



PROYECTO
Touro

**ANEXO MEDIDAS EXPERIMENTALES
ASOCIADAS A LA ACTUALIZACIÓN DEL
PROYECTO MINERO DE TOURO:**

**“CREACIÓN DEL PRIMER PARQUE DE ESTUDIO DE
ORGANISMOS EXTREMÓFILOS, MODELIZACION
TERMODINAMICA DE AGUAS DE ALTERACION
GOSSANICA Y PROCESOS DE NEOFORMACION
MINERAL EN SISTEMAS HIPERACIDOS”**

Marzo de 2017

Autor: Felipe Macías Vázquez

ÍNDICE

1	MEDIDA EXPERIMENTAL PARA LA CREACIÓN DEL PRIMER PARQUE DE ESTUDIO DE ORGANISMOS EXTREMÓFILOS, MODELIZACIÓN TERMODINÁMICA DE AGUAS DE ALTERACIÓN GOSANICA Y PROCESOS DE NEOFORMACIÓN MINERAL EN SISTEMAS HIPERÁCIDOS.	3
2	EXTREMÓFILOS PRESENTES EN LOS PASIVOS MINEROS DE TOURO: COMUNIDADES DE ALGAS, PROTOZOOS BACTERIAS Y ARCHAEA EN LOS SEDIMENTOS Y SISTEMAS DE AGUAS HIPERÁCIDAS.	5
2.1	Las aguas hiperácidas y el origen de la vida.	8
1.1	Especies extremófilas identificadas	10
1.1.1	BACTERIAS HELICOIDALES.	10
1.1.2	PROTOZOOS.	11
1.1.2.1	Amebas de vida libre.	11
1.1.2.2	Heliozoos.	12
1.1.2.3	Flagelados: diflagelados reniformes.	13
1.1.3	ALGAS: DIATOMEAS	16
1.1.4	ROTÍFEROS: Philodina sp.	16
1.2	Bacterias y Archeobacterias en la mina de Touro. Estudios de diversidad por ADN .	18

1 MEDIDA EXPERIMENTAL PARA LA CREACIÓN DEL PRIMER PARQUE DE ESTUDIO DE ORGANISMOS EXTREMÓFILOS, MODELIZACION TERMODINAMICA DE AGUAS DE ALTERACION GOSSANICA Y PROCESOS DE NEOFORMACION MINERAL EN SISTEMAS HIPERACIDOS.

Según estudio de extremófilos (algas, protozoos y archa) presentes en los sedimentos y sistemas de aguas hiperácidas en los pasivos mineros de Touro, cuyos resultados se muestran en detalle en el siguiente apartado, Lucheta et al., concluyen que en la mina Touro hay una comunidad de bacterias y arqueobacterias extremófilas, diferentes a las estudiadas en el río Tinto y con un contenido más elevado de especies desconocidas para la ciencia. (> 80%) recomendando su estudio, tanto por su importancia para el origen de la vida, como por la biodiversidad de organismos y sistemas enzimáticos presentes que pueden tener importantes aplicaciones ambientales.

En el Congreso de Microbiología de Bral el trabajo reconocido por el premio Ernesto Hofer de la Sociedad Brasileira de Microbiología. Trabajos posteriores realizados por el Laboratorio de Tecnología Ambiental han demostrado que las comunidades de bacterias y arqueobacterias extremófilas de la mina Touro pueden realizar reacciones enzimáticas catalizando reacciones redox de elevado interés ambiental, tales como la destrucción de contaminantes orgánicos del tipo del lindano e hidrocarburos policíclicos.

El elevado interés de estas comunidades desconocidas para la ciencia, tanto a nivel del origen de la vida como por las posibilidades de aplicación de su capacidad enzimática, ha sido reconocido por investigadores de la USC y la de Sao Paulo, Universidad Complutense de Madrid, IGME, CIEMAT y el centro de Biología Molecular de la Universidad de Minho estando varias personas de estos centros muy interesados en colaborar en el estudio de estos sistemas y en mantener las condiciones de los mismos.

Por ello, se propone como medida experimental dentro del EsIA de la reapertura de la mina Touro la formación en el interior de la mina de un “parque de extremófilos”, próximo a las vías de acceso a la zona de Bama-Monte de las Minas, con la creación de varias balsas permanentes de superficie y condiciones similares a

la de la actual balsa roja, donde puedan ser estudiadas estas comunidades y sus mecanismos enzimáticos. Con especial énfasis en los procesos redox que pueden favorecer la destrucción de los contaminantes orgánicos persistentes, tales como lindano, dioxinas, furanos, PAH, TNT, organoclorados y organofosforados.

Las mismas balsas podrían ser utilizadas en el estudio de la modelización termodinámica de las aguas producidas en sistemas con oxidación de sulfuros (alteración gossanica), los procesos de neoformación de minerales secundarios y su evolución y los nuevos minerales formados en condiciones evaporíticas. Todo ello, con una capacidad de generación de una documentación importante, tanto para la comprensión de estos sistemas como para la elaboración de nuevas propuestas de bio y fitoremediación y de nuevas alternativas físico-químicas de tratamiento de aguas hiperácidas.

