

Ambientes extremos y geología: el caso de Río Tinto

Extreme Environments and Geology: The case of Rio Tinto

RICARDO AMILS

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM) y Centro de Astrobiología (CSIC-INTA). E-mail: ramils@cbm.uam.es

Resumen La reciente caracterización geomicrobiológica del Río Tinto, Faja Pirítica Ibérica (FPI), ha demostrado la importancia del ciclo del hierro, no sólo en la generación de las condiciones extremas del ecosistema (pH ácido, elevada concentración de metales pesados tóxicos) sino también del mantenimiento de un elevado nivel de biodiversidad, fundamentalmente eucariótica. Existen evidencias que sugieren que las condiciones extremas de la cuenca del Tinto no son debidas a la contaminación industrial sino a la operación de un birreactor subterráneo que obtiene su energía a partir de los sulfuros metálicos masivos de la FPI. Para demostrar esta hipótesis se han desarrollado distintos proyectos de perforación (MARTE, IPBSL) con el fin de intersectar la interacción de aguas subterráneas con los sulfuros metálicos de la FPI, aportar evidencias de las actividades microbianas subterráneas y la existencia de recursos potenciales para soportar dichas actividades. Los oxidantes responsables del funcionamiento del ecosistema provienen de la matriz mineral de la FPI, contradiciendo los modelos convencionales de formación de drenajes ácidos de minas. Estos recursos requieren únicamente de la presencia de agua para poner en marcha el metabolismo microbiano, fundamentalmente quimiolitotrófico. La existencia de similitudes entre los vastos depósitos de sulfatos y óxidos de hierro detectados en Marte y los productos de la biolixiviación de sulfuros metálicos identificados en la cuenca del Tinto ha potenciado su consideración como un análogo geoquímico terrestre del planeta rojo.

Palabras clave: Extremófilos, acidófilos, ciclo del hierro, Río Tinto, Marte, vida en el subsuelo.

Abstract *The recent geomicrobiological characterization of Río Tinto, Iberian Pyrite Belt (IPB), has proven the importance of the iron cycle, not only in generating the extreme conditions of the habitat (low pH and high concentration of toxic heavy metals) but also in maintaining a high level of microbial diversity, mainly eukaryotic. There are evidence suggesting that the extreme conditions of the Tinto basin are not the product of industrial contamination but the consequence of the operation of an underground bioreactor that obtains its energy from the massive sulfidic minerals of the IPB. To test this hypothesis, different drilling projects (MARTE, IPBSL) were carried out to intersect ground waters interacting with mineral ores, to provide evidence of subsurface microbial activities and the potential resources supporting them. The oxidants that drive the system are provided by the rock matrix, contradicting conventional acid mine drainage models. These resources need only groundwater to launch microbial metabolism, mainly chemolithotrophic. The existence of similarities between the vast deposits of sulfates and iron oxides on Mars and the bioleaching products identified in the Tinto basin have promoted the recognition of Río Tinto as a geochemical terrestrial analogue of the red planet.*

Keywords: *Extremophiles, acidophiles, iron cycle, Rio Tinto, Mars, subsurface life.*

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos fundamentales de la microbiología es conocer los límites de la vida y los mecanismos responsables de los mismos. La exploración de ambientes extremos ha permitido el descubrimiento de numerosos hábitats que se consideraban inhabitables hace sólo muy pocos años.

Como consecuencia, el interés en conocer la diversidad y la ecología de estos ambientes extremos ha aumentado considerablemente por diversas razones. Algunas son fundamentales y pretenden conocer los límites de la vida. Otras son más prácticas y se interesan por las posibles aplicaciones que alguno de estos microorganismos extremófilos o sus componentes puedan tener en procesos bio-

tecnológicos (por ejemplo, biominería o biorremediación).

Los extremófilos tienen además un papel fundamental en el desarrollo de la Astrobiología. De acuerdo al mapa de ruta del NASA Astrobiology Institute (<http://astrobiology.arc.nasa.gov>), uno de los principales objetivos de esta área de investigación transdisciplinar es la caracterización de ambientes extremos, de los microorganismos que en ellos habitan y los mecanismos que utilizan para resolver los problemas creados por las condiciones extremas en los que se desarrollan. La evaluación de la primera misión astrobiológica desarrollada por las misiones Vikingo en Marte en la década de los setenta concluyó que la vida tenía muy pocas posibilidades de desarrollarse en este planeta debido a las condiciones extremas detectadas en su superficie (Margulis et al., 1979). En los últimos cuarenta años se han realizado importantes avances en ciencia, en general, y en microbiología, en particular, que han permitido discurrir de este punto de vista tan pesimista. La investigación en extremofilia ha aumentado la posibilidad de encontrar vida en el Universo, ya que ha permitido demostrar, en contra de lo que pensábamos, que la vida no necesita para su desarrollo las condiciones que requieren los sistemas complejos eucarióticos utilizados como referencia. A pesar de que somos aún incapaces de definir lo que es la vida, hoy sabemos que es extremadamente robusta y capaz de adaptarse a muy distintas condiciones.

A continuación daremos un repaso a los conocimientos actuales en extremofilia, prestando especial atención a los microorganismos acidófilos. Los microorganismos extremófilos se adaptan a condiciones extremas generadas por las condiciones geofísicas del planeta (elevada o baja temperatura, alta dosis de radiación, elevadas concentraciones de iones, elevada presión, ausencia de agua, etc.). Los acidófilos, en concreto, se desarrollan en condiciones extremas debidas a la actividad metabólica de microorganismos quimiolitótrofos, es decir organismos que obtienen energía a partir de sustratos minerales (Ehrlich, 2002). Por otra parte y debido a esta actividad metabólica, estos microorganismos generan productos que facilitan la formación de minerales los cuales pueden ser importantes biofirmas para facilitar la detección de este tipo de actividades en lugares remotos del Sistema Solar o del Universo.

EXTREMÓFILOS

Una de las primeras observaciones sobre la existencia de extremófilos tuvo lugar hace más de cien años cuando se descubrieron los microorganismos responsables del deterioro del bacalao conservado en salazón. La sal era y continúa siendo uno de los métodos comunes para preservar comida, por lo

que la presencia de estos microorganismos en los cristales de sal representaba un problema importante para la industria de conservación de pescado. Estos microorganismos se denominaron halófilos (literalmente que aman la sal) porque necesitan importantes concentraciones de sal para desarrollarse. El interés en este tipo de microorganismos decreció cuando se sustituyó la sal de origen marino por la procedente de minas de sal continentales, que aunque de origen marino poseen una cantidad de halófilos viables mucho menor.

