

El origen biológico de los espeleotemas de ópalo del Sistema Brewer, Guayana Venezolana

Vicente Marcano¹, Ricardo Amils² y Charles Brewer-Carias³

Bioespeleotemas en forma de champiñones. Sistema Brewer. Macizo de Chimantá. Guayana Venezolana
Foto: Charles Brewer Carias

Resumen:

El sistema de cuevas de cuarcita Brewer, el de mayor extensión en el mundo, se localiza en las Tierras Altas de la Guayana, Macizo de Chimantá. Los espeleotemas hallados en este sistema son poco usuales. Consisten de estromatolitos columnares de ópalo amorfo (A) formados en el piso y paredes pero no en el techo. Un estudio llevado a cabo utilizando técnicas analíticas (XRPD, NIRS, UVS, and FM) y de biología molecular (FISH, CARD-FISH, DGGE, PCR), reveló la existencia de una asociación mineral/microbiana compleja, con la presencia dominante de *Acidithiobacillus ferroxidans* como bacteria oxidadora de hierro. Este hallazgo condujo a reconocer la existencia de una nueva forma de vida, basada en una bioorganización polisimbiótica estromatolítica con semejanza a un líquen, formada principalmente a partir de procesos de biomineralización consistentes en la conversión del sílice a ópalo A.

Palabras clave: biomineralización, estromatolitos, ópalo, espeleotemas, tepuyes

¹ Laboratorio de Biología Evolutiva y Extremofilia. Grupo de Ciencias Atmosféricas y del Espacio, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela. E-mail: vicente.marcano@gmail.com

² Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-Universidad Autónoma de Madrid - Centro de Astrobiología, INTA-CSIC-NASA, Madrid, España.

³ Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Abstract:

Among the quartzite cave systems, Brewer cave system is considered one having the longer extension in the world and is located at the Guayana Highland, Chimanta Massif. The speleothems found in this system are unusual and consist of opal columnar stromatolites recognized from the floor and walls but not from the cave roof. These speleothems consist of (amorphous) opal-A. A study of these speleothems utilizing several analytical techniques (XRPD, NIRS, UVS, and FM), including molecular biology (FISH, CARD-FISH, DGGE, PCR), revealed the presence of a complex mineral/microbial association dominating *Acidithiobacillus ferroxidans* as Fe-oxidizing bacteria. This finding led to recognize the occurrence of a new life-shape based on a lichen-like stromatolitic polysymbiotic bioorganization mainly formed from the oxidizing action of chemolithoautotrophic bacteria on quartzite.

Keywords: biomineralization, stromatolites, opal, speleothems, tepuyes.

Introducción

Existen dudas acerca de cuál es el rol que podrían jugar los microorganismos con la formación de las cuevas, espeleotemas y estructuras minerales (Northup *et al.*:1997, 2000; Vlasceanu *et al.*:2000; Northup y Lavoie: 2001; Forti: 2001; Barton *et al.*: 2002; Wray y Sauro: 2017). La lista de minerales reconocidos formados biogénicamente incluye más de 80 sustancias (Lowenstam y Weiner: 1989; Addadi y Weiner: 2014). Entre los minerales formados en conexión con bacterias y otros organismos, destacan algunas formaciones de silicatos (Amores y Warren: 2007; Konhauser y Jones: 2011). Gorbushina y colaboradores (1997, 2001) demostraron como la meteorización y degradación de la cuarcita que prevalece en las cumbres y laderas de los tepuyes (montañas en forma de meseta de la Guayana), constituye un proceso lento influenciado por factores biológicos donde participan colonias poikilotróficas de cianobacterias, hongos y algunos líquenes (e.g. *Peltula* spp.) que mineralizan estructuras microestromatolíticas. Los biominerales reconocidos en estas estructuras son el ópalo amorfo (A) ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) y la forsterita (SiO_4Mg_2), los cuales ocurren en meteoritos Marcianos (Bell *et al.*: 1999, Rubin *et al.*: 2000) y además en la superficie de Marte (Michalski *et al.*: 2003). De cualquier manera, este proceso mediado por los líquenes no

es conocido en cuevas y está básicamente determinado por la acción de los compuestos polifenólicos liquénicos y del ácido oxálico (Gorbushina *et al.*: 1997,2001; Marcano *et al.*: 2020; Marcano: 2022).

La primera meseta explorada con cuevas de cuarcita de la Guayana fue el Autana tepui, ubicada hacia el Este del Bajo Orinoco, en proximidad a los ríos Sipapo y Cuaó (Brewer-Carías: 1976; Colveé: 1972, 1973; Urbani y Szczerban: 1974; Urbani: 1976a y b). Brewer-Carías en 1971 realizó la primera incursión a la Cueva del Autana. Posteriormente en 1975, un equipo de escaladores de la Sociedad Venezolana de Espeleología (SVE: 1976a y b) logró ascender desde la base hasta la cueva, realizando su exploración y levantamiento topográfico en detalle. El estudio del material mineral colectado reveló la presencia de ópalo en los espeleotemas de la cueva (Urbani: 1976b). Urbani analizó mediante difracción de rayos X (XRD), muestras de espeleotemas de esta cueva, coincidiendo la curvatura del difractograma a $22,5^\circ$ 2 teta con la presencia de ópalo-A. Adicionalmente, el autor reportó la presencia de calcita y calcedonia, esta última considerada un producto de recristalización del ópalo. Aunque Urbani consideró el origen de los espeleotemas de ópalo a partir de una precipitación mediada por factores hidrotermales en presencia de calcita con pH alcalinos, no descartó la posibilidad de la intervención de factores biogénicos en la precipitación de este mineral (Urbani: 1976b).

El estudio del material mineralógico colectado por la Expedición Polaco-Venezolana de 1976 en las cuevas del Sarisariñama (Zawidski *et al.*: 1976) mostró la presencia de ópalo en muchas diferentes formas de espeleotemas, tales como estalactitas, piedras en flujo (flowstones) y diferentes tipos de costras y formas semejantes a corales. De igual modo, los autores reconocieron en los espeleotemas de ópalo una apariencia que abarcaba todos los matices desde el negro al blanco. De igual modo reportaron la presencia por primera vez en cavernas, del mineral litioforita ($\text{LiMn}_3\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y de espeleotemas de óxido de hierro.

Aubrecht y colaboradores (2008), reportaron un posible origen microbiano para los espeleotemas de sílice de forma coralina procedentes de cuevas de cuarcita localizadas en el macizo de Chimantá y Cerro Roraima en la Guayana venezolana. Sin embargo, no identificaron las rutas biogénicas correspondientes a los procesos de biomineralización ni tampoco las bacterias específicas responsables de dichos procesos. Según estos autores, los espeleotemas con ópalo dominante, están constituidos por colonias de bacterias y son de dos tipos principales: 1, estromatolitos columnares fino-



laminados formados por microbios filamentosos silicificados (bacterias heterotróficas filamentosas o cianobacterias) y 2, estromatolitos peloidal porosos formados por cianobacterias tipo-Nostoc.

La primera expedición microbiológica al sistema de cuevas Charles Brewer, ubicado en el Macizo de Chimanta, fue conducida en Febrero del 2005, en la que se llevó a cabo un estudio físico-químico y microbiológico preliminar con el fin de determinar la presencia de posibles factores biogénicos como responsables de la formación de los espeleotemas (Brewer-Carias y Audy; 2010; Marcano *et al.*:2020; Marcano: 2022). Durante este estudio, se emplearon técnicas analíticas no-invasivas y de impacto mínimo para la detección y caracterización de vida microbiana. Estos procedimientos fueron conducidos bajo condiciones de campo muy difíciles que comparten muchas de las limitaciones que son comunes en el estudio de ambientes extremos. En la cueva, se reconocieron numerosos espeleotemas de sílice conformando una estructura estromatolítica columnar de opal y creciendo desde el piso y paredes, sin embargo no desde cualquier superficie que pudiera estar bajo las aguas (Brewer-Carias y Audy; 2010; Marcano *et al.*:2020; Marcano: 2022). Los espeleotemas mostraron una diversidad de formas descritas previamente por Aubrecht y colaboradores (2008, 2012), de forma coralina, balón (champiñón), negro-cónica, blanco-cónica y estructuras negro-blanca-cónica. Un estudio preliminar de estos espeleotemas, llevado a cabo *in situ* reveló con sorpresa la presencia de una muy compleja asociación mineral/microbial, incluyendo la presencia de estructuras semejantes a cianobacterias, lo cual nos condujo a establecer la hipótesis acerca de la existencia de una bioorganización polisimbiótica estromatolítica semejante a un líquen (Marcano *et al.*: 2020: Marcano: 2022), no obstante autotrófica, presentando una alta estabilidad en el tiempo y siendo capaz de formar un estromatolito columnar de ópalo amorfo a partir de la biomineralización por hidratación de silicatos cristalinos. De aquí que el término “bioespeleotema” sea utilizado.

