



**Universidade de Santiago de Compostela  
Escola Técnica Superior de Enxeñaría  
Máster Universitario en Enxeñaría Ambiental**

**Efecto da radiación UV-B e da  
combinación da temperatura e o CO<sub>2</sub> sobre  
a ecofisioloxía dos organismos  
colonizadores do patrimonio cultural  
granítico.**

Diana Pérez Velón

Santiago de Compostela, 2021

# Índice

Resumo.....	1
<b>1. Introducción .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Escenario futuro de cambio climático: variacións da temperatura, concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> e dos patróns de luz ultravioleta.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Cambio climático e conservación do Patrimonio Cultural.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Resposta dos biofilms subaéreos ás variacións ambientais.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Obxectivo .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Material e métodos.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Experimento temperatura-CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.1. Biofilm: cultivos iniciais e preparación do inóculo .....</b>	<b>11</b>
3.1.1.1. <i>Cepas utilizadas e condicións de cultivo .....</i>	11
3.1.1.2. <i>Purificación de cultivos existentes .....</i>	12
3.1.1.3. <i>Cuantificación da biomasa e da densidade óptica.....</i>	12
3.1.1.4. <i>Preparación do cultivo mixto 1:1 .....</i>	14
<b>3.1.2. Material lítico e preparación do experimento .....</b>	<b>14</b>
3.1.2.1. <i>Material lítico .....</i>	14
3.1.2.2. <i>Montaxe do experimento .....</i>	15
<b>3.1.3. Monitorización do efecto das condicións ensaiadas nos cultivos .....</b>	<b>16</b>
3.1.3.1. <i>Cuantificación do número de células de <i>Synechocystis sp PCC 6803</i> e <i>Bracteacoccus minor</i>.....</i>	16
3.1.3.2. <i>Fluorescencia clorofílica .....</i>	16
3.1.3.3. <i>Cuantificación da cor.....</i>	17
3.1.3.4. <i>Cuantificación do contido en pigmentos.....</i>	18
3.1.3.5. <i>Cuantificación do contido de carbono inorgánico (CI) TOC-IC.....</i>	19
3.1.3.6. <i>Cuantificación do osíxeno disolto.....</i>	20
3.1.3.7. <i>Cuantificación de elementos disoltos por espectroscopía de absorción atómica en chama .....</i>	20
3.1.3.8. <i>Cuantificación do pH.....</i>	21
<b>3.1.4. Análise estadística .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 Experimento UV-B.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.1. Biofilm: cultivos iniciais e preparación do inóculo .....</b>	<b>22</b>
3.2.1.1. <i>Cepas utilizadas e condicións de cultivo .....</i>	22
3.2.1.2. <i>Cuantificación do número de células de <i>Bracteacoccus minor</i> e <i>Synechocystis sp PCC 6803</i> e preparación do cultivo mixto 1:1 .....</i>	22
<b>3.2.2. Preparación do experimento .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.3. Monitorización do efecto das condicións ensaiadas nos cultivos .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.4. Análise estadística .....</b>	<b>26</b>

<b>4. Resultados</b> .....	27
<b>4.1. Experimento temperatura-CO<sub>2</sub></b> .....	27
<b>4.1.1. Cuantificación do número de células e variación da proporción de células de <i>Synechocystis sp</i> PCC 6803 e <i>Bracteacoccus minor</i></b> .....	27
<b>4.1.2. Fluorescencia clorofílica</b> .....	28
<b>4.1.2 Cuantificación do cambio de cor</b> .....	31
<b>4.1.3. Cuantificación do contido en pigmentos</b> .....	34
<b>4.1.4. Cuantificación do contido de carbono inorgánico (CI) TOC-IC</b> .....	37
<b>4.1.5. Osíxeno disolto</b> .....	37
<b>4.1.6. Espectroscopía de absorción atómica en chama</b> .....	38
<b>4.1.7. Cuantificación do pH</b> .....	40
<b>4.2 Experimento UV-B</b> .....	41
<b>4.2.1. Variación da proporción de células de <i>Synechocystis sp</i> PCC 6803 e <i>Bracteacoccus minor</i></b> .....	41
<b>4.2.2. Fluorescencia clorofílica</b> .....	42
<b>4.2.3. Cuantificación da variación da cor</b> .....	45
<b>4.2.4. Cuantificación do contido en pigmentos</b> .....	48
<b>4.2.5. Microscopía confocal (CLSM)</b> .....	51
<b>5. Discusión</b> .....	53
<b>5.1. Experimento CO<sub>2</sub>-Temperatura</b> .....	53
<b>5.2. Experimento UV-B</b> .....	58
<b>6. Conclusións</b> .....	61
<b>7. Bibliografía</b> .....	62

## Resumo

Un dos problemas máis importantes no campo da conservación do Patrimonio Cultural é a colonización dos sustratos por parte de biofilms. Estes biofilms, compostos en moitos casos por compendios de algas e cianobacterias, están en gran medida influenciados por cambios ambientais. Nun contexto de cambio climático como o actual é esencial entender cales son estes procesos e en que medida van a afectar aos organismos e, polo tanto, que consecuencias terá isto sobre o biodeterioro do patrimonio. Neste traballo fin de máster (TFM) estudouse o efecto do cambio climático, en termos de aumento de temperatura, CO<sub>2</sub> e radiación UV-B, na ecofisioloxía dun biofilm composto por unha especie de cianobacteria, *Synechocystis sp PCC 6803* e outra de alga verde, *Bracteacoccus minor*. Observouse que, de forma xeral, o aumento de calquera destes parámetros provocou un aumento no dominio das cianobacterias, que provocan un maior biodeterioro do substrato sobre o que viven, en comparación coas algas verdes. Concretamente, descubriuse que para os organismos estudados, un aumento da temperatura reduce o seu crecemento e eficiencia fotosintética, mentres que a nivel de substrato aumenta a disolución de elementos. Ante un aumento da temperatura, poderíase esperar un aumento da meteorización dos minerais, pero unha menor actividade deteriorante dos organismos. O efecto do CO<sub>2</sub> observouse dependendo da temperatura e, a pesar do esperado, só produciu un lixeiro aumento da eficiencia fotosintética. Finalmente, o aumento da radiación UV-B tamén produciu un aumento na proporción de cianobacterias, así como un cambio de tamaño nas células de algas que sobreviviron. Isto, xunto cunha menor produción de EPS por parte das cianobacterias, parece indicar unha menor necesidade de protección contra o estrés luminoso e, polo tanto, menor dano pola radiación UV-B. Pódese concluír que as variacións destes parámetros con respecto aos niveis actuais afectarían tanto á fisioloxía das biopelículas como á súa capacidade para deteriorar o substrato. Isto implica un cambio na dirección do biodeterioro e, polo tanto, en como se deben afrontar as tarefas de conservación para evitar a desaparición do noso Patrimonio Cultural.

# 1. Introducción

## 1.1. Escenario futuro de cambio climático: variacións da temperatura, concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> e dos patróns de luz ultravioleta.

As emisións antropoxénicas de gases de efecto invernadoiro (GEI) e, consecuentemente, as súas concentracións atmosféricas aumentaron drásticamente dende a Revolución Industrial, sendo o principal factor responsable do cambio climático na actualidade. Segundo o quinto informe do Panel Intergubernamental do Cambio Climático (IPCC), as concentracións atmosféricas de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O, os principais GEI, se atopan hoxe en día nas máximas históricas rexistradas, non habendo precedentes nos últimos 800.000 anos. Entre os anos 2000 e 2010, as emisións de GEI aumentaron máis que nas tres décadas anteriores (Fig.1) e en febreiro de 2015 as concentracións atmosféricas de CO<sub>2</sub> alcanzaron 400,26 ppm. Os últimos datos rexistrados confirman as peores previsións, que a tendencia de aumento das emisións de GEI continúe a longo prazo (Leissner et al., 2015). Así, dependendo do desenvolvemento socioeconómico, demográfico e das políticas climáticas se espera unha ampla variabilidade de escenarios futuros de emisións antropoxénicas (IPCC, 2014).

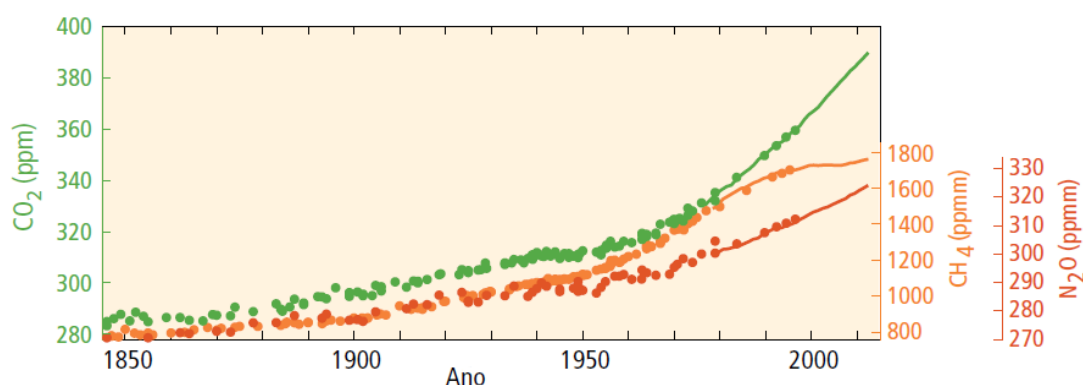


Fig. 1. Promedio global de concentracións de gases de efecto invernadoiro (GEI). Fonte: (IPCC, 2014)

Unha das consecuencias máis evidentes da crecente concentración atmosférica de GEI é o aumento de temperatura, tendo aumentado xa 0,8°C no último século. Múltiples evidencias

apuntan a unha relación liñal entre as emisións de CO<sub>2</sub> acumuladas e os niveis de quecemento global. Na Fig. 2 móstrase a previsión de emisións de CO<sub>2</sub> das diferentes traxectorias de concentración representativas (RCP) propostas polo quinto informe do IPCC, onde se representan diferentes escenarios de mitigación do cambio climático. As RCP situadas entre 6,0 e 8,5 corresponden a escenarios sen esforzos adicionais para limitar as emisións, mentres que as RCP 4,5 e 2,6 representan escenarios de mitigación con altas probabilidades de manter o quecemento global por baixo dos 2°C.

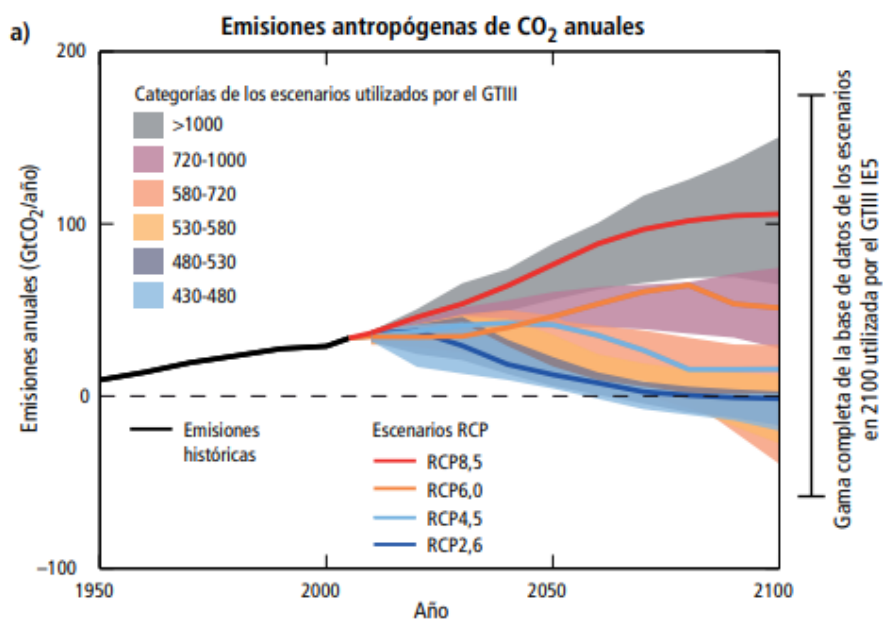


Fig. 2. Emisións de dióxido de carbono anuais (GtCO<sub>2</sub>/ano) nas traxectorias de concentración representativas (RCP) (liñas). Fonte: IPCC, 2014.

Os modelos climáticos prevén aumentos de entre 0,6 e 4°C na temperatura media global, aumento de temperatura e acidificación dos océanos así como aumento do nivel do mar, maior frecuencia e duración nos eventos climáticos extremos, variación nas concentracións de ozono estratosférico e cambios nos patróns de precipitación, nubosidade e polo tanto nos patróns de luz e radiación ultravioleta (UV). Estudos previos consideran o papel do cambio climático no aumento e diminución das concentracións de ozono estratosférico e a súa relación cos niveis de radiación ultravioleta-B (UV-B 280-315 nm) na superficie terrestre (Bais *et al.*, 2019). Non

obstante, outros estudos afirman que o cambio climático está contribuindo cada vez máis a cambios na duración da exposición á radiación UV-B en diferentes zonas do planeta, independentemente dos cambios no ozono estratosférico e relacionados con, por exemplo, alteracións na cobertura de nubes ou no crecemento vexetal debidas, a súa vez, ao cambio climático (Bornman *et al.*, 2019; Cleland *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 2015).

## **1.2. Cambio climático e conservación do Patrimonio Cultural.**

As consecuencias do cambio climático (desertificación, chuvias torrenciais, aludes, inundacións) xa se están a experimentar e afectan tanto a organismos vivos como a obxectos expostos ao medio ambiente entre os que se atopan, e son causa de preocupación, os bens mobles e inmobles do Patrimonio Cultural (UNESCO, 2007). Dada a importancia que ten o noso Patrimonio Cultural como arquivo de saber e memoria, temos o deber de conservalo e transmitilo ás futuras xeracións e para iso é preciso ter en conta os anteriormente comentados cambios nas condicións ambientais e desenvolver medidas de adaptación e mitigación sostibles de protección do Patrimonio Cultural.

Entre os ben do Patrimonio Cultural expostos aos factores climáticos e atmosféricos, a protección dos monumentos fronte o cambio climático, pola súa característica de bens inmobles que non poden ser protexidos da intemperie, supón un verdadeiro reto. Entre os axentes causantes de alteración dos materiais de construción dos monumentos, maioritariamente pedra natural, a colonización biolóxica debida a unha ampla variedade de organismos dende microorganismos ata mamíferos (Francis, 2011; Scheerer *et al.*, 2009), pode verse modificada polas condicións cambiantes e o seu efecto pode verse exacerbado. A colonización biolóxica do Patrimonio Cultural ten xerado e sigue xerando controversia, por un lado é considerada unha molestia porque pode provocar biodeterioro nos materiais de construción e ocultar elementos arquitectónicos e polo outro, de forma positiva, pode contribuir as súas calidades estéticas e tamén pode ter un papel bioprotector, por exemplo modificando o microclima das paredes

colonizadas (Viles *et al.*, 2012). Existen relacións complexas entre os monumentos históricos e as comunidades bióticas que os colonizan que están fortemente influenciadas polas condicións ambientais predominantes. Por conseguinte, non só se deben considerar as variacións dos parámetros climáticos senón tamén os seus efectos sobre o metabolismo, crecemento e desenvolvemento dos organismos, ademais de posibles cambios na distribución e composición das comunidades bióticas e as repercusións destes cambios na conservación do substrato colonizado (Bornman *et al.*, 2019; Fuentes & Prieto, 2021; Prieto *et al.*, 2020)

Entre a ampla variedade de organismos colonizadores do Patrimonio Cultural, este traballo centrase no desenvolvemento de biofilms e biofilms subaéreos (SAB) en material granítico. Defínese biofilm como un agregado organizado de microorganismos que viven dentro dunha matriz de produción de substancias poliméricas extracelulares (EPS) que se une a unha superficie biótica ou abiótica. A matriz de EPS é unha mestura polar altamente hidratada composta principalmente por polisacáridos, proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (ARN e ADN extracelular (eDNA)) que contribúe á armazón da estrutura tridimensional dos biofilms, ademais ten un papel protector do propio biofilm fronte alteracións das condicións ambientais coma cambios de temperatura, presión atmosférica, pH e humidade relativa (Costerton, 2007; Flemming *et al.*, 2010).

O termo "biofilm subaéreo" (SAB) foi descrito para comunidades microbianas unidas por unha matriz de EPS que se desenvolven sobre superficies minerais sólidas expostas á atmosfera. Os SAB caracterízanse por un crecemento irregular que está dominado por asociacións de fungos, algas, cianobacterias e bacterias heterótrofas, estes biofilms son omnipresentes, autosuficientes, e cunha ampla distribución, xa que se atopan en edificios, en rochas nos desertos, en montañas e en todas as latitudes (Yin *et al.*, 2019). A formación dun biofilm subaéreo pódese resumir en 5 pasos (Fig. 3): 1) Fixación: os microorganismos libres (células planctónicas) son adsorbidos reversiblemente a unha superficie mediante interaccións débiles

(como as forzas de van der Waals). 2) Colonización: os microorganismos únense á superficie mediante unha fixación química permanente, comeza a produción de EPS e división celular facilitando un temperán desenvolvemento vertical. 3) Desenvolvemento: proliferación e acumulación de células en multicapa que segregan e producen unha matriz de EPS. 4) Maduración: formación estable dunha comunidade tridimensional con canais de distribución de nutrientes e moléculas de sinalización, caracterizado por unha arquitectura específica, heteroxénea e con interaccións sinérxicas. 5) Dispersión activa: debido a remodelación da matriz de EPS e a interaccións con factores intrínsecos e extrínsecos, algúns microorganismos desléganse en cúmulo ou son separados, e posteriormente poden colonizar outras localizacións (Bos *et al.*, 1999; Limoli *et al.*, 2015; Sharahi *et al.*, 2019).

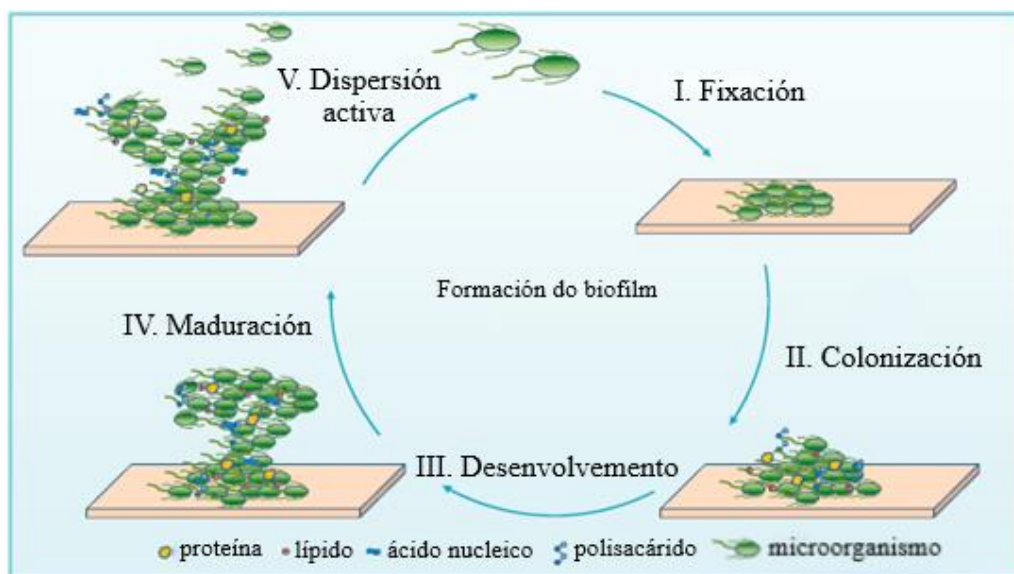


Fig. 3. Modelo de formación de biofilme microbiano en 5 etapas. Fonte: Yin *et al.*, 2019.

A actividade metabólica dos SAB céntrase na retención de auga, protexendo as células das condicións ambientais flutuantes e da radiación solar, así como prolongando a súa vida vexetativa. Os aerosois atmosféricos, gases e partículas propagadoras serven como fontes de nutrientes e inóculo para estas comunidades abertas.

Son varios os traballos de investigación nos que se caracterizan os SAB colonizadores do patrimonio xa que este tipo de colonización se atopa en monumentos de todo o mundo (Joh &

Lee, 2012; Ortega-Morales *et al.*, 2004; Scheerer *et al.*, 2009; Witt *et al.*, 2012). No caso concreto de biofilms colonizadores de monumentos graníticos galegos, Prieto *et al.*, (1999); Rifón-Lastra & Nogueroles-Seoane, (2001); Sanmartín *et al.*, (2010); Silva *et al.*, (1999) puxeron de manifesto que eses biofilms están principalmente compostos por cianobacterias, fungos e microalgas eucariotas como pioneiros do substrato pétreo.

Dende o punto de vista de conservación do patrimonio pétreo, os biofilms subaéreos deben ser tidos en conta xa que inducen cambios físicos e químicos nos materiais da rocha e penetran no substrato mineral contribuíndo á desintegración da rocha e dos minerais ( Prieto *et al.*, 1999; Prieto & Silva, 2005; Silva *et al.*, 1999). Ademais, dado o seu característico crecemento lento e sensible e súa estreita relación cos parámetros ambientais, os SAB parecen bos candidatos para ser empregados como bioindicadores do cambio climático (Gorbushina, 2007).

### **1.3. Resposta dos biofilms subaéreos ás variacións ambientais.**

As células que conforman os biofilms teñen un comportamento diferente que as súas homólogas planctónicas, concretamente debido a súa maior resistencia a moitas das perturbacións ambientais. A agrupación dos organismos en biofilms repórtalles beneficios tales como unha maior tolerancia a temperaturas extremas, alta salinidade, altas presións, déficit de nutrientes, pH extremos, variacións nas concentracións de gases atmosféricos e radiación UV (Koerdt *et al.*, 2010; Rinaudi *et al.*, 2010).

A resposta dos biofilms ás condicións ambientais foi estudada en moitas ocasións pero sobre todo para biofilms subacuáticos e pouco se sabe da resposta ás condicións ambientais dos biofilms subaéreos.

É coñecido que o aumento da temperatura ten un efecto estimulante sobre o crecemento e o metabolismo dos organismos e na ecoloxía de poboacións, comunidades e ecosistemas (Brown *et al.*, 2004). Segundo isto, cabería esperar un aumento das taxas de crecemento de biofilms

bacterianos, así como de biomasa e actividade de algas e protozoos (Ratkowsky *et al.*, 1982) co incremento da temperatura, sen embargo hai estudos nos que se constata una diminución da eficiencia do crecemento bacteriano ante un aumento de entre 3,5 e 4°C tanto no ambiente coma nas masas de auga (Sand-Jensen *et al.*, 2007).