Por otra parte, cada una de las balsas creadas rebosaría hacia una inferior de condiciones diferentes, llegando en su fase final a una zona de tratamiento con humedales reactivos. Esto permitiría poder realizar el tratamiento de las aguas mejorando las calidades actuales a los ríos Portapego, Felisa y Rego das Rozas.

Esta comunidad y el parque de extremófilos constituiría un importante centro de estudios de estos sistemas susceptible de ser utilizado tanto en la formación, enseñanza, investigación y curiosidad científica.

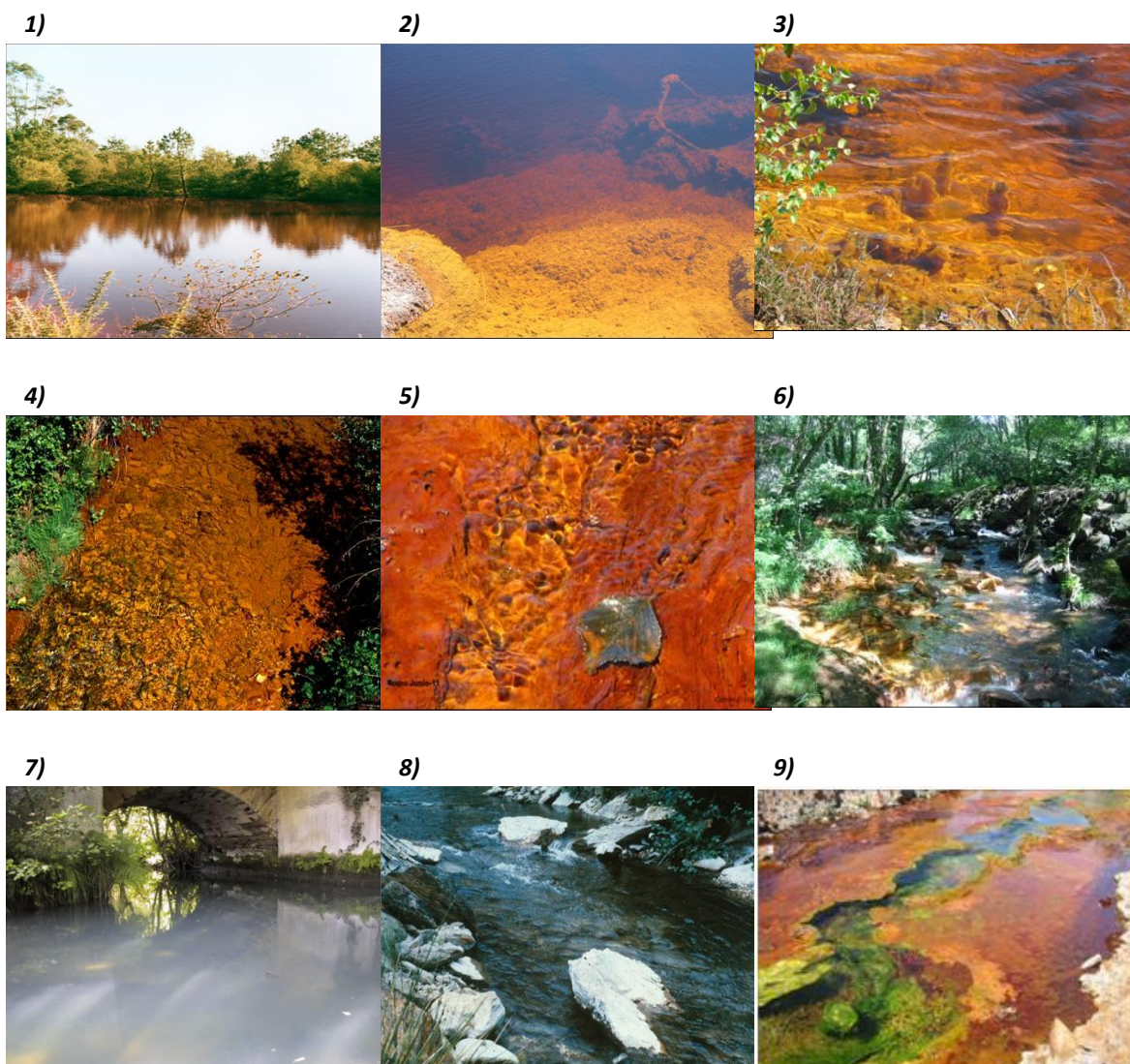
2 EXTREMÓFILOS PRESENTES EN LOS PASIVOS MINEROS DE TOURO: COMUNIDADES DE ALGAS, PROTOZOOS BACTERIAS Y ARCHAEA EN LOS SEDIMENTOS Y SISTEMAS DE AGUAS HIPERACIDAS.

