



**Estructura de la Comunidad Microbiana Cultivable
a lo Largo de un Gradiente de Luz
en una Cueva Volcaniclástica Tropical**

Trabajo de Grado

Presentado al Área de Sistemas Naturales y Sostenibilidad
como Requisito Parcial para Optar al Título de
Biólogo

POR

Sebastian Correa-Gallego

ASESOR

Dr. Nicolás Pinel Peláez

Medellín, Colombia

mayo de 2026

© 2026 Sebastian Correa-Gallego



Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Este trabajo de grado es el resultado de un proceso de investigación lento pero persistente que comenzó en 2022 con la exploración de ideas y de literatura sobre ecología de cuevas, vida microbiana y sistemas extremófilos. Con el tiempo, estos intereses iniciales se refinaron en una pregunta científica definida, un marco experimental y un estudio integrado de la diversidad microbiana en el Organal San Antonio. Realicé las actividades de campo y de laboratorio, el análisis de datos, la interpretación y la preparación del manuscrito principalmente durante 2025 y 2026 en la Universidad EAFIT.

Todo el contenido científico—incluyendo la pregunta de investigación, el diseño experimental, la ejecución de campo y de laboratorio, el análisis de datos, la interpretación y las conclusiones finales—es trabajo propio del autor y no ha sido presentado para optar a ningún otro título. Durante las etapas de revisión y formato del manuscrito, el autor utilizó Claude (Anthropic PBC, San Francisco; modelos Sonnet 4.5 y Sonnet 4.6) como asistente computacional para la revisión del código estadístico, el refinamiento de la prosa en inglés y el formato del documento. La herramienta fue empleada bajo instrucción directa y supervisión crítica del autor. Ninguna decisión científica, analítica o interpretativa fue delegada a la inteligencia artificial, y el autor asume la responsabilidad exclusiva por el contenido, la precisión y las conclusiones de este trabajo de grado.

Resumen

Los ambientes cavernícolas comprimen cambios marcados en luz, aporte energético, conectividad superficial y heterogeneidad de sustrato dentro de gradientes espaciales cortos. Esto los convierte en sistemas naturales poderosos para examinar las respuestas microbianas a la heterogeneidad ambiental. Sin embargo, la fracción microbiana cultivable de las cuevas volcánicas tropicales sigue estando poco resuelta. Las cuevas pseudokársticas de tipo organal de los Andes colombianos están especialmente subrepresentadas en la microbiología de cuevas, a pesar de su geomorfología distintiva y de su conexión hidrológica con los paisajes montañosos. Aquí evalué si la identidad de sector a lo largo de la zonación definida por la luz del Organal San Antonio, una cueva volcániclastrica tropical situada a ~2350 m s. n. m. en Támesis, Antioquia, está asociada a diferencias en la fracción microbiana de sedimentos cavernícolas recuperable en R2A. Conduje dos experimentos de cultivo: una comparación binaria inicial Luz–Oscuridad y un experimento principal de tres sectores que resuelve las zonas de Entrada, Transición y Oscura, con normalización gravimétrica a nivel de alícuota, incubación a 15 °C y un crosswalk fenotípico operativo de veintitrés clústeres. En el experimento principal, la densidad cultivable siguió un patrón escalonado a lo largo del gradiente: los sedimentos de Entrada y Transición sostuvieron aproximadamente $5,1\text{--}5,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo, mientras que el sector Oscuro, completamente afótico, sostuvo aproximadamente $8,9 \times 10^4$ UFC g⁻¹, una reducción aproximada de seis veces ($\eta^2 = 0,652$). La riqueza y la equidad locales de clústeres de morfotipos no mostraron diferencias detectables a nivel de sector, pero la composición de la comunidad se particionó fuertemente con la zonación (PERMANOVA $R^2 = 0,573$, $p = 0,001$) bajo dispersión multivariada balanceada. El sector de Transición sostuvo un conjunto distintivo de clústeres fenotípicos restringidos a la zona, que aportaron aproximadamente el 27 % de su comunidad cultivable, mientras que el sector Oscuro combinó una densidad reducida con una abundancia moderada de clústeres restringidos al sector afótico. La caracterización preliminar mediante Gram, KOH, catalasa y microscopía de aislados representativos reveló incertidumbre a nivel de Gram y heterogeneidad celular dentro de varios fenotipos coloniales intersectoriales, lo que confirma que el crosswalk de morfotipos es útil para la comparación a nivel de comunidad pero no equivalente a la resolución taxonómica. Estos resultados establecen una primera línea base cultivable espacialmente resuelta para una cueva volcániclastrica tropical de tipo organal e indican que la identidad de sector a lo largo de un gradiente cavernícola definido por la luz está asociada a una menor densidad cultivable en el sector afótico y a un fuerte recambio composicional a nivel de morfotipo, sin un descenso paralelo de la diversidad local de clústeres de morfotipos. El estudio define la escala a la que estos patrones son válidos: la fracción cultivable aeróbica, de baja temperatura y en R2A diluido de los microorganismos asociados a sedimento.

PALABRAS CLAVE: microbiología de cuevas, fracción cultivable, cueva volcániclastrica, crosswalk de morfotipos, filtrado ambiental, Andes tropicales

Agradecimientos

Este trabajo nació de un interés por la forma en que las comunidades microbianas se organizan bajo restricción ambiental — un interés que, a lo largo de este proceso de investigación, fue afinado por la disciplina de la observación cuidadosa y por las exigencias de un diseño experimental riguroso. La cueva proporcionó un sistema tratable; las preguntas que abrió son considerablemente más amplias que el sistema mismo.

Agradezco profundamente al municipio de Támesis y a la comunidad del entorno del Organal San Antonio, y especialmente a Rodrigo Echeverri, por abrir su territorio a esta investigación y por compartir conocimientos ecológicos, históricos y locales que ningún libro de texto habría podido proporcionar.

Nicolás Pinel guió este proyecto desde su formulación más temprana hasta su forma final. Su influencia sobre el modo en que estructuro preguntas, evalué evidencia y me exijo precisión a mí mismo se extiende mucho más allá de este manuscrito. Me enseñó que el rigor y la curiosidad genuina no están en tensión.

Agradezco también a la Dra. Valeska Villegas-Escobar por su perspectiva crítica y su apoyo institucional a lo largo de este trabajo.

Agradezco al Dr. Sergio Muñoz-Gómez por acogerme como estudiante de pregrado visitante en Purdue University durante un período que moldeó profundamente la manera en que pienso sobre la biología y la evolución. En Purdue encontré una comunidad científica y humana construida con integridad, generosidad y seriedad intelectual. Muchas de las personas allí pasaron a formar parte de lo que soy ahora y de lo que aspiro a llegar a ser en la vida y en la ciencia.

La Fundación Fraternidad Medellín hizo posible mi educación de pregrado, incluido mi período como visitante en Purdue University. Nicolás Pinel gestionó recursos esenciales de campo y de logística para las campañas de muestreo. La Universidad EAFIT proporcionó el espacio institucional para el trabajo experimental y un entorno colaborativo que respaldó muchas etapas de este proceso.

Agradezco también a mis padres y a mi familia más cercana por aquello que ninguna institución puede brindar: un compromiso sostenido con un proceso cuyo desenlace nunca estuvo garantizado. Su apoyo permaneció presente a lo largo de los momentos más exigentes de este camino.

Espero continuar persiguiendo preguntas en la intersección de la ecología microbiana, la fisiología y la evolución.

Índice

Resumen	2
Agradecimientos	3
1. Introducción	5
1.1. Las cuevas como hábitats limitados por energía y como filtros ambientales	5
1.2. El sesgo kárstico y la brecha volcániclaística	8
1.3. El cultivo como enfoque complementario	10
1.4. El sistema de estudio: el Organal San Antonio	11
1.5. Pregunta de investigación, objetivos y diseño del estudio	13
2. Materiales y Métodos	15
2.1. Sistema de estudio y zonación ecológica	15
2.2. Estructura experimental y muestreo	16
2.3. Cultivo, dilución y conteo de colonias	17
2.4. Clasificación de morfotipos y <i>crosswalk</i> intersectorial	19
2.5. Caracterización fenotípica de aislados representativos	21
2.6. Análisis estadístico	22
3. Resultados	23
3.1. Observaciones de campo y emergencia colonial	23
3.2. El catálogo de morfotipos	26
3.3. Densidad cultivable a lo largo del gradiente definido por la luz	26
3.4. La diversidad local de morfotipos no mostró diferencias detectables a nivel de sector	30
3.5. Recambio composicional a lo largo del gradiente definido por la luz	30
3.6. Caracterización fenotípica de aislados representativos	32
4. Discusión	37
Disponibilidad de Datos, Código y Permisos	43
Referencias	44
Material Suplementario	49

1 Introducción

1.1 Las cuevas como hábitats limitados por energía y como filtros ambientales

LA ORGANIZACIÓN DE LA VIDA A LO LARGO DE GRADIENTES AMBIENTALES se cuenta entre las observaciones más antiguas y productivas de la biología [1, 2]. Desde el límite del bosque en la ladera de una montaña hasta la zona de mínimo oxígeno de un océano estratificado, la disposición espacial de los organismos refleja la intersección entre la tolerancia fisiológica y la estructura física del ambiente. Donde una variable abiótica cambia de manera predecible en el espacio, las comunidades responden: la densidad se desplaza, la composición se recambia y el repertorio funcional del ensamble se reorganiza para coincidir con aquello que las condiciones locales pueden sostener. Los ambientes subterráneos ofrecen un escenario natural especialmente adecuado para estudiar esta relación, porque comprimen cambios ambientales pronunciados dentro de distancias espaciales cortas y los mantienen con una estabilidad temporal que pocos sistemas superficiales pueden igualar.

Las cuevas imponen una combinación distintiva de restricciones a las comunidades biológicas: la eliminación progresiva de la radiación fotosintéticamente activa con la profundidad, la escasez crónica de nutrientes, el intercambio atmosférico restringido, el amortiguamiento térmico respecto a las condiciones superficiales y una humedad relativa persistentemente alta [3-6]. Estas condiciones actúan como filtros abióticos cuya intensidad cambia de manera predecible a lo largo del gradiente entrada-interior, seleccionando organismos capaces de sostener la actividad metabólica bajo estrés crónico y generando gradientes espaciales a lo largo de los cuales se espera que las comunidades microbianas cambien en densidad, composición y organización funcional.

A pesar de estas restricciones, las cuevas albergan comunidades microbianas de notable diversidad. Los conteos directos de células en superficies rocosas y sedimentos arrojan rutinariamente densidades del orden de 10^6 células por gramo [5, 7], y los estudios moleculares han mostrado que los ensambles subterráneos incluyen representantes de la mayoría de los grandes filos bacterianos. A través de sistemas geográfica y geológicamente diversos, empleando la nomenclatura procariota actual de filos [8], Pseudomonadota (Proteobacteria), Actinomycetota, Bacillota y Chloroflexota se cuentan consistentemente entre los linajes más abundantes, con aportes adicionales de Acidobacteriota, Planctomycetota, Nitrospirota y miembros de la radiación de filos candidatos [5, 9-11]. Esta amplitud taxonómica se mantiene bajo oligotrofia extrema: las concentraciones de carbono orgánico disuelto en las aguas cavernícolas suelen estar por debajo de 2 mg/L [7], y las fuentes principales de carbono y energía se limitan a aportes alóctonos por agua de percolación, deposición aerotransportada, penetración de raíces y actividad de invertebrados, complementadas en algunos sistemas por producción quimiolitotrófica autóctona [6, 12, 13].

La persistencia de la vida bajo tal restricción refleja adaptaciones fisiológicas que operan a escalas muy por debajo de las que capta el cultivo estándar de laboratorio. En el subsuelo profundo, los microorganismos catabolizan entre 10^4 y 10^6 veces más lentamente que los organismos modelo en cultivos ricos en nutrientes, recambian su biomasa en escalas de tiempo de siglos a milenios, y subsisten con flujos energéticos mil veces inferiores a las estimaciones de

mantenimiento en laboratorio [14]. Hoehler y Jørgensen formalizaron el concepto de potencia basal de mantenimiento — el requerimiento energético mínimo de los organismos no crecientes para preservar la integridad celular — y demostraron que las tasas metabólicas medias específicas por célula en las comunidades del subsuelo se dispersan varios órdenes de magnitud por debajo de las tasas requeridas para el cultivo en laboratorio. Lever y colaboradores distinguieron posteriormente tres estados fisiológicos — crecimiento, mantenimiento y supervivencia — que definen el continuo de actividad metabólica bajo escasez energética creciente [15]. Los ambientes cavernícolas no están tan empobrecidos energéticamente como el subsuelo profundo, pero comparten la característica fundamental de una limitación persistente de carbono y energía que selecciona organismos con alta afinidad por el sustrato, bajas tasas metabólicas basales y una regulación biosintética eficiente [6, 7].

La estructura interna de las cuevas se describe habitualmente mediante un modelo de tres zonas basado en la penetración de la luz (Figura 1): una zona de entrada que recibe luz solar directa o indirecta y está influida por el microclima superficial; una zona de penumbra en la que la irradiancia está fuertemente atenuada pero no del todo ausente; y una zona oscura en la que la luz es indetectable y los parámetros ambientales permanecen térmica e hidrológicamente estables en el tiempo [16-18]. Cada zona impone presiones selectivas distintas y sostiene tipos funcionales microbianos diferentes. En las zonas de entrada, los microorganismos fotótrofos — en particular las Cyanobacteria y las algas verdes — colonizan superficies rocosas húmedas y forman comunidades pigmentadas asociadas a la superficie sostenidas por irradiancia residual; en los sistemas cavernícolas carbonatados, se ha demostrado que tales ensamblajes contribuyen a la litólisis mediante la secreción de ácidos y a la litogénesis mediante biocalcificación y la formación de recubrimientos superficiales estructurados [18, 19]. En la zona de penumbra, donde la irradiancia puede caer por debajo del 0.01 % de los niveles superficiales en pocos metros desde la entrada, las comunidades sostenidas por la fotosíntesis dan paso a ensamblajes heterótrofos dependientes de materia orgánica alóctona transportada por agua de goteo, exudados radiculares o vectores invertebrados [5, 6]. En el interior completamente afótico, la vida microbiana depende de la quimiolitotrofia — explotando compuestos reducidos de hierro, manganeso, azufre o nitrógeno como fuentes de energía —, del reciclaje de materia orgánica endógena dentro de consorcios microbianos, o de la lenta degradación del carbono asociado a minerales [3, 15, 20]. Más allá del ciclo del carbono, las cuevas albergan redes biogeoquímicas completas que operan independientemente de la productividad superficial: se han documentado procesos del ciclo del nitrógeno, incluyendo la oxidación del amoníaco y la fijación biológica del nitrógeno, en tapetes microbianos de cuevas de lava mediante la detección de los genes marcadores *amoA* y *nifH* [20, 21], y se han demostrado el ciclo del azufre, la oxidación de manganeso y hierro y el consumo de metano en comunidades subterráneas [3, 20].

Estas restricciones energéticas y estructurales se intersectan con el concepto ecológico de filtrado ambiental — el proceso por el cual las condiciones abióticas impiden el establecimiento o la persistencia de especies que no toleran los estresores locales [22]. El término se invoca a veces de manera laxa en la literatura ecológica, pero las cuevas proporcionan un escenario conceptual

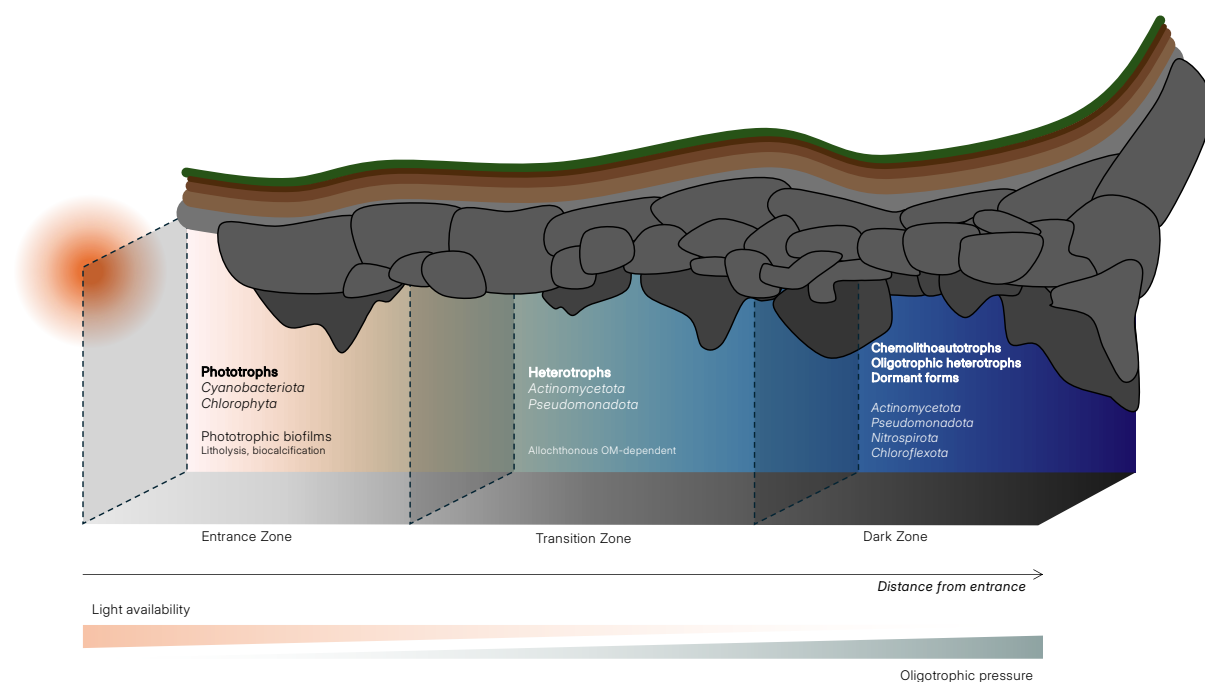


Figura 1. Modelo conceptual de la zonación cavernícola definida por la luz. El esquema representa la transición desde una zona de entrada semi-iluminada hacia un sector de transición en penumbra y una zona oscura completamente afótica, con disponibilidad de luz decreciente y restricciones oligotróficas más intensas hacia el interior. Los grupos biológicos y los procesos ecológicos mostrados dentro de la figura resumen expectativas teóricas de la microbiología y la geomicrobiología cavernícolas; no constituyen asignaciones taxonómicas ni mediciones funcionales del presente estudio. Los nombres taxonómicos se refieren a grupos comúnmente reportados en la literatura microbiana asociada a cuevas, mientras que las etiquetas funcionales indican estrategias ecológicas amplias esperadas a lo largo de los gradientes energéticos subterráneos. Los análisis basados en cultivo de este manuscrito evaluaron la densidad cultivable, la diversidad local de clústeres de morfotipos y el recambio composicional entre sectores.

claro para su aplicación: la oscuridad, la oligotrofia, la baja temperatura, la alta humedad y el intercambio restringido con la superficie pueden actuar como filtros cuya intensidad cambia a lo largo de distancias espaciales cortas. Cabe esperar, por lo tanto, que la estructura comunitaria resultante refleje la persistencia, el crecimiento o la detectabilidad diferenciales de los organismos capaces de satisfacer las exigencias energéticas y fisiológicas de cada sector, produciendo recambio espacial en densidad y composición. Un apoyo empírico de esta visión proviene del estudio de cuevas de lava de California realizado por Lavoie y colaboradores, en el cual solo el 11.2 % de las unidades taxonómicas operativas resultaron compartidas entre los tapetes microbianos cavernícolas y los suelos superficiales suprayacentes, y el número de entradas de la cueva — un *proxy* de la conectividad con la superficie — fue un predictor significativo de la diversidad comunitaria [23]. Un metaanálisis reciente a escala global de más de 1 050 comunidades bacterianas y fúngicas de cuevas en todo el mundo demostró además que el clima exterior, en particular la temperatura y la precipitación, es un determinante primario de la diversidad microbiana cavernícola a escalas regionales y continentales, seleccionando taxones dominantes específicos a través de fronteras biogeográficas [24]. En conjunto, estas líneas de evidencia indican que las comunidades subterráneas no son ensambles al azar, sino sistemas espacialmente organizados cuya composición puede responder a gradientes ambientales,

estructurada por la interacción entre el clima externo, las restricciones abióticas internas y la conectividad superficial.

1.2 El sesgo kárstico y la brecha volcanoclástica

El alcance geográfico y geológico de la investigación en ecología microbiana subterránea es marcadamente desigual. La gran mayoría de los estudios se han realizado en cuevas kársticas calcáreas en latitudes templadas [4, 24, 25]. Los sistemas kársticos se forman por disolución de rocas carbonatadas debida a la percolación de agua ácida, lo que produce extensas redes de drenaje, sustratos químicamente amortiguados y aportes relativamente continuos de materia orgánica disuelta desde los suelos suprayacentes. La disolución carbonatada provee un suministro constante de iones calcio, magnesio y bicarbonato que amortiguan el pH y sostienen diversas precipitaciones minerales [3, 9]. Los paisajes kársticos comprenden aproximadamente entre el 15 y el 20 % de la superficie terrestre libre de hielo [9], y su accesibilidad, sus interiores ricos en espeleotemas y su conectividad hidrológica con los sistemas de agua superficial los han convertido en el modelo por defecto de la microbiología subterránea. Las comunidades microbianas documentadas en cuevas kársticas — incluyendo ensambles diversos de litoautótrofos, desnitrificadores, oxidadores de azufre y de hierro, y taxones heterótrofos — reflejan estas condiciones geoquímicas relativamente favorables y han proporcionado el sustento empírico para la mayor parte del conocimiento actual sobre ecología microbiana cavernícola [3, 5, 26].

Las cuevas volcánicas y volcanoclásticas constituyen una categoría estructural y geoquímicamente distinta que sigue estando comparativamente poco caracterizada [10]. Estos sistemas se forman mediante procesos espeleogenéticos fundamentalmente distintos: la dinámica de los flujos de lava produce tubos de lava, en los que la corteza externa de una corriente de lava solidifica mientras el material fundido continúa drenando debajo; el colapso gravitacional de depósitos volcánicos produce cuevas de talud y de bloques; y la reconfiguración erosiva a largo plazo de materiales piroclásticos produce cavidades volcanoclásticas de geometría variable [27, 28]. A diferencia de las cuevas kársticas, las cuevas volcánicas y volcanoclásticas son típicamente más jóvenes desde el punto de vista geológico, químicamente menos amortiguadas e hidrológicamente menos conectadas con los aportes de agua superficial. Sus sustratos — lavas basálticas, brechas, aglomerados o ignimbritas retrabajadas — ofrecen composiciones minerales, texturas superficiales y disponibilidades de elementos traza distintas de las de las rocas carbonatadas. Los sustratos basálticos pueden proporcionar compuestos reducidos de hierro, manganeso y azufre que sostienen el metabolismo quimiolitótrofo, pero la ausencia de disolución carbonatada continua reduce el aporte de nutrientes alóctonos, imponiendo una oligotrofia más severa y persistente que la típica de los sistemas kársticos [27, 29].

La investigación en ecología microbiana de cuevas volcánicas se ha concentrado casi exclusivamente en tubos de lava de un número limitado de regiones geográficas: Hawái, las Azores, las Islas Canarias, Nuevo México, California y Sicilia. Las primeras caracterizaciones moleculares realizadas por Northup y colaboradores en cuevas de lava hawaianas y azorianas identificaron al menos quince filos bacterianos en tapetes microbianos y depósitos minerales secundarios, con

Actinobacteria, Acidobacteria y Proteobacteria como linajes dominantes, y con la localización geográfica como determinante más fuerte de la composición comunitaria que las características locales del sustrato [27, 30]. Hathaway y colaboradores demostraron posteriormente que las comunidades de cuevas de lava sostienen ciclos del nitrógeno funcionalmente completos, con bacterias oxidadoras de amoníaco similares a *Nitrosospira* dominantes en cuevas azorianas y con un uso del suelo superficial que influye sobre las comunidades del ciclo del nitrógeno subyacentes [21]. Riquelme y colaboradores documentaron Actinobacteria prominentes en catorce cuevas volcánicas de dos islas azorianas, encontrando que la identidad de la cueva y la localización insular fueron más importantes que el color del tapete para estructurar la diversidad microbiana [31]. Una comparación pionera realizada por Lavoie y colaboradores entre siete comunidades de cuevas de lava de California y los suelos superficiales suprayacentes reveló que solo el 11.2 % de las unidades taxonómicas operativas eran compartidas entre los tapetes cavernícolas y los suelos [23], refutando la suposición de que los microorganismos cavernícolas son simples subconjuntos de las comunidades superficiales y proporcionando evidencia sólida de ensamblajes indígenas, localmente adaptados y modelados por filtrado ambiental *in situ* más que por deposición pasiva.

