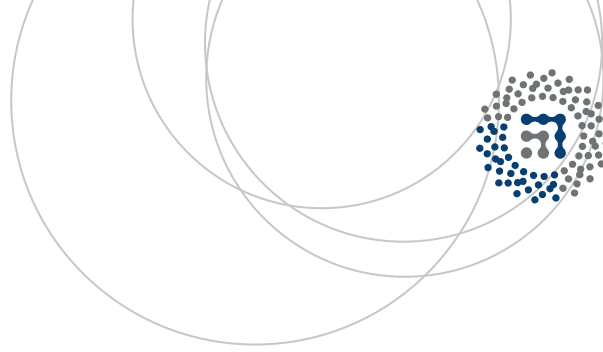


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Efectos del microhábitat y del sustrato en la distribución de tardígrados terrestres en Balmaseda (Bizkaia)

Autora:
Elena Alier Giménez
Directora:
Ibone Ametzaga
Codirectora:
Noemí Guil López

© 2016, Elena Alier Giménez

Leioa, 31 de agosto de 2016

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| <i>Resumen/Abstract</i> | 1 |
| 1. Introducción | 2 |
| 1.1. Investigaciones sobre tardígrados | 2 |
| 1.2. Patrones de distribución y abundancia | 4 |
| 1.3. Líquenes y briófitos..... | 5 |
| 1.4. Coexistencia con otros grupos animales | 5 |
| 2. Objetivo..... | 6 |
| 3. Material y métodos..... | 6 |
| 3.1. Estudio previo | 6 |
| 3.2. Estudio piloto | 6 |
| 3.2.1. Trabajo de campo..... | 7 |
| 3.2.2. Tratamiento de las muestras..... | 8 |
| 3.2.3. Recuento y clasificación de los tardígrados | 8 |
| 3.3. Estudio sobre el efecto del nicho/hábitat y sustrato | 10 |
| 3.3.1. Selección de sustratos | 10 |
| 3.3.2. Área de estudio..... | 10 |
| 3.3.3. Trabajo de campo..... | 12 |
| 3.3.4. Tratamiento de las muestras..... | 12 |
| 3.3.5. Recuento y clasificación de tardígrados..... | 12 |
| 3.3.6. Análisis estadísticos | 14 |
| 4. Resultados | 14 |
| 4.1. Densidad de tardígrados..... | 14 |
| 4.2. Proporción y diversidad de tamaño en eutardígrados | 15 |
| 4.3. Presencia de otros organismos junto a los tardígrados..... | 17 |
| 5. Discusión..... | 18 |
| 6. Conclusiones | 20 |
| 7. Agradecimientos..... | 21 |
| 7. Bibliografía..... | 21 |
| <i>ANEXOS</i> | 25 |

Resumen

El conocimiento sobre los tardígrados (*phylum* Tardigrada) ha acumulado un gran retraso respecto a lo que se sabe de otros muchos microinvertebrados a pesar de su interés y potencial. Este retraso se da fundamentalmente en aspectos relacionados con su autoecología. El objetivo de este estudio consistió en analizar el efecto que ejerce el microhábitat (liquen o comunidad de musgos) y el sustrato en que éste se encuentra (corteza de árbol, metal o piedra) en la abundancia de tardígrados (eutardígrados y heterotardígrados). También se analizó el efecto de estas variables en la diversidad de tamaños de los individuos. El estudio consistió en tres fases: un estudio previo exploratorio; un estudio piloto de entrenamiento; y el estudio propiamente dicho del efecto del microhábitat y sustrato en la abundancia y tipología de tardígrados. En esta última fase se recolectaron 30 muestras de los líquenes *Xanthoria parietina* y *Physcia adscendens* y de ciertas comunidades de musgos en los sustratos mencionados, en las que se contabilizó el número, clase y tamaño de tardígrados. Los resultados mostraron que el sustrato puede ejercer un efecto en la clase predominante de tardígrados y en la diversidad del tamaño de los eutardígrados: los heterotardígrados fueron más abundantes en sustratos de piedra que en corteza de árbol; los eutardígrados fueron más abundantes en sustratos de metal que en piedra; la variabilidad de tamaños de eutardígrados fue mayor en sustratos de metal que en los de piedra y corteza. El microhábitat no reflejó ningún efecto significativo ni en la abundancia ni en la diversidad de tamaños de eutardígrados. Una réplica del estudio con mayor número de muestras, identificación de especies y teniendo en cuenta otras variables microambientales sería necesaria.

Abstract

Despite their interest and potential, there is a significant backlog of knowledge about tardigrades with respect to what is known about other microinvertebrates. This backlog mainly occurs in relation to their autoecology. The aim of this work was to analyse the effect of the microhabitat (lichen and moss community) and the substrate on which is located (tree bark, metal or rock) on the abundance of tardigrades (eutardigrades and heterotardigrades). Moreover, the effect of these variables on the tardigrades size diversity was also analysed. To that end, the research consisted in three stages: an exploratory study; a pilot training study; and the actual study of the effect of the microhabitat and the substrate on the abundance and typology of tardigrades. In this last phase, 30 samples of *Xanthoria parietina* and *Physcia adscendens* lichens and some moss communities were collected from the above mentioned substrates. In these samples the number, class and size of tardigrades were recorded. The obtained results showed a possible effect of the substrate on the main classes of tardigrades and the size diversity of eutardigrades: heterotardigrades were more abundant on rocky substrates than tree bark; eutardigrades were more profuse on metal substrates than rocky ones; size diversity of eutardigrades was highest on metal substrates. Regarding the microhabitat, it showed no significant effect on neither the abundance nor the size diversity of eutardigrades. Consequently, a replica of this study, with a larger

sample number and species identification, and bearing in mind other microambiental variables would be necessary.

1. Introducción

Los tardígrados (latín *Tardus*, “lento”; *gradus*, “paso”) son un grupo de invertebrados microscópicos con características compartidas con onicóforos, artrópodos y nematodos, pero no clasificables en ninguno de estos grupos. Se consideran un filo independiente, el *phylum* Tardigrada. Se trata de un antiguo linaje de microinvertebrados con una longitud media entre 0,250 y 0,500 mm, con unas pocas especies que exceden los 0,500 mm y pueden alcanzar 1,2 mm (Nelson y Marley 2000); con un cuerpo ovalado y un patrón metamérico único que consiste en una cabeza y cuatro segmentos con dos patas retráctiles terminadas en grandes uñas en cada uno de ellos (Ramazzotti y Maucci 1983). En base a las características morfológicas el filo se divide en dos clases principales: Heterotardígrada y Eutardígrada. Una tercera clase, Mesotardígrada, está basada en una única especie y no existe consenso en su mantenimiento como taxón independiente (Nelson 2002). De momento se han identificado 1.200 especies (Zawierucha *et al.* 2016).

Una de las características más llamativas de este filo es su poder de criptobiosis (estado de latencia que implica una importante reducción de actividad metabólica durante las condiciones ambientales desfavorables) y que puede estar causado por distintos factores ambientales (por ejemplo, por bajas temperaturas, denominado criobiosis, por desecación, anhidrobiosis, o por falta de oxígeno, anoxobiosis) (Ramazzotti y Maucci 1983). En el caso de la anhidrobiosis, la criptobiosis les permite “enquistarse” en situaciones de sequía: recogen sus patas, pierden agua corporal y adoptan una forma esférica que supone la de mayor resistencia y que se denomina *tun* (tonel). Es este estado el aspecto más llamativo de los tardígrados ya que les permite resistir situaciones adversas que raramente aparecen en la naturaleza, como por ejemplo, temperaturas superiores a 150°C e inferiores a -270°C (cerca del cero absoluto) (Crowe 1971), radiaciones de rayos X y rayos ultravioletas hasta 1.140 veces la dosis letal para el ser humano (May, Maria y Guimard 1964), presiones hasta 6 veces la presión que hay a 10.000 metros de profundidad y entornos tóxicos diversos (Beltrán y Bernal 2009).

1.1. Investigaciones sobre tardígrados

El estudio científico de los tardígrados no comenzó hasta 1773. Este retraso, junto con la dificultad de trabajar, manipular y estudiar organismos microscópicos (que no ha promovido la creación de escuelas para su estudio), ha hecho que el conocimiento sobre lo que son, cómo son y cómo han evolucionado los tardígrados haya acumulado un gran retraso respecto a lo que se sabe de otros muchos organismos, a pesar de su interés y potencial (Guil 2002). El mayor conocimiento se ha desarrollado en tardígrados limnoterrestres, que incluyen tanto a los dulceacuícolas como a los denominados terrestres. Éstos

incluyen tanto a los “muscícolas” (según Glime (2013), término demasiado genérico ya que se incluyen en este grupo también a los habitantes de hepáticas, líquenes, helechos y fanerógamas de tipo “almohadillado”) y a los tardígrados del suelo (hasta los 5-10 cm de profundidad) (Ramazzotti y Maucci 1983). A pesar de la denominación de “tardígrados terrestres” siempre se encuentran en sustratos húmedos ya que requieren espacios intersticiales con la existencia de una película de agua (Hallas 1978; Garey *et al.* 2008). Hay relativamente pocos estudios sobre tardígrados marinos, aunque éstos indican una alta diversidad morfológica (Renaud-Mornant 1988), dado que existen muy pocos investigadores a nivel mundial (en el último Symposium sobre tardígrados se contabilizaron cuatro; N. Guil, com. pers.).

Los estudios sobre el *phylum* Tardigrada se centran principalmente en su taxonomía (Guil 2008) y posición filogenética dependiendo de sus caracteres morfológicos o moleculares (Nielsen 1995; Guil *et al.* 2013), procesos de criptibiosis (Crowe y Crowe 2000), tolerancia a extremos ambientales y radiación en el espacio (Rizzo *et al.* 2015) y sus potenciales implicaciones biotecnológicas y biomédicas (Crowe y Crowe 2000; Eroglu *et al.* 2000; Beltrán y Bernal 2009). Son escasos los trabajos de investigación en relación a su autoecología (Guil 2009).

En la Península Ibérica los estudios sobre tardígrados son todavía más escasos. Alrededor de la mitad del siglo XX, A. X. Da Cunha comenzó a estudiar los tardígrados de Portugal y J. Rodríguez-Roda los de España. Hasta 2008 sólo se habían publicado 37 artículos, principalmente relacionados con taxonomía y análisis faunísticos (Guil 2008; Guil y Guedetti 2005). Se han identificado al menos 98 especies en la Península Ibérica (Guil 2002) y tan sólo 4 en un total de 5 registros en el País Vasco (Rodríguez-Roda 1946; Guil 2002). Una completa revisión de los estudios llevados a cabo en la Península indica la escasa investigación llevada a cabo en la mayor parte del territorio, a excepción de Portugal, Madrid y Cataluña (Guil 2002) (Figura 1).

