

Procesos de precipitación mineral bioinducidos en sistemas kársticos subterráneos: breve revisión y nuevas tendencias

S. Sánchez-Moral¹, J. M. González², J. C. Cañaveras³, S. Cuezva¹, J. Lario⁴, C. Cardell⁵, J. Elez⁶, L. Luque⁷, C. Saiz-Jiménez²

RESUMEN

Los microorganismos, en particular las bacterias, habitan en todos los ambientes posibles de la biosfera incluidos los ambientes subterráneos. Desempeñan un papel importante en procesos geológicos tales como la precipitación y disolución mineral, e influyen notablemente sobre los ciclos biogeoquímicos de diferentes elementos. Hasta este momento, son relativamente pocos los estudios orientados a conocer el papel activo de los microorganismos, especialmente las bacterias, en la formación de espeleotemas, de manera que la implicación de la actividad microbiana en la precipitación y disolución mineral en ambientes kársticos es un tema aún sin resolver en geomicrobiología. Actualmente, no está del todo aclarada cuál es la interrelación entre los microorganismos y las fábricas minerales, ni el papel que juegan los microorganismos en la precipitación de carbonatos.

Las cuevas son ambientes protegidos donde las fábricas microbianas pueden preservarse sin sufrir modificaciones diagenéticas importantes o destrucción, ofreciendo, por ello, un excelente entorno para estudiar los procesos de biomineralización (desde los propios microorganismos activos a sus depósitos minerales). Las nuevas tendencias en geomicrobiología se basan en la conjunción de diferentes metodologías (microclima, petrología, geoquímica, hidroquímica, microbiología, biología molecular) con un objetivo común: 1) determinar el papel de las diferentes comunidades microbianas que habitan los ambientes subterráneos en los procesos de transformación mineral; 2) identificar las propiedades físicas y químicas de las fases cristalinas bioinducidas, y 3) determinar las condiciones ambientales y las propiedades composicionales y texturales de los soportes rocosos naturales (biorreceptividad) que favorecen o inhiben el desarrollo de las comunidades microbianas.

Palabras clave: comunidad microbiana, geomicrobiología, biorreceptividad, biomineralización, karst, cueva.

ABSTRACT

Microorganisms, particularly bacteria, inhabit all possible environments in the biosphere including subterranean ones. They play an important role in geological processes such as mineral precipitation and dissolution, and significantly influence biogeochemical cycles. At present, relatively few studies have focused on the active role of microorganisms, especially bacteria, in the formation of speleothems. Thus, the involvement of microbial activity in the formation of speleothems in caves is a geomicrobiological issue still to be solved. Today, the relationship between microorganisms and mineral fabrics and the role played by microorganisms in carbonate precipitation is unclear.

The processes of carbonate deposit formation in caves offers an excellent scenario for research on biomineralization processes (from active microorganisms to their mineral deposits), because caves are protected environments where microbial fabrics can be preserved without extensive diagenetic modification or destruction. The new tendencies on geomicrobiological studies consist on applying different and multidisciplinary methodological approaches (petrology, geochemistry, microbiology, molecular biology)

¹ Departamento de Geología, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, José Gutiérrez Abascal, 2. 28006 Madrid.

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC, Sevilla.

³ Departamento de Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, Alicante.

⁴ Departamento de Ciencias Analíticas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid.

⁵ Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Granada.

⁶ Departamento de Paleontología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

⁷ Fundación Conjunto Paleontológico de Teruel, Dinópolis, Teruel.

to (1) determine the role of the different microbial communities inhabiting the hypogean environments in the processes of mineral transformation, (2) identifying the physical and chemical properties of bioinduced crystalline phases, and (3) determine the environmental conditions, composition and texture of natural substrates (bioreceptivity) favouring or inhibiting the development of microbial communities.

Key words: microbial community, geomicrobiology, bioreceptivity, biomineralization, karst, cave.

Introducción

Los microorganismos, en particular las bacterias, actúan como agentes geoquímicos activos en la zona superior de la litosfera y en la hidrosfera (Ehrlich, 1998). Participan eficazmente en procesos de alteración y transformación mineral e influyen notablemente en los ciclos biogeoquímicos de los elementos (C, N, S, etc.). La importancia de la actividad inicial de los microorganismos fotosintéticos (cianobacterias) en la composición de la atmósfera pasada y reciente respecto al O₂ y CO₂, ha sido estudiada y confirmada en numerosos estudios previos (Awramik, 1992; Zavarzin, 2002). La confirmación de que la precipitación de calcita, o carbonatogénesis, por influencia bacteriana (Kellerman, 1915) es un fenómeno habitual en ambientes marinos someros (McCallum & Guhathakurta, 1970) y suelos (Boquet *et al.*, 1973), supuso un gran auge de la geomicrobiología como línea de investigación multidisciplinar (Banfield y Nealson, 1997; Ehrlich, 2002). Asimismo, estos resultados representaron el reconocimiento del importante papel que juegan, no sólo los microorganismos autótrofos sino también los heterótrofos, en los fenómenos de precipitación mineral (Castanier *et al.*, 2000).

Los estudios sobre biomineralización inducida o controlada por microorganismos están implicados y relacionados con numerosos procesos naturales: secuestro de CO₂, fijación y movilización de metales, bio-remediación de contaminantes en suelos ácidos, formación de cálculos en animales y humanos, etc. (Dove *et al.*, 2003). Recientemente la investigación en este campo se ha enfocado al uso de determinadas bacterias biomineralizantes en problemas de conservación de monumentos y otras aplicaciones tecnológico-científicas (Mastromei *et al.*, 1999; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003). El estudio de organismos endolíticos y su capacidad biomineralizante en ambientes extremos también ha experimentado un gran auge en los últimos años (Ascaso & Wierzechos, 2003; Wierzechos *et al.*, 2006a y 2006b).

