

Riotinto: un universo de mundos microbianos

A. I. López-Archilla

Departamento de Ecología. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Cantoblanco, Madrid. España

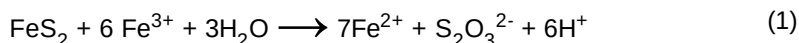
El río Tinto es un ambiente extremo caracterizado por un pH muy bajo y altas concentraciones de metales en disolución. Las extremas condiciones del río son en gran medida producidas y mantenidas por el componente biológico del ecosistema, principalmente por organismos procarióticos quimiolitótrofos. Las algas eucarióticas son los otros productores primarios del sistema mientras que hongos y bacterias heterotróficas juegan el papel de consumidores y descomponedores. Otros consumidores son protistas heterotróficos y, en ocasiones, rotíferos. El río en sí tiene una amplia variedad de ambientes en donde se desarrollan distintas comunidades (bentónicas en zonas aerobias, neustónicas en la superficie de aguas semiquietas, planctónicas en la columna de agua óxica y anóxica), además, las zonas adyacentes al río como los montones de mineral, las galerías mineras o el acuífero son ambientes distintos y aún inexplorados. A pesar de las condiciones extremas de este ecosistema, el río Tinto posee una gran diversidad de comunidades microbianas, cuyas interacciones son de gran interés para la ecología microbiana.

The Tinto River is an extreme environment characterized by a very low pH and high concentration of heavy metals in solution. The extreme features of the river are produced and sustained by the biological components of the ecosystem, mainly by chemolithoautotrophic prokaryotic organisms. Eukaryotic algae are another primary producers in the system, while fungi and heterotrophic bacteria play the role of consumers and decomposers. Other consumers are heterotrophic protists and sometime rotifers. The river has a wide variety of environments where different communities develop (benthonic in aerobic zones and neustonic in the surface of calm waters, planktonic in the anoxic and oxic water column). In addition, adjacent zones of the river, like the piles of mineral, the mining galleries or the aquifer, are interesting and unexplored. In spite of the extreme conditions of this ecosystem, the Tinto River has a great diversity of microbial communities, whose interaction are of great interest for microbial ecology.

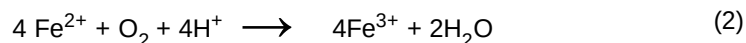
Introducción

Al norte de la provincia del Huelva se encuentra una banda pirítica de origen hidrotermal submarino que ha dado lugar a una intensa actividad minera llevada a cabo desde tiempos remotos. En esta región, explotaciones como la de Tharsis o las de Riotinto parecen estar asociadas a actividades mineras que datan de la época de los tartesos y de los romanos. Las minas de Riotinto han sido por su volumen de explotación y su reciente historia, sin duda, las más famosas.

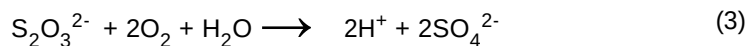
La singularidad de la zona reside en sus características geológicas y en la riqueza de sus minerales. Las vetas de pirita, calcopirita, gossan y otros minerales complejos de azufre ofrecen a ciertos organismos los recursos necesarios para desarrollarse, formando un hábitat muy especial. Estos minerales son estables cuando no se encuentran en contacto con el oxígeno o con el agua: Sin embargo, cuando son expuestos a estos factores, los sulfuros metálicos se oxidan espontáneamente (ver reacción 1 para el caso de la pirita), aunque este proceso se ve extraordinariamente acelerado por microorganismos quimiolitótrofos y acidófilos como *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Jonson y Hallberg, 2003):



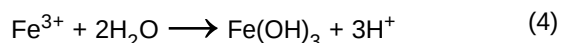
Estos microorganismos aceleran la oxidación de los minerales regenerando el ión férrico a pH inferiores a 4 (reacción 2):



Algunas bacterias (por ejemplo *Acidithiobacillus ferrooxidans* o *Thiomonas cuprina*) y arqueas (como *Metallosphaera* spp. o *Sulfolobus* spp.) pueden también oxidar el tiosulfato producido en la reacción 1, otros compuestos inorgánicos reducidos de azufre y/o azufre elemental, generando a su vez ácido sulfúrico (reacción 3):



La acidez del medio se ve incrementada también por hidrólisis del ión férrico (reacción 4):



La tendencia del medio por lo tanto es hacia la acidificación ya que la disolución de minerales básicos (por ejemplo carbonatos) no suele ser suficiente como para neutralizar la enorme producción de protones. Junto con el ión férrico, y debido a la presencia de otros metales en los minerales de las zonas piríticas (por ejemplo Riotinto), el agua que entra en contacto con las vetas y sale más tarde a la superficie va cargada de otros metales pesados como cobre, zinc y manganeso, debido a la gran solubilidad de estos elementos en agua ácida. Sin embargo, es el ión férrico el que normalmente domina en este tipo de aguas y debido a que permanece en disolución a pHs bajos, les proporciona su llamativo color rojo.

El área que engloba Riotinto es amplia y brinda la oportunidad de estudiar diferentes ambientes, desde las entrañas de la tierra a las aguas que discurren por su superficie formando un río que por poseer las características anteriormente enunciadas, especialmente el color del agua, recibe el nombre de Tinto (**Fig.1**). La característica fundamental y común de todos estos ambientes es estar habitados básicamente por microorganismos, ya sean procariotas o eucariotas.



Figura 1. Vista del río Tinto mostrando el llamativo color rojo de sus aguas.

El río Tinto

Se trata de un sistema muy heterogéneo en donde se han generado ambientes muy distintos y donde se observa la proliferación de organismos y actividades muy diversas. Es, en definitiva, un conjunto de ecosistemas diferentes pero interdependientes y conectados entre sí.

Por lo general se trata de un río de poco caudal salvo en episodios no demasiado frecuentes de lluvias torrenciales. En gran parte de su recorrido el cauce es ancho y el agua que fluye forma una lámina somera que permite la penetración de la luz hasta el fondo, facilitando la proliferación de productores primarios fotosintéticos y otros organismos asociados, formando *biofilms*. En otros lugares del río, sin embargo, se forman pozas o el camino del agua se ve retenido durante algún tiempo debido a la existencia de pequeñas presas a lo largo de su cauce. Es en estos sitios, donde la luz no llega a penetrar hasta el fondo y los materiales son sedimentados y acumulados, donde el oxígeno escasea o es inexistente. La superficie de estos lugares de aguas semiquietas constituye un hábitat distinto a los anteriores que los organismos también saben aprovechar.