Una segunda expedición a la Cueva “Charles Brewer” se realizó en mayo del 2006 cuyo objetivo fue confirmar los microorganismos específicos responsables de los procesos de biomineralización conducentes a la síntesis de ópalo utilizando técnicas de biología molecular y así determinar con certeza, si los espeleotemas de ópalo de la cueva constituyen bien sea el resultado de la actividad de bacterias oxidadoras del hierro en simbiosis y sinergia junto a otros microorganismos para la conformación de

un ecosistema autotrófico o son el resultado de un proceso abiogénico libre de la participación bacteriana (Marcano *et al.*: 2020; Marcano: 2022).

Sauro y colaboradores (2014, 2018), describieron la diversidad de formaciones amorfas de sílice procedentes del sistema de cuevas Imawari Yeuta, localizado en el Auyán tepui, Guayana venezolana. Los autores concibieron su origen a partir de una transición mediada por microorganismos, desde la ortocuarcita prístina a precipitados opalinos de sílice amorfos en la forma de estructuras semejantes a estromatolitos. Los tres phylum Proteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria representaron el 75–80% de la población microbial, encontrando una baja abundancia de Archaeobacteria y de bacterias nitrificadoras del género *Nitrobacter*. A pesar que los autores emplearon técnicas moleculares (extracción de ADN total, PCR, 16S rRNA gene targeting NGS, secuenciación Illumina), los autores no identificaron las rutas biogénicas correspondientes a los procesos de biomineralización para las variedades de espeleotemas de ópalo, ni tampoco las bacterias específicas responsables de dichos procesos. No obstante, sugirieron la probable ocurrencia de una actividad oxidadora del hierro por parte de algunos géneros Betaproteobacteriales (viz. *Thiobacillus* (= *Acidithiobacillus*), para la acumulación y precipitación del sílice amorfo. “La presencia en todas las muestras de grupos de bacterias con posible actividad oxidadora de Fe, los convierte en candidatos potenciales oxidadores de Fe involucrados en la formación de espeleotemas de sílice amorfo” (Sauro *et al.* 2018).

En la actualidad ambos sistemas de cuevas en cuarcita de la Guayana venezolana, el sistema Brewer, con 24,3 km de longitud (Brewer-Carias y Audy; 2010; Aubrecht *et al.*: 2012; Marcano, 2022) y el sistema Imawari Yeuta, con 20,2 km de longitud (Sauro *et al.*: 2014, 2018), constituyen los de mayor extensión en todo el mundo (*fig.1*).

El reconocimiento de comunidades quimioautotróficas en estas cuevas tiene especial relevancia para los estudios de la evolución de la biosfera temprana (Boston *et al.*: 1992; Boston: 1999; Mancinelli: 2000). El sílice es un elemento abundante en el universo el cual está presente en la forma de olivino y piroxeno en asteroides, cometas, satélites y cuerpos planetarios (Lodders: 1998). La biogenicidad de formaciones minerales secundarias (Barton *et al.*: 2002), puede ofrecer una visión alternativa en la búsqueda de nuevas formas de vida en el universo (Boston *et al.*: 2001).

El objetivo de este trabajo es documentar los rasgos sobre el origen biogénico de los procesos relativos a la formación y organización de espeleotemas de sílice del sistema de cuevas de cuarcita Charles Brewer, con el fin de ampliar el conocimiento

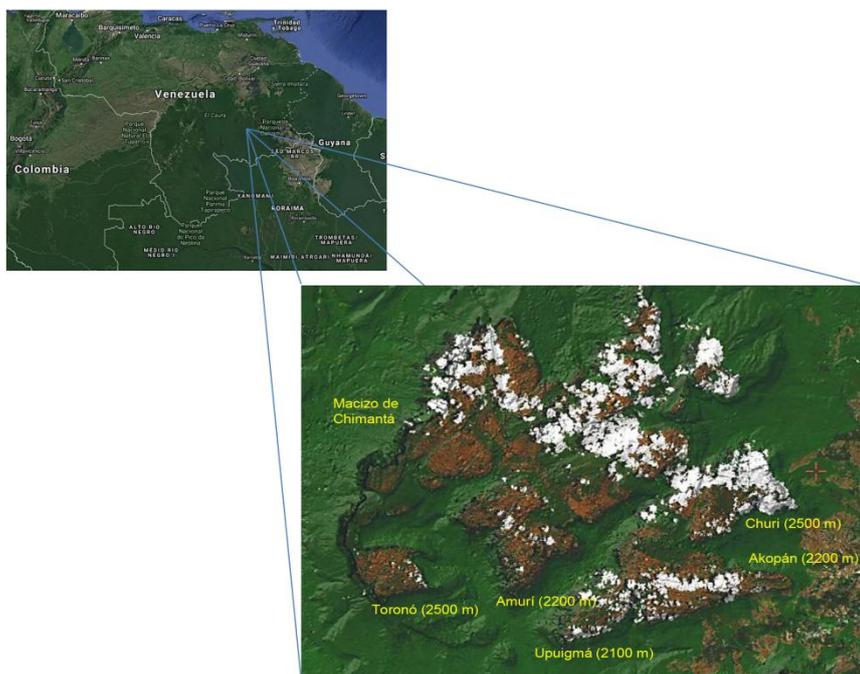


Fig.2: El sistema de cuevas de cuarcita Charles Brewer, se localiza en el Macizo de Chimantá, compuesto por diversas montañas (tepuí) en forma de meseta características de las Tierras Altas de la Guayana, Venezuela.

Análisis por difracción de rayos X (XRPD)

Se pulverizaron 16 sub-muestras de los espeleotemas proviniendo desde distintas secciones usando un mortero y pistilo de ágata, hasta que se obtuvo un polvo delgado y homogéneo con partículas más pequeñas a 53 μm . Luego, una porción del polvo fue colocada dentro de una celda para muestras bajo cero cubierta con una capa delgada de gel de petróleo. Un modelo de difracción del polvo se midió usando un Difractómetro Siemens D-5005. Las condiciones experimentales para el ensayo de difracción fueron las siguientes: Geometría θ/θ , modo scan por reflexión, detector de centelleo, voltaje y amperaje aplicados 40 KV and 20 mA, rango del ángulo $5^\circ\text{--}70^\circ$ (2θ), medida de los pasos $0,02^\circ$, tiempo del paso 10 s/paso, y temperatura 298K (ambiente). Se empleó un software para la identificación de las fases cristalinas, MDI JADE 5.0, integrado a la base de datos PDF-2 (POWDER DIFFRACTION FILE: 1999).

Análisis microbiológicos y de cultivos

Bacterias aisladas de los espeleotemas de ópalo-A se lavaron en una solución de 5 ml de PBS por 1 min, la cual se descartó y luego se añadió 1 ml de 0,05% tripsina

(conteniendo 0,53 mM EDTA). Las células se incubaron a 37°C por 2-5 minutos. La suspensión de las células se centrifugó a 1000g por 10 minutos a 4°C y entonces se añadió 0,5-1,0 ml de buffer para extracción de ADN (e.g. 10 mM Tris.Cl-pH 8-, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0,5% SDS) en el pellet y 100 µg/ml de proteinasa K fueron añadidos. La mezcla se incubó a 55°C en baño de maría toda la noche y luego se extrajo con fenol/cloroformo/iso-amil alcohol. Un procedimiento normalizado se observó de allí en adelante (Sambrook *et al.*: 1989) chequeando finalmente la concentración de ADN en 260 nm usando un espectrofotómetro Shimadzu.