Trabajos más recientes han continuado ampliando el alcance geográfico y ecológico de la microbiología de cuevas volcánicas. Nicolosi y colaboradores realizaron el primer estudio sistemático de los tubos de lava del Monte Etna y encontraron comunidades dominadas por Actinomycetota — en particular el género *Crossiella* — junto con Pseudomonadota, Acidobacteriota y Chloroflexota [32]. Prescott y colaboradores compararon cuevas de lava hawaianas de distintas edades geológicas e identificaron a los Chloroflexi como especies eje (*hub species*) que mantienen un número desproporcionado de interacciones de co-ocurrencia dentro de las redes microbianas cavernícolas [33]. Gonzalez-Pimentel y colaboradores documentaron la participación de comunidades procariotas en los ciclos biogeoquímicos de elementos mayores dentro de un tubo de lava de las Islas Canarias, demostrando ciclos activos de hierro y manganeso sobre superficies basálticas [34]. Una revisión comparativa entre cuevas calcáreas, cuevas de espeleogénesis sulfúrica y cuevas volcánicas encontró que las cuevas calcáreas y las de tipo tubo de lava son colonizadas por filos en gran medida superpuestos — dominados por Pseudomonadota y Actinomycetota —, mientras que las cuevas sulfídicas muestran una codominancia característica de Pseudomonadota y Campylobacterota impulsada por la oxidación quimiolitotrófica del azufre [10].

A pesar de este creciente cuerpo de trabajo, la microbiología publicada sobre cuevas volcánicas se ha concentrado abrumadoramente en los tubos de lava — un tipo espeleogenético específico caracterizado por paredes basálticas relativamente lisas, una geometría aproximadamente cilíndrica y una formación a partir de dinámica activa de flujos de lava. Las cuevas volcanoclásticas, formadas mediante la meteorización, el colapso gravitacional y la reconfiguración erosiva de depósitos piroclásticos, representan una categoría geológica y estructuralmente distinta, con composiciones de sustrato, regímenes de porosidad y conectividades hidrológicas diferentes [28, 35]. El origen piroclástico de estos sistemas implica una distribución heterogénea de granos minerales, una permeabilidad variable y una arquitectura interna más compleja que la típica

de los tubos de lava, con implicaciones tanto para los microhábitats físicos disponibles a los colonizadores microbianos como para el ambiente geoquímico al que se enfrentan. Si los patrones ecológicos documentados en la microbiología de tubos de lava — el recambio comunitario asociado a la zonación, el dominio de Actinomycetota y Pseudomonadota, los ensamblajes indígenas y no derivados de la superficie — se generalizan a los entornos volcánoclasticos, o si las diferencias geológicas y geoquímicas imponen presiones selectivas distintas sobre la estructura de las comunidades microbianas, sigue siendo en gran medida una cuestión no resuelta. Esta brecha es particularmente aguda para las regiones tropicales montañosas, donde temperaturas bajas estables, alta humedad, heterogeneidad mineral y una zonación pronunciada definida por la luz pueden crear paisajes selectivos sin análogo directo en la literatura existente. Hasta donde tengo conocimiento, ningún estudio publicado ha examinado la estructura de la comunidad microbiana cultivable en una cueva volcánoclastica tropical de tipo orgánica, ni ninguna investigación ha abordado las cuevas pseudokársticas de bloques características de los Andes colombianos desde una perspectiva microbiológica.

1.3 El cultivo como enfoque complementario

La gran anomalía del conteo en placa — la discrepancia de entre uno y cuatro órdenes de magnitud entre los conteos microscópicos directos y los conteos de colonias en medios estándar — ha sido reconocida desde la década de 1980 como una limitación fundamental de la microbiología dependiente de cultivo [36]. En los ambientes cavernícolas oligotróficos, la cultivabilidad puede ser tan baja como el 0.02–1 % del recuento total de células [37, 38]. Los métodos moleculares dominan ahora el campo, y sus contribuciones a la cartografía de la diversidad microbiana subterránea son sustanciales [5, 39]. Sin embargo, los enfoques moleculares y los basados en cultivo capturan dimensiones fundamentalmente diferentes de las comunidades microbianas y se entienden mejor como complementarios [40]: los métodos basados en ADN no pueden distinguir organismos viables del ADN ambiental derivado de células muertas o latentes, mientras que el cultivo permite la recuperación de organismos vivos, la estimación cuantitativa de la densidad cultivable mediante conteos de unidades formadoras de colonia y descripciones comunitarias con resolución fenotípica mediante la clasificación de morfotipos [37, 41]. El cultivo accede también a miembros de la biosfera rara que se sitúan por debajo de los límites moleculares de detección — Shade y colaboradores mostraron que el cultivo puede recuperar OTUs bacterianas raras o no detectadas en estudios independientes de cultivo, demostrando que los enfoques dependientes de cultivo y los basados en secuenciación acceden a fracciones superpuestas pero no idénticas de la diversidad microbiana [42].

Los medios de bajo contenido nutricional, como el agar R2A, desarrollado por Reasoner y Geldreich para la recuperación de bacterias heterótrofas a partir de agua potable [41], están diseñados para superar el choque nutricional que los medios ricos imponen sobre los organismos oligotrofos. R2A se ha convertido en el estándar *de facto* para conteos heterótrofos ambientales en placa y se utiliza ampliamente en microbiología cavernícola, a menudo a un cuarto o a un décimo de su concentración para favorecer la recuperación de organismos adaptados a oligotrofia

extrema. Combinado con condiciones de incubación que mimetizan las cavernícolas — baja temperatura, oscuridad y períodos de incubación prolongados —, el R2A diluido proporciona un marco ecológicamente pertinente para recuperar fenotipos de crecimiento lento que los protocolos estándar de cultivo pasarían por alto. Kato y colaboradores mostraron que las colonias que emergen tras siete o más días en medios de bajo contenido nutricional pueden incluir bacterias filogenéticamente novedosas, incluyendo taxones representativos de órdenes taxonómicos enteramente nuevos [43]. En sistemas cavernícolas, Zhu y colaboradores emplearon cultivo intensivo para recuperar 3 562 aislados bacterianos representativos de 329 especies, entre ellas catorce especies recién descritas, a partir de muestras de roca, agua y sedimento recolectadas en dos cuevas kársticas chinas; integraron luego esta colección genómica cultivada con datos metagenómicos para inferir el potencial metabólico en los ciclos del carbono, el nitrógeno y el azufre [26].

A pesar de este potencial, las líneas base cultivables espacialmente resueltas para los sistemas cavernícolas siguen siendo escasas. La mayoría de los estudios cavernícolas basados en cultivo reportan o bien conteos globales de UFC sin réplica espacial, o bien identificaciones taxonómicas de aislados seleccionados sin análisis estadístico a nivel de comunidad [23, 44]. La morfotipificación de colonias — la clasificación sistemática de fenotipos a nivel colonial, incluyendo pigmentación, forma, elevación, arquitectura del margen, tamaño, textura superficial, transparencia, comportamiento de expansión y mucoidía — proporciona un marco práctico para resolver la composición comunitaria a nivel de placa cuando la identificación molecular de cada aislado no es factible. La defensibilidad de la morfotipificación como herramienta de ecología de comunidades reposa sobre validación empírica: Haldeman y Amy, trabajando con aislados de roca del subsuelo profundo, utilizaron perfiles quimiotaxonómicos de ésteres metílicos de ácidos grasos para mostrar que los aislados pertenecientes a un mismo morfotipo correspondían en general a la misma especie a nivel de biotipo o subespecie [45]; Lebaron y colaboradores, trabajando con bacterias de agua marina, utilizaron el análisis de restricción del gen del ARNr 16S para demostrar que morfotipos coloniales distintos correspondían en general a especies diferentes, señalando al mismo tiempo que la morfotipificación subestima inevitablemente la diversidad taxonómica real porque la convergencia morfológica puede oscurecer las diferencias filogenéticas [46]. La morfotipificación captura, por tanto, una resolución gruesa pero significativa de la estructura comunitaria a nivel colonial, suficiente para detectar patrones espaciales de cambio composicional y al mismo tiempo explícitamente no taxonómica. Hasta donde tengo conocimiento, ningún estudio previo ha aplicado estadística ecológica multivariada a datos comunitarios cultivables a nivel de morfotipo procedentes de un sistema cavernícola volcánico de tipo orgánico.

1.4 El sistema de estudio: el Organal San Antonio

El Organal San Antonio es una cueva volcánico de tipo orgánico situada a aproximadamente 2350 m s. n. m. en el municipio de Támesis (Antioquia), en el flanco oriental de la Cordillera Occidental de los Andes colombianos (Figura 2). La cueva pertenece a una categoría distintivamente

antioqueña de sistemas pseudokársticos conocidos como *organales*, clasificados sistemáticamente por primera vez en la literatura geológica por Cano Alzate y Rentería Cárdenas, quienes propusieron una tipología formal basada en litología, proceso espeleogenético, régimen hidrológico y estabilidad estructural [47]. Los organales son pasajes subterráneos formados por la acumulación gravitacional y la reorganización a largo plazo de grandes bloques volcánicos, que producen corredores con apariencia de cueva y que ocasionalmente canalizan agua corriente. Carecen de espeleotemas internos y no presentan espeleogénesis por disolución; su formación se interpreta, por lo tanto, como predominantemente mecánica y erosiva, reflejando la reorganización gravitacional de materiales volcanoclásticos a escalas de tiempo geológicas. Dentro de la tipología de Cano Alzate y Rentería Cárdenas, el Organal San Antonio se clasifica como un sistema húmedo, profundo, grande, estable, gravitacional, ígneo-volcánico, soportado y semiconfinado — generado no por disolución de roca soluble, sino por acumulación gravitacional, reorganización mecánica y modificación erosiva de un sustrato volcanoclástico heterogéneo. Coherentemente con esta interpretación, el sistema se trata mejor como pseudokárstico que como kárstico: sus vacíos se producen por acumulación mecánica, reorganización gravitacional y modificación erosiva de materiales volcanoclásticos, y no por disolución de roca madre soluble. Esto sitúa a los organales dentro de la familia más amplia de formas subterráneas no disolutivas, comparables a las cuevas de talud, las cuevas de bloques y las cavidades pseudokársticas relacionadas descritas a nivel mundial [28, 35, 47].

El contexto geológico del Organal San Antonio lo proporciona la Provincia Volcánica Combia, una unidad volcánica miocena activa aproximadamente entre 12 y 6 Ma dentro del sistema de fallas Cauca–Romeral de la Cordillera Occidental [48, 49]. La Provincia Combia abarca tres series magmáticas coexistentes — toleítica, calcoalcalina y shoshonítica — e incluye un ensamble heterogéneo de lavas basálticas, andesitas, depósitos piroclásticos, depósitos de avalancha de escombros y de lahar, y cuerpos subvolcánicos porfiríticos emplazados durante el Mioceno tardío. Su formación se ha vinculado a la subducción de la placa de Nazca bajo la placa Sudamericana y a la colisión del bloque Panamá-Chocó con el noroeste de Sudamérica, con un magmatismo intensificado por el desarrollo del Caldas Tear, una ventana de losa producida por la subducción de la Dorsal de Sandra [48, 49]. Según la interpretación local de la capa geológica AGC 2023, la entrada de la cueva se sitúa cerca del contacto cartografiado entre la Formación Combia y la Diorita de Támesis, también denominada Stock de Támesis (Figura 2, panel (c)). Este cuerpo intrusivo se describe como predominantemente diorítico, con variaciones locales a cuarzo-diorita, cuarzo-monzodiorita y gabro anfibólico. El Atlas Geológico de Colombia 2023 asigna el Stock de Támesis al Mioceno tardío (Serravalliense–Messiniense) [50], con una edad de formación de aproximadamente 9–10 Ma consistente con el episodio magmático regional de Combia [48, 49]. Una edad K–Ar más antigua de 124 ± 6 Ma reportada por González y Londoño [51] refleja probablemente material más antiguo incorporado más que la edad de cristalización del cuerpo intrusivo. Este contacto litológico cartografiado puede influir sobre la heterogeneidad del sustrato y sobre las rutas hidrológicas locales dentro del sistema cavernícola.

Coherentemente con el modelo organal descrito para los sistemas pseudokársticos antioqueños, la cueva está estructurada por grandes bloques volcaniclásticos redondeados que forman paredes irregulares, pasajes con techo y vacíos discontinuos en lugar de galerías de disolución. Cabe esperar que esta arquitectura genere una fuerte heterogeneidad a pequeña escala en exposición a la luz, humedad, acumulación de sedimento y colonización de superficies rocosas, y que permita el movimiento del agua a través del sustrato suprayacente para conectar el interior cavernícola con el paisaje montano circundante [28, 35, 47].

La cueva abarca un gradiente ambiental abrupto en lugar de uno que se atenúe de manera continua. La transición desde la entrada semi-iluminada hasta el interior completamente afótico ocurre a lo largo de distancias cortas — aproximadamente 30 m separan la entrada del sector de transición, y más de 80 m separan la entrada del interior oscuro — y está gobernada principalmente por la geometría de las acumulaciones de bloques más que por una atenuación gradual de la luz a través del espacio abierto. La temperatura del aire en los sectores interiores es estable y baja (15.0–16.1 °C), con humedad relativa consistentemente superior al 87 % y temperaturas de la superficie rocosa cercanas a 14 °C, en contraste marcado con el ambiente exterior inmediatamente adyacente a la entrada (18.3 °C, 76 % HR). Estas condiciones sitúan la cueva dentro del rango psicotolerante, donde se espera que se vean selectivamente favorecidos los organismos capaces de crecer a bajas temperaturas pero no necesariamente requirentes de ellas [55, 56]. Este paisaje térmico tiene una implicación metodológica directa: dirigir el cultivo hacia el componente tolerante a bajas temperaturas de la comunidad cultivable exige temperaturas de incubación que se aproximen a las del interior cavernícola.

La colonización superficial visible ocurre a lo largo de toda la cueva como películas pigmentadas, parches hidratados y estructuras laminadas asociadas a la superficie sobre las superficies rocosas — películas verdes y anaranjadas cerca de la entrada, estructuras mucilaginosas más delgadas sobre roca teñida de hierro en el sector de transición, y tenues costras blanquecinas sobre superficies húmedas en el interior oscuro. Estas observaciones son consistentes con el marco de zonación establecido en la literatura más amplia de la microbiología cavernícola, pero no han sido cuantificadas ni caracterizadas sistemáticamente en ningún estudio previo de este sistema. Hasta donde tengo conocimiento, no se ha realizado ninguna investigación microbiológica en el Organal San Antonio, y ningún estudio publicado ha examinado la estructura de la comunidad microbiana cultivable en una cueva de tipo organal. La combinación de singularidad geológica, zonación abrupta, estabilidad ambiental e impacto humano mínimo hace del Organal San Antonio un sistema adecuado para investigar cómo varía la fracción microbiana cultivable entre sectores cavernícolas definidos por la luz en un contexto volcaniclástico tropical, y para establecer una primera línea base cuantitativa contra la cual puedan compararse futuros estudios moleculares, fisiológicos, geoquímicos y temporales.

1.5 Pregunta de investigación, objetivos y diseño del estudio

Este estudio pregunta si la zonación abrupta definida por la luz del Organal San Antonio está asociada con diferencias en la fracción microbiana cultivable detectables a la escala de

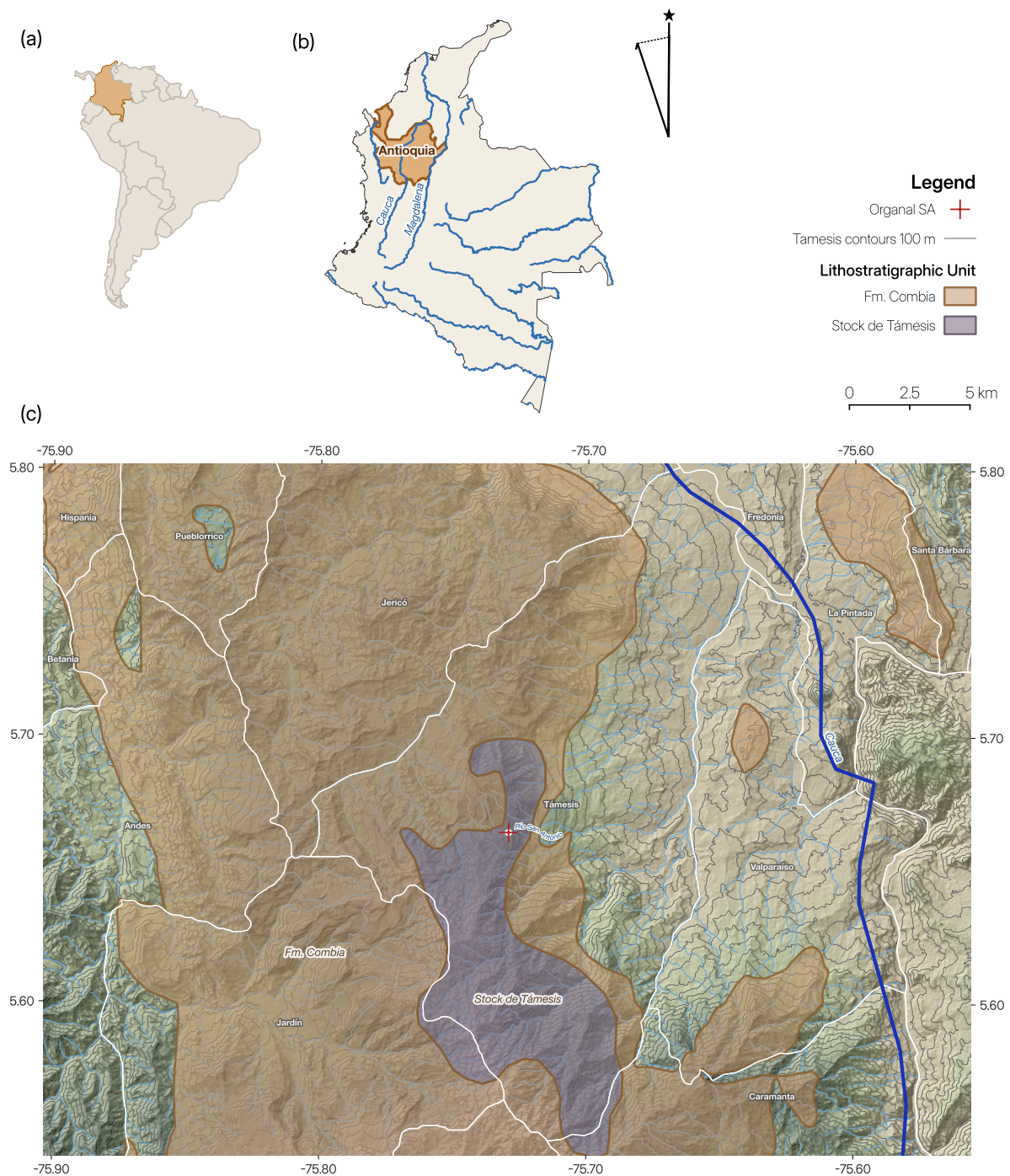


Figura 2. Contexto geográfico, topográfico y geológico del Organal San Antonio. (a) Contexto sudamericano con Colombia resaltada. (b) Contexto regional que muestra el departamento de Antioquia dentro de Colombia, con los ríos Cauca y Magdalena como referencias geográficas. (c) Contexto topográfico y geológico local del área de Tamesis. La entrada de la cueva está marcada en 5.664°N, 75.729°W, a aproximadamente 2350 m s. n. m. Las unidades geológicas incluyen la Formación Combia (basaltos y andesitas volcánoclasticos, Mioceno) y la Diorita de Tamesis o Stock de Tamesis (intrusivo predominantemente diorítico, Mioceno tardío; ~9–10 Ma). Terreno derivado del Copernicus Digital Elevation Model (GLO-30; [52]). Límites nacionales, regionales y continentales y rásters base provenientes de Natural Earth [53]; límites político-administrativos locales e hidrografía, del IGAC [54]; unidades geológicas, del Atlas Geológico de Colombia 2023 [50]. Las capas locales se proyectaron en MAGNA-SIRGAS 2018 / Origen-Nacional (EPSG:9377); las cuadrículas en WGS84 (EPSG:4326).

un único sistema cavernícola. Si el filtrado ambiental asociado al sector afecta a la comunidad recuperable en R2A, la estructura de la comunidad cultivable debería particionarse con la zonación cavernícola, y esa partición debería ser detectable en tres firmas complementarias (Figura 1): la densidad cultivable por unidad de sedimento, la diversidad local de clústeres de morfotipos dentro de las muestras y el recambio composicional entre muestras. Si, en cambio, la zonación resulta ecológicamente transparente para la fracción cultivable — si la densidad cultivable, la diversidad y la composición son indistinguibles entre sectores — entonces, o bien el contraste ambiental no afecta fuertemente a la fracción cultivable, o bien su efecto no alcanza la resolución accesible a través del marco de cultivo y de clústeres de morfotipos empleado aquí.

El objetivo general es caracterizar la fracción microbiana cultivable a lo largo de la zonación ecológica definida por la luz del Organal San Antonio y determinar si la identidad de sector está asociada con diferencias en densidad cultivable, diversidad local de clústeres de morfotipos y composición a nivel de morfotipo. Los objetivos específicos son: (i) cuantificar la densidad cultivable entre sectores cavernícolas definidos por la disponibilidad de luz y evaluar si la densidad cambia a lo largo del gradiente; (ii) caracterizar la composición de clústeres de morfotipos y la diversidad alfa dentro de cada sector, evaluando si la diversidad local varía con la zonación; (iii) evaluar el recambio composicional entre sectores mediante análisis multivariado de comunidades, evaluando si la composición cultivable a nivel de clústeres de morfotipos se particiona con la zonación cavernícola; y (iv) generar una referencia fenotípica preliminar para representantes cultivables seleccionados, evaluando si los clústeres fenotípicos a nivel colonial corresponden a perfiles celulares y bioquímicos consistentes.

Para abordar estos objetivos, la fracción cultivable se caracterizó mediante dos experimentos independientes conducidos en etapas sucesivas del estudio: un contraste binario inicial entre sectores iluminados y afóticos, y una resolución posterior en tres sectores de la zonación completa entrada-interior. Ambos experimentos emplearon agar R2A diluido y la clasificación por morfotipos coloniales como el marco principal para el análisis a nivel comunitario. El Experimento II empleó además condiciones de incubación que mimetizan las cavernícolas (14.5–15 °C), mientras que el Experimento I se incubó a temperatura ambiente de laboratorio (~20 °C). En conjunto, estos análisis establecen, hasta donde tengo conocimiento, la primera línea base cuantitativa cultivable para una cueva volcanoclástica tropical de tipo organal y proporcionan el sustento empírico contra el cual podrán situarse futuras investigaciones moleculares, fisiológicas, geoquímicas y temporales del Organal San Antonio.

2 Materiales y Métodos

2.1 Sistema de estudio y zonación ecológica

El trabajo de campo se realizó en el Organal San Antonio, una cueva pseudokárstica volcanoclástica tropical en el municipio de Támesis (Antioquia, Andes colombianos; ~2350 m s. n. m.; el contexto geológico y ambiental se describe en la Sección 1). Se definieron tres sectores principalmente sobre la base de la disponibilidad de luz, con las condiciones abióticas asociadas

registradas durante el muestreo: un sector de Entrada semi-iluminado expuesto a radiación externa indirecta y con un acoplamiento más fuerte con el microclima superficial; un sector de Transición, situado aproximadamente a 30 m de la entrada, en el cual la luz natural está fuertemente atenuada pero no del todo ausente; y un sector Oscuro completamente afótico, situado a más de 80 m de la entrada, en el que la iluminación natural fue indetectable durante cualquier evento de muestreo. La transición entre sectores está gobernada por la geometría de las acumulaciones de bloques más que por una atenuación gradual a través de un pasaje lineal abierto. La disponibilidad de luz se clasificó cualitativamente con base en la presencia o ausencia de iluminación natural detectable.

Las condiciones abióticas se registraron *in situ* durante el muestreo utilizando un termohigrómetro CHY820 para la temperatura del aire y la humedad relativa; la temperatura de la superficie rocosa se registró con la misma configuración de instrumento de campo cuando fue aplicable (Tabla 1). El pH del sedimento y del agua cavernícola se midió *ex situ* el 12 de junio de 2025 utilizando un pHmetro Orion Star A111 (Thermo Scientific). El sedimento húmedo de la cueva arrojó valores ácidos (pH 4.40 tanto en una preparación sedimento-agua como en una preparación de sedimento denso), mientras que el agua del arroyo cavernícola filtrada fue menos ácida (pH 5.74). El pH post-autoclave del medio R2A diluido empleado para el cultivo fue 7.01.

Cuadro 1. Condiciones abióticas *in situ* registradas durante el muestreo. Los valores exteriores proporcionan una referencia superficial para el gradiente interior.

Sector	Temperatura del aire (°C)	HR (%)	Temperatura de la roca (°C)	Interior
Exterior	18.3	75.7	14.8	No
Entrada	15.0	92.7	14.2	Sí
Transición	16.1	87.5	14.1	Sí
Oscuro	15.2	92.0	13.9	Sí

2.2 Estructura experimental y muestreo

La comunidad cultivable se investigó mediante dos experimentos independientes conducidos en etapas sucesivas del estudio. Cada experimento representa una resolución observacional distinta del gradiente interno de la cueva, y las inferencias derivadas de cada uno se presentan por separado a lo largo de los Resultados. El Experimento I comparó dos categorías operativas — *Luz* (las porciones de entrada y de penumbra, donde la radiación fotosintéticamente activa residual podía alcanzar el sustrato) y *Oscuridad* (el interior completamente afótico) — con seis réplicas biológicas independientes por categoría, generando doce muestras de sedimento en total. El Experimento II resolvió la cueva en tres sectores (Entrada, Transición, Oscuro) con cinco réplicas biológicas independientes por sector, generando quince muestras de sedimento en total (Figura S1). Una réplica biológica se define operativamente como un único punto de recolección de sedimento separado de todas las demás réplicas dentro de la misma categoría o sector por una distancia mínima de aproximadamente 70 cm y que muestra variación local visible en morfología superficial, retención de humedad y aspecto de la colonización. Esta definición trata cada réplica como una observación independiente de la comunidad cultivable dentro de su

zona y no como una submuestra de un parche homogéneo. La heterogeneidad del sustrato fue evidente dentro de cada sector: las diferencias en inclinación de la roca, porosidad, tinciones minerales, películas de humedad y la presencia o ausencia de colonización superficial visible eran perceptibles entre las posiciones de réplica, lo que respalda el tratamiento de cada punto de recolección como una muestra independiente del mosaico de microhábitats locales.