Agua que fluye

El río Tinto nace en Peña del Hierro, al norte de la localidad onubense de Nerva y en plena zona minera. Ya las fuentes y manantiales que lo originan tienen las propiedades de extrema acidez y altísimas concentraciones de metales que le caracterizan durante todo su recorrido hasta llegar, 92 Km después, a su desembocadura en el océano Atlántico (**Fig. 2** y **Tabla 1**). No sólo la geología, sino también la climatología de la región favorecen el mantenimiento de este ambiente tan especial. Los sulfuros polimetálicos del cinturón pirítico ofrecen los sustratos necesarios para la proliferación de las bacterias quimiolitótrofas oxidadoras de compuestos de S y de metales reducidos, y el aporte continuo de agua desde el acuífero, en la cabecera del río, mantiene a éste siempre con agua, incluso durante el verano, en ausencia prácticamente total de lluvia y con una alta tasa de evaporación. Las épocas lluviosas (primavera y otoño) aumentan el caudal del río pero no se observa una dilución excesiva de sus características más llamativas (disminución en las concentraciones de metales, sulfato o aumento en los valores de pH) (López-Archilla *et al.*, 2001).



Figura 2. Localización de los distintos puntos de muestreo cuyas características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios de las concentraciones de metales, pH y sulfato medidos en el río Tinto a lo largo de su recorrido (ver Fig. 2 para la localización de los distintos lugares de muestreo ?L.M.-). Datos tomados de López-Archilla et al., 1999 y López-Archilla y Amils, 2001.

L.M.	pH*	Fe* mg l ⁻¹	Cu* mg l ⁻¹	Zn* mg l ⁻¹	Ar** mg l ⁻¹	Mn** mg l ⁻¹	Mg** mg l ⁻¹	SO ₄ ²⁻ * mg l ⁻¹
1	2.43	2300	34.3	145.7	0.42	197.1	308	13800
2	2.66	2000	67.1	182.9	0.00	134.6	240	12120
3	2.03	3660	53.6	135.7	6.62	132.6	275	14800
4	2.28	1000	37.9	135.8	0.22	66.3	400	nd.
5	2.14	3410	34.1	288.6	18.22	76.2	645	5410
6	2.45	2820	189.0	192.0	32.1	60.5	270	29220
7	2.23	2980	115	361.4	12.22	44.9	380	14200
8	2.39	2200	127.9	226.1	8.54	33.3	248	15240
9	2.18	1460	86.0	170.0	nd.	nd.	nd.	2170
10	2.42	1430	24.2	60.8	nd.	nd.	nd.	8900
11	2.49	620	27.1	70.0	1.77	21.5	320	nd.
m1	2.13	5540	183.9	1013	13.69	77.6	650	16900
m3	1.16	47600	1700	1170	nd.	nd.	nd.	30350

*Media de 7 muestreos estacionales; **Media de 4 muestreos estacionales. nd.: Datos no determinados.

Los primeros estudios sobre las poblaciones de bacterias quimiolitótrofas llevados a cabo mediante técnicas clásicas de conteo y aislamientos, demostraron la presencia a lo largo de todo el río de cantidades elevadas de bacterias oxidadoras del hierro (Iron-oxidizing bacteria ?IOB-) y del azufre (Sulfur oxidizing bacteria -SOB-) del orden de 10⁶ células por mililitro (López-Archilla et al., 1993). Los principales aislados bacterianos capaces de oxidar Fe²⁺ a Fe³⁺ fueron *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (Fig. 3), mientras que los oxidadores de compuestos reducidos de S como S⁰ o tiosulfato, pero no de Fe²⁺, pertenecieron a *Acidithiobacillus thiooxidans*.

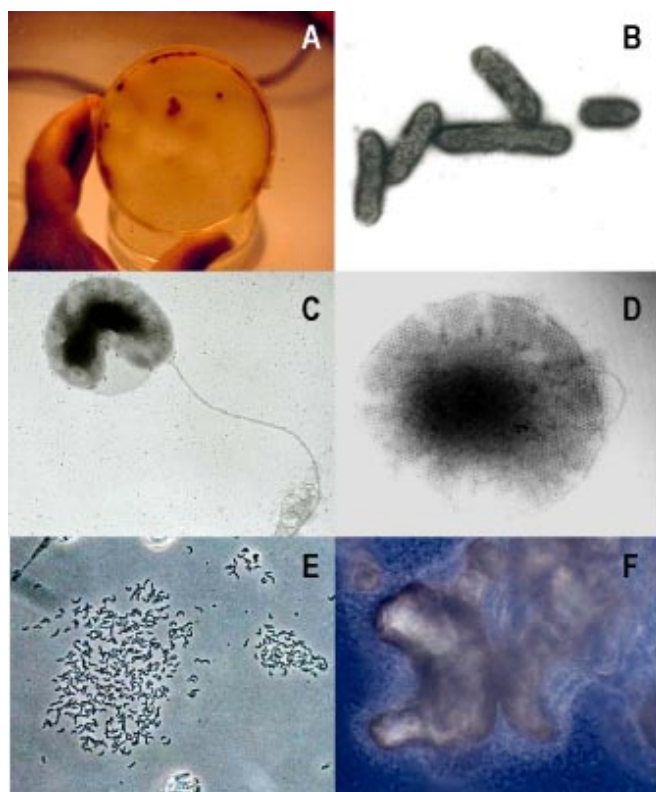


Figura 3.

Organismos quimiolitótrofos aislados del agua del río Tinto o de zonas adyacentes. (A) Crecimiento sobre medio sólido de bacterias oxidadoras del Fe; (B) Fotografía al microscopio electrónico de transmisión (MET) de *Acidithiobacillus thiooxidans*; (C) Fotografía al MET de una bacteria oxidadora de Fe, posiblemente *Leptospirillum* sp.; (D) Fotografía al MET de un aislado quimiolitótrofo y termófilo, posiblemente una arquea *Sulfolobus*; (E) *Leptospirillum ferrooxidans* al microscopio óptico con contraste de fases; (F) Bacterias quimiolitótrofas alrededor de un grano de azufre elemental.

Las diferencias encontradas entre el número de IOB y SOB en algunos lugares del río demostraron que, localmente, la presencia de *Leptospirillum ferrooxidans* (capaz de oxidar compuestos de Fe reducidos pero no de S) podía ser muy importante (López-Archilla *et al.*, 2001). Estudios posteriores con técnicas moleculares confirmaron la presencia masiva de este tipo de oxidadores del Fe en el río y demostraron la existencia de otros géneros bacterianos como *Ferrimicrobium acidiphilium* o de la arquea *Ferroplasma acidiphilium*, aunque en mucha menor cantidad (Gonzalez-Toril *et al.*, 2003). Sin embargo, y contrariamente a lo observado en los primeros trabajos, dichos estudios no detectaron la presencia masiva de *A. thiooxidans* en el río.