Muestras de espeleotemas de ópalo-A procedentes de silicatos blancos y negros se cultivaron por 15 días a 13°C bajo condiciones de oscuridad, en discos estériles en autoclave conteniendo: A, medios de cultivo que incluyeron Czapek Dox modificado (CZA) (e.g. enriquecidos con sales de hierro y sulfuro) (45,4 g/l) y B, 100 ml del medio Mackintosh, específico para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mackintosh: 1978), en pH 4 y 5. Los cultivos se llevaron a cabo *in situ* en la cueva y en el laboratorio, bajo condiciones estériles y la identificación bacterial se llevó a cabo en el laboratorio mediante métodos microbiológicos normalizados.

Análisis molecular

Para el análisis molecular se fijaron muestras de espeleotemas *in situ* en una solución de formaldehído diluida al 4% en buffer a pH 4, para la posterior aplicación de las técnicas moleculares de FISH, CARD-FISH, PCR y DGGE. La metodología y las técnicas moleculares empleadas para el análisis de los espeleotemas de ópalo fueron tediosas, sin embargo se pueden resumir de la siguiente manera.

1. Reconocimiento preliminar de presencia bacteriana mediante un colorante fluorescente para enlazar ADN tal como Acridina Naranja y el tinte DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) y pruebas de vivo/muerto utilizando microscopía de fluorescencia y láser confocal (González-Torilet *et al.*: 2003, 2005).

2. Extracción de material genético utilizando el kit fastDNA-SPIN.

3. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído, para su posterior amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

4. Hibridación *in situ* mediante sondas de oligonucleótidos (target 16S, secuencia 5' a 3') de distinta especificidad (FISH) y con señal amplificada (CARD-FISH) correspondientes a Archaeobacteria, Eubacteria, *Nitrospira*, *Proteobacteria* (Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria), y *Acidithiobacillus sp.*, *Leptospirillum sp.*



y *Nitrobacter* sp. y reconocimiento de marcaje utilizando microscopía de fluorescencia y láser confocal (Amann *et al.*: 1990, 1995; GONZÁLES-TORIL *et al.* 2003, 2005).

5. Amplificación de ADN bacteriano por PCR y su resolución mediante técnicas de electroforesis de gel de gradiente denaturante (DGGE), el cual es un método para identificar cambios de base únicos en un segmento de ADN.

6. Secuenciación de bandas de ADN bacteriano obtenidas por DGGE.

7. Identificación de microorganismos por comparación de secuencias y establecimiento de las filogenias correspondientes (González-Toril *et al.*: 2003, 2005).

Resultados

Análisis por difracción de rayos X (XRPD)

El análisis por XRPD de las secciones externas (blanca porosa) e internas (negra vítrea y marrón) de los espeleotemas reveló una banda amplia de dispersión típica que coincide con ópalo amorfo ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (*fig. 3*). Las bandas amplias de dispersión XRPD tanto en la sección negra vítrea como en la sección blanca porosa (friable) mostraron una intensidad máxima centrada en los $22,5^\circ 2\theta$ y la presencia de un pico en $27^\circ 2\theta$ correspondiendo a cuarzo detrítal (*fig. 3*). El análisis por XRPD de la sección central o intermedia mostró una banda amplia de dispersión XRPD del ópalo-A relacionada a la presencia de formas cristalinas de color marrón que corresponden a fosfatos hidratados conteniendo Al y Fe identificadas como vauxita $\text{FeAl}_2(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ y vashegyita $\text{Al}_{11}(\text{PO}_4)_9(\text{OH})_6 \cdot 38(\text{H}_2\text{O})$ o $\text{Al}_6(\text{PO}_4)_5(\text{OH})_3 \cdot 23(\text{H}_2\text{O})$ (*fig. 4*).

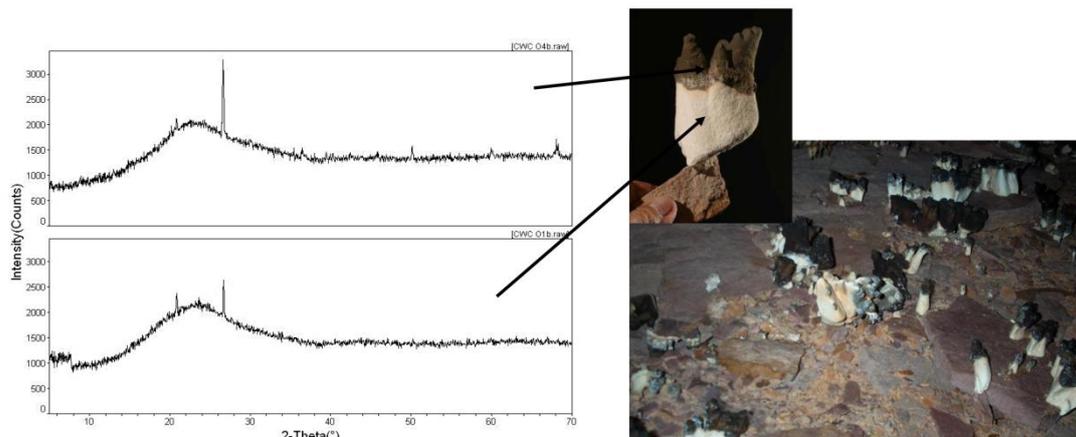


Fig.3: El análisis por difracción de rayos X (XRPD) mostró bandas amplias de dispersión típica que coincide con ópalo-A en los espeleotemas semejantes a corales y cónicos, revelando una friabilidad e hidratación variables entre las distintas secciones o capas del espeleotema. A, negro (vítrea); y B, blanco (poroso friable).

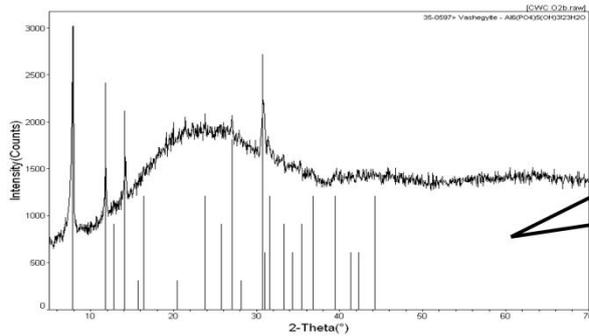


Fig.4: El análisis por XRPD de la sección central o intermedia de color marrón mostró una banda amplia de dispersión típica de ópalo-A relacionada a la presencia de formas cristalinas que corresponden a fosfatos hidratados conteniendo Al y Fe identificadas como vauxita y vashegyita.

Por otra parte, el análisis por XRPD de los espeleotemas en forma de champiñones, evidenció la presencia de una estructura amorfa consistiendo de granos de sílice no-hidratados en la zona periférica, mientras en la zona central (S), se encontró una fase de ópalo negro-vítreo (fig. 5).

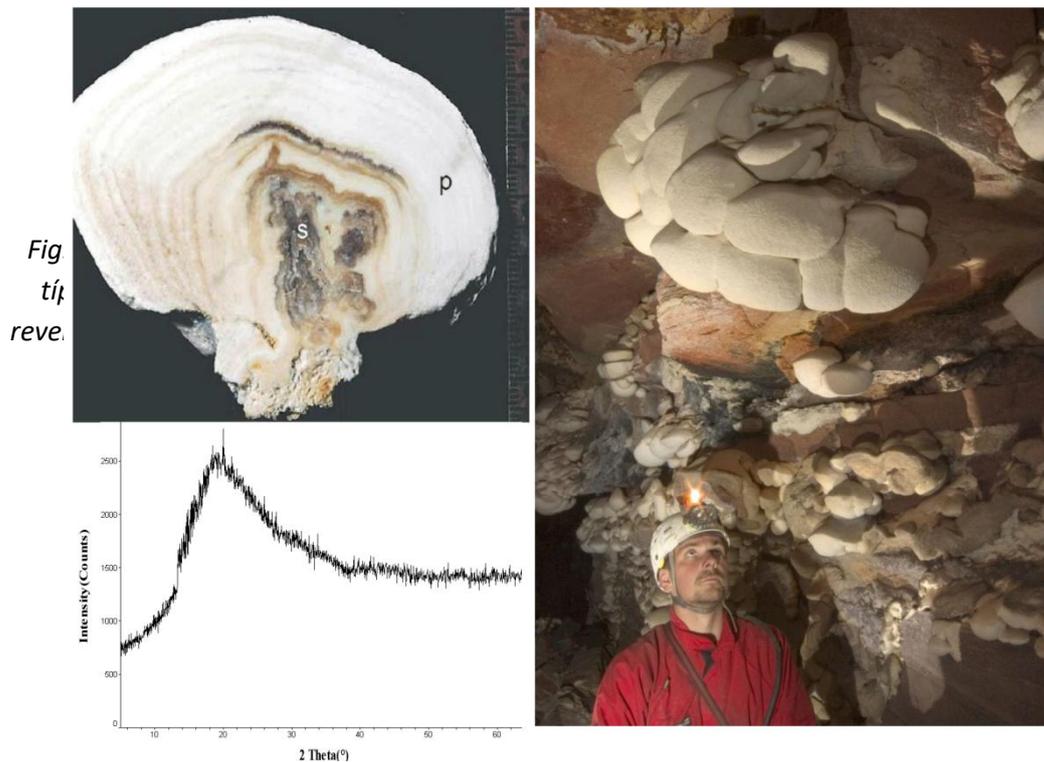


Fig.5: El análisis por XRPD de los espeleotemas de ópalo en forma de champiñones (A), mostró una banda de dispersión en la zona periférica (P) relacionada a la presencia de granos de sílice amorfos no-hidratados (B), con un índice de friabilidad FI = 1, mientras en la zona central (S), se encontró una fase polimérica de ópalo negro-vítreo (FI = 5,) con una composición $\text{SiO}_2 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. (C).