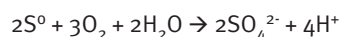
El estudio sistemático de extremófilos se inició en la década de los setenta como resultado del trabajo pionero del microbiólogo T. Brock y sus colaboradores (Book, 1995), los cuales aislaron microorganismos capaces de desarrollarse en las aguas extremadamente calientes de la zona volcánica de Yellowstone, y del ingeniero de minas J. Brierley (Brierley y Brierley, 1973), el cual aisló un hipertermófilo oxidador de azufre de interés biohidrometalúrgico en la misma área. El interés por los extremófilos creció exponencialmente gracias al desarrollo de nuevos conceptos filogenéticos por el biofísico C. Woese y colaboradores (Woese y Fox, 1977) basados en la comparación de las secuencias de catálogos de oligonucleótidos de la subunidad pequeña ribosomal. Esta metodología permitió el descubrimiento de un nuevo grupo de microorganismos procariontes (reino Archeobacteria), distinto de los reinos clásicos de Bacterias (procariontes) y Eucariotas. El reino Archeobacteria, posteriormente convertido en dominio Archaea, incluía junto a las halófilas mencionadas anteriormente, los microorganismos hipertermófilos (capaces de crecer a elevada temperatura) y las metanógenas (microorganismos que requieren condiciones estrictas de anaerobiosis para crecer), todas ellas extremófilas. El término Archeobacteria implicaba un estatus evolutivo de antigüedad debido a la naturaleza extrema de la mayoría de sus miembros. Este concepto se demostró erróneo cuando al utilizar secuencias completas de genes del ARN ribosomal (16-18S rADN) de un mayor número de organismos se evidenció que las Archaeas eran un grupo de microorganismos más próximos evolutivamente a las eucariotas que a las bacterias, a pesar de sus propiedades fenotípicas netamente procariontes (Woese et al., 1990). Por otra parte, la caracterización de la biodiversidad existente en distintos ambientes extremos permitió el aislamiento de un número importante de bacterias en los mismos, lo que demostró que la extremofilia no era patrimonio de las Archaeas.

ACIDOFILIA

Tal y como ya se ha mencionado, los ambientes ácidos son especialmente interesantes porque, en general, el pH de estos hábitats se



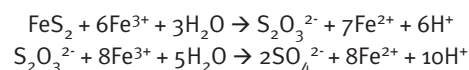
debe al metabolismo de los microorganismos y no a condiciones impuestas por el medio en el que se desarrollan, como es el caso del resto de los extremófilos. Los ambientes ácidos naturales poseen dos orígenes. En el primero, asociado a la actividad volcánica, la acidez se debe a la oxidación microbiana del azufre elemental producto de la reacción de condensación de los gases oxidados y reducidos producidos por la actividad volcánica:



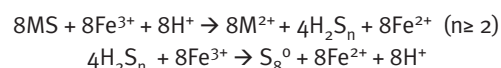
En el segundo caso, los ambientes ácidos con elevados contenidos en metales están habitualmente asociados a actividades mineras. Operaciones mineras para obtener carbón o metales exponen los sulfuros metálicos a la acción combinada del agua y el oxígeno, facilitando el crecimiento de microorganismos quimiolitótrofos y generando los denominados drenajes ácidos de minas (AMD), un problema ambiental comúnmente asociado a la actividad minera de metales.

El mecanismo por el cual los microorganismos quimiolitótrofos obtienen energía oxidando sulfuros metálicos, un proceso de interés industrial (biolixiviación, biominería), ha sido sujeto de una importante controversia durante muchos años (Ehrlich, 2002). Pero la reciente demostración de que el ión férrico presente en las envolturas celulares de los microorganismos biolixiviadores es responsable de la transferencia electrónica desde el sustrato mineral insoluble (sulfuros) a la cadena de transporte de electrones, ha permitido aclarar el proceso de solubilización de sulfuros metálicos a baja temperatura y presión (Sand et al., 2001). Las diferencias observadas en la biolixiviación de diferentes sulfuros metálicos se deben a la distinta estructura cristalina de los mismos. Tres sulfuros metálicos, pirita, molibdenita y tungstenita, son susceptibles de una oxidación química mediada por ión férrico por el denomina-

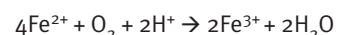
do mecanismo del tiosulfato. En el caso de la pirita, es como sigue:



mediante el cual el principal producto de la reacción es el ácido sulfúrico. El resto de los sulfuros metálicos (por ejemplo, calcopirita y galena) son susceptibles de una oxidación por ión férrico mediada por el denominado mecanismo del polisulfuro (en la siguiente reacción, M representa a un metal):



En este caso, el producto final es azufre elemental y se requiere la participación de microorganismos oxidadores de azufre con el fin de oxidar completamente el azufre a sulfato. El hierro reducido producido en estas reacciones se puede reoxidar mediante el concurso de microorganismos oxidadores de hierro:



El papel principal de los microorganismos quimiolitótrofos acidófilos es mantener una elevada concentración del ión férrico, el agente oxidante.

El acidófilo quimiolitótrofo estricto *Acidithiobacillus ferrooxidans* (previamente denominado *Thiobacillus ferrooxidans*) fue aislado por primera vez en un drenaje ácido de una mina de carbón en USA a finales de los cuarenta (Colmer et al., 1950). Aunque *At. ferrooxidans* puede oxidar azufre y hierro reducidos, consideraciones termodinámicas le dieron más importancia a la reacción de oxidación del sulfuro, obviando la del hierro. El descubrimiento de que algunos quimiolitótrofos estrictos como *Leptospirillum ferrooxidans* pueden crecer únicamente oxidando hierro y que el mismo tiene un papel fundamental en la biolixiviación y en la generación de drenajes ácidos de minas, ha cambiado completamente este punto de vista. Más aún, hoy en día está convenientemente demostrado que la oxidación de hierro en condiciones anaerobias (ausencia de oxígeno) se puede dar tanto en la fotosíntesis anoxigénica como en la respiración anaerobia de hierro utilizando nitrato y probablemente otros aceptores de electrones (Amils et al., 2008). La mayoría de los microorganismos acidófilos estrictos han sido aislados en zonas volcánicas o drenajes ácidos de mina. Río Tinto (Fig. 1) es un inusual ecosistema extremo debido a su acidez (media pH 2.3, tamponado por el ión férrico), longitud (92 kms), elevada concentración de cationes metálicos tóxicos (Fe, As, Cu, Zn, Ni, etc...) y un inesperado nivel de biodiversidad, principalmente eucariótica (Amils y Segura, 2010). Debido a su tamaño y accesibilidad, Río Tinto se considera un excelente modelo para el estudio de la ecología microbiana de ambientes ácidos extremos.

Fig. 1. Río Tinto.
Fotografía extraída de Amils y Segura (2010).



RÍO TINTO

Río Tinto nace en el corazón de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), la mayor concentración de sulfuros metálicos de la Tierra, producto de la actividad hidrotermal submarina de hace 350 millones de años (Almodóvar y Sáez, 2004). Existen indicios en los testigos extraídos en campañas de perforación en los hielos del Ártico “que están de acuerdo con pruebas arqueológicas” de que la actividad metalúrgica de la zona tiene más de cinco mil años, una de las más antiguas conocidas. Los especialistas sitúan a los tartesios en esta zona, y sabemos que la misma, probablemente debido a su riqueza metalúrgica, fue disputada por distintos pueblos establecidos en la parte occidental del mediterráneo, como los fenicios y cartagineses. Hay constancia por referencias bíblicas de que el rey Salomón tenía relaciones comerciales con los tartesios y que admiraba sus conocimientos metalúrgicos. Pero fueron los romanos los primeros en dejar constancia escrita en su cartografía de la existencia del río Urbero, “el que quema”, sin que exista acuerdo si el nombre hacía referencia al color rojo de sus aguas o a sus propiedades ácidas y oxidantes. Los romanos explotaron las minas de Río Tinto durante cuatro siglos, extrayendo con éxito plata y, según datos arqueológicos recientes, cobre (Aquilino Delgado, comunicación personal). A la colonización romana le siguió la árabe, que ocupó esta parte de la Península Ibérica durante setecientos años. Sabemos que los árabes no extrajeron metales de la Faja Pirítica, sino que se dedicaron fundamentalmente a la agricultura, a las artes y a las ciencias, entre ellas, la alquimia. Precisamente el nombre que le dieron, río Tinte de Azije, se corresponde con esta última actividad. Tinto es el nombre actual del río y no hay duda de que hace referencia al color de sus aguas, y Azije es el nombre que los árabes daban a la caparrosa (sulfato de hierro y cobre), una sal fundamental para los alquimistas y que se obtenía a partir de los precipitados que se acumulan en las márgenes del río. La importancia de este producto se desprende del tratamiento especial que el código de Zalamea la Real le daba a su recolección y a las multas que sufrían los que indebidamente interferían su producción.