La producción de materia orgánica en el río Tinto se debe tanto a la actividad quimiolitotrófica como fotosintética. Los productores fotosintéticos se encuentran principalmente en aquellos lugares donde el cauce es somero y la luz penetra sin problemas hasta el fondo (**Fig. 4**). Estos organismos se encuentran en grandes cantidades durante prácticamente todo el año, tapizando el lecho del río junto con otros microorganismos; sólo en momentos de grandes lluvias, con las consecuentes avenidas, estos *biofilms* son arrastrados y desaparecen hasta que poco tiempo después los mismos lugares vuelven a ser colonizados por el mismo tipo de comunidad.

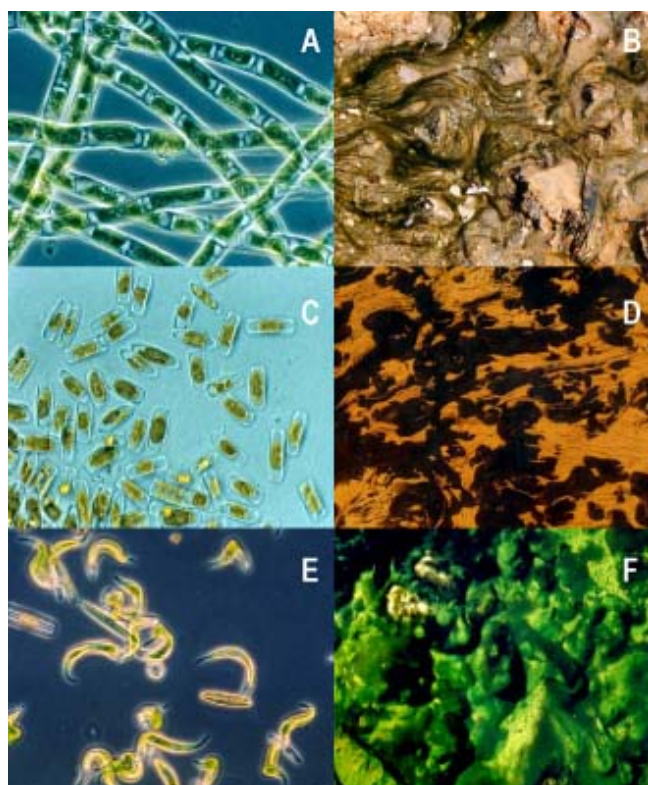


Figura 4. Fotografías al microscopio óptico de distintos tipos de algas observadas en el río Tinto. (A) Filamentos algales del género *Klebsormidium*; (B) Aspecto macroscópico de los filamentos en el río; (C) Diatomeas; (D) Aspecto macroscópico de acumulaciones de diatomeas (manchas marrones) sobre el lecho del río; (E) *Euglena mutabilis* junto con algunas diatomeas; (F) Aspecto macroscópico de las acumulaciones de *Euglena* en el lecho del río.

En términos de biomasa los productores fotosintéticos constituyen, sin lugar a dudas, los principales proveedores de materia orgánica para el sistema (López-Archilla *et al.*, 1993, 2001). Debido a su abundancia y gran volumen, las diatomeas (**Fig. 4B**), que mediante técnicas moleculares parecen encontrarse filogenéticamente próximas al género *Eolimna* (Amaral-Zettler, *et al.* 2002), juegan un papel fundamental en el mantenimiento del sistema (López-Archilla *et al.*, 2001). También las Euglenofitas son en este sentido importantes en el río, habiéndose identificado únicamente la especie *Euglena mutabilis* (**Fig. 4C**) tanto mediante técnicas clásicas (López-Archilla *et al.*, 2001) como moleculares (Amaral-Zettler, *et al.* 2002). Por el contrario, las Clorofitas parecen ser mucho más diversas que los anteriores grupos. En el río se han observado filamentos similares a los que forman las algas del género *Klebsormidium* y esporádicamente a los del género *Zygnema* (López-Archilla *et al.*, 2001), aunque las algas más ubicuas fueron Clorofitas unicelulares, principalmente de los géneros *Chlamydomonas* y *Chlorella* (López-Archilla *et al.*, 2001). En el río también se ha detectado la presencia de algas rojas unicelulares del género *Galdieria*.

El aislamiento de dos cepas distintas y su estudio mediante técnicas de campo pulsado (PFGE) parece indicar que pudieran pertenecer a dos especies distintas dentro de este género (Moreira *et al*, 1994).

La biomasa generada por los productores primarios tanto quimiolitautótrofa como fotosintéticamente es descompuesta por una gran cantidad de bacterias heterótrofas. Algunas de ellas pertenecieron al género *Acidiphilium* (López-Archilla *et al.*, 2001), un tipo de bacterias asociadas frecuentemente con bacterias quimiolitautótrofas, especialmente a las IOB (Johnson y Kelso, 1983) y que han sido identificadas como *A. cryptum*, *A. organovorum* y *A. multivorum* (González-Toril *et al.*, 2003). Otro grupo de bacterias heterótrofas numéricamente importante en las aguas del Tinto pertenecieron al género *Bacillus* (**Fig. 5**), las cepas aisladas fueron identificadas como *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. cereus* y *B. subtilis* (López-Archilla *et al.*, 2001). Estas bacterias crecen óptimamente a pHs próximos a la neutralidad y su presencia en este ambiente puede deberse a su capacidad para excretar copiosas cantidades de sustancias poliméricas (EPS) durante su crecimiento en biofilms (Beech y Gaylarde, 1999) actuando de forma similar a lo que ocurre en los macrofilamentos neustónicos hallados en algunas partes del río (ver más adelante).

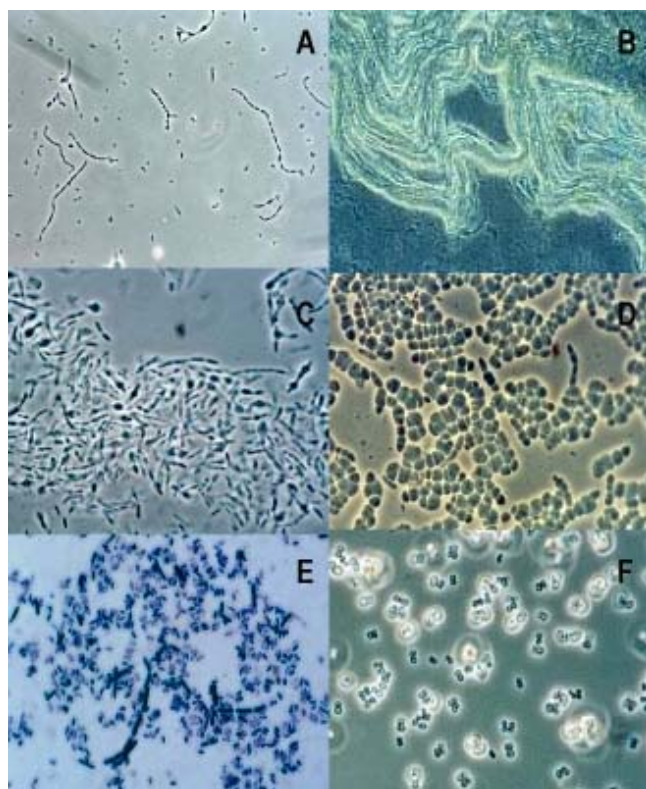


Figura 5. Fotografías al microscopio óptico de distintos tipos de bacterias heterótrofas aisladas del río Tinto. Se observan morfologías muy distintas, desde irregulares (A, C y D) a filamentosas (B), bacilares (E) o cocales (F).