Análisis microbiológico y molecular

El análisis espectrofotométrico por UV de los extractos para ADN corroboró la presencia de una población microbiana presentando una densidad alta en todas las secciones de los espeleotemas de ópalo-A, tal como lo indican las fuertes absorciones en los 266 nm correspondiendo al ADN microbiano aislado. El análisis microbiológico de los cultivos de la capa externa del ópalo blanco que provienen de los espeleotemas de ópalo-A reveló la presencia de microorganismos Gram-negativos, aeróbicos y quimiolitotróficos, de coloración marrón rojiza, en forma de bastón, con flagelos cortos o pili, específicos para *Acidithiobacillus ferroxidans*. Por otra parte, los cultivos de la capa blanca más interna de los silicatos desde los espeleotemas, mostró abundantes bacterias con motilidad, presentando endosporas pertenecientes al género *Bacillus* asociadas a una población densa de *Nitrobacter* sp. Las observaciones obtenidas con los cultivos están en concordancia con las observaciones obtenidas con las muestras de espeleotemas. Las capas externas de los espeleotemas mostraron la presencia de abundantes colonias de cianobacterias unicelulares, pertenecientes al género *Aphanocapsa* (Merismopediaceae, Synechococcales), las cuales fueron halladas también en el techo y pared de la cueva. Esta especie consistió de células esféricas no envueltas en una capa, sin embargo embebidas en una matriz gelatinosa.

El análisis mediante microscopía de luz normal y a través de DAPI y pruebas de vivo/muerto utilizando microscopía de fluorescencia y láser confocal de las secciones de ópalo blanco de los espeleotemas, reveló la presencia abundante de microorganismos unicelulares presentando distintas formas (e.g. baciliformes, en forma de cortos bastones), exhibiendo algunos motilidad, con un tamaño entre 2 a 5 μm de largo, tanto en las muestras fijadas en formaldehído al 4% como en los triturados de muestras no fijadas. Las secciones de ópalo negro revelaron una muy baja densidad bacteriana en ambos tipos de muestras comparada con las secciones de ópalo blanco. El análisis por microscopía láser confocal de los cristales de ópalo blanco y negro de igual manera mostró la presencia de bacterias específicas adheridas fuertemente a la superficie de toda la matriz mineral.

El resultado de hibridación *in situ* a partir de muestras de ópalo blanco y negro mediante sondas de oligonucleótidos de distinta especificidad utilizando microscopía de fluorescencia y láser confocal (FISH y CARD-FISH) reveló una respuesta positiva para las siguientes sondas: Eubacteria (EUB338; GCT GCC TCC CGT AGG AGT, secuencia 5' a 3'), Alphaproteobacteria, *viz.* *Nitrobacter* sp. (NTR712; CGC CTT CGC

CAC CGG CCT TCC, secuencia 5' a 3'), Gammaproteobacteria, viz. *Acidithiobacillus ferroxidans* (THIO1; GCG CTT TCT GGG GTC TGC, secuencia 5' a 3') (fig.6), mientras el resultado de la hibridación fue negativo para las siguientes sondas: Archaeabacteria y *Nitrospira*, viz. *Leptospirillum* sp. (Tabla I).

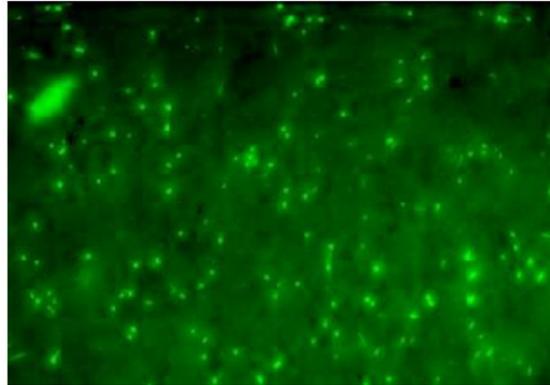


Fig.6: *Acidithiobacillus ferroxidans* hibridado con THIO1 (Alexa488) por CARD-FISH. Las muestras desde los espeleotemas de ópalo-A fueron evidenciadas por microscopía de fluorescencia.

TABLA I
Bacterias identificadas a partir de distintos métodos en secciones de ópalo-A blanco y negro correspondientes a espeleotemas procedentes del sistema de cuevas Charles Brewer, Churí tepui, Macizo de Chimantá, Venezuela

Taxones	Metabolismo	Métodos
Eubacteria (dominio) AGT*;	Desconocido	EUB338; GCT GCC TCC CGT AGG DGGE, PCR y secuenciación
Acidithiobacillaceae <i>Acidithiobacillus ferroxidans</i>	Oxidadora de Fe	THIO1; GCG CTT TCT GGG GTC TGC*; DGGE, PCR y secuenciación; microbiológico y bioquímico
Bradyrhizobiaceae <i>Nitrobacter</i> sp. TCC*;	Nitrificadora	NTR712; CGC CTT CGC CAC CGG CCT DGGE, PCR y secuenciación; bioquímico
Merismopediaceae <i>Aphanocapsa</i>	Fijadora de N ₂	Microbiológico y bioquímico
Bacillaceae <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus</i> spp. microbiológico y	Heterotrófico Heterotrófico	DGGE, PCR y secuenciación DGGE, PCR y secuenciación; bioquímico
Beijerinckiaceae <i>Methylocella tundrae</i>	Metanotrófica	DGGE, PCR y secuenciación

* Target 16S, secuencia 5' a 3'(Marcano *et al.*: 2020).



La extracción del material genético de la capa externa de los espeleotemas conteniendo ópalo blanco, utilizando kits específicos inicialmente presentó grandes dificultades. Sin embargo, empleando diferentes procesos extractivos, que contemplaron el aumento de los tiempos de sonicación y centrifugación, se pudo lograr un rendimiento significativo. La resolución por técnicas de electroforesis de gel de gradiente denaturante (DGGE) de los extractos de ADN bacteriano) mostró la presencia de 7 bandas, las cuales fueron amplificadas posteriormente por PCR y resueltas por electroforesis de gel de agarosa (fig. 7). El análisis por secuenciación de las bandas obtenidas por DGGE corroboró los resultados obtenidos utilizando las sondas de oligonucleótidos de secuencia 5' a 3' (target 16) para hibridación *in situ* y mostró la presencia adicional de bacterias heterotróficas (Firmicutes, Bacilli) tales como *Bacillus* sp. (clones SB-2, SB-1), *Bacillus cereus*, y especialmente una bacteria metanotrófica (Alphaproteobacteria, Rhizobiales) como es *Methylocella tundrae* (Tabla I). Es importante mencionar que el porcentaje de similitud de las secuencias correspondientes a las bandas analizadas con el de dichas bacterias fue del 98 al 99% para cada una de las especies.