El agua subterránea en la zona del Andévalo donde nace Río Tinto ha sido un problema crónico de la minería. Los romanos, como buenos ingenieros, lo resolvieron mediante el uso de norias capaces de desalojar el agua y exponer los minerales beneficiables. Se conocen tímidos intentos de explotación sin éxito, a causa de los problemas de la capa freática, de distintas compañías del norte de Europa, hasta que a finales del siglo XIX la Primera República vendió los derechos mineros hasta el centro de la Tierra al banquero escocés H. Matheson, fundador de la Río Tinto Company, una empresa metalúrgico-minera que tuvo en su día un papel

preponderante en la revolución industrial mundial al proveer a la industria de dos elementos fundamentales, el cobre y el ácido sulfúrico. La Compañía, tal y como se la conocía familiarmente, resolvió los problemas del agua en la minería tradicional introduciendo una nueva metodología, revolucionaria para la época, la minería a cielo abierto, que además permitía la extracción de mayores volúmenes de mineral. La Río Tinto Company fue dueña de los destinos de la provincia de Huelva durante más de 80 años, hasta la suave nacionalización ejecutada por el gobierno español en la década de los cincuenta. La nacionalización dio origen a la compañía Explosivos de Río Tinto, la cual explotó la mina, valga la redundancia, con éxito económico relativo. Los problemas económicos de la empresa facilitaron su venta a la multinacional Freeport-McMoran, únicamente interesada en los hornos de fundición, que la compañía había instalado recientemente en el polo industrial de Huelva, para tratar los concentrados de cobre de su mina de Indonesia, una de las más grandes del mundo. Los problemas ambientales provocados por el mantenimiento de una mina sin explotación facilitaron su cesión a los trabajadores que se constituyeron en Sociedad Anónima Laboral, la cual debido a los problemas ambientales asociados a la minería en el primer mundo y sobre todo a los persistentes bajos precios del cobre en el mercado de metales de Londres, se disolvió con la venta de la mayoría de las acciones a un testaferro que, en contra de sus promesas, cerró definitivamente la mina. En la actualidad, parte de la mina está en manos de otra multinacional, EMED-Tartessus, la cual y debido a la reciente subida del precio del cobre como consecuencia del desarrollo de países emergentes como China y la India, considera rentable la reapertura de la actividad minera en la zona.

GEOMICROBIOLOGÍA DE LA CUENCA DEL TINTO

Curiosamente, al mismo tiempo que empezaba el declive de la actividad minera en el área a finales del siglo pasado, aumentaba el interés científico de la misma. A finales de los ochenta y a raíz del desarrollo de un proyecto de investigación europeo interesado en la evaluación de la utilización de microorganismos termófilos en procesos de biominería, se inició el estudio de la ecología microbiana de Río Tinto con el fin de identificar y aislar microorganismos de posible utilidad en procesos de biolixiviación. El estudio sistemático fue iniciado por nuestro grupo de investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), y convenientemente complementado con posterioridad por el recién creado Centro de Astrobiología (INTA-CSIC), asociado al NASA Astrobiology Institute, lo que ha permitido demostrar la singularidad del ecosistema del Tinto, y,



sobre todo, que las condiciones extremas de acidez y de elevada concentración de hierro y metales del mismo, no son producto exclusivo de la actividad minera, como señalan los libros de texto, sino que se debe fundamentalmente a la actividad metabólica de microorganismos quimiolitótrofos que se alimentan de los sulfuros metálicos existentes en la Faja Pirítica Ibérica (FPI).

Las primeras investigaciones se centraron en la caracterización de la diversidad microbiana del ecosistema. Teniendo en cuenta que Río Tinto se ha considerado clásicamente como un ejemplo de aguas ácidas de mina, los estudios se orientaron preferentemente al aislamiento de microorganismos capaces de oxidar el azufre de la pirita (FeS_2) y de otros sulfuros metálicos (calcopirita) presentes en importantes cantidades en la FPI. El microorganismo más estudiado hasta ese momento en este tipo de procesos era *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta bacteria, aislada de las aguas ácidas de una mina de carbón de los EE.UU (Colmer et al., 1950), se creía el principal responsable de su generación por oxidación del azufre reducido de los sulfuros metálicos. Su aislamiento recurrente en la mayoría de las minas metálicas del mundo facilitó, que en su momento, se considerara el principal responsable de los problemas ambientales generados por la minería metálica. Es importante aclarar en este contexto que esta labor pionera se llevó a cabo utilizando los métodos convencionales de la ecología microbiana: aislamiento e identificación de microorganismos a partir de cultivos de enriquecimiento. La cuantificación *in situ*, imprescindible para evaluar la impor-

tancia de los microorganismos en el ecosistema, se realizó por métodos indirectos poco fiables. Estas metodologías, las únicas disponibles a principios de los noventa, permitieron evidenciar la presencia de actividades oxidadoras de azufre y de hierro a lo largo del cauce del río, e identificar y aislar algunos de los microorganismos responsables, tales como el ya mencionado *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*.

La irrupción a mediados de los noventa de las técnicas de biología molecular aplicadas a estudios de ecología microbiana supuso una auténtica revolución. Estas metodologías basadas en el aislamiento del ADN a partir de muestras naturales y la correspondiente amplificación y secuenciación de genes, fundamentalmente de los genes responsables de la codificación de los ácidos nucleicos de los ribosomas (16-18S rADN), permiten, por un lado evaluar el nivel de diversidad de una muestra sin tratar, facilitando la identificación de los microorganismos presentes a tiempo cero y, por otro, cuantificarlos mediante el uso de técnicas de hibridación *in situ*. La aplicación de estas metodologías al estudio de Río Tinto (Fig. 2) ha permitido demostrar, en contra de lo establecido, que es la oxidación del hierro y no la del azufre de la pirita el elemento fundamental del funcionamiento del sistema (González-Toril et al., 2003). El papel central que el hierro oxidado tiene en la solubilización de la pirita (biolixiviación) y de los otros sulfuros metálicos ya había sido enunciado por el grupo del profesor W. Sand de la Universidad de Hamburgo (Sand et al., 2001), mediante experimentos controlados de laboratorio. La demos-