En ambos experimentos, el muestreo se dirigió a capas finas de sedimento y a depósitos hidratados estrechamente asociados con la colonización superficial visible sobre las superficies rocosas. El sedimento se recolectó utilizando guantes de nitrilo estériles y espátulas estériles de acero inoxidable. La capa superficial de sedimento húmedo de campo asociada a la colonización visible se raspaba suavemente de la superficie rocosa y se transfería a microtubos estériles de 1.5 mL. Durante el trabajo de campo, las espátulas se enjuagaban y limpiaban entre puntos de recolección utilizando el agua disponible en el sitio y raspando el material residual de la superficie del instrumento; por lo tanto, aunque el arrastre entre muestras se minimizó, la limpieza en campo no debe interpretarse como una reesterilización completa entre muestras. El contacto con superficies no objetivo se minimizó a lo largo del muestreo. El diseño de muestreo incluyó un conjunto completo de réplicas de campo de respaldo; el flujo de trabajo final del Experimento I se inició a partir de estas muestras de respaldo refrigeradas 10 días después de la recolección. Para el Experimento II, el procesamiento microbiológico se inició dentro de las 48 h siguientes a la recolección. En ambos casos, los tubos se transportaron y mantuvieron bajo condiciones de refrigeración hasta el procesamiento de laboratorio.

En el Experimento II, cada microtubo se pesó antes y después de la adición de sedimento utilizando una balanza analítica para obtener la masa medida de sedimento húmedo de campo por réplica (rango: 1.25–1.89 g). Además de las muestras orientadas al cultivo, se recolectaron submuestras de sedimento fresco para observación directa en montaje húmedo utilizando un microscopio óptico compuesto Leica DM750 equipado con una cámara FlexCam i5, y se conservaron fragmentos de roca para examen estereoscópico de las superficies minerales utilizando un estereomicroscopio Carl Zeiss Stereo Discovery.V12 equipado con una AxioCam. El agua ambiental se recolectó del arroyo cavernícola en botellas estériles de vidrio borosilicato (Schott Duran), se transportó a 4 °C y se esterilizó mediante autoclave a 121 °C durante 15 min antes de su uso como diluyente en las suspensiones de sedimento y las diluciones seriadas. De manera separada, se sembró en placa agua fresca no autoclavada del arroyo cavernícola del sector Oscuro como control de agua ambiental, según se describe en la Sección 2.3.

2.3 Cultivo, dilución y conteo de colonias

Se empleó un medio de bajo contenido nutricional en ambos experimentos para reducir el choque nutricional y limitar el sobrecrecimiento por copiótrofos de crecimiento rápido. El agar R2A en polvo (DM1962; Central Drug House (P) Ltd., Nueva Delhi, India) se preparó al 25 % de la concentración recomendada por el fabricante (4.53 g/L de polvo total de medio), suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico en polvo (Biomark Laboratories, Pune, India) para asegurar la solidificación a la concentración de nutrientes reducida, y con 0.1 g/L de NaHCO₃ como fuente

mínima de carbono inorgánico [41]. Los medios se autoclavaron a 121 °C durante 15 min; el pH post-autoclave fue 7.01. Los medios se dispensaron en placas de Petri estériles y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Las placas de ambos experimentos se siguieron a través de una secuencia observacional compartida en la que la emergencia colonial temprana, el conteo primario de colonias, el reconocimiento de morfotipos y el procesamiento posterior de los aislados se trataron como etapas distintas. En el Experimento I, las placas se incubaron a aproximadamente 20 °C en un contenedor cerrado de almacenamiento en oscuridad bajo condiciones ambientales de laboratorio. En el Experimento II, las placas se incubaron a 14.5–15 °C en oscuridad total dentro de una cámara de enfriamiento de laboratorio (DVM Tecnología S.A.S.) equipada con ventilador y placa de enfriamiento; la temperatura se monitoreó utilizando un termohigrómetro CHY820. Este régimen térmico aproxima las condiciones térmicas *in situ* del interior de la cueva (Tabla 1) y se seleccionó para reducir el sesgo hacia el crecimiento mesofílico más rápido bajo condiciones de laboratorio más cálidas. Las colonias pequeñas se hicieron detectables durante la primera semana de incubación, con una emergencia visible en el Experimento II hacia el día 4 aproximadamente. El censo primario de colonias del Experimento II utilizado para los análisis de densidad y de comunidad se registró en el día 7, mientras que el reconocimiento de morfotipos, la verificación a nivel de colonia y la selección de aislados se consolidaron progresivamente en un lapso de aproximadamente 10–20 días. La purificación, la tinción, la microscopía y la criopreservación aguas abajo se realizaron secuencialmente después de esta fase inicial de cultivo.

En ambos experimentos, el sedimento se homogeneizó por agitación en vórtex durante 30 s antes de la dilución, y se preparó una suspensión madre resuspendiendo 200 µL de sedimento húmedo de campo en 800 µL de agua autoclavada del arroyo cavernícola. Esto produjo una suspensión de sedimento 1:5 en la que la fracción original de sedimento era $0,2 = 2 \times 10^{-1}$. En el Experimento I, esta suspensión se diluyó serialmente desde 10^{-1} hasta 10^{-5} en agua autoclavada del arroyo cavernícola y se sembró por extensión a razón de 100 µL por placa sobre agar R2A al 25 %. En el Experimento II, la suspensión se diluyó serialmente a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , con una réplica técnica a 10^{-2} para evaluar la variabilidad de conteo dentro de la muestra.

Para la estimación de la densidad, se seleccionó una placa primaria por réplica biológica privilegiando las placas contables (30–300 colonias) en la dilución más baja disponible (Tablas S8–S9). Los dos experimentos difirieron en su denominador de normalización. En el Experimento I, la densidad se normalizó volumétricamente porque no se midió una masa de sedimento específica por réplica. En el Experimento II, la densidad se normalizó gravimétricamente utilizando la masa estimada de sedimento húmedo de campo de la alícuota utilizada para preparar la suspensión madre.

En el Experimento II, la masa total de sedimento húmedo de campo recolectada en cada microtubo se midió gravimétricamente. Dado que la suspensión madre se preparó a partir de una alícuota estandarizada de 200 µL de sedimento húmedo de campo en lugar de a partir del contenido total del tubo, la masa representada en la suspensión se estimó como:

$$m_{\text{aliquot}} = m_{\text{tube}} \times \frac{V_{\text{aliquot}}}{V_{\text{tube}}}, \quad (1)$$

donde m_{tube} es la masa medida de sedimento húmedo de campo en el microtubo, $V_{\text{aliquot}} = 0,2 \text{ mL}$ es el volumen de sedimento utilizado para preparar la suspensión madre, y $V_{\text{tube}} \approx 1,5 \text{ mL}$ es el volumen aproximado de sedimento húmedo de campo recolectado por tubo. Así, $m_{\text{aliquot}} = m_{\text{tube}} \times 0,2/1,5$. La estimación resultante se utiliza como una corrección gravimétrica a nivel de alícuota más que como una medición directa de la masa exacta de la alícuota de $200 \mu\text{L}$. Este cálculo asume densidad aparente uniforme dentro del tubo después del vórtex; cualquier desviación respecto a este supuesto introduce un error de estimación que se espera pequeño en relación con la diferencia aproximada de un orden de magnitud en la densidad cultivable observada entre sectores. Los valores por réplica de m_{tube} y los m_{aliquot} derivados utilizados en la Ecuación 2 se reportan en la Tabla S10.

La densidad cultivable se calculó como:

$$\text{UFC por unidad de sustrato} = \frac{N}{D_{\text{serial}} \times V_{\text{plated}} \times A}, \quad (2)$$

donde N es el conteo de colonias en la placa seleccionada, D_{serial} es la dilución seriada sembrada, $V_{\text{plated}} = 0,1 \text{ mL}$ es el volumen sembrado por extensión y A es la cantidad de sustrato representada en la serie de dilución sembrada. En el Experimento I, $A = 0,2 \text{ mL}$ de sedimento húmedo representado en la suspensión madre, y los resultados se expresan como UFC mL^{-1} de sedimento húmedo. En el Experimento II, $A = m_{\text{aliquot}}$, la masa estimada de sedimento húmedo de campo utilizada para preparar la suspensión madre, y los resultados se expresan como UFC g^{-1} de sedimento húmedo de campo. Esta formulación separa la dilución seriada aplicada después de la suspensión madre del denominador de normalización por sustrato y hace explícito que la corrección gravimétrica del Experimento II se basa en la alícuota de sedimento procesada y no en la masa total del tubo.

El agua fresca no autoclavada del arroyo cavernícola recolectada del sector Oscuro se sembró por separado como un control de agua ambiental para estimar el fondo cultivable asociado a la fuente de agua en sí. Este control fue distinto del agua autoclavada del arroyo cavernícola utilizada como diluyente estéril para las suspensiones de sedimento y las diluciones seriadas, y no se trató como una prueba de esterilidad del diluyente (Tabla S6). En paralelo, en ambos experimentos se sembró un control negativo consistente en el agua autoclavada del arroyo cavernícola utilizada como diluyente; no se registró crecimiento colonial.

2.4 Clasificación de morfotipos y *crosswalk* intersectorial

Los morfotipos coloniales se definieron operativamente con base en características macroscópicas de las colonias observadas en la superficie de la placa: pigmentación, opacidad, textura superficial (mate frente a brillante o mucoide), perfil de elevación, arquitectura del margen, tamaño de la colonia, transparencia y comportamiento de expansión. Un morfotipo, tal como se usa en este estudio, es la categoría visualmente distinguible más pequeña de fenotipo colonial

que pudo reconocerse consistentemente entre placas dentro de un experimento dado. La defensibilidad de esta unidad reposa sobre validación empírica que muestra que la morfología colonial puede recuperar una estructura fenotípica gruesa pero significativa en estudios ambientales basados en cultivo, reconociendo a la vez que la convergencia morfológica puede colapsar organismos taxonómicamente distintos y que la plasticidad fenotípica puede dividir organismos relacionados entre distintas formas coloniales [45, 46]. Los morfotipos se tratan, por lo tanto, como unidades fenotípicas operativas y no como asignaciones taxonómicas.

En el Experimento I, los morfotipos se asignaron globalmente entre las categorías Luz y Oscuridad, generando diecinueve códigos descritos (ORG-SA001 a ORG-SA019; Tabla S1). Catorce de ellos se detectaron en placas contables y se incluyeron en la matriz comunitaria del Experimento I. Las colonias representativas se estriaron nuevamente sobre placas frescas de agar R2A al 25 % hasta que la consistencia morfológica entre generaciones sucesivas sugirió una purificación adecuada. Los aislados purificados se criopreservaron a -80°C en glicerol al 30 % (v/v) preparado con agua autoclavada del arroyo cavernícola.

En el Experimento II, los morfotipos se clasificaron independientemente dentro de cada sector: quince códigos para el sector de Entrada (E-MT01 a E-MT15, incluyendo tres morfotipos fúngicos putativos), catorce para la Transición (T-MT01 a T-MT14, incluyendo dos morfotipos fúngicos putativos) y trece para el sector Oscuro (D-MT01 a D-MT13, incluyendo un morfotipo fúngico putativo), para un total de cuarenta y dos códigos de morfotipos de sedimento específicos por zona (Tablas S2–S4). Los morfotipos del control de agua fresca cavernícola se codificaron por separado como C-MT01 a C-MT06 y no se incluyeron en la matriz comunitaria del sedimento (Tabla S6).

Para permitir la comparación comunitaria intersectorial en el Experimento II, los cuarenta y dos códigos de morfotipos de sedimento específicos por zona se mapearon sobre un conjunto unificado de veintitrés clústeres fenotípicos operativos (CL01–CL23) utilizando un *crosswalk* diagnóstico basado en pigmentación, opacidad, forma, elevación, arquitectura del margen, tamaño, textura superficial, transparencia, mucoidía y comportamiento de expansión (Tabla S5). La confianza de la asignación se registró como Alta, Moderada o Baja según el número, la distintividad y la reproducibilidad de los caracteres diagnósticos compartidos. Las asignaciones de alta confianza requirieron múltiples caracteres compartidos fuertemente discriminantes; las asignaciones de confianza moderada reflejaron un fenotipo compartido reconocible con variación menor en rasgos secundarios; las asignaciones de baja confianza representaron fenotipos restringidos a la zona o casos en los que la similitud fenotípica con otro clúster requería una interpretación cautelosa.

El *crosswalk* final comprendió siete clústeres intersectoriales tratados como bacterianos en la etapa del catálogo colonial (CL01–CL04, CL06–CL08), dos clústeres bacterianos compartidos por dos sectores (CL05 y CL14), once clústeres de sedimento restringidos a zona (CL09–CL13, CL15–CL19, CL23) y tres clústeres fúngicos putativos (CL20–CL22). Los veintitrés clústeres se retuvieron en la matriz comunitaria. La caracterización posterior a nivel de aislado no modificó el *crosswalk* ni la matriz comunitaria. Los clústeres restringidos a zona se trataron como ausencias

estructurales biológicamente informativas en los sectores no fuente, y no como datos faltantes [57, 58]. Todos los análisis comunitarios aguas abajo se interpretan, por lo tanto, a nivel de clúster de morfotipos.

2.5 Caracterización fenotípica de aislados representativos

Veintitrés aislados del Experimento II — ocho del sector de Entrada, seis de Transición, siete del sector Oscuro y dos aislados del control de agua fresca cavernícola — se seleccionaron para una caracterización fenotípica preliminar. La selección priorizó la distintividad fenotípica e incluyó representantes tanto de clústeres intersectoriales como de clústeres restringidos a zona. Los aislados se purificaron por estriado secuencial en agar R2A al 25 % hasta alcanzar consistencia morfológica a partir de una sola colonia antes de la caracterización. Las preparaciones teñidas con Gram se examinaron utilizando un microscopio óptico compuesto Leica DM750 equipado con una cámara FlexCam i5. La morfología colonial y la apariencia a nivel de placa se examinaron estereoscópicamente utilizando un estereomicroscopio Carl Zeiss Stereo Discovery.V12 equipado con una AxioCam.

La batería de caracterización comprendió tres ensayos. (i) La tinción de Gram se realizó utilizando el protocolo estándar de cuatro reactivos (cristal violeta, yodo de Gram, decoloración con etanol y safranina como contracolorante) sobre células tomadas de cultivos activos a baja temperatura sobre agar R2A al 25 %, generalmente tras aproximadamente seis días de incubación y, para los aislados de crecimiento más lento, hasta aproximadamente diez días. Este rango de edad de cultivo refleja el desarrollo más lento de las colonias procedentes de cuevas bajo cultivo a baja temperatura y se tuvo en cuenta al interpretar patrones de tinción ambiguos o periféricos. Los frotis se fijaron por calor, se tiñeron y se examinaron por microscopía óptica con inmersión en aceite a una magnificación total de $\times 1000$ para reacción de Gram, morfología celular, dimensiones celulares aproximadas y disposición celular. Cuando la biomasa disponible lo permitió, se realizaron al menos dos preparaciones de tinción independientes por aislado; cuando los resultados fueron inconsistentes, se examinaron preparaciones adicionales hasta poder establecer una asignación reproducible o hasta que la ambigüedad se registró formalmente. (ii) La prueba de la cuerda con KOH al 3 % se realizó como un ensayo confirmatorio independiente para la clasificación de Gram: el material colonial se suspendió en una gota de KOH al 3 % sobre un portaobjetos y se agitó continuamente durante 30 s, y la formación de una cuerda viscosa al levantar el asa de inoculación se interpretó como consistente con una envoltura celular Gram-negativa [59]. En los casos de discordancia entre la tinción de Gram y la prueba de la cuerda con KOH, la asignación consolidada se resolvió reteniendo la observación primaria de mayor confianza, mientras que ambos resultados sin procesar se registraron en el registro detallado de caracterización (Tabla S7). (iii) La actividad de catalasa se evaluó aplicando una gota de H_2O_2 al 3 % directamente sobre una pequeña cantidad de material colonial en un portaobjetos; una efervescencia vigorosa e inmediata se interpretó como un resultado positivo.

Tres aislados — E-MT10, D-MT04 y D-MT08 — se excluyeron del perfil fenotípico bacteriano consolidado. E-MT10 no arrojó información fiable de Gram, KOH o catalasa; D-MT04 produjo

material celular heterogéneo consistente con una preparación no resuelta o potencialmente mixta; y D-MT08 no arrojó células bacterianas visualizadas con confianza durante la revisión de la tinción de Gram y, por lo tanto, se trató como un morfotipo fúngico putativo para los propósitos de la caracterización poscultivo. Estas exclusiones se aplican únicamente a la capa de caracterización a nivel de aislado: los morfotipos coloniales correspondientes permanecen retenidos en el catálogo de morfotipos, en el *crosswalk* intersectorial y en la matriz comunitaria allí donde sean aplicables. Se intentó una tinción con lactofenol para morfotipos fúngicos putativos seleccionados, pero las preparaciones arrojaron material fragmentado sin estructuras fúngicas diagnósticas; estas colonias se retuvieron, por lo tanto, como morfotipos fúngicos putativos basados en la macromorfología colonial y no se asignaron como taxones fúngicos confirmados. Tras la caracterización, todos los aislados que alcanzaron pureza morfológica se criopreservaron a -80°C en glicerol al 30 % (v/v) preparado con agua autoclavada del arroyo cavernícola, sumándose a la colección de referencia establecida en el Experimento I.

2.6 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en R (v4.5.2) utilizando el ecosistema *tidyverse* para la gestión y la visualización de datos, *vegan* (v2.7-3) para los análisis a nivel de comunidad [60], *iNEXT* (v3.0.2) para la estimación de diversidad basada en rarefacción [61] y *effectsize* (v1.0.2) para el cálculo de tamaños de efecto estandarizados [62]. Los tamaños de efecto con intervalos de confianza del 95 % se tratan como la herramienta inferencial primaria, con los valores de p reportados como evidencia auxiliar [63]; en todas las pruebas se reportan los valores exactos.

Los valores de densidad cultivable se transformaron mediante $\log_{10}$ antes de todas las pruebas paramétricas. En ambos experimentos, los supuestos de normalidad (prueba de Shapiro–Wilk sobre los residuos del modelo) y de homocedasticidad (prueba de Levene) se evaluaron antes del análisis paramétrico. En el Experimento I, Shapiro–Wilk rechazó la normalidad ($p = 0,038$); la prueba de suma de rangos de Wilcoxon se trató, por tanto, como la prueba primaria, con la prueba t de Welch como corroboración. Como tamaño de efecto estandarizado se calculó la g de Hedges con intervalos de confianza del 95 %. En el Experimento II se cumplieron ambos supuestos (Shapiro–Wilk $p = 0,345$; Levene $p = 0,660$); el ANOVA de una vía fue la prueba primaria, con la prueba de Kruskal–Wallis como corroboración no paramétrica. Las comparaciones *post hoc* por pares utilizaron pruebas t de Welch con corrección de Benjamini–Hochberg; para los tres contrastes por pares se calculó la g de Hedges con intervalos de confianza del 95 %.

La diversidad alfa se caracterizó por réplica mediante la riqueza de morfotipos (conteo observado de códigos de morfotipos distintos en el Experimento I y de clústeres fenotípicos en el Experimento II), la entropía de Shannon (H') y el complemento de Simpson ($1 - D$). Las comparaciones entre sectores siguieron el mismo marco paramétrico–no paramétrico; para el complemento de Simpson en el Experimento II, donde los residuos no cumplieron el supuesto de normalidad (Shapiro–Wilk $p = 0,010$), la prueba de Kruskal–Wallis se trató como primaria.

La diversidad beta se evaluó mediante análisis multivariado de la matriz muestra-por-morfotipo de abundancias en el Experimento I y de la matriz muestra-por-clúster de abundancias en el Experimento II. La matriz del Experimento I comprendió doce muestras y catorce morfotipos; la matriz del Experimento II comprendió quince muestras y veintitrés clústeres fenotípicos operativos. Las matrices de abundancias se transformaron mediante la transformación de Hellinger antes de calcular las disimilitudes de Bray–Curtis, reduciendo el dominio de los morfotipos más abundantes a la vez que se conserva la información de las unidades fenotípicas más raras [57]. Las muestras se ordenaron por escalamiento multidimensional no métrico (NMDS; metaMDS, vegan). Las diferencias composicionales entre grupos se evaluaron con el análisis multivariado permutacional de la varianza (PERMANOVA; 999 permutaciones; `adonis2`, vegan) [64].

Dado que PERMANOVA es sensible a la heterogeneidad de la dispersión multivariada dentro de los grupos, cada PERMANOVA fue precedido por una prueba de permutación para la homogeneidad de la dispersión multivariada (`betadisper` y `permutest`, vegan) [58]. Donde `betadisper` fue no significativa, el resultado del PERMANOVA se interpretó principalmente como una separación composicional entre los centroides de los grupos. Donde `betadisper` fue significativa, el resultado se interpretó conservadoramente como potencialmente confundido por la heterogeneidad de la dispersión. Los contrastes PERMANOVA por pares del Experimento II se calcularon con corrección de Benjamini–Hochberg aplicada a los valores de p por permutación. El análisis SIMPER (`simper`, vegan) se utilizó únicamente como una herramienta descriptiva para identificar los clústeres fenotípicos que más contribuyen a la disimilitud entre sectores y no como evidencia inferencial.

Las métricas de control de calidad para el Experimento II se evaluaron en tres niveles. La concordancia de los conteos de colonias se evaluó comparando la suma de los conteos asignados a morfotipos con el conteo total de colonias registrado independientemente para cada placa. Donde ocurrieron discrepancias, el conteo de la suma por morfotipos se utilizó como el total de abundancia internamente consistente para los análisis comunitarios basados en morfotipos aguas abajo, mientras que el conteo total original se retuvo como un registro primario auditable. La concordancia entre réplicas técnicas se evaluó para los pares de placas producidos en la dilución 10^{-2} . El fondo del agua fresca cavernícola se evaluó por separado de la esterilidad del diluyente: el agua autoclavada del arroyo cavernícola utilizada como diluyente se sembró como control negativo, mientras que el agua fresca no autoclavada del arroyo cavernícola se sembró de manera independiente para estimar la carga cultivable asociada a la fuente de agua en sí (Tabla S6).

3 Resultados

3.1 Observaciones de campo y emergencia colonial

El muestreo a lo largo del Organal San Antonio reveló un patrón espacialmente estructurado de colonización superficial visible coherente con la zonación definida por la luz de la cueva

(Figura 3). En el sector de Entrada, las superficies rocosas hidratadas próximas a la zona de incidencia de luz externa mostraron tonos verdosos localizados, parches húmedos oscurecidos y colonización visible asociada a acumulaciones finas de sedimento y a zonas de contacto entre bloques. El sector de Transición se caracterizó por películas superficiales más conspicuas de tonos anaranjados y translucentes, frecuentemente de apariencia mucilaginosa y concentradas a lo largo de vías de infiltración entre bloques donde el agua llegaba visiblemente desde la superficie a través del sustrato suprayacente. El sector Oscuro, completamente afótico, presentó la colonización visible más escasa, con películas tenues pálidas y depósitos semejantes a costras restringidos a superficies persistentemente húmedas y sin la pigmentación verde o anaranjada observada en los sectores iluminados o semi-iluminados. En los tres sectores, la colonización superficial visible fue espacialmente discontinua y se concentró en microhábitats definidos por la intersección de humedad, retención de sedimento y rugosidad del sustrato, en lugar de estar distribuida uniformemente sobre las superficies rocosas. No se realizó ninguna caracterización taxonómica o química cuantitativa de estas características superficiales; se reportan como observaciones contextuales cualitativas.

La observación directa de montajes húmedos de sedimento fresco mediante microscopía óptica compuesta reveló frústulas de diatomeas, eucariotas unicelulares similares a ciliados y estructuras semejantes a quistes, principalmente en muestras del sector de Entrada (Figura 3a). Estas identificaciones visuales no se resolvieron a rangos taxonómicos inferiores y se utilizaron únicamente como contexto ecológico cualitativo. Indican que el microhábitat asociado al sedimento alberga un ensamble eucariota más amplio que la fracción cultivable bacteriana y fúngica putativa abordada por el flujo de trabajo de cultivo. El examen estereoscópico de fragmentos de roca mostró además una heterogeneidad visible en coloración y textura superficial entre sectores, incluyendo recubrimientos superficiales y depósitos minerales de apariencia distinta sobre los sustratos de los sectores de Transición y Oscuro. La naturaleza y la composición de estos depósitos no se caracterizaron con mayor detalle.