Durante el proceso de extracción del Cu llevados a cabo en la mina de Touro durante los años 1970 y 1986 los residuos del proceso de beneficiación (flotación y separación de la calcopirita) se concentraron en una balsa de lodos que comprendía una superficie de 80 ha, alcanzando un espesor máximo de unos 80 metros de profundidad.

Mientras que en las cortas y en las escombreras los sulfuros comenzaron a oxidarse rápidamente, durante la fase de explotación en la balsa de lodos solo se produjo la oxidación de forma parcial (capas superficiales y capas profundas) tras el abandono del proceso de flotación y del aporte de álcalis. El proceso de infiltración y percolación del agua a través de estos lodos, con partículas inferiores a las 150 micras ricas en pirita y pirrotina provocó la generación de un drenaje ácido de mina (AMD), con un $\text{pH} < 3$, que sale de la balsa de flotación a través de sistemas fisurales y surgencias en su base y se acumulan en balsas en la base de la mina (Balsa roja) o son eliminados a través de los cursos de agua externos, como el Portapego, Rego das Rozas o Felisa (en el caso de la balsa de lodos) o del Brandelos y Pucheiras (en el caso de las aguas procedentes de cortas y escombreras). Todas ellas, son aguas hiperácidas ($\text{pH} < 3.5$), hiperoxidantes ($E_h > 600 \text{ mV}$) e hiperconductoras ($\text{CE} > 200 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Este tipo de aguas destruyen todos los minerales primarios o secundarios solubilizando sus elementos en forma de iones fácilmente movilizables y biodisponibles. Únicamente son estables algunas asociaciones de sulfatos e hidroxisulfatos de hierro y aluminio, con formación de precipitados, escasamente cristalinos de jarositas, schwermanitas, alunitas y jurbanitas, a las que cuando se producen condiciones evaporíticas se unen formaciones de sales evaporíticas de sulfatos de Ca (yeso), Mg (epsomita) y sales complejas con Mg, Fe II,... extremadamente solubles, que sufren procesos de deshidratación, hidratación y solubilización en las diferentes fases de los días cálidos, con formación de diferentes

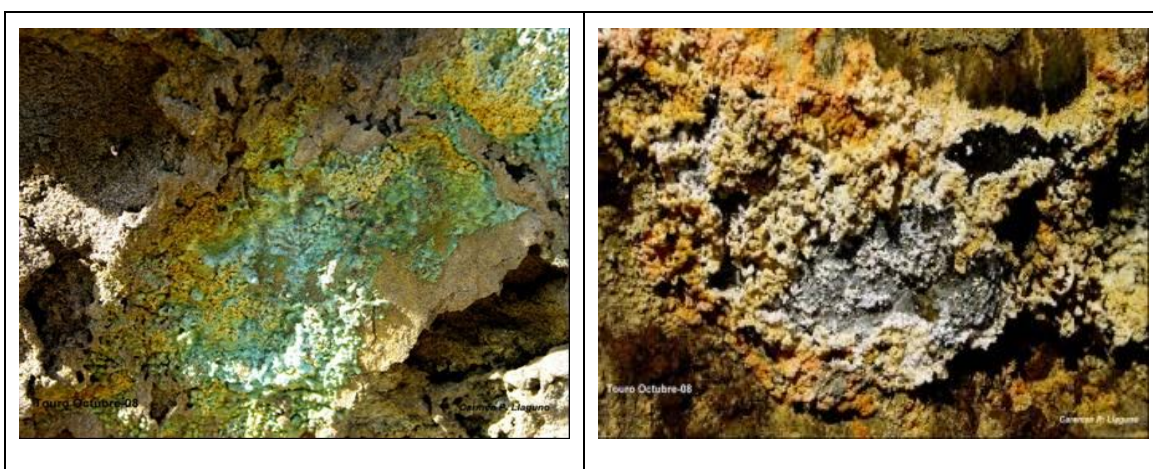
series minerales de sulfatos evaporíticos con contenido de agua de cristalización variable.



1.- Aspecto de la charca de Angumil de condiciones hiperácidas. Sus aguas tienen una coloración y composición próxima a la del río Tinto, pero con un menor contenido de elementos potencialmente tóxicos. 2000. **2.-** Precipitados ferruginososo (fundamentalmente jarositas) en el fondo de la charca de Angumil. 2000. **3.-** Precipitados de fondo en el Portapego. Fundamentalmente sulfatos (jarositas) e hidroxisulfatos (schwermanitas) que envuelven a restos orgánicos de algas y arqueobacterias. 2000. **4.-** Precipitados de fondo en el Felisa antes de su unión con el Pucheiras. Fundamentalmente jarositas y schwermanitas. 2000. **5.-** Precipitados de fondo en el Portapego. Sulfatos e hidróxidos de hierro (ferrihidritas) que posteriormente evolucionan a goethita por cristalización. 2010. **6.-** Contacto entre el Portapego y el Lañas. Precipitados de sulfatos e hidróxidos de hierro y acidificación de todo el curso del Lañas hasta el Ulla actualmente en vías de recuperación. 2006. **7.-** Aguas del Brandelos con Al hidroxilado polimérico. 1989. **8.-** Recubrimientos de precipitados de sulfatos e hidroxidos de Al y Ca en el Brandelos. 1989. **9.-** Formación de precipitados biogénicos de ferrihidrita en el Portapego. 2008.