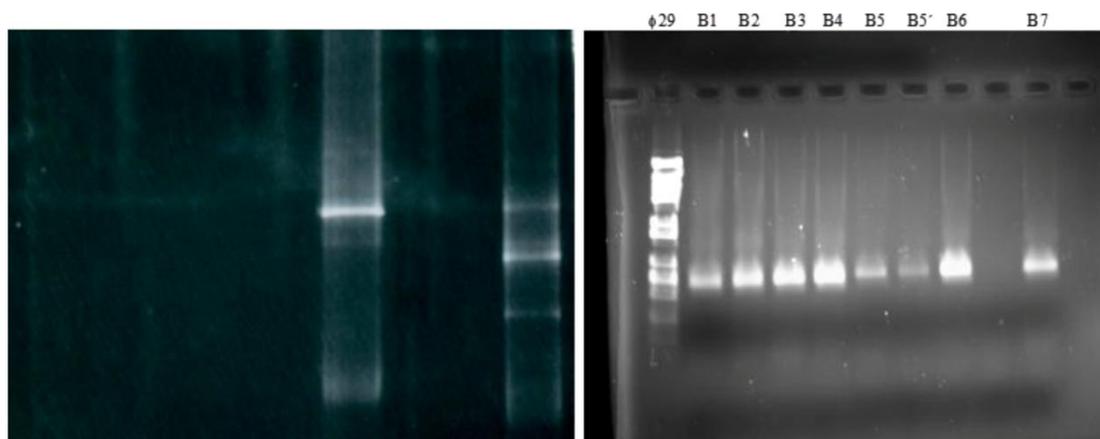


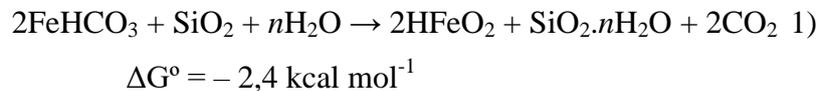
Fig.7: Gel de electroforesis (DGGE) revelado por luz ultravioleta mostrando la presencia de 7 bandas correspondientes a distintos tipos bacterianos (línea izquierda correspondiente a la sección central de ópalo negro; línea derecha a la capa externa de ópalo blancuzco) (A). Estas bandas fueron amplificadas posteriormente por PCR, resueltas por electroforesis de gel de agarosa y secuenciadas. B1, *Bacillus* sp.; B2, *Bacillus* sp.; B3, eubacterias; B4, *Acidithiobacillus* sp.; B5, *Nitrobacter* sp.; B6, *Bacillus cereus*, y B7, *Methylocella tundrae* (B).

Discusión

La evidencia sugiere que *Acidithiobacillusferrooxidans*, *Bacillus* spp. y cianobacterias participan sinérgicamente en la formación de los espeleotemas de ópalo-A (Birnbaumet al.: 1989; Toporskiet al.: 2002; Feinet al.: 2002; Benninget al.: 2004;

Konhauery Jones: 2011; Marcano *et al.*: 2020). En la formación de los espeleotemas en forma de coral y cónicos *A. ferroxidans* juega el rol más importante.

En la ruta para la formación de los espeleotemas de ópalo, el dióxido de carbono producido por los microorganismos forma ácido carbónico, favorecido por la alta humedad relativa del aire del 100%. Luego, este ácido carbónico ataca fuertemente la cuarcita meteorizándola, así como también a sus minerales accesorios conteniendo hierro (e.g. magnetita, biotita e ilmenita) (Amoresy Warren: 2007). Posteriormente, el ion HCO_3^- producido se une al hierro disuelto para formar FeHCO_3 , y de ahí en adelante este compuesto es oxidado en la pared celular de *A. ferroxidans* en la presencia de SiO_2 que proviene de la cuarcita meteorizada (Bodoy Lundgren: 1974). La reacción final esperada sería la siguiente:



donde n está entre 0,5 y 2. La goethita (HFeO_2) es precipitada mientras el ópalo lentamente agregado, dando lugar a dos fases en los espeleotemas de ópalo-A, resultando desde dos procesos de deposición diferentes (Iler: 1979; Williams *et al.*: 1985; Marcano *et al.*: 2020). Estas fases son: I, ópalo negro vítreo, de mayor densidad y menor porosidad, encontrado en la sección central de muchos espeleotemas y constituyendo espeleotemas cónicos de poco desarrollo, y II, ópalo blanco poroso (friable), menos denso, situado en la sección externa de los espeleotemas blanco-cónicos. La presencia de ópalo-A marrón relacionado a fosfatos hidratados presentando Al y Fe (vauxita y vashegyita), constituye una fase muy interesante, la cual podría estar relacionada a especiales eventos hidrogeológicos en la paleohistoria ambiental de la cueva (Lundberg *et al.*: 2010). Finalmente, el CO_2 es expulsado en el aire de la cueva y entonces reciclado para formar nuevamente ácido carbónico. De cualquier forma, el CO_2 así producido puede constituir una importante fuente de carbono para el ecosistema microbiano en la cueva, incluyendo para esos microorganismos que viven en los espeleotemas (Marcano *et al.*: 2020; Marcano: 2022). La goethita se ha reportado presente en el Macizo de Chimantá (Briceño y Paolini: 1992; Briceño y Schubert: 1992), en cuevas de cuarcita de la Guayana (Urbani: 1996) y por primera vez como un producto biogénico en los espeleotemas de ópalo del sistema Brewer (Marcano *et al.*: 2020; Marcano: 2022).

La meteorización de la cuarcita es el resultado de la acción de microorganismos (Wray y Sauro, 2017; Sauro *et al.*: 2018), tal como lo sugieren además los altos valores positivos registrados de potencial redox (Marcano *et al.*: 2020). Por otra parte, la reacción



(1) se espera ocurra en la pared celular de *A. ferroxidans* debido a su capacidad para concentrar SiO_2 y 2FeHCO_3 mediante enlaces facilitados por interacciones electrostáticas con grupos cargados negativamente en los polímeros estructurales de la célula (e.g. grupos carboxilo deprotonado, fosforilo e hidroxilo, polisacáridos y proteínas) (Feinet *al.*: 1997; Fortinet *al.*: 1998; Toporski *al.*: 2002; Kling *et al.*: 2011).

La precipitación biogénica de ópalo a partir de condiciones semiacuosas presentes en los espeleotemas (humedad 100%) es facilitada por un cierto grado de sobresaturación del sílice, a partir de una barrera de energía de activación que inhibe la precipitación espontánea desde un medio semiacuoso (Stumm:1992). Las reacciones de disolución y recristalización del ópalo-A en la historia de los espeleotemas son improbables, debido a que el ambiente de la cueva representa un sistema cerrado, de temperatura baja ($13,7^\circ\text{C}$ constante), donde los cambios de temperatura y presión son despreciables (Marcano *et al.*: 2020; Marcano: 2022).

La presencia de *A. ferroxidans* (= *Thiobacillus ferroxidans*) en cuevas de cuarcita de la Guayana fue reportada por Kunicka-Goldfinger (1982), específicamente en cuevas de la meseta del Sarisariñama. Sauro y colaboradores (2018), sugirieron la posibilidad de la presencia de *Thiobacillus* sp. en cuevas del Auyántepey. Esta bacteria se conoce bien desde hace décadas con la particularidad de desplegar un número de propiedades tales como acidofilia obligada, autotrofia, como también un crecimiento heterotrófico y la utilización de hierro como única fuente de energía para formar finalmente goethita (Temple y Calmer: 1951; Dana-Hurlbut: 1960). El organismo posee una estructura de envoltura celular externa típica de las bacterias Gram-negativas, sin embargo presenta un conjunto de propiedades adscritas a su envoltura celular que le son características (Remsen y Lundgren, 1966; Hirt y Vestal: 1974; Kling *et al.*: 2011). El hierro ferroso es oxidado en la superficie celular para obtener energía y no penetra a la célula (Bodo y Lundgren: 1974; Ehrlich: 1986). La envoltura aparentemente funciona estableciendo un gradiente del ion hidrógeno, dado que el pH intracelular de la célula es mucho más alto que el pH ambiental (Blaylock y Nason: 1963; Bodo y Lundgren: 1974). Una capa superficial proteínica semejante a un saco envolviendo toda la célula, parece estar involucrada en la adhesión de los cristales de hierro y en la formación de complejos de iones Fe_3^+ (Kling *et al.*: 2011).

La capacidad de las colonias de *A. ferroxidans* de generar campos eléctricos en medios ácidos (Lovley: 2008; Jibaja *et al.*: 2019), puede constituir una función selectiva de los microorganismos participantes en la asociación polisimbótica de los espeleotemas

según las características moleculares y de las cargas eléctricas de su envoltura celular y del sustrato, que merece ser investigada *in situ*. Dicha habilidad puede influir también en el proceso de biomineralización conducente a la formación de la estructura de ópalo.