La incubación de suspensiones de sedimento sembradas sobre agar R2A diluido produjo colonias visibles dentro de la primera semana en ambos experimentos, con una emergencia colonial temprana especialmente evidente en el Experimento II hacia el día 4 aproximadamente y con el crecimiento contable más rico generalmente observado en diluciones intermedias. Los campos coloniales se hicieron progresivamente más interpretables a lo largo de la ventana de observación subsiguiente, lo que permitió tratar el conteo primario de colonias, el reconocimiento de morfotipos y la selección de aislados como pasos secuenciales en lugar de simultáneos. En el Experimento II, contado el día 7 bajo una temperatura que mimetiza la cavernícola, los ensambles cultivables ya eran visualmente distinguibles entre sectores a nivel de placa. Las placas de Entrada y Transición produjeron campos coloniales densos y fenotípicamente heterogéneos, dominados por colonias puntiformes transparentes y formas circulares color crema pálido, con tipos pigmentados ocasionales; las placas del sector Oscuro produjeron campos coloniales consistentemente más escasos en los que el mismo conjunto general de morfotipos operativos era reconocible, pero a una abundancia visiblemente reducida. Los morfotipos fúngicos putativos,

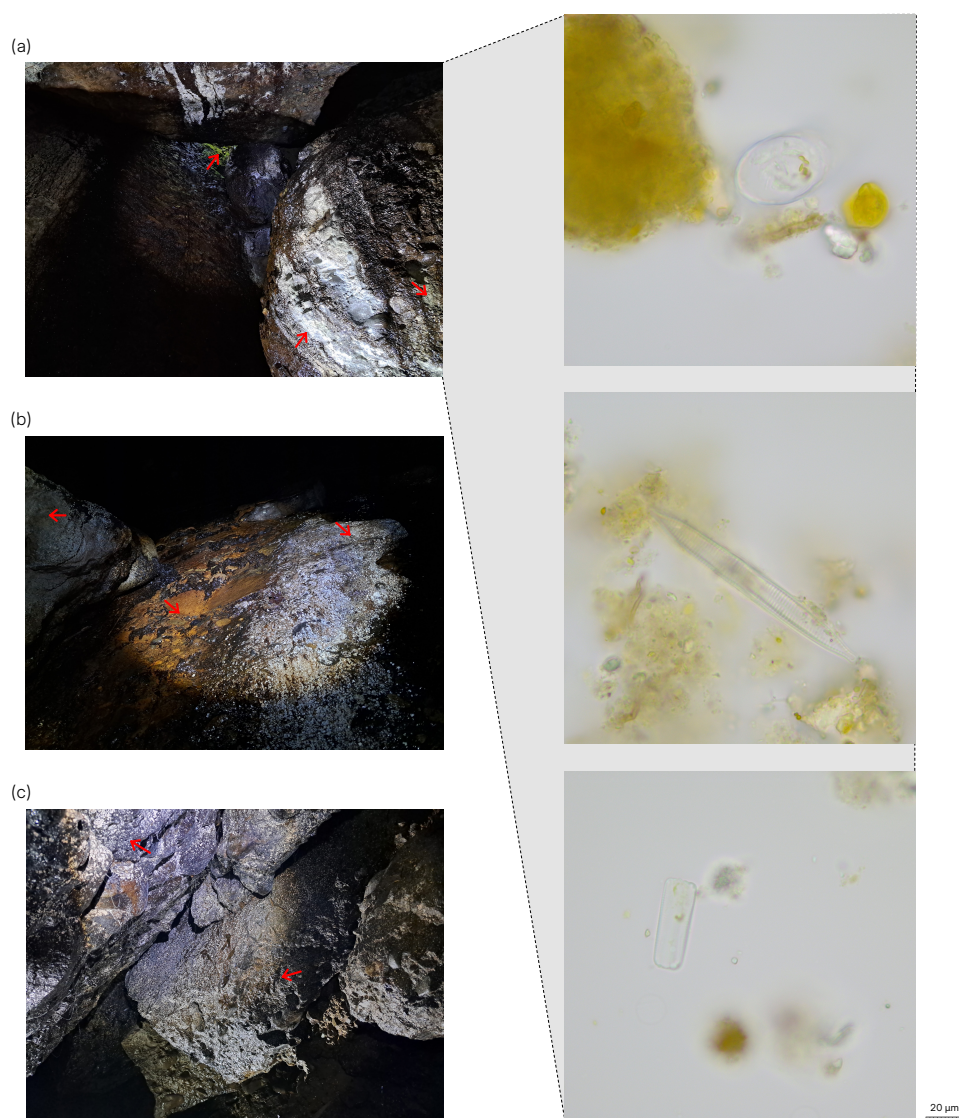


Figura 3. Microhábitats a escala de campo y microscopía de sedimento fresco a lo largo del gradiente cavernícola del Organal San Antonio. (a) Sector de Entrada, mostrando un corredor rocoso hidratado próximo a la zona de incidencia de luz externa; las flechas rojas indican superficies y zonas de contacto seleccionadas donde se observaron humedad, retención de sedimento y colonización localizada. Los paneles de microscopía asociados muestran montajes húmedos representativos de sedimento fresco de material del sector de Entrada observado con el microscopio óptico compuesto Leica, incluyendo un eucariota unicelular similar a un ciliado y frústulas de diatomeas reconocidas por inspección visual. **(b)** Sector de Transición, mostrando superficies húmedas de bloques con películas superficiales de tonos anaranjados y pálidos concentradas a lo largo de microhábitats asociados a infiltraciones. **(c)** Sector Oscuro, mostrando superficies rocosas afóticas con escasos recubrimientos pálidos o depósitos semejantes a costras restringidos a zonas persistentemente húmedas. Las observaciones microscópicas no se resolvieron a rangos taxonómicos inferiores, y las características a escala de campo indicadas por las flechas rojas se utilizaron únicamente como contexto ecológico cualitativo y no como puntos de muestreo cuantificados ni como insumos para la matriz comunitaria cultivable.

cuando estuvieron presentes, constituyeron el componente de crecimiento más lento del ensamble en cada sector y se mantuvieron como una fracción menor del conteo colonial total.

3.2 El catálogo de morfotipos

La clasificación por morfotipos coloniales produjo un vocabulario fenotípico estable para cada experimento. El Experimento I arrojó diecinueve morfotipos asignados globalmente (ORG-SA001 a ORG-SA019; Tabla S1), de los cuales catorce se detectaron en las doce placas analizadas para la estadística a nivel de comunidad; los cinco restantes aparecieron únicamente en placas no contables o excluidas y no se incluyeron en la matriz de abundancias del Experimento I.

El Experimento II produjo un catálogo de mayor resolución de cuarenta y dos códigos de morfotipos de sedimento específicos por zona distribuidos entre los tres sectores: quince en Entrada (incluyendo tres tipos fúngicos putativos), catorce en Transición (dos tipos fúngicos putativos) y trece en el sector Oscuro (un tipo fúngico putativo). Los catálogos completos específicos por zona se presentan en las Tablas S2–S4. Estos códigos se mapearon sobre un conjunto unificado de veintitrés clústeres fenotípicos operativos (CL01–CL23) mediante el *crosswalk* intersectorial descrito en la Sección 2.4 y detallado en la Tabla S5. El *crosswalk* comprendió siete clústeres intersectoriales tratados como bacterianos en la etapa del catálogo colonial (CL01–CL04, CL06–CL08), dos clústeres bacterianos compartidos por dos sectores (CL05, CL14), cuatro clústeres restringidos al sector de Entrada (CL11–CL13, CL23), tres clústeres restringidos al sector de Transición (CL09, CL10, CL19), cuatro clústeres restringidos al sector Oscuro (CL15–CL18) y tres clústeres fúngicos putativos (CL20–CL22). Los veintitrés clústeres se retuvieron en la matriz comunitaria utilizada para los análisis composicionales. La caracterización posterior a nivel de aislado no modificó el *crosswalk* ni la matriz comunitaria.

Los morfotipos del control de agua fresca cavernícola se codificaron por separado como C-MT01 a C-MT06 y no se incluyeron en la matriz comunitaria del sedimento. Su correspondencia con los clústeres fenotípicos asociados al sedimento se reporta en el *crosswalk* únicamente como información de fondo ambiental (Tablas S5 y S6).

3.3 Densidad cultivable a lo largo del gradiente definido por la luz

La densidad cultivable varió sustancialmente a lo largo de la zonación definida por la luz de la cueva en ambos experimentos. En el Experimento I, la densidad cultivable media fue mayor en la categoría Luz ($5,60 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de sedimento húmedo) que en la categoría Oscuridad ($2,69 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ de sedimento húmedo), correspondiente a una diferencia aproximada del doble en la escala lineal. La categoría Luz mostró una variabilidad sustancialmente mayor entre réplicas en la escala log₁₀ (SD = 0.382 frente a 0.058), un patrón atribuible en parte a una réplica de baja densidad (35 colonias) dentro del conjunto Luz. La prueba de Shapiro–Wilk rechazó la normalidad de los residuos ($W = 0,851$, $p = 0,038$), y la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon recibió, por lo tanto, prioridad interpretativa. Ni la prueba de Wilcoxon ($W = 30$, $p = 0,066$) ni la prueba t de Welch ($t = 2,015$, gl = 5,2, $p = 0,098$) alcanzaron significancia a $\alpha = 0,05$. El tamaño de efecto estandarizado fue grande (g de Hedges = 1,16; IC

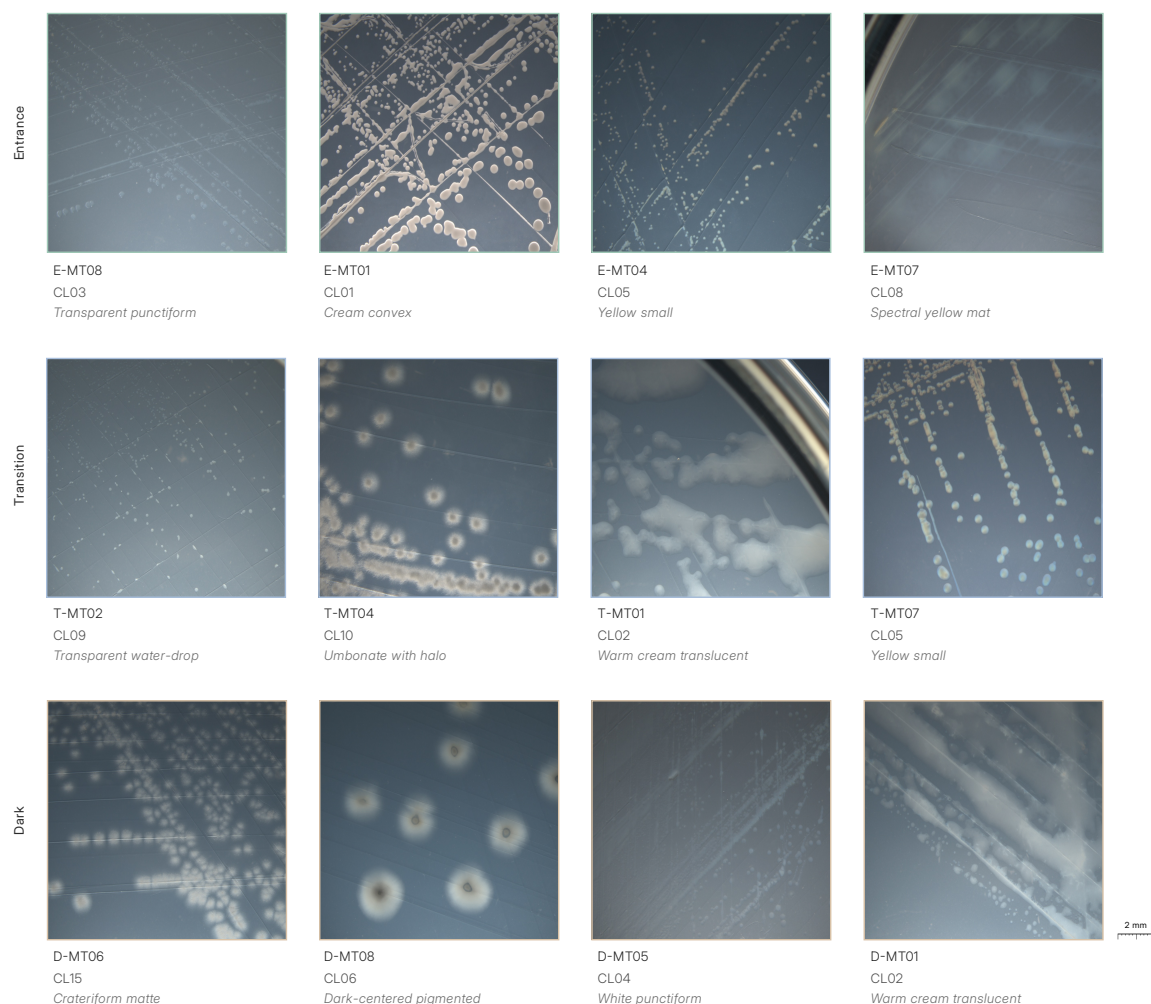


Figura 4. Morfotipos cultivables representativos recuperados del Organal San Antonio. Los paneles muestran morfotipos coloniales seleccionados de los sectores de Entrada, Transición y Oscuro, etiquetados con su código de morfotipo específico de sector y con su clúster fenotípico operativo final. La galería es representativa, no exhaustiva; los catálogos completos de morfotipos y el *crosswalk* fenotípico intersectorial se proporcionan en las Tablas S2–S4 y en la Tabla S5. Los paneles seleccionados ilustran fenotipos dominantes, compartidos, restringidos a la zona o visualmente diagnósticos utilizados para respaldar el análisis comunitario a nivel de morfotipo. Dado que las fotografías se adquirieron en distintas fechas de observación y bajo distintos ajustes de iluminación, las diferencias en brillo, contraste o intensidad aparente de color entre paneles no deben interpretarse como diferencias diagnósticas a menos que se describan explícitamente en el catálogo de morfotipos o en el *crosswalk*.

95 %: $-0,10$ a $2,38$), con un intervalo de confianza que cruza ligeramente el cero. La dirección de la diferencia fue consistente con una menor densidad cultivable en el interior afótico, pero el contraste no se resolvió estadísticamente con el tamaño de muestra de este experimento.

El Experimento II, conducido con normalización gravimétrica a nivel de alícuota y con resolución en tres sectores, recuperó un patrón más claro y precisamente estructurado. La densidad cultivable siguió un patrón escalonado entre sectores (Figura 5a; Tabla 2): los sectores de Entrada y Transición sostuvieron densidades estadísticamente indistinguibles de aproximadamente $5,1 \times 10^5$ y $5,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo, respectivamente, mientras que el sector Oscuro sostuvo aproximadamente $8,9 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo — una reducción aproximada de seis veces. El ANOVA de una vía confirmó un efecto significativo de sector ($F_{2,12} = 11,27$, $p = 0,0018$; $\eta^2 = 0,652$), corroborado por la prueba de Kruskal–Wallis ($H = 7,58$, $p = 0,0226$). Las comparaciones por pares *post hoc* (t de Welch, ajustadas por BH) mostraron que la Entrada y la Transición no diferían entre sí ($p = 0,829$; g de Hedges = $-0,144$; IC 95 %: $-1,381$ a $1,102$), mientras que ambas diferían del sector Oscuro (Entrada–Oscuro: $p = 0,0135$, $g = 2,707$, IC 95 % $[0,871, 4,467]$; Transición–Oscuro: $p = 0,0135$, $g = 2,224$, IC 95 % $[0,548, 3,824]$). Una réplica dentro del sector Oscuro (D-R1, $\log_{10} = 5,630$) produjo un valor de densidad dentro del rango de los sectores iluminados; esta réplica se conservó en todos los análisis reportados. El sector de Transición también mostró una variabilidad intrasector mayor que la Entrada (SD = 0.334 frente a 0.114 en la escala $\log_{10}$), lo que puede reflejar heterogeneidad microambiental entre posiciones de réplica a lo largo del corredor de Transición alimentado por infiltraciones, aunque esto sigue sin verificarse.

Cuadro 2. Densidad cultivable ($\log_{10}$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo) en los tres sectores del Experimento II ($n = 5$ por sector). Los valores utilizan normalización gravimétrica a nivel de alícuota basada en la masa estimada de sedimento húmedo de campo de la alícuota de 200 μ L utilizada para preparar la suspensión madre.

Sector	n	Media	SD	Mín	Máx
Entrada	5	5.712	0.114	5.563	5.826
Transición	5	5.748	0.334	5.217	6.059
Oscuro	5	4.951	0.381	4.758	5.630

A través de ambos experimentos, la dirección de la señal de densidad es consistente: la densidad cultivable fue menor en el interior afótico que en los sectores que reciben luz residual. El Experimento I detectó esta dirección como una señal de gran efecto que no se resolvió estadísticamente con el tamaño de muestra disponible; el Experimento II la resolvió como un contraste fuerte de densidad asociado al sector, en el que la identidad de sector explica aproximadamente el 65 % de la varianza en la densidad cultivable. La corrección gravimétrica a nivel de alícuota cambia la escala absoluta de UFC g⁻¹ pero no afecta al patrón relativo entre sectores ni a la estadística inferencial.

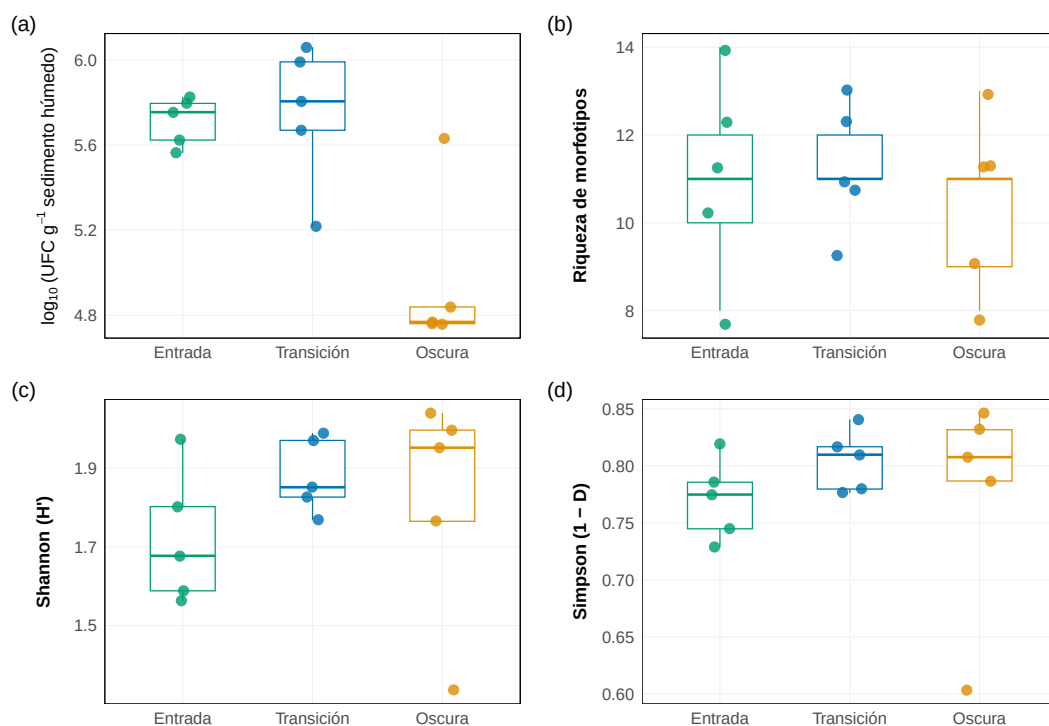


Figura 5. Densidad cultivable y diversidad local entre sectores cavernícolas definidos por la luz en el Experimento II. (a) $\log_{10}(\text{UFC g}^{-1}$ de sedimento húmedo de campo) en los tres sectores, calculada utilizando normalización gravimétrica a nivel de alícuota, con los valores individuales de cada réplica superpuestos sobre los diagramas de caja. ANOVA general: $F_{2,12} = 11,27$, $p = 0,0018$, $\eta^2 = 0,652$. (b) Riqueza de clústeres de morfotipos. (c) Diversidad de Shannon H' . (d) Complemento de Simpson $1 - D$. Ninguna métrica de diversidad local mostró una diferencia detectable a nivel de sector (todos los $p > 0,33$). El contraste entre el panel (a) y los paneles (b–d) visualiza la disociación entre la densidad cultivable y la diversidad local de clústeres de morfotipos.

3.4 La diversidad local de morfotipos no mostró diferencias detectables a nivel de sector

La diversidad local, cuantificada a la escala de las réplicas individuales, no mostró diferencias detectables entre sectores en ninguno de los dos experimentos. En el Experimento I, la riqueza de morfotipos, la diversidad de Shannon H' y el complemento de Simpson $1 - D$ fueron estadísticamente indistinguibles entre las categorías Luz y Oscuridad (riqueza: Welch $p = 0,134$, Wilcoxon $p = 0,111$; Shannon: Welch $p = 0,797$; Simpson: Welch $p = 0,292$). Las dos categorías sostuvieron números comparables de morfotipos con una equidad comparable.

En el Experimento II, el mismo patrón se mantuvo a lo largo de la resolución en tres sectores (Tabla 3; Figura 5b–d). Cada sector sostuvo aproximadamente 10–11 clústeres fenotípicos por réplica con una equidad comparable (Shannon H' entre 1.72 y 1.88). El ANOVA de una vía no reveló un efecto detectable de sector ni para la riqueza de clústeres de morfotipos ($F = 0,236$, $p = 0,793$; Kruskal–Wallis $H = 0,538$, $p = 0,764$) ni para la diversidad de Shannon ($F = 0,810$, $p = 0,468$; Kruskal–Wallis $H = 2,18$, $p = 0,336$). La prueba de Shapiro–Wilk rechazó la normalidad de los residuos del complemento de Simpson ($p = 0,0098$); la prueba de Kruskal–Wallis se trató, por lo tanto, como la prueba primaria para esta métrica y resultó igualmente no significativa ($H = 2,16$, $p = 0,340$). La ausencia de un efecto detectable a nivel de sector fue robusta a la inclusión o a la exclusión de los morfotipos fúngicos putativos.

Cuadro 3. Diversidad alfa de la comunidad cultivable entre sectores cavernícolas en el Experimento II (media $\pm$ SD; $n = 5$ por sector). N_{total} es el conteo medio efectivo de colonias por réplica utilizado en los cálculos de diversidad.

Sector	Riqueza observada	Shannon H'	Simpson $1 - D$	N_{total}
Entrada	11,0 $\pm$ 2,2	1,720 $\pm$ 0,169	0,771 $\pm$ 0,035	233 $\pm$ 69
Transición	11,2 $\pm$ 1,5	1,881 $\pm$ 0,095	0,805 $\pm$ 0,027	227 $\pm$ 87
Oscuro	10,4 $\pm$ 1,9	1,818 $\pm$ 0,289	0,775 $\pm$ 0,098	163 $\pm$ 28

Junto con los hallazgos de densidad, este resultado indica una disociación específica: los sectores difirieron sustancialmente en cuántas colonias se recuperaron por unidad de sedimento, pero no mostraron diferencias detectables en cuántos clústeres fenotípicos estuvieron representados dentro de una muestra. Por lo tanto, la densidad cultivable adicional recuperada en los sectores de Entrada y Transición no estuvo acompañada por un incremento correspondiente en la riqueza o la equidad locales de clústeres de morfotipos. Las curvas de rarefacción y de extrapolación basadas en el tamaño de muestra respaldaron esta interpretación al indicar que la riqueza de clústeres de morfotipos quedó razonablemente capturada en los conteos coloniales observados a lo largo de las réplicas del Experimento II (Figura S2).

3.5 Recambio composicional a lo largo del gradiente definido por la luz

El recambio composicional entre réplicas se analizó mediante disimilitudes de Bray–Curtis calculadas sobre matrices de abundancia transformadas mediante Hellinger. En el Experimento I, el PERMANOVA sobre la matriz de 12 muestras y 14 morfotipos detectó un efecto de categoría ($R^2 = 0,227$, $F = 2,94$, $p = 0,021$). La prueba de betadisper, sin embargo, fue también significativa ($F = 5,39$, p por permutación = 0,021), lo que indica que la categoría Luz fue sustancialmente más

heterogénea en el espacio multivariado que la categoría Oscuridad (disimilitud media de Bray–Curtis dentro de categoría: 0.352 frente a 0.114). Bajo estas condiciones, la señal composicional no puede atribuirse limpiamente al solo desplazamiento de centroides; probablemente refleja una combinación de diferenciación composicional y dispersión diferencial dentro de la categoría. El análisis SIMPER identificó cinco morfotipos que dan cuenta del 73 % de la disimilitud entre categorías, todos más abundantes en la categoría Luz (ORG-SA019: 15.5 %; ORG-SA001: 9.6 %; ORG-SA015: 7.2 %; ORG-SA009: 7.0 %; ORG-SA002: 5.5 %). El patrón dominante fue una reducción cuantitativa — los mismos morfotipos a abundancia sistemáticamente menor en la Oscuridad — más que un reemplazo cualitativo. Las Figuras S3 y S4 presentan los resultados estadísticos del Experimento I.