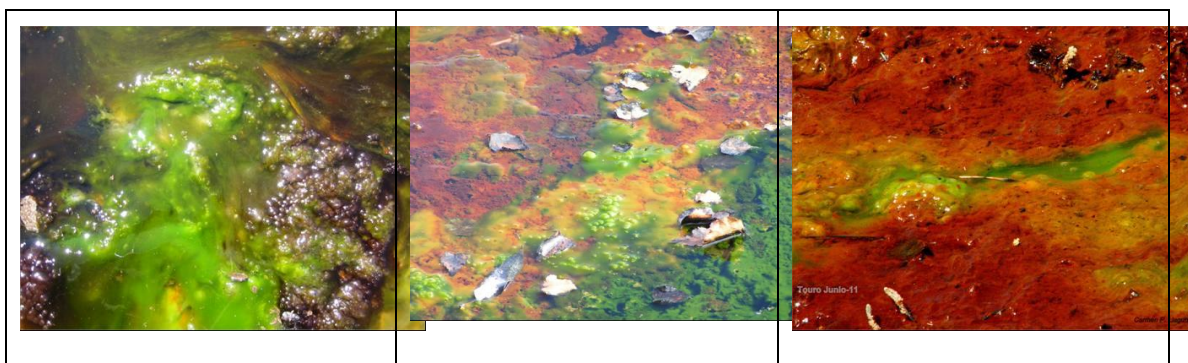
Los sulfatos estables en medios hiperácidos precipitan en el fondo de los cursos y aguas embalsadas y cuando el pH se eleva por dilución, con la lluvia o por aporte de aguas dulces, dan origen a precipitados de ferrihidrita y de microgibbsita que evolucionan posteriormente hacia la goethita y la gibbsita crisalinas.

La asociación de sulfatos, hidroxisulfatos e hidróxidos de Fe y Al (ferrihidritas) que adsorben metales, sulfatos y componentes orgánicos formando costras de estructura estromatolítica que funcionan como sistemas de pasivado natural y mitigación de la contaminación de los medios acuáticos.

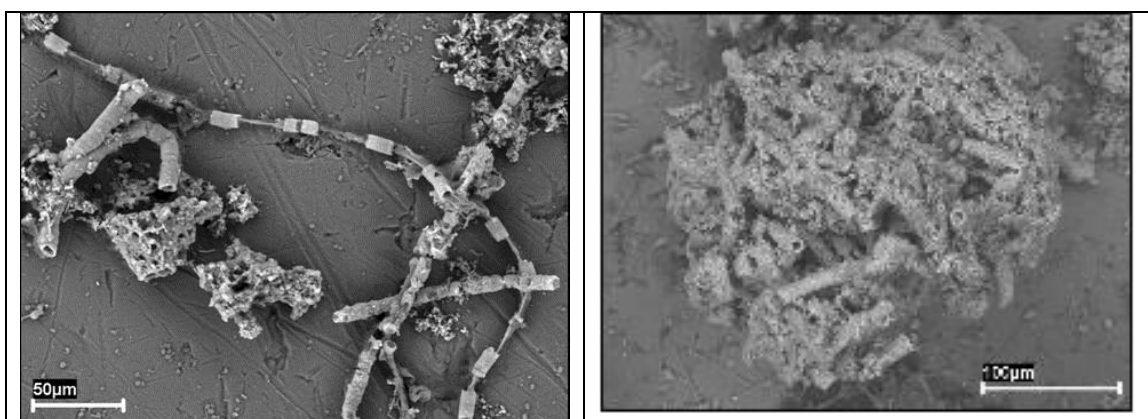


Formación de sulfatos evaporíticos de diferente composición y contenido de agua de cristalización. En Touro sólo pueden ser observados los días más cálidos y secos o en zonas de drenaje muy intenso. Estas formaciones de sulfatos de hidrólisis fuertemente ácida permiten interesantes estudios de génesis de nuevos minerales y de procesos de cristalización y disolución.

Los organismos vivos más fácilmente identificables en las aguas hiperácidas son las algas clorofíceas. Pertenecen a diferentes especies de algas resistentes a la acidez, presentando una coloración verde intensa en el inicio de su desarrollo y pasando progresivamente a tonos pardos y finalmente a negros a medida que se cargan de elementos metálicos adsorbidos dentro de una importante acción de Bioy fitoremedición de aguas por mecanismos naturales



1.- . Algas clorofílicas resistentes a la acidez (verde) hasta que se cargan de metales pesados y necrosan (marrón y negro). **2.-** Formación de algas resistentes a la acidez y precipitados ferruginosos biogénicos que tienden al encostramiento. **3.-** Costra ferruginosa.