Los medios subterráneos naturales y dentro de ellos los sistemas kársticos someros, como ambientes hipogeos más comunes, suponen un escenario

particular para la interacción microbiana-mineral debido a su carácter oligotrófico y a la ausencia de luz natural. El conocimiento sobre la diversidad y actividad de microorganismos en cuevas es aún muy limitado y aún más sus pautas de distribución y los condicionantes que favorecen o inhiben su desarrollo. Este último aspecto es de gran importancia en la conservación de los sistemas kársticos entendidos como medios naturales frágiles que albergan abundantes recursos naturales y patrimoniales.

Los microorganismos se adhieren y colonizan el sustrato dependiendo de la «biorreceptividad» de las rocas y las condiciones ambientales del medio que habitan. La «biorreceptividad» o susceptibilidad de un material para ser colonizado por uno o varios grupos de organismos (Guillitte, 1995) depende de factores ambientales tales como la disponibilidad de agua, pH, condiciones climáticas y fuentes de nutrientes, así como de parámetros petrológicos y texturales tales como composición mineral, tipo de cemento, porosidad y permeabilidad del material rocoso (Warscheid & Braams, 2000). Recientes investigaciones llevadas a cabo en el marco del proyecto europeo CATS EVK4-2000-00659, desarrollado en un medio subterráneo artificial como las catacumbas de Roma (Albertano *et al.*, 2003), han permitido observar que tanto el tipo y composición del biofilm microbiano, como su densidad y distribución, están fuertemente condicionadas por la composición química y el sistema poroso de cada sustrato rocoso, junto a las condiciones microambientales de humedad y ventilación (Sánchez-Moral *et al.*, 2005). Asimismo, se ha observado que los microorganismos allí presentes eran capaces de movilizar elementos como el bario y favorecer su precipitación en forma de nuevas fases minerales (Sánchez-Moral *et al.*, 2004).

En la actualidad, uno de los principales objetivos de los estudios geomicrobiológicos en cavidades, consiste en determinar qué factores ambientales y físico-químicos determinan la presencia y desarrollo de los microorganismos y a partir de ahí determinar el grado de implicación de dichos microorganismos en los procesos de disolución/precipitación mineral que se producen en estos ambientes.

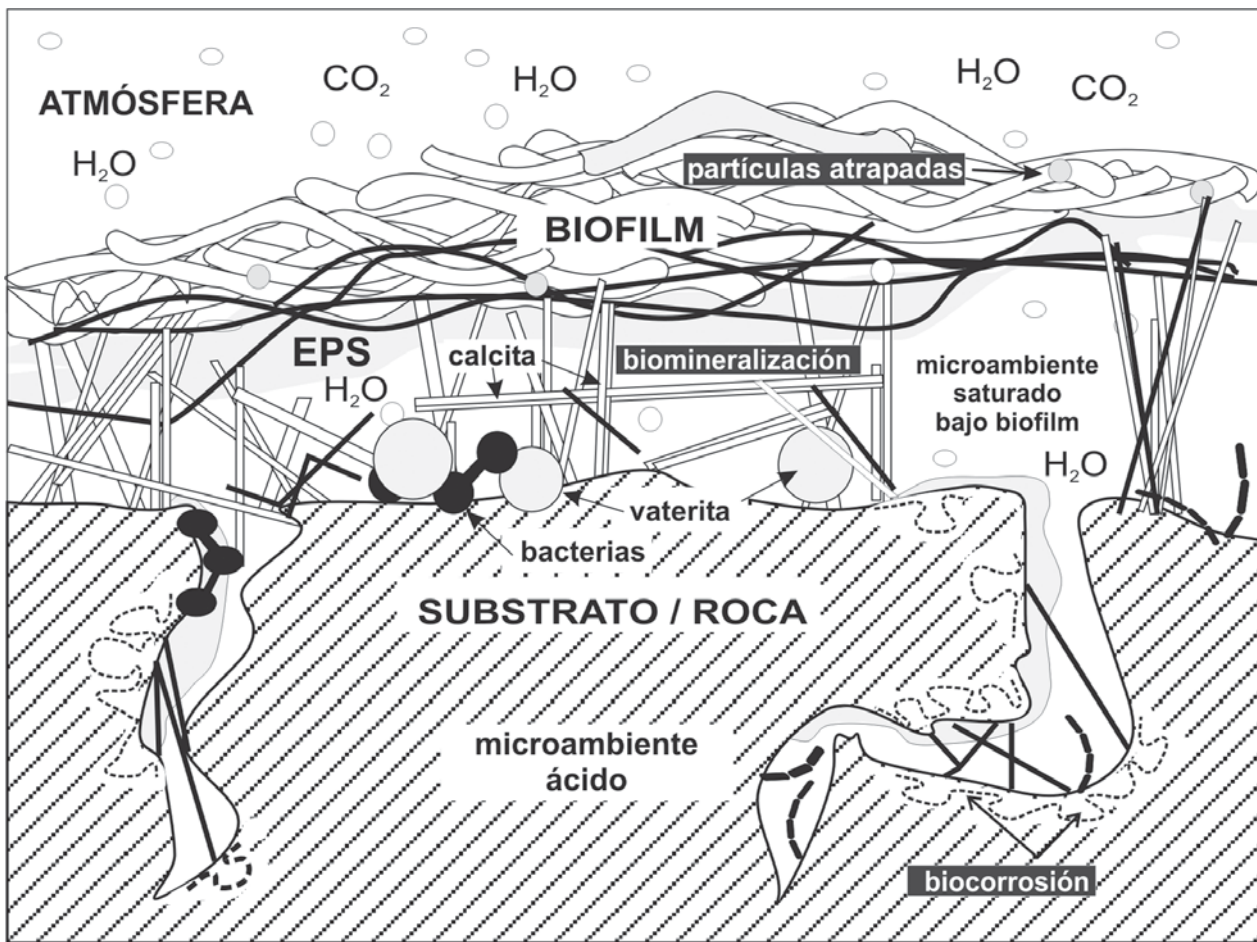


Fig. 1.—Esquema sintético de la distribución de minerales bioinducidos y microambientes geoquímicos en la interfase biofilm /substrato-roca.