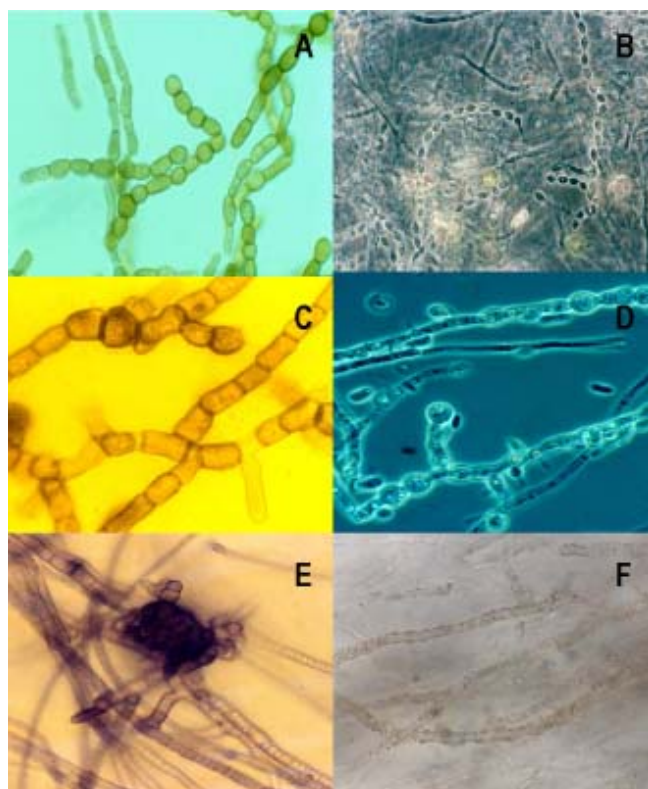


Figura 6. Microfotografías de diferentes hongos aislados del río Tinto. (A) *Scytalidium thermophilum*; (B) Posible *Acremonium* sp.; (C) *Scytalidium acidophilum*; (D) *Lecythophora hoffmannii*; (E) Cepa de clasificación incierta caracterizada por la pigmentación oscura de las hifas y la formación de incipientes esclerocios; (F) Imagen de la alta densidad de hifas de hongos encontradas en distintas partes del río.

En los ambientes terrestres, los hongos son descomponedores muy activos e importantes. Pese a ser un ambiente acuático, en el río Tinto parece suceder lo mismo, dado el elevado número de hongos (tanto filamentosos como levaduriformes) y su amplia diversidad (**Fig. 6**) (López-Archilla *et al.* 2004b). La mayoría de las levaduras encontradas en el río fueron basidiomicetes que incluyeron los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Tremella*, *Holtermannia*, *Leucosporidium* y *Mrakia* mientras que solo dos géneros fueron ascomicetes (*Candida* y *Williopsis*). Los hongos filamentosos (hifomicetos) son mucho más abundantes que las levaduras en el río y forman parte estructural de los *biofilms* que tapizan su lecho en muchas zonas. Contrariamente a lo esperado para un sistema acuático, en el Tinto no se observaron ni aislaron hongos ingoldianos (un grupo de hifomicetos acuáticos y degradadores de materia vegetal cuyas esporas presentan una morfología especial), típicos de esos ambientes. Por el contrario, la mayoría de las cepas aisladas y capaces de crecer en el agua del río mostraron micelios oscuros debido a la presencia de melanina en ellos (por lo que son denominados dematiáceos) y pertenecieron a distintas especies de los géneros *Scytalidium*, *Bahusakala*, *Phoma*, y *Heteroconium*. Otro grupo de especies importante pertenecieron al género *Penicillium* y, en menor cantidad, se desarrollaron cepas de los géneros de ascomicetes *Lecythophora* y *Acremonium*, y zigomicetes del género *Mortierella*.

Nuestros análisis estadísticos han mostrado la dependencia de estos grupos de hifomicetos con las diferentes características físico-químicas del ambiente. Así, los hongos dematiáceos se asocian estadísticamente con los lugares de características más extremas (pHs más bajos y mayores concentraciones de metales). La característica común de este grupo muy heterogéneo de hongos es, como ya se ha mencionado antes, la de poseer melanina en sus hifas. Este pigmento oscuro absorbe cationes metálicos de forma copiosa (Larsson y Tjälve, 1978; Fogarty, R.V. y Tobin, J.M. 1996; Fomina y Gadd, 2002) lo que puede representar una ventaja y explicar la presencia de este grupo de hifomicetos en los puntos más extremos. Por el contrario, cuando las condiciones ambientales se vuelven más moderadas, la competencia con otros hongos (principalmente especies de *Penicillium* que resisten concentraciones de metales menores) aumenta, lo que hace que decrezca la presencia de dematiáceos en los lugares con pHs más elevados y menores concentraciones de metales del río. Por otro lado, junto con los dematiáceos se encuentran agrupados los hongos de los géneros *Lecythophora* y *Acremonium* que también parecen preferir lugares de características extremas, si bien estos hifomicetos parecen requerir altas concentraciones de materia orgánica para su subsistencia (López-Archilla *et al.* 2004b).

Los consumidores primarios en el Tinto son también organismos microscópicos, principalmente protistas heterótrofos, habiéndose observado distintos tipos de flagelados, amebas, heliozoos y ciliados (**Fig. 7**) (López-Archilla *et al.*, 2001).