Formación de las costras estromatolíticas. 1.-- Detalle al microscopio electrónico de la fase inicial de ferruginización de las algas clorofíceas. recubiertas y fosilizadas por tuberías de compuestos ferruginosos precipitados o adsorbidos. **2.-**Fase de aglomeración de los túbulos **iniciales**. Formación de una costra ferruginosa con estructura estromatolítica a partir de la unión de los filamentos anteriores con materia orgánica procedente de la necromasa de los organismos acuáticos unicelulares, paredes bacterianas y aportes de hojas alóctonas..

2.1 Las aguas hiperácidas y el origen de la vida.

Las aguas hiperácidas constituyen un importante sistema biótico, que ha sido considerado como uno de los más útiles para comprender el origen de la vida (Amils et al., 2012.).

La presencia en ellas de organismos cuya aparición se produjo desde casi los momentos iniciales del planeta (bacterias y arqueobacterias se estima que aparecieron hace más de 3900 millones de años) adaptados a condiciones extremas, capaces de obtener su energía por quimiosíntesis sin intervención del oxígeno y sin necesidad de dependencia de la clorofila y las plantas verdes, constituye un campo de estudio

relevante, tal como lo han puesto de manifiesto los continuados estudios de la NASA, tanto en el río Tinto como en otros ambientes con estos organismos y condiciones extremas de acidez, temperatura, salinidad o concentración de diferentes elementos tóxicos. Los sistemas de Touro también han sido estudiados por equipos mixtos de las Universidades de Santiago de Compostela y Sao Paulo y se han utilizado con fines didácticos en trabajos de los alumnos de bachillerato internacional del Instituto Rosalía de Castro (Fernando Castro, Rosario García-Echave, Carmen Nieto).

Las investigaciones que se están llevando a cabo para probar los límites de la vida resultan apasionantes. Uno de los objetivos fundamentales de la microbiología es conocer los límites de la vida y los mecanismos responsables de ello. La extremofilia es, por definición, la vida en las condiciones en que, en un principio, no tendría que ser posible; a partir de la adaptación a las condiciones geofísicas más inhóspitas del planeta: temperatura, radiactividad, concentraciones de iones o metales pesados, presión, ausencia de agua, acidez... Su descubrimiento se remonta al estudio del deterioro del bacalao en salazón (halófilos), aunque la ciencia no se ocupó sistemáticamente de ellos hasta los años setenta. Poco después, se creó el reino Arqueobacteria (en la actualidad, dominio Archea), numeroso grupo que incluye halófilos, hipertermófilos, metanógenos (anaerobios estrictos)... Las sucesivas investigaciones demostrarían que la extremofilia no es patrimonio exclusivo de este taxón. Los acidófilos, en concreto, proliferan a muy bajo pH, circunstancia que ellos mismos provocan mediante su actividad quimiolitotrófica, aunque también se desarrollan en ambientes ácidos de por sí. Un estudio de las aguas del arroyo Felisa y de la presa de Angumil (Charca roja), ambos sistemas hiperácidos, hiperoxidantes e hiperconductores con altas concentraciones de sulfatos, Al, Mn y Fe disueltos, pero bajas en As, Cd, Ni, Pb o Zn, como corresponde a la paragénesis de sulfuros polimetálicos presentes en el yacimiento., ha permitido conocer la enorme biodiversidad presente en estas aguas aparentemente abióticas. Se tomaron en cada punto unos 10 litros de agua y se comenzó con su observación directa, sin ninguna modificación, mediante un microscopio óptico con contraste de fases. Los resultados fueron espectaculares y pusieron de manifiesto la importancia y diversidad de vida existente en estos medios, con particular énfasis en la presencia de bacterias y

protozoos extremadamente variados que constituyen un importante aporte de la biomasa y necromasa necesaria para la obtención de energía por estos sistemas bióticos.



Presa de Angumilo (Charca roja). Recoge aguas de filtraciones de la balsa de lodos y, junto con los arroyos de Portapego y Felisa contienen una elevada biodiversidad de organismos propios de sistemas extremófilos que debe ser conservada y estudiada sin que ello suponga la contaminación de los sistemas fluviales del entorno minero. La realización de la actualización del Proyecto Touro puede ser una importante solución para conservar la biodiversidad y mejorar los cursos fluviales...

1.1 Especies extremófilas identificadas

1.1.1 BACTERIAS HELICOIDALES.

Podría tratarse de la especie *Leptospirillum ferrooxidans*, que agrupa bacterias helicoidales no espiroquetas, dentro del filo *Nitrospirae*, clase *Nitrospira*, orden *Nitrospirales*, familia *Nitrospiraceae*. Según la composición de su pared bacteriana, se clasifican como Gram negativas y, por su alimentación, como quimiolitótrofas: fijan carbono utilizando Fe^{2+} como reductor y O_2 como oxidante. Tienen una gran utilidad industrial y en el campo de la biorremediación, pues resultan altamente efectivos para la biolixiviación, consiguiendo buenos resultados en la extracción de Cu, Fe, Zn, Cd, As, Ni... a partir de aguas residuales de minas abandonadas y de las rocas de sus escombreras. Además, se encuentran formando biopelículas o *biofilms* rosados, similares a los hallados en Touro. En cualquier caso, esto no supone más que una

hipótesis que, aunque bastante fundada, no puede ser confirmada sin antes realizar secuenciaciones de ADN.