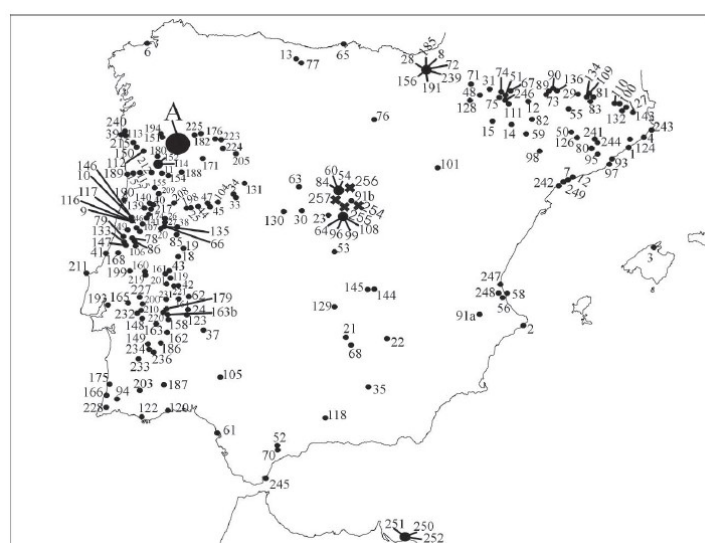


Figura 1. Localidades en la Península Ibérica, Islas Baleares e Islas Chafarinas donde se han encontrado tardígrados. Tomado de Guil 2002.

1.2. Patrones de distribución y abundancia

Los tardígrados se distribuyen a lo largo de todos los continentes, habitando en la mayoría de ecosistemas marinos, dulceacuícolas y terrestres, desde elevadas altitudes en picos montañosos hasta desiertos polares y en profundidades como las fosas oceánicas (Zawierucha *et al.* 2015). A pesar de eso, los requerimientos de su hábitat permanecen escasamente conocidos. Las observaciones son muy limitadas en amplias regiones como Asia, África, Sudamérica y Australasia (McInnes 1994) y en Estados Unidos no hay registros en 16 estados (Glime 2013).

Las especies que habitan los medios marinos y salobres suelen pertenecer a la clase Heterotardigrada (Nelson 1982), las especies dulceacuícolas pertenecen casi exclusivamente a la clase Eutardigrada y en los medios terrestres viven especies tanto de eutardígrados como de heterotardígrados (Nelson y Higgins 1990).

Existe un cierto número de trabajos que estudian los patrones de distribución de abundancias de los tardígrados, pero no existen datos concluyentes (Guil 2008; Guil y Cabrero-Sañudo 2007; Glime 2013). Se reportan datos tan variables como los 300.000 tardígrados/m² estimados por Franz (1952) y los contabilizados por Ito (1999) que oscilan entre 8.050 y 75.500 tardígrados/m². Brusca y Brusca (2005) proponen un valor medio de 22.000 tardígrados/g de peso seco en musgos. En cualquier caso, la densidad de los tardígrados terrestres se sitúa a la altura de otros grupos de artrópodos dominantes en las poblaciones, como los ácaros oribátidos o los colémbolos en el suelo (Nelson Nelson y Higgins 1990). En general estos estudios indican que la densidad de las poblaciones es muy variable y no se conocen las condiciones mínimas ni las óptimas para el crecimiento de estas poblaciones (Kinchin 1994). Lo que se ha observado en todos estos trabajos es que existen considerables diferencias entre microhábitats aparentemente idénticos (tanto en abundancia como en diversidad de especies), existiendo una microdistribución en “parches” (Nelson y Marley 2000; Guil 2002). Aunque parece un efecto del azar en la dispersión (Nelson 2002), se han encontrado efectos de distintas variables en la densidad de tardígrados.

Las iniciativas llevadas a cabo para dilucidar estas posibles diferencias consisten en unos pocos trabajos que se centran variables como la altitud (Rodríguez Roda 1951; Beasley 1988; Collins y Bateman 2001), la insolación y velocidad del viento (Ramazzotti y Maucci 1983; Wright 1991), la temperatura y la humedad (Morgan 1977), la disponibilidad de alimento (Hallas y Yates 1972), las relaciones de competencia, depredación o parasitismo de los tardígrados entre sí y con otros grupos (Nelson y Marley 2000), comparaciones entre musgos, líquenes, hojarasca o fanerógamas (Ramazzotti y Maucci 1983; Wright 1991) o comparaciones entre especies de musgo (Bertolani 1983; Hoffmann 1987; Nichols 1999). Son pocas las conclusiones generales a las que se ha podido llegar en estos estudios.

1.3. Líquenes y briófitos

La mayor parte de la bibliografía sobre hábitats de los tardígrados procede de investigaciones sobre ecología de briófitos. Líquenes y briófitos son el refugio ideal para una amplia variedad de organismos ya que mantienen la temperatura y humedad (Glime 2013), y proporcionan microespacios ideales para las puestas de huevos y protección de larvas frente a la desecación y los depredadores. Por lo tanto, se trata de organismos de los que dependen una amplia variedad de microinvertebrados. Diferentes estudios han abordado la medida en que diferentes briofitos albergan distintas especies animales (Davis 1981; Learner *et al.* 1990), pero aún se sabe poco de las diferencias entre las comunidades de las que son hospedadoras. Como los briófitos se desecan y/o congelan en ocasiones, uno de los rasgos para poder sobrevivir en los briófitos es que se tenga la capacidad para lograr un estado criptobiótico, como es el caso de los tardígrados (Glime 2013).

En cuanto al valor nutricional de líquenes y briófitos, tradicionalmente se consideraba que era escaso o nulo, pero son parte del alimento de la fauna que albergan. Esta calidad nutricional podría ser una variable diferencial en la clase y densidad de tardígrados que en ellos se encuentran (Glime 2013).

1.4. Coexistencia con otros grupos animales

Una variable que parece influir en la abundancia de tardígrados es la fauna asociada que coexiste en estos microhábitats. Algunas especies se alimentan de algas, del propio líquen/musgo, protozoos, bacterias, detritus orgánico, etc. Otras especies son depredadoras y se alimentan de los fluidos corporales de pequeños metazoos como nematodos, rotíferos u otros tardígrados (Hallas y Yeates 1972). A su vez los tardígrados son depredados por otros grupos como colémbolos, nematodos, ácaros, arañas y larvas de insecto (Ramazzotti y Maucci 1983; Dastyh 1988). Conocer las especies que se encuentran en los mismos microhábitats puede ser importante para encontrar diferencias en cuanto a la diversidad de tardígrados.

Las investigaciones sobre el efecto de diferentes especies de musgo no muestran diferencias en abundancia (Bertolani 1983), pero sí se han encontrado diferencias en cuanto al número de especies (Horning *et al.* 1978). Sin embargo, no se ha comparado el efecto en abundancia de diferentes especies de líquenes, ni tampoco si existe efecto del sustrato en que tanto líquenes como musgos se desarrollan. Glime (2013) señala que las investigaciones pocas veces nombran las especies de briofitos y líquenes en los que encuentran los tardígrados que están estudiando. En general se diferencia entre “musgos”, líquenes, hojarasca o fanerógamas, incluyendo todas las clases, géneros y especies en cada una de estas categorías.

2. Objetivo

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es analizar el efecto que ejerce el microhábitat (líquen o comunidad de musgos) y el sustrato en que éste se encuentra (corteza de árbol, metal o piedra), en la abundancia de tardígrados (eutardígrados y heterotardígrados).

3. Material y métodos

La realización del estudio se llevó a cabo en tres etapas. Un estudio previo en el que a lo largo de varios meses se realizaron observaciones aleatorias como forma de aproximación a la localización de tardígrados; un estudio piloto de entrenamiento en la recolección y manipulación de tardígrados así como para seleccionar microhábitats con un efecto potencial en la abundancia y tipología de tardígrados; y finalmente el estudio del efecto de distintos tipos de microhábitat y sustratos en la abundancia y tipología de tardígrados.

3.1. Estudio previo

La literatura no recoge todos los detalles del método estándar para la recolección, manipulación y conservación de muestras de tardígrados. Además, dicho método estándar requiere un periodo de práctica en el manejo de las muestras y en la observación y recuento de las mismas. Por este motivo, entre marzo de 2014 a diciembre de 2015 se recogieron muestras aleatorias de distintos tipos de líquenes y musgos, así como de distintos sustratos (piedra, metal, corteza de árbol), y en localidades muy diversas en cuanto a su altitud, humedad, temperatura y vegetación asociada (Madrid, Alicante, Cambridgeshire, Bizkaia, La Rioja y Araba). Se buscaron tardígrados *in vivo* en cada una de ellas mediante microscopía (BMS 037 LED Pro). Estas observaciones pusieron de manifiesto notables diferencias en la abundancia en las distintas muestras. Se hicieron pruebas con distintos tipos de agua para tratar las muestras (de grifo, destilada natural, destilada embotellada y sin cloro), y con distintos tiempos de inmersión de las muestras por si estas variables afectaban a los estados de criptobiosis de los tardígrados no encontrando efectos evidentes. Tras estos primeros ensayos aleatorios de tipo exploratorio y para sistematizar las observaciones, se procedió a desarrollar un estudio piloto comparando muestras homogéneas y con una metodología estándar. El estudio se realizó entre marzo y mayo de 2016.

3.2. Estudio piloto

Se seleccionaron aquellos microhábitats (líquenes y musgos) que cumpliesen con los siguientes requisitos: haber mostrado aparentes diferencias entre ellos en cuanto al número y variedad de tardígrados en las observaciones previas; crecer lo más próximos posible entre ellos para disminuir el efecto de otras variables del entorno; ser fáciles de recoger; y tener un aspecto homogéneo.

Se recogieron un total de 42 muestras de los siguientes géneros: 12 muestras de *Xanthoria* (Fr.) Th. Fr. con crecimiento en piedra (2 muestras), metal (4 muestras) y corteza (6 muestras); 11 muestras de *Physcia* (Schreb.) Michaux con crecimiento en piedra (1 muestra), metal (4 muestras) y corteza (6 muestras); 3 muestras de *Pannaria* Del. ex Bory con crecimiento en piedra; 9 muestras de *Flavoparmelia* Hale con crecimiento en corteza (4 muestras), piedra (4 muestras) y metal (1 muestra); 4 muestras de *Orthotrichum* Hedw. con crecimiento en piedra (2 muestras) y corteza (2 muestras); 1 muestra de *Evernia* Ach. con crecimiento en corteza; y 5 muestras de mosaicos de diversas especies de musgo formando comunidades en forma de almohadillas con crecimiento en piedra (2 muestras) y corteza (2 muestras), y en raras ocasiones, en metal (1 muestra). Conviene señalar que los géneros *Xanthoria* y *Physcia* crecen juntos formando mosaicos con elevada frecuencia. La identificación de estos géneros se realizó con la Guía de campo de los helechos, musgos y líquenes de Europa (Jahns 1982).