Methylocella tundrae (Beijerinckiaceae) constituye una bacteria metanotrófica, acidófila y facultativa (Deydich *et al.*: 2004), cuya presencia resultó confirmada en los espeleotemas de ópalo-A. Este hecho es muy interesante, puesto se ha demostrado que *M. tundrae* puede consumir metano y moléculas C-C y C-O y utilizarlas como fuente de energía a partir de su respectiva oxidación (Farhan Ui Haque *et al.*: 2019). Aunque no se detectaron en los espeleotemas bacterias metanógenas (Archaeobacteria), este hecho hace suponer que los hidrocarburos de bajo peso molecular (incluyendo metano) consumidos por *M. tundrae*, deben ser generados a partir de otras fuentes en la cueva.

Las fechas más antiguas de espeleotemas empleando técnicas de datación basadas en desintegración de isótopos (U-Th) de sílice se remontan al Pleistoceno (Lundberg *et al.*: 2010). Según los datos de estos autores, la tasa de crecimiento máximo de los espeleotemas es de $0,37 \pm 0,23$ mm/ka. Esto indica que aproximadamente $2,7 \times 10^5$ años son requeridos para que un espeleotema de ópalo-A alcance una altura de 10 cm.

La tasa de disolución del cuarzo como una función del pH (2-6), equivale a 1×10^{-13} mol/m² s⁻¹ (Kowalewski y Kimstidt: 2003). Por tanto, la edad para la formación de los espeleotemas puede estimarse en $\sim 5,3 \times 10^6$ años por cada kilogramo de SiO₂ (en la cuarcita primaria) disuelto y transformado en ópalo-A (*fig. 8*).

Las estimaciones sobre la antigüedad de los espeleotemas basadas sobre la tasa de oxidación del ion ferroso por *A. ferroxidans* en la reacción (Marcano *et al.*: 2019; Marcano: 2022), indican edades de $\sim 3,6 \times 10^6$ años por cada kilogramo de ópalo-A producido, asumiendo una tasa de oxidación de $3,3 \times 10^{-10}$ μmol por bacteria min⁻¹ (Espejo *et al.*: 1988) y una densidad bacteriana de $\sim 4 \times 10^5$ células por m² calculados a partir de muestras de espeleotemas.

De cualquier manera, se desconoce cuántos años habrían de transcurrir desde que los procesos de disolución culminarían hasta convertir el cuarzo a ópalo-A en el presente tiempo. El tiempo requerido para los cambios de porosidad, hidratación y friabilidad del ópalo-A sobre todo dependiendo de las condiciones ambientales del pasado también es imprecisable). En todo caso, la presencia de cuarzo detrítal en los espeleotemas sugiere que el proceso de disolución del cuarzo aún no ha finalizado totalmente.



Fig.8: Aspectos concernientes a la evolución de los espeleotemas de ópalo-A (biomineralización): A, formación de una matriz polisimbótica bacteriana; B, fase inicial de la formación de estromatolitos de ópalo-A columnar; C, fase de crecimiento con incremento de ópalo-A poroso blanco en la estructura del espeleotema, y D, estadio de los espeleotemas cónicos de ópalo-A de mayor desarrollo. Fotos: Vicente Marcano.

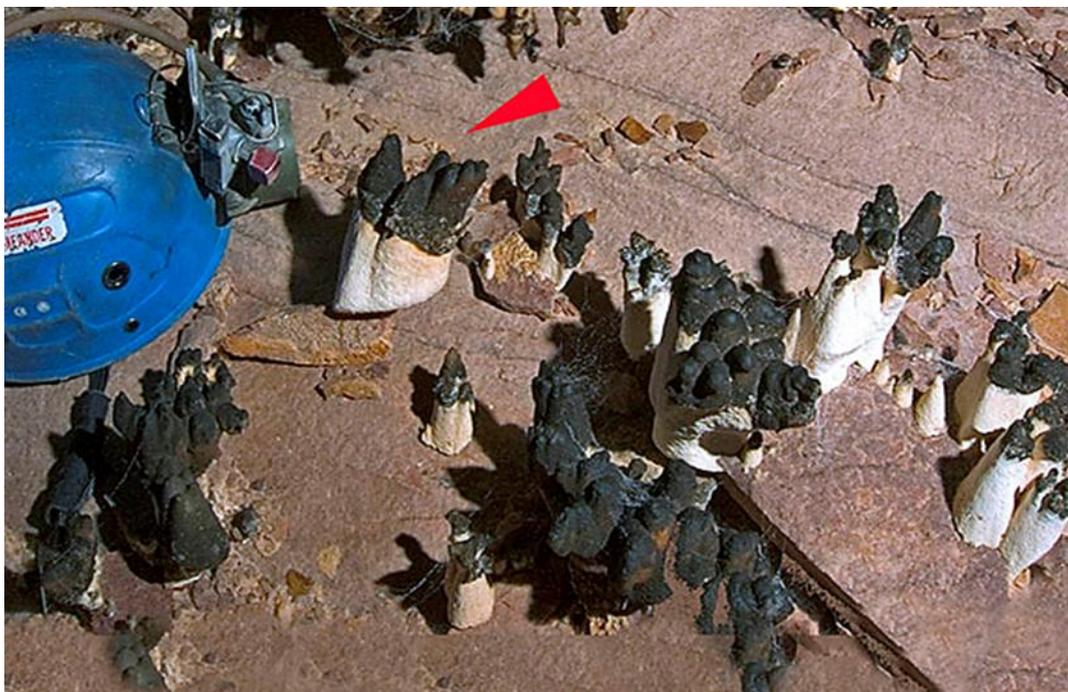


Fig.9: Una fase en los espeleotemas considerada de mayor desarrollo y crecimiento corresponde a esas estructuras divididas, mayor a 20 cm de alto y designadas por el Dr. Brewer-Carias como “biospeleotemas de Dos helados”. Foto: C. Brewer-Carias.

Conclusiones

Los resultados obtenidos evidencian el origen biogénico de los espeleotemas de ópalo amorfo formados como consecuencia de la participación de una compleja asociación bacteriana. Microorganismos participando en la bioorganización polisimbótica son capaces de producir metabólicamente los requerimientos necesarios a fin de mantener la demanda energética de la organización simbiótica entera. Es muy importante destacar que los altos valores de CO₂ registrados en la cueva, como también la materia orgánica producida a partir de la descomposición de las colonias microbianas halladas en otros sectores, representan la fuente primaria de carbono para todo el ecosistema microbiano de la cueva Charles Brewer, incluyendo para esos microorganismos que viven en los espeleotemas de ópalo-A.

En los espeleotemas de ópalo-A son predominantes microorganismos acidófilos oxidadores de hierro, que corresponden a *Acidithiobacillus ferroxidans*, los cuales son mayores por campo en las secciones de ópalo blanco y menores en la sección de ópalo negro, el cual presenta una mayor dureza. El origen microbiológico del ópalo y por consecuencia de los espeleotemas en estudio se relaciona con las condiciones de pH ácido y potencial redox con valores siempre positivos, los cuales difícilmente permitirían procesos de mineralización sin la intervención del metabolismo bacteriano. En este caso, quimiolitautótrofos disponen del hierro como un importante donador de energía para la conversión de la cuarcita por hidratación (síntesis de ópalo, e.g. SiO₂.nH₂O) y producción de goethita (hidróxido férrico) como subproducto metabólico. Por consiguiente, el término “bioespeleotema”, es conveniente para designar a estas estructuras, lo cual nos conduce a reconocer una nueva forma de vida polisimbótica en nuestro planeta con grandes implicaciones exobiológicas.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud a todos los miembros de las Expediciones al Macizo de Chimantá; al equipo de la Universidad de Los Andes por su asistencia técnica en el análisis químico y físico de las muestras; a las autoridades y personal del Laboratorio de Extremofilia del Centro de Biología Molecular (CBM) de la UAM y del Centro de Astrobiología (CAB) del INTA-CSIC-NASA; a todos los miembros del equipo de espeleología participante de la República Checa y Eslovaca; al Dr. Christopher McKay de NASA-Ames Research Center y Dr. Rafael Navarro-González† del Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, por su apoyo y colaboración en la utilización de equipos y sensores.