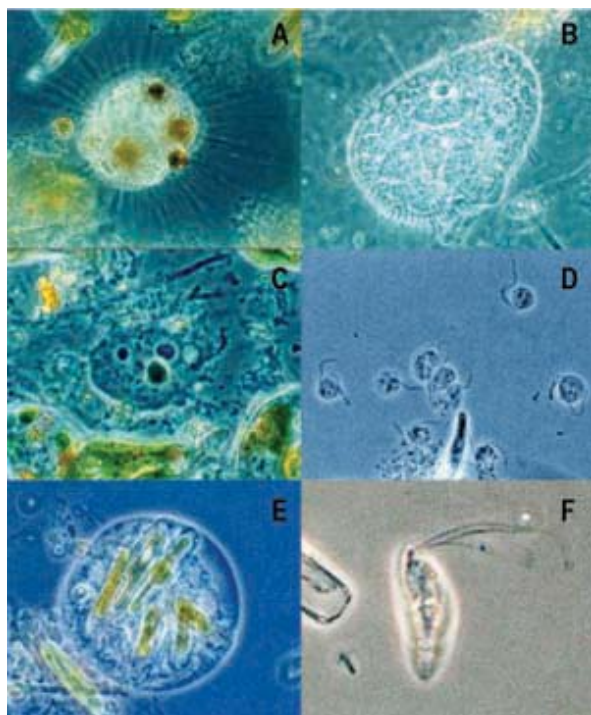


Figura 7. Microfotografías de algunos protistas observados en los biofilms del río Tinto. (A) Heliozoo; (B) Ciliado; (C) Ameba; (D) Biflagelados; (E) Protista no identificado que ha atrapado algunas diatomeas; (F) Flagelado.

Análisis moleculares posteriores confirmaron la presencia de estos grupos de protistas en el río y propusieron la existencia en este sistema de un nuevo linaje de Stramenopilos (Amaral-Zettler, *et al.* 2002). Eventualmente se han podido observar en algunos lugares del río rotíferos activos (**Fig. 8**); su presencia estaría indicando la existencia de consumidores secundarios en el sistema, lo que aumentaría un grado la complejidad de la cadena trófica, por el momento, exclusivamente microbiana y bastante sencilla.



Figura 8. Fotografías al microscopio óptico de un Rotífero observado en la zona alta del río (ver punto de muestreo 1 en la figura 2).

Las zonas anóxicas

El alto número de bacterias oxidadoras de sulfuros metálicos en la columna de agua a lo largo de todo el río explica en gran medida las peculiares características de este ambiente. Los materiales del cinturón pirítico existentes en la cabecera del río son rápidamente oxidados microbiológicamente. Dichos productos crean fuertes condiciones de oxidación para otros metales contenidos en los minerales (Ehrlich, 1990). El hierro y el azufre tienen un papel fundamental en este ecosistema dada la extraordinaria concentración de sus formas oxidadas encontrada en las aguas del Tinto (**Tabla 1**). Si embargo, este hecho genera la pregunta de cómo las bacterias quimilitotrofas (IOB y SOB), que se muestran en número constante en las distintas estaciones, pueden sustentar su metabolismo energético a lo largo de todo el río en ausencia de sustratos reducidos. Una explicación plausible nos la proporciona la existencia de ambientes anóxicos en el propio río (en las presas, por ejemplo, que dependiendo de la época del año quedan anaeróbicas a poca distancia de la superficie del agua ?datos no mostrados-). Bajo condiciones anóxicas o microaerófilas muchos compuestos oxidados son utilizados por los microorganismos como aceptores de electrones. El Fe^{3+} es un aceptor de electrones para el metabolismo energético de una amplia variedad de microorganismos tanto quimiorganotrofos como quimilolitótrofos. Puesto que este ión es extraordinariamente abundante en el sistema, su reducción puede ser una forma importante de respiración anaeróbica. Varios trabajos han considerado la posibilidad de que en el río Tinto los propios organismos oxidadores de Fe^{2+} en condiciones aeróbicas, puedan respirar Fe^{3+} en ausencia de oxígeno (López-Archilla *et al.*, 2001; Gonzalez-Toril *et al.*, 2003). Este sería el caso de *A. thiooxidans* o *A. ferrooxidans* cuya capacidad para reducir Fe^{3+} bajo condiciones anaeróbicas o microaerófilas ha sido ampliamente demostrada (Brock y Gustafson, 1976; Suzuki *et al.* 1990; Pronk *et al.* 1991, 1992). Otros organismos encontrados en el Tinto, como varias especies del género *Acidiphilium*, pueden también llevar a cabo una reducción desasimilativa del Fe^{3+} , algunas de ellas incluso en condiciones aeróbicas, usando compuestos orgánicos como donadores de electrones (Johnson y Bridge, 2002). Otro compuesto muy abundante en las aguas del Tinto es el sulfato. Diferentes formas reducidas de azufre pueden ser obtenidas a partir de esta molécula mediante procesos tanto asimilativos (aeróbica y anaeróbicamente) como desasimilativos (reducción de sulfato anaeróbica). La reducción de sulfato es una actividad ampliamente extendida en las zonas anóxicas de todo el planeta si existen suficientes compuestos orgánicos o hidrógeno como donadores de electrones. Sin embargo, esta actividad parece resultar inhibida a pHs ácidos. No obstante, en recientes investigaciones en los sedimentos de diversos lagos de aguas procedentes de minas de carbón, se ha observado que en las zonas profundas el pH incrementa hasta valores cercanos a 5 y el sulfato es reducido por bacterias como *Desulfosporosinus*, la cual crece a este pH y no es capaz de hacerlo a pH 7 (Küsel, 2003). Por otro lado, como se ha dicho, existen biofilms tapizando las superficies de las rocas y del lecho del río. En estas comunidades complejas pueden producirse micronichos anaerobios, como sucede en otros tipos de biofilms (Costerton *et al.*, 1995), en donde tanto la reducción del sulfato como del Fe^{3+} pueden llevarse a cabo por actividad microbiana, tanto asimilativa como desasimilativamente.

La superficie del agua

La parte más superficial del agua representa la interfase entre la hidrosfera y la atmósfera y se caracteriza por una elevada tensión superficial. En condiciones de calma, los microorganismos forman una película en la superficie conocida como neuston. En los hábitats acuáticos convencionales el neuston está formado por productores primarios fotosintéticos y organismos heterótrofos que incluyen hongos, bacterias y protozoos. Con frecuencia el número de microorganismos que componen el neuston es del orden de 10 a 100 veces mayor que el que se encuentra en la columna de agua (Atlas y Bartha, 2001). En el río Tinto se ha observado durante varios años la presencia de densas comunidades microbianas sobre la superficie de las aguas estancadas de una de sus presas. Estas comunidades neustónicas forman filamentos ramificados que pueden tener más de un metro de largo y que normalmente se encuentran anclados por un extremo a superficies sólidas como ramas caídas o el muro de la presa (**Fig. 9**).