Todas las muestras fueron recogidas y tratadas siguiendo los métodos estándar establecidos para el examen de tardígrados (Ramazzotti y Maucci 1983; Guil 2004), tal como se describe a continuación.

3.2.1. Trabajo de campo

La recogida de las muestras se realizó los días 17/4/2016, 29/4/2016, 3/5/2016 y 7/5/2016 de mayo de 2016. Se aseguró que en las 24 horas previas a la recogida de las muestras no hubiese llovido para evitar que las muestras estuviesen lavadas.

Para la recogida se utilizó una cuadrícula de madera de 3x3 cm (Figura 2). Esta superficie de muestreo se eligió en base a un compromiso entre esfuerzo y resultados determinado por Guil (2009) mediante simulación por ordenador. En el caso de los líquenes y musgos con un tamaño inferior al de la cuadrícula, la forma de proceder fue colocar la cuadrícula sobre una superficie de papel y rellenarla con los fragmentos de líquen o musgo hasta cubrir el tamaño de la misma.

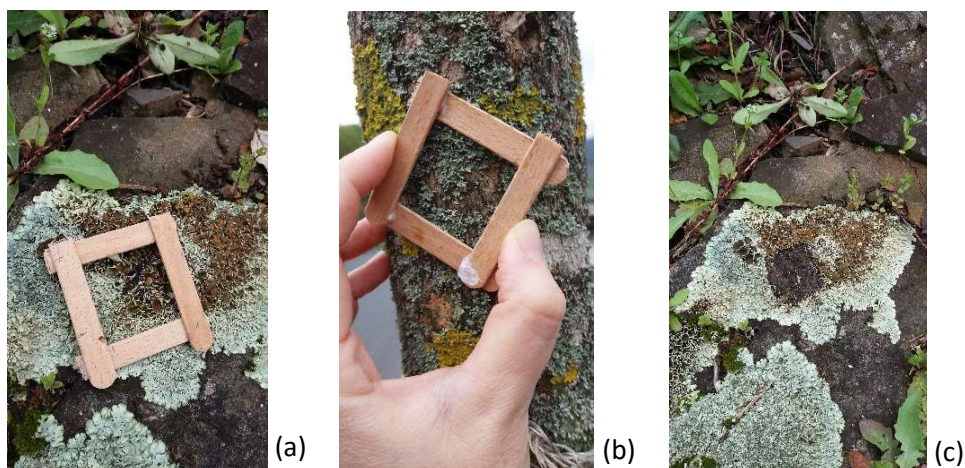


Figura 2. Cuadro de muestreo de 3x3 cm utilizado sobre piedra (a) y sobre corteza de árbol (b); estado de la piedra tras la extracción de la muestra (c).

El material seleccionado se separó del sustrato con una pequeña espátula procurando extraer la menor cantidad posible de materia que no fuera propiamente líquen o musgo. El impacto producido al raspar con la espátula en el sustrato al obtener la muestra hacía que parte de la misma (y por tanto parte de individuos) saliese despedida y se perdiese. Esto se tuvo en cuenta para modificar el procedimiento de extracción en el estudio posterior. Todas las muestras se introdujeron en botes de muestra de 50 ml con tapa de rosca debidamente etiquetados e identificados. Cada vaso contenía 25 ml de agua destilada para asegurar que la muestra quedase totalmente cubierta por el líquido.

3.2.2. Tratamiento de las muestras

Las muestras se mantuvieron un período de entre 15 y 26 horas de inmersión (las muestras se airearon 3 veces en ese periodo de tiempo para evitar anoxobiosis en los tardígrados) para permitir que los tardígrados saliesen del estado de criptobiosis en caso de estarlo. Posteriormente se procedió a la separación de las muestras mediante tamizado y su preparación para el recuento.

Se utilizó un doble tamiz de luz de malla de 0,125 mm y 0,063 mm. La malla de 0,063 mm deja pasar partículas que dificultan la observación pero evita que se pierdan los individuos de menor tamaño. La malla de 0,125 mm excluye a los individuos de mayor tamaño, pero deja la muestra lo suficientemente limpia como para facilitar el trabajo para un experimentador novel en fase de entrenamiento. Cada muestra se colocó en la parte superior de este doble tamiz y se lavó con abundante agua de grifo.

Las muestras que quedaban recogidas en el tamiz de 0,063 mm, se volcaron en un vaso de precipitados. Para no dejar restos en la malla se enjuagó desde el envés del tamiz asegurando una recogida lo más completa posible del material. Posteriormente se pasó todo el material con el agua del enjuague por un embudo con filtro de papel y el material retenido en dicho filtro se introdujo en botes con líquido Carnoy (alcohol 96°/97° y ácido acético en proporción 3:1 respectivamente) (Guil 2009). Las muestras permanecieron en dicho líquido un mínimo de 24 horas hasta su recuento.

Los restos de los musgos/líquenes recolectados y lavados que se habían quedado en el primer tamiz (0,125 mm) se dejaron escurrir en papel de filtro a temperatura ambiente y se pesaron para calcular el Peso Fresco (PF). Se utilizó una balanza de precisión (Denver APX 203 con un error de ± 0.002 g). Posteriormente se introdujo en una mufla a 60° durante 48 horas para calcular el Peso Seco (PS). Finalmente se pusieron a 400° durante 24 horas para calcular el Peso Seco Libre de Cenizas (PS-PC=PSLC).

3.2.3. Recuento y clasificación de los tardígrados

Para el recuento del número de individuos de cada muestra se utilizó una lupa binocular Nikon SMZ800 de hasta 65 aumentos. Se trabajó con 30 aumentos ampliando sólo en el caso de necesitar detalles en

caso de dudas. Se llevaron a cabo diferentes sistemas de conteo en función de la nitidez de la muestra y la cantidad de individuos que se iban encontrando.

El recuento se realizó directamente en el líquido de Carnoy, vertiendo todo el contenido de los botes en una placa de Petri. Dada la volatilidad del líquido de Carnoy y las corrientes convectivas que genera, dicho recuento en las muestras con abundante material en suspensión resultó altamente complicado. Para facilitar esta tarea, la placa de Petri se colocó sobre una base negra cuadrículada (fabricada exprofeso tras varias pruebas con diferentes tipos de base) (Figuras 3a y 3b) y se rastreó cuadrícula a cuadrícula (100 cuadrículas centrales más 52 cuadrículas circundantes, la mitad de ellas incompletas). Se separó cada partícula examinada con una aguja enmangada y se anotó el número de individuos observados etiquetándolos según la tipología correspondiente en función de los criterios que se explican posteriormente (Figuras 3c y 3d). Si la materia en la cuadrícula estaba apelmazada se agitaba bien para asegurar que no quedase ningún individuo oculto adherido a la misma. En el caso de las muestras excesivamente sucias el material a observar se dividió en dos, tres, cuatro o cinco fracciones (según grado de suciedad). En estos casos la abundancia de individuos fue muy aproximada en cada una de las fracciones (observación personal).

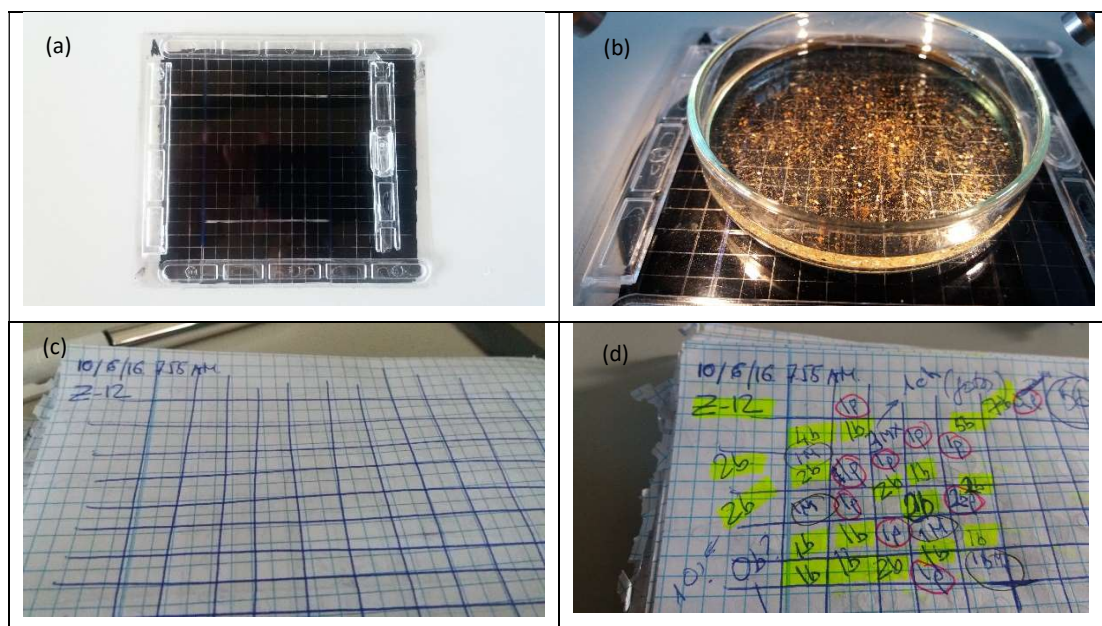


Figura 3. Cuadrícula base fabricada para guiar el recuento en lupa (a); ejemplo de una de las muestras a analizar sobre la cuadrícula (b); plantilla de recuento con identificación de la muestra, fecha y hora de recuento (c); plantilla de recuento con las anotaciones en el primer cuadrante con códigos de clasificación.

La clasificación de los individuos a nivel de género y especie resultó inviable en este estudio. Se requiere disponer de líquido Faure en el que mantener las muestras durante al menos 15 días (Ramazzotti y Maucci 1983; Guil 2004), además de una destreza en la captura de los individuos y la identificación de los caracteres diagnósticos. Si se pudo clasificar a nivel de clase entre Heterotardigrada y Eutardigrada,

así como clasificar por tamaño. Esto último se consideró adecuado para los eutardígrados dado que algunas de las muestras presentaban individuos de tamaños semejantes, mientras que en otras se encontraban en tamaños llamativamente diversos (“micro”, “pequeños”, “estándar”, “grandes” y “extragrandes”). La posibilidad de que esta variedad se debiese exclusivamente a juveniles parece poco probable dada la amplia gama y la inexistencia de variedad en otras muestras. Se decidió tomar en cuenta esta variabilidad como un indicador alternativo de riqueza.