Ademais do cambio nas taxas metabólicas e desenvolvemento dos biofilms, diversos autores (Lear *et al.*, 2008; Norf *et al.*, 2007) constataron un efecto do aumento da temperatura sobre a distribución e a composición das comunidades microbianas en correntes de auga doce, concretamente no caso de comunidades bacterianas. Este mesmo efecto de regulación na composición das comunidades pode observarse en comunidades algales xa que as temperaturas óptimas para a fotosíntese varían entre especies de algas (DeNicola, 1996); deste xeito, un aumento na temperatura podería inducir cambios taxonómicos na composición das comunidades provocando o desprazamento das especies e a modificación das taxas metabólicas (Ariño *et al.*, 2010; Hodkinson *et al.*, 2011).

Non obstante, o efecto da temperatura non pode ser en moitos casos aillado do efecto doutros parámetros. Así, Beardall & Raven (2004), Necchi (2004) e Staehr & Sand-Jensen (2006) puxeron de manifesto o efecto modulador da concentración de nutrientes na resposta positiva que ten o aumento de temperatura sobre a actividade fotosintética das algas.

Outro tipo de variación ambiental que ten que ser tido en conta nun contexto de cambio climático, é o incremento na concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico. Estudos previos proban que existen cambios funcionais nas comunidades bióticas asociados ao aumento de concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico tales como o aumento na produtividade ou cambios na calidade do tecido activo fotosintético, os que a súa vez teñen efectos nas dinámicas das comunidades (Körner, 2000).

Schimel, (1995) formulou a hipótese de que a exposición a niveis de CO<sub>2</sub> superiores aos ambientais pode ter un efecto fertilizante nos organismos fotosintetizadores, e polo tanto mellorar o rendemento fotosintético. A este respecto, as investigacións de DeLucia *et al.* (1999), Hamilton *et al.* (2002) e Hu *et al.* (2001) en plantas superiores, de Singh & Singh (2014) en especies de *Chlorella* e de Li *et al.* (2016) en comunidades de fitoplacton, apoian esta hipótese.

Sen embargo esta non é unha tendencia xeralizada, xa que algúns estudos demostraron que non hai diferenzas no crecemento de especies ante concentracións de CO<sub>2</sub> altas e normais (Huertas *et al.*, 2000 para cultivos de microalgas mariñas de *Nannochloropsis gaditana* e *Nannochloropsis maculate*; Morales *et al.*, 2002 para *Anabaena sp.* PCC 7120; Palmqvist, 2000 para diversas especies de liques e Querijero-Palacpac *et al.*, 1990 para *Gloeotrichia natans*).

Aínda que non hai moitos estudos que cuantifiquen o efecto do aumento da concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> sobre os biofilms subaéreos, espérase que de lugar a un aumento da produtividade dos microorganismos (concretamente das cianobacterias e as algas verdes) e das plantas superiores que crecen nos monumentos do patrimonio cultural. Non obstante, algúns autores consideran que é máis probable que as comunidades que colonizan o patrimonio estén mais limitadas pola humidade, dispoñibilidade hídrica e/ou os nutrientes que polo CO<sub>2</sub> (Balaguer *et al.*, 1999; B. Prieto *et al.*, 2020).

En canto a resposta dos biofilms ás modificacións na cantidade e calidade da luz que reciben, hai que ter en conta que a organización das comunidades formadoras de biofilms en biofilms é unha enxeñosa forma de protección das células dos microorganismos que evolucionaron desde hai miles de millóns de anos. Esta disposición protexe ás células das capas máis profundas da acción dos factores ambientais e de forma específica da acción da luz xa que en xeral, a

radiación ultravioleta (UV) presenta unha escasa penetración na matriz dos biofilms e só as primeiras capas superiores de células microbianas están expostas aos seus efectos nocivos (de Carvalho, 2017). Estas células expostas poden producir compostos fotoprotectores, que son aqueles cuxo contido celular aumenta pola exposición á luz ultravioleta de xeito proporcional á intensidade. Estudos da produción deses pigmentos como resposta a radiación UV foron levados a cabo por Geraldés & Pinto, (2014) e Castenholz & Garcia-Pichel, (2013) en cianobacterias. Non obstante non se atopan estudos comparados do efecto da radiación UV-B entre algas e cianobacterias conformado un biofilm subaéreos.

## **2. Obxectivo**

O obxectivo do presente traballo é analizar o efecto do cambio climático, en termos de aumento de temperatura, concentración de CO<sub>2</sub> e radiación UV-B, na ecofisioloxía de biofilms colonizadores do patrimonio cultural pétreo galego. Os resultados obtidos suporán unha primeira aproximación ao coñecemento dos procesos de adaptación e estratexias de resistencia que poden desenvolver este tipo de SABs e as súas implicacións na conservación do Patrimonio Cultural.

### 3. Material e métodos

Para desenvolver o obxectivo do presente traballo, deseñáronse dous experimentos nos que organismos formadores de biofilms foron expostos a:

- a) diferentes condicións de temperatura e concentracións de CO<sub>2</sub> avaliándose tanto os efectos de ambos parámetros sobre o desenvolvemento e actividade fotosintética dos organismos coma o na súa actividade deteriorante do sustrato granítico que colonizan, e
- b) diferentes condicións de iluminación combinando luz día e luz UV-B e avaliándose o seu efecto sobre o desenvolvemento e actividade fotosintética dos organismos.

#### 3.1. Experimento temperatura-CO<sub>2</sub>

##### 3.1.1. Biofilm: cultivos iniciais e preparación do inóculo

###### 3.1.1.1. Cepas utilizadas e condicións de cultivo

Usáronse dúas especies de microorganismos para este experimento, unha cianobacteria e unha alga verde. A cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 (ATCC 27184) obtida a través do Pasteur Culture Collection (PCC) de París, é un organismo unicelular terrestre con células esféricas que se dividen en dous ou tres planos sucesivos en ángulo recto entre si (Stanier *et al.*, 1971) e caracterízase por un metabolismo versátil, xa que ten a capacidade de medrar en condicións fotoautótrofas, mixotróficas e heterótrofas (Vermaas, 1996). Foi aillada orixinalmente nun lago de auga doce de Berkeley, California, USA en 1968. A alga *Bracteacoccus minor* (Schmidle ex Chodat) Petrová utilizada neste traballo foi obtida por Vázquez-Nion *et al.*, 2016 a partires dunha mostra representativa de biofilms subaéreos recollidos nas paredes de edificios monumentais no centro histórico da cidade de Santiago de Compostela, España, no ano 2012. Concretamente, provén dun biofilm natural das paredes da entrada do Palacio de Xelmírez (UTM 29T X 537166, Y 4747687; Datum ETRS89). Este

xénero de alga verde tamén se caracteriza pola súa versatilidade metabólica, xa que pode medrar tanto en condicións fotoautótrofas coma heterótrofas (Parker *et al.*, 1961).

Ambos microorganismos mantivéronse en medio de cultivo líquido BG11 (Rippka *et al.*, 1979) con aireación, a temperatura constante de 23°C e fotoperíodo de 12:12 h de luz/oscuridade ( $\sim 20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### *3.1.1.2. Purificación de cultivos existentes*

Co fin de que os cultivos foran estritamente monoespecie e eliminar calquera posible contaminación de natureza fúnxica, procedeuse á purificación de ambos cultivos. Baixo cabina de fluxo laminar, trasladouse un inóculo de cada cultivo a unha placa Petri diferente con medio BG11 agarizado, mediante unha asa de sembra levando a cabo a técnica de cultivo por estría. Tras observar crecemento nas placas cultivadas, repetiuse o protocolo anterior en varias ocasións utilizando como inóculo as colonias de alga verde ou cianobacteria non contaminadas visiblemente por fungos. Finalmente, obtéronse inóculos purificados de ambas especies, que se cultivaron en medio líquido BG11 (Rippka *et al.*, 1979) con aireación, a temperatura constante de 23°C e fotoperíodo de 12:12 h de luz/oscuridade ( $\sim 20 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### *3.1.1.3. Cuantificación da biomasa e da densidade óptica*

Co obxectivo determinar a biomasa do cultivo de cada microorganismo a partires da medición da densidade óptica a 750 nm ( $\text{DO}_{750}$ ) calculouse a curva de calibración biomasa vs. densidade óptica (750 nm) dos cultivos de cianobacteria e alga. A esta lonxitude de onda pódese avaliar o estado e evolución do cultivo, xa que a cantidade de luz absorbida por parte das células está directamente relacionada ca biomasa fotoautótrofa. Logo dunha calibración para cada cultivo, dispónse dunha metodoloxía sinxela e rápida para a determinación da variación da biomasa do biofilm, dando información sobre os efectos que ocasionan as diferentes condicións ás que se

someteu durante o experimento, sen necesidade de ter que cuantificar o peso seco de cada mostra cada vez que se precise medir biomasa.

Extraéronse 10 alícuotas de cada cultivo e se diluiron secuencialmente con medio de cultivo BG11 de forma que non superaran o valor de 1 de DO<sub>750</sub>, para poder garantir unha medida lineal. Cada dilución, previamente centrifugada a 5000 rpm durante 1 minuto, mediuse por triplicado usando un espectrofotómetro UV-visible (Varian Cary 100), obtendo para cada mostra un valor de DO a 750 nm. Despois, filtráronse ao vacío 2 mL de cada dilución a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm previamente marcados, pesados e secados en estufa a 65°C. Os filtros resultantes deste proceso volvéronse secar en estufa a 65°C e pésaronse, obtendo así un valor de biomasa en peso seco (DW) resultado de restar o peso dos filtros con e sen biofilm filtrado. Obtívose así unha relación biomasa (peso seco)-densidade óptica a 750nm para cada cultivo (Fig. 5-6):

*Bracteacoccus minor*: Biomasa DW (g L<sup>-1</sup>) = 0,9111 · DO<sub>750</sub> + 0,2347 R<sup>2</sup>= 0.9191

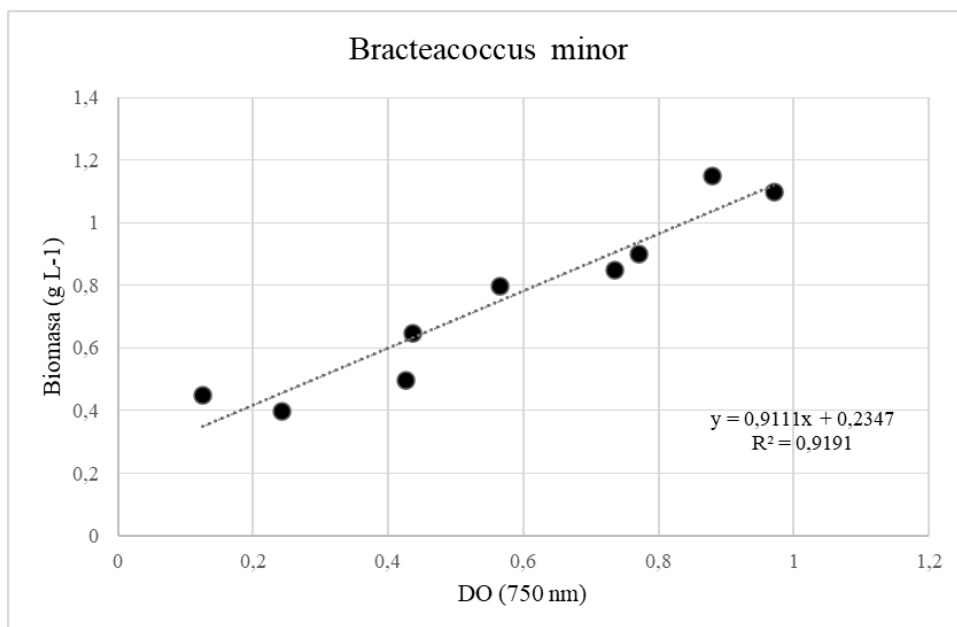


Fig 5. Relación DO a 750 nm e biomasa en peso seco do cultivoda alga verde *Bracteacoccus minor*.

*Synechocystis sp* PCC 6803: Biomasa DW (g L<sup>-1</sup>) = 0,808 · DO<sub>750</sub> + 0,294 R<sup>2</sup> = 0,9424

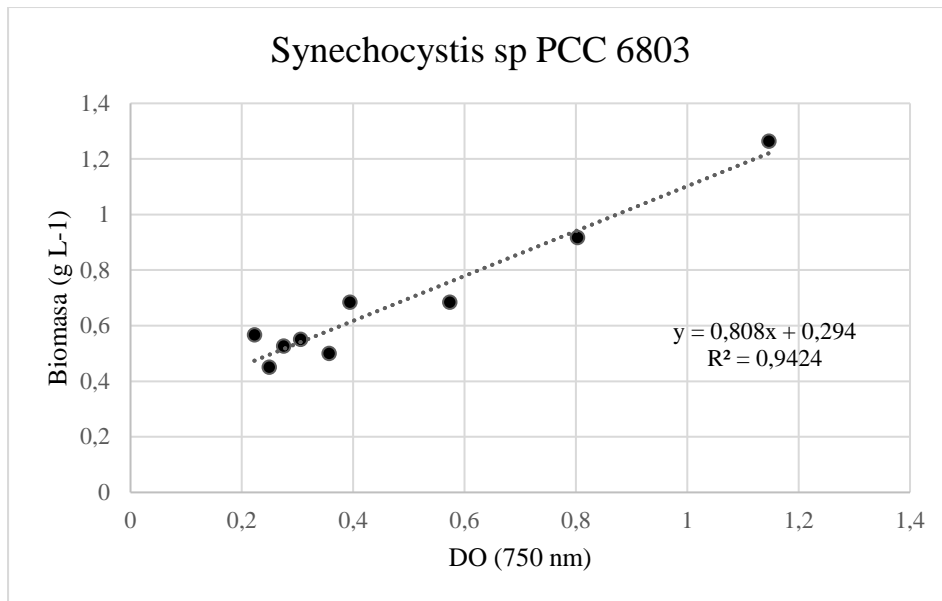


Fig 6. Relación a DO a 750 nm e biomasa en peso seco do cultivo da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803.

#### 3.1.1.4. Preparación do cultivo mixto 1:1

Partindo da curva de calibración biomasa vs. DO<sub>750</sub> calculada anteriormente, procedeuse a establecer a cantidade a tomar de cada cultivo purificado co obxectivo de acadar un cultivo mixto cunha relación 1:1 en biomasa.

### 3.1.2. Material lítico e preparación do experimento

#### 3.1.2.1. Material lítico

Para este experimento seleccionouse un granito de dúas micas, adamelítico, con textura equigranular panalotriomórfica de gran medio. Está principalmente composto por cuarzo, feldespato K, plaxioclasas, biotita, moscovita e clorita, e coñécese comercialmente co nome de *Silvestre*.

O material granítico fragmentouse ata obter grans de tamaño entre 0 e 5 mm, co obxectivo de aumentar a exposición da rocha ao medio e aos microorganismos, acelerando os posibles procesos de degradación e facilitando o acceso aos minerais. O granito fragmentado tamizouse

para asegurar unha distribución homoxénea dos tamaños de gran en todas as mostras separando o material en tres fraccións: de 2 a 5 mm, de 0,5 a 2 mm e <0,5 mm de diámetro.

### *3.1.2.2 Montaxe do experimento*

Dispuxéronse 24 tubos de ensaio de vidro, con 18 g de fragmentos graníticos de tamaño 5-2 mm, 2-0,5 mm e <0,5 mm en relación 1:1:1. Tras esterilizar os tubos co material lítico no seu interior en autoclave a 121°C durante 15 min, engadiuse á metade dos tubos un volume de 5 mL de medio de cultivo BG11 e 50 mL de auga destilada e á outra metade engadiuse un volume de 5 mL de cultivo mixto (que inclúe o medio BG11) e 50 mL de auga destilada. Cada tubo conta ademais, cun tapón dúas veces perforado e un sistema de aireación mediante o que se suministra aire natural do exterior a través dunha bomba de aireación. O sistema funciona de modo que o aire entra por unha das perforacións dos tapóns dos tubos conectada ao sistema de aireación producindo burbuxeo e sae pola outra perforación. Os 24 tubos mantivéronse en cámara climática cunha iluminación de 1900 lux e un fotoperíodo luz/escuridade de 12:12 h.

Do total de 24 tubos, usáronse 3 réplicas para cada conxunto de condicións aplicadas (con inóculo/sen inóculo, 20°C/26°C e altos niveis de CO<sub>2</sub>/niveis ambientais de CO<sub>2</sub>). A metade dos tubos, (6 inoculados + 6 sen inocular) mergulláronse nun recipiente transparente con auga e un calentador acuático que eleva a temperatura a 26°C ±1. Os tubos restantes (6 inoculados + 6 sen inocular) quedaron expostos á temperatura de 20°C ± 1 (fixada na cámara climática), polo que se estableceron dúas condicións de temperatura. Ademais, para cada temperatura a metade deles, (3 inoculados, 20°C; 3 sen inocular, 20°C; 3 inoculados, 26°C; 3 sen inocular, 26°C) foron sometidos a elevadas concentracións de CO<sub>2</sub> mediante a conexión do seu sistema de aireación a unha bombona de CO<sub>2</sub> e suministrouse un pulso diario do gas (9,6 L/semana). A aireación da outra metade dos tubos (3 inoculados, 20°C; 3 sen inocular, 20°C; 3 inoculados, 26°C; 3 sen inocular, 26°C) consistiui únicamente no aire natural do exterior; desta forma

estableceronse dúas condicións de concentración de CO<sub>2</sub> (altos niveis de CO<sub>2</sub> e niveis atmosféricos de CO<sub>2</sub>). Pódese ver un esquema da montaxe do experimento na Fig 7.

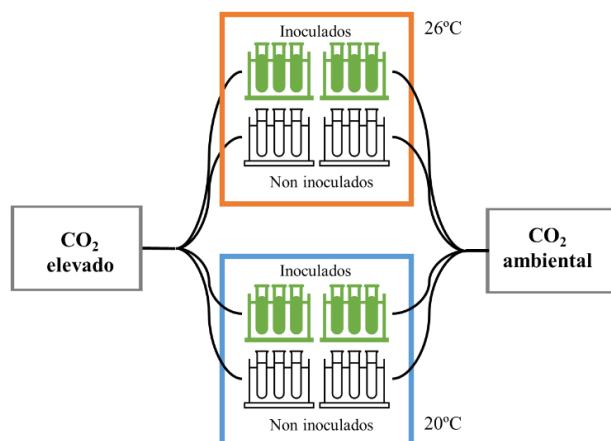


Fig. 7. Esquema da montaxe do experimento. Móstrase a distribución e colocación das réplicas dos tubos de vidro na cámara climática (inoculados e non inoculados), así coma a temperatura á que están expostos (20°C e 26°C) e o tipo de exposición de CO<sub>2</sub> (elevada e ambiental).

### 3.1.3. Monitorización do efecto das condicións ensaiadas nos cultivos

#### 3.1.3.1 Cuantificación do número de células de *Synechocystis sp PCC 6803* e *Bracteacoccus minor*

Unha vez preparado o cultivo mixto, este foi observado ao microscopio óptico ca finalidade de de cuantificar o número de células de alga verde e de cianobacteria no inicio, na metade (día 45) e no final (día 90) do experimento seguindo o protocolo de Vega & Lobina, (2007) e empregando unha cámara de reconto ou hematocitómetro de 0.1 mm de profundidade con escala graduada de Neubauer.

#### 3.1.3.2. Fluorescencia clorofílica

As moléculas de pigmentos situadas nas antenas fotosintéticas dos organismos fotoautótrofos absorben a enerxía luminosa que se pode consumir por tres vías: utilizarse na fotosíntese, disiparse en forma de calor ou reemitirse en forma de fluorescencia clorofílica (Lichtenthaler,

1987). A partir da fluorescencia emitida pola clorofila tras un pulso de luz saturante pódese valorar o rendemento cuántico máximo do fotosistema II (PSII). O rendemento cuántico máximo obtense ca ratio  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ , onde  $F_0$  e  $F_m$  defínense como a mínima e máxima fluorescencia, respectivamente, en mostras adaptadas á escuridade. A condición de adaptación a escuridade é necesaria para que o electroceptor se oxide ao máximo e os centros de reacción do PSII se atopen abertos, isto proporciona o nivel de fluorescencia mínimo,  $F_0$ . Trala aplicación dun pulso de luz saturante, o aceptor de electróns redúcese ao máximo, obtendo o nivel de fluorescencia máximo,  $F_m$ . A ratio  $F_v/F_m$  estima a fracción da enerxía luminosa absorbida que é utilizada na fotoquímica do PSII, estando correlacionada ca cantidade de carbono fixado por unidade de luz absorbida (Maxwell & Johnson, 2000; Roháček, 2002).

A fluorescencia clorofílica mediuse por primeira vez o día 0 do experimento e consecutivamente cada 15 días con Phyto-PAM (Heinz Walz GmbH) equipado cunha unidade emisor-detector de fibra óptica Phyto-EDF, que permite a medición en superficies a través dunha varilla de plexiglás de 50 mm de largo e 4 mm de diámetro. Extraéronse 1,5 mL de cada tubo de vidro e pasáronse a tubos eppendorf de 2 mL debidamente etiquetados. As mostras permaneceron en escuridade durante 30 minutos previos ás medicións. Leváronse a cabo tres medicións por mostra, mergullando a sonda no tubo eppendorf, axitando a mostra entre cada medición. Phyto-PAM rexistra medidas a 665 nm que corresponde co pico de absorción da clorofila-a.

### 3.1.3.3. Cuantificación da cor

Está demostrado que a cuantificación da cor é un método non destructivo fiable para monitorizar o desenvolvemento de biofilms en superficies rochosas (Prieto *et al.*, 2002, 2004; Sanmartín, 2012).

De cada tubo de cultivo, tomáronse 1,5 mL que foron filtrados ao vacío a través de filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  de maneira que os organismos quedaron depositados sobre o filtro. Sobre cada filtro realizáronse 5 medidas da cor empregándose un espectrofotómetro portátil (Konica Minolta CM-700D) con software CM-S100w (Spectra Magic TM NX) e baixo as seguintes condicións: iluminante D65, observador 2° e área obxectivo tipo SAV con 3 mm de diámetro.