El Experimento II, realizado sobre la matriz de 15 muestras y 23 clústeres derivada del *crosswalk* fenotípico intersectorial final, resolvió la estructura composicional con mayor claridad estadística. PERMANOVA detectó un efecto fuerte de sector ($R^2 = 0,573$, $F = 8,06$, $p = 0,001$; Figura 6a; Tabla 4), con los tres contrastes por pares manteniéndose significativos tras la corrección de Benjamini–Hochberg (Entrada–Transición: $R^2 = 0,509$, $p_{\text{adj}} = 0,016$; Entrada–Oscuro: $R^2 = 0,539$, $p_{\text{adj}} = 0,016$; Transición–Oscuro: $R^2 = 0,466$, $p_{\text{adj}} = 0,016$; los valores ajustados empatados reflejan el piso conjunto impuesto por 999 permutaciones y por la corrección BH de tres vías). Betadisper fue no significativa (p por permutación = 0,334; ANOVA $p = 0,319$), lo que indica que el efecto de sector no se explica por la dispersión diferencial dentro del sector. La ordenación NMDS (estrés = 0,092) recuperó agrupamientos por sector visualmente separados en el espacio de clústeres fenotípicos.

Cuadro 4. Resultados de PERMANOVA y de betadisper para la composición de la comunidad cultivable en el Experimento II (*crosswalk* de 23 clústeres; Bray–Curtis sobre datos transformados por Hellinger; 999 permutaciones). Se reportan los valores de p por permutación; el p del ANOVA se proporciona para betadisper como evidencia suplementaria.

PERMANOVA					
Término	gl	Suma de cuadr.	R^2	F	p
Sector	2	0.787	0.573	8.06	0.001
Residual	12	0.586	0.427		
Total	14	1.373	1.000		
Betadisper					
Prueba	F		p		
ANOVA	1.257		0.319		
Permutación	1.257		0.334		

Siete clústeres fenotípicos intersectoriales tratados como bacterianos en la etapa del catálogo colonial (CL01–CL04, CL06–CL08) se detectaron en los tres sectores de sedimento, constituyendo un núcleo cultivable compartido cuyas abundancias variaron cuantitativamente a lo largo del gradiente. CL03 (puntiforme transparente), el clúster más abundante en general, declinó en el conteo medio por réplica desde 75.6 en la Entrada hasta 52.2 en la Transición y 36.0 en el sector Oscuro, siguiendo el patrón general de densidad (Figura 6c). Ningún clúster intersectorial estuvo

ausente de ningún sector de sedimento, lo que indica que este núcleo fenotípico compartido persistió a lo largo de toda la cueva bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

Superpuestos a este núcleo compartido, cada sector contuvo clústeres fenotípicos restringidos a la zona y ausentes de los sectores adyacentes. El sector de Entrada contuvo cuatro clústeres restringidos (CL11–CL13, CL23) a abundancia global baja, aportando aproximadamente el 5.6 % de la comunidad de la Entrada. El sector Oscuro contuvo cuatro clústeres restringidos (CL15–CL18) a abundancia moderada, aportando aproximadamente el 22.4 % de la comunidad del sector Oscuro. El sector de Transición contuvo tres clústeres restringidos (CL09, CL10, CL19) a abundancia sustancial, aportando en conjunto aproximadamente el 26.9 % de la comunidad de la Transición. CL09 (media de 31.6 colonias por réplica) y CL10 (media de 22.8) dieron cuenta en conjunto de aproximadamente el 24 % de todos los individuos recuperados del sector de Transición y estuvieron ausentes tanto de la Entrada como del sector Oscuro.

El análisis SIMPER identificó contribuciones distintas a cada comparación por pares y se trata aquí como evidencia descriptiva más que inferencial. El contraste Entrada–Oscuro estuvo impulsado principalmente por reducciones de abundancia en clústeres compartidos: CL03 (9.7 %, $p = 0,033$) y CL04 (9.4 %, $p = 0,059$) fueron los dos contribuyentes principales por reducción cuantitativa, con el clúster CL15 restringido al sector Oscuro aportando un 7.2 % ($p = 0,009$) por recambio cualitativo. El contraste Transición–Oscuro estuvo impulsado por reemplazo recíproco de clústeres restringidos a la zona: CL15 (restringido al sector Oscuro, 7.5 %, $p = 0,002$) y CL09 (restringido a la Transición, 7.4 %, $p = 0,001$) fueron los contribuyentes principales. El contraste Entrada–Transición estuvo dominado por desplazamientos de abundancia en clústeres compartidos (CL04: 8.3 %, $p = 0,178$; CL03: 7.5 %, $p = 0,540$; CL02: 6.6 %, $p = 0,185$), junto con la contribución del clúster CL09 restringido a la Transición (6.4 %, $p = 0,006$) y del clúster CL07 enriquecido en la Transición (4.8 %, $p = 0,037$).

A través de ambos experimentos, el recambio composicional fue detectado, pero se resolvió con distintos grados de claridad analítica. El Experimento I proporcionó una señal binaria exploratoria cuya interpretación está limitada por una heterogeneidad de dispersión significativa. El Experimento II resolvió la señal composicional como un recambio asociado al sector en la matriz de 23 clústeres, con la identidad de sector dando cuenta de más de la mitad de la varianza. El sector de Transición no fue simplemente una mezcla composicional intermedia entre la Entrada y el sector Oscuro; sostuvo su propio conjunto característico de clústeres fenotípicos restringidos a la zona a una abundancia sustancial.

3.6 Caracterización fenotípica de aislados representativos

Veintitrés aislados del Experimento II — ocho de la Entrada, seis de la Transición, siete del sector Oscuro y dos controles de agua fresca cavernícola — fueron sometidos a una caracterización fenotípica preliminar mediante tinción de Gram, prueba de la cuerda con KOH al 3 %, ensayo de catalasa y microscopía óptica. El resumen del texto principal reporta los perfiles consolidados de los aislados derivados del sedimento retenidos en el perfil fenotípico bacteriano (Tabla 5), mientras que el registro completo por prueba, incluyendo los controles de agua fresca cavernícola,

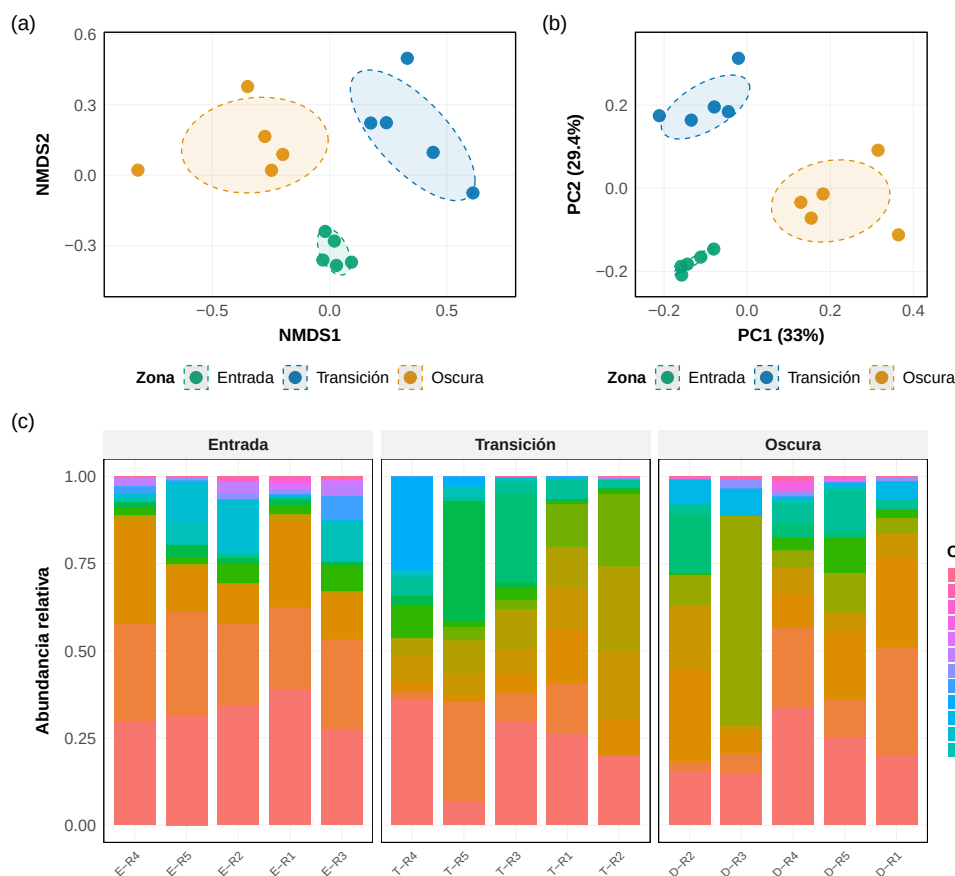


Figura 6. Estructura composicional de la comunidad cultivable en el Experimento II (*crosswalk* de 23 clústeres). (a) Ordenación NMDS de quince muestras en el espacio de clústeres fenotípicos utilizando abundancias transformadas por Hellinger y disimilitud de Bray–Curtis (estrés = 0,092). Los puntos están coloreados por sector; las elipses representan regiones de confianza del 68 % alrededor de los centroides de sector. PERMANOVA: $R^2 = 0,573$, $F = 8,06$, $p = 0,001$; betadisper, p por permutación = 0,334. (b) Ordenación PCoA de la misma matriz de disimilitud. (c) Abundancia relativa de los veintitrés clústeres fenotípicos operativos por réplica, agrupados por sector. Los clústeres restringidos a la zona se distinguen visualmente; el sector de Transición lleva tres clústeres restringidos (CL09, CL10, CL19) a una abundancia colectiva sustancial (~27 % de la comunidad de la Transición).

los resultados sin procesar de KOH, los niveles de confianza y las notas de caracterización, se proporciona en la Tabla S7. Tres aislados de sedimento no se incluyeron en el perfil fenotípico bacteriano consolidado: E-MT10, para el cual no se obtuvo información fiable de Gram, KOH o catalasa; D-MT04, que produjo material celular heterogéneo consistente con una preparación no resuelta o potencialmente mixta; y D-MT08, para el cual no pudieron visualizarse con confianza células bacterianas y que, por lo tanto, se trató como un morfotipo fúngico putativo para los propósitos de la caracterización poscultivo. Estas exclusiones se aplican únicamente a la capa de caracterización a nivel de aislado; los morfotipos coloniales correspondientes permanecen retenidos en el catálogo de morfotipos, en el *crosswalk* y en la matriz comunitaria allí donde sean aplicables.

Entre los aislados que arrojaron resultados interpretables a lo largo de la batería de caracterización, las morfologías celulares en forma de bacilo o de bacilo corto predominaron en los tres sectores. Las dimensiones celulares variaron desde células bacilares pequeñas por debajo de aproximadamente 1 μm (E-MT04, D-MT05) hasta bacilos mayores que excedían las 3 μm (E-MT08), con formas cocobacilares o de bacilo corto observadas en E-MT01, E-MT09, T-MT01, T-MT07, D-MT01 y D-MT03. Estos descriptores de forma se utilizan aquí como descripciones microscópicas conservadoras y no como designaciones taxonómicas. Dos aislados presentaron disposiciones celulares que pueden resultar útiles para una resolución taxonómica posterior: E-MT05, un coco Gram-positivo observado consistentemente en tétradas mayores de 1 μm de diámetro, y D-MT06, un tipo celular bacilar cuadrado Gram-positivo dispuesto en tétradas a modo de ladrillo de aproximadamente 1 μm por célula. Varios aislados mostraron características internas o de tinción de interés potencial bajo microscopía con inmersión en aceite, incluyendo cuerpos refráctiles centrales en E-MT04, T-MT07 y un aislado de control, y patrones de tinción periférica o asociada a la superficie en algunos aislados mucoides.

Los resultados de la tinción de Gram y de la prueba de la cuerda con KOH mostraron un patrón mixto de concordancia y discordancia entre el conjunto de aislados caracterizados. En este estudio, la formación de cuerda en KOH se interpretó como compatible con una envoltura celular Gram-negativa, mientras que la ausencia de formación de cuerda se interpretó como compatible con un perfil Gram-positivo. Los casos concordantes se trataron como asignaciones de mayor confianza, mientras que los casos discordantes se resolvieron reteniendo la observación primaria de mayor confianza, conservando ambos resultados sin procesar en el registro detallado de caracterización (Tabla S7). Varios aislados produjeron asignaciones tentativas o de baja confianza, particularmente entre los morfotipos mucoides o de desarrollo lento, y tres aislados no fueron evaluables para la caracterización bacteriana consolidada. Por esta razón, los resultados de Gram se interpretan como información descriptiva a nivel de aislado y no como evidencia de diferencias a nivel de sector en el fenotipo de la pared celular.

Se detectó actividad de catalasa en la mayoría de los aislados caracterizados. Una excepción notable fue el clúster fenotípico CL03 — el clúster más abundante del conjunto de datos y un morfotipo dominante o codominante en los tres sectores. Los tres miembros caracterizados de CL03 (E-MT08, T-MT12, D-MT12) fueron catalasa-negativos, una propiedad fenotípica

compartida que persistió entre sectores a pesar de la heterogeneidad a nivel de Gram: E-MT08 se asignó como Gram-positivo, mientras que T-MT12 y D-MT12 se asignaron como Gram-negativos con menor confianza. Otros dos clústeres intersectoriales mostraron heterogeneidad o incertidumbre a nivel de Gram a la vez que conservaron coherencia en catalasa. CL02 (E-MT02 G⁺; T-MT01 G⁻; D-MT01 G⁺ tentativo; todos catalasa-positivos) combinó una discordancia de alta confianza entre los representantes de la Entrada y la Transición con una asignación tentativa para el sector Oscuro. CL07 (E-MT09 G⁻ de baja confianza; T-MT09 ambiguo/G⁻ retenido con cautela; D-MT03 G⁺ tentativo; todos catalasa-positivos) debe interpretarse con mayor cautela, porque varias asignaciones implican características de baja confianza o asociadas a la superficie. En este clúster, la aparente heterogeneidad Gram puede reflejar diferencias celulares reales, efectos de la edad del cultivo, artefactos de tinción o convergencia fenotípica entre morfotipos a nivel colonial.

Dentro del sector Oscuro, los morfotipos mucoides macroscópicos D-MT01 (CL02) y D-MT03 (CL07) produjeron morfologías coloniales visualmente convergentes durante el subcultivo y perfiles microscópicos y bioquímicos parcialmente similares, pese a pertenecer a clústeres fenotípicos distintos en el *crosswalk* primario a nivel colonial. Esta convergencia no indica que los dos morfotipos representen la misma entidad biológica. La evaluación primaria en placa los asignó como unidades distintas sobre la base de rasgos a nivel colonial observados durante la evaluación comunitaria, y la matriz comunitaria preserva esa asignación. Su similitud posterior durante el subcultivo se interpreta, por lo tanto, como una observación a nivel de caracterización, que potencialmente refleja plasticidad fenotípica, efectos de la edad del cultivo o convergencia entre aislados ambientales mucoides.

La caracterización restringe las posibilidades fenotípicas de los aislados seleccionados y establece un punto de referencia para la identificación molecular futura de la colección criopreservada. La heterogeneidad y la incertidumbre a nivel de Gram observadas dentro de varios clústeres fenotípicos intersectoriales — en especial CL02, CL03 y CL07 — indican que el *crosswalk* de 23 clústeres puede agrupar organismos celularmente distintos o ambiguamente resueltos bajo categorías fenotípicas compartidas a nivel colonial. Este resultado no invalida el *crosswalk*, porque el *crosswalk* se construyó a partir de rasgos macroscópicos coloniales antes de la caracterización celular y se utilizó únicamente como un marco operativo para la comparación a nivel de comunidad. Más bien, la caracterización confirma que la resolución a nivel de clúster de morfotipos es más gruesa que la resolución taxonómica o celular y que la diversidad biológica real es necesariamente subestimada por la sola morfología colonial.

Un caso final ilustra la separación entre la matriz comunitaria a nivel de morfotipo y la caracterización posterior a nivel de aislado. CL06 se retuvo sin cambios como un clúster fenotípico pigmentado con centro oscuro en la matriz comunitaria intersectorial porque su asignación se basó en rasgos a nivel colonial evaluados durante el análisis primario de morfotipos. Sin embargo, su representante del sector Oscuro, D-MT08, no pudo caracterizarse con confianza como bacteriano durante la revisión de la tinción de Gram: las células bacterianas no se visualizaron de manera fiable, y una preparación temprana en cultivo fresco mostró elementos filamentosos

Cuadro 5. Caracterización fenotípica consolidada de aislados representativos derivados del sedimento en el Experimento II. Las asignaciones de Gram resumen la interpretación final tras la repetición de la tinción y la comparación con la prueba de la cuerda con KOH; los resultados sin procesar, los niveles de confianza y los aislados del control de agua fresca cavernícola se reportan en la Tabla S7. Tent.: asignación tentativa; baja conf.: asignación de baja confianza. Los descriptores de forma son descripciones microscópicas y no deben interpretarse como designaciones taxonómicas.

Código	Sector	Gram	Morfología celular	Catalasa	Notas
E-MT01	E	G+ (tent.)	Cocobacilar, 1–2 μm	–	Tinción tenue
E-MT02	E	G+	Células bacilares, 1.5–4 μm	+	CL02
E-MT04	E	G [–]	Células bacilares pequeñas, <1–2 μm	+	CL05; cuerpo refráctil
E-MT05	E	G+	Cocos en tétradas, >1 μm	+	CL04; diagnóstico
E-MT07	E	G [–]	Células bacilares delgadas, 2–3 μm	–	CL08
E-MT08	E	G+	Células bacilares, >3 μm	–	CL03
E-MT09	E	G [–] (baja conf.)	Bacilares a cocobacilares, variable	+	CL07; mucoide
T-MT01	T	G [–]	Células muy pequeñas bacilares/cocobacilares	+	CL02
T-MT02	T	G+	Células bacilares	–	CL09; tinción posterior exitosa
T-MT04	T	G+	Células bacilares gruesas, 1–2 μm ; cadenas	+	CL10; división activa
T-MT07	T	G [–]	Células cocobacilares, ~1 μm	+	CL05; cuerpo refráctil
T-MT09	T	Ambig./G [–] retenido	Células bacilares a cocobacilares, 1.5–3 μm	+	CL07; tinción periférica
T-MT12	T	G [–]	Células bacilares, 2–3 μm	–	CL03
D-MT01	D	G+ (tent.)	Células bacilares a cocobacilares, 1–2 μm	+	CL02; tinción periférica
D-MT03	D	G+ (tent.)	Células bacilares a cocobacilares, ~1 μm	+	CL07; mucoide
D-MT05	D	G [–]	Células bacilares pequeñas, ~1 μm	–	CL04; tinción revisada
D-MT06	D	G+	Células bacilares cuadradas, $\leq 1 \mu\text{m}$; tétradas a modo de ladrillo	+	CL15; diagnóstico
D-MT12	D	G [–]	Células bacilares, ~1 μm	–	CL03

sin estructuras fúngicas diagnósticas. Por lo tanto, D-MT08 se trató como un morfotipo fúngico putativo en la capa de caracterización. Esta reasignación afecta únicamente a la interpretación del aislado representativo y no altera los conteos coloniales originales, el *crosswalk*, ni ningún análisis comunitario aguas abajo.

4 Discusión

Este estudio establece, hasta donde tengo conocimiento, la primera línea base cultivable espacialmente resuelta para una cueva volcániclastica tropical de tipo organal y muestra que la zonación definida por la luz del Organal San Antonio está asociada con diferencias medibles en la fracción microbiana recuperable en R2A. Se evaluaron tres firmas cuantitativas: la densidad cultivable, la diversidad local de clústeres de morfotipos y la composición comunitaria a nivel de morfotipo. Los resultados convergen en una interpretación específica y acotada: el interior afótico sostuvo una menor densidad cultivable que los sectores iluminados, la riqueza y la equidad locales de clústeres de morfotipos no mostraron diferencias detectables a nivel de sector, y la composición comunitaria se particionó fuertemente con la zonación cavernícola. Estos patrones son consistentes con el filtrado ambiental a lo largo del gradiente entrada-interior, pero no aíslan la luz como el único motor causal. Más bien, la zonación definida por la luz en esta cueva integra varias características covariantes — la distancia desde la entrada, la conectividad superficial, la humedad del sedimento, las infiltraciones, el aporte orgánico, la heterogeneidad del sustrato, el pH y posiblemente la química mineral — que en conjunto definen el contexto ecológico en el que se recuperó la fracción cultivable.

La densidad cultivable siguió un patrón escalonado a lo largo del gradiente definido por la luz, más que un descenso lineal gradual. En el Experimento II, los sectores de Entrada y Transición sostuvieron densidades estadísticamente indistinguibles de aproximadamente $5,1\text{--}5,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo, mientras que el sector Oscuro, completamente afótico, sostuvo aproximadamente $8,9 \times 10^4$ UFC g⁻¹ de sedimento húmedo de campo, lo que corresponde a una reducción aproximada de seis veces y a un gran efecto de sector ($\eta^2 = 0,652$). Estos valores se basan en una normalización gravimétrica a nivel de alícuota utilizando la masa estimada de sedimento húmedo de campo de la alícuota empleada para preparar la suspensión madre. Este patrón fue direccionalmente consistente con el Experimento I, donde la densidad cultivable fue mayor en los sedimentos iluminados que en los afóticos por un margen comparable, aunque el contraste no se resolvió estadísticamente con el tamaño de muestra disponible (g de Hedges = 1,16; con un intervalo de confianza del 95 % que cruza el cero). Los dos experimentos respaldan, por lo tanto, la misma interpretación direccional, pero difieren en fuerza inferencial: el Experimento I proporciona un apoyo exploratorio, mientras que el Experimento II proporciona la prueba primaria en tres sectores. Dado que el Experimento I se incubó a aproximadamente 20 °C bajo condiciones ambientales de laboratorio — la cámara de enfriamiento que mimetiza las condiciones cavernícolas aún no estaba disponible en esa etapa —, los valores absolutos de

UFC no son directamente comparables entre experimentos; solo la dirección del contraste de densidad es informativa entre ellos.

El patrón escalonado de densidad es ecológicamente informativo porque el descenso ocurre únicamente en el interior completamente afótico, mientras que los sectores de Entrada y Transición permanecen comparables en densidad cultivable. Una interpretación plausible es que la luz residual, el acoplamiento atmosférico con el exterior y el aporte mediado por infiltraciones en los sectores iluminado y de penumbra mantienen una fracción heterótrofa recuperable mayor que la sostenida en el interior más profundo. Esta interpretación es consistente con la organización entrada-interior descrita en la ecología de cuevas [16, 17] y con el hallazgo de Lavoie y colaboradores de que la conectividad superficial puede ser un predictor importante de la estructura de la comunidad microbiana en cuevas de lava [23]. Sin embargo, el presente estudio no midió la radiación fotosintéticamente activa, el carbono orgánico disuelto, la humedad del sedimento ni las tasas de aporte geoquímico. El contraste de densidad debe interpretarse, por lo tanto, como un patrón asociado al sector dentro de un gradiente cavernícola definido por la luz, y no como evidencia directa de que la disponibilidad de luz por sí sola determina la densidad cultivable.

Varias características del Organal San Antonio pueden haber contribuido a la magnitud del patrón de densidad. La geometría de una cueva por acumulación de bloques de tipo organal produce una transición abrupta de condiciones semi-iluminadas a afóticas, gobernada por la geometría de empaquetamiento de grandes bloques volcánoclasticos más que por una atenuación gradual a través de una larga galería abierta. La distancia entre los sectores de Entrada y Transición es de aproximadamente 30 m, y el sector Oscuro se sitúa a más de 80 m de la entrada, creando un gradiente espacial comprimido a lo largo del cual los cambios en luz, flujo de aire, infiltraciones y condiciones del sustrato ocurren en distancias cortas. El contexto montano tropical mantiene, además, temperaturas bajas estables y alta humedad relativa dentro de la cueva, lo que potencialmente reduce el ruido temporal y permite detectar los contrastes espaciales a pequeña escala. Al mismo tiempo, las diferencias entre sectores en acumulación de sedimento, retención de materia orgánica, superficie del sustrato y aporte de agua cavernícola permanecen como covariables no medidas. Estos factores podrían contribuir al patrón de densidad observado de manera independiente de, o en interacción con, la zonación definida por la luz.

La ausencia de diferencias detectables a nivel de sector en la diversidad local de clústeres de morfotipos es tan importante como el patrón de densidad. En el Experimento II, la riqueza de clústeres de morfotipos, la diversidad de Shannon y el complemento de Simpson se mantuvieron estadísticamente sin resolver entre sectores (todos los $p > 0,33$), y el mismo patrón general se observó en el Experimento I. Junto con el resultado de densidad, esto produce una disociación específica: el sector Oscuro arrojó menos colonias por unidad de sedimento húmedo de campo, pero no menos clústeres fenotípicos locales por réplica bajo las condiciones de cultivo utilizadas. La densidad cultivable adicional recuperada en los sectores de Entrada y Transición no estuvo acompañada, por lo tanto, por un aumento paralelo en la riqueza o en la equidad locales de clústeres de morfotipos.

Este resultado debe interpretarse a la resolución biológica correcta. La riqueza de morfotipos no es la riqueza de especies, y la invariancia reportada aquí opera a la escala del fenotipo a nivel colonial, no a la escala de los linajes, las cepas o los genes funcionales. Dos aislados que produzcan morfologías coloniales similares pueden pertenecer a especies diferentes [46], mientras que organismos estrechamente relacionados pueden generar fenotipos coloniales distinguibles bajo distintos estados fisiológicos o condiciones microambientales [45]. Lo que los datos muestran es que la identidad de sector no redujo detectablemente el número o la equidad locales de los fenotipos coloniales operativos recuperados en R2A al 25 %. Si el mismo patrón se mantiene a la resolución del gen del ARNr 16S, del genoma o de los genes funcionales sigue sin resolverse y requerirá la identificación molecular de los aislados criopreservados y el perfilamiento independiente de cultivo de la comunidad del sedimento.