3.3. Estudio sobre el efecto del microhábitat y sustrato

3.3.1. Selección de microhábitats y sustratos

Se seleccionaron tres microhábitats diferentes: dos tipos de líquen y una comunidad de briófitos. En la zona de muestreo cohabitan de forma sistemática las especies *Xanthoria parietina* (s.l., ya que en ocasiones puede ser *X. polycarpa*) y la especie *Physcia adscendens* (como la más habitual de su género). En cuanto a los briófitos, se recogieron muestras de *Orthotrichum* spp. en sustratos de corteza, mientras que en los sustratos pétreos las muestras fueron comunidades constituidas por los géneros *Hypnum* L., *Bryum* Hedw. y *Ditrichum* Hampe. En estas comunidades en que se alternan géneros con crecimiento agrupado es impracticable abordar cada uno de ellos de forma separada ya que crecen de forma almohadillada como si se tratase de un mismo individuo. Para referirnos tanto a estas agrupaciones como al género *Orthotrichum* lo haremos de forma genérica como “musgo”. La determinación específica de los líquenes y briófitos se realizó con la colaboración de la Dra. Isabel Salcedo del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

Los tres tipos de microhábitat crecen formando mosaicos en ramas y cortezas de troncos de árbol (corteza). Los dos líquenes también crecen como mosaicos en sustratos metálicos como barandillas, pero no los musgos. Sin embargo, estas barandillas están siempre ancladas en sustrato de piedra donde sí crecen estos musgos, compartiendo por lo tanto las condiciones macroambientales. En cuanto a la corteza se trató siempre de troncos de árboles vivos de las especies *Liquidambar styraciflua* L., *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton y *Ulmus pumila* L.. La base metálica consistió en barandillas con un elevado componente de óxido por el paso del tiempo y la exposición al medio.

Se recogieron 5 réplicas para cada una de las 6 condiciones experimentales *X. parietina* sobre metal, *Ph. adscendens* sobre metal, musgo sobre piedra, *X. parietina* sobre corteza, *Ph. adscendens* sobre corteza, musgo sobre corteza.

3.3.2. Área de estudio

El área de estudio está localizada en el Municipio de Balmaseda (Área Funcional de Balmaseda-Zalla (Encartaciones), en Bizkaia, al norte de la Península Ibérica (Figura 4). Se trata de un territorio

fuertemente montañoso vinculado directamente con el corredor del Cadagua. A pesar de que Las Encartaciones poseen uno de los mayores valores de diversidad biológica de Bizkaia, la vegetación potencial de grandes bosques ha desaparecido quedando relegada a masas discontinuas de bosque mixto atlántico, de robles, encinares cantábricos, fresnos, hayedos y alisedas. La precipitación media anual es de 1,316 mm; durante los meses más cálidos, la temperatura media anual es de 24,1 °C, y en los meses más fríos es de 3,2 °C. La temperatura media anual es de 12,5 °C.

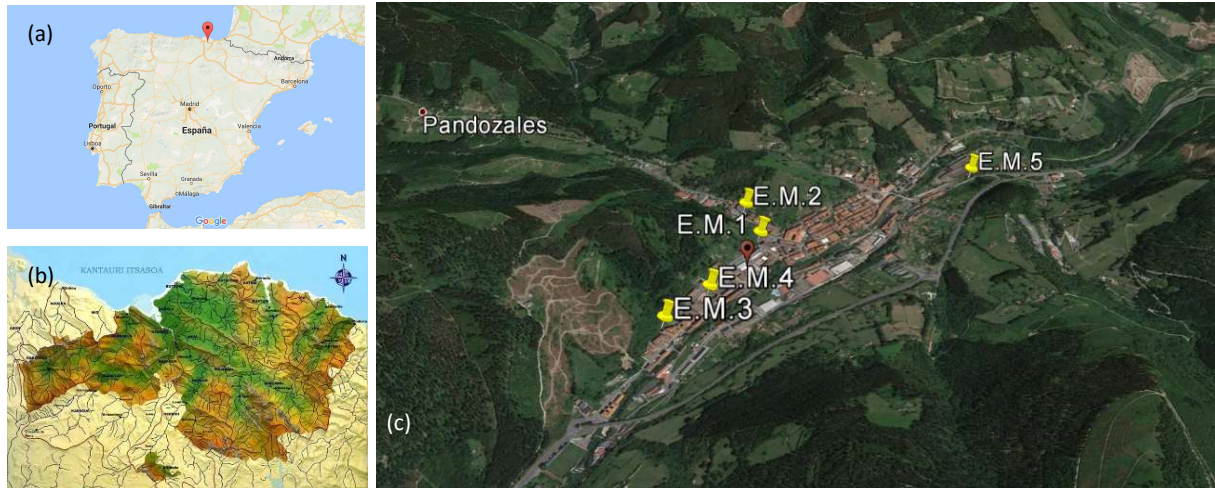


Figura 4. Mapas del área de estudio. Situación de Bizkaia respecto a la Península Ibérica (a); situación de Balmaseda en Bizkaia (b); localización de las Estaciones de Muestreo en el Municipio de Balmaseda.

Se seleccionaron 5 Estaciones de Muestreo (E.M.), todas ellas en el interior de la población en zonas ruderales en el límite con las explotaciones agrarias o forestales. En todas ellas existe paso continuado de vehículos motorizados y presencia de polvo de tierra. Todas las muestras estaban expuestas a la radiación directa del sol y a periodos de sequía. Las localizaciones de cada estación se recogen en la Tabla 1. En todas las estaciones de muestreo a excepción de la E.M. 3 se obtuvieron dos réplicas de cada sustrato, mientras que en la E.M. 3 sólo se obtuvo una réplica dado que la cantidad de líquen era escasa y no había puntos lo suficientemente alejados como para considerar que las réplicas fuesen independientes.

Tabla 1. Coordenadas GMS (latitud; longitud) y altitud de las cinco Estaciones de Muestreo del estudio.

| E.M. | Coordenadas GMS y altitud |
|------|--------------------------------------|
| 1 | 43°11'36.03" N; 3°11'53.78" O; 155 m |
| 2 | 43°11'41.42" N; 3°11'57.09" O; 165 m |
| 3 | 43°11'22.00" N; 3°12'05.17" O; 159 m |
| 4 | 43°11'50.23" N; 3°11'06.41" O; 147 m |
| 5 | 43°11'49.43" N; 3°11'18.08" O; 147 m |

3.3.3. Trabajo de campo

La recogida de las muestras se realizó el día 16 de mayo de 2016, entre las 18:46 horas y las 21:05 horas. La semana previa el tiempo osciló entre nubes, claros y lluvias suaves (ninguna torrencial), y 32 horas antes de la recogida de las muestras no hubo precipitación. Se siguió el mismo procedimiento explicado para el estudio piloto, con la diferencia de que en este caso el material seleccionado se humedecía previamente con un vaporizador con agua destilada para facilitar la recogida y evitar la pérdida de individuos por impacto en la extracción. También en este caso se controló la cantidad de agua destilada añadida en cada recipiente de muestreo: 15 ml en el caso de los líquenes y de 20 ml en el de los musgos debido al mayor volumen de estos últimos.

3.3.4. Tratamiento de las muestras

El tratamiento se realizó de igual forma que en el estudio piloto. En este caso se sustituyó la de luz de malla de 0,125 por una de 0,800 mm para no dejar fuera los individuos de mayor tamaño (Ramazzotti y Maucci 1983) y se mantuvo la de 0,063 mm.

3.3.5. Recuento y clasificación de tardígrados

El recuento se llevó a cabo en agua destilada (sustituyendo al líquido de Carnoy) para evitar la volatilidad y las corrientes convectivas. Cada una de las muestras se vertió en una placa de Petri, aclarando bien el vaso con agua destilada para asegurar que se transvasaba toda la materia. Antes del recuento en la placa ésta se agitaba en círculos para aglomerar la materia en el centro dado que el recuento en borde es más impreciso. Se anotaba el número y tipo de tardígrados en cada cuadrante, indicando si era heterotardígrado o eutardígrado y éstos últimos se clasificaron por tamaño en las categorías “micro”, “pequeño”, “mediano”, “grande” o “extragrande” (con medidas aproximadas de menor de 0,080 mm, entre 0,080 y 0,125 mm, entre 0,125 y 0,225 mm, entre 0,225 y 0,450 mm o mayores de 0,500 mm). En el caso de los heterotardígrados no se apreciaron diferencias considerables en cuanto a su tamaño, por lo que se consideran como un único tipo dentro de la clase (Figura 5). Se anotó la presencia de otros organismos: nematodos, rotíferos, ácaros oribátidos, colémbolos, huevos de arácnido y otros cuya clasificación se desconocía. La forma de contabilizar estos organismos se realizó siguiendo un método semicuantitativo con rangos de 0 a 4, siendo 0 = ausencia, 1 = presencia (1 a 5 individuos), 2 = más de 5 individuos pero no 1 individuo por cuadrícula, 3 = aproximadamente 1 individuo por cuadrícula, y 4 = más de un individuo por cuadrícula.