Os datos obtidos representáronse no espazo CIELAB ou CIE 1976  $L^* a^* b^*$ , onde cada color está definida por tres coordenadas cartesianas ou lineais  $L^* a^* b^*$ , sendo  $L^*$  a medida de luminosidade, que varía de 100 branco absoluto a 0 negro absoluto,  $a^*$  a medida que representa variacións cromáticas no eixo vermello-verde (vermello positivo, verde negativo) e  $b^*$  unha medida que representa variacións cromáticas no eixo amarelo-azul (amarelo positivo, azul negativo).

#### 3.1.3.4. Cuantificación do contido en pigmentos

Determinouse o contido de clorofila a, clorofila b, scitonemina e carotenoides totais de todas as mostras sometidas ás diferentes condicións de temperatura e concentración de  $\text{CO}_2$ . Ademais, tamén se determinou o índice de feofitización (Phaeophytinization Quotient, PQ), calculado pola relación de absorbancias dos extractos en 435 e 415nm, que reflicte a degradación de clorofila a feopigmentos (Sanmartín *et al.*, 2011). Os fitopigmentos foron extraídos, cada 15 días dende o día 0 do experimento incluído, con dimetilsulfóxido (DMSO), xa que presenta vantaxes fronte a outros disolventes como son a súa fácil manipulación, maior poder de extracción e estabilidade dos pigmentos ao manter as mostras no frigorífico (Prieto *et al.*, 2004).

Tomáronse alícuotas de 1,5 mL de cada tubo e filtráronse ao vacío con filtros de nitrocelulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ , a continuación resuspendéronse os filtros en 1,5 mL de DMSO durante 1 hora a

65°C de temperatura con axitación (Bell & Sommerfeld, 1987). Ao rematar a dixestión con DMSO, as mostrás centrifugáronse durante 10 minutos a 7000 g (Centric 150 Tehtnica), o sobrenadante foi medido a diferentes lonxitudes de onda usando un espectrofotómetro UV-visible (Varian Cary 100).

O contido de clorofila a, clorofila b, scitonemina e carotenoides foi calculado mediante as seguintes ecuacións (Mushir & Fatma, 2012; Wellburn, 1994):

$$\text{Clorofila-a (Chla)} = 12.47 \cdot (\text{Abs664-Abs750}) - 3.62 \cdot (\text{Abs647-Abs750})$$

$$\text{Clorofila-b (Chlb)} = 25.06 \cdot (\text{Abs647-Abs750}) - 6.5 \cdot (\text{Abs664-Abs750})$$

$$\text{Scitonemina} = 1.04 \cdot \text{Abs384} - 0.79 \cdot \text{Abs665.1} - 0.27 \cdot \text{Abs490}$$

$$\text{Carotenoides totais} = (1000 \cdot \text{Abs480} - 1.29 \cdot \text{Chla} - 53.78 \cdot \text{Chlb}) / 220$$

### *3.1.3.5. Cuantificación do contido de carbono inorgánico (CI) TOC-IC*

O contido de carbono inorgánico (CI) foi cuantificado en todas as mostrás. Os métodos de análise de TOC-IC (Carbono orgánico total- Carbono inorgánico) utilizan calor, O<sub>2</sub>, irradiación ultravioleta e oxidantes químicos. As mostrás inxectáronse na cámara de reacción que contén H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ao 25% tras o que son sometidas a un proceso de quecemento onde se produce a combustión e se desprende CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Polo tubo circula unha corrente de osíxeno que arrastra os gases emitidos na combustión ata dúas celdas de infravermello (IR) onde se analiza selectivamente o CO<sub>2</sub>. Cada 15 días dende o comezo do experimento, tomáronse alícuotas de 1,5 mL de cada tubo e filtráronse ao vacío con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm. O volume filtrado foi medido no analizador de carbono orgánico e inorgánico (SHIMADZU TOC-5000A).

### *3.1.3.6. Cuantificación do osíxeno disolto*

O osíxeno disolto é un indicador importante e un factor limitante na eficiencia fotosintética e polo tanto, na fixación de CO<sub>2</sub> (Björkman, 1966). Co obxectivo de determinar a concentración de osíxeno disolto nas mostras expostas ás diferentes condicións de temperaturas e CO<sub>2</sub>, tomáronse alícuotas de 1,5 mL de cada tubo de mostra e leváronse a cabo medicións con oxímetro (O<sub>2</sub> microsensor 10 µm, Unisense) cada 15 días dende o comezo do experimento.

### *3.1.3.7. Cuantificación de elementos disoltos por espectroscopía de absorción atómica en chama*

Co obxectivo de coñecer o o efectos das condicións ensaiadas na capacidade dos organismos para solubilizar e/ou tomar elementos dende o sustrato, neste caso granito, cuantificouse, ao final do experimento, o contido de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> disoltos en cada tubo mediante espectroscopía de absorción-emisión atómica. Para a análise tomáronse 20 mL de cada tubo de ensaio, filtrados previamente ao vacío con filtros de nitrocelulosa de 0.45 µm. e utilizouse un espectrómetro de absorción atómica de chama SpectrAA 220 FS (Mulgrave, Victoria, Australia) Modelo Varian con módulo secuencial rápido (FS-FAAS), equipado cun sistema convencional de nebulizador pneumático e cámara de nebulización. As lámpadas de cátodo oco de sodio, potasio, calcio e maganesio funcionaron baixo unha corrente de 5mA (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) e 10 mA (Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>). As lonxitudes de onda utilizadas foron: para sodio (589,0 nm), potasio (766,5 nm), calcio (422,7 nm) e magnesio (285,2 nm). A composición da chama era acetileno (2,0 L min<sup>-1</sup>) e aire (13,5 L min<sup>-1</sup>) e a altura do queimador axustouse ao sodio e potasio, os elementos con menor sinal de absorbancia. O fluxo de aspiración do nebulizador mantívose entre 5,5 e 6,0 ml min<sup>-1</sup>.

#### *3.1.3.8. Cuantificación do pH*

Co obxectivo de determinar o posible cambio no pH das mostras provocado polos efectos das condicións estudadas, leváronse a cabo medicións co medidor de pH de sobremesa Thermo Scientific™ Orion™ Dual Star™ con dobre canle o día do comezo do experimento e o día final.

#### **3.1.4. Análise estadística**

Os datos foron sometidos a un ANOVA de dúas vías e unha proba post hoc de Tukey HSD, considerando os parámetros medidos como variables dependentes e a temperatura e concentración de CO<sub>2</sub> como factores fixos. As análises estatísticas levarónse a cabo usando o software SPSS Statistics v23.0 (IBM) e as diferenzas consideráronse estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

## 3.2 Experimento UV-B

### 3.2.1. Biofilm: cultivos iniciais e preparación do inóculo

#### 3.2.1.1. Cepas utilizadas e condicións de cultivo

Para este experimento usáronse as mesmas dúas especies descritas no experimento anterior: a cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 (ATCC 27184) obtida a través do Pasteur Culture Collection (PCC) de París, e a alga *Bracteacoccus minor* (Schmidle ex Chodat) Petrová obtida por Vázquez-Nion *et al.*, (2016) a partir dunha mostra representativa de biofilms subaéreos recollidos nas paredes de edificios monumentais no centro histórico da cidade de Santiago de Compostela, España, no ano 2012.

Ambos microorganismos mantivéronse en medio de cultivo líquido BG11 (Rippka *et al.*, 1979) con aireación, a temperatura constante de 23°C e fotoperíodo de 12:12 h de luz/oscuridade (~20  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### 3.2.1.2. Cuantificación do número de células de *Bracteacoccus minor* e *Synechocystis sp* PCC 6803 e preparación do cultivo mixto 1:1

Co obxectivo de acadar un cultivo mixto con relación 1:1 en número de células, procedeuse ao recuento celular de 1,5mL de cada monocultivo con microscopio óptico empregando a mesma metodoloxía que a descrita na sección 3.1.3.1

### 3.2.2. Preparación do experimento

O cultivo mixto 1:1 da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e da alga *Bracteacoccus minor* foi inoculado en cabina de fluxo laminar sobre membranas de policarbonato (0,22  $\mu\text{m}$  de poro, 25 mm de diámetro, Millipore) previamente esterilizadas baixo UV-C (Philips TUV F17T8) durante unha hora por cada cara. Inoculáronse 0.2 ml de cultivo mixto en fase exponencial por cada membrana. Estas foron colocadas en placas Petri (n: 16) con 25 ml de BG11 agarizado, esterilizado previamente en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

Tendo en conta que para cada condición deben prepararse tres réplicas, que se ensaiaron 4 ciclos de iluminación (explicados máis adiante) e que se realiza o seguimento do estado dos biofilms cada 15 días ao longo dun período de 45 días (os días 0, 15, 30 e 45 logo da inoculación) empregando técnicas destructivas, foi preciso inocular un total de 144 membranas que se dispuxeron en placas Petri en grupos de tres. Un total de 3 placas Petri con 3 réplicas de membrana (N=9) foron usadas para cada día de medición (0, 15, 30 e 45 días) e para cada condición de exposición a UV-B estudada (un total de 48 placas con 3 membranas cada unha). Na figura 8 pódese ver o esquema de distribución de mostras según condicións e monitorización.

Tendo en conta que á atmosfera chega un 5% da radiación UV-B, e que a unha parede vertical orientada ao oeste recibe un 30% da radiación solar total, calculáronse os tempos de exposición á radiación UV-B que recibirían diariamente biofilms en paredes verticais orientadas ao oeste en 3 localizacións, escollidas na mesma lonxitude cartográfica, pero con diferentes latitudes e diferentes tempos de exposición á radiación UV co fin de estudar a resposta dos organismos compoñedores dos SAB ante un hipotético escenario futuro de cambio climático no que non se coñece con certeza como variarán os patróns de radiación UV-B na superficie terrestre. Por exemplo, falando do hemisferio norte, se o cambio climático provocara un desprazamento do clima mediterráneo cara o norte, en Galicia (norte de España) aumentarían as horas de luz solar e a exposición á radiación UV-B sería homóloga á actual no sur de Portugal. Por outra banda, no suposto de que o cambio climático provocara cambios nos patróns de nubosidade e a exposición á radiación UV-B na superficie terrestre diminuíra, as condicións actuais de radiación de Irlanda poderían ser homólogas ás futuras en Galicia. En base a isto, as localizacións escollidas foron: sur de Irlanda (1h/día), norte de España (Galicia) (2h/día) e sur de Portugal (3h/día) (“UV Maps / Root - EUROSUN Project,” n.d.). Estas foron as condicións ensaiadas ademais dun control (0h/día).

As mostras foron iluminadas con ciclos de 8 horas luz día/16 horas escuridade e nas horas nas que foron iluminadas con luz día ilumináronse tamén con luz UVB durante 0, 1, 2 ou 3 horas. Para iso dispúxose dunha cámara escura con catro estancias nas que se instaloron as dúas lámpadas: unha lámpada UV-B (Philips UV-B Broadband TL T12 20W/12 G13 RS) e unha lámpada de luz día (Osramn LUMILUX, Cool daylight, L 18 W/865), necesarias para conseguir as condicións a ensaiar (Fig.8).

Na fig. 9 represéntase o espectro de emisión das lámpadas UV-B e de luz do día (DL) utilizadas neste experimento. Durante o experimento de 45 días, as placas xiráronse a través das 12 posicións dispoñibles na cámara de xeito que todas as placas de Petri recibiron os mesmos fotóns por superficie da fonte de luz.

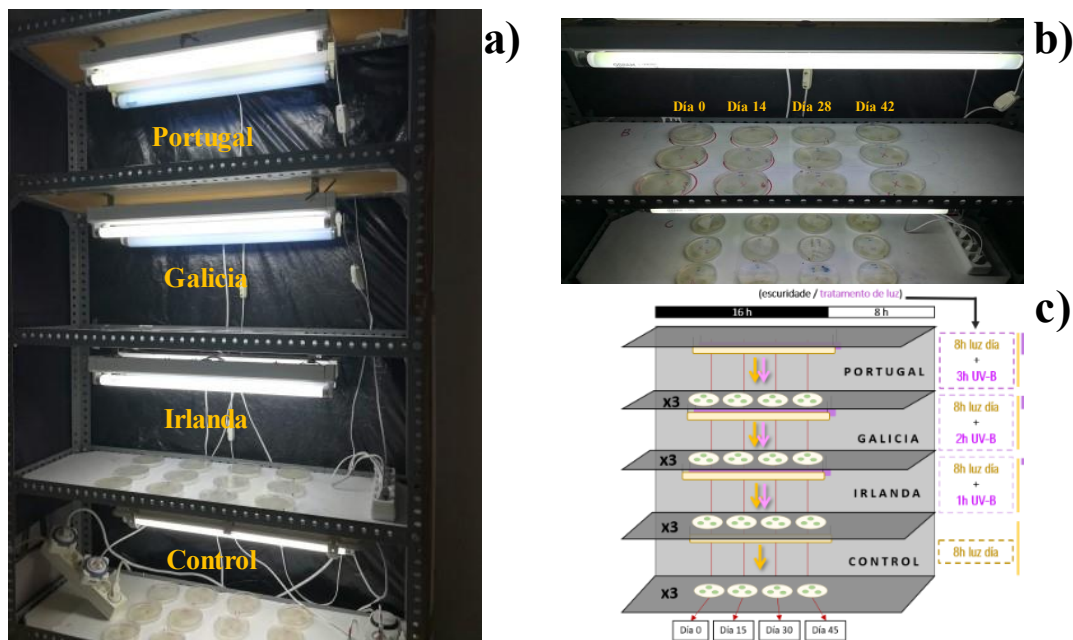


Fig.8. a): imaxe da montaxe do experimento onde se observan as 4 seccións nomeadas segúna as condicións de radiación UV calculadas para diferentes lugares (Portugal, Galicia, Irlanda e control). b): imaxe dunha das seccións na que se amosa a disposición inicial das placas Petri. c): esquema xeral da montaxe do experimento onde se amosan os diferentes tempos de iluminación diarios de UV-B (3h, 2h, 1h e 0h) e de luz do día (8h)

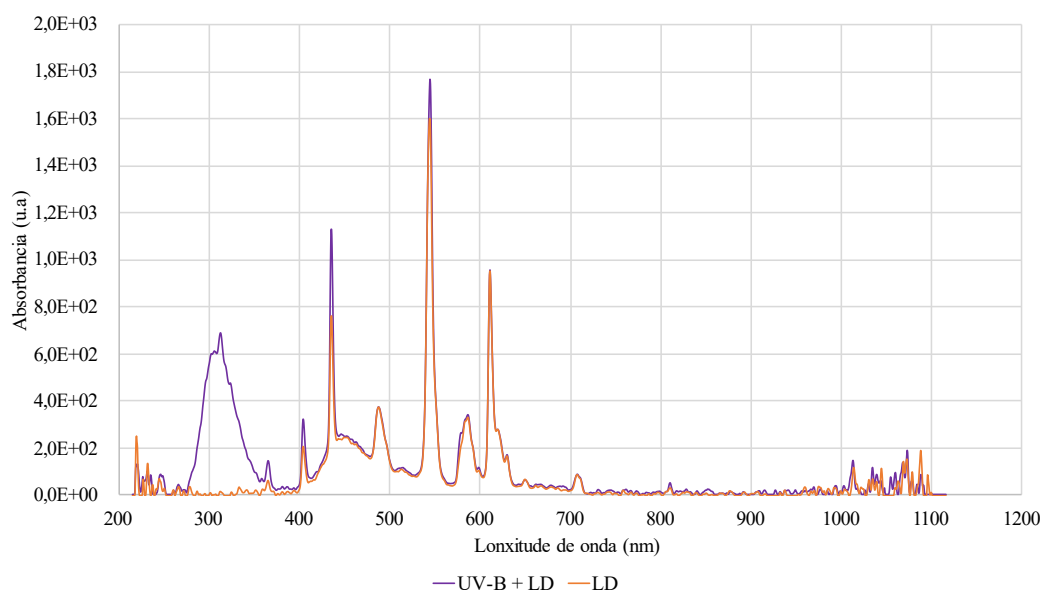


Fig.9. Espectro de emisión das lámpadas de luz do día (LD) e das lámpadas de UV-B en conxunto coas de luz do día (UV-B+LD) utilizadas neste experimento.

### 3.2.3. Monitorización do efecto das condicións ensaiadas nos cultivos

O seguimento do efecto das condicións ensaiadas sobre os organismos foi realizado cada 15 días mediante a cuantificación da fluorescencia clorofílica, cuantificación da cor e cuantificación do contido en pigmentos, así coma a cuantificación do número de células de cianobacteria e alga verde do cultivo mixto o día inicial e final do experimento. As metodoloxías empregadas foron as mesmas que as descritas nas seccións 3.1.3.2, 3.1.3.3, 3.1.3.4 e 3.1.3.1 respectivamente.

Ademais, ao final do experimento as mostras foron estudadas mediante microscopía confocal co obxecto de analizar diferencias en composición e distribución de organismos no biofilm provocadas pola radiación UV-B. Para iso, as membranas tingúíronse coa lectina ConA-TMR (concanavalina A, conxugado de tetrametilrodamina) e isómero I de isotiocianato de fluoresceína (FITC) seguindo o protocolo de (Wang *et al.*, 2018). Recolléronse imaxes confocais empregando un obxectivo HC PL APO CS 10 × / 0,4 DRY.

Fixéronse observacións en áreas aleatorias de cada biopelícula: ConA-TMR (excitación, 552 nm; emisión, 578 nm) rexistráronse polisacáridos na canle vermella; FITC (excitación, 495 nm; emisión, 519 nm) dirixido a compoñentes proteicos da EPS que se rexistraron na canle verde; e a autofluorescencia de clorofila das células do biofilm (excitación, 633 nm; emisión, 650–750 nm) rexistrouse na canle azul para as algas verdes e na canle rosa para as cianobacterias. As imaxes capturadas analizáronse co software Adobe Photoshop™ CS6 v.13.0.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA).

#### **3.2.4. Análise estadística**

Os datos foron sometidos a unha análise de varianza (ANOVA) e unha proba post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ), realizada empregando o programa estatístico SPSS (versión 23.0).

## 4. Resultados

### 4.1. Experimento temperatura-CO<sub>2</sub>

#### 4.1.1. Cuantificación do número de células e variación da proporción de células de *Synechocystis sp* PCC 6803 e *Bracteacoccus minor*

Na figura 10 pódese observar que tódalas condicións de temperatura e CO<sub>2</sub> deron lugar a unha diminución do contido de células totales co paso do tempo, excepto para as mostras mantidas a 20°C e condición atmosférica de CO<sub>2</sub> que aumentaron ata o día 45 diminuindo logo ata alcanzar os mínimos valores de células totais o día 90 con respecto as mostras sometidas as demais condicións.

Non obstante, a proporción de células de algas verdes e cianobacterias das mostras variou amplamente ao longo do experimento. En xeral a proporción de algas verdes aumentou co paso do tempo e diminuíu a proporción de cianobacterias. A día 45, obsérvanse diferenzas entre condicións de temperatura, as mostras mantidas a 20°C presentan un aumento da porcentaxe de algas con respecto ás cianobacterias en relación ao principio do experimento, mentres que no caso das mostras mantidas a a 26°C este aumento na porcentaxe de algas non se atopa. O día final do experimento, mantéñense as diferenzas achadas entre temperaturas, a porcentaxe de algas verdes aumentan en tódolos casos e ademais obsérvanse diferenzas entre as condicións de exposición a CO<sub>2</sub>, as mostras expostas a altos niveis de CO<sub>2</sub> presentan unha menor proporción de células de alga que as mostras expostas a CO<sub>2</sub> ambiental.

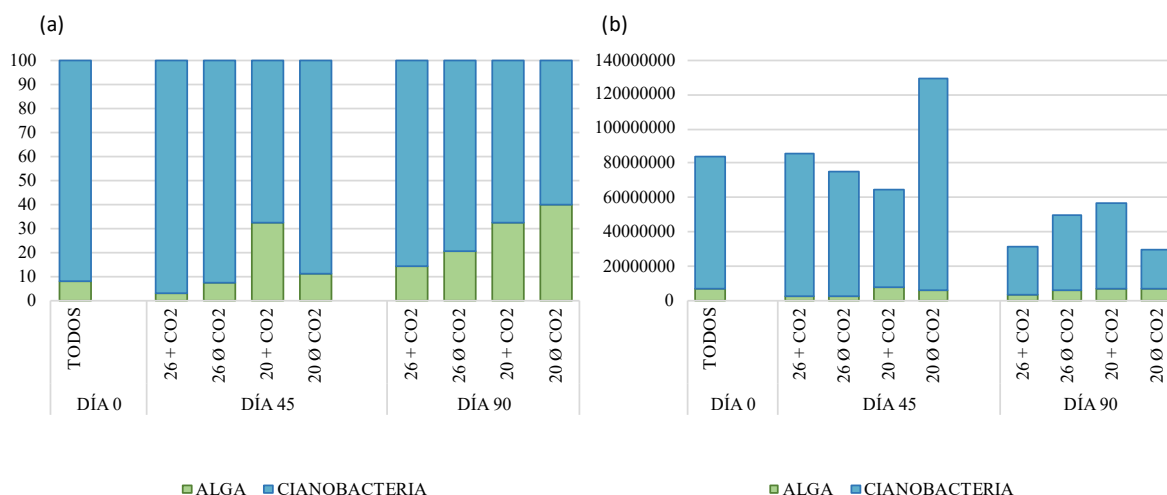


Fig.10. Porcentaxes da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* (a) e número de células totales no cultivo mixto a día 0, 45 e 90 do experimento baixo diferentes condicións de concentración de CO<sub>2</sub> e temperatura.