La señal más fuerte recuperada por este estudio fue la partición composicional de la fracción cultivable entre los tres sectores. El PERMANOVA sobre la matriz de 23 clústeres transformada por Hellinger arrojó $R^2 = 0,573$ ($F = 8,06$, $p = 0,001$), con todos los contrastes por pares significativos tras la corrección y con una dispersión multivariada no significativa (betadisper, p por permutación = 0,334). El resultado de betadisper es crítico porque respalda la interpretación del PERMANOVA del Experimento II como una separación de centroides asociada al sector y no como un artefacto de heterogeneidad desigual intrasector. Esto resuelve la ambigüedad principal del Experimento I, donde el PERMANOVA fue significativo pero betadisper también lo fue ($p = 0,021$), lo que obligó a una interpretación conservadora de la señal composicional piloto.

El patrón composicional tuvo dos componentes. Primero, siete clústeres fenotípicos intersectoriales presentes en los tres sectores de sedimento y tratados como bacterianos en la etapa del catálogo colonial (CL01–CL04, CL06–CL08) se detectaron a lo largo de toda la cueva, formando un núcleo cultivable compartido que persistió bajo las condiciones de incubación utilizadas. Varios de estos clústeres compartidos cambiaron cuantitativamente a lo largo del gradiente; por ejemplo, CL03, el clúster puntiforme transparente y el clúster más abundante en general, descendió en el conteo medio de Entrada a Transición y a Oscuro. Segundo, este núcleo compartido estuvo superpuesto a clústeres fenotípicos restringidos a la zona. El sector de Entrada contuvo cuatro clústeres restringidos a una abundancia colectiva baja; el sector Oscuro contuvo cuatro clústeres restringidos que aportaban aproximadamente el 22 % de su comunidad; y el sector de Transición contuvo tres clústeres restringidos que aportaban aproximadamente el 27 % de su comunidad. El patrón resultante no es simplemente una pérdida de morfotipos con la profundidad cavernícola, sino una reorganización de la composición de clústeres fenotípicos entre sectores.

El sector de Transición no se describe bien, por lo tanto, como un intermedio pasivo entre la Entrada y el sector Oscuro. Tres clústeres restringidos al sector de Transición (CL09, CL10, CL19) se recuperaron a abundancia sustancial y estuvieron ausentes de ambos sectores adyacentes. Este patrón sugiere que el sector de Transición puede proporcionar una combinación distintiva de condiciones — luz fuertemente atenuada, humedad sostenida, infiltraciones desde el sustrato suprayacente y conectividad superficial intermedia — que soporta fenotipos no recuperados

en otras partes de la cueva. Esta interpretación sigue siendo hipotética porque el estudio no cuantificó las concentraciones de nutrientes, la química del agua ni la intensidad de la luz a la escala de réplica. CL09, en particular, debe interpretarse con cautela porque presenta una confianza baja en el *crosswalk* a causa de la similitud fenotípica con el ubicuo CL03; la distintividad ecológica del sector de Transición se apoya con mayor seguridad en CL10 y CL19, ambos asignados con mayor confianza y que en conjunto aportan aproximadamente el 24 % de la comunidad de la Transición. La identificación molecular de los aislados correspondientes a los tres clústeres restringidos al sector de Transición será necesaria para determinar si representan entidades biológicas distintas o casos de convergencia entre morfotipos.

Los resultados de SIMPER respaldan esta interpretación de manera descriptiva, no inferencial. El contraste Entrada–Oscuro estuvo impulsado principalmente por reducciones cuantitativas en clústeres compartidos, especialmente CL03 y CL04, junto con la contribución del clúster CL15 restringido al sector Oscuro. El contraste Transición–Oscuro estuvo impulsado por reemplazo recíproco entre el CL15 restringido al sector Oscuro y el CL09 restringido a la Transición. El contraste Entrada–Transición estuvo dominado por desplazamientos de abundancia en clústeres compartidos, junto con contribuciones de CL09 y CL07 asociados a la Transición. Estos patrones son útiles para identificar qué clústeres fenotípicos dan cuenta de la disimilitud, pero SIMPER no pone a prueba un mecanismo ecológico. El resultado inferencial más fuerte sigue siendo la combinación del PERMANOVA, el betadisper no significativo y la distribución observada de clústeres compartidos y restringidos a la zona.

La caracterización fenotípica preliminar de aislados representativos añade una capa celular al análisis a nivel colonial. Las morfologías en forma de bacilo o de bacilo corto predominaron entre sectores, con varias disposiciones celulares distintivas, incluidos cocos en tétradas en E-MT05 y células bacilares cuadradas en tétradas a modo de ladrillo en D-MT06. Las estructuras refractiles internas observadas en E-MT04, T-MT07 y un aislado de control pueden proporcionar restricciones útiles para una identificación taxonómica futura, aunque no pueden interpretarse taxonómicamente sin confirmación molecular o fisiológica. La caracterización reveló heterogeneidad e incertidumbre a nivel de Gram entre varios clústeres intersectoriales. CL03 contuvo un representante Gram-positivo en la Entrada (E-MT08) y representantes Gram-negativos en la Transición y en el sector Oscuro (T-MT12, D-MT12), todos catalasa-negativos — una característica uniforme que persistió pese a la heterogeneidad a nivel de Gram. CL02 mostró heterogeneidad Gram entre sus representantes caracterizados, con una lectura tentativa para el sector Oscuro. CL07 debe interpretarse con mayor cautela: E-MT09 y T-MT09 se retuvieron como asignaciones Gram de baja confianza o ambiguas, y T-MT09 en particular mostró tinción púrpura periférica con coloración interna débil, lo que sugiere que la edad del cultivo, los artefactos de tinción, las propiedades de la superficie celular o el estado fisiológico pudieron contribuir a la ambigüedad. Estas observaciones se obtuvieron a partir de representantes seleccionados, no de todas las colonias dentro de cada clúster, y no deben leerse como asignaciones celulares o taxonómicas definitivas. Más bien, restringen las posibilidades fenotípicas de los aislados criopreservados y motivan la identificación molecular como el siguiente paso apropiado. Estos resultados muestran

que el *crosswalk* puede agrupar organismos celularmente distintos o ambiguamente resueltos bajo categorías fenotípicas compartidas a nivel colonial, lo que confirma que el sistema de 23 clústeres es útil para la comparación a nivel de comunidad pero subestima necesariamente la diversidad biológica.

Este hallazgo justifica además conservar el *crosswalk* como un marco fenotípico operativo en lugar de subdividir clústeres retroactivamente después de la caracterización celular. El *crosswalk* se construyó a partir de rasgos macroscópicos coloniales observados durante la evaluación comunitaria; la reacción de Gram, la respuesta a KOH y la actividad de catalasa se midieron posteriormente sobre aislados seleccionados y a una resolución biológica diferente. Reestructurar la matriz comunitaria después de observar diferencias celulares parciales arriesgaría introducir un sesgo *post hoc* en el análisis estadístico. La interpretación apropiada es, por lo tanto, jerárquica: el *crosswalk* resuelve la estructura comunitaria a nivel de morfotipo, mientras que los ensayos de caracterización muestran que algunos clústeres de morfotipos contienen una heterogeneidad celular más fina que la identificación molecular futura debería evaluar.

Las observaciones de campo proporcionan contexto ecológico para los datos de cultivo sin servir como evidencia directa de mecanismo. Las películas pigmentadas cerca de la entrada, las estructuras mucilaginosas translúcidas en el sector de Transición, las películas tenues pálidas en el sector Oscuro, las infiltraciones visibles a través de la matriz de bloques y la detección de diatomeas y protozoos ciliados en sedimento fresco indican, en conjunto, que el sustrato muestreado forma parte de un ensamble más amplio asociado al sedimento, y no de una capa bacteriana aislada. La presencia de eucariotas fotosintéticos en el sedimento del sector de Entrada es consistente con la colonización fototrófica visible de las superficies rocosas iluminadas, mientras que las infiltraciones en el sector de Transición plantean la posibilidad de que la materia orgánica disuelta transportada desde la superficie contribuya al ensamble cultivable distintivo recuperado allí. Dado que este estudio no midió el carbono orgánico disuelto, el nitrógeno, el fósforo ni la química del agua de goteo, esto sigue siendo una hipótesis ecológica y no un mecanismo demostrado.

Las mediciones de pH añaden una restricción adicional a la interpretación. El sedimento húmedo de la cueva fue ácido (pH 4.40 tanto en una preparación sedimento-agua como en una preparación de sedimento denso), mientras que el agua del arroyo cavernícola filtrada fue menos ácida (pH 5.74) y el medio R2A diluido quedó cercano al neutro tras el autoclavado (pH 7.01). Este contraste implica que las colonias recuperadas representan organismos capaces de formar colonias tras la transferencia desde un sedimento húmedo de campo ácido a un medio de cultivo de bajo contenido nutricional y casi neutro. El conjunto de datos basado en cultivo no debe interpretarse, por lo tanto, como una réplica directa de la comunidad *in situ*, sino como el subconjunto de organismos capaces de sobrevivir al muestreo, a la dilución, a la transferencia y al crecimiento bajo las condiciones de medio e incubación impuestas. El pH puede ser un filtro ambiental importante en la cueva, pero el diseño actual no pone a prueba los efectos del pH de manera directa; un perfilamiento de pH del sedimento y del agua intersticial a la escala de réplica sería un complemento productivo para futuros estudios de cultivo y moleculares.

El contexto geológico del Organal San Antonio añade una dimensión geomicrobiológica que sigue estando en gran medida inexplorada. La cueva se sitúa cerca del límite entre la Formación Combia y la Diorita de Támesis (Stock de Támesis), y la heterogeneidad visible en textura de la roca, coloración superficial y recubrimientos minerales sugiere un mosaico de sustrato complejo. La composición mineral podría influir sobre la colonización microbiana a través de la disponibilidad de elementos traza, las superficies redox-activas, los microambientes de pH, la adsorción de materia orgánica o las propiedades de retención de agua. Ninguna de estas variables se cuantificó aquí. Los presentes resultados establecen, por lo tanto, una línea base biológica contra la cual podrán compararse futuros análisis geoquímicos y mineralógicos, en lugar de una explicación mecanística de cómo la química del sustrato estructura la comunidad cultivable.

El alcance inferencial de este estudio está acotado por varias restricciones metodológicas. Primero, el cultivo en R2A diluido recupera solo una pequeña fracción de las células microbianas totales en los sedimentos oligotróficos cavernícolas [37, 38]. La estructura comunitaria documentada aquí es la estructura de la fracción cultivable bajo las condiciones específicas utilizadas: R2A al 25 %, incubación aeróbica, baja temperatura, oscuridad y conteo en el día 7 para el experimento principal. Si los mismos patrones espaciales ocurren en la mayoría no cultivada sigue siendo una cuestión empírica. Esta limitación no hace que el cultivo sea poco informativo: los enfoques basados en cultivo recuperan organismos viables para una caracterización posterior y pueden acceder a miembros de la biosfera rara o a diversidad a nivel de aislado que no quedan totalmente resueltos por los estudios moleculares por sí solos [42]. Segundo, el estudio es espacial pero no temporal. Ambos experimentos muestrearon en puntos temporales únicos, por lo que la estabilidad estacional de los patrones de densidad y composicionales aún no puede evaluarse. Tercero, el análisis concierne a una sola cueva. La generalización a otros organales, a otras cuevas volcánicas o a otros sistemas pseudokársticos tropicales debe tratarse como una hipótesis para trabajos comparativos, no como una conclusión de este estudio.

Otras limitaciones surgen de la resolución analítica y de la ejecución práctica. La clasificación de morfotipos fue realizada por un único observador y se basó en criterios visuales sistemáticos, más que en una validación independiente entre observadores o en una agrupación algorítmica de imágenes. El *crosswalk* fenotípico se construyó como un marco operativo reproducible, pero la convergencia morfológica y la plasticidad fenotípica permanecen como fuentes inevitables de subestimación e incertidumbre. Algunos clústeres de baja confianza, en especial las formas restringidas a la zona como CL09, requieren confirmación molecular. No todos los morfotipos recuperados durante la evaluación primaria en placa fueron fotografiados o purificados con igual éxito durante los pasos de aislamiento posteriores, de modo que la galería de morfotipos debe leerse como representativa y no como exhaustiva; el registro analítico completo lo proporcionan los catálogos, el *crosswalk* y las matrices de abundancias suplementarios. Finalmente, la cámara de enfriamiento utilizada para la incubación que mimetiza las condiciones cavernícolas mantuvo el rango de temperatura objetivo con fluctuaciones menores, y la batería de caracterización se limitó a la tinción de Gram, a la prueba de la cuerda con KOH, al ensayo de catalasa y a la

microscopía óptica. Estas restricciones definen la resolución de las conclusiones, pero no borran los patrones principales recuperados: una menor densidad cultivable en el sector afótico, la ausencia de una reducción detectable de la diversidad local de clústeres de morfotipos y un fuerte recambio composicional asociado al sector con dispersión multivariada balanceada.

Los morfotipos coloniales mucoides son particularmente susceptibles a una convergencia macroscópica durante el subcultivo. En este estudio, los representantes del sector Oscuro de dos clústeres mucoides intersectoriales distintos, D-MT01 en CL02 y D-MT03 en CL07, mostraron morfologías coloniales visualmente convergentes y perfiles fenotípicos parcialmente similares durante la caracterización. Esta observación se trata como una ambigüedad a nivel de caracterización más que como evidencia para fusionar los morfotipos: el *crosswalk* preserva las asignaciones primarias de la evaluación en placa sin modificación retroactiva.

El Organal San Antonio es una cueva volcaniclástica tropical cuya fracción microbiana cultivable está espacialmente estructurada a lo largo de la zonación cavernícola definida por la luz. Este estudio muestra que la densidad cultivable disminuye en el sector afótico, que la diversidad local de clústeres de morfotipos se mantiene estadísticamente sin resolver entre sectores y que la composición de clústeres fenotípicos se particiona fuertemente con la zonación cavernícola. El sector de Transición emergió como un componente distintivo del sistema, más que como un simple intermedio entre la Entrada y el sector Oscuro, sosteniendo fenotipos restringidos a la zona a abundancia sustancial. Estos hallazgos establecen una primera línea base cuantitativa cultivable para una cueva pseudokárstica de tipo organal y proporcionan un marco para el trabajo futuro. Los siguientes pasos son claros: la identificación molecular de los aislados criopreservados, la secuenciación independiente de cultivo de las comunidades de sedimento, el perfilamiento fisicoquímico a la escala de réplica, el remuestreo estacional y el análisis comparativo entre organales adicionales y sistemas cavernícolas volcaniclásticos. Este trabajo no pretende caracterizar la microbiología de las cuevas volcaniclásticas tropicales en su conjunto; define una entrada hacia esa categoría inexplorada y establece el terreno empírico desde el cual ya pueden plantearse preguntas biológicas y geomicrobiológicas más profundas.

Disponibilidad de Datos, Código y Permisos

Los scripts de R, las tablas procesadas de conteos de colonias, las matrices de morfotipos, los archivos de *crosswalk* y los productos de análisis suplementarios asociados a este trabajo de grado están disponibles en <https://github.com/correa-gallego/psychro-oligophiles>.

La recolección de campo y la movilización del material biológico se realizaron bajo el permiso de recolección otorgado a la Universidad EAFIT por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA), Resolución N.º 000548 del 28 de marzo de 2025.

Referencias

1. Humboldt, A. V. y Bonpland, A. *Essai sur la géographie des plantes: accompagné d'un tableau physique des régions équinoxiales, fondé sur des mesures exécutées, depuis le dixième degré de latitude boréale jusqu'au dixième degré de latitude australe, pendant les années 1799, 1800, 1801, 1802 et 1803* DOI: 10.5962/bhl.title.9309 (Chez Levrault, Schoell et compagnie, libraires, Paris, 1805).
2. Nottingham, A. T. *et al.* Microbes follow Humboldt: temperature drives plant and soil microbial diversity patterns from the Amazon to the Andes. *Ecology* **99**, 2455-2466. DOI: 10.1002/ecy.2482 (2018).
3. Northup, D. E. y Lavoie, K. H. Geomicrobiology of Caves: A Review. *Geomicrobiology Journal* **18**, 199-222. DOI: 10.1080/01490450152467750 (2001).
4. Barton, H. A. y Northup, D. Geomicrobiology in Cave Environments: Past, Current, and Future Perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies* **69**, 163-178 (2007).
5. Hershey, O. S. y Barton, H. A. en *Cave Ecology* (eds. Moldovan, O. T., Kováč, L. y Halse, S.) 69-90 (Springer International Publishing, Cham, 2018). DOI: 10.1007/978-3-319-98852-8_5.
6. Kováč, L. en *Cave Ecology* (eds. Moldovan, O. T., Kováč, L. y Halse, S.) 297-307 (Springer International Publishing, Cham, 2018). DOI: 10.1007/978-3-319-98852-8_13.
7. Barton, H. y Jurado, V. What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves. *Microbe* **2**, 132-138 (2007).
8. Oren, A. y Garrity, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **71**, 005056. DOI: 10.1099/ijsem.0.005056 (2021).
9. Engel, A. S. en *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective* (eds. Barton, L. L., Mandl, M. y Loy, A.) 219-238 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2010). DOI: 10.1007/978-90-481-9204-5_10.
10. Turrini, P., Chebbi, A., Riggio, F. P. y Visca, P. The geomicrobiology of limestone, sulfuric acid speleogenetic, and volcanic caves: basic concepts and future perspectives. *Frontiers in Microbiology* **15**, 1370520. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1370520 (2024).
11. Tomczyk-Żak, K. y Zielenkiewicz, U. Microbial Diversity in Caves. *Geomicrobiology Journal* **33**, 20-38. DOI: 10.1080/01490451.2014.1003341 (2016).
12. Sarbu, S. M., Kane, T. C. y Kinkle, B. K. A Chemoautotrophically Based Cave Ecosystem. *Science* **272**, 1953-1955. DOI: 10.1126/science.272.5270.1953 (1996).

13. Ortiz, M. *et al.* Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *The ISME Journal* **8**, 478-491. DOI: 10.1038/ismej.2013.159 (2014).
14. Hoehler, T. M. y Jørgensen, B. B. Microbial life under extreme energy limitation. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 83-94. DOI: 10.1038/nrmicro2939 (2013).
15. Lever, M. A. *et al.* Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory- and field-based investigations. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 688-728. DOI: 10.1093/femsre/fuv020 (2015).
16. Howarth, F. G. Ecology of Cave Arthropods. *Annual Review of Entomology* **28**, 365-389. DOI: 10.1146/annurev.en.28.010183.002053 (1983).
17. Culver, D. C. y Pipan, T. *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats* 2nd ed. (Oxford University Press, Oxford, New York, 2019).
18. Mulec, J. en *Cave Ecology* (eds. Moldovan, O. T., Kováč, L. y Halse, S.) 91-106 (Springer International Publishing, Cham, 2018). DOI: 10.1007/978-3-319-98852-8_6.
19. Mulec, J., Kosi, G. y Vrhovsek, D. Characterization of Cave Aerophytic Algal Communities and Effects of Irradiance Levels on Production of Pigments. *Journal of Cave and Karst Studies* **70**, 3-12 (2008).
20. Zhu, H.-Z., Jiang, C.-Y. y Liu, S.-J. Microbial roles in cave biogeochemical cycling. *Frontiers in Microbiology* **13**, 950005. DOI: 10.3389/fmicb.2022.950005 (2022).
21. Hathaway, J. J. M., Sinsabaugh, R. L., Dapkevicius, M. D. L. N. E. y Northup, D. E. Diversity of Ammonia Oxidation (amoA) and Nitrogen Fixation (nifH) Genes in Lava Caves of Terceira, Azores, Portugal. *Geomicrobiology Journal* **31**, 221-235. DOI: 10.1080/01490451.2012.752424 (2014).
22. Kraft, N. J. B. *et al.* Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor. *Functional Ecology* **29**, 592-599. DOI: 10.1111/1365-2435.12345 (2015).
23. Lavoie, K. H. *et al.* Comparison of bacterial communities from lava cave microbial mats to overlying surface soils from Lava Beds National Monument, USA. *PLOS ONE* **12**, e0169339. DOI: 10.1371/journal.pone.0169339 (2017).
24. Biagioli, F. *et al.* Outdoor climate drives diversity patterns of dominant microbial taxa in caves worldwide. *Science of The Total Environment* **906**, 167674. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167674 (2024).
25. Kosznik-Kwaśnicka, K., Golec, P., Jaroszewicz, W., Lubomska, D. y Piechowicz, L. Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *Microorganisms* **10**, 222. DOI: 10.3390/microorganisms10020222 (2022).

26. Zhu, H.-Z. *et al.* Bacteria and Metabolic Potential in Karst Caves Revealed by Intensive Bacterial Cultivation and Genome Assembly. *Applied and Environmental Microbiology* **87**, e02440-20. DOI: 10.1128/AEM.02440-20 (2021).
27. Northup, D. E. *et al.* Lava Cave Microbial Communities Within Mats and Secondary Mineral Deposits: Implications for Life Detection on Other Planets. *Astrobiology* **11**, 601-618. DOI: 10.1089/ast.2010.0562 (2011).
28. Halliday, W. R. Pseudokarst in the 21st Century. *Journal of Cave and Karst Studies* **69**, 103-113 (2007).
29. Northup, D. E. y Lavoie, K. H. en *Microbial Life of Cave Systems* (ed. Summers Engel, A.) 161-192 (DE GRUYTER, 2015). DOI: 10.1515/9783110339888-010.
30. Hathaway, J. J. *et al.* Comparison of Bacterial Diversity in Azorean and Hawai'ian Lava Cave Microbial Mats. *Geomicrobiology Journal* **31**, 205-220. DOI: 10.1080/01490451.2013.777491 (2014).
31. Riquelme, C. *et al.* Actinobacterial Diversity in Volcanic Caves and Associated Geomicrobiological Interactions. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1342. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01342 (2015).
32. Nicolosi, G., Gonzalez-Pimentel, J. L., Piano, E., Isaia, M. y Miller, A. Z. First Insights into the Bacterial Diversity of Mount Etna Volcanic Caves. *Microbial Ecology* **86**, 1632-1645. DOI: 10.1007/s00248-023-02181-2 (2023).
33. Prescott, R. D. *et al.* Islands Within Islands: Bacterial Phylogenetic Structure and Consortia in Hawaiian Lava Caves and Fumaroles. *Frontiers in Microbiology* **13**, 934708. DOI: 10.3389/fmicb.2022.934708 (2022).
34. Gonzalez-Pimentel, J. L. *et al.* Prokaryotic communities from a lava tube cave in La Palma Island (Spain) are involved in the biogeochemical cycle of major elements. *PeerJ* **9**, e11386. DOI: 10.7717/peerj.11386 (2021).
35. De Waele, J., Sanna, L. y Rossi, A. *Pseudokarstic cavities in pyroclastic rocks: some examples from North Sardinia* en *Proceedings of the 10th international symposium on pseudokarst* (2008), 53-62.
36. Staley, J. T. y Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* **39**, 321-346. DOI: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541 (1985).
37. Barton, H. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies* **68**, 43-54 (2006).
38. *Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery* (ed. Cheeptham, N.) DOI: 10.1007/978-1-4614-5206-5 (Springer New York, New York, NY, 2013).

39. Shu, W.-S. y Huang, L.-N. Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology* **20**, 219-235. DOI: 10.1038/s41579-021-00648-y (2022).
40. Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169. DOI: 10.1128/mr.59.1.143-169.1995 (1995).
41. Reasoner, D. J. y Geldreich, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* **49**, 1-7. DOI: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985 (1985).
42. Shade, A. *et al.* Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environmental Microbiology* **14**, 2247-2252. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02817.x (2012).
43. Kato, S. *et al.* Isolation of Previously Uncultured Slow-Growing Bacteria by Using a Simple Modification in the Preparation of Agar Media. *Applied and Environmental Microbiology* **84**, e00807-18. DOI: 10.1128/AEM.00807-18 (2018).
44. Yasir, M. Analysis of bacterial communities and characterization of antimicrobial strains from cave microbiota. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**, 248-257. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.08.005 (2018).
45. Haldeman, D. L. y Amy, P. S. Diversity within a Colony Morphotype: Implications for Ecological Research. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 933-935. DOI: 10.1128/aem.59.3.933-935.1993 (1993).
46. Lebaron, P., Ghiglione, J.-F., Fajon, C., Batailler, N. y Normand, P. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 137-143. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12903.x (1998).
47. Cano Alzate, E. M. y Rentería Cárdenas, M. C. *Propuesta de clasificación de los organales en el Departamento de Antioquia, Colombia* Undergraduate thesis (Geology) (Universidad EAFIT, Medellín, Colombia, 2020).
48. Weber, M. *et al.* en *The Geology of Colombia, Volume 3: Paleogene–Neogene* (eds. Gomez, J. y Mateus-Zabala, D.) 355-394 (Servicio Geológico Colombiano, Bogotá, 2020). DOI: 10.32685/pub.esp.37.2019.12.
49. Jaramillo, J. S., Cardona, A., Monsalve, G., Valencia, V. y León, S. Petrogenesis of the late Miocene Combia volcanic complex, northwestern Colombian Andes: Tectonic implication of short term and compositionally heterogeneous arc magmatism. *Lithos* **330-331**, 194-210. DOI: 10.1016/j.lithos.2019.02.017 (2019).
50. Servicio Geológico Colombiano. *Atlas geológico de Colombia 2023 a escala 1:500K* (Servicio Geológico Colombiano, Bogotá, Colombia, 2023).

