

Ecología microbiana de sustratos líticos

Carmen Ascaso

Resumen

El estudio de cada nicho litobiótico requiere una caracterización precisa de los componentes biológicos y minerales del microhábitat en orden a comprender la biocomplejidad de los microecosistemas tanto epilíticos como endolíticos. La Ecología Microbiana de los sustratos líticos tiene importantes campos de aplicación en disciplinas tan diferentes como la Astrobiología o el estudio del biodeterioro del Patrimonio Histórico Monumental. Esta rama de la Ciencia abarca desde el estudio de la microbiota en el interior de cualquier material pétreo aparentemente inerte en el planeta Tierra, a la investigación de materiales rocosos, fundamentalmente meteoritos, procedente del Cosmos en orden a conocer si alguna vez hubo vida fuera de nuestro Planeta. La Ecología Microbiana de sustratos líticos aplicada al estudio de la piedra monumental, contribuirá en el futuro a que se hagan con precisión los diagnósticos sobre el efecto de los microorganismos en ella y a la evaluación de la eficacia de los tratamientos aplicados. En estudios de ecología de los microecosistemas epilíticos y sobre todo endolíticos, hay que tener en cuenta las restricciones para investigar el microambiente en cuanto a radiación lumínica, temperatura, humedad, etc. y a la vez hay que tratar de analizar el entorno químico en nanoescala. El estudio de cada nicho litobiótico debe ser llevado a cabo *in situ*, es decir sin disturbar el sistema y requiere la capacidad de cuantificar el número y tipo de microorganismos presentes en un microhábitat determinado y de caracterizar con precisión los minerales constituyentes del mismo. Debido a esta problemática, las técnicas de microscopía láser confocal y microscopía electrónica se han revelado como las más adecuadas.

Palabras clave: Astrobiología, biodeterioro, biomarcador, biomobilización, biomineralización, fósil de microorganismo, microscopía láser confocal, microscopía electrónica de barrido en modo de electrones retrodispersados, microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas, nicho ecológico, litobiótico.

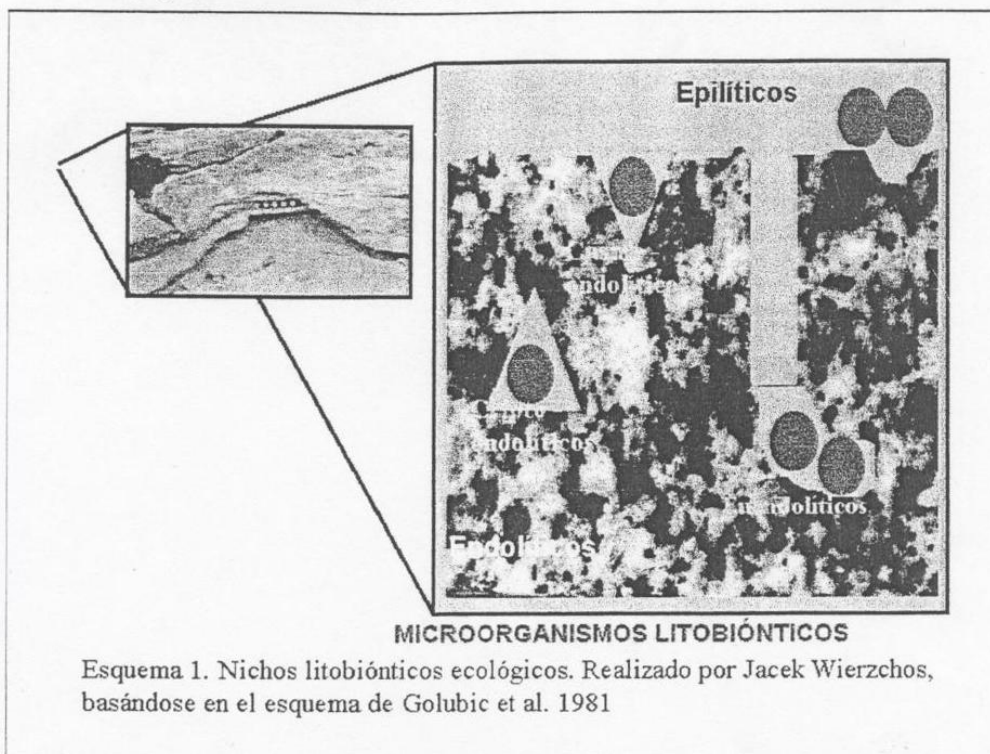
Introducción

Recientemente ha sido descrito el término biocomplejidad que es el estudio de los ecosistemas al más alto nivel. Brock (1987), definió la Ecología Microbiana como el estudio de los microorganismos

en su ambiente natural y propuso que el investigador debe estudiar los microorganismos *in situ*. Interpretamos esta expresión como *sin disturbar el microhábitat epilítico o endolítico*. Tanto en el estudio de un ecosistema, como de un microecosistema lítico que se desarrolla únicamente en el rango de cientos de micras cúbicas, hay que conocer los componentes del mismo y entender los procesos dinámicos existentes entre ellos.

El estudio de los microorganismos situados sobre o dentro de las rocas ocupando diferentes nichos litobióticos (Golubic et al. 1981) presenta enormes dificultades y requiere una caracterización precisa de los componentes biológicos y minerales. Para Golubic los nichos litobióticos son epilíticos, si el microorganismo se encuentra sobre la roca y endolíticos, si el microorganismo vive dentro de la misma. Los nichos litobióticos endolíticos se clasifican en casmoendolíticos, criptoendolíticos y euendolíticos (Esquema 1).

Hace algunos años ha empezado a ser empleada la palabra *biofilm* o biopelícula para definir interfaces entre microorganismos y minerales. Los *biofilms* líticos están compuestos de microorganismos, minerales, sustancias poliméricas extracelulares (EPS), cationes multivalentes y compuestos biogénicos e inorgánicos. Llegado este punto hay que aclarar que los líquenes se consideran dentro de los organismos formadores de *biofilms*, ya que un talo líquénico es algo macroscópico pero esta compuesto de microorganismos: el fotobionte (alga o cianobacteria) y el micobionte (hongo). En este trabajo nos referiremos tanto a microorganismos que forman parte de talos líquénicos epilíticos y endolíticos, como a microorganismos de vida libre que ocupan los nichos ecológicos litobióticos descritos por Golubic et al. (1981). Además las observaciones *in situ* marcarán la pauta de este estudio, ya que según afirma del Prof J.W. Schopf, eminente micropaleontólogo en su libro *La cuna de la vida*, la regla de oro en Física Cuántica es la teoría primero y la experimentación después, pero en Ciencias de la Vida las observaciones normalmente marcan el camino y las teorías sólo valen los hechos sobre los que se asientan. En Ciencias de la Vida se obtienen resultados planteando experimentos u observando. La experimentación en los microhábitats líticos tiene enormes restricciones y es de la observación de donde deben extraerse los datos que soporten las teorías.



El estudio de la ecología microbiana de los sustratos líticos reviste interés en primer lugar como conocimiento de la biocomplejidad y biodiversidad de los microecosistemas litobióticos, pero también tiene importantes campos de aplicación entre las que caben destacar las investigaciones en Astrobiología y los estudios en biodeterioro y biodegradación.

Astrobiología

Se consideran investigaciones dentro del campo de la Astrobiología aquellos trabajos llevados a cabo con microorganismos que habitan en condiciones extremas para la vida. La comunidad microbiana criptoendolítica de las rocas antárticas es un ejemplo de supervivencia en un ambiente extremadamente frío y seco. Es muy necesario contar con la experiencia y las metodologías de investigación necesarias para tratar de descubrir si en dichas rocas existen microorganismos vivos, fosilizados o por lo menos hay presencia de biomarcadores. Dentro del campo de la Astrobiología están comprendidos los estudios dirigidos a la búsqueda de vida en Marte, y otros cuerpos del espacio exterior de los que únicamente disponemos de fragmentos de rocas que han llegado a la Tierra como meteoritos (a excepción de la Luna en cuyo caso se dispone de muestras lunares recogidas por el hombre).