#### 4.1.2. Fluorescencia cloroflica

A variación ao longo do tempo da fluorescencia mínima das mostras ( $F_0$ ) (indicador de desenvolvemento do cultivo) baixo as diferentes condicións de temperatura e CO<sub>2</sub> preséntase na figura 11. Pódese observar un aumento do sinal de fluorescencia mínima co paso do tempo para as mostras sometidas a tódalas condicións de temperatura e de exposición a CO<sub>2</sub>. Hai unha gran diferenza entre os valores das mostras sometidas ás diferentes condicións de temperatura. A partires do día 30 as mostras mantidas a 26°C teñen valores significativamente máis baixos de fluorescencia mínima. Sen embargo, a esta mesma temperatura, os valores das mostras tratadas con niveis altos de CO<sub>2</sub>, son menores que os das mostras expostas a condicións ambientais de CO<sub>2</sub>. Polo contrario, no tratamento con 20°C de temperatura, as mostras tratadas con niveis altos de CO<sub>2</sub> expoñen valores máis altos que as mostras con niveis ambientais. Baixo altos niveis de CO<sub>2</sub> as diferenzas nos valores de  $F_0$  entre ambas temperaturas estudadas son significativamente máis amplas que en condicións ambientais. Por outro lado, a partir do día 45 hai un cambio nas tendencias, xa que a partir dese día os valores tenden a igualarse, especialmente baixo niveis ambientais de CO<sub>2</sub>.

A relación  $F_0 470\text{nm} / F_0 645\text{nm}$  é un indicador do dominio das algas verdes (valores altos) ou das cianobacterias (valores baixos) (Vázquez Nion, 2016) e se presenta na figura 12. As mostras mantidas a  $20^\circ\text{C}$  presentan valores significativamente máis altos ata a metade do experimento que as mostras mantidas a  $26^\circ\text{C}$ . A partires do día 45 os valores das mostras baixo calquera das condicións de temperatura e  $\text{CO}_2$  tenden a confluír, acadando valores semellantes aos do inicio do experimento.

O rendemento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) indica a eficiencia da actividade fotosintética (Fig.13). Neste experimento, atopáronse diferencias neste parámetro entre as temperaturas e as diferentes exposicións a  $\text{CO}_2$  estudadas . Ata o día 45, os valores de eficiencia das mostras mantidas a  $20^\circ\text{C}$  de temperatura son significativamente maiores que os das mostras mantidas a  $26^\circ\text{C}$ . En ambas condicións de temperatura, os valores das mostras expostas a altos niveis de  $\text{CO}_2$  son máis altos que os das mostras sometidas a condicións ambientais de  $\text{CO}_2$ .

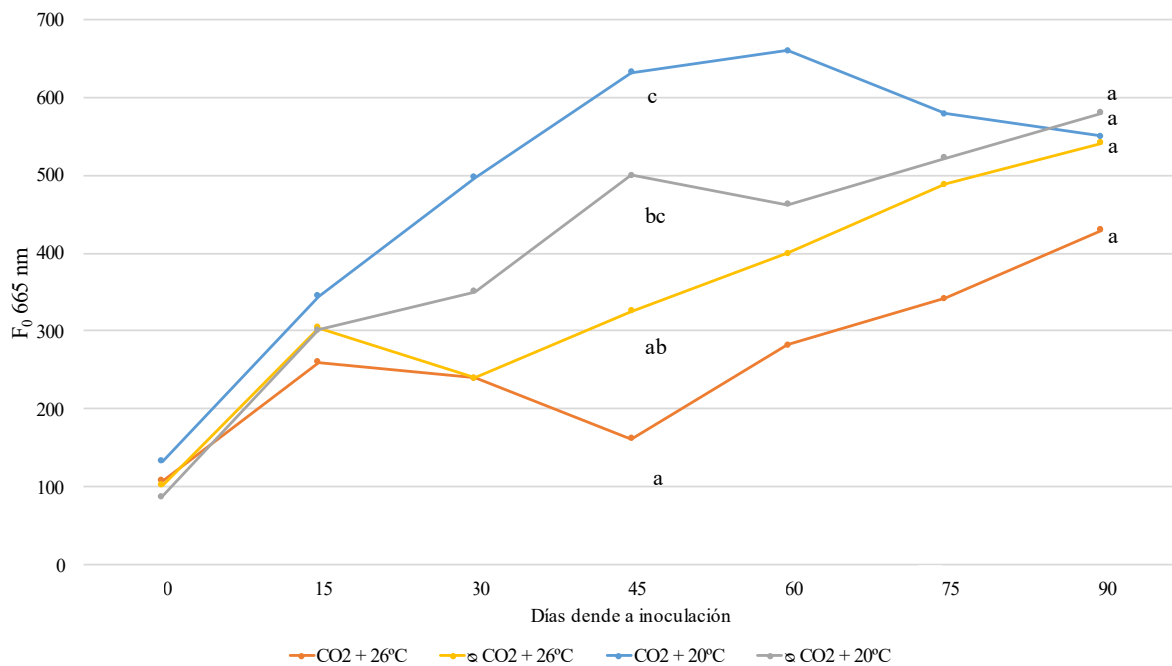


Fig.11. Valores de  $F_0$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de concentración de  $\text{CO}_2$  e temperatura a 665 nm. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

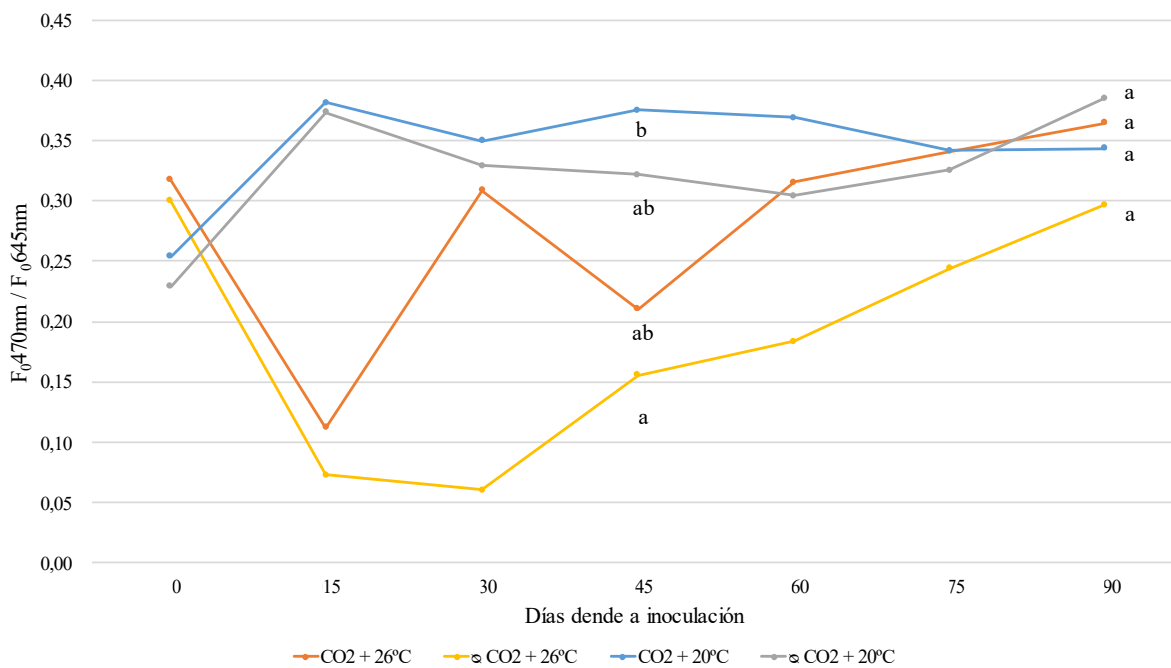


Fig 12. Relación  $F_{0470nm} / F_{0645nm}$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de concentración de  $CO_2$  e temperatura. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferenzas estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

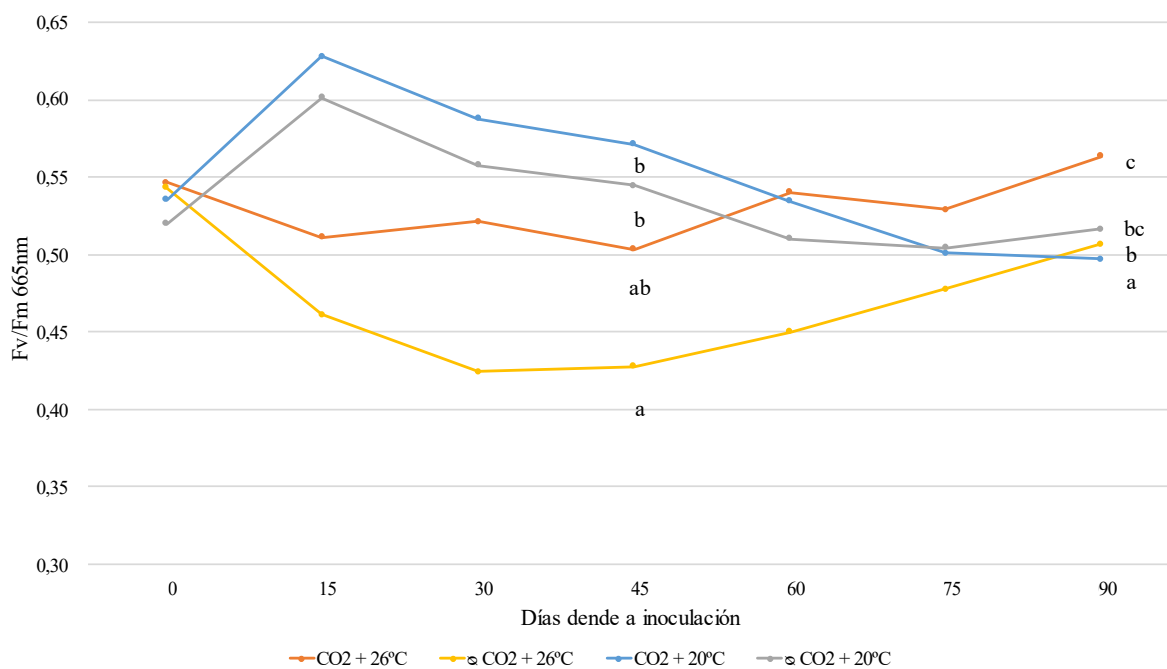


Fig.13. Rendemento cuántico máximo a 665 nm ( $F_v / F_m$ ) do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de concentración de  $CO_2$  e temperatura. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferenzas estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.2 Cuantificación do cambio de cor

A cor dos cultivos é un indicador do seu nivel de desenvolvemento, senescencia e de estado fisiolóxico (Prieto & Silva, 2005; Prieto *et al*, 2004; Patricia Sanmartín, 2012). Variacións do parámetro L\* indican variacións de luminosidade de maneira que as mostras con máis claridade teñen valores cercanos a 100 e as mostras máis escuras teñen valores cercanos ao 0. Os parámetros a\* e b\* mostran as variacións cromáticas nos eixos verde (negativos) - vermello (positivos), e azul (negativo) - amarelo (positivo), respectivamente. En xeral, ao longo do experimento os cultivos evolucionaron cara a seren máis luminosos, máis vermellos e máis amarelos con respecto ao día 0 do experimento (Fig.14).

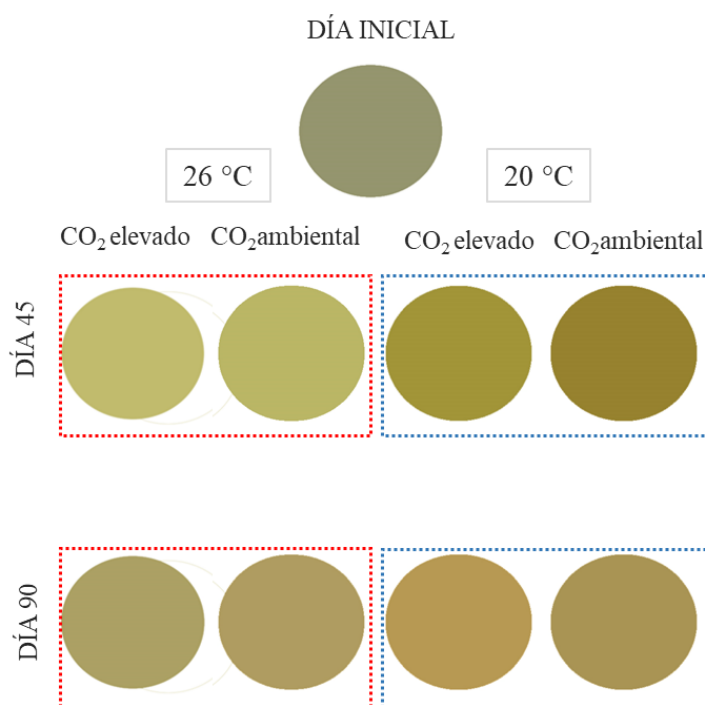


Fig. 14. Cor, segundo as coordenadas CIELAB, do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de concentración de CO<sub>2</sub> e temperatura a día 0, 45 e 90 dende o comezo do experimento.

En canto ó parámetro  $L^*$  (Figura 15), ata o día 45 varía significativamente en sentido contrario nas mostras sometidas a distintas temperaturas, cun aumento deste parámetro no caso de mostras mantidas a  $26^{\circ}\text{C}$  (fanse mais luminosas) e unha diminución no caso das mantidas a  $20^{\circ}\text{C}$  (oscurécense). O día 45 supón un punto de inflexión xa que a partires de aquí as mostras de ambas condicións de temperatura cambian de tendencia para amosar valores moi cercanos entre eles o día 90.

No que ao parámetro  $a^*$  se refire (Fig.16), obsérvase que as mostras de todos os tratamentos amosan unha variación cara o vermello. Ao final do experimento, as mostras mantidas a  $20^{\circ}\text{C}$  son significativamente mais vermellas que as mantidas a  $26^{\circ}\text{C}$ .

As variación do parámetro cromático  $b^*$  móstrase na figura 17. Ao final do experimento todas as mostras variaron cara o amarelo. Obsérvase sen embargo que, de novo o día 45 parece marcar un cambio de tendencia de maneira que o incremento de  $b^*$  vese revertido a partir dese día habendo ademais diferencias significativas nos valores obtidos cas distintas temperaturas. Co paso do tempo pódese observar unha lixeira diferenciación de tendencias entre os tratamentos de temperatura, mostrando unha cor máis amarela as mostras tratadas a  $20^{\circ}\text{C}$ . A partires do día 60 de experimento os valores de todas as condicións tenden a diminuír. Estatísticamente existe variación de color asociada ao efecto do  $\text{CO}_2$  no día 45 nas mostras mantidas a  $26^{\circ}\text{C}$  e no día final do experimento nas mantidas a  $20^{\circ}\text{C}$ .

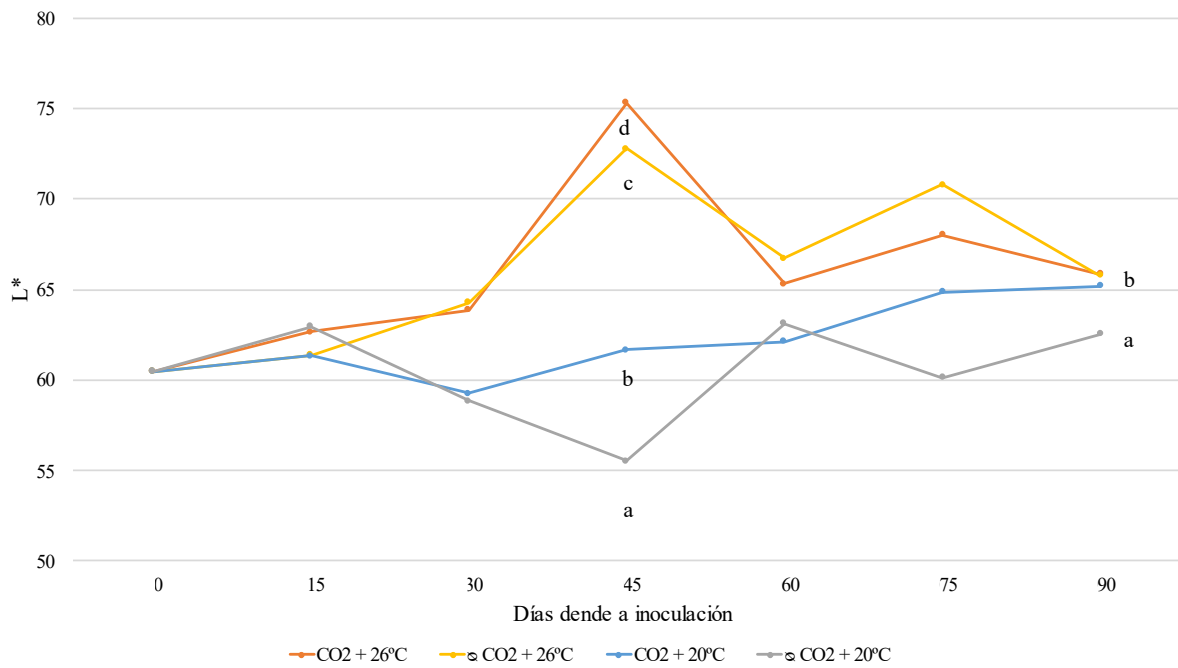


Fig 15. Valores do parámetro de color  $L^*$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de temperatura e concentración de  $CO_2$ . As letras sobre a gráfica (a,b,c,d) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

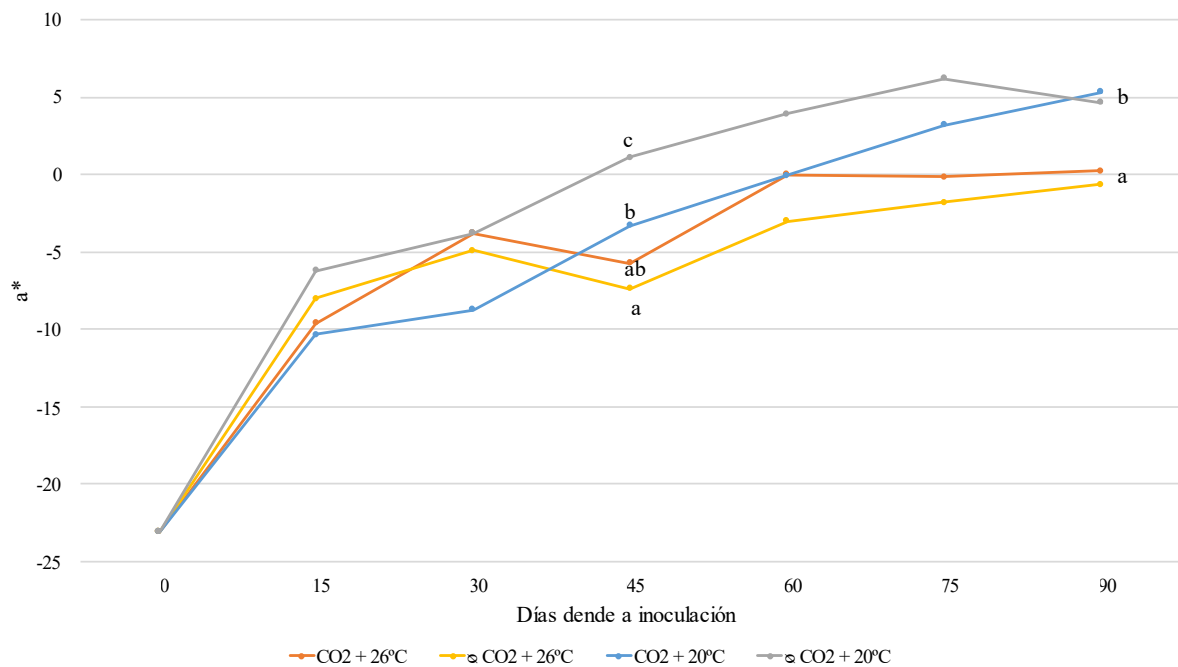


Fig 16. Valores do parámetro de color  $a^*$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de temperatura e concentración de  $CO_2$ . As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

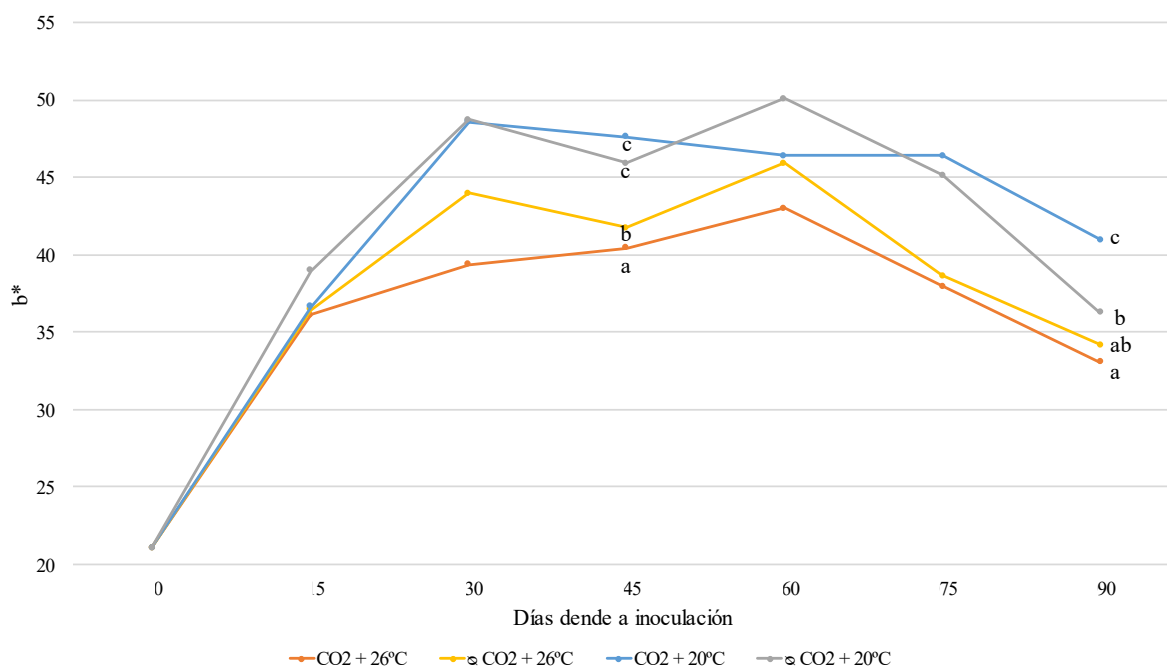


Fig 17. Valores do parámetro de color  $b^*$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de temperatura e concentración de  $\text{CO}_2$ . As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferenzas estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3. Cuantificación do contido en pigmentos

O contido en pigmentos dos organismos fotosintéticos é un indicador do estado fisiolóxico e do seu desenvolvemento. Baixo calquera das condicións estudadas, o contido de Chl a reduciuse co paso do tempo con respecto ao inicio do experimento, sufrindo fluctuacións ata o final do experimento, onde tódalas mostras acadaron valores semellantes (Fig.18a).