51. González I., H. y Londoño, A. C. *Diorita de Támesis (Stock de Támesis) (k1dt), Cañón del Río Cauca, Departamento de Antioquia* (Instituto de Investigación e Información Geocientífica, Minero-Ambiental y Nuclear, INGEOMINAS, Bogotá, Colombia, 2002).
52. European Space Agency y Airbus. *Copernicus DEM 2022*. DOI: 10.5270/ESA-c5d3d65.
53. Patterson, T. y Kelso, N. V. *Natural Earth: Free vector and raster map data 2023*.
54. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. *Límites municipales y departamentales de Colombia; cartografía hidrográfica local Bogotá, Colombia, 2023*.
55. D'Amico, S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *The EMBO Reports* 7, 385-389. DOI: 10.1038/sj.embor.7400662 (2006).
56. Cavicchioli, R. On the concept of a psychrophile. *The ISME Journal* 10, 793-795. DOI: 10.1038/ismej.2015.160 (2016).
57. Legendre, P. y Gallagher, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129, 271-280. DOI: 10.1007/s004420100716 (2001).
58. Anderson, M. J. Distance-Based Tests for Homogeneity of Multivariate Dispersions. *Biometrics* 62, 245-253. DOI: 10.1111/j.1541-0420.2005.00440.x (2006).
59. Suslow, T. V. Application of a Rapid Method for Gram Differentiation of Plant Pathogenic and Saprophytic Bacteria Without Staining. *Phytopathology* 72, 917-918. DOI: 10.1094/Phyto-72-917 (1982).
60. Oksanen, J. et al. *vegan: Community Ecology Package 2026*. DOI: 10.32614/CRAN.package.vegan.
61. Hsieh, T. C., Ma, K. H. y Chao, A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution* 7 (ed. McInerney, G.) 1451-1456. DOI: 10.1111/2041-210X.12613 (2016).
62. Ben-Shachar, M., Lüdtke, D. y Makowski, D. effectsize: Estimation of Effect Size Indices and Standardized Parameters. *Journal of Open Source Software* 5, 2815. DOI: 10.21105/joss.02815 (2020).
63. Amrhein, V., Greenland, S. y McShane, B. Scientists rise up against statistical significance. *Nature* 567, 305-307. DOI: 10.1038/d41586-019-00857-9 (2019).
64. Anderson, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26, 32-46. DOI: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x (2001).

Material Suplementario

Este apéndice proporciona el material suplementario que sustenta el diseño de muestreo, la clasificación de morfotipos, el *crosswalk* fenotípico intersectorial, la caracterización de aislados, el control de calidad de los conteos de colonias, la normalización gravimétrica, el análisis de rarefacción y los resultados piloto exploratorios. Todos los clústeres de morfotipos son unidades fenotípicas operativas y no deben interpretarse como asignaciones taxonómicas.

A. Esquema del diseño de muestreo

La Figura S1 resume la estructura espacial del Experimento I y del Experimento II a lo largo del gradiente cavernícola.

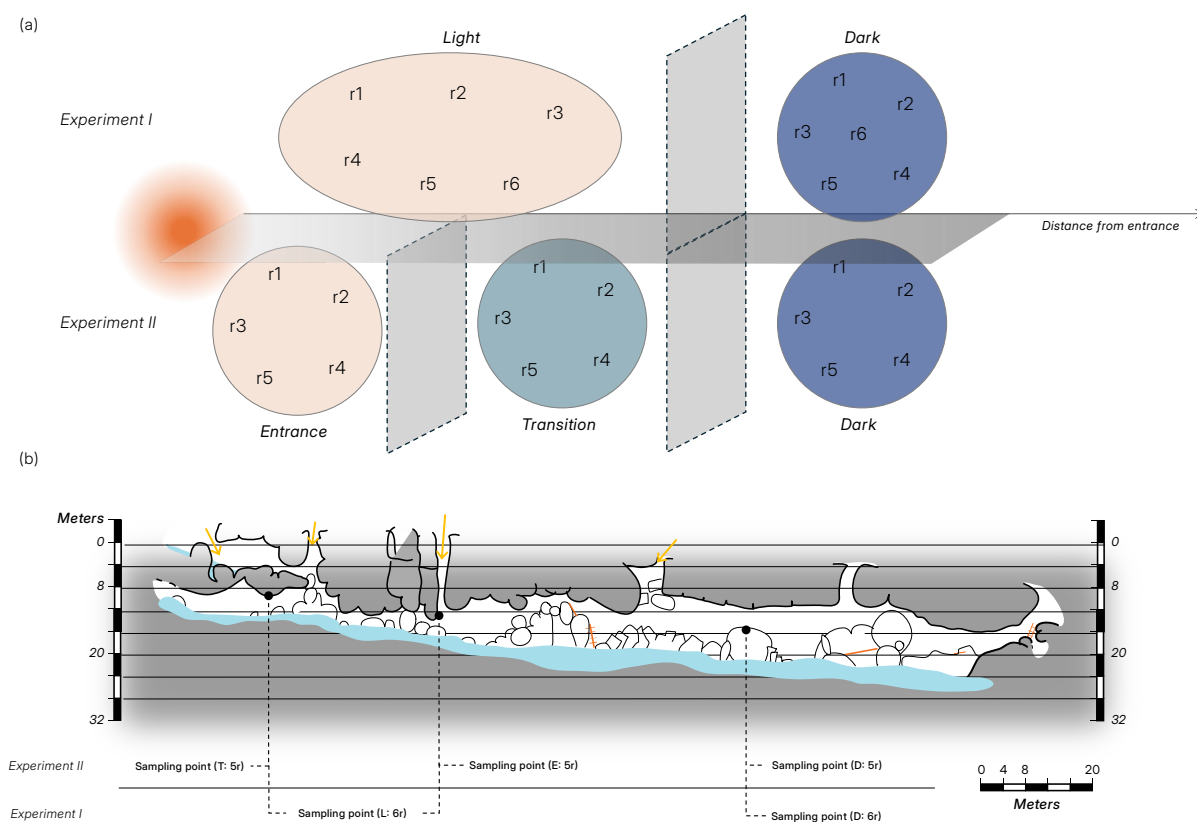


Figura S1. Diseño de muestreo y disposición espacial de las réplicas biológicas en el Organal San Antonio. (a) Estructura experimental a lo largo del gradiente definido por la luz de la cueva. El Experimento I comparó las categorías Luz y Oscuridad con seis réplicas biológicas por categoría; el Experimento II resolvió la cueva en los sectores de Entrada, Transición y Oscuro con cinco réplicas biológicas por sector. **(b)** Sección longitudinal de la cueva mostrando la posición aproximada de los sectores de muestreo, los puntos de infiltración y el arroyo cavernícola. El esquema es espacialmente aproximado y se adaptó del levantamiento original de la cueva por J. Rincón, R. Echeverri, A. Ledezma y D. Estrada; levantamiento con Suunto y distánciometro, digitalizado por J. Rincón, 2-3 de septiembre de 2017), modificado por el autor con autorización.

B. Catálogo de morfotipos — Experimento I

La Tabla S1 presenta los diecinueve morfotipos descritos durante el Experimento I. Catorce códigos se detectaron en placas contables y se incluyeron en la matriz comunitaria; cinco aparecieron únicamente en placas no contables o excluidas y se marcan con un asterisco.

C. Catálogos de morfotipos — Experimento II

Las Tablas S2–S4 presentan los cuarenta y dos códigos de morfotipos de sedimento específicos por zona descritos durante el Experimento II: quince en Entrada, catorce en Transición y trece en el sector Oscuro. Los morfotipos fúngicos putativos se identificaron de manera conservadora a partir de la macromorfología colonial porque la tinción con lactofenol no arrojó estructuras fúngicas diagnósticas.

Cuadro S1. Catálogo de morfotipos, Experimento I. El asterisco indica los morfotipos excluidos de la matriz comunitaria del Experimento I porque aparecieron únicamente en placas no contables o excluidas.

Código	Color / pigmento	Forma / elevación	Margen	Tamaño (mm)	Textura / superficie	Transparencia
ORG-SA001	Blanco crema, variable	Circular a deformada, convexa	Liso a irregular	1–6	Firme, sólida	Opaca
ORG-SA002	Crema, centro más oscuro	Filamentosa, rizoide	Filamentosa	5–40	Algodonosa, estructurada	Opaca
ORG-SA003	Crema viscoso a amarillo pálido	En forma de domo, irregular	Irregular	>10	Brillante, mucoide gruesa	Opaca
ORG-SA004	Crema transparente	Mancha irregular, con halo	Difuso	3–4	Brillante, lisa	Translúcida
ORG-SA005	Amarillo verdoso pálido	Irregular, aplanada	Irregular	2–4	Velo mucoide delgado	Translúcida
ORG-SA006*	Rosa pálido, bordes azulados	Circular, convexa	Liso	1–3	Brillante, gelatinosa	Semi-translúcida
ORG-SA007	Pigmento púrpura central	Circular, convexa	Liso	2–5	Blanda, estructurada	Opaca
ORG-SA008	Núcleo amarillo, gradiente crema	Circular, lobulada	Lobulado	2–6	Translúcida, mucoide	Translúcida
ORG-SA009	Blanco crema, mucoide periférica	Irregular, embebida en halo	Irregular	2–6	Arrugada, compleja	Opaca
ORG-SA010	Amarillo brillante, halo mucoide	Circular convexa con tapete	Lobulado, difuso	3–8	Centro mucoide brillante	Translúcida
ORG-SA011	Blanca, ligeramente cremosa	Circular a irregular, convexa	Regular	2–5	Superficie en forma de gota	Semi-translúcida
ORG-SA012	Blanca, embebida en tapete mucoide	Circular convexa en tapete	Regular	1–4	Mucoide brillante, microcolonias	Translúcida
ORG-SA013*	Cremosa, amarillo verdoso espectral	Tapete delgado	Irregular	<1	Delgada, casi invisible	Semi-translúcida
ORG-SA014*	Púrpura pálido a blanco	Lobulada, ligeramente convexa	Lobulado	2–4	Sólida, densa	Opaca
ORG-SA015	Crema cálido, brillante	Circular a irregular, convexa	Liso a ondulado	2–5	Densa, firme	Opaca
ORG-SA016	Rosa oscuro a borgoña	Circular, ligeramente convexa	Ligeramente lobulado	2–4	Lisa, gelatinosa	Opaca
ORG-SA017*	Blanco lechoso	Convexa, en forma de gota	Liso	1.5–3	Lisa, clara	Semi-translúcida
ORG-SA018*	Tapete denso blanco	Circular, embebida en mucoide	Difuso	2–4	Núcleo opaco, anillo gelatinoso	Opaca
ORG-SA019	Amarillo cremoso, halo granular	Circular, convexa	Irregular	2–4	Ligeramente granular en el margen	Opaca

Cuadro S2. Catálogo de morfotipos del Experimento II, sector de Entrada. Se describieron quince morfotipos, incluyendo tres morfotipos fúngicos putativos.

Código	Color / pigmento	Forma / elevación	Margen	Tamaño (mm)	Textura / superficie	Transparencia	Tipo
E-MT01	Blanco crema	Circular, convexa	Entero	1–3	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
E-MT02	Crema cálido	Circular, convexa	Entero	2–4	Lisa, brillante	Semi-translúcida	Bact.
E-MT03	Blanco crema	Circular, umbonada	Entero	~2	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
E-MT04	Amarillo	Circular, elevada	Entero	~1	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
E-MT05	Blanca	Circular, convexa, puntiforme	Entero	0.5–1	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
E-MT06	Centro púrpura-negro, margen crema pálido	Irregular, elevada	Entero a ligeramente irregular	~1.5	Mate	Opaca	Bact.
E-MT07	Amarillo con tono verdoso sutil	Plana, expansiva	Radial, lobulado	7–12	Brillante, expansiva	Translúcida	Bact.?
E-MT08	Casi transparente, crema tenue	Circular, convexa, puntiforme	Entero	0.5–1	Lisa, brillante	Transparente a semi-translúcida	Bact.
E-MT09	Blanco crema, apariencia mucoide	Convexa, irregular	Entero a deformado	6–8	Lisa, brillante, mucoide	Semi-translúcida	Bact.
E-MT10	Centro amarillo brillante con halo translúcido	Centro umbonada	Halo radial	2 centro, hasta 10 halo	Brillante	Centro opaco, halo translúcido	Bact.?
E-MT11	Blanco crema con tono rosa pálido tenue	Circular, convexa	Entero	1.5–4	Brillante, cristalina	Semi-translúcida	Bact.
E-MT12	Centro blanco a plateado con halo translúcido	Circular, umbonada	Entero	1–2	Brillo bajo	Centro opaco, halo translúcido	Bact.
E-MT13	Filamentos blancos	Plana, rizoides	Rizoides, irregular	~22 de expansión	Filamentosa, brillante	Indeterminada	Fungal?
E-MT14	Crema pálido, rizoides, hifal	Ligeramente elevada	Irregular, filamentoso	10–25	Mate, textura fúngica	Opaca	Fungal?
E-MT15	Blanco muy pálido	Plana, muy grande	Irregular, radial, asimétrico	40–50	Mate, crecimiento delgado	Opaca a apenas translúcida	Fungal?

Cuadro S3. Catálogo de morfotipos del Experimento II, sector de Transición. Se describieron catorce morfotipos, incluyendo dos morfotipos fúngicos putativos.

Código	Color / pigmento	Forma / elevación	Margen	Tamaño (mm)	Textura / superficie	Transparencia	Tipo
T-MT01	Blanco crema cálido	Circular, convexa	Entero	~6	Lisa, brillante	Mayormente opaca	Bact.
T-MT02	Transparente, gota de agua	Circular, convexa	Entero	0.5–1	Lisa, brillante	Transparente	Bact.
T-MT03	Blanca	Puntiforme, convexa	Entero	~1	Lisa, brillante	Translúcida	Bact.
T-MT04	Centro blanco pálido con halo claro	Circular, umbonada	Ligeramente irregular	2–3	Mate a lisa	Centro opaco, halo claro	Bact.
T-MT05	Transparente	Puntiforme, umbonada	Entero	~1	Lisa, brillante	Transparente	Bact.
T-MT06	Centro negro, borde crema	Circular, umbonada	Sutilmente lobulado	~1	No determinada	Opaca	Bact.
T-MT07	Amarillo	Circular, convexa	Entero	~1	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
T-MT08	Blanco crema	Circular, convexa	Entero	~2.5	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
T-MT09	Translúcida, apariencia mucoide	Circular, convexa a irregular	Entero a irregular	~5	Lisa, brillante, mucoide	Semi-translúcida	Bact.
T-MT10	Centro amarillo verdoso tenue, tapete delgado	Plana, expansiva	Entero a ligeramente irregular	~6	Lisa, brillante	Translúcida	Bact.
T-MT11	Amarillo lechoso pálido	Circular, convexa	Entero	~2	Lisa, brillante	Translúcida	Bact.
T-MT12	Transparente	Circular, convexa, puntiforme	Entero	0.5–1	Brillante	Transparente	Bact.
T-MT13	Blanco crema cálido, rizoide, pubescente	Centro umbonado, periferia plana	Mal definido, rizoide	7–9	Vellosa, mate	Opaca	Fungal?
T-MT14	Crema pálido, rizoide, hifal	Plana	Irregular, filamentososo	~50	Mate, textura fúngica	Apenas translúcida	Fungal?

Cuadro S4. Catálogo de morfotipos del Experimento II, sector Oscuro. Se describieron trece morfotipos, incluyendo un morfotipo fúngico putativo.

Código	Color / pigmento	Forma / elevación	Margen	Tamaño (mm)	Textura / superficie	Transparencia	Tipo
D-MT01	Translúcida, crema lechoso	Circular, convexa	Entero a ligeramente irregular	~3	Lisa, brillante	Semi-translúcida	Bact.
D-MT02	Blanca, firme	Circular, convexa	Entero	2–3	Lisa, brillante	Opaca	Bact.
D-MT03	Transparente, apariencia muy mucoide	Circular, convexa, deformable	Entero a irregular	6–10	Lisa, brillante, mucoide	Translúcida	Bact.
D-MT04	Amarillo lechoso pálido	Circular, convexa	Irregular a entero	~3	Brillante, impresión mucoide	Semi-translúcida	Bact.
D-MT05	Blanco cálido, puntiforme	Circular, convexa	Entero	~1	Brillante, firme, lisa	Opaca	Bact.
D-MT06	Blanco crema	Crateriforme, ligeramente arrugada	Difuso, irregular	~1.5	Seca, mate	Opaca con halo tenue	Bact.
D-MT07	Blanca	Elevada, cfater central sutil	Entero a sutilmente irregular	~2	Mate	Opaca	Bact.
D-MT08	Centro púrpura-negro con borde gris	Plana a elevación muy baja	Entero, irregular	~2	Mate	Opaca	Bact.
D-MT09	Amarillo translúcido	Circular, convexa	Entero	6–8	Translúcida, mucoide	Translúcida	Bact.
D-MT10	Rojo-rosado pálido translúcido	Circular, convexa, deformable	Entero a irregular	6–8	Translúcida, mucoide	Translúcida	Bact.
D-MT11	Amarillo espectral tenue	Plana, expansiva	Radial, irregular	15–20	Brillante, irregular	Translúcida	Bact.
D-MT12	Transparente	Circular, convexa, puntiforme	Entero	0.5–1	Lisa, brillante	Transparente	Bact.
D-MT13	Blanca, pubescente	Elevada, convexa, pubescente	Radial, regular	~12	Mate, vellosa	Opaca	Fungal?

D. *Crosswalk* fenotípico intersectorial

La Tabla S5 presenta el *crosswalk* final de veintitrés clústeres utilizado para construir la matriz comunitaria del Experimento II. Las asignaciones se basaron en rasgos macroscópicos coloniales, y los niveles de confianza indican la solidez del emparejamiento fenotípico. Los morfotipos del control de agua fresca cavernícola se muestran únicamente como correspondencias de fondo ambiental y no se incluyeron en la matriz comunitaria del sedimento. La caracterización posterior a nivel de aislado no modificó este *crosswalk*; D-MT08 permanece en CL06 para los propósitos de la matriz comunitaria, aunque posteriormente se trató como no evaluable a nivel bacteriano en la capa de caracterización.

Cuadro S5. *Crosswalk* fenotípico intersectorial. Los clústeres son unidades fenotípicas operativas y no asignaciones taxonómicas. Los códigos C corresponden a morfotipos de control ambiental de agua fresca cavernícola y no se incluyeron en la matriz comunitaria del sedimento.

Clúster	Nombre del clúster	Conf.	Entrada	Transición	Oscuro	Agua	Rasgos diagnósticos
CL01	Crema convexa opaca	Alta	E-MT01	T-MT08	D-MT02	C-MT01	Blanco crema, circular convexa, margen entero, opaca, lisa brillante, 1–4 mm
CL02	Crema cálido translúcida	Alta	E-MT02	T-MT01	D-MT01	—	Crema cálido, circular convexa, entero, semi-translúcida con interior lechoso, lisa brillante, 3–6 mm
CL03	Puntiforme transparente	Alta	E-MT08	T-MT12	D-MT12	—	Transparente a casi clara, circular convexa puntiforme, entero, lisa brillante, 0.5–1 mm, apariencia de gota de agua
CL04	Puntiforme blanca	Moderada	E-MT05	T-MT03	D-MT05	C-MT05	Blanca opaca, puntiforme convexa, entero, lisa brillante, 0.5–1 mm
CL05	Amarilla pequeña	Alta	E-MT04	T-MT07	—	C-MT02	Amarilla, circular convexa, entero, lisa brillante, opaca, aproximadamente 1 mm
CL06	Pigmentada de centro oscuro	Alta	E-MT06	T-MT06	D-MT08	C-MT04	Centro púrpura-negro con borde pálido o gris, elevación baja, mate, opaca, 1–2 mm
CL07	Mucoide grande translúcida	Moderada	E-MT09	T-MT09	D-MT03	—	Grande, mucoide, translúcida, forma colonial irregular, convexa a deformada, brillante, 5–10 mm
CL08	Tapete amarillo verdoso espectral	Moderada	E-MT07	T-MT10	D-MT11	C-MT03	Plana expansiva, amarillo verdoso translúcida, margen radial o difuso, pigmento uniforme, brillante, 7–20 mm
CL09	Transparente convexa no puntiforme	Baja	—	T-MT02	—	—	Transparente, circular convexa, entero, lisa brillante, 0.5–1 mm; retenida separadamente de CL03 por apariencia no puntiforme
CL10	Umbonada con halo	Moderada	—	T-MT04	—	—	Centro blanco pálido con halo claro, umbonada, margen ligeramente irregular, mate, 2–3 mm
CL11	Umbonada blanca	Baja	E-MT03	—	—	—	Blanco crema, circular umbonada, entero, lisa brillante, aproximadamente 2 mm, opaca
CL12	Rosa pálido/cristalina	Baja	E-MT11	—	—	—	Blanco crema con tono rosa tenue, circular convexa, semi-translúcida cristalina, 1.5–4 mm
CL13	Halo plateado-metálico	Baja	E-MT12	—	—	—	Centro blanco a plateado, halo translúcido, umbonada, brillo bajo, 1–2 mm
CL14	Amarillo lechoso	Baja	—	T-MT11	D-MT04	—	Amarillo lechoso pálido, circular convexa, translúcida a semi-translúcida, aproximadamente 2–3 mm
CL15	Crateriforme mate	Baja	—	—	D-MT06	—	Blanco crema, crateriforme, ligeramente arrugada, margen difuso irregular, seca mate, aproximadamente 1.5 mm
CL16	Blanca con cfater central	Baja	—	—	D-MT07	—	Blanca, elevada con cfater central sutil, margen entero a sutilmente irregular, mate, aproximadamente 2 mm
CL17	Amarilla translúcida mucoide	Baja	—	—	D-MT09	—	Amarilla translúcida, circular convexa, mucoide, 6–8 mm
CL18	Roja-rosada translúcida	Baja	—	—	D-MT10	—	Rojo-rosado pálido translúcido, circular convexa, mucoide, deformación cuasilíquida, 6–8 mm
CL19	Umbonada transparente	Baja	—	T-MT05	—	—	Transparente, umbonada puntiforme con punta central, entero, lisa brillante, aproximadamente 1 mm
CL20	Rizoide fúngico (similar a <i>Penicillium</i>)	Alta	E-MT14	T-MT14	—	—	Crema pálido, rizoide con hifas abundantes, mate textura fúngica, 10–50 mm
CL21	Fúngico pubescente	Moderada	E-MT13	T-MT13	D-MT13	C-MT06	Blanca, pubescente o vellosa, elevada, mate opaca, margen radial, 10–22 mm
CL22	Fúngico grande asimétrico	Baja	E-MT15	—	—	—	Blanco muy pálido, plano, muy grande, mate, crecimiento radial asimétrico, 40–50 mm
CL23	Halo de centro amarillo	Baja	E-MT10	—	—	—	Centro umbonado amarillo brillante con halo translúcido y gradiente de pigmento, 2 mm centro hasta 10 mm halo

E. Control ambiental de agua fresca cavernícola

Se sembró agua fresca no autoclavada del arroyo cavernícola recolectada del sector Oscuro como control de agua ambiental. Este control fue distinto del agua autoclavada del arroyo cavernícola utilizada como diluyente estéril y no se incluyó en la matriz comunitaria del sedimento.

La siembra directa arrojó 292 colonias a partir de 100 μL , equivalentes a $2,92 \times 10^3$ UFC mL^{-1} . Las placas diluidas arrojaron 21 colonias a 1:10 y 8 colonias a 1:100, equivalentes a $2,10 \times 10^3$ y $8,00 \times 10^3$ UFC mL^{-1} , respectivamente. La estimación a 1:100 debe interpretarse con cautela porque proviene de un conteo colonial absoluto bajo.

Cuadro S6. Morfotipos y conteos coloniales del control ambiental de agua fresca cavernícola. Estos morfotipos se recuperaron del agua no autoclavada del arroyo cavernícola y no se incluyeron en la matriz comunitaria del sedimento.

Código	Color / pigmento	Forma / elevación	Margen	Tamaño (mm)	Textura / superficie	Transparencia	Tipo
C-MT01	Blanco crema	Circular, elevada	Entero, regular	3–4	Lisa, brillo bajo	Opaca	Bact.
C-MT02	Amarillo	Circular, convexa	Entero, ligeramente difuso	1–2	Lisa, brillante	Translúcida	Bact.
C-MT03	Amarillo espectral	Plana, expansiva	Radial, difuso	~10	Brillante, irregular	Translúcida	Bact.
C-MT04	Púrpura-lila	Circular, convexa	Entero, regular	1–2	Mate, lisa	Opaca	Bact.
C-MT05	Crema pálido, puntiforme	Circular, convexa	Entero, irregular	0.5–1	Brillo bajo	Opaca	Bact.
C-MT06	Blanca, pubescente	Convexa, pubescente	Entero, radial	~10	Mate, vellosa	Opaca	Fungal?