Aunque no puede descartarse la hipótesis de que nunca haya habido vida microbiana fuera de la

Tierra, no debe olvidarse que en los primeros años de la segunda década de este siglo, es posible que una misión espacial con retorno desde Marte, nos proporcione material para investigar si alguna vez el Planeta Rojo albergó vida. Toda la metodología que se haya puesto a punto y toda la experiencia que se haya adquirido en Ecología Microbiana de sustratos líticos terrestres, podrá ser de gran utilidad para dar respuesta a ese enigma ya que nos proporcionará la capacidad para identificar dentro de las rocas marcianas, fósiles microbianos o biomarcadores.

Los primeros estudios en Ecología Microbiana de los Valles Secos del desierto Ross (Antártida) (Mapa) tienen sus comienzos en el año 1976 cuando E.I. Friedmann y R. Ocampo anunciaron por vez primera, que el interior de las rocas areniscas (*Beacon Sandstone*) está colonizado por la cianobacteria *Gloeocapsa* (Friedmann y Ocampo, 1976). La región denominada Valles Secos está en la parte sur de *Victoria Land* (*McMurdo Dry Valleys*; 76°30' - 78°30'S, 160° - 164°E) con amplias áreas libres de nieve y de hielo. Este nombre se aplica a una área de unos 4.800 km² conocida como uno de los desiertos más extremos en el mundo, siendo mucho más seco y frío que otros lugares de la Antártida. Las condiciones climáticas están representadas por la temperatura promedio anual de -20° C y por precipitaciones de 6 cm en forma de nieve durante el invierno austral. Curiosamente en 1976 un prototipo de la nave Viking que iba a ser enviado a Marte en

búsqueda de vida en ese planeta, fue probado en esa zona de la Antártida. Sorprendentemente las copias de las naves Viking no fueron capaces de encontrar vida dentro de las rocas (comunicación personal de E.I. Friedmann). En Diciembre de 2001, el Prof. Ricardo Guerrero, catedrático de Microbiología de la Universidad de Barcelona, en un debate al que también asistía el Prof. Joan Oro, el Prof. Casanova (Universidad Politécnica de Cataluña) y el Dr. Wierczos (Universidad de Lleida), volvía a hacer hincapié en la incapacidad de prototipos semejantes a la Viking para encontrar vida microbiana en zonas de la Antártida donde realmente hay muchos microorganismos. Quizás fue por el fracaso de la Viking en encontrar vida microbiana en la Antártida y en Marte, que el descubrimiento de Friedmann y Ocampo-Friedmann (1976) llamó mucha la atención de investigadores de la NASA, que empezaron a considerar los Valles Secos de la Antártida como un lugar idóneo para todo tipo de estudios referentes a Ecología Microbiana de ambientes *extremos*.

Desde 1976 varios tipos de microorganismos endolíticos tales como: bacterias y cianobacterias, algas, hongos, y microorganismos simbioses de protoliquenes y líquenes, han sido caracterizados tras extraerlos y separarlos del microhábitat epilítico o endolítico de las rocas Antárticas (ver referencias en Wierczos y Ascaso 2001). Friedmann además de extraer y caracterizar algunos de los microorganismos realizó estudios del contenido de agua en areniscas colonizadas por microorganismos endolíticos y observo que el agua forma un 0.1-0.2 % del peso de las rocas (Friedmann, 1980). Parece ser que esta mínima cantidad es suficiente para mantener una atmósfera bastante saturada en el sistema de poros microscópicos de las rocas de los desiertos fríos. El grado de humedad de la roca parece afectar al pH, a la formación de manchas primarias de hierro y a la distribución de las comunidades microbianas. Se conoce bien que los líquenes evitan la continua presencia de agua líquida además de ser capaces de utilizar vapor de agua atmosférico. Sin embargo, las cianobacterias, incluso las formas de desierto, requieren aunque sea esporádicamente una atmósfera saturada o agua líquida. Dentro de la biosfera Antártica el hábitat criptoendolítico es un sistema altamente inestable ya que esta sometido a los continuos procesos de congelaciones y descongelaciones e hidrataciones y deshidrataciones. El coste metabólico de vivir en un ambiente altamente inestable es muy alto, lo que se refleja en que un sutil cambio desfavorable en este equilibrio, trae como consecuencia la extinción de la vida en su totalidad (Friedmann y Weed, 1987). Tras la extinción se pueden buscar fósiles y biomarcadores, que hablan de la vida y la biodiversidad preexistentes. Por esa razón estos estudios también contribuyen a la

investigación del cambio climático, debido a la influencia del clima en los microecosistemas.

Por haberse tenido en cuenta las peculiares características del ecosistema microbiano criptoendolítico de la Antártida y sus posibles vías de extinción se ha sugerido este ecosistema como el mejor modelo terrestre para los últimos estadios de la vida en la historia de Marte, cuando la superficie de ese Planeta se enfrió mucho, y la atmósfera y el agua líquida desaparecieron (McKay et al., 1992; McKay, 1993). Las comunidades microbianas criptoendolíticas en las rocas porosas de los Valles Secos son ejemplos de este escenario. Nuestro grupo ha conseguido en los últimos años experiencia en la búsqueda de vida o huellas de vida en las rocas antárticas (Ascaso, 2000; Wierczos y Ascaso, 2001, Wierczos et al., 2001, De los Rios, et al. 2001, Wierczos et al., 2002, Wierczos y Ascaso, 2002; Ascaso y Wierczos 2002 a y b).

Así pues, como ya se ha indicado, los estudios de Ecología Microbiana de los ambientes extremos líticos Antárticos pueden encontrar su aplicación en problemas tan aparentemente lejanos como es la cuestión de si existió o existe vida en Marte. Y a la inversa, si un día se llegan a encontrar restos de microorganismos fosilizados en Marte o biomarcadores, la comparación de los resultados con fósiles de microorganismos terrestres, puede soportar teorías alternativas sobre el origen de la vida en la Tierra. Hay que destacar, que en los últimos años se ha demostrado un creciente interés en las investigaciones astrobiológicas (búsqueda de huellas de vida en el sistema solar) por parte de las agencias espaciales europeas (ESA – proyecto “Mars Express”) y estadounidenses (NASA – varias expediciones robotizadas a Marte). Una de estas misiones prevista para el año 2011 tiene como objetivo recoger las muestras del *regolít* marciano y traerlas a la Tierra. Es extremadamente importante que hasta esas fechas la comunidad científica puede observar y comprender el funcionamiento de los microhábitat endolíticos para de acuerdo con Conrad y Neilson (2001), cuando podamos reconocer la vida y nunca equivocarnos con la identificación de huellas de la actividad microbiana en nuestro ambiente terrestre, estar preparados para movernos hacia el exterior de nuestro Planeta, en busca de huellas de vida.

Biodeterioro

Cuando se investiga el biodeterioro y la biodegradación hay que considerar que las piedras usadas como materiales de construcción en edificios históricos y monumentos, están frecuentemente colonizadas por comunidades de microorganismos litobionticos, entre los que se incluyen tanto bacterias como cianobacterias, algas, hongos y los

microorganismos formadores de los talos liquénicos (los simbioses). Los líquenes son un grupo de organismos que son especialmente importantes en un rango de problemas que tienen que ver con los esfuerzos que actualmente se están haciendo para la protección de los monumentos. La mayor parte de la investigación sobre los efectos producidos por los talos liquénicos sobre los monumentos han sido llevadas a cabo con estudios taxonómicos donde la presencia del talo liquénico se ha relacionado con factores ecológicos (Nimis et al. 1992). Tanto los talos liquénicos como los microorganismos de vida libre forman *biofilms* o biopelículas sobre la superficie de las piedras monumentales. El comprender las complejas interacciones existentes entre estos litobiontes y su sustrato mineral es de gran interés y conduce a la determinación de la tasa de bioalteración en monumentos construidos en piedra. Esto claro está, siempre que estos estudios se hagan siguiendo las estrictas reglas de la ecología microbiana en sustratos líticos, es decir llevando a cabo observaciones *in situ* de los fenómenos que tienen lugar, ya sea de interrelación entre microorganismos como de interacción de los microorganismos con el componente mineral del sustrato. Este conocimiento detallado permite una elección más apropiada de los métodos de conservación del monumento y de las estrategias de erradicación de los microorganismos, cuando dichas estrategias son necesarias.