O contido de clorofila b (Chl b) con respecto a clorofila a (Fig.18b) aumentou co paso do tempo para tódalas mostras e amosou diferenzas significativas debidas a interacción dos factores temperatura e  $\text{CO}_2$ . Obsérvase un aumento nos valores das mostras mantidas a 26°C con e sen exposición a  $\text{CO}_2$  e das mostras mantidas a 20°C sen exposición a  $\text{CO}_2$  ata o día 45; as mostras mantidas a 20°C expostas a  $\text{CO}_2$  mostran unha diminución dos valores ata o día 30, a partir do cal aumentan ata o día 45. Dende o día 45, os valores das mostras de tódalas condicións de

temperatura e de exposición a CO<sub>2</sub> seguen a mesma tendencia chegando ata valores moi similares entre eles o día 90.

O contido en carotenoides con respecto a clorofila a aumentou co paso do tempo para tódalas mostras. O día 30 e o día 60 os valores das mostras amosaron diferencias significativas en función da exposición a CO<sub>2</sub>, sen embargo, cara o final do experimento, os valores de todas as mostras tenderon cara o mesmo punto sen amosar diferencias entre condicións de temperatura ou CO<sub>2</sub> (Fig.18c).

O contido en scitonemina con respecto a clorofila a ao longo do experimento variou de forma similar para os valores das mostras sometidas a tódalas condicións de temperatura e exposición a CO<sub>2</sub> (Fig.18d). A partires do día 75, tódolos valores experimentan un aumento notable diferenciándose por un lado as mostras mantidas a 20°C expostas a CO<sub>2</sub> e as mostras mantidas a 26°C sen exposición de CO<sub>2</sub>, que alcanzaron valores similares, e polo outro as mostras mantidas a 20°C sen exposición a CO<sub>2</sub> e as mantidas a 26°C expostas a CO<sub>2</sub>.

Por último, o índice de feofitinización (PQ) (Fig.18e), que da información sobre a degradación da clorofila a de maneira que valores altos do índice indican niveis baixos de degradación da clorofila a, diminuiu en tódalas mostras co paso do tempo, o que sinala cara a un aumento na degradación de clorofila a. Durante todo o experimento as mostras mantidas a 20°C mantiveron valores de PQ superiores con respecto as mostras mantidas a 26°C o que indica unha maior degradación dos cultivos mantidos a 26°C.



Fig 18. Cantidad de clorofila a (a), clorofila b en relación á chlorofila a (b), carotenoides en relación á chlorofila a (c), scytonemina en relación á chlorofila a (d) e índice de feofitinización PQ (435nm/415nm) (e) do cultivo mixto da cyanobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de exposición a CO<sub>2</sub> e temperatura. As letras sobre a gráfica (a,b) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor p ≤ 0,05).

#### 4.1.4. Cuantificación do contido de carbono inorgánico (CI) TOC-IC

Na figura 19 móstranse os valores de CI disolto nos tubos de ensaio. As mostras non inoculadas non presentaron variacións no contido en CI disolto durante o experimento (valores non mostrados). Os valores de CI disolto das mostras inoculadas variou de forma similar en todos as mostras independentemente das condición de temperatura e concentración de CO<sub>2</sub>, mostrando un aumento ata o día 30 e diminuíndo ata o día 45, a partires do cal volven a aumentar para manterse constantes ata o final do experimento.

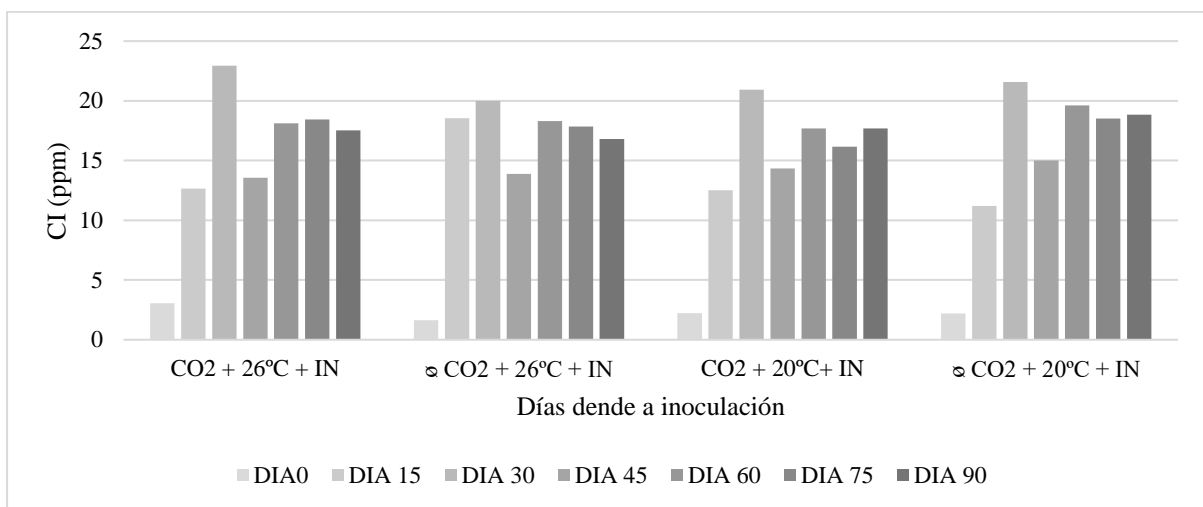


Fig 19. Cantidad de carbono inorgánico disolto (ppm) no cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de exposición a CO<sub>2</sub> e temperatura.

#### 4.1.5. Osíxeno disolto

A concentración de osíxeno disolto é indicador da actividade fotosintética. Na figura 20 mostrase a variación da concentración de osíxeno disolto ( $\Delta$  O<sub>2</sub> disolto) con respecto ao inicio do experimento. A concentración de osíxeno disolto diminuíu co paso do tempo en tódalas mostras independentemente da temperatura e a concentración de osíxeno ata o día 75, aumentando lixeiramente de cara o final do experimento. Non obstante, as mostras mantidas a 20°C presentaron un incremento na cantidade de e osíxeno disolto os primeiros días do experimento pero igualáronse ao longo do tempo.

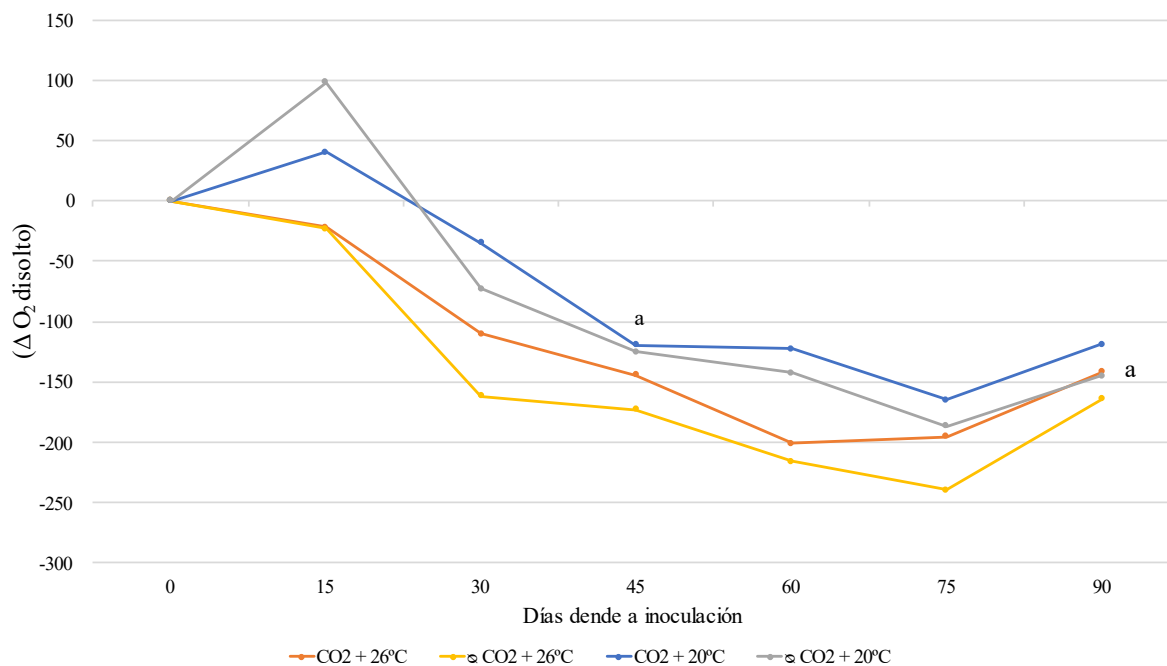


Fig.20. Variación da concentración de osíxeno disolto ( $\Delta O_2$  disolto) no cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* con respecto ao inicio do experimento baixo diferentes condicións de exposición a  $CO_2$  e temperatura. A letra sobre a gráfica (a) indica as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.6. Espectroscopía de absorción atómica en chama

O contido de  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  disolto é indicativo da meteorización do granito e ao mesmo tempo, por comparación, da incorporación deses elementos nos organismos vivos. Os valores dos ratios do contido en  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$  e  $K^+$  das mostras inoculadas fronte as non inoculadas representáanse na figura 21. Valores por enriba de 1 implican unha maior proporción do elemento nas mostras inoculadas que nas non inoculadas, mentres que valores menores a 1 representan maior proporción do elemento nas mostras non inoculadas con respecto ás que sí están inoculadas. No presente experimento, en todos os casos a cantidade de elementos disoltos nas mostras inoculadas foi maior que nas mostras sin inocular polo que os organismos induciron alteración do sustrato.

Analizando os datos para os distintos elementos, no caso de  $\text{Ca}^{+2}$  (Fig.21a) e  $\text{Na}^{+}$  (Fig.21d) nas mostras mantidas a 26°C prodúcese unha maior liberación ou ben un menor consumo por parte dos organismo destes ions que no caso das mostras mantidas a 20°C. No caso do  $\text{Mg}^{+2}$  (Fig. 21b) non se observa un efecto da temperatura baixo a condición de alta dispoñibilidade de  $\text{CO}_2$ , pero si baixo concentracións ambientais de  $\text{CO}_2$ , onde o a súa liberacion dende a roca e maior, ou o consumo polos organismos menor, a 26 ca 20 grados. No caso do contido en  $\text{K}^{+}$  (Fig.21c), as mostras expostas a  $\text{CO}_2$  presentan valores maiores, o que implica maior liberación do elemento, ou un menor consumo deste elemento por parte dos organismos, que nas mostras mantidas con  $\text{CO}_2$  ambiental.

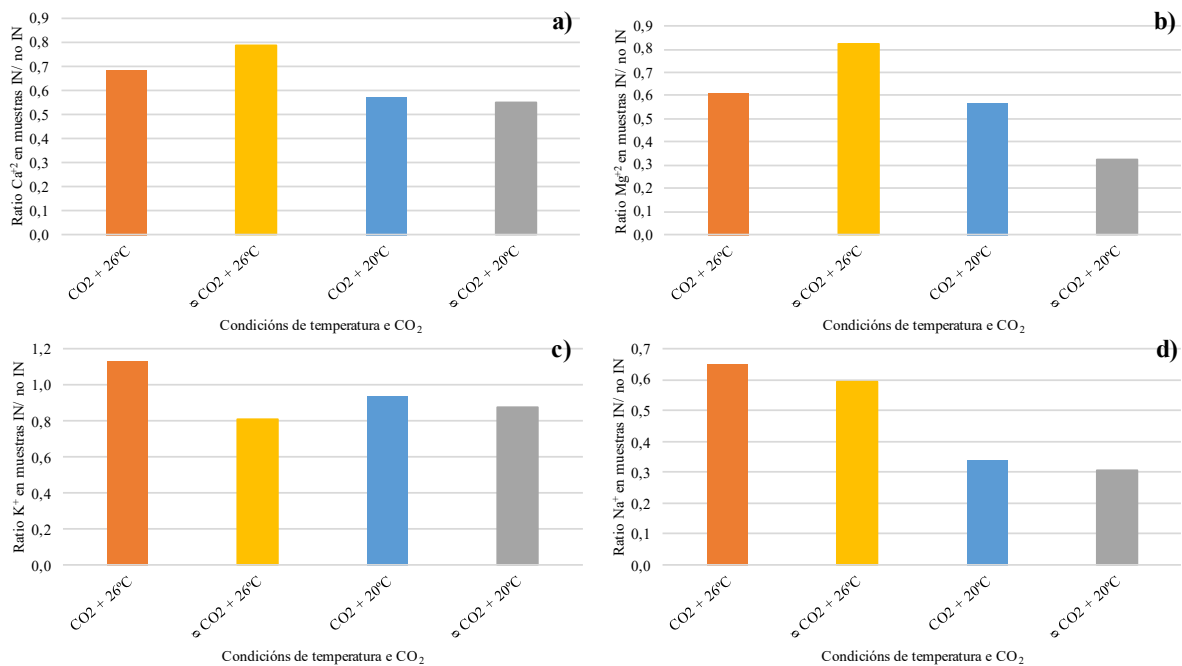


Fig.21. Ratios dos contidos en (a)  $\text{Ca}^{+2}$ , (b)  $\text{Mg}^{+2}$ , (c)  $\text{K}^{+}$  e (d)  $\text{Na}^{+}$  nas mostras inoculadas (IN) do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* con respecto ás non inoculadas baixo diferentes condicións de exposición a  $\text{CO}_2$  e temperatura.

#### 4.1.7. Cuantificación do pH

O pH da información da acidez e basicidade das mostras. O pH das mostras inoculadas variou cas diferentes condicións (Fig.22). As mostras inoculadas presentaron valores de pH máis básicos que as mostras sen inocular o que é debido o pH do medio de cultivo. As mostras mantidas a 26°C presentaron ao final do experimento un pH lixeiramente máis alto que as mostras inoculadas mantidas a 20°C, lixeiramente mais ácidas, independentemente do tratamento de CO<sub>2</sub>. En calquera dos casos as diferencias non son significativas.

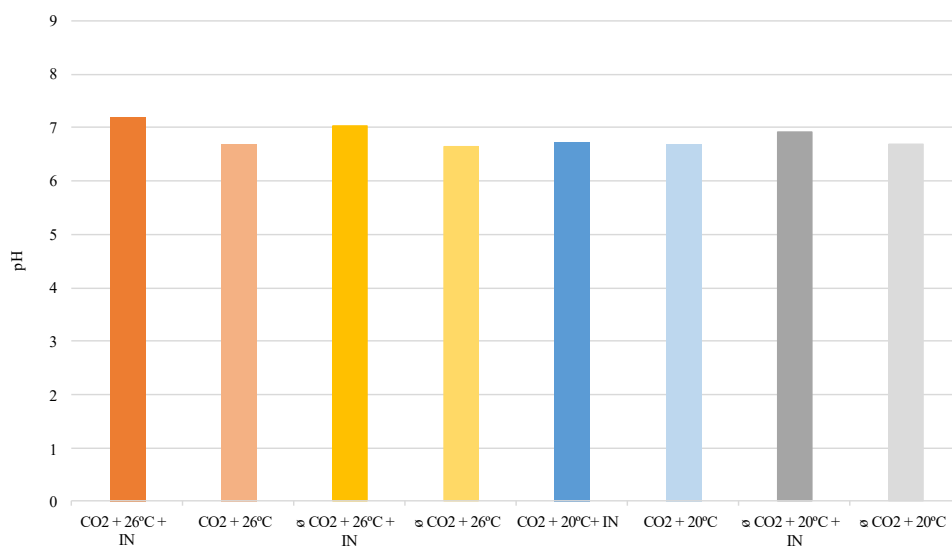


Fig 22. pH do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* das mostras inoculadas (IN) e de mostras non inoculadas baixo diferentes condicións de temperatura e exposición a CO<sub>2</sub>.

## 4.2 Experimento UV-B

### 4.2.1. Variación da proporción de células de *Synechocystis sp* PCC 6803 e *Bracteacoccus minor*

O contido celular das mostras variou segundo a exposición á luz UV-B (Fig.23). O día 0 partiuse dun cultivo mixto 1:1 en número de células, polo que a proporción de células era de 50% de alga verde e 50% de cianobacteria. Ao final do experimento, as mostras do control presentaron unha proporción similar á do día 0 cunha porcentaxe do 53% de células de alga. Sen embargo, as mostras expostas a luz UV-B sufriron unha diminución do contido en células algales e un aumento da porcentaxe de células cianobacterianas que garda relación co tempo de exposición a luz UV-B. As mostras expostas a condicións de luz UV-B calculada para Irlanda (1 hora/día) tiveron ao final do experimento ao redor dun 8% de células algales, mentres que as mostras expostas á radiación calculada para Galicia (2 horas/día) tiveron un 4,5% de células algales e as sometidas as condiciones de Portugal (3 horas/día) ao redor do 3% de células algales.

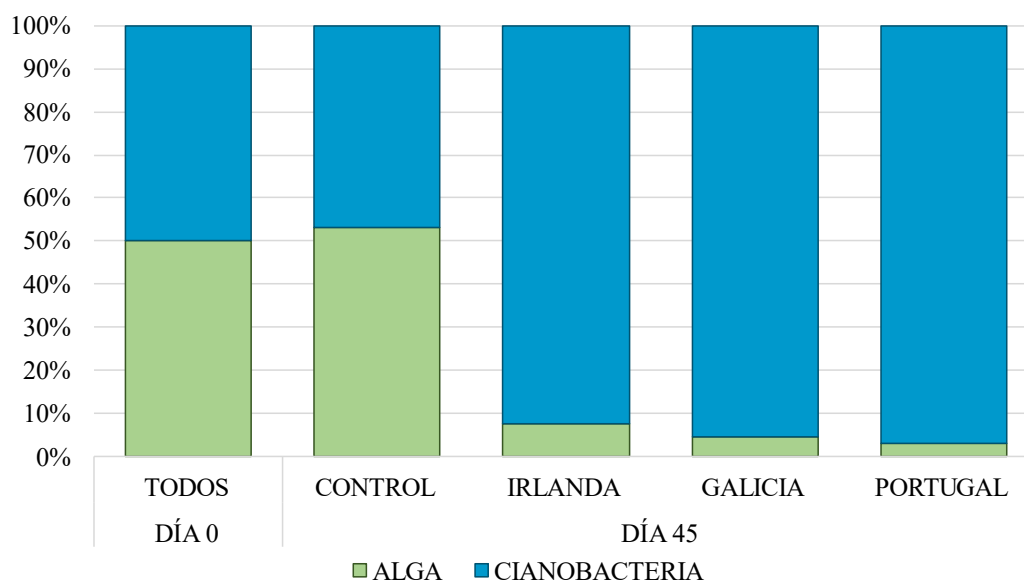


Fig.23. Porcentaxes da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* no cultivo mixto a día 0 e 45 do baixo as diferentes condicións de exposición a luz UV-B.

#### 4.2.2. Fluorescencia clorofílica

A fluorescencia mínima ( $F_0$ ) é, como xa se dixo previamente, un indicador de desenvolvemento do biofilm. Na figura 24 pode observarse a variación da fluorescencia mínima nos biofilms expostos a diferentes condicións de radiación UV-B ao longo do experimento. En xeral, os valores de fluorescencia mínima tenderon a aumentar co paso do tempo gardando relación co número de horas de exposición á luz UV-B. Os valores de  $F_0$  das mostras denominadas Irlanda, Galicia e Portugal seguen unha variación similar: aumentan ata o día 15 e diminúen a partir do día 30 por orde, é dicir, as mostras con maior tempo de exposición a UV-B (Portugal) presentan valores menores que as mostras con tempos baixos de exposición a UV-B (Irlanda). Por outro lado, as mostras do control presentan unha tendencia liñal de aumento do parámetro  $F_0$  co paso do tempo.

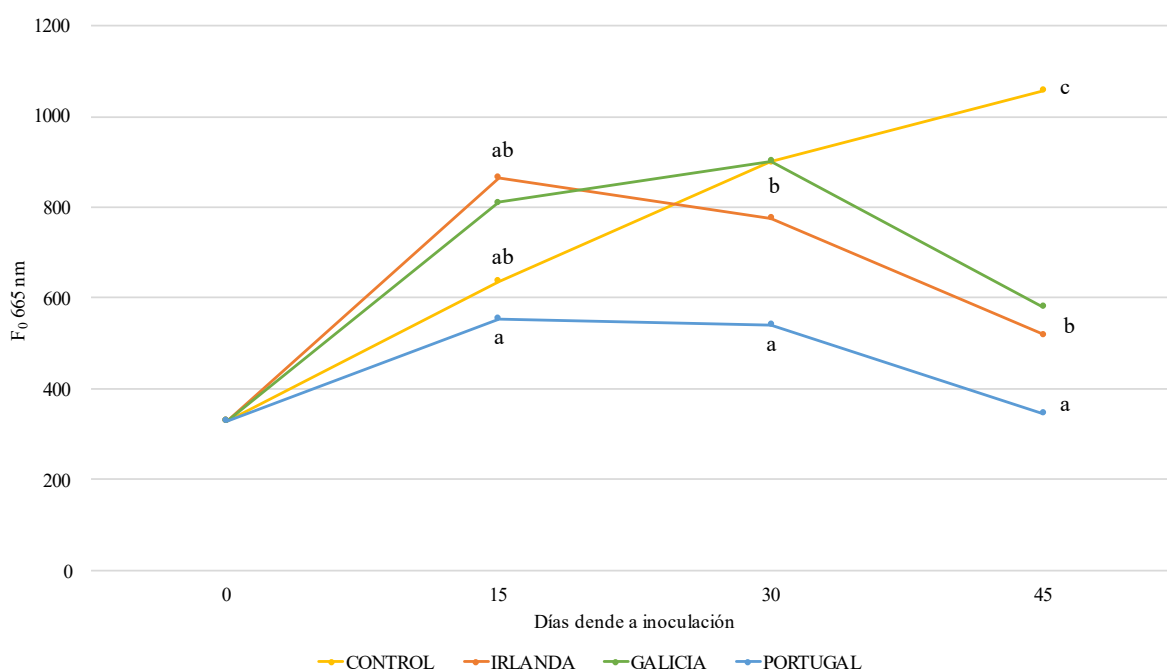


Fig 24. Valores de  $F_0$  a 665 nm do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de exposición a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

A relación  $F_0\ 470\text{nm} / F_0\ 645\text{nm}$  das mostrás (Fig. 25), que é un indicador do dominio das algas verdes (valores altos) ou das cianobacterias (valores baixos) (Vázquez Nion, 2016), aumentou ata o día 15 o que indica que nese periodo aumentou o dominio das algas verdes; a partires dese día os valores da relación  $F_0\ 470\text{nm} / F_0\ 645\text{nm}$  diminuíron de forma marcada e por igual nas mostrás expostas a radiación UV-B, indicando o dominio cada vez mais acusado das cianobacterias. As mostrás control comportáronse da mesma maneira pero a diminución do parámetro foi moito menos acusada. Ao día final do experimento os valores do parámetro para as mostrás control foron similares aos do día 0, mentres que os valores para as mostrás expostas a UV-B foron significativamente menores.