Biomíneralización en cavidades

La mayor parte de los estudios microbiológicos previos en cuevas son de un carácter predominantemente descriptivo (ver la excelente revisión de Northup & Lavoie, 2001). No obstante, existen evidencias de que los microorganismos juegan un papel importante en la formación de rasgos kársticos (Cañaveras *et al.*, 2001). Los efectos que la colonización microbiológica ejerce sobre el substrato subterráneo (espeleotemas, roca de caja, representaciones artísticas, etc.) son de carácter diverso (fig. 1): i) cubriéndolos, ya sean las mismas microcolonias, o los precipitados orgánicos e inorgánicos (biomineralización) provocados por su actividad metabólica; ii) alterándolos químicamente (disolución-biocorrosión); iii) alterándolos físicamente (rotura y descamación del substrato); o iv) modifi-

cando sus pautas de crecimiento (hábito, cinética), en el caso de los espeleotemas. Está probada la implicación de los microorganismos en la formación de espeleotemas, ya sea de forma pasiva, actuando como puntos de nucleación facilitando el inicio de la precipitación de minerales, o de forma activa, produciendo modificaciones microambientales en su entorno inmediato que conducen a la precipitación mineral (fig. 1). Algunos tipos de espeleotemas formados por óxidos de hierro y/o manganeso, carbonatos y nitratos pueden, directa o indirectamente, atribuirse a actividad microbiana (Forti, 2001; Cacchio *et al.*, 2004).

Existe una gran controversia acerca del origen, orgánico (Northup *et al.*, 1997; Cañaveras *et al.*, 1999) *versus* inorgánico (Borsato *et al.*, 2000), de los espeleotemas de tipo *moonmilk*. Los depósitos de *moonmilk* están constituidos por agregados

microcristalinos, de carbonatos cálcicos y/o magnésicos, y filamentos microbianos activos, fundamentalmente bacterias. La identificación de este tipo de agregados cristalinos en depósitos tipo *moonmilk* en cuevas, donde las condiciones ambientales (temperatura, HR) son muy estables, sugiere que procesos de evaporación y criodeseccación no son necesarios para su formación (Cuezva *et al.*, 2003; Cañaveras *et al.*, 2006), como han sido comúnmente mencionados en la bibliografía (Verrecchia & Verrecchia, 1994) en atribución a un posible origen inorgánico. En la mayor parte de las cavidades kársticas en zona vadosa existen colonias microbianas observables a simple vista, así como espeleotemas subaéreos de tipo *moonmilk* en proceso de formación y evolución, todo lo cual permite la observación de relaciones microorganismo-mineral y variaciones de elementos microestructurales y microfábrica, de forma que representan puntos de estudio idóneos para investigar la implicación de los microorganismos en el origen y/o evolución de estos depósitos.

Los microorganismos heterótrofos utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y producen CO₂ derivado de su actividad metabólica, dando lugar a fraccionamientos isotópicos que modifican las proporciones en las que se encuentran los isótopos estables (d¹³C y d¹⁸O). La caracterización de esa señal isotópica en cada una de las fases involucradas (mineral, aire, agua) es un parámetro muy útil a la hora de evaluar el grado y tipo de influencia de las poblaciones microbiológicas edáficas y subterráneas en los procesos de precipitación/disolución de minerales carbonatados, tal y como se ha ensayado en otros escenarios con pulsos de sustratos marcados con d¹³C (Blair *et al.*, 1985; Bolliger *et al.*, 2000; Cacchio *et al.*, 2004). Por otra parte, existen bacterias capaces de asimilar CO₂ quimiolitotóticamente como única fuente de carbono para la síntesis de biomoléculas (Brock & Madigan, 1991; Buzolyova & Somov, 1999). La dependencia de la presencia de CO₂ de las bacterias para su crecimiento y desarrollo por largos períodos de tiempo es bien conocida, siendo el CO₂ y HCO₃⁻ imprescindibles para determinadas funciones celulares de crecimiento (Smith & Ferry, 2000). Un ejemplo de la capacidad bacteriana para secuestrar CO₂ en soluciones sería la anhidrasa carbónica, una enzima que cataliza la hidratación reversible de CO₂ y está ampliamente distribuida en organismos superiores (animales, algas verdes). En los dominios *Archaea* y *Bacteria*, aunque está poco estudiado, se ha observado una amplia distri-

bución de esta enzima, si bien aún sólo ha sido investigada en un número reducido de especies (Smith & Ferry, 2000; Tripp *et al.*, 2001). La anhidrasa carbónica podría ser la responsable del secuestro de una fracción importante de CO₂ por parte de bacterias heterótrofas en ambientes subterráneos (Sánchez-Moral *et al.*, 2003a).