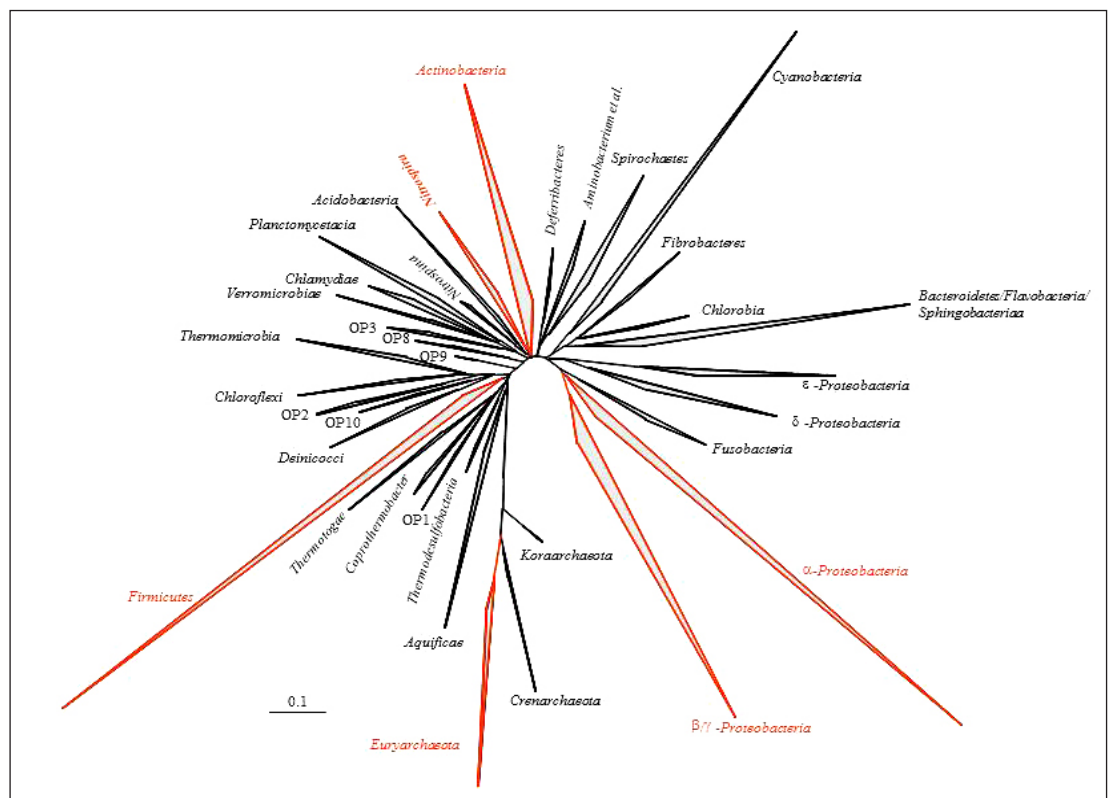
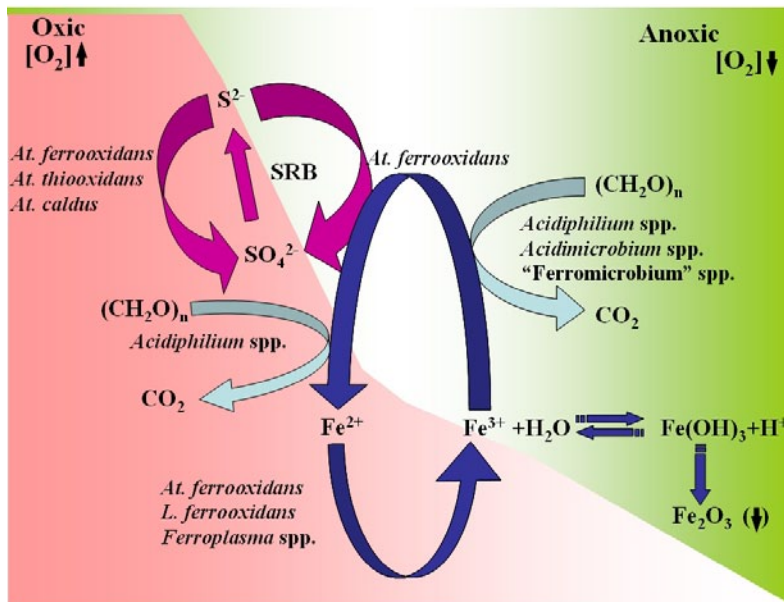


Fig. 2. Árbol filogenético procariótico. Marcado en rojo los fila que poseen algún microorganismo detectado en Río Tinto.

tración del papel del hierro en un sistema natural se ha realizado en la cuenca del Tinto mediante la identificación y cuantificación de los microorganismos involucrados en el proceso, fundamentalmente *Leptospirillum ferrooxidans* y el ya mencionado *At. ferrooxidans* (González-Toril et al., 2003).

La oxidación del hierro se produce fundamentalmente en las zonas expuestas al oxígeno atmosférico. En las zonas más profundas, el sistema se vuelve anóxico por consumo del oxígeno por los microorganismos respiradores aerobios. En ausencia de oxígeno, el ión férrico se utiliza como aceptor de electrones, reduciéndose, en lo que denominamos una respiración anaerobia, utilizando compuestos reducidos de azufre como dadores de electrones (Fig. 3). Los principales microorganismos involucrados en reacciones de reducción del hierro son, el ya conocido y versátil *At. ferrooxidans* (el cual puede oxidar hierro en presencia de oxígeno y reducirlo en su ausencia) y distintas especies del género *Acidiphilium*, un grupo de microorganismos poco conocidos debido al escaso interés aplicado de su metabolismo. Por lo tanto, debido a la actividad de la mayoría de los microorganismos identificados en la columna de agua del Tinto (un 80%), el hierro no solo se oxida sino que también se reduce, es decir, que se constituye en un ciclo, el ciclo del hierro, el cual es fundamental para el funcionamiento y mantenimiento del ecosistema. Por supuesto que otros microorganismos han sido identificados mediante la combinación de técnicas convencionales y moleculares, pero ninguno de ellos constituye más de un 1% de la diversidad del sistema, considerándose por lo tanto componentes minoritarios del mismo. En este contexto, es importante subrayar que el funcionamiento del ciclo del azufre, anteriormente considerado esencial en los procesos de biolixiviación y la generación de aguas ácidas, es minoritario y dependiente del ciclo del hierro. Como ya se ha mencionado anteriormente, la oxidación de la pirita y de otros sulfuros metálicos se hace gracias al poder oxidante del ión férrico en medio ácido, es decir, mediante una reacción netamente química. Siendo los microorganismos oxidadores de hierro los responsables de mantener una elevada concentración del agente oxidante, el ión férrico. Los microorganismos oxidadores de azufre solo participan en la generación de ácido sulfúrico a partir del metabolismo de compuestos reducidos de azufre, como por ejemplo el azufre elemental, generados en las reacciones de oxidación de sulfuros metálicos distintos a la pirita, tales como la calcopirita o la galena.

Obviamente el conocimiento de la génesis del sistema es solo un primer paso necesario para comprender su funcionamiento. A partir de ahí, numerosas investigaciones, la mayoría en desarrollo, intentan profundizar de manera complementaria en la esencia y las peculiaridades del hábitat. En este contexto es conveniente subrayar que hay muchas



cosas que aún no entendemos de este peculiar ecosistema. Por ejemplo, la paradoja de la gran diversidad eucariótica en un ecosistema tan extremo como el del Tinto (Amaral-Zettler et al., 2002; Amaral-Zettler et al., 2011). En ecología, se dice que un ambiente es extremo cuando posee un bajo nivel de biodiversidad. Desde el punto de vista procariótico, la cuenca de Río Tinto corresponde a un ambiente extremo debido a la baja diversidad bacteriana y arqueana detectada (el 80% corresponde a los tres microorganismos ya mencionados: *L. ferrooxidans*, *At. ferrooxidans* y *Acidiphilium* sp.). Sin embargo, la simple inspección de determinadas zonas del río pone de manifiesto la existencia de importantes formaciones de organismos fotosintéticos eucarióticos (algas), fácilmente identificables por la intensa coloración de la clorofila presente en sus cloroplastos. Más aún, las algas unicelulares detectadas en el ecosistema del Tinto están acompañadas de otros microorganismos no fotosintéticos, fundamentalmente protistas y hongos filamentosos, formando densas biopelículas. Se ha evaluado que el 65% de la biomasa del ecosistema corresponde a microorganismos fotosintéticos eucarióticos, es decir, que la mayor parte de la producción primaria del ecosistema se debe a la fotosíntesis oxigénica, el sistema de obtención de energía de las algas que se desarrollan en los márgenes del río y en las biopelículas que cubren las rocas y los lugares poco profundos de su cauce. Hasta la fecha se han identificado 22 clases de protistas eucarióticos acidófilos (Fig. 4). Esta diversidad está convenientemente complementada con más de mil hongos filamentosos aislados, de los cuales más de la mitad son capaces de desarrollarse en las condiciones extremas del río, siendo por lo tanto elementos activos potenciales del sistema y no formas de resistencia externas (esporas) introducidas por los tributarios neutros o por las lluvias torrenciales que este río de régimen mediterráneo

Fig. 3. Modelo geomicrobiológico de la columna de agua de la cuenca del Tinto. El tamaño de los géneros y especies es proporcional al número de células detectado en el sistema.