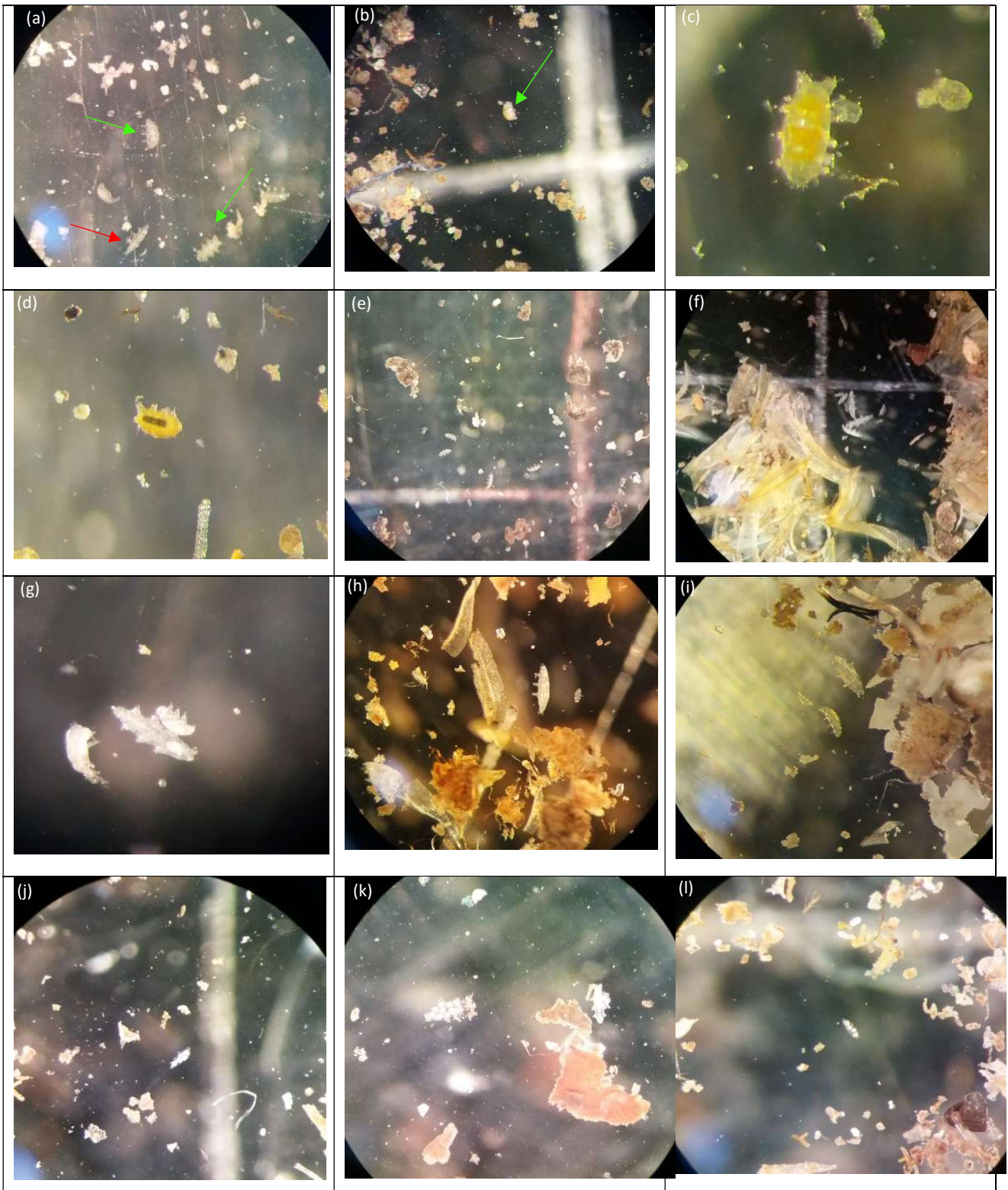


Figura 5. Clases y tamaños de tardígrados. Muestra con eutardígrados (flecha roja) y heterotardígrados (flecha verde)(a); heterotardígrados (b)(c)(d); muestra con eutardígrados de tamaño equivalente (e); distintos tamaños de eutardígrados (f)(g)(h)(i); cutículas con huevos (j)(k)(l).

3.3.6. Análisis estadísticos

El número de tardígrados encontrado en cada muestra fue extrapolado para un gramo de PSLC para calcular la densidad total. Previamente se comprobó que la correlación entre el peso de la muestra (tanto en PF como en PSLC) y el número de individuos no era significativa (Rho de Spearman, $r = 0,257$; $p = 0,171$) (Zawierucha 2016). Dado que los datos de densidad muestran una correlación negativa ($r = -0,496$; $p < 0,01$) con la presencia de oribátidos (depredadores de tardígrados), se eliminaron las muestras que presentaban un valor de 4 en el índice de abundancia para este invertebrado. Dichas muestras fueron z19, z22, z25, z20 y z23. También se calculó la diversidad de tamaños de eutardígrados calculando el índice de diversidad de Shannon-Weaver como $H' = -\sum p_i \cdot \log_2 p_i$ (Shannon 1948) y el índice de diversidad de Simpson como $D = 1/(\sum p_i^2)$ (Simpson 1949), donde p_i es la proporción de un tamaño determinado respecto a total de individuos de la muestra. Los datos no presentaron una distribución normal ni de Poisson, ni tampoco los logaritmos de los mismos, por lo que se utilizaron análisis no paramétricos para el análisis de las muestras. La prueba de Wilcoxon de los rangos con signo para muestras relacionadas se utilizó para contrastar las densidades de eutardígrados frente a heterotardígrados. La prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes se utilizó en la comparación de densidades entre microhábitats y entre sustratos, así como para comparar la diversidad de tamaños calculada a partir de los índices de Shannon-Weaver y Simpson. Los análisis se llevaron a cabo con el programa IBM SPSS statistics 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

4. Resultados

4.1. Densidad de tardígrados

En el total de materia vegetal analizada se han contabilizado un total de 5.954 tardígrados, de los cuales 4.954 son eutardígrados y 1.001 son heterotardígrados. Las densidades en función del microhábitat en combinación con el sustrato se muestran en la Tabla 2. Se incluyen también los totales para cada una de las variables por separado. Teniendo en cuenta las estimaciones de individuos por gramo, la prueba de Wilcoxon indicó que la densidad de eutardígrados fue significativamente mayor que la de heterotardígrados ($z = -3,135$; $p = 0,002$) en general. Los estadísticos descriptivos para eutardígrados, heterotardígrados y total se detallan en el Anexo I.

Tabla 2. Total de individuos por gramo de PSLC en función del microhábitat (*Xanthoria*, *Physcia* y musgo) y del sustrato (corteza, metal y piedra).

| | Eutardígrados | Heterotardígrados | TOTAL |
|-------------------------|----------------------|--------------------------|---------------|
| <i>Xanthoria</i> | 9.759 | 18 | 9.777 |
| corteza | 3.383 | 0 | 3.383 |
| metal | 6.376 | 18 | 6.394 |
| <i>Physcia</i> | 12.677 | 470 | 13.147 |
| corteza | 5.737 | 69 | 5.806 |
| metal | 6.940 | 401 | 7.341 |
| Musgo | 4.376 | 3.347 | 7.723 |
| corteza | 3.283 | 1 | 3.284 |
| piedra | 1.094 | 3.346 | 4.439 |
| Total Corteza | 12.402 | 70 | 12.473 |
| Total Metal | 13.316 | 419 | 13.735 |
| Total Piedra | 1.094 | 3.346 | 4.439 |
| Total general | 26.812 | 3.835 | 30.647 |

La comparación de la densidad total de tardígrados así como la de las dos clases estudiadas entre los diferentes microhábitats, no mostró diferencias significativas (*X. parietina* vs. *Ph. adscendens*, *X. parietina* vs. musgo, *Ph. adscendens* vs. musgo).

Sin embargo, al comparar la densidad de eutardígrados y heterotardígrados entre diferentes sustratos sí hubo diferencias significativas. Así, la densidad de eutardígrados en muestras recogidas en sustrato de metal fue significativamente mayor que en piedra (prueba de Mann-Whitney, $U = 4$; $p = 0,044$). En cuanto a los heterotardígrados, las diferencias se vieron al comparar los sustratos de piedra frente a los de corteza ($U = 9,5$; $p = 0,006$), dándose una mayor abundancia en los de piedra. Tomados en conjunto el total de tardígrados no aparecen diferencias significativas en ninguna de las comparaciones de tipo de sustrato. En cuanto a las comparaciones entre sustratos llevadas a cabo para cada tipo de microhábitat, no hubo diferencias significativas en las muestras de *X. parietina* ni *Ph. adscendens*. Pero en el caso de las muestras de musgos sí aparecieron diferencias significativas ($U = 3,00$; $p = 0,034$) en el caso de los heterotardígrados, con una mayor abundancia de los mismos en los musgos recogidos en piedra frente a los musgos recogidos en corteza. Los valores de los rangos promedio y suma de rangos de cada uno de los grupos que se comparan se detallan en el Anexo II.

4.2. Proporción y diversidad de tamaños

En general, se observó gran variabilidad en la proporción de tamaños de eutardígrados entre muestras, así como en la presencia o no de heterotardígrados (Figura 6). El tipo de tardígrado que se encontró en mayor proporción fue el de eutardígrados medianos, seguido de los heterotardígrados (Figura 7). En los microhábitats de musgo en sustratos de piedra hubo un amplio dominio de los heterotardígrados mientras que la presencia de eutardígrados de tamaño mediano fue bastante general en el resto de microhábitats

y sustratos. Los tardígrados de menor tamaño (micro) así como los extragrandes fueron los que aparecieron en menor medida.

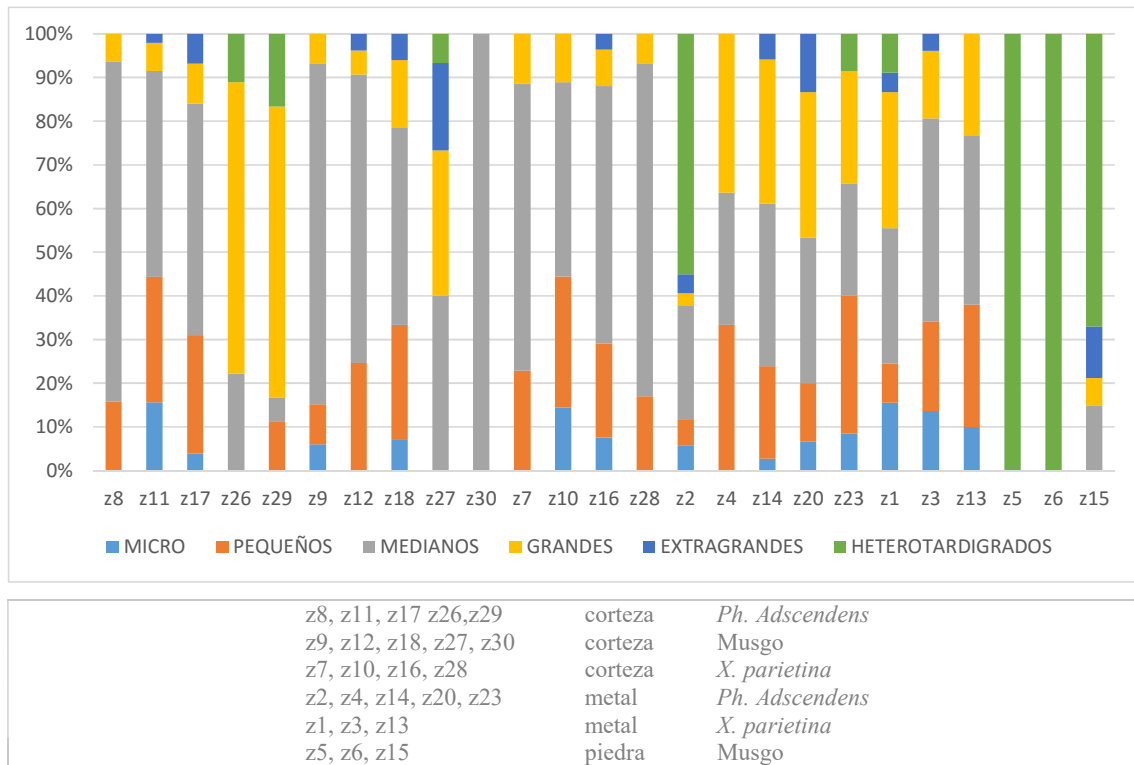


Figura 6. Porcentaje de heterotardígrados y eutardígrados, estos últimos agrupados por tamaños, en cada una de las 25 muestras de estudio.