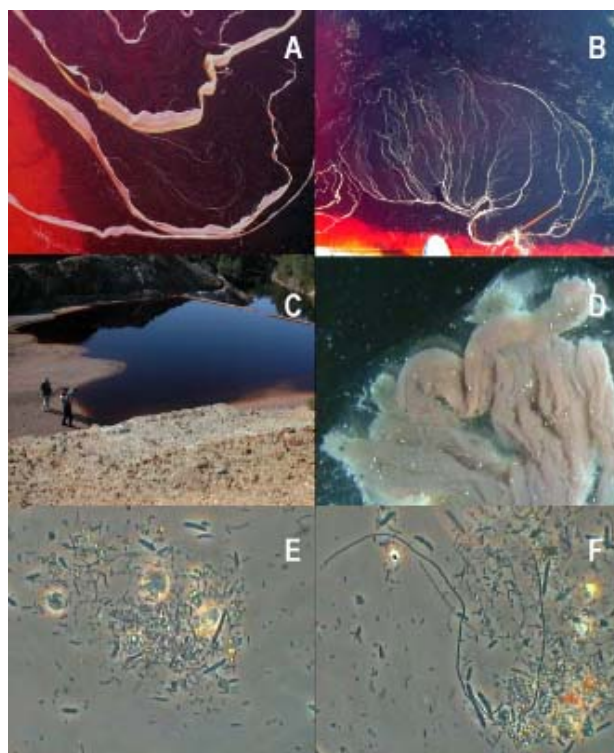


Figura 9. Comunidades neustónicas en el río Tinto. (A) Fotografía de los macrofilamentos; (B) Macrofilamentos unidos a la pared de la presa; (C) Presa en donde se encuentran los macrofilamentos; (D) Observación a la lupa, mediante la tinción de una muestra con tinta china, del mucílago que rodea a los filamentos; (E-F) Fotografías al microscopio óptico de los distintos tipos morfológicos bacterianos que forman las comunidades de macrofilamentos.

El lugar donde se encuentran estos filamentos muestra las características ambientales típicas del río, bajo pH (entre 1.7 y 2.2 según la época del año), alta conductividad (11.7 ± 3.8 mS) y altas concentraciones de metales (4.2 ± 2.2 g Fe l⁻¹) y sulfato (14.9 ± 7.7 g l⁻¹) (López-Archilla y Amils, 1999). Debido a estas características la hipótesis inicial fue la de que los microorganismos que componen estos filamentos serían organismos típicamente acidófilos similares a los encontrados en la columna de agua y en los biofilms del lecho del río. Las observaciones microscópicas de los macrofilamentos revelaron la existencia de algas eucarióticas, protozoos, hongos y granos de polen junto con enormes cantidades de organismos procarióticos que eran los que parecían dar consistencia a los filamentos mediante la generación de un denso mucílago (**Fig. 9**). Las librerías obtenidas mediante estudios moleculares de estos filamentos amplificando por PCR el gen que codifica el ARN ribosómico 16S y su posterior clonaje, mostraron una mayor proporción de clones pertenecientes a γ -proteobacteria y α -proteobacteria, y a unos pocos miembros de β -proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (López-Archilla et al. 2004a). Contrariamente a lo esperado, la secuenciación de cada clon y su posterior comparación con las bases de datos, no mostró relación de éstos con las especies típicamente acidófilas de las aguas de drenaje de minas, incluidas las encontradas en el agua del río Tinto. Dentro de las γ -proteobacteria los filotipos mas abundantes se relacionaron estrechamente con distintas especies de *Pseudomonas* que poseen pioverdina, un pigmento que secuestra activamente hierro férrico (Meyer, 2000) y que, obviamente, puede ser muy útil en un lugar como el Tinto, donde el Fe³⁺ es tan abundante. Por otro lado, varios clones, uno perteneciente al grupo de las γ -proteobacteria y otro a los Firmicutes, estaban relacionados con bacterias halófilas o halotolerantes y alcalófilas, lo que puede llevar a pensar que las adaptaciones de estos organismos a soportar altas concentraciones de sales podrían servir también para hacer frente a altas concentraciones de iones metálicos. La mayoría de los clones de α -proteobacterias pertenecieron al grupo de las Sphigomonadales, algunos a los Caulobacteriales, componentes habituales del neuston y un clon a la familia Rhodospirillales, cuyos miembros son bacterias típicas del suelo.

Los análisis mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de los macrofilamentos mostraron que, a excepción de unos pocos eucariotas, virtualmente todas las células eran bacterianas. Las sondas para detectar α -proteobacterias permitieron la identificación de varios morfotipos que incluían formas bacilares y cocoides. Por el contrario, todas las células que hibridaron con las sondas de γ -proteobacterias mostraron morfología bacilar. Debido a la compactación de los macrofilamentos y a la

producción de un denso mucílago, la precisa cuantificación de las células procarióticas no fue posible aunque parece que las γ -proteobacterias eran las más abundantes, seguidas por las α -proteobacterias y la aparición ocasional de actinobacterias (López-Archilla et al. 2004a).

Según este estudio, la comunidad microbiana que constituye mayoritariamente los macrofilamentos es claramente distinta de las encontradas en el río Tinto, en arroyos ácidos o en los biofilms de los drenajes de las minas. La mayoría de los filotipos encontrados están estrechamente relacionados con especies heterótrofas por lo que podría pensarse que la mayor parte de las bacterias en estos filamentos son heterótrofas. Si esto fuera así, podrían alimentarse por un lado de los compuestos orgánicos generados por las algas (que no parecen ser demasiado abundantes en estos macrofilamentos) y por otro, de materia orgánica flotante que la estructura dendrítica de los propios filamentos, junto con la producción de mucílago, podría atrapar. Estas dos últimas características facilitarían también la flotación de los macrofilamentos (López-Archilla et al. 2004a).

Con el conocimiento que por el momento se tiene, se ha elaborado una propuesta de funcionamiento del río que se muestra de forma esquemática en la **Figura 10**. En dicho esquema se han trazado los flujos de materia y energía entre los distintos componentes del ecosistema y se han mostrado las transformaciones de oxido-reducción de los principales iones presentes en las aguas del Tinto. La complejidad, aún sin ser excesiva, resulta notoria a pesar de que, dadas las características extremas del ambiente, podríamos haber esperado un funcionamiento mucho más sencillo.