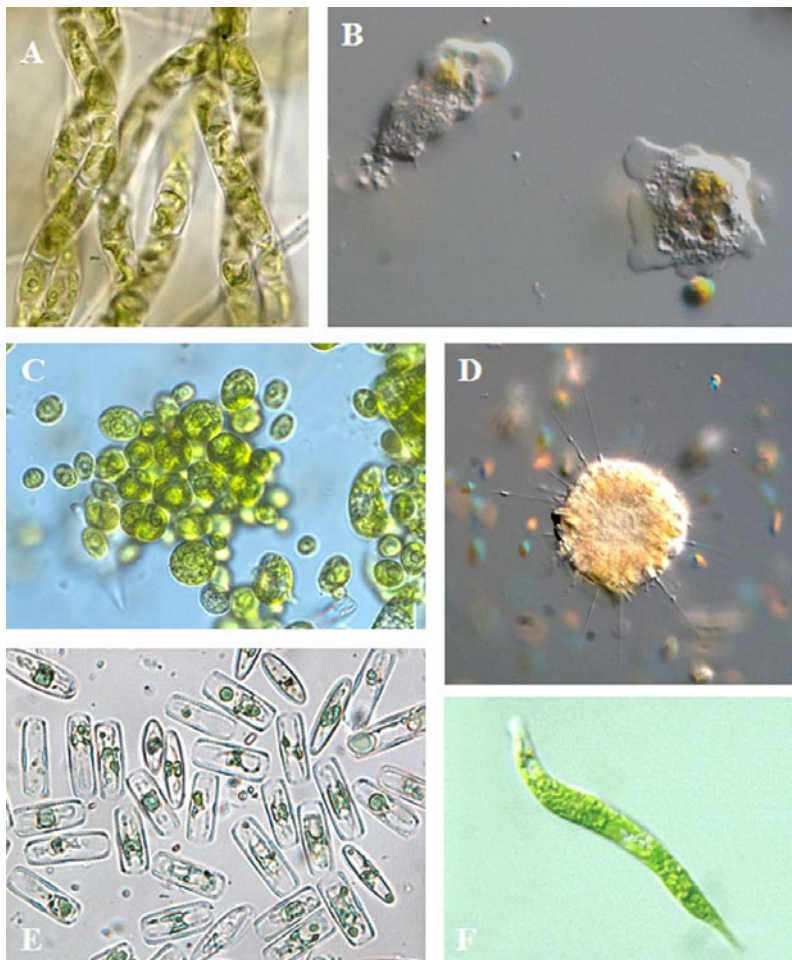


Fig. 4. Microscopía óptica de microorganismos eucarióticos detectados en la cuenca del Tinto (Foto de A. Aguilera).

sufre en otoño e invierno. Este importante nivel de diversidad eucariota no se corresponde a lo esperado en un ambiente extremo y contrasta con la baja diversidad procariótica anteriormente apuntada. Por otra parte, la mayoría de los microorganismos eucariotas identificados corresponden a organismos comúnmente detectados en ambientes neutros cercanos, por ejemplo el río Guadiana o el Guadalquivir. Es decir, que estamos frente a mecanismos de adaptación rápida a condiciones extremas por organismos con organización celular compleja. ¿Cuál es la ventaja de desarrollarse en un ambiente ácido extremo cargado de metales pesados tóxicos? Esta pregunta aguarda una adecuada respuesta. Existen hipótesis, como por ejemplo la ventaja de disponer de una fuente ilimitada de hierro, un elemento esencial para la vida, extremadamente competitivo en los ecosistemas neutros en los que es insoluble.

Otra peculiaridad del ecosistema es la formación de minerales secundarios (Fernández-Remolar et al., 2005) a partir de los productos del metabolismo, fundamentalmente quimiolitótrofo. Como ya se ha comentado anteriormente, la utilización de la pirita y de otros sulfuros metálicos como fuente de energía genera productos oxidados: sulfatos, ión férrico y otros metales, que se mantienen solubles, incluso a elevadas concentraciones, gracias a la acidez del medio. La variación de las condiciones

físico-químicas en el espacio y en el tiempo hace se produzca la formación de distintos minerales como la jarosita, la copiapita o la schwertmannita. Por otra parte, y a pesar de la dilución por tributarios o lluvia, la hidrólisis del ión férrico mantiene constante el pH del río (Fig. 3), formando jarosita (sulfato hidróxido de hierro y potasio), a $\text{pH} < 2.5$, y schwertmannita (hidróxi-sulfato hidratado de hierro), a $\text{pH} > 3$, siendo esta última muy inestable. Ambos minerales se transforman en goethita (oxihidróxido de hierro), y finalmente, esta a su vez, con el paso del tiempo, en hematites (óxido de hierro). Probablemente para los valores de pH del río Tinto la jarosita sea, en primera instancia, el principal producto de la hidrólisis del férrico. Otra cuestión, es que la jarosita es bastante más estable que la schwertmannita, y cuando hay niveles de goethita, más o menos jóvenes, lo más normal es que esta proceda de la última. La identificación de estos minerales y su cuantificación en las rocas sedimentarias (terrazas) que se encuentran a lo largo del cauce del río han facilitado el seguimiento de su proceso de generación, y lo que es más importante, su datación, lo que ha permitido demostrar que las terrazas de óxidos de hierro más antiguas del río se formaron hace varios millones de años en condiciones análogas de acidez y de concentración iónica a las actuales. Este dato indica que las peculiares características del río anteceden en tres órdenes de magnitud la actividad minera más antigua conocida, lo que demuestra claramente que las mismas no son producto de la actividad minera sino de la actividad geomicrobiológica auspiciada por la elevada concentración de los sulfuros metálicos de la FPI.

