

Funcionamiento acoplado de los ciclos biogeoquímicos en la biosfera oscura

RICARDO AMILS^{1,2} EN NOMBRE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN IPBSL^{1,2}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, campus Cantoblanco, 28049 Madrid y
²Centro de Astrobiología (INTA-CSIC), ctra Ajalvir km 5, 28850 Torrejón de Ardoz.

✉ ramils@cbm.csic.es



Figura 1. Parte del equipo transdisciplinar que ha trabajado en el proyecto IPBSL.

La geomicrobiología del subsuelo profundo intenta entender el funcionamiento de la denominada biosfera oscura (vida en ausencia de radiación), una nueva frontera del conocimiento. Los ecosistemas subterráneos son también de interés astrobiológico ya que permiten generar modelos de posibles escenarios para el origen de la vida en la Tierra y para evaluar su posible existencia en otros sistemas planetarios. Aunque Darwin predijo la existencia de

vida en el subsuelo han tenido que transcurrir 200 años para que se publicara el primer trabajo describiendo la diversidad microbiana asociada a la matriz rocosa de una perforación de 2,000 metros de profundidad en China (Zhang *et al.*, 2005).

La actividad microbiana es fundamental para el adecuado funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos de los que depende la vida en nuestro planeta. La geomicrobio-

logía del subsuelo continental es esencial para entender la importancia de los ciclos biogeoquímicos a escala local y planetaria. Evaluaciones recientes estiman que la mayor parte de la biomasa y diversidad procarionótica se encuentra en el subsuelo (Magnarosco *et al.*, 2018). Desafortunadamente la mayor parte de la información sobre el subsuelo continental se ha obtenido a partir de pozos artesianos (Stevens y McKinley, 1995), con sus limitaciones intrínsecas, ya



Figura 2. La torre de perforación, un elemento esencial para el estudio de la geomicrobiología del subsuelo profundo.

que los mismos carecen de información sobre el contexto geológico de la compleja matriz mineral sólida a la que los microorganismos identificados están asociados, lo cual es fundamental para entender el funcionamiento del ecosistema (Escudero y Amils 2022). Para generar información sobre la abundancia, diversidad, así como el funcionamiento del microbioma subterráneo se requieren perforaciones dedicadas con el fin de generar muestras a partir de testigos obtenidos en condiciones controladas sobre las que aplicar distintas metodologías complementarias.

La Faja Pirítica Ibérica (FPI), extendiéndose a lo largo de 250 kms en el suroeste de la Península Ibérica, posee la mayor concentración de sulfuros metálicos conocidos en el planeta (Tornos, 2006). Se formó a partir del hidrotermalismo submarino que tuvo lugar durante la orogenia Hercínica (380-280 millones de años). Río Tinto es un río de 92 kms de longitud que nace en Peña de Hierro, en el corazón de la FPI, desembocando en el Océano Atlántico en Huelva. Río Tinto es un inusual ambiente extremo debido a su acidez (pH 2.3) y a su elevada concentración de metales pesados, lo cual no impide la existencia de un importante nivel de diversidad microbiana, fundamentalmente eucariótica (Amaral-Zettler *et al.*, 2002). Tradicionalmente se ha considerado que las condiciones extremas existentes en el cauce del Tinto son debidas a la actividad minera existente en la zona desde hace 5000 años, pero estudios geofísicos, hidrológicos y geológicos recientes sugieren que el subsuelo de la FPI actúa como un enorme bio-reactor en la que los sulfuros metálicos son la fuente de energía y los productos metabólicos vierten al cauce del Tinto (Gómez-Ortiz *et al.*, 2014).

Las pocas perforaciones continentales realizadas para obtener testigos del subsuelo, 8 en total, han reportado resultados de biodiversidad a partir de muestras muy distantes entre sí, y en general utilizando una única metodología (secuenciación del gen 16S rRNA), información insuficiente para describir el funcionamiento de los ciclos biogeoquímicos operando en el ecosistema. Con el fin de resolver estas limitaciones en el proyecto Advance ERC "Iberian Pyrite Belt Subsurface Life Detec-