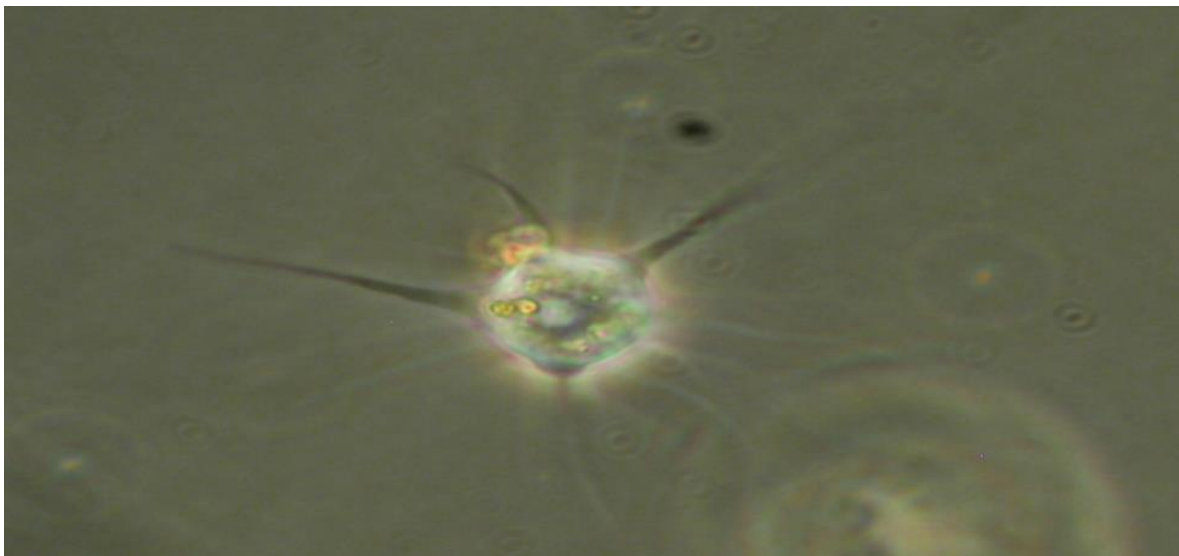
Bacteria helicoidal observada en las aguas del arroyo de Felisa (ver anexo de vídeos)

1.1.2 PROTOZOOS.

Una gran diversidad de formas y especies:

1.1.2.1 Amebas de vida libre.

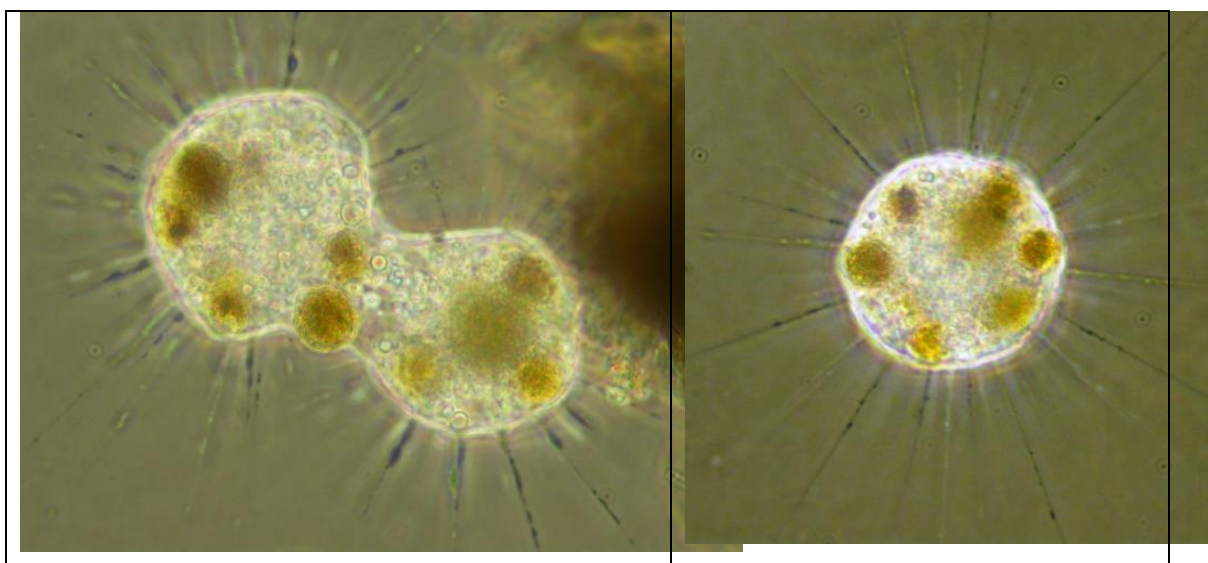
Bajo el filo *Amoebozoa* se agrupan los más sencillos de todos los protozoos conocidos, con unas dimensiones comprendidas entre unos pocos μm y 0,5 mm. Su cuerpo es una especie de masa gelatinosa semilíquida que cambia constantemente de forma. Estas modificaciones se producen a través de la emisión de prolongaciones de su citoplasma, denominadas pseudópodos; mediante cambios de estado coloidal, de sol a gel. De entre las ocho clases conocidas, se distingue entre amebas desnudas y testáceas. Las halladas en este experimento se corresponden con el primer tipo, caracterizadas por la ausencia de envoltura celular y los constantes cambios de forma. Estos son tan bruscos que resulta casi imposible diferenciar unas amebas de otras con la sola ayuda de un microscopio.