Estrategias de investigación: métodos tradicionales y nuevas propuestas

Hasta el momento actual, la estrategia seguida para abordar el estudio de comunidades microbianas en cuevas y otros ambientes naturales ha sido el uso de técnicas microbiológicas tradicionales, que consisten en el cultivo y aislamiento de los microorganismos presentes en muestras naturales. Estas técnicas presentan la ventaja de poder obtener cultivos puros de microorganismos, lo que permite estudiar sus actividades metabólicas y su posible relación con el sustrato (biodegradación, bioprecipitación). No obstante, los métodos microbiológicos convencionales presentan también desventajas, como son la pequeña proporción de los microorganismos presentes en una comunidad bacteriana que pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Ward *et al.*, 1990; Gonzalez & Saiz-Jiménez, 2004) y el relativo gran tamaño de muestra que se necesita para diseñar una buena estrategia de cultivo. Así, y a pesar de las numerosas evidencias y trabajos de investigación sobre el papel de las bacterias en la precipitación de carbonatos, el hecho de que gran parte de esas evidencias procedan de cultivos en laboratorios bajo condiciones ambientales diferentes a las del medio natural (Boquet *et al.*, 1973; Rivadeneyra *et al.*, 1994; Sanchez-Moral *et al.*, 2003b; Baskar *et al.*, 2006) hace que aún exista una gran controversia en la comunidad científica acerca de la relación directa entre microorganismos y fábricas minerales, y sobre las rutas metabólicas, el modo y las condiciones en las que se produce la precipitación de carbonatos (Castanier *et al.*, 1999).

Precisamente, una de las principales novedades en este campo son las propuestas metodológicas basadas en una triple estrategia: primero, la detección de los componentes de las comunidades microbianas utilizando técnicas moleculares (sin necesidad de realizar cultivos); segundo, el cultivo dirigido a aislar las especies más características detectadas; y tercero, el análisis de cultivos bajo condiciones ambientales de presión, temperatura, humedad y

concentración de CO₂ similares a las de los medios naturales en los que se propone llevar a cabo los trabajos de investigación.

Hasta la fecha, los estudios que han analizado la colonización bacteriana en cuevas mediante técnicas moleculares, sin cultivos previos son relativamente escasos y no han proporcionado información funcional sobre los microorganismos detectados; por ejemplo, las cuevas de Lechugilla, Spider, Hidden, Ceespool y Fairy en Estados Unidos (Northup *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 2001; Barton *et al.*, 2004); Frasassi Gorge en Italia (Vlasceanu *et al.*, 2000); la Cueva de Villa Luz en Méjico (Hose *et al.*, 2000); el complejo kárstico de Nullarbor en Australia (Holmes *et al.*, 2001). En todos estos casos la diversidad microbiana observada es mucho más variada que la encontrada utilizando sólo cultivos microbianos.

Los primeros estudios llevados a cabo por nuestro equipo utilizando técnicas moleculares han resaltado el amplio espectro de microorganismos presentes en los ambientes kársticos, y la complejidad de los mismos, ampliando significativamente la diversidad microbiana detectada que vive y se desarrolla sobre sustratos rocosos en ambientes subterráneos y cambiando nuestra visión de la participación bacteriana en procesos kársticos. Estas investigaciones han permitido el estudio de los microorganismos no cultivables y su comparación con los cultivables, como se ha comprobado en algunas cavidades con arte rupestre del norte peninsular (Tito Bustillo, Altamira, La Garma y Llonín) (Laiz *et al.*, 2003; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2004). El estudio molecular de una muestra de pigmento de la Sala de Polícromos (Altamira) mostró una gran variedad taxonómica de bacterias, detectándose microorganismos inesperados y desconocidos. Los microorganismos identificados mediante el empleo de técnicas moleculares en las pinturas rupestres se distribuían en Proteobacteria (52,3%), miembros de la división Acidobacteria (23,8%), grupo Bacteroidetes (9,5%), Chloroflexi (4,8%), Planctomycetes, (4,8%) y Actinobacteria (4,8%). Utilizando cultivos, la gran mayoría de los microorganismos detectados pertenecían a las Actinobacterias, y específicamente al género *Streptomyces* (Laiz *et al.*, 2003). Estas diferencias en los resultados serían la consecuencia de las diferentes técnicas de detección utilizadas (fig. 2), e inherentes a la estrategia de dispersión de algunas bacterias (formación de esporas).

Estos datos también confirman la necesidad de evaluar la totalidad de la comunidad microbiana con el uso de técnicas moleculares en lugar de obte-

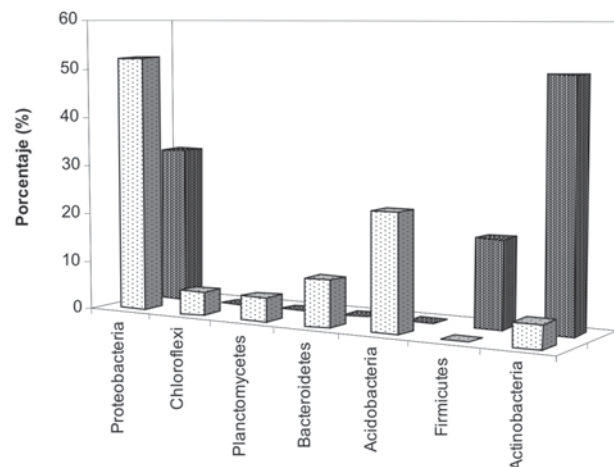


Fig. 2.—Distribución de las bacterias detectadas en la cueva de Altamira a partir de técnicas moleculares (claro) y de cultivos de microorganismos (oscuro). Los métodos moleculares permiten detectar la presencia de una mayor diversidad de microorganismos.