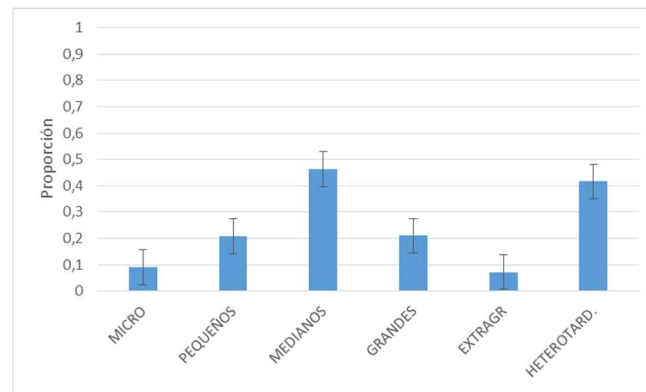


Figura 7. Porcentaje medio de heterotardígrados y eutardígrados, estos últimos agrupados por tamaños, para el total de las 25 muestras del estudio (las barras representan el error estándar).

Las comparaciones por pares de la diversidad de tamaños de eutardígrados en función del microhábitat no mostró diferencias significativas, pero sí hubo diferencias en las comparaciones por pares en función del sustrato (Figura 8). Así, hubo una mayor diversidad de tamaños en los sustratos de metal que en los de corteza tanto para el índice de diversidad de Shannon-Weaver ($U = 9,0$; $p = 0,006$), como para el índice de Simpson ($U = 8,0$; $p = 0,005$). Entre los sustratos de corteza y piedra, se dieron diferencias

significativas en el índice de diversidad de Simpson ($U = 9,0$; $p = 0,006$) pero no en el de Shannon-Weaver. No hubo diferencias en ninguno de los dos índices entre sustrato de metal y piedra. Los valores de los rangos promedio y suma de rangos para cada uno de los grupos que se comparan se detallan en el Anexo III.

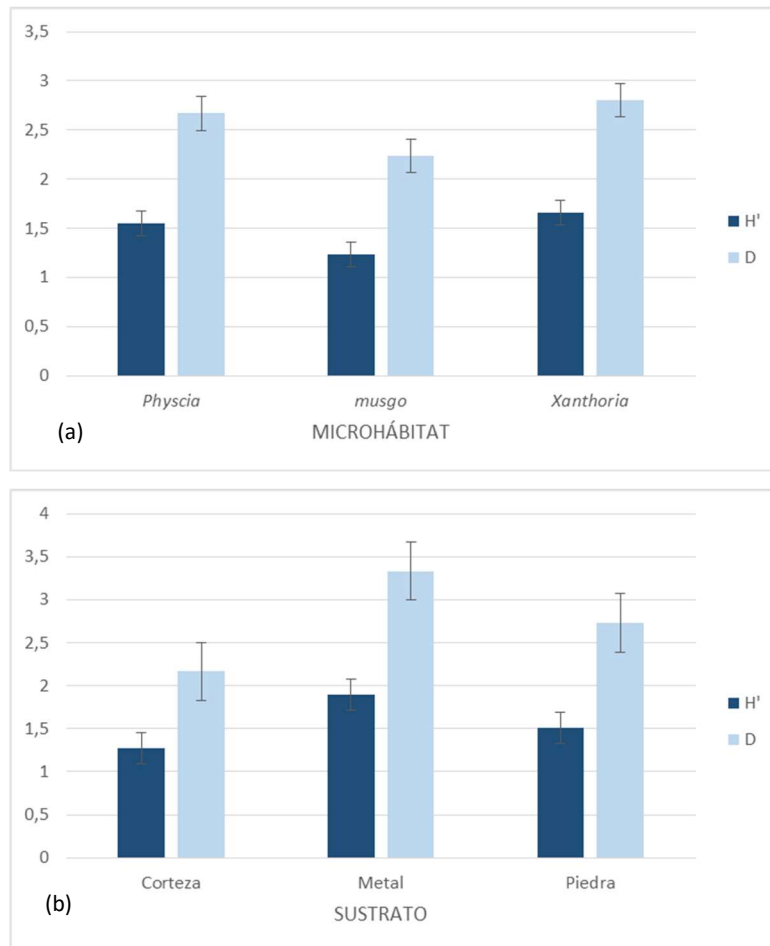


Figura 8. Índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') y de Simpson (D) obtenidos a partir de la diversidad de tamaños de eutardígrados en función del microhábitat (a) y del tipo de sustrato (b) (las barras representan el error estándar).

4.3. Presencia de otros organismos junto a los tardígrados

En todas las muestras analizadas se encontraron otros organismos con distintos grados de abundancia: nematodos, rotíferos, ácaros oribátidos, áfidos, colémbolos y huevos de arácnidos. Como se señaló en la metodología, la abundancia de oribátidos correlacionó negativa y significativamente con la de tardígrados. Por su parte, rotíferos y nematodos mostraron una correlación positiva significativa entre ellos ($r = 0,627$; $p < 0,01$) y ambos grupos correlacionaron también con los áfidos ($r = 0,623$; $p < 0,01$ y $r = 0,530$; $p < 0,01$, respectivamente). En cuanto a los áfidos, correlacionaron positivamente con oribátidos ($r = 0,628$; $p < 0,01$). Colémbolos y huevos de arácnidos no mostraron ninguna correlación con otros grupos.

5. Discusión

Este trabajo supone la primera iniciativa en Bizkaia en el estudio de la ecología de los tardígrados y de las primeras en el País Vasco desde los trabajos de Rodríguez-Roda en 1945 (Guil 2002). Además, se encuadra entre los pocos trabajos que existen todavía sobre las variables microambientales que pueden explicar los patrones de distribución de las poblaciones de tardígrados.

El conocimiento de los tardígrados en general es muy escaso, incluso en sus aspectos más básicos, lo que hace difícil realizar estudios más complejos, debido a la falta de información fundamental. Un claro ejemplo son los estudios sobre la ecología de los tardígrados, que requieren de información taxonómica que aún no se ha desarrollado en la mayoría de los casos (como es el caso de los listados de especies en las distintas regiones geográficas). De esta forma, el esfuerzo realizado por los tardigradólogos se ha centrado en la taxonomía de este grupo, avanzando así en el conocimiento de su diversidad, pero ralentizando el avance en aspectos como su ecología o su uso en aplicaciones biotecnológicas.

La identificación de tardígrados a nivel de género (y por lo tanto aún más a nivel de especie) implica un nivel de complejidad, entrenamiento y dedicación (Beltrán y Bernal 2009) que excede las posibles pretensiones de un Trabajo de Fin de Grado. Sin embargo, una aproximación desde el mero estudio de la abundancia, dado el poco desarrollo que a día de hoy ha tenido el área objeto de estudio, hace viable un estudio preliminar de estas características.

Por otro lado, en el estudio piloto se observó que, aunque no se pueden realizar identificaciones más allá del nivel de clase, las diferencias en tamaños de eutardígrados que presentaban las distintas muestras podían significar algo más que la presencia de juveniles. Muestras con todos los tamaños posibles, frente a muestras con solo dos o tres tamaños, y la ausencia de correlación entre diversidad de tamaños con densidad de eutardígrados, contribuyó a considerar esta diversidad de tamaños como una variable que convenía ser tomada en cuenta para los análisis que se pretendían realizar.

Teniendo estas peculiaridades en cuenta, el presente estudio tenía como objetivo encontrar efectos en la densidad causados por el microhábitat (tipo de líquen/musgo) y del sustrato en que dicho microhábitat se encuentra (piedra, metal o corteza de árbol). Los resultados obtenidos parecen confirmar los datos de los trabajos previos como los de Bertolani (1983) y Horning *et al.* (1978) realizados con musgos, a pesar de lo que las observaciones del estudio previo parecían indicar: el microhábitat no muestra ningún efecto en la abundancia ni de eutardígrados, ni de heterotardígrados, ni en el total de los mismos. Es decir, la densidad de ambas clases de tardígrados no es diferente en el líquen *X. parietina* respecto al líquen *Ph. Abscensis* o que en las comunidades de musgos *Orthotrichum* spp., *Hypnum* spp., *Bryum* spp. y *Ditrichum* spp. Ya en otros trabajos se ha encontrado que en, contra de lo esperado, el microhábitat no influye tanto en la densidad de los tardígrados (Guil *et al.* 2009 a y b; Guil y Sánchez-Moreno 2013). En el origen de esta homogeneidad de abundancias podría encontrarse el hecho de que uno de los

microhábitats, el musgo, sólo se recogió en un tipo de sustrato. Si existiese algún tipo de interacción entre estos dos factores, en el caso del musgo no podría ser contrastado.

Sin embargo, sí que se han encontrado diferencias en cuanto a la abundancia en función del sustrato en que se desarrollan los microhábitats. En el caso de los eutardígrados, existen densidades superiores en los sustratos de metal que en los de piedra y en el caso de los heterotardígrados hay más individuos en los sustratos de piedra que en los de corteza, siendo casi inexistentes en estos últimos. Un resultado similar se encontró respecto a la diversidad u abundancia de los tardígrados y el sustrato, diversidad alta y abundancia baja en la hojarasca, diversidades y abundancias medias en las rocas y bajas diversidades y abundancias en los troncos (Guil *et al.* 2009b). Las diferencias encontradas con dicho trabajo podrían deberse al estudio de sustratos distintos. De hecho, parece que los musgos en sustratos de piedra están habitados mayoritariamente por heterotardígrados, dominando sobre los eutardígrados eutardígrados (competidores directos en muchos casos de los heterotardígrados). En el resto de combinaciones microhábitat-sustrato la dominancia sería de los eutardígrados.

Estos resultados ponen de manifiesto que las únicas diferencias encontradas entre heterotardígrados y eutardígrados fueron en comparaciones con sustratos de piedra y de metal. Collins y Bateman (2001) y Dastyh (1988) ya encontraron diferencias en cuanto a diversidad de especies en función del tipo de roca (más o menos carbonatada). Sin embargo, tal como se ha comentado anteriormente, en el presente estudio se contaba únicamente con un tipo de microhábitat en piedra (musgo). Sería necesario poder contar con un mayor número de muestras y a ser posible con los géneros de líquenes también en este sustrato. Aunque se trata de datos del estudio piloto del presente trabajo, existe cierta evidencia en los datos cualitativos que apoyan este resultado. Dadas las escasas muestras encontradas de *Xanthoria* y *Physcia* en sustrato rocoso en el área de estudio no se pudo optar por suficientes réplicas como para ser incluidas en el estudio definitivo. Sin embargo, en el piloto sí se obtuvieron muestras de estos líquenes en piedra, una en Balmaseda a una altitud de 250 m (una barandilla artificial de piedra hormigonada), y otra en Subijana (Araba). En el primer caso coexistían los dos tipos de liquen con musgo del mismo tipo de los observados en el estudio; en el segundo caso se consiguió muestra sólo de los dos líquenes. En ambos, los individuos observados fueron mayoritariamente heterotardígrados, siendo exclusivamente de este tipo en el caso de las muestras de Subijana. En cuanto a la mayor abundancia de eutardígrados en sustrato metálico, podría ser que este sustrato, o los restos de pintura de las barandillas de las que se obtuvieron las muestras, contengan sustancias que por algún motivo favorezcan esta mayor densidad. Lo cierto es que no se ha encontrado ningún trabajo que haya investigado sobre este tipo de sustratos artificiales.