Amebas

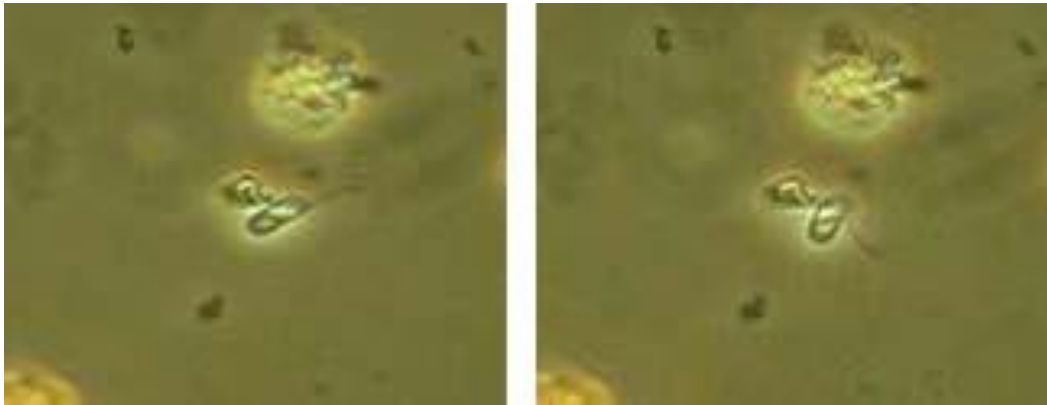
1.1.2.2 Heliozoos

Su nombre acredita su condición de microorganismos eucariontes (*Protozoa*) más o menos esféricos (de radio comprendido entre 30 y 90 μm), provistos de múltiples y protuberantes apéndices radiales, llamados axópodos. Su alimentación se basa en seres menos desarrollados, entre ellos flagelados y otros protozoos, obtenidos de la filtración de las aguas dulces. El tamaño las vacuolas es indicativo de la alimentación reciente del individuo. Las primeras descripciones de estos seres se deben al eminente microbiólogo decimonónico Ehrenberg, pionero por su estudio de los géneros *Actinophrys* y *Actinosphaerium*.



Heliozoa.

1.1.2.3 Flagelados: diflagelados reniformes



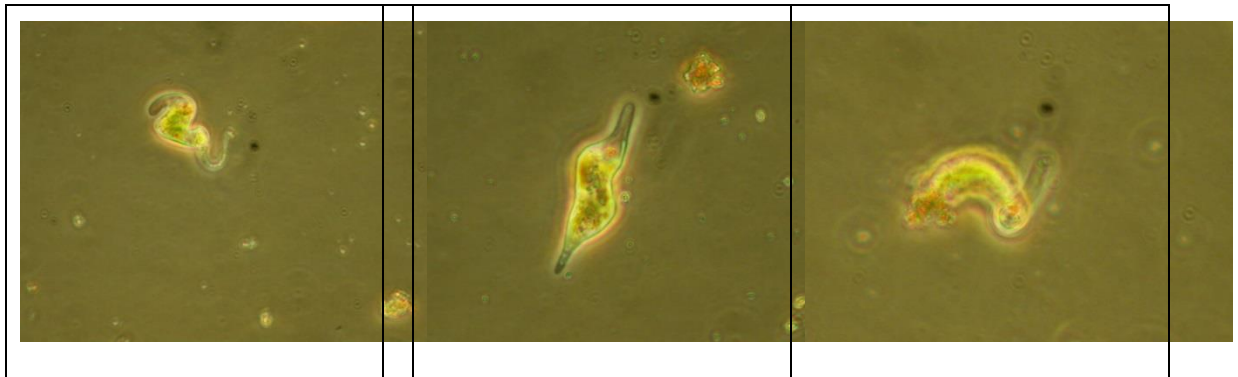
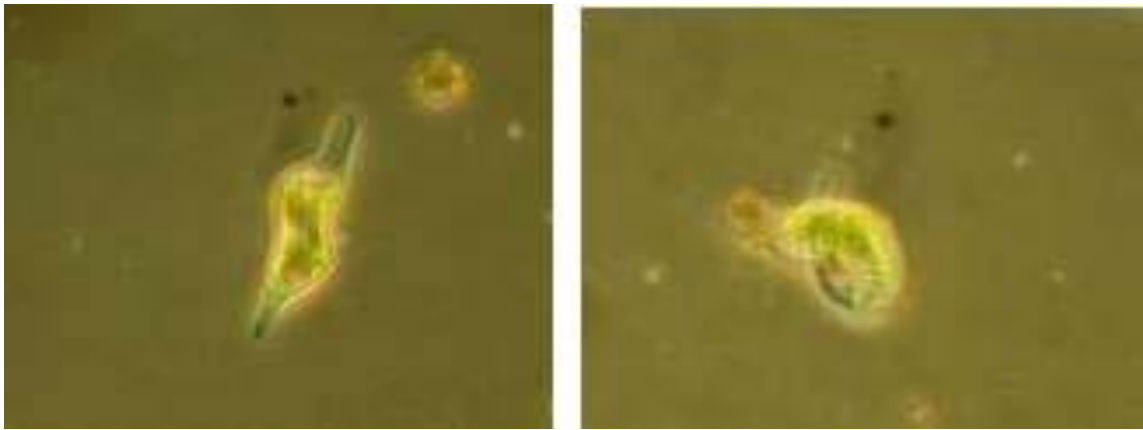
Flagelados reniformes