ner información tan sólo de la pequeña fracción de microorganismos cultivables (generalmente < 1% de la comunidad total microbiana; González & Saiz-Jiménez, 2004). No obstante, el número de microorganismos que podrían cultivarse aumenta mucho cuando se conocen los componentes de la comunidad microbiana (por ejemplo, por análisis moleculares previos) o cuando se enfocan los esfuerzos de cultivo hacia tipos seleccionados de microorganismos (Stevenson *et al.*, 2004). Las Acidobacterias, por ejemplo, representaban casi un cuarto de las secuencias de ADN detectadas en las proximidades de las pinturas de la cueva de Altamira (Laiz *et al.*, 2003; Schabereiter-Gurtner *et al.*, 2002) y, sin embargo, ninguna de estas Acidobacterias ha podido ser cultivada. De hecho, hoy en día, la división completa de Acidobacterias sólo incluye tres especies como representantes cultivados y adecuadamente descritas, mientras que se conocen más de mil secuencias de ADN distintas pertenecientes a Acidobacterias obtenidas de ambientes muy diversos. Un ejemplo del posible papel de Acidobacteria podría deducirse de la capacidad reductora del hierro (III) de *Geothrix fermentans* (Coates *et al.*, 1999), una de las tres especies de Acidobacterias descritas hasta la fecha, si bien los representantes de las Acidobacterias detectadas a través de sus secuencias se encuentran alejados de *G. fermentans* (Zimmermann *et al.*, 2005). Hoy en día, se requieren estudios funcionales de los microorganismos característicos detectados más frecuentemente en estos ambientes, de modo que podamos averiguar

su papel biogeoquímico y deducir su importancia y función en los sistemas kársticos.

En estudios recientes llevados a cabo en la Cueva de Altamira, el empleo de nuevas técnicas moleculares de detección de microorganismos, permitió determinar la presencia de microorganismos metabólicamente activos en las muestras estudiadas. Para ello se realizaron análisis de diversidad microbiana a partir del ARN. La cantidad de ARN en las células es dependiente de su actividad metabólica (Molin & Givskov, 1999; González & Saiz-Jiménez, 2005). Los resultados revelaron una variedad de especies microbianas que se desarrollan activamente en la Cueva de Altamira, siendo el grupo bacteriano predominante las Proteobacterias. También se detectó la presencia de bacterias anaeróbicas estrictas (como, por ejemplo, las bacterias reductoras de sulfato) en muestras que se creían aeróbicas. La existencia de microorganismos y microhábitats anaeróbicos expande el rango de posibilidades para que los microorganismos afecten a los procesos de precipitación y disolución de carbono inorgánico. Hemos comprobado la presencia activa de bacterias metanótrofas (consumidoras de metano) que pudieran tener un efecto directo en la producción y consumo de CO₂, respectivamente. La combinación de técnicas moleculares (a partir de ADN y ARN) con el cultivo de microorganismos, permitirá determinar los componentes de la comunidad microbiana y dirigir el esfuerzo de cultivos de microorganismos a aquellos grupos funcionales más característicos.

Los microorganismos en la naturaleza interactúan unos con otros y con su entorno o micronicho particular, especialmente en biofilms. Por tanto, las comunidades microbianas representan sistemas altamente complejos en los que los productos del metabolismo de unos son utilizados por otros, y los cambios en el medio creados por unos microorganismos afectan a otros. Estas relaciones sintróficas entre microorganismos son punteras en microbiología ambiental hoy en día y pueden afectar a escalas desde varias micras hasta metros o kilómetros. Consecuentemente, los microorganismos dependen de los parámetros físicos, químicos y geológicos donde viven, experimentando mayor o menor desarrollo e incluso cambiando su metabolismo. Más aún, muchos microorganismos en la naturaleza se encuentran inactivos, es decir, no desarrollan actividad metabólica aparente. Estos microorganismos estarían a la espera de cambios en su microhábitat para desarrollarse y llevar a cabo una actividad determinada. Un ejemplo serían los microorganismos

anaerobios facultativos que en presencia de oxígeno llevan a cabo respiración aeróbica (produciendo CO₂), mientras que en ausencia de oxígeno realizan fermentaciones (produciendo fundamentalmente ácidos orgánicos y CO₂, entre otros). Otro ejemplo serían los microorganismos que producen esporas, como las bacterias *Clostridium* spp., y Actinobacterias, que no desarrollan actividad significativa en las cuevas estudiadas (resultados obtenidos por técnicas moleculares basadas en ARN por nuestro grupo). Sin embargo, en los cultivos a partir de estas muestras se obtienen casi exclusivamente este tipo de microorganismos, ya que son microorganismos que se ven favorecidos por condiciones ricas en nutrientes como las ofrecidas en los medios de cultivo.

Todo lo anterior indica que el abordaje conjunto de microbiólogos junto a físicos, químicos y geólogos es crucial para el avance de la geomicrobiología como disciplina científica. Cambios estacionales en la concentración de CO₂ típicos de cavidades kársticas someras (Hoyos *et al.*, 1998; Sánchez-Moral *et al.*, 1999; Cuezva *et al.*, 2004; Lario *et al.*, 2005), podrían influenciar decisivamente el metabolismo de las comunidades microbianas y afectar a procesos de solubilidad o precipitación de carbonatos bioinducidos. Por tanto, resulta decisiva la caracterización de las condiciones microambientales en cada punto, así como el análisis estacional, de los ambientes en los que se propone este estudio a través de parámetros físicos, químicos y geológicos en conjunción con estudios microbiológicos. El objetivo debe centrarse en conocer las variaciones microambientales existentes entre diferentes puntos con ausencia o distintos grados de colonización microbiana. Además de la caracterización microambiental, los trabajos a realizar se centrarían en identificar y evaluar la actividad de las poblaciones microbiológicas presentes en el ambiente subterráneo y en el suelo exterior inmediatamente suprayacente, caracterizando el tipo de substrato sobre el que viven y las aguas intersticiales y de infiltración relacionadas con la proliferación de microorganismos. Una vez conocidas las condiciones microambientales y geoquímicas de su entorno natural, los cultivos podrían realizarse reproduciendo dichas condiciones, lo que permitirá analizar en detalle el papel potencial en la precipitación/disolución de carbono inorgánico en las condiciones determinadas in situ.

