellas, Eva Fernández y Almudena García. *Microscopia electrónica de barrido:* Ana Domínguez, Javier García y Eva Prats. *Difracción de rayos X:* Xavier Alcobé.

### **Servicio de Microscopía. Universidad Autónoma de Barcelona**

M<sup>a</sup> Dolors Baró, Onofre Castell, Mònica Roldán, Helena y Nùria.

**Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid** a la Dra. Pilar Mateo y Dra. Esther Barrendero. Por su gran disposición pero sobre todo por su amistad.

**Departamento de Biología Comparada. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México** al Dr. Eberto Novelo, M.C. Guadalupe Vidal y Biol. Erika Loyo. Por lo bien que lo pasamos en las campañas de recogida de muestras.

**Instituto Nacional de Antropología e Historia.** *Dirección de la Escuela Nacional de Antropología e Historia:* Dr. Alejandro Villalobos por ser parte importante en esta "aventura académica". *Coordinación Nacional de Conservación del Patrimonio Cultural:* Mtra. Dulce M. Grimaldi, Rest. Xochiquetzal Rodríguez, D.G. Cuauhtémoc Rodríguez. *Dirección de las zonas arqueológicas de Palenque, Yaxchilán y Bonampak* por todas las facilidades en la recogida de muestras.

Comenzar un nuevo ciclo en **Greenaltech** ha sido la mayor motivación para finalizar este trabajo. Agradezco a Olga, Jordi y Jaume la confianza depositada. A Derek y Xavi, más que compañeros de trabajo, buenos amigos.

Gracias también a todas las personas que de una u otra manera, tanto en México como en Barcelona, han estado en este largo camino llamado "Tesis" ... siempre con una sonrisa, muestras de cariño y ánimos.

A mis hermanos Marcelos ... Rosita, Liher, Enric y Saúl.

A mi familia catalana ... Ana y Lluís (mis padres), Laura, Montse, Sara, Eli, Josep, David, Artur, Vanesa, M<sup>a</sup> Carmen, Oscar, Olga, Zaira, Miriam, Rubén, Sergio, Miquel y Gloria por ser la energía de cada mañana.

A los entrañables amigos ... Betsa, Flor, Karla, Eva, Laura, Virginia e Irian.

A Javier, el culpable de que las algas sean parte de mi vida.

A mis hermanos ... Ricardo, Esperanza, Miguel y Manuel por todo su amor y cuidados.



**Hermano** ... lo que ya sabemos, que la distancia y el tiempo solo fortalecen lo nuestro y que no hay palabras para demostrarlo, si solo se siente.

**Papi**, sabes que significas mucho y eres lo más importante en mi vida ... gracias por todo y más.

**Mami** ... por siempre presente.