Aunque la diversidad taxonómica a nivel de género o especie no ha podido ser estudiada, la diversidad de tamaños observados en eutardígrados muestra diferencias. Así, en este caso los sustratos de metal dan lugar a una mayor variación de tamaños que los otros dos sustratos estudiados (la piedra y la

corteza). Este resultado coincide con la mayor densidad encontrada para los eutardígrados en sustratos de metal, de modo que la característica que hace a este sustrato diferente repercute tanto en la abundancia como en la diversidad de tamaños. Esto hace aún más necesaria la necesidad de investigar en esta línea. Al igual que ocurre en el caso de la densidad, el tipo de microhábitat tampoco parece ejercer ningún efecto en esta diversidad de tamaños. A pesar de las diferencias observadas estos resultados deben completarse con una identificación más detallada de los ejemplares para poder llegar a algún tipo de conclusión más concreta.

En lo que respecta al número máximo de individuos contabilizados, éste se encontró en un líquen de la especie *X. parietina*, con 5.636 tardígrados/g. de peso seco. Se trata de un número muy inferior a los 22.000 tardígrados/g. propuestos por Brusca y Brusca (2005). Este dato llama aún más la atención si se tiene en cuenta que Ramazzotti y Maucci (1983) mantienen que los hábitats más numerosos son aquellos que crecen en capas finas o muy finas (como es el caso de los líquenes con los que se ha trabajado en este estudio), aunque refutado en otros trabajos (Guil 2008; Guil *et al.* 2009 a y b) y los que crecen con gran exposición al sol, lugares abiertos, expuestos a tierra polvorienta, y en caminos utilizados por el tráfico motorizado (todos ellos requisitos que aquí se daban en todas las muestras). Sin embargo, la antigüedad del trabajo de Ramazzotti y Maucci, así como la ausencia de trabajos sistemáticos y análisis estadísticos uni- y multivariantes, hacen poner en duda los resultados ecológicos de trabajos tan antiguos. En cualquier caso, Nelson (2002) justifica este tipo de diferencias dada la alta variabilidad que presentan las densidades de estos animales, con una distribución teórica parcheada.

Por último, señalar la importancia que se debería conceder a la investigación sobre el papel de los tardígrados en las cadenas tróficas en briófitos y líquenes, así como los patrones de abundancia y diversidad de los distintos grupos tróficos de tardígrados (Guil y Sánchez-Moreno 2013). Su papel en los musgos parece ser el mismo que el de los nematodos (Steiner 1994). Sin embargo, se desconoce la función de los tardígrados en el ciclo del suelo (Sánchez-Moreno *et al.* 2008). Su biomasa, respiración, consumo, asimilación y producción parecen tener valores de la misma magnitud que en rotíferos y nematodos (Davis 1981), por lo que desempeñan un importante papel en las redes tróficas y a pesar de ello los estudios ecológicos al respecto son escasos (Zawierucha *et al.* 2016). En el presente trabajo se ha corroborado que la presencia de oribátidos disminuyó la presencia de tardígrados, mientras que no se encontró ninguna relación con otros microinvertebrados. Sin embargo, la complicada red de correlaciones entre nematodos y rotíferos (ambos posibles presas y depredadores de tardígrados) y de estos con áfidos y oribátidos (como posibles depredadores) apoya la idea de que una compleja red trófica puede estar afectando a la dinámica poblacional de los tardígrados.

Por todo ello, conviene apuntar la necesidad de una mayor investigación, centrada en el tipo de sustrato y con un mayor número de muestras para cada una de las variables estudiadas debido a la gran

variabilidad entre réplicas. Además, conviene profundizar en la fauna asociada, ya que posiblemente encontremos ahí posibles explicaciones a la errante variabilidad apuntada por Nelson (2002).

6. Conclusiones

En conclusión, aunque los eutardígrados y los heterotardígrados comparten hábitat, su distribución muestra diferencias en relación al sustrato en el que se sustenta el microhábitat y no con él en sí mismo. Los heterotardígrados sobre todo se encontraron en sustrato de piedra y estaban prácticamente ausentes en sustrato arbóreo. En cuanto a los eutardígrados, se encontraron en todos los sustratos pero mayoritariamente en metal, y parecían disminuir en aquellos en los que dominaban los heterotardígrados. Además, se detectó una mayor diversidad de tamaños de eutardígrados en sustratos metálicos. Las futuras vías de investigación se abren en aspectos como la identificación de los individuos a nivel de género o especie y el análisis del efecto de otros factores (depredadores, presas, materia inorgánica disponible) como posibles explicaciones que justifiquen las diferencias encontradas.

7. Agradecimientos

Quisiera agradecer al Departamento de Biología Vegetal y Ecología los medios puestos a mi disposición para la realización de este trabajo. También agradezco a Noemí Guil su cercanía y la desinteresada ayuda que me ofreció desde el principio. A Ibone Ametzaga por sus conocimientos, ayuda, generosidad y la actitud positiva que me ha ayudado a seguir adelante. A Leire Martin Souto por compartir el camino conmigo. Y a Mercedes Herrera e Itziar García Mijangos por transmitirme su entusiasmo por lo que ocurría al otro lado de la lupa.

8. Bibliografía

- Beasley, C. W., 1988. Altitudinal distribution of Tardigrada of New Mexico with the description of a new species. *The American Midland Naturalist*, 120(2), 436-440.
- Beltrán, E. y Bernal, J., 2009. Acercamiento a los estudios actuales sobre el filo Tardigrada y su importancia en la medicina. *Universitas Médica*, 50(3), 380-403.
- Bertolani, R., 1983. Tardigardi muscicoli delle dune costiere Italiane, con descrizione di una nuova specie. *Atti Società Toscana di Scienze Naturali*, B90, 139-148.
- Brusca, R. C. y Brusca, G. J., 2005. Invertebrados. Mc Graw-Hill Interamericana (2º ed), cap. 15.
- Collins, M. y Bateman, L., 2001. The ecological distribution of tardigrades in Newfoundland. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 240, 291-297.
- Crowe, J. H., 1971. Anhydrobiosis: an unsolved problem. *American Naturalist*, 105(946), 563-573.
- Crowe, J. H. y Crowe, L. M., 2000. Preservation of mammalian cells learning nature's tricks. *Nature Biotechnology*, 18(2), 145-146.
- Dastych, H., 1988. The Tardigrada in Poland. *Monografie Fauny Polski* 16, 1-255.

- Davis, R. C., 1981. Structure and function of two Antarctic terrestrial moss communities. *Ecological Monographs*, 51, 125-143.
- Eroglu, A., Russo, M. J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H. y Torner, M., 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 18(2), 163-167.
- Franz, H., 1952. Etat de nos connaissances sur la microfaune du sol. *Colloques Internationaux. Centre National de la Recherche Scientifique, Ecologie*, 33, 241.
- Garey, J. R., McInnes, S. J., y Nichols, P. B., 2008. Global diversity of tardigrades (Tardigrada) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 101-106.
- Glime, J. M., 2013. Bryophyte Ecology. Ebook patrocinado por Michigan Technological University y la International Association of Bryologists. <http://www.bryoecol.mtu.edu>.
- Guidetti, R. y Bertolani, R., 2005. Tardigrade taxonomy: an update check list of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa*, 845, 1-46.
- Guil, N., 2002. Diversity and distribution of tardigrades (Bilateria, Tardigrada) from the Iberian Peninsula, Balearic Islands and Chafarinas Islands. *Graellsia*, 58(2), 75-94.
- Guil, N., 2004. Los tardígrados terrestres de la Sierra de Guadarrama: diversidad, taxonomía y filogenia. *Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid*.
- Guil, N., 2008. New records and within-species variability of Iberian tardigrades (Tardigrada), with comments on the species from the *Echiniscus blumi-canadensis* series. *Zootaxa*, 1757, 1-30.
- Guil, N. y Cabrero-Sañudo, F. J., 2007. Analysis of the species description process of a little known invertebrate group: the limnoterrestrial tardigrades (Bilateria, Tardigrada). *Biodiversity and Conservation*, 16, 1063-1086.
- Guil, N. y Guidetti, R., 2005. A new species of Tardigrada (Eutardigrada, Macrobiotidae) from Iberian Peninsula and Canary Islands (Spain). *Zootaxa*, 889, 1-11.
- Guil, N., Hortal, J., Sánchez-Moreno, S., y Machordom, A., 2009a. Effects of macro and micro-environmental factors on the species richness of terrestrial tardigrade assemblages in an Iberian mountain environment. *Landscape Ecology*, 24, 375-390.
- Guil, N., y Sanchez-Moreno, S., 2013. Fine-scale patterns in micrometazoans: tardigrade diversity, community composition and trophic dynamics in leaf litter. *Systematics and Biodiversity*, 11, 181-193.
- Guil, N., Sánchez-Moreno, S. y Machordom, A., 2009b. Local biodiversity patterns in micrometazoans: are tardigrades everywhere? *Systematics and Biodiversity*, 7(3), 259-268.
- Hallas, T. E., 1975. A mechanical method for the extraction of Tardigrada. *Memorie dell' Instituto Italiano di Idrobiologia*, 32(Suppl.), 153-158.
- Hallas, T. E. y Yeates, G. W., 1972. Tardigrada of the soil and litter of a Danish beech forest. *Pedobiologia* 12, 287-304.