La complejidad intrínseca a la gran cantidad y variedad de datos obtenidos mediante esta estrategia hace recomendable el uso de métodos informáticos

de tratamiento de datos espaciales. Estos métodos informáticos se basan en tecnología S.I.G. (Sistemas de Información Geográfica), que no son más que programas que permiten, tanto en 2D como en 3D, el tratamiento de grandes cantidades de información espacial. En estos programas la información se estructura por un lado en bases de datos que almacenan y ordenan la información y por otro en expresiones gráficas en forma de mapas de la información almacenada. Obtenida esta integración se puede generar un flujo activo de intercambio de información, el contraste de los datos obtenidos mediante fuentes diferentes y la generación de nuevos datos a partir de la combinación y tratamiento de los distintos resultados geoespaciales.

Como fin último, los sistemas de información geográfica permiten la integración, síntesis y gestión de datos de diversos orígenes, escalas y temáticas que se relacionan en un entorno de trabajo o con unos objetivos comunes. Una ingente cantidad de información espacial puede ser resumida, manejada, gestionada y, por lo tanto, aprovechada con eficacia y rentabilidad dentro de un mismo marco de trabajo.

Conclusiones

El avance de la geomicrobiología como disciplina precisa de la aplicación de diferentes metodologías (caracterización microambiental, petrología de alta resolución, geoquímica e hidroquímica de mayores-trazas-isótopos, microbiología y biología molecular) con el objeto de determinar el papel de las diferentes comunidades microbianas que habitan los ambientes kársticos (y en general cualquier ambiente) en los fenómenos de precipitación/disolución mineral, e identificar las propiedades físicas (por ejemplo, morfología cristalina) y químicas (por ejemplo, señal isotópica ^{13}C y ^{18}O) de las fases cristalinas bioinducidas tanto en el ambiente natural como en cultivos de laboratorio. Este último aspecto es clave para identificar con precisión el origen de los minerales derivados directa o indirectamente de la actividad biológica. Otro aspecto fundamental es la realización de mapeos detallados de la distribución de los diferentes tipos de colonias de microorganismos existentes en un medio, empleando técnicas fotográficas y programas de análisis y procesamiento de imagen.

Los resultados más recientes obtenidos por nuestro grupo de investigación siguiendo esta estrategia

integradora, basada en la aplicación de una metodología multidisciplinar y novedosa a los ambientes subterráneos, han permitido obtener conclusiones sobre varios aspectos fundamentales: 1) las poblaciones microbianas existentes en los sistemas kársticos subterráneos son mucho más diversas de lo que en un principio se creía (Laiz *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006); 2) la distribución del tipo y abundancia de microorganismos depende de las características petrofísicas y geoquímicas del sustrato sobre el que se instalan (Sánchez-Moral *et al.*, 2005); 3) las características microambientales e hidroquímicas de dichos sistemas varían estacionalmente, siendo especialmente intensas las variaciones en la concentración de Rn , CO_2 en aire y agua (Cuezva *et al.*, 2004; Lario *et al.*, 2005); 4) las colonias microbianas se asocian usualmente a depósitos carbonatados de neoformación en los que se distinguen variaciones morfotexturales que indican cambios físico-químicos del medio en el que se han generado (Cañaveras *et al.*, 1999; Cañaveras *et al.*, 2001; Cuezva *et al.*, 2003); 5) Muchas de las especies identificadas en los medios subterráneos estudiados y cultivadas en laboratorio muestran la capacidad de inducir la precipitación de carbonatos y otras especies minerales (Sánchez-Moral *et al.*, 2003 a, b, 2004), y 6) sólo una fracción de los microorganismos se muestran metabólicamente activos *in situ* en un momento determinado (González & Saiz-Jiménez, 2005; González *et al.*, 2006), lo que sugiere que la mayoría de los microorganismos dependen de cambios microambientales en su entorno para poder desarrollar su actividad metabólica.

La integración, síntesis y gestión de todos los datos procedentes de diversos orígenes, escalas y metodologías analíticas debe gestionarse con sistemas de información geográfica (SIG) que deben tener como base la topografía digital de detalle del interior de la cueva en relación a la topografía de la superficie exterior. Su uso permite conocer con mucha exactitud las condiciones microambientales y geoquímicas precisas bajo las que se encuentran las diferentes comunidades microbianas. Es además una herramienta básica a la hora de determinar la distribución de los sustratos biorreceptivos, frente a los no biorreceptivos, fundamental para establecer las áreas de colonización preferencial.

La disponibilidad de datos microambientales mediante monitorización continua, así como información de la composición de las comunidades microbianas obtenida por métodos moleculares,

junto al estudio de los diferentes soportes, permitiría tanto llevar a cabo cultivos dirigidos al aislamiento de microorganismos específicos como analizar cultivos de microorganismos con diversas fisiologías en condiciones similares a las determinadas en las cuevas estudiadas en cada estación climática. De esta forma, los resultados obtenidos en ambos medios (natural y laboratorio) podrían ser correlacionados, individualizando el papel de microorganismos concretos e integrando este conocimiento en un modelo global biogeoquímico de los procesos de transformación mineral en los sistemas kársticos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de los proyectos CGL2006-11561/BTE y CGL2006-07424/BOS.