tion" (IPBSL), se han obtenido a lo largo de una perforación dedicada de 613 metros muestras mayoritariamente a distancias menores de 20 metros y se han utilizado distintas metodologías de análisis de diversidad (secuenciación, clonaje, inmunología, hibridación, cultivos de enriquecimiento y aislamiento), además de su correspondiente caracterización geoquímica. Siendo la contaminación el problema endémico de la geomicrobiología del subsuelo, en este proyecto se ha utilizado NaBr como marcador en el imprescindible fluido de perforación, con el fin de identificar las muestras que han estado en contacto con dicho fluido, y por lo tanto susceptibles de estar contaminadas. A pesar de que la extracción de ácidos nucleicos de muestras de roca es extremadamente difícil, se ha conseguido obtener suficiente ADN de 16 muestras de testigos de distinta profundidad. Amplicones de dichas muestras se han analizado mediante hibridación, clonaje y secuenciación masiva. Un chip inmunológico con 300 anticuerpos, desarrollado por el Centro de Astrobiología para detectar señales de vida en Marte, ha permitido identificar la presencia de distintos microorganismos y sus productos metabólicos. Diferentes cultivos de enriquecimiento han permitido demostrar la existencia de actividades microbianas relacionadas con los ciclos del Fe y del S, la presencia de actividades metanogénicas, metanotróficas, acetogénicas y desnitrificantes. Los microorganismos presentes en los cultivos más activos se han identificado por secuenciación y se han podido aislar 28 bacterias, las cuales están siendo caracterizadas y la secuenciación de sus genomas utilizados para anotar la presencia de genes de interés. El conjunto de metodologías utilizadas ha permitido identificar la presencia de 670 microorganismos a lo largo de los 20 intervalos analizados, mostrando un inesperado nivel de diversidad procariótica en el interior de la matriz rocosa existente en el subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica.

Con el fin de resolver el problema ampliamente debatido sobre la contaminación en muestras del subsuelo, y con el fin de identificar los géneros más representativos del subsuelo de la Faja Pirítica hemos seleccionado los que han sido identifica-

dos por al menos dos técnicas basadas en principios diferentes y en cinco intervalos de profundidad de los 20 monitoreados. Este análisis ha permitido seleccionar los 16 géneros que cumplen con este requisito, la mayoría anteriormente reportados en análisis de diversidad del subsuelo continental. De estos géneros disponemos de 9 aislados con su genoma secuenciado. La anotación de los genes correspondientes ha permitido demostrar el funcionamiento acoplado de los ciclos del C, H, N, S y Fe en el subsuelo de la FPI a distintas profundidades en ausencia de radiación en la llamada biosfera oscura, favoreciendo la hipótesis de la existencia de un bio-reactor subterráneo responsable de las condiciones extremas características del Río Tinto. Es la primera vez que se reporta el funcionamiento del microbioma del subsuelo profundo continental a nivel de los ciclos biogeoquímicos que lo sostienen (Amils *et al.*, 2023).

La comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en 18 proyectos de perforación continental, muestran un elevado nivel de similitud a nivel de los filums identificados utilizando muestras de perforación en diferentes sustratos minerales, distintos continentes y profundidades, lo que sugiere que la biosfera oscura es a grandes rasgos universal. Un aspecto importante de este trabajo es su dimensión astrobiológica tanto desde un aspecto práctico para la preparación de una futura misión de búsqueda de vida en el subsuelo de Marte (habida cuenta de la imposibilidad de su existencia en la superficie debido a las condiciones existentes en la misma), como fundamental, considerando las implicaciones que este tipo de vida tiene en la necesaria ampliación del concepto clásico de zona de habitabilidad (HZ) que únicamente contempla la posibilidad de vida en planetas con agua líquida en su superficie, una situación a todas luces excesivamente restrictiva (Escudero y Amils, 2023)

Referencias

Zhang, G, Dong, H, Xu, Z, Zhao, D y Zhang, C (2005) Microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from

the Chinese Continental Drilling Project in China. *Appl Environ Microbiol* 71: 3213-3227.

Magnabosco C *et al.* (2018) The biomass and biodiversity of the continental subsurface. *Nature geoscience* 11:707-717.

Stevens T y McKinley J (1995) Lithoautotrophic microbial ecosystems in deep basalt aquifers. *Science* 270: 450-455.

Escudero C y Amils R (2022) Dark biosphere: just at the very tip of the iceberg. *Environ Microbiol* 25: 147-149.

Tornos F (2006) Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: the Iberian Pyrite Belt. *Ore Geology Rev* 28: 259-307.

Amaral-Zettler L, Gómez F, Zettler, E, Keenan BG, Amils R y Sogin M (2002) Eukaryotic diversity in Spain "river of fire". *Nature* 417: 137.

Gómez-Ortiz D *et al.* (2014) Identification of the subsurface sulfide bodies responsible for acidity in Río Tinto source water, Spain. *Earth Planet Sci Lett* 391: 36-42.

Amils R *et al.* (2023) Coupled C, H, N, S and Fe biogeochemical cycles operating in the continental deep subsurface of the Iberian Pyrite Belt. *Environ Microbiol* 25: 428-453.

Escudero C y Amils R (2023) Hard rock biosphere and habitability. *Frontiers Astronomy Space Sci* 10: 1203845.

.....