GEOMICROBIOLOGÍA DEL SUBSUELO DE LA FAJA PIRÍTICA IBÉRICA

Los resultados obtenidos hasta ahora permiten explicar la mayoría de los fenómenos observados a lo largo del cauce del río, pero no responden a la pregunta de si el río es el producto de la actividad de un gigantesco reactor subterráneo operando en el subsuelo de la Faja Pirítica, tal y como se había propuesto originalmente. Para responder a esta pregunta, ha sido necesario perforar la Faja Pirítica con el fin de detectar la posible actividad biológica en los lugares de contacto entre la capa freática y los sulfuros metálicos. Para ello se puso en marcha el proyecto MARTE (Mars Analogue Research and Technology Experiment), un proyecto de colaboración entre el Centro de Astrobiología y la NASA (Amils et al., 2008). La parte geomicrobiológica del proyecto se desarrolló durante los años 2003 y 2004, realizándose varias perforaciones con el fin de atravesar la masa de sulfuros masivos de la FPI en la zona de Peña de Hierro. Estas perforaciones se hicieron en condiciones especialmente diseñadas para minimizar el contacto entre los testigos y el agua de refrige-

ración del cabezal de la perforadora, así como con el oxígeno atmosférico. El agua de perforación se marcó convenientemente con el fin de detectar su presencia en las distintas muestras y descartar aquellas que hubieran estado expuestas a través de fisuras o discontinuidades del mineral y que pudieran estar contaminadas con microorganismos externos al sistema. Las muestras se obtuvieron de la parte interna de los testigos, procesados en condiciones estériles y anaerobias en el laboratorio cedido por la Fundación Riotinto en el Museo Minero, y en las mismas se midió el contenido en aniones y cationes metálicos, se identificaron las fases minerales existentes, la presencia de microorganismos por técnicas de hibridación *in situ*, se extrajeron ácidos nucleicos para su amplificación, clonación y secuenciación y se inocularon cultivos de enriquecimiento con el fin de detectar distintos tipos de metabolismo. En las distintas perforaciones realizadas, el nivel freático se encontró a 90 metros de profundidad, continuándose la perforación hasta alcanzar los 160 metros, es decir que una parte importante de la perforación se realizó a través de la capa freática, en condiciones totalmente anóxicas. En los pozos de perforación, convenientemente protegidos con tubos de PVC con ranuras a distintos niveles con el fin de facilitar el movimiento del agua a través de los mismos, se instaló un sistema de toma de muestras de agua y gases a distintas profundidades de la capa freática. El análisis de las muestras ha permitido demostrar la presencia de actividades oxidadoras de hierro y azufre a distintas profundidades. El análisis mineralógico ha permitido correlacionar estas actividades con la aparición de minerales producto de la oxidación de los sulfuros metálicos. La aparición de gases reducidos como el hidrógeno y el metano ha facilitado la detección de actividades metanogénicas y sulfato reductoras en el subsuelo de la Faja Pirítica. Estas actividades requieren condiciones anóxicas estrictas, lo cual es un indicador de las condiciones en las que opera la geomicrobiología en el interior de la Faja Pirítica. Los resultados del proyecto MARTE han probado la existencia de un reactor subterráneo capaz de generar los elementos presentes en las aguas del río, lo que sugiere que Río Tinto no es más que el sistema de desagüe de los productos generados por la oxidación de sulfuros metálicos en el interior de la FPI (Amils et al., 2008).

Recientemente se han iniciado las perforaciones del proyecto Iberian Pyrite Belt Subsurface Life (IPBSL), un proyecto "Ideas" de la Comunidad Europea concedido al Centro de Astrobiología y que permitirá responder a las muchas preguntas originadas y no respondidas por el proyecto MARTE (Amils et al., 2011). Este proyecto ha generado dos pozos de 340 y 630 metros de profundidad (Fig. 5), convenientemente seleccionados por una prospección geofísica dedicada a la búsqueda de fallas asociadas a zonas de baja resistividad, las cuales podrían corresponder

a aguas con elevado contenido iónico. Los datos preliminares obtenidos han permitido aseverar la potencia de las aguas subterráneas existentes en la zona, la elevada concentración de iones que como el hierro y el sulfato, que subrayan la actividad quimiolitótrofa sugerida por el proyecto MARTE. El cromatógrafo iónico ha permitido evidenciar no sólo la presencia de putativos donadores y aceptores de electrones análogos a los detectados en el proyecto MARTE, sino de importantes concentraciones de ácidos orgánicos a determinados niveles, los cuales sugieren la existencia de ecosistemas complejos operando en el subsuelo de la FPI. Las muestras obtenidas se están analizando con técnicas tanto convencionales (cultivos de enriquecimiento, aislamiento, caracterización fisiológica), como moleculares (extracción de ADN, amplificación de genes, clonación, secuenciación, comparación con secuencias de bancos de datos, metagenómica, transcriptómica, proteómica, hibridación, etc), con el fin de determinar la biodiversidad existente y las actividades que permiten el desarrollo de los ecosistemas detectados. En una segunda fase a desarrollar en un futuro próximo, se pretende colocar sondas de distinta especificidad (pH, potencial redox, conductividad, temperatura, flujo, concentración de cationes y aniones de interés), con el fin de obtener datos en tiempo real de la evolución de parámetros que nos permita evaluar la geomicrobiología subterránea generadora de las aguas ácidas y oxidantes de la cuenca del Tinto. Es importante subrayar que esta geomicrobiología se realiza en condiciones estrictamente anaerobias, es decir en ausencia de oxígeno, lo que acentúa la necesidad de entender su funcionamiento por sus implicaciones tanto medioambientales como tecnológicas. Desde el punto de vista ambiental, existe el convencimiento de que las aguas ácidas asociadas a la actividad minera son debidas a la exposición del mineral al oxígeno atmosférico, no teniéndose en cuenta la posibilidad de que se pueda oxidar hierro, el agente oxidante de la pirita, en condiciones anaerobias, mediante la denominada respiración anaerobia. Eso permitiría explicar la elevada

Fig. 5. Vista de la perforación BH11 del proyecto IPBSL en Peña de Hierro (Foto de J. Segura).



carga iónica, en ión férrico y sulfatos, de las aguas subterráneas que discurren por zonas profundas no asociadas a la actividad minera. Así como, el funcionamiento de ciclos activos del hierro y del azufre, que permiten cambiar el estado de oxidación de estos elementos facilitando la generación de especies con mayor movilidad como el ión ferroso, o la generación de sulfuros metálicos de origen biológico, debidos a la actividad de procariontas sulfato reductoras generadoras de ácido sulfhídrico a partir del ión sulfato. Está claro a partir de los resultados obtenidos que existe una importante actividad biológica subterránea asociada a la presencia de elevadas concentraciones de sulfuros metálicos. El desconocimiento que existe de la biosfera oscura, se debe fundamentalmente a la complejidad asociada a su estudio, y a su juventud. De hecho, el primer trabajo científico sobre la misma tiene menos de veinte años, y sólo nos permite avanzar que la misma es mucho más importante de lo que suponíamos (Amils et al., 2008). Científicos, de los que no hay sospecha que estén barriendo para casa, como S. G. Gould, avanzaron que el tamaño de la biosfera oscura podría ser mayor que el de la biosfera que se desarrolla en la superficie del planeta. Por esta razón, se considera indispensable que continuemos profundizando en un mundo desconocido donde la interacción entre la geología y la biología es más que evidente.

RÍO TINTO COMO UN ANÁLOGO TERRESTRE DE MARTE

Tal y como se ha mencionado en la introducción, la primera misión astrobiológica, expresamente diseñada para buscar vida fuera de la Tierra, corresponde a los módulos Vikingo que “amartizaron” con éxito a mediados de los años setenta en la superficie de Marte. Los módulos Vikingo realizaron varios experimentos diseñados para detectar posibles signos de vida en el planeta rojo. A pesar de que continúa el debate sobre la idoneidad de las tecnologías utilizadas y la interpretación de alguno de sus resultados, la principal conclusión de estos experimentos fue que el desarrollo de la vida en Marte era imposible a causa de la radiación, las condiciones oxidantes, la baja temperatura y la ausencia de agua en estado líquido (Margulis et al., 1979). La evaluación negativa sobre la habitabilidad de Marte y la falta de interés político como consecuencia del fin de la Guerra Fría disminuyeron el interés por este planeta. Sin embargo, en los últimos años varias misiones de distintas agencias espaciales han logrado alcanzar su objetivo, acumulando datos fundamentalmente topográficos, geoquímicos y atmosféricos, que están cambiando radicalmente nuestra visión de Marte. ¿Qué ha sucedido en los menos de 40 años que han transcurrido desde las misiones Vikingo para que renazca, con mayor empuje si cabe, el interés por Marte? Varios han sido los