Ariño et al., (1995) han indicado en el caso de un pavimento romano, el papel protector de los líquenes frente a un ambiente agresivo. Sin embargo uno de los primeros estudios aplicando microscopía óptica a monumentos de piedra, proporcionó hace ya dos décadas, evidencias de que los líquenes causan alteraciones significativas en el sustrato rocoso (Bech-Andersen, 1983). Una de las razones que ha originado esta controversia es que existen ciertas dificultades para demostrar la evidencia de la alteración que produce el *biofilm* microbiano sobre el sustrato lítico.

Tradicionalmente los componentes biológicos presentes en el sustrato mineral han sido investigados por técnicas microbiológicas y una de las más importantes ha sido la identificación de los microorganismos tras el cultivo de los mismos en placa *petri*. Esta técnica microbiológica ha sido cuestionada por Amann et al., (1995) debido a que existen en el sustrato rocoso muchos microorganismos que no pueden ser aislados y cultivados. Son los microorganismos que se han denominado *viables pero no cultivables*. Es por esta razón que recientemente han sido usadas técnicas de Biología Molecular para hacer la taxonomía de los microorganismos que componen el *biofilm* sobre monumentos o pinturas (Rolleke et al., 1996; Rolleke et al., 1998). El único inconveniente de dicha

taxonomía molecular es que se lleva a cabo sobre microorganismos previamente extraídos de su ambiente natural. Por otra parte en 1996 Koestler y Salvadori planteaban problemas derivados de la evaluación de la eficacia de los biocidas, cuando dicha evaluación se lleva a cabo sobre cultivos y es por ello que recientemente se han usado técnicas de fluorescencia, tales como las medidas de pérdida de clorofila en la capa algal para conocer *in situ* la eficacia de biocidas.

Sin embargo tanto las tan extendidas técnicas de cultivo en placa, como las técnicas moleculares y las de fluorescencia, no pueden explicar las características morfológicas y estructurales de los componentes biológicos (muertos o vivos) de los *biofilms* o biopelículas, no permiten tampoco comprender las características morfológicas y geofísico-químicas de los minerales alterados, y su grado de bioalteración y tampoco permiten comprender sobre qué tipo de microorganismos de aquellos que están inmersos en el sustrato lítico, actúan con más eficacia los diferentes biocidas. De la misma forma que cuando hablamos de Ecología Microbiana de microorganismos litobiónicos antárticos y teniendo de nuevo en cuenta las recomendaciones de Brock (1987), la atención de los estudiosos del biodeterioro debe ser focalizada en investigaciones *in situ* de la microbiota de la piedra monumental.

¿Cómo estudiar los microhábitat litobiónicos?

Desde el punto de vista de la ecología de los microorganismos epilíticos y sobre todo endolíticos, hay que tener en cuenta que el microambiente que los rodea puede diferir mucho del macroambiente, y también el análisis químico de dicho microambiente es de gran importancia. El estudio de cada nicho ecológico litobiónico requiere asimismo la habilidad de cuantificar el número y tipo de microorganismos presentes en un microhábitat y la caracterización precisa de los minerales constituyentes del mismo en orden a comprender la estructura y función. Por todo ello el estudio de estos microhábitats debe hacerse sin disturbarlos y esto requiere siempre el uso del microscopio.

Teniendo en cuenta la experiencia acumulada hasta ahora se recomienda la aplicación de las siguientes técnicas: A) Microscopía óptica y microscopía láser confocal (CLSM). B) Microscopía electrónica de barrido en modo de electrones retrodispersados (SEM-BSE), y equipada con sistema de microanálisis por energía dispersiva de Rayos X (EDS). C) Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LTSEM). En ciertos casos es posible aplicar Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Técnicas

Miroscopia láser confocal. CLSM

Las buenas prestaciones de la *Miroscopia láser confocal* (CLSM) para observar microorganismos litobióticos en imágenes tridimensionales (De los Ríos et al., 1999), sugiere claramente su idoneidad para estudios de Ecología Microbiana en sustratos líticos. La estructura y distribución de la microbiota constituyente de la comunidad litobiótica y las relaciones entre sus componentes, puede ser examinada usando fluorocromos, entre ellos tinciones *live-dead* y pruebas de fluorescencia natural. Además, se pueden obtener estimaciones del número de microorganismos que ocupan un volumen determinado de sustrato lítico. La CLSM podrá también permitir en el futuro identificar por FISH diferentes grupos de microorganismos localizados dentro de las rocas. Hasta el momento, dentro del campo de las técnicas moleculares han sido llevadas a cabo ampliaciones directas por PCR de regiones ITS de r DNA de un hongo endolítico y los resultados han sido comparados con el micobionte de un talo líquénico situado epilíticamente (De los Ríos, Ascaso y Grube, Lichenologist. Enviado).

Miroscopia electrónica de barrido trabajando en modo de electrones retrodispersados. SEM-BSE (EDS).

El método que abreviadamente llamamos SEM-BSE consiste fundamentalmente en dos fases. La primera corresponde al procedimiento de preparación de la muestra y combina la fijación en glutaraldehído con una postfijación en tetróxido de osmio y la preparación de bloques de resina finamente pulidos que son recubiertos finalmente con carbón. (Wierzchos y Ascaso, 1994). El segundo paso implica la observación de las superficies pulidas y cubiertas con carbón, en el microscopio electrónico de barrido usando el detector de electrones retrodispersados (BSE). La señal BSE es fuertemente dependiente del número atómico medio del objeto bombardeado por los electrones. Así la técnica SEM-BSE permite la identificación de elementos ultraestructurales de los componentes biológicos, a la vez que la perfecta observación de los componentes inorgánicos del microhábitat, entre ellos los minerales que rodean a los microorganismos (Ascaso y Wierzchos, 1994; Ascaso y Wierzchos, 1995; Sanders et al., 1994). La energía dispersiva por microanálisis de Rayos X (EDS) permite la caracterización química (conocer los elementos a nivel cualitativo y cuantitativo, y la obtención de imágenes de distribución espacial de elementos) de los componentes minerales (Wierzchos y Ascaso, 1996; Wierzchos y Ascaso, 1998).

Miroscopia electrónica de barrido a bajas temperaturas. LTSEM

La descripción morfológica externa proporcionada por SEM-SE ya sea trabajando en alto vacío o por *Environmental Electron Scanning Microscopy* (ESEM), generalmente no proporciona los suficientes elementos de juicio al investigador para discernir entre los diversos microorganismos que pueden ser encontrados en un poro o en una fisura. Es por esta razón por lo que se puso a punto la técnica SEM-BSE descrita en el apartado B.

Cuando además se desea conocer el aspecto de los microorganismos hidratados y la localización del agua en el microhábitat, el trabajar a temperatura ambiente y en vacío impide la visualización tanto del agua y como del hielo en el microhábitat. Sin embargo es obvio que es importante conocer y observar la localización del agua, un componente muy importante del microhábitat (con frecuencia en forma de hielo en la Antártida), para comprender los procesos ecológicos.