Dilución de agua fresca	Conteo de colonias	UFC mL^{-1}
Sin diluir	292	$2,92 \times 10^3$
1:10	21	$2,10 \times 10^3$
1:100	8	$8,00 \times 10^3$

F. Caracterización fenotípica detallada

La Tabla S7 presenta los resultados por prueba de los aislados representativos caracterizados en el Experimento II. La formación de cuerda en KOH se interpretó como compatible con una envoltura celular Gram-negativa, mientras que la ausencia de formación de cuerda se interpretó como compatible con un perfil Gram-positivo. Los aislados marcados con † fueron excluidos del perfil fenotípico bacteriano consolidado porque no pudo establecerse la tinción, la pureza o la resolución celular bacteriana. Estas exclusiones no modifican el catálogo de morfotipos, el *crosswalk* intersectorial ni la matriz comunitaria.

Cuadro S7. Caracterización fenotípica por prueba, Experimento II. Los aislados marcados con † fueron excluidos del perfil fenotípico bacteriano consolidado. KOH se refiere a la prueba de la cuerda con KOH al 3 %: “String” indica formación de cuerda viscosa, consistente con una envoltura celular Gram-negativa; “No string” indica ausencia de formación de cuerda, consistente con un perfil Gram-positivo.

Código	Sec.	Gram	KOH	Conc.	Cat.	Conf.	Morfología celular	Notas
E-MT01	E	G+ tent.	String	D	—	M	Coccobacillus-like, 1–2 µm	Tinción tenue; Gram retenido con cautela
E-MT02	E	G+	No string	Y	+	H	Rod-shaped cells, 1.5–4 µm	Miembro de CL02; resultado concordante claro
E-MT04	E	G [–]	String	Y	+	H	Small rod-shaped cells, <1–2 µm	Miembro de CL05; cuerpo refráctil central
E-MT05	E	G+	No string	Y	+	H	Cocci in tetrads, >1 µm	Miembro de CL04; disposición en tétada diagnóstica
E-MT07	E	G [–]	String	Y	—	H	Slender rod-shaped cells, 2–3 µm	Miembro de CL08; resultado concordante claro
E-MT08	E	G+	No string	Y	—	H	Rod-shaped cells, >3 µm	Miembro de CL03; catalasa-negativo
E-MT09	E	G [–] low conf.	No string	D	+	M/L	Rod-shaped to coccobacillus-like, variable	Miembro de CL07; colonia mucoide; Gram retenido con cautela
E-MT10†	E	ND	ND	—	ND	—	No determinado	Fenotipo de halo de centro amarillo; excluido del perfil bacteriano consolidado
T-MT01	T	G [–]	No string	D	+	H	Very small rod-like/coccobacillus-like cells	Miembro de CL02; resultado de Gram repetido retenido
T-MT02	T	G+	No string	Y	—	M	Rod-shaped cells	Miembro de CL09; tinción posterior exitosa; incorporado al perfil consolidado
T-MT04	T	G+	No string	Y	+	H	Thick rod-shaped cells, 1–2 µm; chains	Miembro de CL10; división activa visible
T-MT07	T	G [–]	String	Y	+	H	Coccobacillus-like cells, ~1 µm	Miembro de CL05; cuerpo refráctil
T-MT09	T	Ambig./G [–] retained	No string	D	+	L	Rod-shaped to coccobacillus-like cells, 1.5–3 µm	Miembro de CL07; colonia mucoide; tinción púrpura periférica con coloración interna débil
T-MT12	T	G [–]	String	Y	—	H	Rod-shaped cells, 2–3 µm	Miembro de CL03; catalasa-negativo
D-MT01	D	G+ tent.	No string	Y	+	M/H	Rod-like to coccobacillus-like cells, 1–2 µm	Miembro de CL02; patrón de tinción periférica o asociada a la superficie
D-MT03	D	G+ tent.	No string	Y	+	M	Rod-like to coccobacillus-like cells, ~1 µm	Miembro de CL07; resultado de KOH concordante, pero la asignación de Gram sigue siendo tentativa debido a la tinción periférica/asociada a la superficie
D-MT04†	D	ND	ND	—	ND	—	Células heterogéneas	Preparación probablemente mixta o no resuelta; excluido del perfil bacteriano consolidado
D-MT05	D	G [–] revised	No string	D	—	M/H	Small rod-shaped cells, ~1 µm	Miembro de CL04; revisado tras tinción de Gram repetida; KOH discordante
D-MT06	D	G+	No string	Y	+	H	Square rod-like cells, ≤1 µm; tetrads	Miembro de CL15; disposición en ladrillo diagnóstica
D-MT08†	D	ND / putative fungal	ND	—	ND	—	No evaluable a nivel bacteriano	Representante de CL06 en el <i>crosswalk</i> ; células bacterianas no visualizadas con confianza; elementos filamentosos observados en material anterior
D-MT12	D	G [–]	String	Y	—	H	Rod-shaped cells, ~1 µm	Miembro de CL03; catalasa-negativo
C-MT01	C	G [–]	String	Y	—	H	Coccobacillus-like cells, ~1 µm	Aislado del control de agua fresca cavernícola
C-MT04	C	G [–]	No string	D	+	M/H	Rod-shaped cells, 1.5–2 µm	Aislado del control de agua fresca cavernícola; resultado de Gram retenido

G. Conteos de colonias y selección de placas — Experimento II

Las Tablas S8 y S9 presentan el conteo colonial del día 7 y el registro de selección de placas para el Experimento II. Se seleccionó una placa primaria por réplica biológica para la estimación de la densidad, privilegiando las placas contables con 30–300 colonias en la dilución más baja disponible. Las placas de réplica técnica a 10^{-2} se indican como T. TNTC indica placas demasiado numerosas para contar; NR indica placas no registradas. Los conteos totales originales se retuvieron como registros auditables; los conteos por suma de morfotipos se utilizaron para los análisis comunitarios basados en morfotipos aguas abajo cuando hubo discrepancias.

Cuadro S8. Conteos de colonias y selección de placas, Experimento II, sectores de Entrada y Transición. Esta tabla constituye la primera parte del registro de selección de placas del Experimento II; el registro del sector Oscuro se proporciona en la Tabla S9.

ID de placa	Zona	Répl.	Dilución	T	Conteo	Categoría	Seleccionada
OSA-E1-D1	E	1	10^{-1}		—	TNTC	
OSA-E1-D2	E	1	10^{-2}		154	Contable	Sí
OSA-E1-D2b	E	1	10^{-2}	T	146	Contable	
OSA-E1-D3	E	1	10^{-3}		15	Baja	
OSA-E2-D1	E	2	10^{-1}		—	TNTC	
OSA-E2-D2	E	2	10^{-2}		89	Contable	Sí
OSA-E2-D2b	E	2	10^{-2}	T	108	Contable	
OSA-E2-D3	E	2	10^{-3}		10	Baja	
OSA-E3-D1	E	3	10^{-1}		—	TNTC	
OSA-E3-D2	E	3	10^{-2}		143	Contable	Sí
OSA-E3-D2b	E	3	10^{-2}	T	160	Contable	
OSA-E3-D3	E	3	10^{-3}		40	Contable	
OSA-E4-D1	E	4	10^{-1}		—	TNTC	
OSA-E4-D2	E	4	10^{-2}		167	Contable	Sí
OSA-E4-D2b	E	4	10^{-2}	T	—	TNTC	
OSA-E4-D3	E	4	10^{-3}		31	Contable	
OSA-E5-D1	E	5	10^{-1}		—	TNTC	
OSA-E5-D2	E	5	10^{-2}		76	Contable	Sí
OSA-E5-D2b	E	5	10^{-2}	T	109	Contable	
OSA-E5-D3	E	5	10^{-3}		13	Baja	
OSA-T1-D1	T	1	10^{-1}		—	NR	
OSA-T1-D2	T	1	10^{-2}		163	Contable	Sí
OSA-T1-D2b	T	1	10^{-2}	T	130	Contable	
OSA-T1-D3	T	1	10^{-3}		21	Baja	
OSA-T2-D1	T	2	10^{-1}		—	NR	
OSA-T2-D2	T	2	10^{-2}		194	Contable	Sí
OSA-T2-D2b	T	2	10^{-2}	T	125	Contable	
OSA-T2-D3	T	2	10^{-3}		11	Baja	
OSA-T3-D1	T	3	10^{-1}		—	NR	
OSA-T3-D2	T	3	10^{-2}		137	Contable	Sí
OSA-T3-D2b	T	3	10^{-2}	T	123	Contable	
OSA-T3-D3	T	3	10^{-3}		11	Baja	
OSA-T4-D1	T	4	10^{-1}		—	NR	
OSA-T4-D2	T	4	10^{-2}		33	Contable	Sí
OSA-T4-D2b	T	4	10^{-2}	T	56	Contable	
OSA-T4-D3	T	4	10^{-3}		7	Baja	
OSA-T5-D1	T	5	10^{-1}		—	NR	
OSA-T5-D2	T	5	10^{-2}		94	Contable	Sí
OSA-T5-D2b	T	5	10^{-2}	T	101	Contable	
OSA-T5-D3	T	5	10^{-3}		5	Baja	

Cuadro S9. Conteos de colonias y selección de placas, Experimento II, sector Oscuro. Esta tabla constituye la segunda parte del registro de selección de placas del Experimento II; los registros de Entrada y Transición se proporcionan en la Tabla S8.

ID de placa	Zona	Répl.	Dilución	T	Conteo	Categoría	Seleccionada
OSA-D1-D1	D	1	10^{-1}		—	NR	
OSA-D1-D2	D	1	10^{-2}		95	Contable	Sí
OSA-D1-D2b	D	1	10^{-2}	T	105	Contable	
OSA-D1-D3	D	1	10^{-3}		10	Baja	
OSA-D2-D1	D	2	10^{-1}		126	Contable	Sí
OSA-D2-D2	D	2	10^{-2}		10	Baja	
OSA-D2-D2b	D	2	10^{-2}	T	14	Baja	
OSA-D2-D3	D	2	10^{-3}		3	Baja	
OSA-D3-D1	D	3	10^{-1}		152	Contable	Sí
OSA-D3-D2	D	3	10^{-2}		22	Baja	
OSA-D3-D2b	D	3	10^{-2}	T	13	Baja	
OSA-D3-D3	D	3	10^{-3}		2	Baja	
OSA-D4-D1	D	4	10^{-1}		123	Contable	Sí
OSA-D4-D2	D	4	10^{-2}		31	Contable	
OSA-D4-D2b	D	4	10^{-2}	T	24	Baja	
OSA-D4-D3	D	4	10^{-3}		2	Baja	
OSA-D5-D1	D	5	10^{-1}		139	Contable	Sí
OSA-D5-D2	D	5	10^{-2}		23	Baja	
OSA-D5-D2b	D	5	10^{-2}	T	31	Contable	
OSA-D5-D3	D	5	10^{-3}		0	Cero	

H. Normalización gravimétrica — Experimento II

La Tabla S10 presenta la normalización gravimétrica a nivel de alícuota utilizada para las estimaciones de densidad del Experimento II. La masa representada en la suspensión madre se estimó como $m_{\text{aliquot}} = m_{\text{tube}} \times 0,2/1,5$, donde 0.2 mL fue el volumen de sedimento procesado y 1.5 mL fue el volumen aproximado de sedimento húmedo de campo recolectado por tubo.

I. Análisis de rarefacción — Experimento II

Las curvas de rarefacción y de extrapolación basadas en el tamaño de muestra para la riqueza observada de clústeres de morfotipos (número de Hill $q = 0$) se calcularon con iNEXT utilizando datos de abundancia, intervalos de confianza del 95 % y 200 iteraciones de *bootstrap*. La riqueza rarefactada a los tamaños de muestra observados corresponde a los conteos observados reportados en la Tabla 3; los segmentos extrapolados indican la riqueza esperada con un mayor esfuerzo de muestreo. Las curvas indican que la riqueza de clústeres de morfotipos quedó razonablemente capturada en los conteos coloniales observados.

J. Figuras estadísticas — Experimento I

Las Figuras S3 y S4 presentan los resultados gráficos estadísticos del Experimento I, que se conserva como una comparación binaria exploratoria Luz–Oscuridad.

Cuadro S10. Normalización gravimétrica a nivel de alícuota utilizada para las estimaciones de densidad cultivable en el Experimento II. m_{tube} es la masa medida de sedimento húmedo de campo en cada microtubo. m_{aliquot} es la masa estimada de sedimento húmedo de campo de la alícuota de 200 μL utilizada para preparar la suspensión madre.

Placa seleccionada	Zona	Répl.	m_{tube} (g)	m_{aliquot} (g)	Dilución	Conteo	$\log_{10}(\text{UFC g}^{-1})$
OSA-E1-D2	E	1	1.85	0.2467	10^{-2}	154	5.795
OSA-E2-D2	E	2	1.59	0.2120	10^{-2}	89	5.623
OSA-E3-D2	E	3	1.89	0.2520	10^{-2}	143	5.754
OSA-E4-D2	E	4	1.87	0.2493	10^{-2}	167	5.826
OSA-E5-D2	E	5	1.56	0.2080	10^{-2}	76	5.563
OSA-T1-D2	T	1	1.25	0.1667	10^{-2}	163	5.990
OSA-T2-D2	T	2	1.27	0.1693	10^{-2}	194	6.059
OSA-T3-D2	T	3	1.61	0.2147	10^{-2}	137	5.805
OSA-T4-D2	T	4	1.50	0.2000	10^{-2}	33	5.217
OSA-T5-D2	T	5	1.51	0.2013	10^{-2}	94	5.669
OSA-D1-D2	D	1	1.67	0.2227	10^{-2}	95	5.630
OSA-D2-D1	D	2	1.64	0.2187	10^{-1}	126	4.761
OSA-D3-D1	D	3	1.65	0.2200	10^{-1}	152	4.839
OSA-D4-D1	D	4	1.57	0.2093	10^{-1}	123	4.769
OSA-D5-D1	D	5	1.82	0.2427	10^{-1}	139	4.758

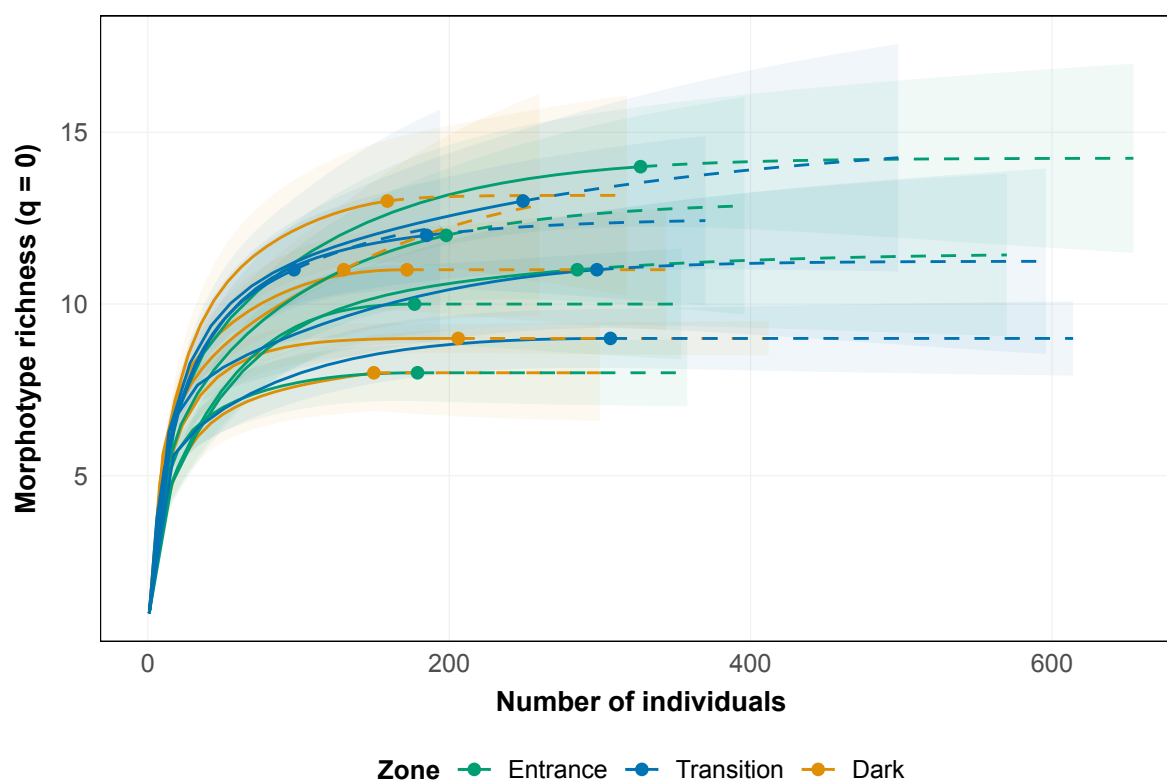


Figura S2. Curvas de rarefacción y de extrapolación basadas en el tamaño de muestra para la riqueza de clústeres de morfotipos (número de Hill $q = 0$) entre sectores del Experimento II. Cada curva corresponde a una réplica biológica; los puntos marcan los tamaños de muestra observados y los segmentos discontinuos representan la extrapolación.

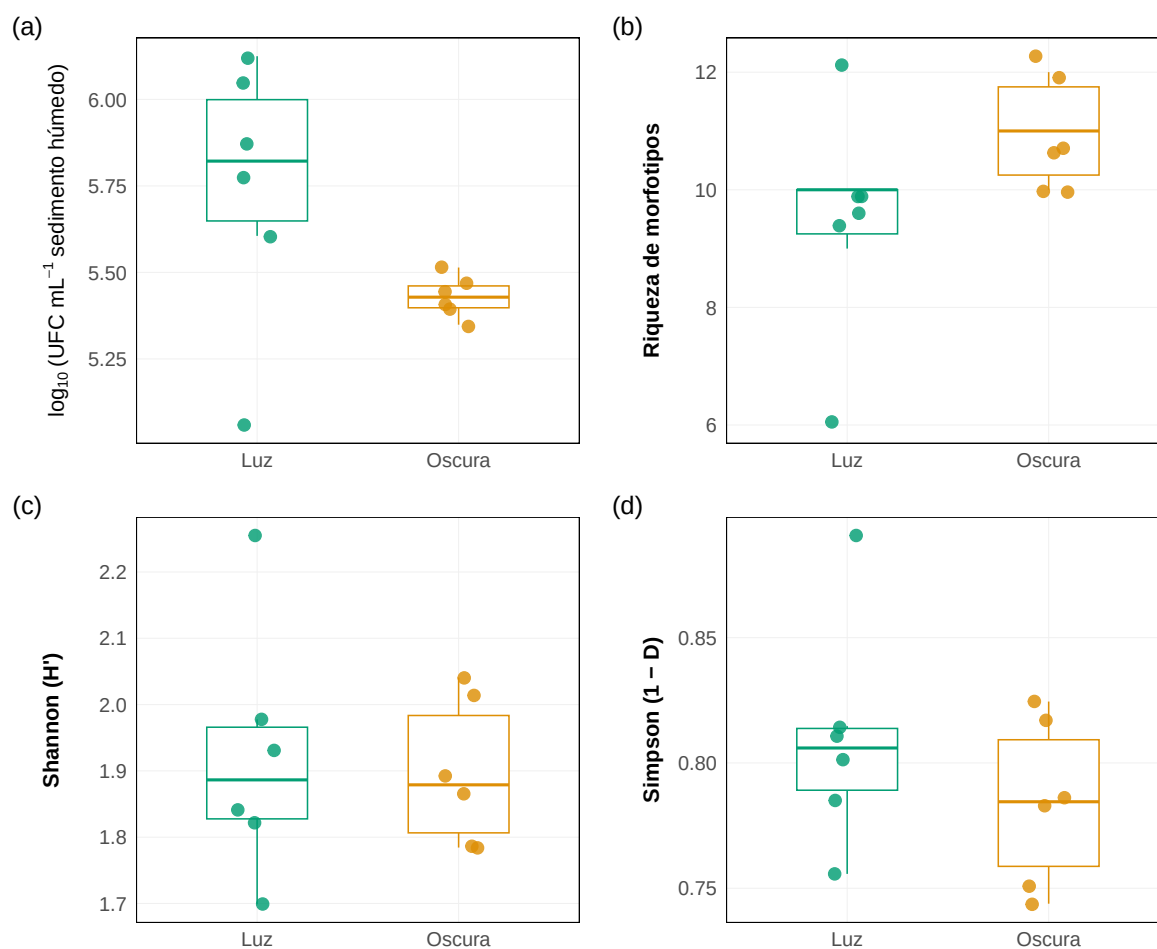


Figura S3. Densidad cultivable y diversidad local de morfotipos, Experimento I. (a) $\log_{10}(\text{UFC mL}^{-1}$ de sediment húmedo) para las categorías Luz y Oscuridad. Prueba de suma de rangos de Wilcoxon: $W = 30$, $p = 0,066$; prueba t de Welch: $t = 2,015$, $gl = 5,2$, $p = 0,098$; g de Hedges = 1,16, IC 95 % -0,10 a 2,38. (b–d) Riqueza de morfotipos, diversidad de Shannon y complemento de Simpson; ninguna métrica de diversidad alfa mostró una diferencia estadísticamente resuelta entre categorías.

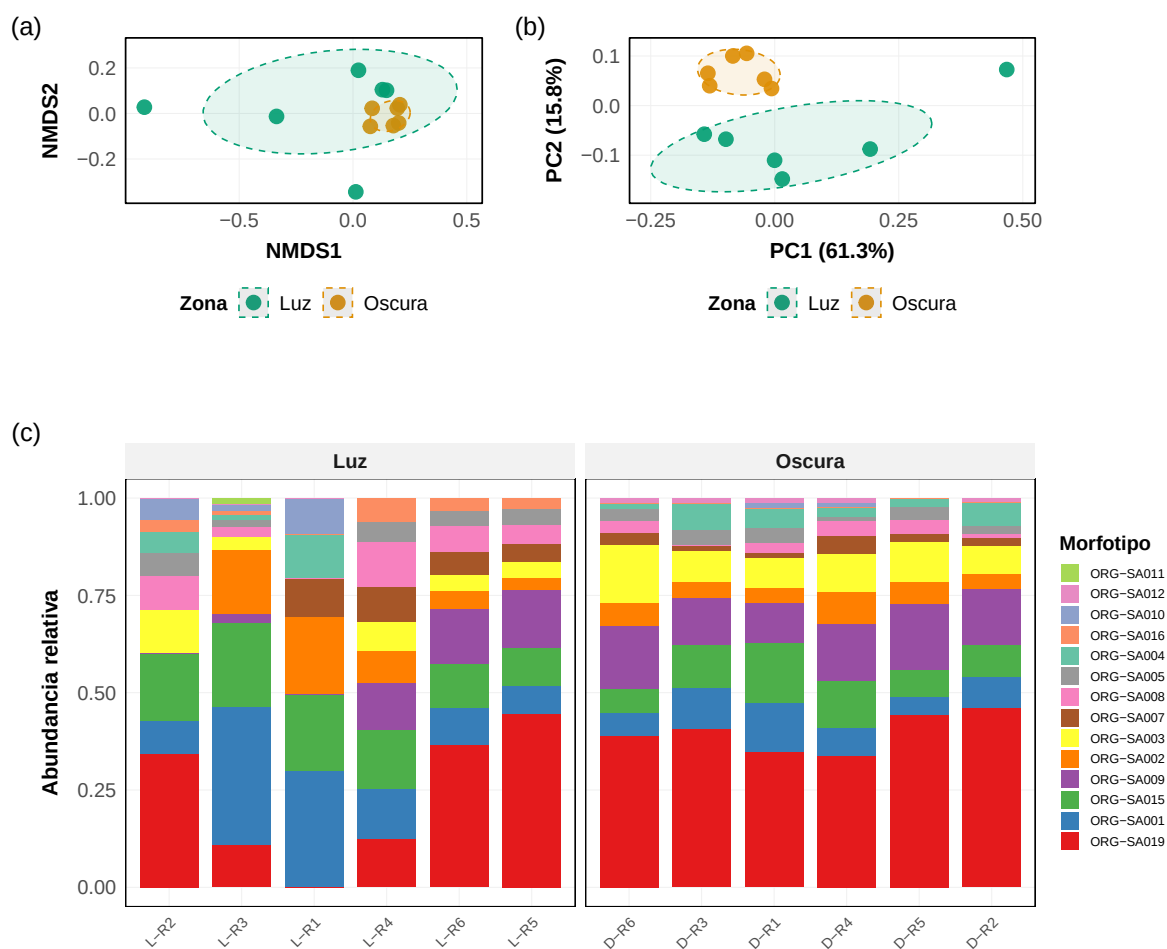


Figura S4. Estructura composicional, Experimento I. (a) Ordenación NMDS utilizando abundancias transformadas por Hellinger y disimilitudes de Bray–Curtis. PERMANOVA: $R^2 = 0,227$, $F = 2,94$, $p = 0,021$; prueba de permutación de betadisper: $F = 5,39$, $p = 0,021$. Dado que la dispersión difirió entre categorías, este resultado se interpreta de manera conservadora. (b) Ordenación PCoA. (c) Abundancia relativa de morfotipos por réplica.