Referencias

- Albertano P., Moscone D., Palleschi G., Hermosin B., Saiz-Jiménez C., Sánchez-Moral S., Hernández-Marine M., Urzì C., Groth I., Schroeckh V., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Gallon J. R., Graziottin F., Bisconti F., Giuliani R. (2003). Cyanobacteria attack rocks (CATS): Control and preventive strategies to avoid damage caused by cyanobacteria and associated microorganisms in Roman Hypogean Monuments. In: *Molecular Biology and Cultural Heritage* (C. Saiz-Jiménez, edit.). Swets & Zeitlinger, Lisse (NL), 151-162.
- Ascano, C. y Wierzbos, J. (2003). The search for biomarkers and microbial fossils in Antarctic rock microhabitats. *Geomicrobiol. J.*, 20: 439-450.
- Awramik, S. M. (1992). The oldest records of photosynthesis. *Photosynthesis Res.*, 33: 75-89.
- Banfield, J. F. y Nealson, K. H. (1997). *Geomicrobiol. Rev. Mineral.*, 35: 448.
- Barton, H. A., Taylor, M. R. y Pace, N. R. (2004). Molecular Phylogenetic Analysis of a Bacterial Community in an Oligotrophic Cave Environment. *Geomicrobiol. J.*, 21: 11-20.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L., McKenzie, J. A. (2006). Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Curr. Sci. India*, 90: 58-64.
- Blair, N., Leu, A., Muñoz, E., Olsen, J., Kwong, E. y Des Marais, D. (1985). Carbon isotopic fractionation in heterotrophic microbial metabolism. *Appl. Environ. Microb.*, 50: 996-1001.
- Bolliger, C., Schönholzer, F., Schroth, M. H., Hahn, D., Bernasconi, S. y Zeyer, J. (2000). Characterizing intrinsic bioremediation in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer by combined chemical, isotopic and biological analyses. *Bioremed. J.*, 4: 359-371.
- Boquet, E., Bordonat, A. y Ramos CORMENZANA, A. (1973). Production of calcite crystals by soil bacteria is a general phenomenon. *Nature*, 246: 527-528.
- Borsato, A., Frisia, S., Jones, B. y Van der Borg, K. (2000). Calcite moonmilk: crystal morphology and environment of formation in caves in the Italian Alps. *J. Sedim. Res.*, 70: 1179-1190.
- Brock, T. D. y Madigan, M. T. (1991). *Biology of microorganisms. 6th edition*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 991 págs.
- Buzolyova, L. S. y Somov, G. P. (1999). Autotrophic assimilation of CO₂ and C₁-compounds by pathogenic bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 64: 1146-1149.
- Cacchio, P., Contento, R., Ercole, C., Cappuccio, G., Preite-Martínez, M. y Lepidi, A. (2004). Involvement of Microorganisms in the Formation of Carbonate Speleothems in the Cervo Cave (L'Aquila-Italy). *Geomicrobiol. J.*, 21: 497-509.
- Cañaveras, J. C., Sánchez-Moral, S., Sanz Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., González, I. y Saiz-Jiménez, C. (1999). Microbial communities associated to hydromagnesite and needle fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiol. J.*, 16: 9-25.
- Cañaveras, J. C., Sánchez-Moral, S., Soler, V. y Saiz-Jiménez, C. (2001). Microorganisms and Microbially Induced Fabrics in Cave Walls. *Geomicrobiol. J.*, 18: 223-240.
- Cañaveras, J. C., Cuezva, S., Sánchez-Moral, S., Lario, J., Laiz, L., González, J. M. y Saiz-Jiménez, C. (2006). On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften*, 93: 27-32.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G. y Perthuisot J.-P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedim. Geol.*, 126: 9-23.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., Perthuisot, J. P. Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. (2000). In: *Microbial Sediments* (R. E. Riding, R. E. y S. M. Awramik, edit.) Springer-Verlag, Heidelberg, 32-39.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V. y Lovley, D. R. (1999). *Geothrix fermentans* gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1615-1622.
- Cuezva, S., Cañaveras, J. C., González, R., Lario, J., Luque, L., Saiz, C., Sánchez-Moral, S. y Soler, V. (2003). Origen bacteriano de espelotemas tipo moonmilk en ambiente kárstico (Cueva de Altamira, España). *Estudios Geol.*, 59: 145-157.
- Dove, P. M., De Yoreo, J. J. y Weiner S. (edit.) (2003). *Biomaterialization. Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, 54. Geochemical Society, St. Louis, MO, and Mineralogical Society of America, Washington, 381 págs.
- Ehrlich, H. L. (1998). Geomicrobiology.: its significance for geology. *Earth-Sci. Rev.*, 45: 45-60.
- Ehrlich, H. L. (2002). *Geomicrobiology.*, 4th ed. Marcel Dekker, New York, 768 págs.
- Engel, A. S., Porter, M. I., Kinkle, B. K. y Kane, T. C. (2001). Ecological assessment and geological signifi-