Por esta razón el uso de la microscopia de barrido a bajas temperaturas (LTSEM) ofrece muchas ventajas, ya que causa la rápida y completa inmovilización de las células en su estado original hidratado. Además algunas de las células criofijadas son fracturadas al azar y esto permite observar sus elementos ultraestructurales (De los Ríos et al., 1999). La LTSEM permite también observar la estructura de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en estado hidratado (Ascaso et al. 2002) y determinar la presencia de agua (o en su caso hielo) tanto en los componentes biológicos como en los inorgánicos (Ascaso, and Souza-Egipsy, 2002. Biblioteca Lichenologica. Enviado).

¿Qué aspectos de la ecología de los microorganismos litobióticos es posible investigar?

-Organización de los microorganismos dentro del sustrato lítico, número de microorganismos por unidad de volumen de roca e identificación de los mismos

En las rocas areniscas del Bacon Valley de la Antártida (ver mapa), algas y hongos forman acúmulos dentro de los poros (flecha), que podríamos denominar protoliquenes y existe una intercomunicación entre los citados protoliquenes que se hace a través de hifas de hongos (punta de flecha) (figura 1). En esta figura obtenida por CLSM se ven espacios negros (asterisco) que corresponden a los lugares donde están situados los granos de cuarzo. Esto indica que los protoliquenes ocupan los poros y

que la interconexión entre ellos se hace con hifas que aprovechan el estrecho espacio existente entre granos de cuarzo adyacentes. En el caso de rocas graníticas antárticas, algas (flecha) y hongos forman también acúmulos dentro de las fisuras (figura 2) según muestra la CLSM. La figura 3 muestra por microscopía de barrido el aspecto y la organización de algas (flechas blancas) y hongos (punta de flecha) dentro de una fisura similar a la mostrada en figura 2. La caracterización de estas algas y hongos *in situ* ha sido posible gracias a la caracterización morfológica y sobre todo al reconocimiento de los elementos ultraestructurales de su citoplasma.

Las estimaciones sobre número de microorganismos fotosintéticos por unidad de volumen en rocas graníticas de la zona de Granite Harbour, indican que existen hasta 10^5 algas/mm³ de fisura (De los Rios, Wierzchos and Ascaso. Applied Environmental Microbiology. Enviado). Tanto la estimación del número de microorganismos por unidad de volumen de poro o fisura, como el conocimiento de si pertenecen a un grupo de microorganismos con capacidad fotosintética, tales como algas y cianobacterias o no, van a permitir interpretar mucho más correctamente los resultados de intercambio gaseoso, obtenidos sobre la superficie de las rocas antárticas, por diferentes investigadores.

En el caso de rocas carbonáticas como las que hemos investigado al estudiar el biodeterioro en diversos monumentos, los microorganismos dependiendo de su naturaleza se encuentran organizados de muy diversas formas. En el caso de los paramentos del Monasterio de los Jerónimos de Lisboa, las cianobacterias se encuentran organizadas de forma aislada cuando están a 100 micras de la superficie de la piedra (asteriscos), en unos espacios que presentan la misma forma que la de las células englobadas en ellos (flechas), lo que indica que están produciendo una bioalteración química (figura 4) y horadando microtúneles. Se trata de verdaderos microorganismos euendolíticos. Las algas de algunos talos liquénicos (flechas) de los citados paramentos, quedan atrapadas entre minerales microdivididos (asteriscos), manteniendo en cierta manera la organización en forma de capa algal (figura 5). Se puede afirmar que el cortex superior queda localizado epiliticamente, mientras que la capa algal aprovecha una fisura paralela a la superficie para situarse en dicho lugar, permitiendo así a los fotobiontes recibir suficiente cantidad de luz.

En resumen se puede decir que las imágenes permiten conocer la organización de los microorganismos en el interior del microhábitat y la posición de los mismos en la roca, mostrando cómo la posición real tiene que ver con la captación de los recursos luminicos.

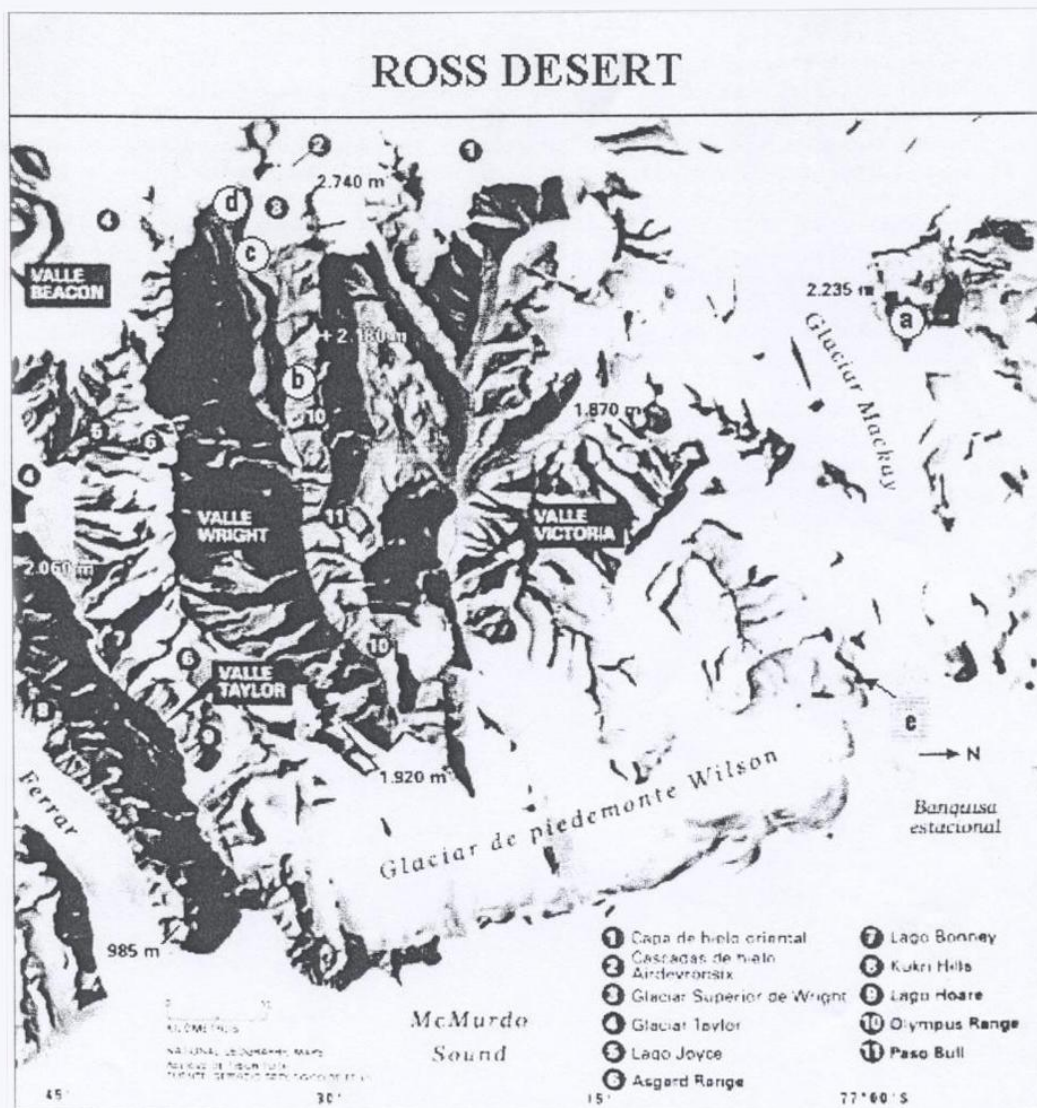
-Localización del agua en los componentes del microecosistema.

Las relaciones hídricas en el talo liquénico están necesariamente ligadas al microhábitat del líquen y a sus características morfológicas y anatómicas. Estas características capacitan al talo para explotar diferentes fuentes de agua (Nash, 1996). Sin embargo cuando el microorganismo endolítico es un simbiote de un talo liquénico, o un alga de vida libre, cianobacteria u hongo de vida endolítica, es únicamente el microhábitat el que juega el papel fundamental en la estrategia hídrica. El agua en forma líquida, de vapor o en forma de hielo es un elemento esencial y puede ser un componente del sustrato mineral, ya que el agua en formas variadas puede quedar atrapada entre las partículas minerales.