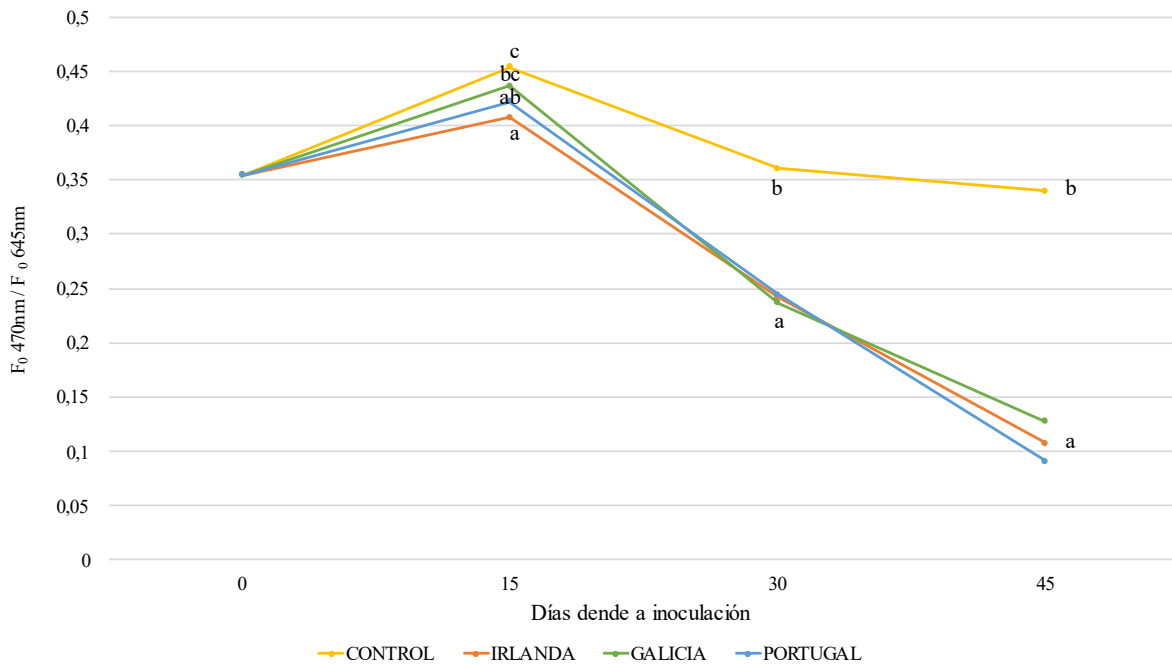


Fig 25. Relación  $F_0,470\text{nm} / F_0,645\text{nm}$  do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de exposición a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

Os valores de rendemento cuántico máximo ( $F_v/F_m$ ) indican a eficiencia da actividade fotosintética. Na figura 26 pódese ver que tódalas mostrás presentaron unha diminución nos

valores de  $F_v/F_m$  ata o día 15, a partires do cal os valores das mostras sometidas as condicións de luz UV-B de Irlanda, de Galicia e as mostras control aumentaron ata o día 30 volvendo a diminuír de cara ao día final do experimento. Os valores máis altos corresponderon ás mostras de control seguidas das mostras que foron sometidas a 1, 2 e 3 horas/ días, respectivamente. Así, as mostras sobre as que se ensaiaron as condición de Portugal tiveron os valores máis baixos de rendimento cuántico máximo, estando durante todo o experimento por debaixo dun 40% de eficiencia fotosintética.

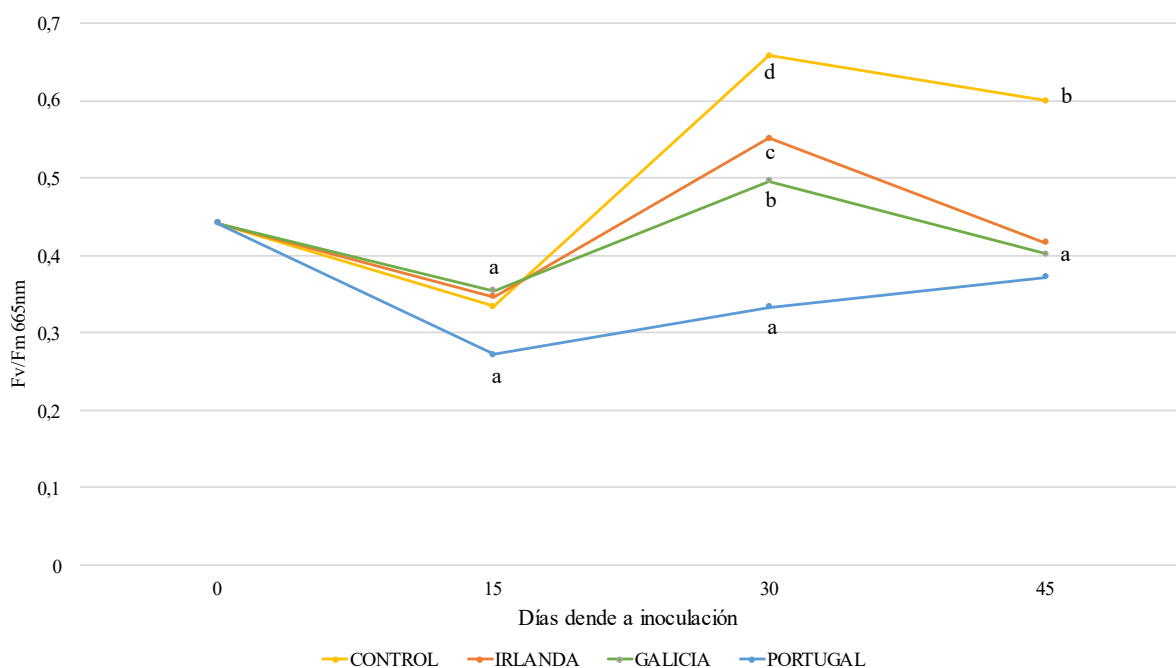


Fig.26. Rendimento cuántico máximo a 665nm ( $F_v/F_m$ ) do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes *minor* baixo 0,1,2 e 3 h de exposición diarias a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c,d) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

O rendimento cuántico efectivo ( $F_v'/F_m'$ ) da información da probabilidade de que un fotón de luz absorbido sexa utilizado no PSII. Os valores para este parámetro (Fig.27) diminuíron ata o día 15 nas mostras de tódalas condicións de exposición a luz UV-B , a partires dese día aumentaron gardando relación co tempo de exposición. Os valores máis altos corresponderon

cas mostras control, non expostas a luz UV-B, e os máis baixos as mostras expostas a radiación UV-B durante máis tempo.

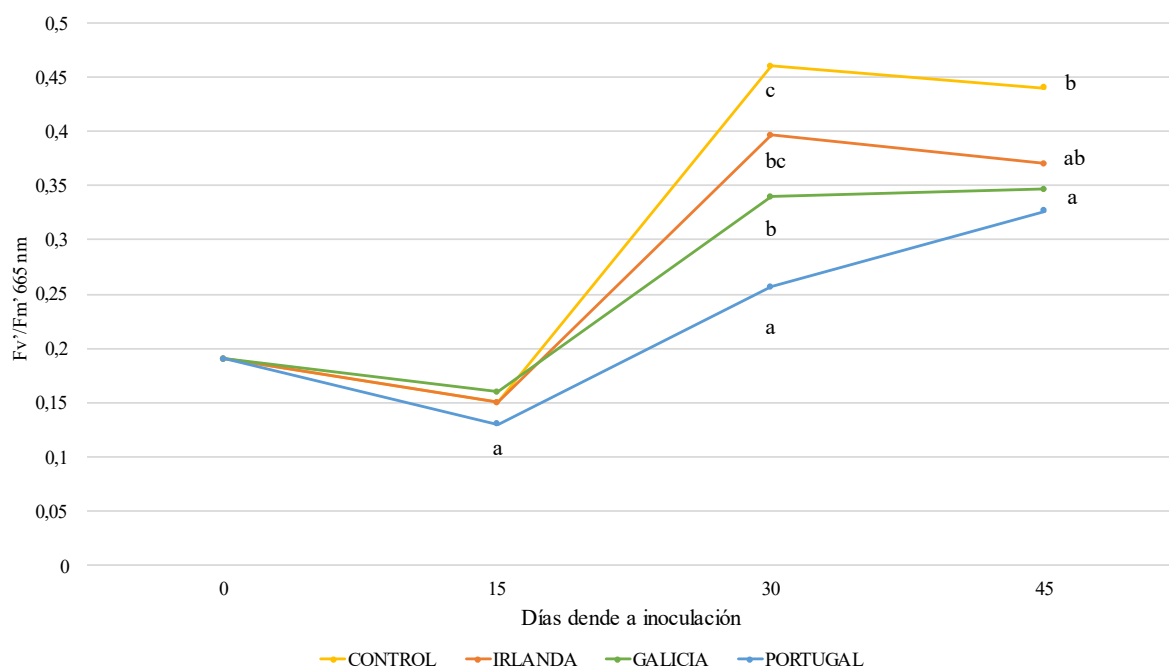


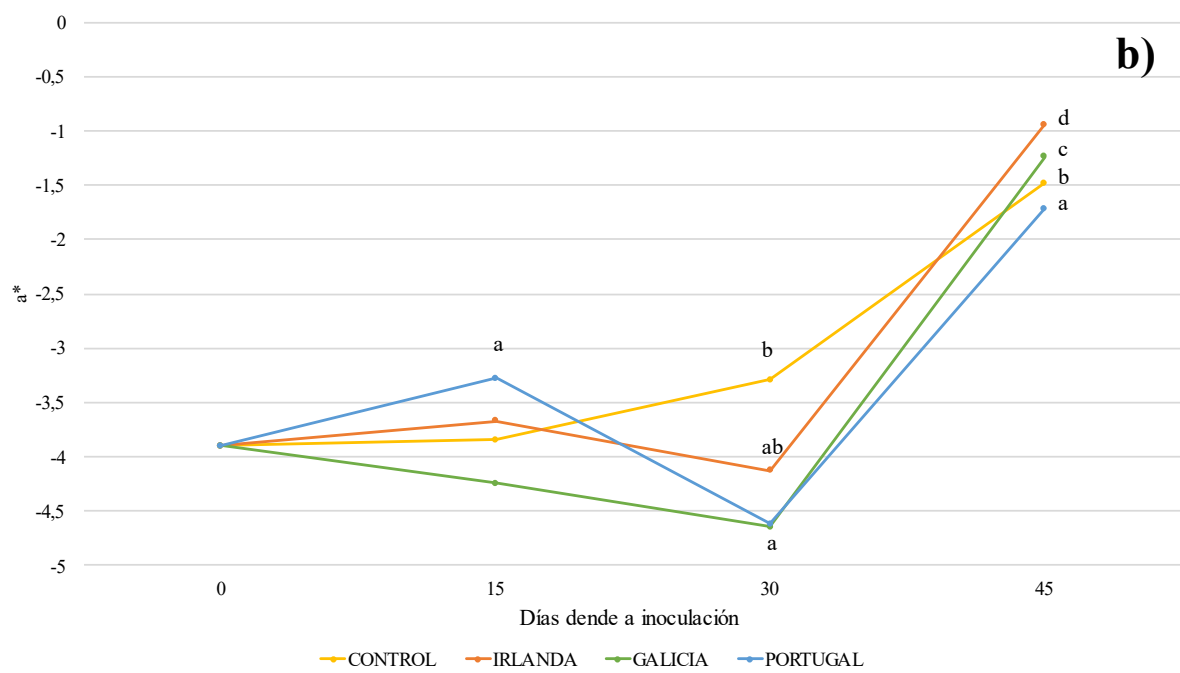
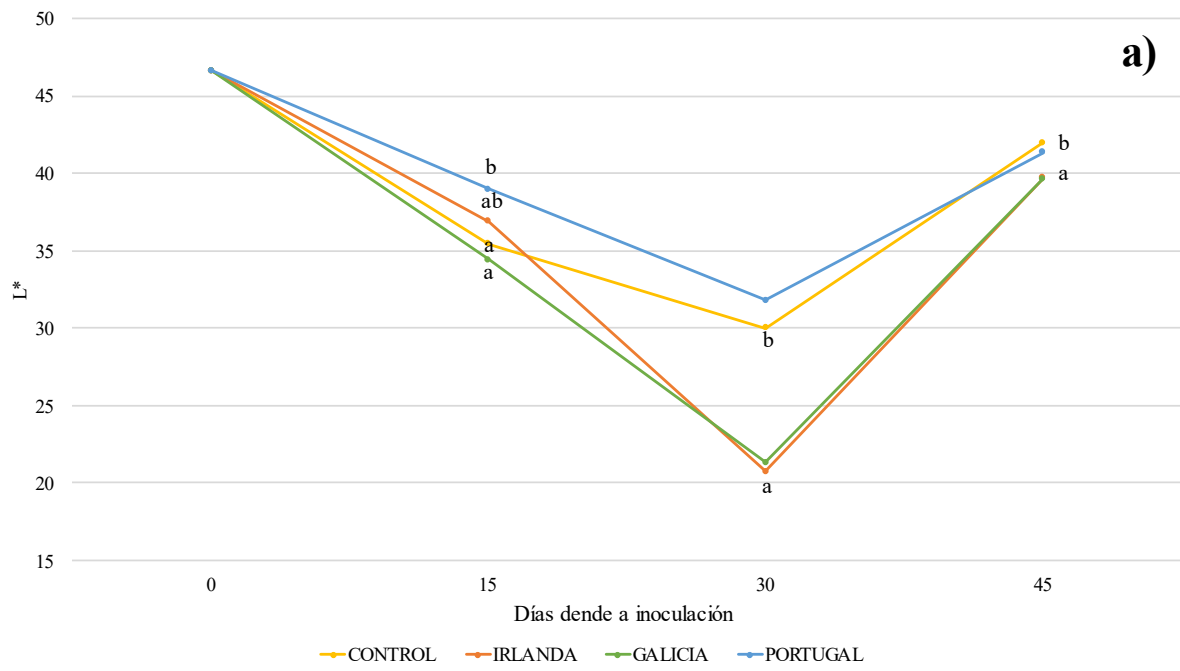
Fig.27. Rendemento cuántico efectivo ( $F_v'/F_m'$ ) a 665nm do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo 0,1,2 e h de exposición diarias a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.3. Cuantificación da variación da cor

Na figura 28 móstrase a evolución dos parámetros da cor nas mostras sometidas ás distintas condicións de radicación UV-B. En xeral, as mostras de todas as condicións de exposición a luz UV-B escureceron co tempo. Os valores de  $L^*$  (Fig.28a) experimentaron unha tendencia similar nas mostras expostas a UV-B e nas mostras control diminuindo ata o día 30, a partires do cal volven a aumentar pero sendo o valor de  $L^*$  ao final do experimento menor que ao principio. As mostras expostas ás condicións de Irlanda (1hora/día) e de Galicia (2 horas/día) presentan valores menores, e moi parecidos entre eles, que os valores das mostras expostas ás condicións de Portugal (3 horas/día) e o control.

O parámetro  $a^*$  (Fig.28b), aumentou en tódolos casos, volvéndose os organismos máis vermellos co paso do tempo. Hai variacións nos primeiros 15 días de experimento e a día 30 as mostras expostas ás condicións de luz UV-B de Irlanda, Galicia e Portugal tenden a valores máis negativos, o que significa que son máis verdes que no comezo do experimento, sen embargo a partir do día 30 os valores das mostras de tódalas condicións de luz UV-B aumentan de forma acusada para chegar ao día final do experimento a valores moi similares entre eles, e claramente menos verdes (máis vermellos) que no principio do experimento.

En xeral os valores de  $b^*$  (Fig.28c) das mostras de tódalas condicións de exposición a luz UV-B tenderon a diminuír co paso do tempo. Durante os primeiros 15 días obsérvase un leve aumento, é dicir, un amarelecemento das mostras expostas as condicións de Portugal e control, e poucas variacións no resto dos casos con respecto ao día 0. A partir dese día, e ata o final do experimento, tódalas mostras tornaron cara unha cor menos amarela. As mostras sometidas ás condición de Galicia e Irlanda e as mostras control, sufreron un decaemento de  $b^*$  moi acusado nos seguintes 15 días, mentres que as mostras sometidas as condicións de Portugal diminuíron os seus valores de forma menos abrupta. Ao final do experimento, tódolos supostos acadan valores moi semellantes, moi por debaixo dos de partida.



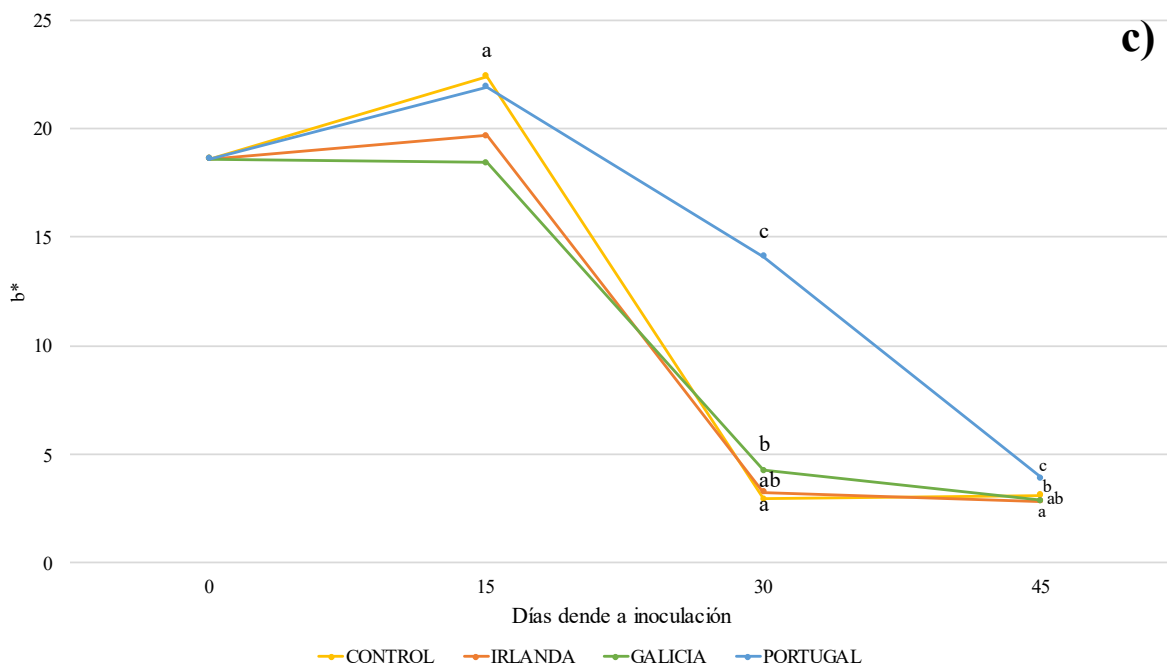


Fig.28. Medida dos parámetros de color  $L^*$ (a),  $a^*$ (b) e  $b^*$ (c) do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo 0,1,2 e h de exposición diarias a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c,d) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.4. Cuantificación do contido en pigmentos

Na figura 29 represéntanse as variacións no contido en pigmentos na mostra control e nas mostras sometidas ás distintas condición de radiación UV-B. O contido en pigmentos dos microorganismos que compoñen os biofilms é un indicador de desenvolvemento e senescencia.

De modo xeral, o contido en cada un dos pigmentos estudados variou de igual maneira nas mostras sometidas a 1, 2 e 3 horas/día que no control, non obstante, as mostras sometidas a 3 horas/día tiveron

O contido en clorofila a (Fig.29a) tendeu a aumentar co paso do tempo nas mostras de tódalas exposicións a luz UV-B. Os valores máis altos ao final do experimento corresponderon ás mostras expostas as condicións de Irlanda e Galicia, sendo moi similares entre elas, seguidos polas mostras expostas as condición de Portugal, e finalmente as mostras control. A variación

ao longo do tempo foi similar á que ocorreu na mostra control, desviándose desa tendencia unicamente a mostra exposta durante mais tempo a UV-B. Con respecto á relación da clorofila b ca clorofila a (Fig.29b), atopamos diferenzas entre as mostras según as horas de exposición a luz UV-B. Os valores das mostras expostas durante mais tempo (3h/día) tenderon a diminuír co paso do tempo mentres que os valores do resto das mostras tenderon a aumentar co paso do tempo, aumentando os valores das mostras do control de forma máis rápida e acusada.

O contido de carotenoides totais con respecto á clorofila a (Fig.29c) diminuí en tódalas mostras co paso do tempo, sen embargo esta diminución foi diferente en función das horas de luz UV-B ás que foron expostas as diferentes mostras. A ratio de carotenoides fronte a chl a das mostras control diminuíu de forma moi acusada a partires do día 15, excepto no caso das mostras expostas por mais tempo (3 horas/día) a luz UV-B, sendo estas as que mostraron un maior contido en carotenoides ao final do experimento.

Os valores do contido en scitonemina con respecto á clorofila a (Fig.29d) experimentan unha diminución acusada dende o comezo do experimento ata o día 15 nas mostras de tódalas condicións de luz UV-B. As mostras control e as expostas a 1 e 2 horas/día perderon totalmente a scitonemina, non obstante, os valores das mostras expostas por máis tempo presentaron un aumento ata o día 30 aínda que e volveu a diminuír cara o día final do experimento.

O índice de feofitinización (PQ) (Fig.29e) aumentou para todas as mostras ata o día 15, a partires do cal produciuse unha baixada brusca dos valores das mostras control e as expostas a 1 e 2 horas/día, mentres que as mostras expostas a UV-B durante máis horas diarias presentaron unha diminución máis paulatina dos valores do índice.