- cance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. *Geomicrobiol. J.*, 18: 259-274.
- Forti, P. (2001). Biogenic speleothems: an overview. *Int. J. Speleol.*, 30: 39-56.
- González, J. M. y Saiz-Jiménez, C. (2004). Microbial activity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. of Separation Science*, 27: 174-180.
- González, J. M. y Saiz-Jiménez, C. (2005). Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments. *Int. Microbiol.*, 8: 189-194.
- González, J. M., Portillo, M. C., Saiz-Jiménez, C. (2006). Metabolically active Crenarchaeota in Altamira Cave. *Naturwissenschaften*, 93: 42-45.
- Guillitte, O. (1995). Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *Sci. Total Environ.*, 167: 215-220.
- Holmes, A. J., Tujula, N. A., Holley, M., Contos, A., James, J. M., Rogers, P., Gillings, M. R. (2001). Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environ. Microbiol.*, 3: 256-264.
- Hose, L. D., Palmer, A. N., Palmer, M. V., Northup, D. E., Boston, P. J. y Duchene, H. R. (2000). Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chem. Geol.*, 169: 399-423.
- Hoyos, M., Soler, V., Cañaveras, J. C., Sánchez-Moral, S. y Sanz-Rubio, E. (1998). Microclimatic characterization of a karst system. Human impact on microenvironmental parameters of a prehistoric rock art cave (Candamo Cave, northern Spain). *Environ. Geol.*, 33: 231-242.
- Kellerman, K. F. (1915). Relation of bacteria to deposition of calcium carbonate. *Geol. Soc. Am. Bull.*, 26: 58.
- Laiz, L., González, J. M., y Saiz-Jiménez, C. (2003). Microbial communities in caves: Ecology, physiology, and effects on paleolithic paintings. In: *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of works of Art* (R. J. Koestler, V. R. Koestler, A. E. Carola y F. E. Nieto-Fernández, edit.). The Metropolitan Museum of Art, New York, 210-225.
- Mastromei, G., Biagiotti, L., Daly, S., Perito, B. y Tiano, P. (1999). Stone reinforcement by biomediated calcite crystal precipitation. *International Conference on Microbiology and Conservation*, (ICMC'99), Florence, 253-256.
- McCallum, M. F., y Guhathakurta, K. (1970). The precipitation of calcium carbonate from seawater by bacteria isolated from Bahama bank sediments. *J. Appl. Bacteriol.*, 33: 649-655.
- Molin, S. y Givskov, M. (1999). Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. *Environ. Microbiol.*, 1: 383-391.
- Northup, D. E., Reysenbach, A. y Pace, N. (1997). Microorganisms and speleothems. In: *Cave Minerals of the World* (Hill, C. y Forti, P., edit.). NSS, Huntsville, 261-266.
- Northup, D. E., Dahm, C. N., Melim, L. A., Spilde, M. N., Crosse, L. J., Lavoie, K. H., Mallory, L. M., Boston, P. J., Cunningham, K. I., y Barns, S. M. (2000). Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *J. Cave Karst Stud.*, 62: 80-90.
- Northup, D. E. y Lavoie, K. H. (2001). Geomicrobiol. of caves: A review. *Geomicrobiol. J.*, 18: 199-220.
- Rivadeneira, M. A., Delgado, R., Delgado, G., Del Moral, A., Ferrer, M. R., Ramos-Cormenzana, A. (1994). Precipitation of carbonates by *Bacillus* sp. Isolated from saline soils. *Geomicrobiol. J.*, 11: 174-184.
- Rodríguez-Navarro, C., Rodríguez-Gallego, M., Ben Chekroun, K. y González-Muñoz, M. T. (2003). Conservation of Ornamental Stone by *Myxococcus xanthus*-Induced Carbonate Biomineralization. *Appl. Environ. Microb.*, 69: 2182-2193.
- Sánchez-Moral, S., Cañaveras, J. C., Laiz, L., Saiz, C., Bedoya, J. y Luque, L. (2003a). Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments. A short review. *Geomicrobiol. J.*, 20: 491-500.
- Sánchez-Moral, S., Bedoya, J., Luque, L., Cañaveras, J. C., Jurado, V., Laiz, L. y Saiz, C. (2003b). Biomineralization of different crystalline phases by bacteria isolated from catacombs. In: *Molecular Biology & Cultural Heritage* (C. Saiz, edit.). Balkema, Lisse, 179-185.
- Sánchez-Moral, S., Luque, L., Cañaveras, J. C., Laiz, L., Jurado, V., Hermosín, B. y Saiz-Jiménez, C. (2004). Bioinduced barium precipitation in San Callixtus and Domitilla Catacombs. *Ann. Microbiol.*, 54: 1-12.
- Sánchez-Moral, S., Luque, L., Cuezva, S., Soler, V., Benavente, D., Laiz, L., González, J. M., Saiz, C. (2005). Deterioration of building materials in Roman catacombs: The influence of visitors. *Sci. Total Environ.*, 349: 260-276.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jiménez, C., Piñar, G., Lubitz, W. y Rölleke, S. (2002). Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211: 7-11.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz, C., Piñar, G., Lubitz, R. y Rölleke, S. (2004). Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic painting and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín, La Garma). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47: 235-247.
- Smith, K. S. y Ferry, J. G. (2000). Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 24: 335-366.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. y Breznak, J. A. (2004). New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 4748-4755.
- Tripp, B. C., Smith, K. y Ferry, J. G. (2001). Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J. Biol. Chem.*, 276: 48615-48618.
- Verrecchia, E. P. y Verrecchia, K. E. (1994). *Needle-fiber calcite*: a critical review and a proposed classification. *J. Sediment. Res.*, A64: 650-664.
- Vlasceanu, L., Sarbu, S. M., Engel, A. S. y Kinkle, B. K. (2000). Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.*, 17: 125-140.
- Ward, D. M., Weller, R. y Bateson, M. M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345: 63-65.
- Warscheid, Th. y Braams, J. (2000). Bioreceptivity of building stones. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 46: 343-368.

- Wierzchos, J., Ascaso, C., Agar, F. J., García-Orellana, I., Carmona-Luque, A. y Respaldiza, M. A. (2006a). Identifying elements in rocks from the Dry Valleys desert (Antarctica) by ion beam proton induced X-ray emission. *Nuclear instruments & methods in physics research section b-beam interactions with materials and atoms*, 249: 571-574.
- Wierzchos, J., Ascaso, C. y McKay, C. P. (2006b). Endolithic cyanobacteria in halite rocks from the hyperarid core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 6: 415-422.
- Zavarzin, G. A. (2002). Microbial Geochemical Calcium Cycle. *Microbiology*, 71: 1-17.
- Zimmermann, J., González, J. M., Ludwig, W., Saiz-Jiménez, C. (2005). Detection and phylogenetic relationships of a highly diverse uncultured acidobacterial community on paleolithic paintings in Altamira Cave using 23S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiol. J.*, 22: 379-388.

Recibido el 6 de noviembre de 2006
Aceptado el 15 de diciembre de 2006