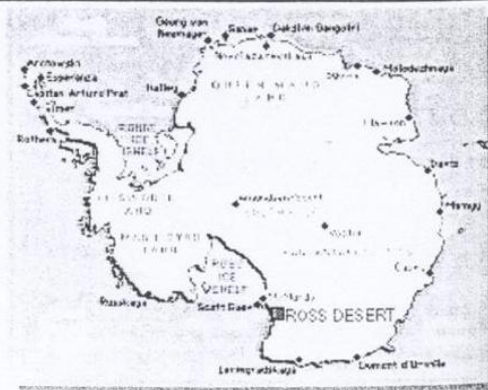
En la Antártida se observan con frecuencia micas con una importante bioalteración en sus láminas (flecha) por efecto de los microorganismos (Figura 6). Se ha observado que dicha bioalteración favorece el almacenamiento de agua entre las láminas de micas, aspecto este que es bien observado si se utiliza la técnica LTSEM (Figura 7). Una ampliación de la citada figura (figura 8) nos muestra cristales de hielo visibles entre las laminas de mica (flechas). Cristales de hielo son también observables sobre las hifas endolíticas fracturadas (flechas) (Figura 9). Estas imágenes muestran que las células fúngicas mantienen cierta cantidad de agua, incluso en condiciones de stress hídrico y que la mica que esta junto a las hifas puede actuar como un reservorio de agua, contribuyendo así a la resistencia al stress de agua inducido por condiciones climáticas adversas

La observación de la matriz polimérica (asteriscos) por LTSEM en torno a las cianobacterias (flechas) presentes en la piedra del Monasterio de los Jerónimos, muestra la importancia que esta matriz (EPS) tiene en los procesos de hidratación-deshidratación de las mismas, ya que actúa como reservorio de agua (figura 10).

Las imágenes presentadas en este apartado demuestran que determinados minerales situados en el microhábitat pueden actuar como reservorios de agua y también que el hecho de que los microorganismos estén o no rodeados de importantes matrices de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) está directamente relacionado con la captación y aprovechamiento de los recursos hídricos. Hay que destacar que aunque los polisacáridos sean cuantitativamente la parte más importante de estos exopolímeros, las proteínas también forman parte de ellos y que los EPS pueden ser hidrofílicos o hidrofóbicos, aunque la mayoría son hidrofílicos y es por esta razón por la que se les asigna un papel importante contra la desecación.



- (a) Battelship Promontorty
- (b) Linnaeus Terrace
- (c) Tyrol Valley
- (d) Mt. Fleming
- e Granite Harbour



-Relación de los microorganismos con el ambiente lítico.

Los microorganismos ejercen una importante acción sobre los minerales que les rodean dentro de la roca. Como consecuencia de dicha acción tienen lugar fenómenos de alteración mecánica y química. Estos fenómenos dejan huellas en los minerales, ya que se producen efectos de alteración mecánica como por ejemplo apertura de las laminas de mica (flecha) (Figura 11) por hongos situados junto a acúmulos de algas (asteriscos) o fenómenos de alteración química como por ejemplo la pérdida de potasio de las láminas de mica (Wierzchos y Ascaso, 1996). Ambos efectos combinados llevan con frecuencia a la transformación de unos minerales en otros, por ejemplo se ha observado la transformación de biotita en biotita vermiculita (Wierzchos y Ascaso, 1998). Los citados fenómenos dan lugar a la biomobilización de elementos con consecuencias de diversa índole para los minerales adyacentes, como la transformación a vermiculita que acabamos de citar, o la simple microdivisión de los minerales (ver cabeza flechas en figura 12) que se encuentran situados entre las hifas (flechas) o la ondulación de los extremos de las micas (Ascaso y Wierzchos, 2002 b). Todas estas improntas o huellas que dejan los microorganismos sobre los minerales, pueden servir como marcadores de actividad biológica, cuando los microorganismos desaparezcán (biomarcadores).

Parte de los elementos biomobilizados de los minerales quedan libres en el microhábitat siendo accesibles para los microorganismos. Otra parte importante de elementos sufre un proceso de biomineralización quedando en el microhábitat cristalizados. En la Antártida es característica la presencia de calcio en el medio y en torno a los microorganismos en forma de oxalato cálcico. En la figura 13 pueden apreciarse hifas de hongos cortadas transversalmente y rodeadas de cristales de oxalato (flechas) y zonas donde ha desaparecido la célula fúngica y se mantienen las biomineralizaciones. En zonas próximas (figura 14) pueden apreciarse biomineralizaciones de sílice (flecha), en lugares donde hay presencia de hifas fúngicas (punta de flecha). Dichos acúmulos de sílice se han producido en torno a grupos de hifas que finalmente desaparecen dejando huecos en los lugares de su presencia previa. Estas imágenes muestran como las biomineralizaciones jugarán el papel de biomarcadores cuando los microorganismos desaparezcán. Alrededor de hifas criptoendolíticas antárticas también se ha observado presencia de depósitos biogénicos compuestos por nanocristales de hidróxido de hierro (Wierzchos et al. 2002).

El papel de los biomarcadores es de gran importancia en Ecología Microbiana de sustratos líticos, en geomicrobiología y sobre todo en Astrobiología. Cuando la vida microbiana desaparece en su totalidad, como resultado de un desequilibrio entre los factores geológicos y/o climáticos, inmediatamente surge la pregunta: ¿Cómo podemos saber, si dentro de una roca hubo vida o no? Desde el punto de vista de los futuros estudios del material procedente del *regolith* marciano es muy probable que esta sea la pregunta más relevante. Hasta el momento nuestro equipo ha encontrado cadenas de magnetita en el interior del meteorito ALH84001 procedente de Marte. Dichas cadenas podrían ser biomarcadores (Friedmann et al. 2001). En las muestras que serán recogidas en el futuro en Marte y traídas a la Tierra para ser investigadas, sería muy interesante encontrar otros biomarcadores, o mejor aún fósiles de microorganismos.

Llegado este punto es muy necesario hacer una distinción clara entre un fósil y un biomarcador. Así como un macrofósil se determina como tal, por unas características morfológicas externas e internas que recuerdan a las del organismo vivo, aunque no sean idénticas, entendemos que lo mismo es esperable en el reconocimiento de un microfósil de un microorganismo. La figura 15 muestra claramente una célula algal fosilizada, es decir mineralizada (flecha). Algunas de las estructuras que existían en la célula en su estado vivo, son todavía reconocibles como sucede con algunas membranas tilacoidales. En la figura 16 también pueden reconocerse contornos de células algales (puntas de flecha) que presenta un gran brillo en su periferia y que revela por EDS la presencia abundante de hierro. Algunas de dichas células se han rellenado completamente de titanio en el proceso de fosilización (asterisco). Sin embargo, otra cosa distinta son los biomarcadores. En el párrafo anterior se ha hablado de algunos biomarcadores, que son las huellas dejadas por los microorganismos cuando estos estuvieron vivos constituyendo así evidencias de que un lugar determinado existió actividad biológica. Algunos biomarcadores como los oxalatos de calcio o los depósitos de sílice son quizás relativamente fáciles de estudiar e investigar. Pero a veces nos encontramos con estructuras no muy definidas como ha sido el caso de estructuras en forma de horquilla con alto contenido en hierro y que no recuerdan estructuralmente a células bacterianas. En principio era difícil saber si uno se encontraba o no frente a un biomarcador. En la figura 17 se ven bacterias (flechas) y en la parte de abajo a la izquierda estructuras de composición conocida (óxidos de hierro) (marcadas con punta de flechas) pero de procedencia desconocida. Como no recuerdan a células de microorganismos no puede decirse que sean fósiles de microorganismos. Ha podido ser

demostrado finalmente que en realidad son células bacterianas que han sufrido un proceso de transformación total hasta quedar de ellas únicamente un contorno altamente rico en hierro (Wierzchos et al. 2002). La flecha vacía de contorno blanco en la figura 18 marca la célula bacteriana viva y la flecha negra muestra la estructura en forma de horquilla formada por el colapsamiento de la célula bacteriana. Dicha estructura en forma de horquilla es por tanto un biomarcador con alto contenido en hierro. El haber observado en lugares endolíticos como los de las figuras 17 y 18, toda la secuencia entre la célula bacteriana y estas estructuras ahorquilladas, nos permite definir a estas últimas como biomarcadores y hará posible reconocerlos en el futuro en lugares donde las bacterias completas hayan desaparecido.