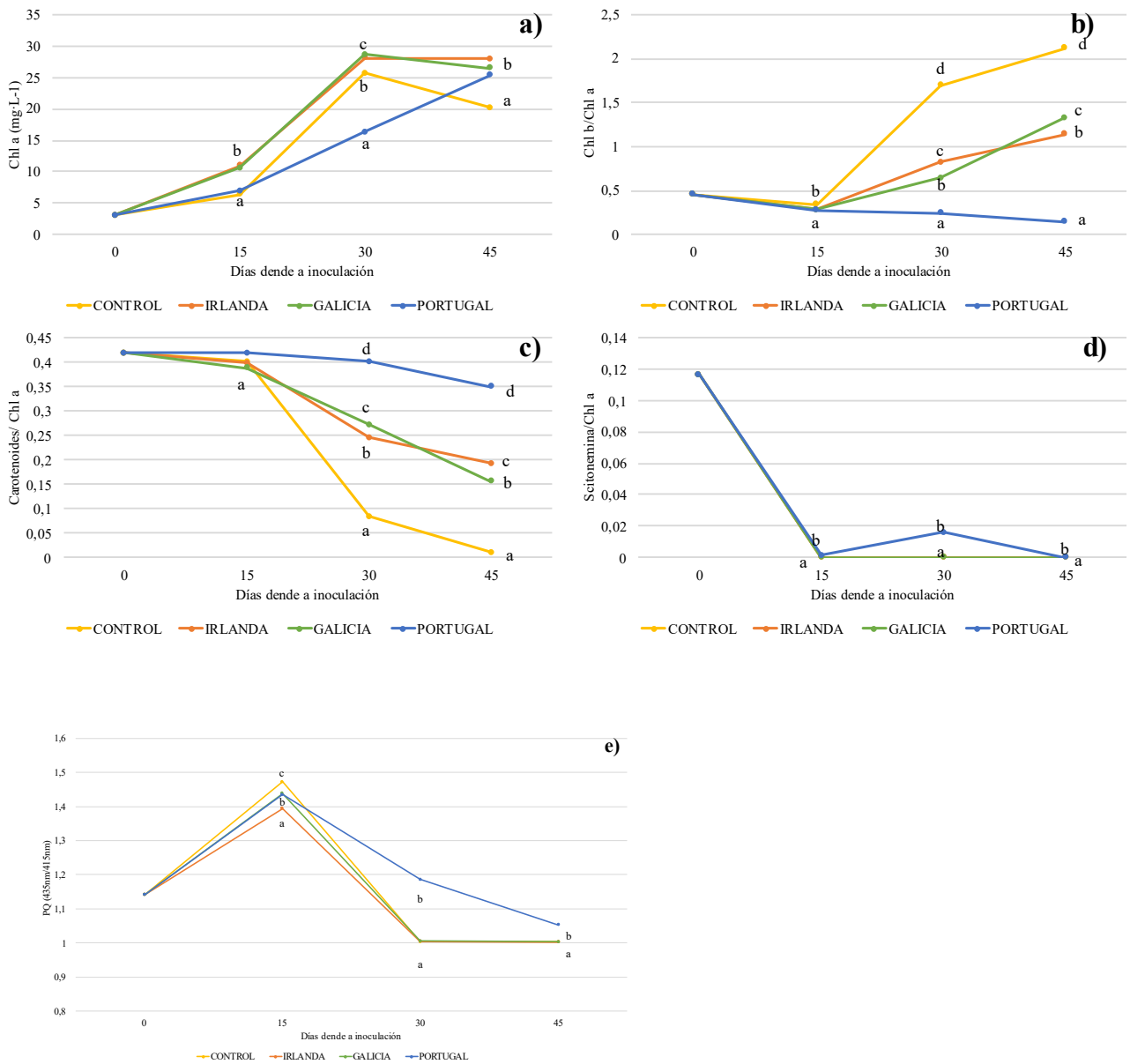


Fig.29. Cantidad dos pigmentos clorofila a (a), clorofila b (b), carotenoides (c) e scitonemina (d) e PQ (435nm/415nm) (e) do cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo 0,1,2 e h de exposición diarias a luz UV-B. As letras sobre a gráfica (a,b,c) indican as diferencias estatisticamente significativas tralas probas Anova e post hoc de Tukey HSD (valor  $p \leq 0,05$ ).

#### **4.2.5. Microscopía confocal (CLSM)**

Na figura 30 móstranse imaxes obtidas mediante CLSM dos biofilms expostos a 0 h (control), 1h (Irlanda), 2h (Galicia) e 3h (Portugal) de luz UV-B. A matriz proteica móstrase de cor verde, os carbohidratos en vermello, as células de algas verdes en azul e as de cianobacterias en rosa. As variacións nos biofilms entre 0 e 3 horas de exposición ao UV-B son evidentes, especialmente en relación ao número de células observadas, sendo maior na mostra control. Ademais, na mostra control obsérvase a presenza tanto de células de algas verdes coma de células de cianobacteria distribuídas de forma homoxénea pola superficie estudada. A medida que as horas de exposición a UV-B aumentan, obsérvase unha diminución do número de algas fronte a unha dominancia das cianobacterias. Ademais, atopamos que a acumulación de horas de UV-B provoca un aumento do tamaño das células de algas verdes, que pese a ser menor en número, son máis grandes en tamaño (círculo vermello).

Na mostra control obsérvase unha distribución filamentosa tanto dos carbohidratos coma das proteínas. A medida que aumentan as horas de exposición a UV-B, apréciase unha tendencia á diminución das proteínas fronte a un aumento relativo da presenza de carbohidratos.

Obsérvase tamén que o desenvolvemento dos carbohidratos, e especialmente das proteínas, está máis asociado ás algas verdes que ás cianobacterias. Neste sentido, parece que a diminución das proteínas nas mostras expostas por mais tempo, vai ligada a un decremento do número de células de algas verdes.

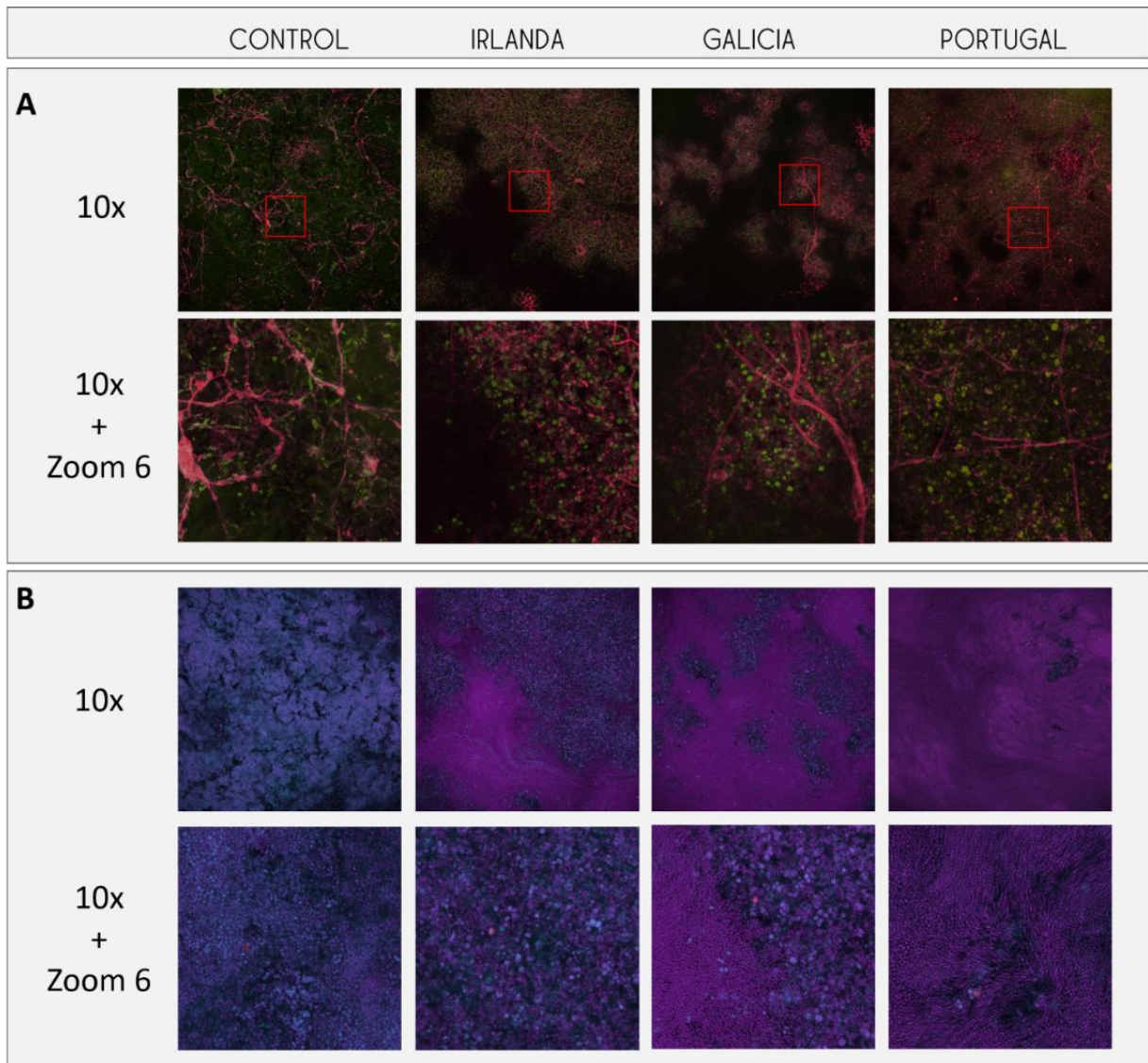


Fig.30. Imaxe por microscopía de barrido láser confocal (CLSM) da biopelícula desenvolvida na superficie das membranas inoculadas con un cultivo mixto da cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 e a alga *Bracteacoccus minor* baixo diferentes condicións de exposición a luz UV-B. A: a cor verde indica as proteínas tinguidos con FTIC e a vermella os hidratos de carbono tinguidos con ConA-TMR. B: a cor azul é a autofluorescencia da clorofila das algas verdes e o rosa a autofluorescencia da clorofila das cianobacterias.

## 5. Discusión

Os modelos climáticos, baseados en principios físicos que poden reproducir as características observadas dos cambios no clima pasado e actual, proporcionan estimacións cuantitativas plausibles do cambio climático futuro a diferentes escalas. Actualmente, as proxeccións mostran un aumento das temperaturas ao longo do século XXI en todos os escenarios de emisión avaliados e cambios a longo prazo en todos os compoñentes do sistema climático, aumentando a probabilidade de impactos graves, xeneralizados e irreversibles sobre as persoas e sobre o patrimonio natural e histórico (IPCC, 2014). Os factores ambientais chave, susceptibles de afectar aos organismos vivos colonizadores e deteriorantes do patrimonio cultural son o clima e a química atmosférica, polo que os cambios nestes factores poden causar potenciais cambios na relación entre biota e patrimonio construído (Viles & Cutler, 2012).

Este traballo profundiza no coñecemento dos efectos que poden provocar os cambios esperados dos factores ambientais (temperatura, concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico e radiación UV-B) nun escenario futuro de cambio climático sobre os organismos colonizadores do patrimonio cultural granítico.

### 5.1. Experimento CO<sub>2</sub>-Temperatura

A análise da evolución dos cultivos sometidos a diferentes condicións de temperatura (20, 26°C) e de CO<sub>2</sub> (ambiental, elevado) mostran que ambos parámetros, individualmente ou en combinación, afectan significativamente ao desenvolvemento dos organismos. O día 45, a metade do experimento, supón un punto de inflexión nas respostas aos factores ambientais. Ata o día 45 hai unha evolución no crecemento, desenvolvemento e eficiencia da actividade fotosintética de todas as mostras marcada maiormente polas diferenzas entre condicións de temperatura, aínda que tamén se mostran diferenzas significativas en función das condicións de CO<sub>2</sub> e da interacción das condicións de temperatura e CO<sub>2</sub> nalgúns parámetros. A partires

do día 45 prodúcese un cambio no que todos os parámetros medidos nos cultivos, independentemente das condicións ás que estean sometidos, conducen ata o mesmo punto e desaparecen as diferenzas que se manifestaron ata a metade do experimento.

No que se refire ao desenvolvemento dos cultivos, se ben o número total de células mantense ata o día 45 (Fig.10), varía a proporción dos distintos organismos, xa que aumenta a porcentaxe de algas verdes en relación ás cianobacterias, especialmente nos cultivos mantidos a 20°C. O final do experimento, o número total de células é menor que no comezo do experimento, pero a porcentaxe de algas verdes é maior, especialmente nos cultivos mantidos a 20°C e sen adición de CO<sub>2</sub>.

O aumento na porcentaxe de algas o longo do experimento está tamén reflexado no parámetro F<sub>0</sub>470nm / F<sub>0</sub>645nm (Fig. 12). O sinal de F<sub>0</sub> a 470 nm está relacionado coa clorofila b e o sinal a 645 nm coa alofocianina, sendo a relación F<sub>0</sub>470nm / F<sub>0</sub>645nm un indicador do dominio das algas verdes (valores altos) ou das cianobacterias (valores baixos) (Vázquez Nion, 2016). Tendo en conta o anterior, o aumento no parámetro F<sub>0</sub> ao longo do experimento está determinado polo incremento na porcentaxe de algas verdes fronte as cianobacterias, favorecido por condicións de temperatura de 20°C fronte a 26°C e aporte de CO<sub>2</sub>, pero só na primeira etapa do experimento, ata o día 45.

Os datos da cor tamén mostran esa inflexión no día 45, especialmente no parámetro b\*. Tendo en conta que o parámetro da cor b\* varía a súa dirección segundo as células do cultivo se estean a desenvolver ou estean morrendo (Prieto *et al.*, 2002) e a contaxe do número de células, está claro que ata o día 45 os organismos foron desenvolvéndose variando o equilibrio inicial alga/cianobacteria, aínda que respondendo de diferente maneira ás condicións de temperatura e CO<sub>2</sub>, pero a partires do día 45 as cianobacterias, que eran as maioritarias, comezaron a morrer, moi probablemente debido o esgotamento do medio de cultivo. Hai que ter en conta que o

medio de cultivo ten nitróxeno e este elemento non é aportado polo granito polo que se esgota co paso do tempo.

En relación á comentada variación do equilibrio inicial alga/cianobacteria, Ji, *et al.*, (2017) atoparon que as cianobacterias aumentan a súa capacidade competitiva con respecto ás algas verdes en casos de alta concentración de CO<sub>2</sub>, o que corresponde ca tendencia da relación entre algas verdes e cianobacterias deste traballo. Do mesmo modo, o efecto da temperatura sobre os microorganismos foi estudado por varios autores. No caso de organismos colonizadores do Patrimonio Cultural, Fuentes *et al.*, (2021) analizando muros de igrexas graníticas con diferentes orientacións atoparon que en aquelas orientacións nas que a temperatura da parede é menor, nos seus biofilms predominan as algas verdes fronte as cianobacterias.

Ademais, de acordo con estudos previos sobre as respostas das comunidades ao cambio climático, o aumento da temperatura ambiente pode dar lugar a respostas funcionais menos evidentes dos biofilms (Villanueva *et al.*, 2011). Esta idea, xunto cos encontros de Xu *et al.*, (2012) en cultivos de auga doce dominados por algas verdes nos que constataron que a eficiencia fotosintética aumenta co aumento de temperaturas, mentras que, os cultivos dominados por cianobacterias son lixeiramente menos fotosinteticamente eficientes co aumento da temperatura, corresponde cos resultados deste experimento no que, tendo en conta a dominancia das cianobacterias do cultivo mixto, o aumento da temperatura provocou unha diminución significativa no rendemento cuántico máximo, e polo tanto na eficiencia fotosintética. Outro parámetro indicador da actividade fotosintética que mostrou diferencias con respecto ao efecto da temperatura é a cantidade de osíxeno disolto (Fig.20), que foi lixeiramente menor nos cultivos mantidos a maior temperatura.

O rendemento cuántico máximo dos cultivos (Fig.13) foi significativamente diferente en función da interacción da temperatura co CO<sub>2</sub>, sendo as mostras con exposición a CO<sub>2</sub>

fotosintéticamente máis eficientes que as mostras sen exposición a CO<sub>2</sub> que se mantiveron á mesma temperatura e as mostras mantidas a 20°C son fotosintéticamente máis eficientes que as mantidas a 26°C. Isto concorda coa hipótese formulada por Viles & Cutler (2012) de que a exposición a niveis máis altos de CO<sub>2</sub> poida mellorar a fotosíntese de xeito que o aumento das concentracións de CO<sub>2</sub> na atmosfera poida favorecer o crecemento de organismos fotosintetizadores en biofilms subaéreos. Estudos máis recentes demostran unha relación do efecto da exposición ao CO<sub>2</sub> co crecemento en cianobacterias marinas e de auga doce, que revelan un aumento da produtividade da biomasa, e maiores taxas de crecemento e fixación do carbono en condicións de exposición a concentracións elevadas de CO<sub>2</sub> (Dineshbabu *et al.*, 2020; Velu *et al.*, 2019). Así mesmo, estudos levados a cabo en rochas graníticas expoñen que concentracións elevadas de carbono favorecen o crecemento do biofilm e o aumento de pigmentos fotosintéticos, aínda que este efecto parece verse limitado pola dispoñibilidade de auga (Prieto *et al.*, 2020; Daniel Vázquez-Nion *et al.*, 2020).

O efecto da temperatura vese tamén claramente analizando o índice PQ (Fig.18e) xa que no tramo dos 45 primeiros días, nos que como xa se dixo o cultivo está desenvolvéndose, o índice aumenta (diminúe a degradación da clorofila) e ademais é significativamente diferente entre temperaturas, cunha menor degradación os cultivos a 20°C que a 26°C. A diminución do índice na segunda metade do experimento indica o aumento da degradación da clorofila que se corresponde coa morte do cultivo.

En relación á produción de pigmentos fotosintéticos, a relación chl b/chl a (Fig.18b) é sempre maior a 1, excepto aos 30 días de experimento para os cultivos mantido a 20°C con aporte de CO<sub>2</sub>, o que sinala a xa comentada predominancia das cianobacterias fronte as algas verdes e o aumento de algas verdes no período entre 45 e 75 días do experimento.

No deseño do experimento incluíuse o aporte aos cultivos de fragmentos de granito para analizar se o efecto das diferentes condicións potenciaba o efecto alterante do substrato por parte dos organismos. Un aspecto importante é que en condicións de elevada temperatura (26°C), independentemente da presenza dos organismos, potenciouse a disolución de elementos, o que indica unha alteración físico-química do substrato. Por outra banda, ocorre unha maior diminución dos minerais disoltos nas mostras inoculadas con respecto ás non inoculadas mantidas a 20°C en comparación cas mantidas a 26°C. Isto podería interpretarse coma un maior consumo de elementos disoltos, ou ben unha maior precipitación dos elementos provocada polos organismos das mostras mantidas a 20°C, nas que se deu un maior desenvolvemento (Fig.21); en todo caso ambos procesos implicarían o biodeterioro do substrato (B. Prieto et al., 1999; Prieto *et al*, 2000).

A ese respecto, observáronse diferencias na solubilización de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  ca temperatura e na solubilización de  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  co  $\text{CO}_2$ , que non teñen que ver con posibles variacións de pH posto que estas non ocorren cas distintas condicións (Fig.22). O mesmo comportamento do  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  indica que a alteración está ocorrendo nas plaxioclasas, único mineral do granito que contén eses elementos, mentres que o mesmo comportamento do  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{+2}$  indica alteración sobre as micas, ámbolos dous presentes nese mineral. De todas formas debe indicarse que os resultados, en canto aos elementos solubilizados, poden interpretarse como máis solubilizados dende a rocha ou como menos consumidos polos organismos, é dicir, a solubilización podería ser a mesma en tódalas condicións pero ao ser o metabolismo dos organismos diferente cas distintas condicións, estes poderían consumir máis ou menos cantidade dos elementos analizados. Este tipo de alteracións debidas á solubilización de elementos dende a rocha inducidas polos organismos colonizadores, foron xa previamente postas de manifesto en estudos de laboratorio anteriores con organismos e fragmentos graníticos (Silva et al., 1999,

Seiffert et al., 2016) pero en ningún caso se analizaron os efectos da temperatura e CO<sub>2</sub>. É preciso afondar nesta cuestión con novos experimentos.

## **5.2. Experimento UV-B**

Os biofilms expostos a luz UV-B presentan diferenzas significativas entre as mostras expostas a diferentes horas de luz UV-B nas súas respostas no desenvolvemento, eficiencia fotosintética, color, contido en pigmentos e proporción celular das dúas especies compoñentes dos biofilms.

A proporción de cianobacterias con respecto ás algas verdes aumentoua co aumento de horas de exposición do biofilm á luz UV-B (Fig.23), o que coincide cos achados de Crispim *et al.*, (2003) sobre o dominio de cianobacterias en biofilms en edificios históricos calcáreos nos trópicos debido a unha maior tolerancia das cianobacterias á radiación UV-B e a desecación con respecto as algas verdes. Sen embargo, os estudos de Sun *et al.*, (2021) sobre monocultivos e cultivos mixtos de tres especies de cianobacterias e algas verdes de ecosistemas acuáticos, demostraron unha maior resistencia das algas verdes á radiación UV-B con respecto as cianobacterias. Debe notarse que as diferencias das respostas á radiación UV-B nos dous traballos veñen dadas porque as cianobacterias terrestres mostran unha maior tolerancia á radiación UV-B que as cianobacterias acuáticas (Song *et al.*, (2016)), polo que a relación dos efectos da radiación UV-B e da dispoñibilidade de auga é importante para establecer relacións de competencia e dominancia entre algas e cianobacterias. No presente traballo trátase de comunidades terrestres.

O incremento de cianobacterias en relación ás algas queda reflexado polos valores obtidos ao final do experimento da relación clorofila b/clorofila a (Fig.29b), con valores mais altos no control (e por tanto maior contido en algas) e menores (maior contido en cianobacterias) nas mostras expostas a radiación gardando relación co número de horas de exposición. Este dominio das cianobacterias queda tamén reflexado no estudo mediante CLSM (Fig.30), onde

ademais, se observa un aumento no tamaño celular das algas verdes relacionado co aumento de horas de exposición á radiación UV-B, sendo este un mecanismo de protección a dita radiación (Sun *et al.*, 2021).