Bibliografía

- ADDADI, L. y WEINER, S. (2014), Biomineralization: mineral formation by organisms. *Physica Scripta*, n°. 89 (9), pp. 1–124.
- AMANN, R. I., KRUMHOLZ, M. L. y STAHL, D. A. (1990), Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, n°. 172, pp. 762–770.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. y SCHLEIFER (1995), Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, n°. 59, 143–169.
- AOAC, (1984), Official Methods of Analysis, 43.014-43.023.
- AMORES, D. A. y WARREN, L. A. (2007), Identifying when microbes biosilicify: the interconnected requirements of acidic pH, colloidal SiO₂ and exposed microbial surface. *Chemical Geology*, n°. 240, pp. 298–312.
- AUBRECHT, R., BREWER-CARÍAS, CH., ŠMÍDA, B., AUDY, M. y KOVÁČIK, E. (2008), Anatomy of biologically mediated opal speleothems in the world's largest sandstone cave Cueva Charles Brewer, Chimanta Plateau, Venezuela. *Sediment. Geol.*, n°. 203, pp. 181–195.
- AUBRECHT, R., BARRÍO -AMORÓS, C. L., BREWER-CARÍAS, CH., DERKA, T. FUENTES-RAMOS, O.A., GREGOR, M., KODADA, J., KOVÁČIK, E., LÁNCZOS, T., LEE, N.M., LIŠČÁK, P., SCHLÖGL J., ŠMÍDA B. y VLČEK, L. (2012), *Venezuelan tepuis: their caves and biota*. Bratislava Acta Geologica Slovaca, Comenius University.
- BARTON, H. A., SPEAR, J. R. y PACE, N. R. (2002), Microbial life in the underworld: evidence for biogenicity in secondary mineral formations. *J. Geomicrobiology*, n°18, pp. 1–9.
- BELL, M. S., THOMAS-KEPRTA, K. L., WENTWORTH, S. J. y MCKAY, D.S. (1999), Microanalysis of pyroxene, feldspar, and silica glass in ALH84001. Abstract n°. 5016, *6nd Annual Meteoritical Society Meeting*.
- BENNING L., G., PHOENIX, V. R., YEE, N. y KONHAUSER, K. O. (2004), The dynamics of cyanobacterial silicification: An infrared micro-spectroscopic investigation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, n°68, pp. 743–757.
- BIRNBAUM S. J., WIREMAN J. W. y BOROWSKI, R. (1989), Silica precipitation by the anaerobic sulfate reducing bacterium *Desulfovibrío desulfuricans* effects upon cell morphology and implications for preservation, en *Origin, Evolution and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals*, CRICK, R. E. (Ed.), pp. 507-516, New York, Plenum Press.
- BLAYLOCK, B. A., y NASON, A. (1963), Electron transport systems of the chemoautotroph *Ferrobacillus ferroxidans*. *J. Biol. Chem.*, n°238, pp. 3453–3462.
- BODO, C., y LUNDGREN, D. G. (1974) Iron oxidation by cell envelopes of *Thiobacillus ferroxidans*. *Can. J. Microbiol.*, 20: 1647-1652.
- BOSTON, P. J., IVANOV, M. V. y MCKAY, C. P. (1992). On the possibility of chemosynthetic ecosystems in subsurface habitats on Mars. *Icarus*, n°95, pp. 300–308.
- BOSTON, P., J., NORTHUP, D. E., SPILDE, M. N. y HOSE, L. D. (1999), Terrestrial cave microbiota: models of Martian subsurface biology. *The Fifth International Conference on Mars*, Pasadena, California, Abstract n°. 6155.



- BOSTON, P. J., SPILDE, M. N., NORTHUP, D. E. y MELIM, L. A. (2001), Cave microbe-mineral suites: best model for extraterrestrial biosignatures. *LPS XXXII*, 2015.
- BREWER- CARÍAS, CH. (1976), Cuevas del Cerro Autana. *Revista Natura*, n°58, pp. 33-48.
- BREWER-CARIAS C. y AUDY, M. (2010), *Entrañas del Mundo Perdido*, Impreso por Carlos Capriles de ALTOLITHO C.A., Caracas.
- BRICEÑO, H. y PAOLINI, J. (1992), Aspectos geoquímicos del Macizo del Chimantá, en *El Macizo del Chimantá*, Huber, O. (Ed.), pp. 75-88. Oscar Todtmann Editores, Caracas.
- BRICEÑO, H. y SCHUBERT, C. (1992), Geomorfología, en *El Macizo del Chimantá*, Huber, O. (Ed.), pp. 61-74. Oscar Todtmann Editores, Caracas.
- COLVÉE, P., (1972), Consideraciones Geológicas sobre el Cerro Autana. *Informe D.I.A. I-1 de la División de Investigación aplicada*, MOP-CODESUR. 1972, pp.1-12.
- COLVÉE P. (1973), Cueva en Cuarcitas en el Cerro Autana. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n°4 (1), pp. 5-13.
- DANA-HURLBUT, C. S. (1960), *Manual of Mineralogy*. John Wiley and Sons, New York.
- DEYDISH, S. N. (2004), *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, n°54, pp. 151-156.
- EHRLICH, H. L. (1986), *Geomicrobiology*. Marcel Dekker, New York.
- ESPEJO, R. T., ESCOBAR, B. JEDLICKI, E. URIBE, P. y BALDILLA-OHLBAUM, R. (1988), Oxidation of ferrous iron and elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, n°54, pp. 1694-1699.
- FARHAN UI HAQUE, M., CROMBIE, A. T. y MURREL, J. C. (2019), Novel facultative *Methylocella* strains are active methane consumers at terrestrial natural gas steeps. *Microbiome*, n°7, p. 134, <https://doi.org/10.1186/s40168019-0741-3>
- FEIN, J. B., SCOTT, S. y RIVERA, N. (2002), The effect of Fe and Si adsorption by *Bacillus subtilis* cell walls: insights into non-metabolic bacterial precipitation of silicate minerals. *Chemical Geology*, n°182, pp. 265-273.
- FORTI, P. (2001), Biogenic speleothems: an overview. *Int. J. Speleol.*, 30 A (1/4), pp. 39-56.
- GONZÁLES-TORIL, E., LLOBET-BROSSA, E. CASAMAYOR, E.O., AMANN R. y AMILS, R. (2003) Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.*, n°69, pp. 4853-4865.
- GONZÁLES-TORIL, E., MARTÍNEZ-FRÍAS, J. GÓMEZ-GÓMEZ, M. A., RULL, F. y AMILS, R. (2005), Iron meteorites can support the growth of acidophilic chemolithoautotrophic microorganisms. *Astrobiology*, n°5, pp. 406-414.
- GORBUSHINA, A., KRUMBEIN, E. y VENDRELL-SAZ, M. (1997), Biogenic forsterite in silicified subaerial lichens. Geological Society of America, Abstracts of 1997 Annual Meeting, n°. 29.
- GORBUSHINA, A., BOETTCHER, M., KRUMBEIN, H-J. B. y VENDRELL-SAZ, M. (2001), Biogenic forsterite and opal as a product of biodeterioration and lichen stromatolite formation in table mountain systems (Tepuis) of Venezuela. *Geomicrobiology Journal*, n°18, pp. 117-132.
- HIRT, W. E. y VESTAL, J. R. (1974), Physical and chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology*, n°123, pp. 642-650.