Conclusiones

Cuando se investiga la microbiota en sustrato líticos, el primer aspecto que llama la atención es la complejidad existente sobre todo en los nichos ecológicos endolíticos. Es destacable la disposición espacial en el microhábitat de los microorganismos fotosintéticos para captar los recursos luminicos y el elevado número de microorganismos que con frecuencia habitan en un reducido volumen de la roca. En poros y fisuras de rocas procedentes de los Valles Secos Antárticos y de Granite Harbour, se hace difícil dilucidar en el entorno de los protoliquenes criptoendolíticos, qué hongos están asociados con las algas y cuales son hifas de hongos de vida libre, pero se puede concluir que son las hifas de los hongos las que constituyen el mejor reservorio de agua en momentos de stress hídrico. Parte del agua procede posiblemente de minerales laminares, que los hongos han alterado previamente con procesos biogeofísicos y biogeoquímicos, originando que sus espacios interlaminares se abran y es esto lo que les proporciona capacidad para retener agua. Se puede afirmar que son los hongos los que, presumiblemente en unión con bacterias, producen los más importantes fenómenos de alteración mecánica y química sobre los minerales circundantes, produciendo importantes fenómenos de biomobilización de elementos. Como consecuencia fundamentalmente de una alteración de minerales laminares, minerales diagénicos ricos en hierro en forma de nanocristales de hidróxido de hierro se localizan alrededor de las hifas fúngicas y de las bacterias, y este fenómeno de formación de bandas de hidróxido de hierro, se llega a observar hasta a nivel macroscópico en areniscas antárticas. Es también en torno a los hongos donde se aprecian otros importantes fenómenos de biomineralización, ya sea en forma de cristales de oxalato cálcico o en forma de depósitos de sílice.

En el caso de rocas carbonáticas, la cianobacterias juegan un importante papel en la alteración del sustrato, ya que se comportan como microorganismos euendolíticos. Los polisacáridos extracelulares (EPS) tienen un efecto antidesecante en las propias cianobacterias, pero a la vez al provocar fenómenos de hinchamiento dan lugar a presiones mecánicas que disgregan la roca y también a alteraciones químicas de la misma al servir los EPS de lugares de nucleación para la formación de minerales.

Como una conclusión más se puede afirmar que todas las biomineralizaciones pueden actuar como excelentes biomarcadores. Esto unido al hecho de que hay microorganismos que tienen el tiempo y las condiciones ambientales adecuadas para fosilizarse, y que hay importantes detalles ultraestructurales que son preservados en la mineralización, conduce a la conclusión que este debe ser el más importante criterio de biogenicidad. Todo ello permite deducir que ha comenzado con paso firme el desarrollo de estrategias de investigación para localizar e identificar signos de vida fuera del planeta Tierra, ya sea en forma fósiles de microorganismos o en forma de biomarcadores.

Agradecimientos

Esta ponencia es parte del trabajo de investigación en Ecología Microbiana de sustratos líticos, llevado a cabo por el grupo de Liqueología y Geomicrobiología del CCMA en el que se encuentran integradas las Doctoras Asunción de los Ríos y Virginia Souza-Egipsy. Con el grupo se encuentra colaborando muy estrechamente el Dr. Wierzchos del Servicio de Microscopía de la Universidad de Lleida. Parte de las muestras investigadas de rocas areniscas de la Antártida fueron cedidas por el Dr. Imre Friedmann y las muestras de Granite Harbour fueron recolectadas por el Dr. Leopoldo García Sancho. La autora agradece la labor realizada por el técnico del Servicio de Microscopía Electrónica del CCMA, D. Fernando Pinto, así como la labor de apoyo de Dña. Teresa Carnota. Este trabajo ha sido posible gracias a varios proyectos financiados por el PGC, el más reciente el BOS2000-1121 y también por el Plan Nacional, Proyecto ANT99-0680-C02-02.

Referencias

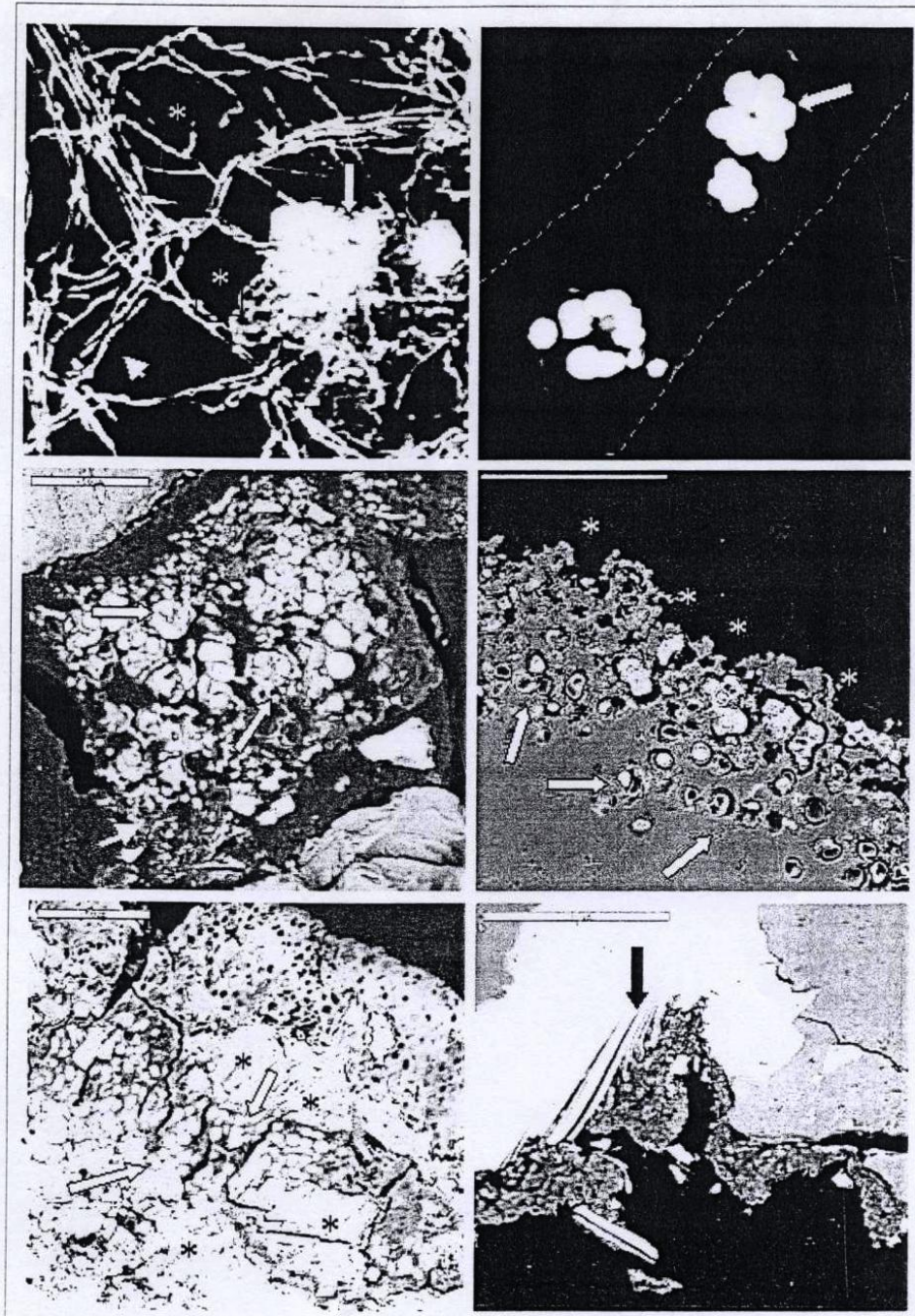
- Amman, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Ariño, X., Ortega-Calvo, J.J., Gomez-Bolea, A. and Saiz-Jimenez, C. 1995. Lichen colonization of the Roman Pavement at Baelo Claudia (Cádiz, Spain): biodeterioration vs. bioprotection. *The Science of the Total Environment* 167:353-363.