Exposicións de 1h (Irlanda), 2h (Galicia) e 3h (Portugal) diarias á luz UV-B durante cortos períodos de tempo (15 días) provocaron un aumento do desenvolvemento dos biofilms (Fig.24), sen embargo, nese mesmo período de tempo, as eficiencias cuánticas máximas (Fig.26) e efectivas (Fig.27) diminuíron en relación ás tendencias das mostras control. De cara o final do experimento, os biofilms reduciron o seu crecemento en relación ás mostras control que continuaron desenvolvéndose, pero aumentaron as eficiencias fotosintéticas, sendo este aumento menor que nos biofilms non expostos a luz UV-B e gardando relación co número de horas de exposición. Estes resultados concordan cos estudos de Häder, (2000) sobre o efecto da radiación UV-B en ecosistemas acuáticos nos que revelou que esta radiación afecta ao crecemento, á fotosíntese, á incorporación de nitróxeno e á actividade enzimática.

En relación aos pigmentos, a degradación das clorofilas, reflexada no índice de feofitinización (Fig.29e), foi menor nas mostras expostas a 3h diarias de luz UV-B, o que se corresponde cos estudos de outros autores. Esta menor degradación da clorofila a foi tamén patente na evolución do parámetro cromático  $b^*$  (Fig.28c), xa que as mostras expostas a 0, 1 e 2h diarias de luz UV-B mostraron unha cor máis azul que as mostras expostas a 3h diarias de UV-B cunha cor máis amarela. Así mesmo a exposición a luz UV-B deu lugar a un aumento na produción de carotenoides a partires do día 15 con respecto ás mostras control. Este aumento de carotenoides foi responsable da variación do parámetro cromático  $a^*$  (Fig.28b), que deu cores hacia tonalidades máis vermellas. As investigacións de varios autores acharon que os carotenoides actúan como fotoprotectores da clorofila disipando a enerxía excesiva e inhibindo a formación de especies reactivas de osíxeno (ROS) (Cogdell *et al.*, 1978; Will & Scovel, 1989). En microorganismos, como as cianobacterias, os carotenoides proporcionan protección contra

radiacións UV, ROS, radicais libres, salinidade, compostos radioactivos, pH e temperatura (Gao *et al.*, 2008; Lesser, 2008; Singh *et al.*, 2010). Probablemente esta produción de carotenoides (Fig.29c) é a citada protección que proporciona e a responsable de que a degradación de clorofilas sexa menor nas mostras expostas por máis tempo á radiación UV-B.

Así, pódese establecer un umbral de exposición a UV-B de 15 días no que a exposición durante curtos períodos (1 e 2 h) ao día non é tan perxudicial, e que se pode comparar cos estudos de Sztatelman *et al.*, (2015) onde atoparon que, ademais de que exposicións elevadas de luz UV-B provocan degradación das clorofilas e diminución nos xenes asociados ca fotosíntese, niveis subletais de UV-B poden evitar o amarelamento das follas de *Arabidopsis thaliana* trala colleita. É importante notar que aínda que o efecto da radiación UV é acumulativo, o que se demostra pola variación dos parámetros estudados ao longo do tempo do experimento, é probable que o tempo de non exposición permita unha posible recuperación, xa que o dano garda relación co tempo de exposición a UV en canto ao paso do tempo, pero non co número de horas acumuladas de exposición á radiación. É dicir, aínda que o tempo de exposición ten efecto sobre os biofilms este pode estar regulado polo tipo de ciclo de iluminación que determina o tempo que o biofilm está exposto á luz visible, o que pode ter un papel na recuperación do dano. Esta hipótese necesita confirmación con posteriores experimentos.

## 6. Conclusións

A partir dos resultados obtidos pódese concluír que variacións nas condicións de temperatura, concentración de CO<sub>2</sub> e radiación UV-B con respecto as actuais afectarán tanto aos biofilms colonizadores do Patrimonio cultural pétreo como a súa capacidade de deteriorar o substrato.

En condicións dun hipotético escenario futuro de cambio climático no que aumente a temperatura, a concentración de CO<sub>2</sub> e a radiación UV-B, o efecto máis acusado será unha variación no consorcio formador do biofilm xa que esas condicións, segundo o presente traballo, estimulan o desenvolvemento de cianobacterias fronte a algas verdes.

Demostrouse ademais que o incremento de temperatura aumenta a cantidade de elementos disoltos dende os minerais, sen embargo a súa eliminación do sistema, ben sexa por consumo ou por precipitación é maior a baixas temperaturas, é dicir, cando o crecemento dos organismos foi favorecido.

As anteriores conclusións teñen gran repercusión en canto á conservación do Patrimonio Cultural pétreo nun contexto de cambio climático xa que implican un cambio de dirección no biodeterioro estético, ao cambiar o tipo de colonizador dominante, e no biodeterioro físico e químico, ao cambiar a relación biofilms-sustrato debida principalmente ao incremento das temperaturas.

## 7. Bibliografía

- Ariño, X., Llop, E., Gómez-Bolea, A., & Saiz-Jimenez, C. (2010). Effects of climatic change on microorganisms colonizing cultural heritage stone materials. *Climate Change and Cultural Heritage*, 193–198.
- Bais, A. F., Bernhard, G., McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Young, P. J., Ilyas, Deushi, M. (2019). Ozone-climate interactions and effects on solar ultraviolet radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 18(3), 602–640.  
<https://doi.org/10.1039/C8PP90059K>
- Balaguer, L., Manrique, E., De Los Rios, A., Ascaso, C., Palmqvist, K., Fordham, M., & Barnes, J. D. (1999). Long-term responses of the green-algal lichen *Parmelia caperata* to natural CO<sub>2</sub> enrichment. *Oecologia*, 119(2), 166–174.  
<https://doi.org/10.1007/s004420050773>
- Beardall, J., & Raven, J. A. (2004). The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*, 43(1), 26-40.  
<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-1-26.1>
- Bell, R. A., & Sommerfeld, M. R. (1987). Algal biomass and primary production within a temperate zone sandstone. *American Journal of Botany*, 74(2), 294–297.  
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1987.tb08608.x>
- Björkman, O. (1966). The effect of oxygen concentration on photosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 19(3), 618-633. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1966.tb07046.x>
- Bornman, J. F., Barnes, P. W., Robson, T. M., Robinson, S. A., Jansen, M. A. K., Ballare, C. L., & Flint, S. D. (2019). Linkages between stratospheric ozone, UV radiation and

- climate change and their implications for terrestrial ecosystems. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 18(3), 681–716. <https://doi.org/10.1039/c8pp90061b>
- Bos, R., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 179–230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x>
- Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., & West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, 85, 1771–1789. <https://doi.org/10.1890/03-9000>
- Castenholz, R. W., & Garcia-Pichel, F. (2013). Cyanobacterial responses to UV radiation. In *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (pp. 481–499). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_19)
- Cleland, E. E., Chuine, I., Menzel, A., Mooney, H. A., & Schwartz, M. D. (2007, July). Shifting plant phenology in response to global change. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(7), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.04.003>
- Cogdell, R. J., Cogdell, & J., R. (1978). Carotenoids in photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 284(1002), 569–579. <https://doi.org/10.1098/rstb.1978.0090>
- Colette, A. (2013). *Case studies on climate change and World Heritage*. UNESCO Publishing.
- Costerton, J. W. (2007). *The Biofilm Primer*. (Vol. 1). Springer Science & Business Media.. <https://doi.org/10.1007/b136878>
- Crispim, C. A., Gaylarde, P. M., & Gaylarde, C. C. (2003). Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic buildings. *Current Microbiology*, 46(2), 79–82. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3815-5>
- de Carvalho, C. C. (2017). Biofilms: Microbial strategies for surviving UV exposure.

*Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*, 233-239.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_19)

DeLucia, E. H., Hamilton, J. G., Naidu, S. L., Thomas, R. B., Andrews, J. A., Finzi, A., ... & Schlesinger, W. H. (1999). Net primary production of a forest ecosystem with experimental CO<sub>2</sub> enrichment. *Science*, 284(5417), 1177–1179.

<https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1177>

DeNicola, D. M. (1996). Periphyton responses to temperature at different ecological levels. *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*, 149-181.

<https://doi.org/10.1016/b978-012668450-6/50035-7>

Dineshabu, G., Uma, V. S., Mathimani, T., Prabakaran, D., & Uma, L. (2020). Elevated CO<sub>2</sub> impact on growth and lipid of marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041– towards microalgal carbon sequestration. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101-606. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101606>

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010,). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Francis, R. A. (2011). Wall ecology: A frontier for urban biodiversity and ecological engineering. *Progress in Physical Geography*, 35(1), 43–63.

<https://doi.org/10.1177/0309133310385166>

Fuentes, E., & Prieto, B. (2021). Recovery Capacity of Subaerial Biofilms Grown on Granite Buildings Subjected to Simulated Drought in a Climate Change Context. *Microbial Ecology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01692-0>

Gao, K., Li, P., Watanabe, T., & Walter Helbling, E. (2008). Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis, and DNA of *Arthrospira*

(Spirulina) Platensis (Cyanophyta). *Journal of Phycology*, 44(3), 777–786.

<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00512.x>

Geraldes, V., & Pinto, E. (2014). Mycosporine-like amino acids (Maas): Biology, chemistry and identification features. *Pharmaceuticals*, 14(1), 63.

<https://doi.org/10.3390/ph14010063>

Gorbushina, A. A. (2007). Life on the rocks. *Environmental Microbiology*, 9(7), 1613–1631.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x>

Häder, D. P. (2000). Effects of solar UV-radiation on aquatic ecosystems. *Advances in Space Research*, 26(12), 2029–2040. [https://doi.org/10.1016/S0273-1177\(00\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1177(00)00170-8)

Hamilton, J. G., DeLucia, E. H., George, K., Naidu, S. L., Finzi, A. C., & Schlesinger, W. H. (2002). Forest carbon balance under elevated CO<sub>2</sub>. *Oecologia*, 131(2), 250–260.

<https://doi.org/10.1007/s00442-002-0884-x>

Hodkinson, T. R., Jones, M. B., Waldren, S., & Parnell, J. A. N. (2011). *Climate change, ecology and systematics* (Vol. 78). Cambridge University Press.

<https://doi.org/10.1017/CBO9780511974540>

Hu, S., Chapin, F. S., Firestone, M. K., Field, C. B., & Chiariello, N. R. (2001). Nitrogen limitation of microbial decomposition in a grassland under elevated CO<sub>2</sub>. *Nature*, 409(6817), 188–191. <https://doi.org/10.1038/35051576>

Huertas, E., Montero, O., & Lubián, L. M. (2000). Effects of dissolved inorganic carbon availability on growth, nutrient uptake and chlorophyll fluorescence of two species of marine microalgae. *Aquacultural Engineering*, 22(3), 181–197.

[https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00038-2)

*IPCC, 2014: Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II*

*and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.

- Ji, X., Verspagen, J. M. H., Stomp, M., & Huisman, J. (2017). Competition between cyanobacteria and green algae at low versus elevated CO<sub>2</sub>: Who will win, and why? *Journal of Experimental Botany*, 68(14), 3815–3828. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx027>
- Joh, G., & Lee, J. (2012). Cyanobacterial biofilms on sedimentation basins in a water treatment plant in South Korea. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9678-z>
- Koerdt, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K. M., & Albers, S. V. (2010). Crenarchaeal Biofilm Formation under Extreme Conditions. *PLoS ONE*, 5(11), 14104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014104>
- Körner, C. (2000). Biosphere response to CO<sub>2</sub> enrichment. *Ecological Applications*, 10(6), 1590–1619.
- Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K., & Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(3), 463–473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00548.x>
- Leissner, J., Kilian, R., Kotova, L., Jacob, D., Mikolajewicz, U., Broström, T., Vyhliđal, T. (2015). Climate for culture: Assessing the impact of climate change on the future indoor climate in historic buildings using simulations. *Heritage Science*, 3(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s40494-015-0067-9>
- Lesser, M. P. (2008). Effects of ultraviolet radiation on productivity and nitrogen fixation in

- the Cyanobacterium, *Anabaena* sp. (Newton's strain). *Hydrobiologia*, 598(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-9126-x>
- Li, W., Xu, X., Fujibayashi, M., Niu, Q., Tanaka, N., & Nishimura, O. (2016). Response of microalgae to elevated CO<sub>2</sub> and temperature: impact of climate change on freshwater ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19847–19860.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-016-7180-5>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382.  
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3) MB-0011-2014.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0011-2014>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C., & Marco, E. (2002). Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 en función del pH y CO<sub>2</sub>. *Interciencia*, 27(7), 373-378.
- Mushir, S., & Fatma, T. (2012). Monitoring stress responses in cyanobacterial scytonemin - screening and characterization. *Environmental Technology*, 33(2), 153–157.  
<https://doi.org/10.1080/09593330.2011.553842>
- Necchi, O. (2004). Photosynthetic responses to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycological Research*, 52(2), 140–148. <https://doi.org/10.1111/j.1440-183.2004.00334.x>

- Norf, H., Arndt, H., & Weitere, M. (2007). Impact of local temperature increase on the early development of biofilm-associated ciliate communities. *Oecologia*, *151*(2), 341–350.  
<https://doi.org/10.1007/s00442-006-0545-6>
- Ortega-Morales, B. O., Narváez-Zapata, J. A., Schmalenberger, A., Sosa-López, A., & Tebbe, C. C. (2004). Biofilms fouling ancient limestone Mayan monuments in Uxmal, Mexico: a cultivation-independent analysis. *Biofilms*, *1*(2), 79–90.  
<https://doi.org/10.1017/s1479050504001188>
- Palmqvist, K. (2000). Tansley review no. 117: carbon economy in lichens. *New Phytologist*, *148*(1), 11–36. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00732.x>
- Parker, B. C., Bold, H. C., & Deason, T. R. (1961). Facultative heterotrophy in some chlorococcacean algae. *Science*, *133*(3455), 761–763.  
<https://doi.org/10.1126/science.133.3455.761>
- Prieto, B., Seaward, M. R. D., Edwards, H. G. M., Rivas, T., & Silva, B. (1999). Biodeterioration of granite monuments by *Ochrolechia parella* (L.) mass: An FT Raman spectroscopic study. *Biospectroscopy*, *5*(1), 53–59. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6343\(1999\)5:1<53::aid-bsp7>3.0.co;2-%23](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6343(1999)5:1<53::aid-bsp7>3.0.co;2-%23)
- Prieto, B., & Silva, B. (2005). Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *56*(4), 206–215. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.08.001>
- Prieto, B., Silva, B., & Lantes, O. (2004). Biofilm quantification on stone surfaces: Comparison of various methods. *Science of the Total Environment*, *333*(1–3), 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.003>
- Prieto, B., Vázquez-Nion, D., Fuentes, E., & Durán-Román, A. G. (2020). Response of

- subaerial biofilms growing on stone-built cultural heritage to changing water regime and CO<sub>2</sub> conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 148, 104882.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104882>
- Prieto, B., Edwards, H. G. M., & Seaward, M. R. D. (2000). A fourier transform-raman spectroscopic study of lichen strategies on granite monuments. *Geomicrobiology Journal*, 17(1), 55–60. <https://doi.org/10.1080/014904500270495>
- Prieto, Beatriz, Rivas, T., & Silva, B. de M. (2002). Rapid Quantification of Phototrophic Microorganisms and their Physiological State through their Colour. *Biofouling*, 18(3), 237–245.
- Querijero-Palacpac, N. M., Martinez, M. R., & Boussiba, S. (1990). Mass cultivation of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Gloeotrichia natans*, indigenous to rice-fields. *Journal of Applied Phycology*, 2(4), 319–325. <https://doi.org/10.1007/BF02180921>
- Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 1–5.  
<https://doi.org/10.1128/jb.149.1.1-5.1982>
- Rifón-Lastra, A., & Noguerol-Seoane, Á. (2001). Green algae associated with the granite walls of monuments in Galicia (NW Spain). *Cryptogamie, Algologie*, 22(3), 305–326.  
[https://doi.org/10.1016/S0181-1568\(01\)01069-8](https://doi.org/10.1016/S0181-1568(01)01069-8)
- Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 304(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01840.x>
- Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*,

111(1), 1-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>

- Robinson, S. A., & Erickson, D. J. (2015). Not just about sunburn - the ozone hole's profound effect on climate has significant implications for Southern Hemisphere ecosystems. *Global Change Biology*, *21*(2), 515-527. <https://doi.org/10.1111/gcb.12739>
- Roháček, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: The definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, *40*(1), 13-29. <https://doi.org/10.1023/A:1020125719386>
- Sand-Jensen, K., Pedersen, N. L., & Søndergaard, M. (2007). Bacterial metabolism in small temperate streams under contemporary and future climates. *Freshwater Biology*, *52*(12), 2340–2353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01852.x>
- Sanmartín, P., Aira, N., Devesa-Rey, R., Silva, B., & Prieto, B. (2010). Relationship between color and pigment production in two stone biofilm-forming cyanobacteria (nostoc sp. pcc 9104 and nostoc sp. pcc 9025). *Biofouling*, *26*(5), 499–509. <https://doi.org/10.1080/08927011003774221>
- Sanmartín, P., Villa, F., Silva, B., Cappitelli, F., & Prieto, B. (2011). Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments. *Biodegradation*, *22*(4), 763–771. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9402-8>
- Sanmartín, Patricia. (2012). *Cuantificación del color en el estudio de la formación de biofilms en rocas graníticas del Patrimonio histórico artístico* (Tesis Doctoral), Universidade de Santiago de Compostela.
- Scheerer, S., Ortega-Morales, O., & Gaylarde, C. (2009). Microbial deterioration of stone monuments—an updated overview. *Advances in applied microbiology*, *66*, 97-139. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00805-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00805-8)

- Schimel, D. S. (1995). Terrestrial ecosystems and the carbon cycle. *Global Change Biology*, 1(1), 77–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.1995.tb00008.x>
- Seiffert, F., Bandow, N., Kalbe, U., Milke, R., & Gorbushina, A. A. (2016). Laboratory tools to quantify biogenic dissolution of rocks and minerals: a model rock biofilm growing in percolation columns. *Frontiers in Earth Science*, 4, 31
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K., & Hashemi, A. (2019). Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14689–14708. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>
- Silva, B., Rivas, T., & Prieto, B. (1999). Effects of lichens on the geochemical weathering of granitic rocks. *Chemosphere*, 39(2), 379-388. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00116-2)
- Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
- Singh, Shailendra P., Häder, D. P., & Sinha, R. P. (2010). Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: Mitigation strategies. *Ageing Research Reviews*, 9(2), 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.05.004>
- Song, W., Zhao, C., Zhang, D., Mu, S., & Pan, X. (2016). Different resistance to UV-B radiation of extracellular polymeric substances of two cyanobacteria from contrasting habitats. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01208>
- Staehr, P. A., & Sand-Jensen, K. A. J. (2006). Seasonal changes in temperature and nutrient control of photosynthesis, respiration and growth of natural phytoplankton communities. *Freshwater Biology*, 51(2), 249–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01490.x>

- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205. <https://doi.org/10.1128/membr.35.2.171-205.1971>
- Sun, Y., Chen, Y., Wei, J., Zhang, X., Zhang, L., Yang, Z., & Huang, Y. (2021). Ultraviolet-B radiation stress alters the competitive outcome of algae: Based on analyzing population dynamics and photosynthesis. *Chemosphere*, 272, 129645. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129645>
- Sztatelman, O., Grzyb, J., Gabryś, H., & Banaś, A. K. (2015). The effect of UV-B on *Arabidopsis* leaves depends on light conditions after treatment. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0667-2>
- UV Maps / Root - EUROSUN Project. (n.d.). Retrieved June 21, 2021, from <https://eurosun-project.org/UV-Maps.html>
- Vázquez-Nion, D., Rodríguez-Castro, J., López-Rodríguez, M. C., Fernández-Silva, I., & Prieto, B. (2016). Subaerial biofilms on granitic historic buildings: microbial diversity and development of phototrophic multi-species cultures. *Biofouling*, 32(6), 657–669. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1183121>
- Vázquez-Nion, Daniel, Fuentes, E., & Prieto, B. (2020). Effect of inorganic carbon concentration on the development of subaerial phototrophic biofilms on granite. *Coatings*, 10(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/coatings10111049>
- Vázquez Nion, D. (2016). *Primary bioreceptivity of granitic rocks to phototrophic biofilms. Development of a bioreceptivity index*. (Tesis Doctoral), Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Vega, B. O. A., & Lobina, D. V. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación*

*de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, SC, La Paz, BCS, México. 97p.* Velu, C., Cirés, S., Brinkman, D. L., & Heimann, K. (2019).

Effect of CO<sub>2</sub> and metal-rich waste water on bioproduct potential of the diazotrophic freshwater cyanobacterium, *Tolypothrix* sp. *Heliyon*, 5(4), e01549.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01549>

Vermaas, W. (1996). Molecular genetics of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Principles and possible biotechnology applications. *Journal of Applied Phycology*, 8(4–5), 263–273. <https://doi.org/10.1007/BF02178569>

Viles, H. A., & Cutler, N. A. (2012). Global environmental change and the biology of heritage structures. *Global Change Biology*, 18(8), 2406–2418. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02713.x>

Villanueva, V. D., Font, J., Schwartz, T., & Romaní, A. M. (2011). Biofilm formation at warming temperature: Acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects. *Biofouling*, 27(1), 59–71. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.538841>

Wang, P., You, G., Hou, J., Wang, C., Xu, Y., Miao, L., Zhang, F. (2018). Responses of wastewater biofilms to chronic CeO<sub>2</sub> nanoparticles exposure: Structural, physicochemical and microbial properties and potential mechanism. *Water Research*, 133, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.031>

Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Will, O. A., & Scovel, C. A. (1989). Photoprotective Functions of Carotenoids. In *Carotenoids* (pp. 229–236). Springer, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613->

Witt, V., Wild, C., & Uthicke, S. (2012). Interactive climate change and runoff effects alter O<sub>2</sub> fluxes and bacterial community composition of coastal biofilms from the Great Barrier Reef. *Aquatic Microbial Ecology*, 66(2), 117–131.  
<https://doi.org/10.3354/ame01562>

Xu, K., Jiang, H., Juneau, P., & Qiu, B. (2012). Comparative studies on the photosynthetic responses of three freshwater phytoplankton species to temperature and light regimes. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1113–1122. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9741-9>

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., & He, J. (2019). Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3423.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20143423>