desarrollos científicos que han propiciado este cambio. En primer lugar el desarrollo de la extremofilia, una nueva área de la biología que ha demostrado que la vida es mucho más robusta de lo que pensábamos y capaz de desarrollarse en condiciones que creíamos prohibitivas hace solo unas décadas. Dentro de la extremofilia, merece mención especial el reciente descubrimiento de vida en el subsuelo, en el interior de las rocas a varios cientos de metros de profundidad, independiente de la energía solar (Amils et al., 2011). En segundo lugar, la sugerencia de posibles signos de vida en el meteorito marciano ALH 84001, realizada en la década de los noventa por el Dr. D. McKay y sus colaboradores. Este muy controvertido trabajo ha inspirado una cantidad enorme de experimentos, publicaciones y discusiones lo que ha facilitado que la NASA retomara la exploración de Marte, desarrollando misiones mucho menos costosas que las Vikingo. El éxito de la misión Pathfinder y de su minirover Sojourner, allanó el camino de futuras misiones, muchas de ellas aún operativas, que están aportando datos fundamentales para evaluar la posible habitabilidad de Marte. Las evidencias de un pasado distinto al actual con grandes cantidades de agua surcando la superficie de Marte empezaron a acumularse a partir de los datos generados por distintas misiones: Mars Global Surveyor, Mars Odyssey, Mars Exploration Rovers (MER), Mars Express, Mars Reconnaissance Orbiter y Phoenix. Estudios espectrales han mostrado la existencia de formaciones minerales singulares, destacando, por ejemplo, la presencia de una región especialmente rica en hematites en Meridiani Planum (Fig. 6), la existencia de hielo de agua en las regiones polares o la detección de filosilicatos en distintas zonas del planeta.

Los datos geoquímicos y mineralógicos generados por los MER Opportunity y Spirit han permitido demostrar no solamente un pasado húmedo en Marte, sino también ácido, condición necesaria para la formación de jarosita, un distintivo sulfato de hierro, detectado por espectroscopía Mössbauer en distintas zonas del planeta. El enriquecimiento en distintos elementos como el azufre, el cloro o el bromo detectado en las rocas expuestas por impactos meteoríticos en diversos cráteres de Meridiani Planum solo es explicable por la evaporación secuencial de aguas cargadas de iones. La presencia de minerales de hierro, como la mencionada jarosita, goethita o hematites, sugiere que su formación se debe a procesos desarrollados en presencia de agua, y por lo tanto compatibles con la vida. La presencia de una importante cantidad de aguas ácidas permitiría explicar un enigma de la geología marciana, la ausencia de formaciones masivas de carbonatos, esperables si el gas invernadero responsable de mantener el agua en estado líquido fuera anhídrido carbónico (Fairén et al., 2004). El análisis de la composición atmosférica de Marte ha permitido identificar la presencia de metano, la cual ha sido posteriormente corroborada por

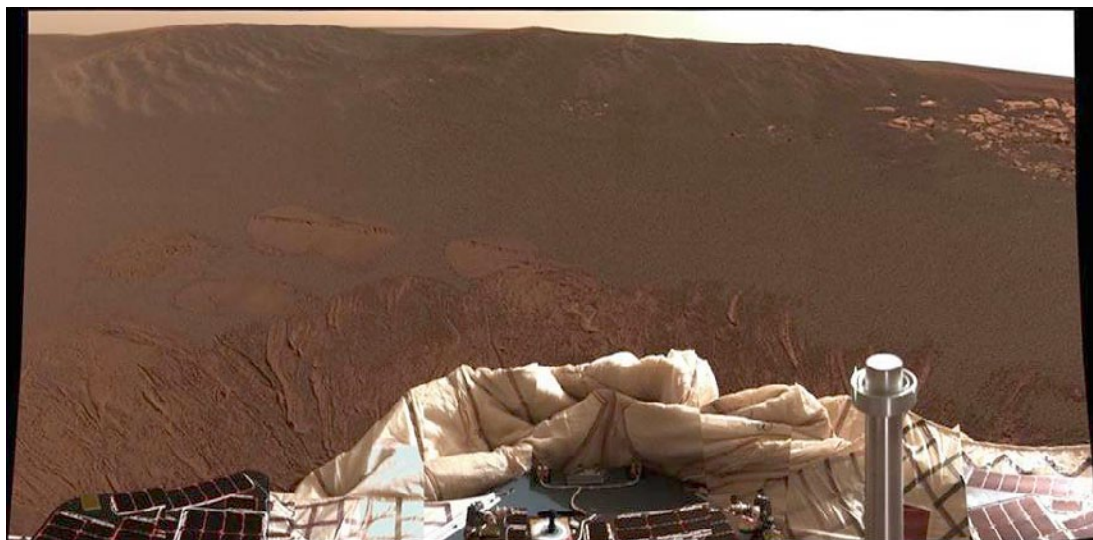


Fig. 6. Vista Pan-Cam del lugar de amartizaje del MER Opportunity en Meridiani Planum, cráter Eagle, con importantes formaciones de óxidos de hierro (NASA).

observaciones radioastronómicas desde la Tierra. La determinación de la vida media del metano de la atmósfera de Marte ha resultado ser mucho menor de lo esperado y además aparece concentrado en áreas específicas de la superficie del planeta en las que se ha determinado una mayor concentración de vapor de agua por el espectrómetro SPICAM del orbitador de la misión europea Mars Express. Todo ello sugiere que el metano se está liberando continuamente a la atmósfera de Marte. En la Tierra, más del 80% del metano atmosférico es producido por arqueas metanogénicas. Obviamente eso no demuestra que el metano marciano sea un signo de vida porque puede producirse por actividad geológica. Una posible respuesta nos la podrá dar el análisis de la composición isotópica del metano marciano. La próxima misión que amartizará en agosto, la Mars Science Laboratory (MSL), dispone de la instrumentación necesaria para medir el fraccionamiento isotópico del carbono en el metano marciano con el fin de intentar aclarar el origen de este gas.

¿Son los datos que están llegando de Marte compatibles con la existencia pasada o presente de vida en el planeta rojo? La mejor manera de responder a esta pregunta sería traer muestras de zonas seleccionadas por sus características a la Tierra para un análisis en profundidad, lo que no es previsible que suceda hasta la próxima década. Mucho mejor sería explorar el planeta con una misión tripulada, la cual aunque está en la lista de futuras misiones deberá aguardar a la solución de problemas tecnológicos y, sobre todo, de seguridad debido a la larga duración de las misiones y a la prolongada exposición de los astronautas a la radiación. Mientras tanto, la pregunta puede responderse de manera indirecta mediante el estudio de análogos terrestres que nos permitan evaluar la posibilidad de existencia de vida en condiciones marcianas y que además nos sirvan de modelo para probar y seleccionar la instrumentación de futuras misiones de exploración del planeta rojo. Hasta hace relativamente poco, los mejores análogos terrestres del planeta