- Ascaso, C. and Wierzbos, J. 1994. Study of substrate weathering produced by lichen activity using back-scattered electron imaging. *Botanica Acta* 107:187-270.
- Ascaso, C. and Wierzbos, J. 1995. Study of the biodeterioration zone between the lichen thallus and substrate. *Cryptogamic Botany* 5: 270-281.
- Ascaso, C. 2000. Lichens on rock substrates: observation of biomineralization processes. En: B. Schroeter, M. Schliensog, T. G. A. Green, editores. *New Aspects in Cryptogamic Research. Contribution in Honour of Ludger Kappen. J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin - Stuttgart*, pp 127-135.
- Ascaso, C. and Souza-Egipsy, V. 2002. Locating water in the dehydrated thallus of lichen from extreme microhabitats (Antarctica). *Bibliotheca Lichenologica (Solicitado para el Homenaje al Prof Benno Feige. Enviado)*.
- Ascaso, C. and Wierzbos, J. 2002a. The search for biomarkers and microbial fossils in Antarctic rock microhabitats. *Geomicrob J* (In press).
- Ascaso, C. and Wierzbos, J. 2002b. New approach to the study of Antarctic lithobiontic microorganisms and their inorganic traces: applications in the detection of life in Martian rocks. *Intern Microbiol.* (In press).
- Ascaso, C., Wierzbos, J., Souza-Egipsy, V., De los Rios, A., and Delgado-Rodríguez, J. 2002. *In situ* evaluation of the biodeteriorating actino of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jerónimos Monastery (Lisbon). *International Biodeterioration and Biodegradation* (In press).
- Bech-Andersen, J.C.P. 1983. Studies of lichen growth and deterioration of rocks and building materials using optical methods. *Biodeterioration* 5:568-572.
- Brock, T.D. 1987. The study of the microorganisms *in situ*: progress and problems. pp 1-17. En: M. Fletcher, T. R. G. Gray, and J. G. Jones, editores. *Ecology of Microbial Communities. Society for General Microbiology. Cambridge*.
- Conrad, P.G. and Nealson, K.H. 2001. A non-Earthcentric approach to life detection. *Astrobiology* 1:15-24.
- De los Ríos, A., Ascaso, C., Grube, M. 2002. Ultrastructural, anatomical and molecular study of the lichenicolous lichen species *Rimularia insularis* and its interface with the substrate. *Lichenologist* (enviado)
- De los Ríos, A., Wierzbos, J., Sancho, L.G. and Ascaso, C. 2001. Combination of different microscopy techniques for the integrated study of extremophile endolithic microorganisms and their habitats. *Proceedings of the First European Workshop. ESA Publications Division*.
- De los Ríos, A., Ascaso, C. and Wierzbos, J. 1999. Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *International Microbiology* 2:251-257.
- De los Ríos, A., Wierzbos, J. and Ascaso, C. Acid microenvironments in microbial biofilms of Antarctic endolithic microecosystems. *Applied Environmental Microbiology* (enviado)
- Friedmann, E.I. 1980. Endolithic microbial life in hot and cold deserts. *Origins Life Evolution B* 10: 223-235.
- Friedmann, E.I. and Ocampo, R. 1976. Endolithic blue-green algae in the Dry Valleys: primary producers in the Antarctic desert ecosystem. *Science* 193:1247-1249.
- Friedmann, E.I. and Weed, R. 1987. Microbial trace-fossil formation, biogenous and abiotic weathering in the Antarctic cold desert. *Science* 236: 654-752.
- Friedmann, E.I., Wierzbos, J., Ascaso, C. and Winkhofer, M. 2001. Chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: evidence of biological origin. *PNAS* 98:2176-2181.
- Golubic, S.I., Friedmann, E.I. and Schneider, J. 1981. The lithobiontic ecological niche, with spatial reference to microorganisms. *J. Sedimentary Petrology* 51:475-478.
- Koestler, R.J. and Salvadori, O. 1996. Methods of evaluating biocides for the conservation of porous building materials. *Science and Technology for Cultural Heritage* 5: 63-68.
- McKay, C.P. 1993. Relevance of Antarctic microbial ecosystems to exobiology. Pp. 593-601. En: E.I. Friedmann, editor. *Antarctic Microbiology. Wiley-Liss Inc. New York*.
- McKay, C.P., Friedmann, E. I., Wharton, R.A. and Davis, W.L. 1992. History of water on Mars: a biological perspective. *Advance Space Research*. 12:231-238.
- NASH III, T.H. 1996. Photosynthesis, respiration, productivity and growth. pp 88-120. En: T.H. Nash III, editores. *Lichen Biology. Cambridge. Cambridge University Press*
- Nimis, P.L., Pinna, D. and Salvadori, O. 1992. Lichen e conservazione dei monumenti. 164 pp. *Cooperativa Libreria Universitaria, Bologna*.
- Rolleke, S., Muyzer, G., Wawer, C., Wanner, G. and Lubitz, W. 1996. Identification of bacteria in a biodegraded wall painting by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 62 : 2059-2065.
- Rolleke, S., Witte, A., Wanner, G. and Lubitz, W. 1998. Medieval wall painting - an habitat for Archaea; identification of Archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval painting. *International Biodeterioration and Biodegradation* 41: 85-92.
- Sanders, W.B., Ascaso, C. and Wierzbos, J. 1994. Physical Interactions of two Rhizomorph-forming Lichens with their Rock Substrate. *Botanica Acta* 107: 432-439.
- Wierzbos, J. and Ascaso, C. 1994. Application of back-scattered electron imaging to the study of the lichen-rock interface. *J. Microscopy* 175: 54-59.
- Wierzbos, J. and Ascaso, C. 1996. Morphological and chemical features of bioweathered granitic biotite induced by lichen activity. *Clays and Clay Minerals* 44: 652-657.
- Wierzbos, J. and Ascaso, C. 1998. Mineralogical transformation of bioweathered granitic biotite studied by HRTEM: evidence for a new pathway in lichen activity. *Clays and Clay Minerals* 46:446-452.
- Wierzbos, J. and Ascaso, C. 2001. Life, decay and fossilisation of endolithic microorganisms from the Ross Desert, Antarctica: suggestions for *in situ* further research. *Polar Biology* 24: 863-868.
- Wierzbos, J. and Ascaso, C. 2002. Microbial fossil record of rocks from the Ross Desert, Antarctica: implications in the search for past life on Mars. *International J. Astrobiology* (In press).
- Wierzbos, J., de los Ríos, A., Sancho, L.G., Green, A. and Ascaso, C. 2001. Combination of different microscopy techniques for the integrated study of extremophile endolithic microorganisms and their habitats. *Proc. First Europ. Workshop on Exo-/ Astrobiology, 2001, ESA SP-496*, pp 405-408.
- Wierzbos, J., Ascaso, C., Sancho, L.G. and Green, A. 2002. Iron-rich diagenetic minerals are biomarkers of microbial activity in Antarctic rocks. *Geomicrobiology J.* (In press).