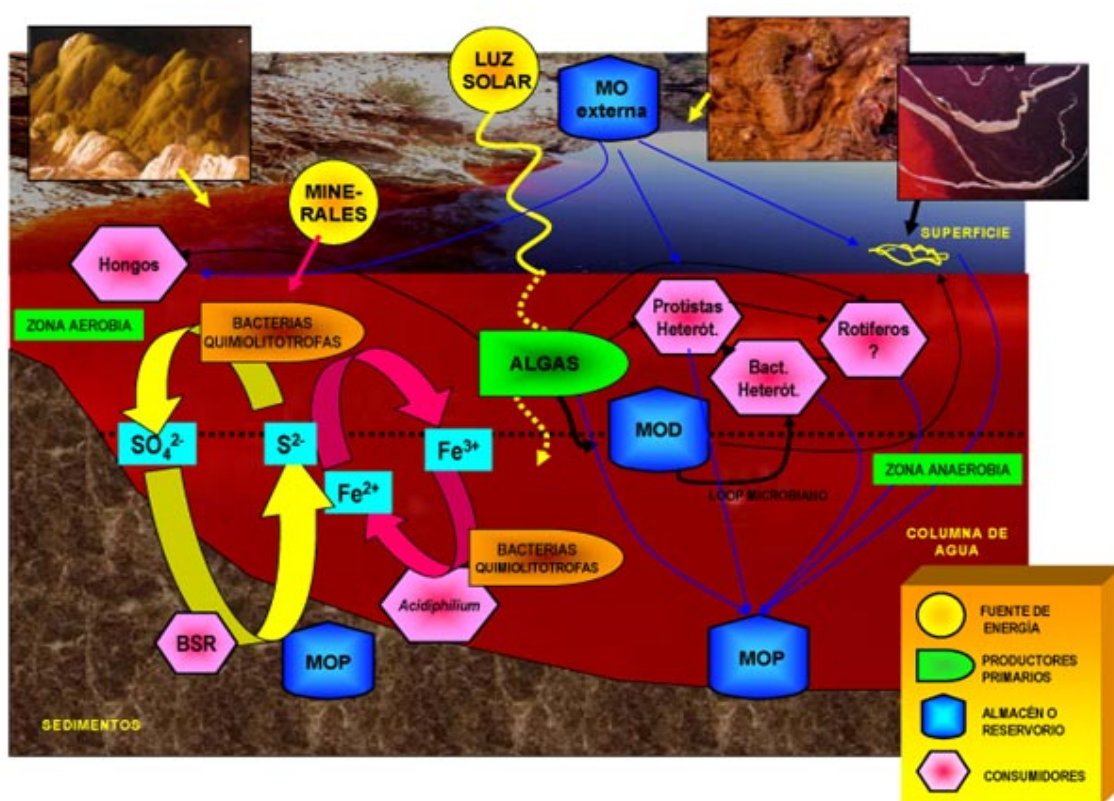


Figura 10. En el río Tinto los productores primarios obtienen la energía de dos fuentes distintas: el sol y los minerales. Las bacterias quimiolitótrofas oxidan los componentes minerales en las zonas aerobias del río obteniendo energía de ello. Los compuestos oxidados pueden ser reducidos en las partes anaerobias por algunos quimiolitótrofos, bacterias heterótrofas como *Acidiphilium* o sulfato reductoras (BSR), generándose y manteniéndose de esta manera las extremas características del río durante todo su recorrido. Los otros productores primarios, las algas, son consumidas por protistas heterótrofos. Los cadáveres de las algas y las sustancias que excretan (materia orgánica disuelta MOD-) son consumidos por las bacterias heterótrofas que a su vez pueden servir de alimento a los protistas heterótrofos. Productores primarios, protistas y bacterias heterótrofas son consumidos por los rotíferos. La MOD y la materia orgánica alóctona (MO externa) puede servir de alimento a las bacterias de los filamentos neustónicos. Los hongos, que en el río son organismos bentónicos, se aprovechan de los productores primarios fotosintéticos y de la MO externa. Parte de los cadáveres de todos estos organismos cae al fondo anaerobio en forma de materia orgánica particulada (MOP) en donde parte es acumulada en los sedimentos y parte es utilizada por BSR y otras bacterias anaerobias heterótrofas.

El mundo interior, un lugar inexplorado

En la cabecera del río, zona propiamente minera, la explotación del mineral durante siglos ha dejado detrás grandes movimientos de tierra y rocas que forman montañas artificiales. También las entrañas de la tierra han sido excavadas formando extensos entramados de galerías que pueden llegar a tener más de 500 metros de profundidad, estos lugares son mundos muy interesantes microbiológicamente inexplorados.

Dentro de los montones de mineral humedecidos por la lluvia las condiciones ambientales son muy distintas al exterior, la temperatura aumenta considerablemente debido a las reacciones químicas producidas entre los minerales y el agua. De hecho, a pocos centímetros de profundidad, la temperatura puede alcanzar los 80 °C (**Fig. 11**). Bajo estas condiciones ambientales proliferan microorganismos termófilos litoautotróficos. En una simple exploración de estos lugares se aisló un termófilo capaz de crecer sobre sustratos minerales como pirita o calcopirita además de azufre elemental pero no sobre sustratos orgánicos. Dadas sus características fisiológicas y morfológicas, este aislado fue clasificado como una arquea *Sulfolobal* (**Fig. 3D**) (Datos no publicados). En ocasiones, el agua cargada de altísimas concentraciones de minerales y a pHs cercanos a cero sale por la base de los montones de mineral donde forma, debido a la evaporación, pequeñas terrazas a diferentes alturas (**Fig. 11E**), en cuyos desagües también se observan precipitados de sulfato de hierro y jarositas entre los cuales crecen filamentos de microorganismos (**Fig. 11F**) no estudiados hasta el momento.

En las galerías profundas la humedad es muy alta y el agua, cargada de minerales en disolución debido al bajo pH, fluye por ellas. En los remansos y charcos se puede observar la formación de comunidades microbianas neustónicas (**Fig. 11A**) de aspecto muy distinto a las observadas en las aguas superficiales del río Tinto y cuya exploración al microscopio reveló la existencia de enormes cantidades de organismos procarióticos, filamentos de hongos y elevado número de protistas biflagelados.

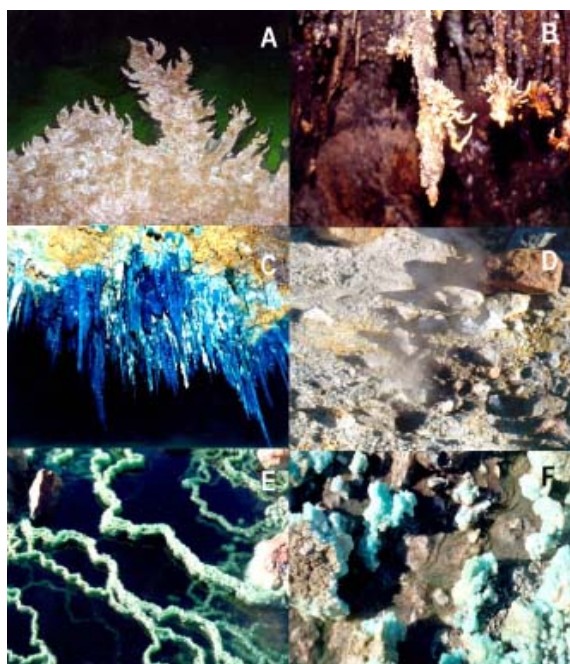


Figura 11: Fotografías de distintas zonas de Ríotinto estrechamente relacionadas con el río. (A) Comunidad neustónica de microorganismos en un charco en el interior de las galerías mineras; (B-C) Estalagmitas de distinta composición en las galerías mineras; (D) Vapor saliendo de un montón de mineral después de unas lluvias, la temperatura a 5 cm de la superficie era de 80 °C; (E) Terrazas formadas por evaporación del líquido lixiviado en la base de un montón de mineral; (F) Filamentos no estudiados de microorganismos creciendo en agua con altas concentraciones de Fe y Cu en disolución ¿obsérvese los precipitados de sales metálicas en la fotografía-.