Marte correspondían a las regiones polares, debido a las bajas temperaturas que se dan en la superficie del planeta. Pero recientemente dos nuevos modelos se han incorporado al estudio de análogos terrestres de Marte: el hidrotermalismo submarino y los ambientes ácidos. En este contexto puede ser interesante analizar las características que posee Río Tinto y que le han hecho merecedor del estatus de análogo geoquímico de Marte (Amils et al., 2007). Si Río Tinto es el río del hierro, Marte es el planeta del hierro, lo cual es fácil de apreciar por el color rojo característico del hierro oxidado presente en ambos sistemas. Pero el descubrimiento por los rovers de la misión MER de minerales de hierro, tales como jarosita o goethita, ambos formados en un ambiente acuoso ácido, esta última precursora de hematites, y que se encuentran generosamente esparcidos en amplias y distantes zonas de la superficie de Marte, así como la presencia de cantidades masivas de sulfatos de hierro ocultos bajo el polvo rojo que cubre la superficie del planeta, han hermanado de manera mucho más profunda, si cabe, Río Tinto con Marte. El reciente descubrimiento de metano en la atmósfera de Marte encaja perfectamente con las características detectadas en Río Tinto (Sanz et al., 2011). Obviamente esto no demuestra que haya vida en Marte, ni siquiera que de existir o haber existido tuviera que ser parecida a la detectada en Río Tinto. Existen importantes diferencias entre ambos sistemas, siendo las más significativas la baja temperatura actual de la superficie de Marte y la baja presión atmosférica, lo que dificulta la existencia de agua líquida. Pero está claro que la geomicrobiología de Río Tinto permite pensar en que un ecosistema basado en el ciclo del hierro habría podido tener éxito en el planeta rojo, especialmente en la época en la que existieron importantes cantidades de agua en su superficie. Río Tinto como análogo de Marte nos permite explorar esta posibilidad al mismo tiempo que hace posible probar las metodologías y tecnologías que se están desarrollando para futuras misiones que busquen señales de vida, pasada o presente, en Mar-



te. El hecho de que los minerales que se forman en Río Tinto, análogos a los detectados en Marte, sean producto de la actividad biológica, añade un nuevo argumento a su estatus de análogo terrestre del planeta rojo (Fernández-Remolar et al., 2005). Tanto la identificación de los microorganismos responsables de generar las características peculiares del río, la mayoría miembros conspicuos del ciclo del hierro, como la caracterización de los minerales producto de dicha actividad biológica, algunos de ellos como ya hemos mencionado recientemente identificados en Marte, han generado un inusitado interés científico por la cuenca del Río Tinto. La comunidad astrobiológica internacional ha dado un importante respaldo a la investigación que se está desarrollando en la Faja Pirítica Ibérica. Por todo ello, en el año 2005, la Junta de Andalucía declaró el cauce de Río Tinto "Paisaje Natural Protegido". Es decir, que ha pasado de ser un río sin vida por culpa de la contaminación minera, con planes millonarios de remediación, a considerarse una joya de la naturaleza que hay que preservar y cuidar para el disfrute de futuras generaciones. Este interés por la singularidad de la cuenca del Tinto ha generado la reciente solicitud del estatus de Geoparque, una figura de protección que concede la Unesco, y está gestándose en estos momentos la petición de declaración de Patrimonio de la Humanidad, y todo eso gracias a la actividad metabólica de los microorganismos capaces de extraer la energía almacenada en los sulfuros metálicos de la Faja Pirítica Ibérica. Mientras tanto, en el subsuelo de la Faja Pirítica, los microorganismos continúan disolviendo los sulfuros metálicos, originados en el pasado geológico por una intensa actividad hidrotermal submarina, manteniendo las características que hacen singular al río Tinto, el color rojo de sus aguas.

BIBLIOGRAFÍA

- Almodóvar G. R., Sáez R. (2004). Los sulfuros masivos de la Faja Pirítica Ibérica. *Geología de España*. Ed. J.A. Vera, SGE – IGME, Madrid, 207-209.
- Amaral-Zettler, L., Gómez, F., Zettler, E., Keenan, B. G., Amils, R., Sogin, M. L. (2002). Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire. *Nature*, 417-137.
- Amaral-Zettler, L., Zettler, E. R., Theroux, S. M., Palacios, C., Aguilera, A., Amils, R. (2011). Microbial community structure across the tree of life in the extreme Río Tinto. *ISME J.*, 5, 42-50.
- Amils, R., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., González-Toril, E., Rodríguez, N., Briones, C., Prieto-Ballesteros, O., Sanz, J. L., Díaz, E., Stevens, T. O., Stoker, C. And The Marte Team (2008). Subsurface geomicrobiology of the Iberian Pyritic Belt. *Microbiology of Extreme Soils* (Eds.: Dion, P. y Nautiyal, C. S.). Springer, 205-223.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Aguilera, A., Rodríguez, N., Malki, M., García-Moyano, A., González-Fairén, A., De La Fuente, V., Sanz, J.

- L. (2007). Extreme environments as Mars terrestrial analogs: the Río Tinto case. *Planetary and Space Science*, 55, 370-381.
- Amils, R., Gonzalez-Toril, E., Aguilera, A., Rodríguez, N., Fernandez-Remolar, D., Gomez, F., Garcia-Moyano, A., Malki, M., Oggerin, M., Sanchez-Andrea, I, Sanz, J.L. (2011). From Río Tinto to Mars: the terrestrial and extraterrestrial ecology of acidophiles. *Advances in Applied Microbiology* (Eds.: Laskin, A.I. y Sariaslani, S.), Elsevier, 77, 41-70.
- Amils, R. y Segura, J. (2010). *Río Tinto: Viaje a Marte*. 2ª edición. Ed. Alfar, Sevilla, 192 p.
- Brierley, C.L. and Brierley, J (1973). A chemoautotrophic and thermophilic microorganism isolated from an acid hot spring. *Can. J. Microbiol.*, 19, 183-188.
- Brock, T.D. (1995). The road to Yellowstone and beyond. *Ann. Rev. Microbiol.*, 49, 1-28.
- Colmer, A.R., Temple, K.L. and Hinkle, H.E. (1950). An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.*, 59, 317-328.
- Ehrlich, H. (2002). *Geomicrobiology*, 4th edition, Marcel Dekker, New York.
- Fairen, A. G., Fernández-Remolar, D., Dohm, J. M., Baker, V. R., Amils, R. (2004). Inhibition of carbonate synthesis in acidic oceans from Mars. *Nature*, 431, 423-426.
- Fernández-Remolar, D., Morris, R. V., Gruener, J. E., Amils, R., Knoll, A. H. (2005). The Río Tinto Basin, Spain: Mineralogy, Sedimentary Geobiology, and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum, Mars. *Earth Planet. Sci. Lett.*, 240, 149-167.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E. O., Amann, R., Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4853-4865.
- López-Archilla, A.I., Marín, I. and Amils, R. (2001). Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microbiol. Ecol.* 41, 20-35.
- López-Archilla, A. I., González, A. E., Terrón, M. C., Amils, R. (2005). Diversity and ecological relationships of the fungal populations of an acidic river of Southwestern Spain: the Tinto River. *Canadian J. Microbiol.*, 50, 923-934L
- Margulis L., Mazur, P., Barghoorn, E.S., Halvorson, H.O., Jukes, T.H., J. and Kaplan, I. R. (1979). The Viking Mission: implications for life in the Vallis Marineris area. *Science* 305, 78-81.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G., Schippers, A. (2001). Biochemistry of bacterial leaching. Direct vs indirect bioleaching. *Hydrometall.* 59, 159-175.
- Sanz, J.L., Rodríguez, N., Diaz, E., Amils, R. (2011). Methanogenesis in the sediments of Río Tinto, an extreme acidic environment. *Environ Microbiol.*, 13-8, 2336-2341.
- Woese, C.R. and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77, 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (1990). Toward a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria and eukarya. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 87, 4576-4579. ■

Este artículo fue solicitado desde E.C.T. el día 11 de marzo de 2012 y aceptado definitivamente para su publicación el 31 de mayo de 2012.