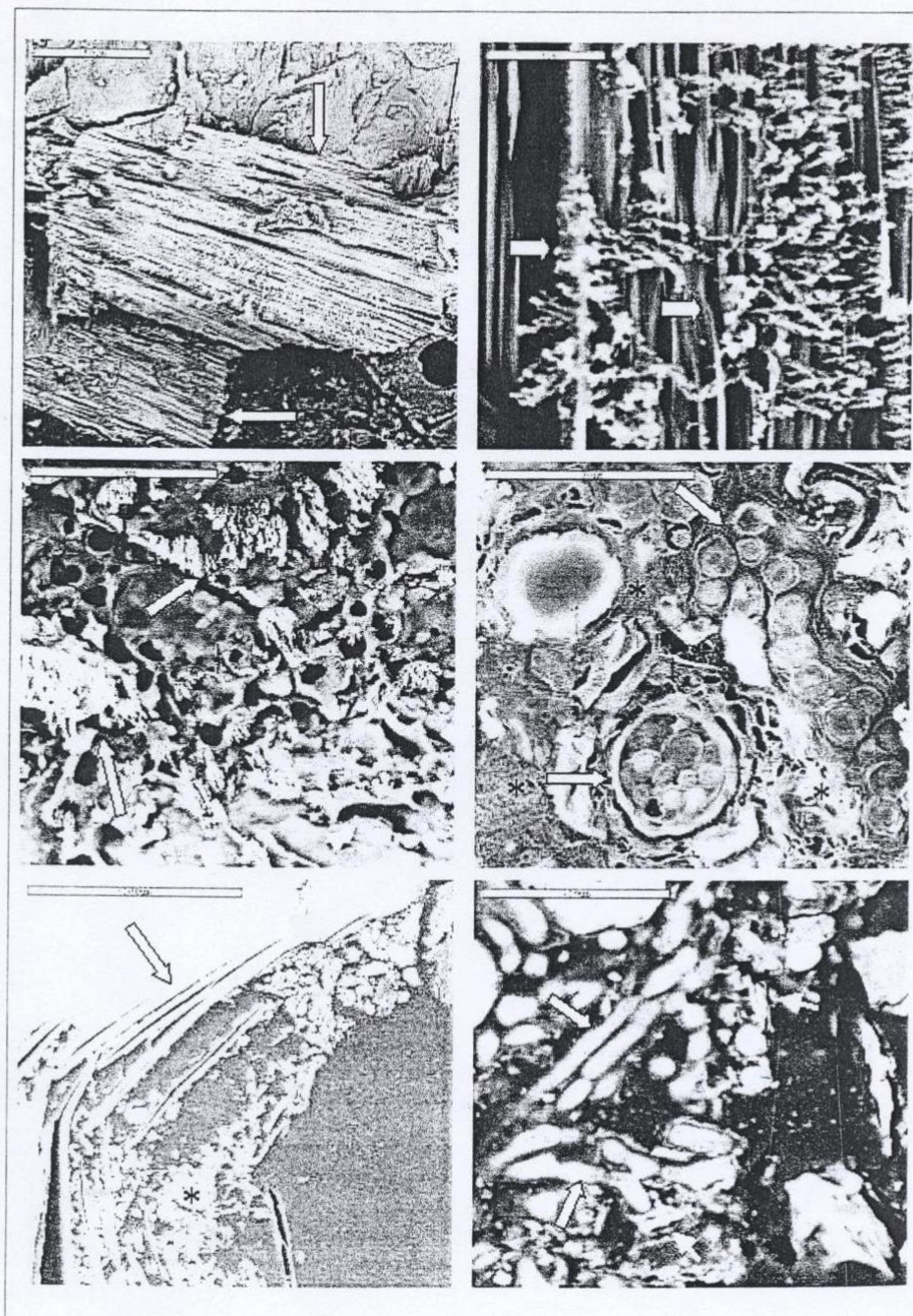
LEYENDA DE LAS FIGURAS 1-18
(Fotografías de las páginas siguientes)

- Figura 1. Protolíquenes ocupando los poros de la parte superficial de la arenisca del Bacon Valley (ver mapa), observados por Microscopía Laser Confocal (CLSM). La flecha blanca señala el protoliquen, las puntas de flecha indican haces de hifas que comunican el conjunto de algas y hongos del microhábitat que constituye un poro con los microhábitats vecinos. Los asteriscos indican las zonas ocupadas por los granos de cuarzo.
- Figura 2. Acúmulos de algas (flecha) situadas en el interior de una fisura de una roca granítica de Granite Harbour (ver mapa) observadas por CLSM.
- Figura 3. Protoliquen en el interior de una fisura semejante a la observada en la figura anterior. Conjuntos de algas e hifas son observadas (flechas) en el centro, mientras que en las parte inferior izquierda únicamente se observan hongos (punta de flecha). La observación por SEM-BSE permite ver y analizar los minerales que bordean la fisura.
- Figura 4. Bioalteración producida en la superficie de una roca calcárea de un paramento del Monasterio de los Jerónimos de Lisboa. Los asteriscos indican el límite entre la roca y la atmósfera circundante, y las flechas muestran la posición de los microorganismos (en esta caso cianobacterias) en el interior de la piedra. Se observa asimismo una importante disgregación del material pétreo. Imagen obtenida por SEM-BSE.
- Figura 5. Talo líquénico sobre un paramento del Monasterio de los Jerónimos. La capa algal (flechas) ha quedado atrapada entre minerales microdivididos (asteriscos). SEM-BSE.
- Figura 6. Roca granítica de Granite Harbour (Antártida) mostrando una importante bioalteración en las micas (flecha). SEM-BSE.
- Figura 7. La misma roca granítica que en la figura anterior, mostrando cómo las micas del microhábitat acumulan agua (flechas) en los espacios existentes entre las láminas. LTSEM.
- Figura 8. Detalle de la figura anterior. Las flechas muestran cristales de hielo entre las láminas de mica. LTSEM.
- Figura 9. Microorganismos (hongos) pertenecientes al microhábitat mostrado en la figura 7. El agua (visible aquí en forma de cristales de hielo: flechas), se acumula entre la pared y el plasmalema de los hongos. LTSEM.
- Figura 10. Imagen de cianobacterias (flechas) del paramento del Monasterio de los Jerónimos, mostrando la sustancia polimérica extracelular hidratada (asteriscos). LTSEM.
- Figura 11. Micas bioalteradas mecánicamente (flecha) por hongos del entorno de algas (asteriscos). Esta forma de bioalteración constituye un biomarcador. SEM-BSE.
- Figura 12. Restos de mica en forma de microfragmento (punta de flecha), junto a hifas (flechas) de un protoliquen criptoendolítico. Evidencias de microfragmentación y biomobilización. Biomarcador. SEM-BSE.
- Figura 13. Biomineralizaciones en torno a hifas endolíticas. Oxalato de calcio (flechas). SEM-BSE.
- Figura 14. Biomineralizaciones de sílice (flecha) alrededor de hifas que acaban desapareciendo del interior del biomineral formado. Las puntas de flecha indican hifas, no implicadas en el proceso de biomineralización. SEM-BSE.
- Figura 15. Fósiles de microorganismos endolíticos de Mount Fleming. La flecha indica un fósil de célula algal. SEM-BSE.
- Figura 16. Conjunto de células algales fosilizadas (flechas). Algunas de las células algales se fosilizan rellenándose por completo de titanio (asteriscos). SEM-BSE.
- Figura 17. Células bacterianas (flechas) que presentan en proximidad un acumulo de restos de naturaleza conocida por su contenido en hierro, pero de origen desconocido (puntas de flecha). SEM-BSE.
- Figura 18. Las estructuras ahorquilladas (flecha negra), son el resultado del colapsamiento de la células bacterianas (flecha blanca) que acumulan hierro en su pared y mueren. Fósil-biomarcador. SEM-BSE.

FIGURAS 1-6



FIGURAS 7-12



FIGURAS 13-18