- Hofmann, I., 1987. Habitat preference of the most frequent moss-living Tardigrada in the area of Giessen (Hessen). En: Bertolani, R. (ed.). *Biology of Tardigrades. Selected Symposia and Monographs*, Modena, 211-216.
- Horning, D. S., Schuster, R. O., y Grigarick, A. A., 1978. Tardigrada of New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 5, 185-280.
- Ito, M., 1999. Ecological distribution, abundance, and habitat preference of terrestrial Tardigrades in various forest on the northern slope of Mt Fuji, central Japan. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 238, 225-234.
- Jahns H. M., 1982. Guía de campo de los helechos, musgos y líquenes de Europa. Editorial Omega, Barcelona.
- Kinchin, I. M., 1994. *The Biology of Tardigrades*. Blackwell. Publishing Co., London.
- Learner, M. A., Bowker, D. W. y Halewood, J., 1990. An assessment of bank slope as a predictor of conservation status in river corridors. *Biological Conservation*, 54, 1-13.
- May, R. H., Maria, M. y Guimard, J., 1964. Actions diferenciées des rayons x et ultraviolets sur le tardigrade *Macrobiotus areolatus*, a l'état actif et desséché. *Bulletin du. Biologie France Belgique*, 98, 349-367.
- McInnes, S., 1994. Zoogeographic distribution of terrestrial/freshwater tardigrades from current literature. *Journal of Natural History*, 28, 257- 352.
- Morgan, C., 1977. Population dynamics of two species of Tardigrada, *Macrobiotus hufelandi* (Schultze) and *Echiniscus (Echiniscus) testudo* (Doye`re), in roof moss from Swansea. *Journal of Animal Ecology*, 46, 263-279.
- Nelson, D. R., 1982. Developmental biology of the Tardigrada. En: Harrison F, Cowden R. (eds). *Developmental biology of freshwater invertebrates*. Alan R. Liss, New York, 363-368.
- Nelson, D. R., 1995. The hundred-year hibernation of the waterbear. *Journal of Natural History* 84,62-65.
- Nelson, D. R., 2002. Current status of the Tardigrada: evolution and ecology. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 652-659.
- Nichols, P.B., 1999. The ecological distribution of the Tardigrada on Dugger Mountain (NE Alabama) with respect to seasonal and altitudinal variation. Jacksonville State University, Jacksonville, AB.
- Nielsen, C., 1995. *Animal evolution. Interrelationships of the living phyla*. Oxford University Press, Oxford.
- Nelson, D. R. y Higgins, R., 1990. Tardigrada. En: D. Dindal (ed.). *Soil biology guide*, John Wiley y Sons Inc., New York, 393-420.
- Nelson, D. R. y Marley, N. J., 2000. The biology and ecology of lotic Tardigrada. *Freshwater Biology*, 44(1), 93-108.

- Ramazzotti, G. y Maucci, W., 1983. II phylum Tardigrada. III edizione riveduta e aggiornata. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia. Dott. Marco di Marchi, 41*, 1-1012.
- Renaud-Mornant, J., 1988. Tardigrada. En: R. Higgins y J. Thiel (eds.). *Introduction to the study of meiofauna*. Smithsonian Institution Press, Wasington D.C., 357-364.
- Rizzo, A. M., Altiero, T., Corsetto, P. A., Montorfano, G. Guidetti, R. y Rebecchi, L., 2015. space flight effects on antioxidant molecules in dry tardigrades: the TARDIKISS experiment. *BioMed Research International, 2015*, 167642. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/167642>.
- Rodríguez-Roda, J., 1946. Contribución al estudio de los Tardígrados de España. Nota previa sobre los de Aralar. En: R. Margalef (ed.). *Aportación al estudio de la fauna y flora vasco-navarra, Sierra de Aralar*. CSIC, Estación de Estudios Pirenaicos, Zaragoza, 67-82.
- Rodríguez-Roda, J., 1951. Algunos datos sobre la distribución de los tardígrados españoles. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural y Biología, 49*, 75-83.
- Sánchez-Moreno, S., Ferris, H., y Guil, N. 2008. Role of tardigrades in the suppressive service of a soil food web. *Agriculture Ecosystems and Environment, 124*, 187-192.
- Shannon, C. E., 1948. Amathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal 27*, 379-423.
- Simpson, E. H., 1949. Measurement of diversity. *Nature 163*, 688.
- Steiner, W. A., 1994. The influence of air pollution on moss-dwelling animals. II: Aquatic fauna with emphasis on Nematoda and Tardigrada. *Revue Suisse de Zoologie, 101(3)*, 699-724.
- Wright, J. C., 1991. The significance of four xeric parameters in the ecology of terrestrial Tardigrada. *Journal of Zoology, 224*, 59-77.
- Zawierucha, K., Smykla, J., Michalczyk, Ł., Gołdyn, B. y Kaczmarek, Ł., 2015. Distribution and diversity of Tardigrada along altitudinal gradients in the Hornsund, Spitsbergen (Arctic). *Polar Ressearch, 34*, 24168. <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v34.24168>.
- Zawierucha, K., Zmudczyńska-Skarbek, K., Kaczmarek, Ł. y Wojczulanis-Jakubas, K., 2016. The influence of a seabird colony on abundance and species composition of water bears (Tardigrada) in Hornsund (Spitsbergen, Arctic). *Polar Biology, 39*, 713-723.

Anexos

Anexo I. Número de muestras (N) y estadísticos descriptivos de la densidad de eutardígrados, heterotardígrados y tardígrados totales para el total de las 25 muestras analizadas.

| | N | Media | Desv. estándar | Mínimo | Máximo |
|-------------------|----|-----------|----------------|--------|---------|
| HETEROTARDÍGRADOS | 25 | 153,1600 | 461,21305 | ,00 | 2216,00 |
| EUTARDÍGRADOS | 25 | 196,9600 | 238,00499 | ,00 | 860,00 |
| TOTAL | 25 | 1211,0000 | 1436,21221 | 11,00 | 5636,00 |

Anexo II. Número de muestras (N), rango promedio y suma de rangos de eutardígrados, heterotardígrados y tardígrados totales en función del microhábitat (A) y del sustrato (B). Los datos se presentan teniendo en cuenta las comparaciones dos a dos.

A. MICROHABITAT

| <i>X. parietina vs. Ph. adscendens</i> | | N | Rango promedio | Suma de rangos |
|---|------------------|----|----------------|----------------|
| HETEROTARDÍGRADOS | <i>Xanthoria</i> | 7 | 7,00 | 49,00 |
| | <i>Physcia</i> | 8 | 8,88 | 71,00 |
| EUTARDÍGRADOS | <i>Xanthoria</i> | 7 | 9,29 | 65,00 |
| | <i>Physcia</i> | 8 | 6,88 | 55,00 |
| TOTAL | <i>Xanthoria</i> | 7 | 8,14 | 57,00 |
| | <i>Physcia</i> | 8 | 7,88 | 63,00 |
| <i>X. parietina vs. musgo</i> | | | | |
| HETEROTARDÍGRADOS | <i>Xanthoria</i> | 7 | 7,00 | 49,00 |
| | musgo | 10 | 10,40 | 104,00 |
| EUTARDÍGRADOS | <i>Xanthoria</i> | 7 | 11,57 | 81,00 |
| | musgo | 10 | 7,20 | 72,00 |
| TOTAL | <i>Xanthoria</i> | 7 | 10,86 | 76,00 |
| | musgo | 10 | 7,70 | 77,00 |
| <i>Musgo vs. Ph. adscendens</i> | | | | |
| HETEROTARDÍGRADOS | <i>Physcia</i> | 8 | 8,56 | 68,50 |
| | musgo | 10 | 10,25 | 102,50 |
| EUTARDÍGRADOS | <i>Physcia</i> | 8 | 11,63 | 93,00 |
| | musgo | 10 | 7,80 | 78,00 |
| TOTAL | <i>Physcia</i> | 8 | 11,13 | 89,00 |
| | musgo | 10 | 8,20 | 82,00 |

B. SUSTRATO

| Metal vs. piedra | | N | Rango promedio | Suma de rangos |
|---------------------------|------------------|----|----------------|----------------|
| HETEROTARDÍGRADOS | metal | 6 | 4,33 | 26,00 |
| | piedra | 5 | 8,00 | 40,00 |
| EUTARDÍGRADOS | metal | 6 | 7,83 | 47,00 |
| | piedra | 5 | 3,80 | 19,00 |
| TOTAL | metal | 6 | 7,00 | 42,00 |
| | piedra | 5 | 4,80 | 24,00 |
| Metal vs. corteza | | | | |
| HETEROTARDÍGRADOS | metal | 6 | 11,67 | 70,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 10,00 | 140,00 |
| EUTARDÍGRADOS | metal | 6 | 12,00 | 72,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 9,86 | 138,00 |
| TOTAL | metal | 6 | 12,33 | 74,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 9,71 | 136,00 |
| Piedra vs. corteza | | | | |
| HETEROTARDÍGRADOS | piedra | 5 | 15,10 | 75,50 |
| | corteza de árbol | 14 | 8,18 | 114,50 |
| EUTARDÍGRADOS | piedra | 5 | 6,00 | 30,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 11,43 | 160,00 |
| TOTAL | piedra | 5 | 9,00 | 45,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 10,36 | 145,00 |

Anexo III. Número de muestras (N), rango promedio y suma de rangos de la media de cada grupo de muestras en el índice de diversidad de Shannon-Weaver (H') y de Simpson (D) obtenidos a partir de la diversidad de tamaños de eutardígrados en función del microhábitat y del tipo de sustrato. Los datos se presentan teniendo en cuenta las comparaciones dos a dos.

| <i>X. parietina vs. Ph. adscendens</i> | | N | Rango promedio | Suma de rangos |
|--|------------------|----|----------------|----------------|
| D | <i>Xanthoria</i> | 7 | 9,57 | 67,00 |
| | <i>Physcia</i> | 8 | 6,63 | 53,00 |
| H' | <i>Xanthoria</i> | 7 | 9,43 | 66,00 |
| | <i>Physcia</i> | 8 | 6,75 | 54,00 |
| <i>X. parietina vs. musgo</i> | | | | |
| D | <i>Xanthoria</i> | 7 | 8,57 | 60,00 |
| | musgo | 8 | 7,50 | 60,00 |
| H' | <i>Xanthoria</i> | 7 | 8,57 | 60,00 |
| | musgo | 8 | 7,50 | 60,00 |
| <i>Musgo vs. Ph. adscendens</i> | | | | |
| D | <i>Physcia</i> | 8 | 7,75 | 62,00 |
| | musgo | 8 | 9,25 | 74,00 |
| H' | <i>Physcia</i> | 8 | 8,13 | 65,00 |
| | musgo | 8 | 8,88 | 71,00 |
| <i>Metal vs. piedra</i> | | | | |
| D | metal | 6 | 4,50 | 27,00 |
| | piedra | 3 | 6,00 | 18,00 |
| H' | metal | 6 | 5,00 | 30,00 |
| | piedra | 3 | 5,00 | 15,00 |
| <i>Piedra vs. corteza</i> | | | | |
| D | piedra | 3 | 14,67 | 44,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 7,79 | 109,00 |
| H' | piedra | 3 | 13,67 | 41,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 8,00 | 112,00 |
| <i>Metal vs. corteza</i> | | | | |
| D | metal | 6 | 16,17 | 97,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 8,07 | 113,00 |
| H' | metal | 6 | 16,00 | 96,00 |
| | corteza de árbol | 14 | 8,14 | 114,00 |