- ILLER, R. K. (1979), *The chemistry of silica*. John Wiley & Sons, New York.
- JIBAJA, S., OYOLA, V., BERASTAIN, A., RAMOS, D., RONCAL, E., MEDINA, J. C., UNTIVEROS, G., SHEER, P. y HURTADO, J. (2019), Producción de electricidad empleando *Acidithiobacillus ferroxidans* a partir de iones tiosulfato y férrico. *Revista de la Sociedad de Química de Perú*, n°85(1), pp. 3-13.
- KLING, A., MOISSEL-EICHINGER, C., WANNER, G., ZWECK, J., HUBER, H., THOMM, M. y RACHEL, R. (2011), Analysis of the surface proteins of *Acidithiobacillus ferroxidans* strain SP5/1 and the new, pyrite-oxidizing *Acidithiobacillus* isolate HV2/2, and their possible involvement in pyrite oxidation. *Arch. Microbiol.*, n°193(12), pp. 867-882.
- KONHAUSER, K. O. y JONES, B. (2011), Microbial silicification – Bacteria (or passive), en *Encyclopedia of Geobiology*, RECHTER, J. y THIEL, V. (Eds.). *Encyclopedia of Earth Sciences Series: 256-278*. Springer, Dordrecht.
- KOWALEWSKI, M. y KIMSTIDT, J. D. (2003), Average lifetime and age spectra of detrital grains: Toward a unifying theory of sedimentary particles. *Journal of Geology*, n°111, pp. 427-439.
- KUNICKA-GOLDFINGER, W. (1982), Preliminary observations on the microbiology of karst caves of the Sarisariñama plateau in Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n°19, pp. 133-136.
- LODDERS, K., 1998. A survey of shergottite, nakhlite and chassigny meteorites whole-rock compositions. *Meteoritics and Planetary Science*, n° 33, pp. A183-A190.
- LOVLEY, D. R. (2008), The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Curr. Opin. Biotechnol.*, n°19, pp. 564-571.
- LOWENSTAM, H. y WEINER, S. (1989), *On Biomineralization*. Oxford University Press, Oxford.
- LUNDBERG, J., BREWER-CARÍAS, CH. y MCFARLANE, D.A. (2010), Preliminary results from U–Th dating of glacial–interglacial deposition cycles in a silica speleothem from Venezuela. *Quaternary Research*, n°74, pp. 113-120.
- MANCINELLI, R. L. y KLOVSTAD, M., (2000), Martian soil and UV radiation: Microbial viability assessment on spacecraft surfaces. *Planetary and Space Science*, n° 48, pp. 1093-1097.
- MARCANO, V. (2022), *Evolución y destino de la vida en el Escudo de Guayana: Una historia natural basada en las contribuciones de exploradores y naturalistas desde el siglo XVII hasta la época actual*. Editorial Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. https://libros.csic.es/product_info.php?products_id=1647
- MARCANO, V., DÍAZ, E., GONZALES-TORIL, E., CEDEÑO, C., AMILS, R. y BREWER-CARIAS, C. (2020), Microbiology of opal formations in quartzite caves from the venezuelan Guayana. *Revista de la Sociedad Española de Espeleología y Ciencias del Karst*, n°15, pp. 89-110.
- MACKINTOSH, M. E. (1978), Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferroxidans*. *J. Gen. Microbiol.*, n°105, pp. 215-218.
- MICHALSKI, J. R., KRAFT, M. D., DIEDRICH, T., SHARP, T. G. y CHRISTENSEN, P. R., (2003), Thermal Emission Spectroscopy of the silica polymorphs and considerations for remote sensing of Mars. *Geophysical Research Letters*, n° 30, 19-PLA 2-1-4.

- NORTHUP, D. E. y LAVOIE, K. H. (2001), Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*, n°18, pp. 199-222.
- NORTHUP, D. E., REYSENBACH, A-L. y PACE, N. R., (1997), Microorganisms and speleothems, en *Cave Minerals of the World*, HILL, C. A. y FORTI, P. (Eds.), pp. 261-266. National Speleological Society, Huntsville.
- NORTHUP, D. E., DAHM, C. N., MELIM, L. A., SPILDE, M. N., CROSSEY, L. J., LAVOIE, K. H., MALLORY, L. M., BOSTON, P. J., CUNNINGHAM, K. I. & BARNS, S. M. (2000), Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *J. Cave Karst Stud.*, n°62, pp. 80-90.
- POWDER DIFFRACTION FILE (1999) *International Center for Diffraction Data (ICCD)*, 12 Campus, Boulevard, Newtown Square, PA, USA.
- REMSEN, C. C. y LUNDGREN, D. G. (1966), Electron microscopy of the cell envelope of *Ferrobacillus ferroxidans* prepared by freeze-etching and chemical fixation techniques. *Journal of Bacteriology*, n°92, pp. 1765-1771.
- RUBIN, A. E., WARREN, P. H., GREENWOOD, J. P., VERISH, R. S., LESHIN, L. A., HERVIG, R. L., CLAYTON, R. N. y MAYEDA, T. K. (2000), Los Angeles: The most differentiated basaltic Martian meteorite. *Geology*, n°28, pp. 1011-1014.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, F. J. y MANIATIS, T. (1989), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAURO, F., DE VIVO, A., PICCINI, L. y VERGARA, F. (2014), Nelle case degli dei, le grotte dell'Auyan Tepui. *Speleologia*, n° 71, pp. 40-48.
- SAURO, F., CAPPELLETTI, M., GHEZZI, D., COLUMBU, A., PEI-YING, H., ZOWAWI, H. M., CARBONE, C., PICCINI, L., VERGARA, F., ZANNONI, D. y DE WAELE, J. (2018), Microbial diversity and biosignatures of amorphous silica deposits in orthoquartzite caves. *Scientific Reports*, n°8, pp. 17569.
- ŠMÍDA, B., AUDY, M., MAYORAL, F. y CARNICERO, L.A. (2004), Chimantá 2004 Expedition, or discovering of the Cueva Charles Brewer – the largest quartzite cave in the world. *Spravodaj Slovenskej speleologickej spoločnosti*, n°35(2), pp. 3-14.
- ŠMÍDA, B., AUDY, M. y MAYORAL, F. (2005a), La Cueva Charles Brewer, La Plus Importante Grotte du Monde Creusée dans les Quarzites. *Spelunca*, n°97, pp. 27-35.
- ŠMÍDA, B., AUDY, M. y MAYORAL, F. (2005b), Cueva Charles Brewer: Largest quartzite cave in the world. *NSS News*, pp. 13-31.
- ŠMÍDA, B., BREWER-CARÍAS, CH. y AUDY, M. (Eds.) (2005c), Cueva Charles Brewer – the greatest quartzite cave in the world. *Spravodaj Slovenskej speleologickej spoločnosti*, supplement, n°36 (3), pp.178.
- STUMM, W. (1992), *The Chemistry of the Solid-Water Interface*. John Wiley and Sons, New York.
- SVE, 1976a. Catastro Espeleológico de Venezuela, AM-11, Cueva del Cerro Autana. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n° 7(13), pp. 81-85.
- SVE, 1976b. Ascenso al Cerro Autana, Territorio Amazonas. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n° 7(13), pp. 114-116.



- TEMPLE, K. L. y COLMER, A. R. (1951) The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, n°62, pp. 605-611.
- TOPORSKI, J. K., STEELE, A., WESTALL, F., THOMAS-KEPRTA, K. L. y MCKAY, D. (2002), The simulated silicification of bacteria - New clues to the modes and timing of bacterial preservation and implications for the search for extraterrestrial microfossils. *Astrobiology*, n°2, pp. 1-26.
- URBANI, F. (1976a), Comentarios generales y estado actual de los estudios de las formas cársicas de las cuarcitas del Grupo Roraima. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n°7, pp. 289-293.
- URBANI, F., (1976b), Opalo, calcedonia y calcita en la cueva del Cerro Autana (Am.11), Territorio Federal Amazonas, Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n° 7(14), pp. 129-145.
- URBANI, F. (1996), Venezuelan cave minerals, a review. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n°30, pp. 1-13.
- URBANI, F. y SZCZERBAN, E. (1974), Venezuelan caves in non-carbonate rocks: a new field in karst research. *National Speleological Society News*, n° 12 (32), pp. 233-235.
- VLASCENAU, L., SARBU, S. M., ENGEL, A. S. y KINKLE, B. K. (2000), Acidic cave-wall biofilms located in the Frasassi Gorge, Italy. *Geomicrobiol. J.*, n°17, pp. 125-139.
- WILLIAMS, L. A., PARKS, G. A. y CRERAR, D. A. (1985), Silica diagenesis, I. Solubility controls. *Journal of Sedimentary Petrography*, n°55, pp. 301-311.
- WRAY, R. A. L. y SAURO, F. (2017), An updated global review of solutional weathering processes and forms in quartz sandstones and quartzites. *Earth-Science Reviews*, n°171, pp. 520-557.
- ZAWIDZKI P., URBANI F. y KOISAR B., (1976), Preliminary notes on the geology of the Sarisariñama Plateau, Venezuela, and the origin of its caves. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología*, n° 7, pp. 29-37.

Este trabajo se citará como: MARCANO, V., AMILS, R. y BREWER-CARIAS, C., (2023): "El origen biológico de los espeleotemas de ópalo del Sistema Brewer, Guayana Venezolana", *Mundo Subterráneo*, n° 9, pp. 52-74, Club Espeleo-Deportivo Nivel 10 (ed.)