Conclusiones

El río Tinto es un sistema complejo extensamente estudiado desde hace más de diez años. Durante este tiempo se ha demostrado que las extremas condiciones del río son en gran medida producidas y mantenidas por el componente biológico del ecosistema (López-Archilla *et al.* 1993; Amils *et al.* 2002), se ha puesto de manifiesto la sorprendente diversidad a nivel eucariótico tanto de protistas fotosintéticos (López-Archilla *et al.*, 2001; Amaral-Zettler, *et al.* 2002), como de hongos (López-Archilla *et al.*, 2004b) y protistas heterotróficos (López-Archilla *et al.*, 2001; Amaral-Zettler, *et al.* 2002). Por otro lado, se ha propuesto un modelo de funcionamiento del ecosistema teniendo en cuenta los distintos componentes biológicos (López-Archilla, 1994; López-Archilla *et al.*, 2001). También se ha estudiado la historia geológica del río, que está revelándose particularmente interesante, ya que existen similitudes con lugares en donde se han encontrado hematites (un mineral que frecuentemente se forma en presencia de agua líquida) en Marte (Fernández-Remolar *et al.* 2004) lo que está despertando un gran interés en Astrobiología. Como hemos visto, no sólo el río, sino también los lugares adyacentes (montones de mineral, galerías de interior, el propio acuífero), son ambientes extremadamente interesantes cuyo estudio, con toda probabilidad, ampliará los conocimientos sobre el modelo de funcionamiento de este peculiar ecosistema.

Referencias

- Amaral-Zettler, L.A., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B. Amils, R. y Sogin, M.L. 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of fire. *Nature* 417: 137.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Rodríguez, N. y Durán, C. 2002. Interaction of the sulfur and iron cycles in the Tinto River ecosystem. *Reviews in Environmental Science Bio/Technology* 1:299-309
- Atlas, R. y Bartha, T. 2001. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Edición. Addison Wesley, Madrid.
- Beech, I.B. y Gaylarde, C.C.1999. Recent advances in the study of biocorrosion -an overview. *Revista de Microbiología* 30: 177-190.
- Brock, T.D. y Gustafson, J. 1976. Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 32:567-571.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. and Lappin-Scott. H.M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49: 711-745.
- Ehrlich, H.L.1990. Geomicrobiology. 2ª Edición. Marcel Dekker. New York.
- Fernández-Remolar, D., Gómez-Elvira, J., Gómez, F., Sebastián, E., Martín, J., Manfredi, J.A., Torres, J., Kesler, C.G. y Amils, R. 2004. The Tinto River, an extreme acidic environment under control of iron, as an analog of the Terra Meridiani hematite site of Mars. *Planetary and Space Science* 52: 239-248.
- Fogarty, R.V. y Tobin, J.M. 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microbial Technology* 19:311-7.
- Fomina, M. y Gadd, G.M. 2002. Metal sorption by biomass of melanin-producing fungi grown in clay-containing medium. *J. Chemical Technology & Biotechnology* 78: 23-34.
- González-Toril, E.; Llobet-Brossa, E. Casamayor, E.O. y Amils, R. 2003. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied Environmental Microbiology* 69: 4853-4865.
- Johnson, D.B. y Hallberg, K.B. 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154: 466-473.
- Johnson, D.B. y McGinness, S. 1991. Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 57:207-211.
- Jonson, D.B. y Bridge, T.A.M. 2002. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *Journal of Applied Microbiology* 92: 315-321.
- Jonson, D.B. y Kelso, W.I.1983. Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by subculturing in media containing copper sulfate. *Journal of General Microbiology* 129: 2969-2972.

- Küsel, K. 2003. Microbial cycling of iron and sulfur in acidic coal mining lake sediments. *Water, Air, & Soil Pollution: Focus* 3: 67-90.
- Larsson, B. y Tjälve, H. 1978. Studies on the melanin-affinity of metal ions. *ACTA Physiologica Scandinavica* 104: 479-484.
- López-Archilla, A.I. 1994. Estudio de la comunidad microbiana de un ecosistema extremo: El río Tinto. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- López-Archilla, A.I., González, A.E., Terrón, M.C. y Amils, R. 2004b. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in Southwestern Spain. *Canadian Journal Microbiology* 50: 923-934.
- López-Archilla, A.I. y Amils, R. 1999. A comparative ecological study of two rivers in Southwestern Spain. *Microbial Ecology* 38: 146-156.
- López-Archilla, A.I., Gérard, E., Moreira, D. y López-García, P. 2004a. Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters* 235: 221-228.
- López-Archilla, A.I.; Marín, I. y Amils, R. 1993. Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Rio Tinto, Spain. *Geomicrobiology Journal* 17: 603-607.
- López-Archilla, A.I.; Marín, I. y Amils, R. 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbial Ecology* 41: 20-35.
- Meyer, J.M. 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potencial taxonomic of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives Microbiology* 174: 135-142.
- Moreira, D.; López-Archilla, A.I.; Amils, R. y Marín, I. 1994. Characterization of two new thermoacidophilic microalgae: genome organization and comparison with *Galdieria sulphuraria*. *FEMS Microbiology Letters* 122: 109-114.
- Pronk JT, de Bruyn, P., Bos, P. y Kuenen, J.G. 1992. Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 58:2227-2230.
- Pronk, J.T.; Liem K.; Bos, P. y Kuenen, J.G., 1991. Energy transduction by anaerobic ferric iron respiration in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 57:2063-2068.
- Suzuki, I.; Takeuchi, T.L.; Yuthasastrakosol, T.D. y Oh, J. 1990. Ferrous iron and sulfur oxidation and ferric iron reduction activities of *Thiobacillus ferrooxidans* are affected by growth on ferrous iron, sulfur, or a sulfide ore. *Applied Environmental Microbiology* 56:1620-1626.