✓ **Ciliados complejos: *Euplotes sp.*** Estos microorganismos viven en medios acuosos, alimentándose por filtración de las corrientes que ellos mismos crean con sus apéndices ciliares, alrededor del citostoma. También poseen cilios motores, estando dispuestos los más fácilmente identificables en una línea transversal. Presentan una vacuola pulsátil o contráctil, que permite su fácil identificación con microscopía óptica.

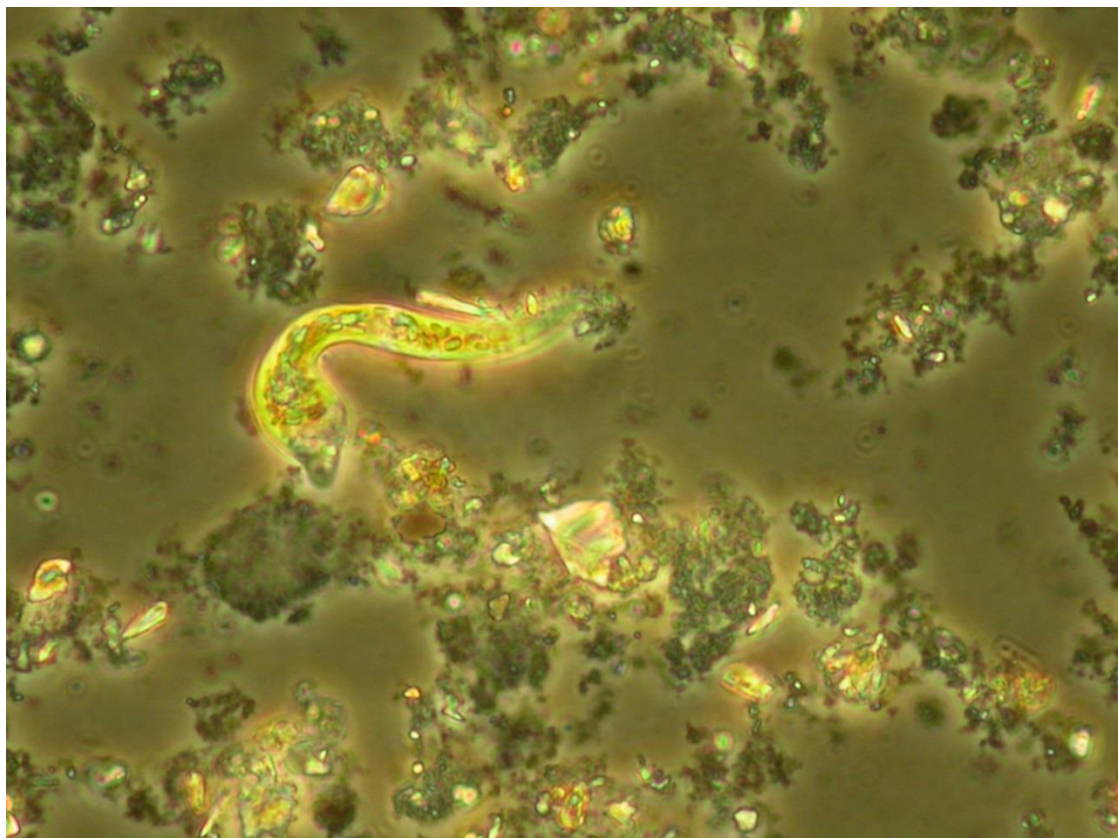


Euplotes

Euglenozoos: *Euglena mutabilis*. Se trata de una de un protozoo fotosintético acidófilo, que incluye en el reino Protozoa, filo Euglenorea, clase Euglenoidea, orden Euglenida y suborden Euglenium. Esta especie ha sido encontrada en ambientes con $[H^+]$ extremadamente altas, incluyendo Río Tinto. Es muy fácilmente reconocible por su verde intenso y su característico *ojo* rojizo en la parte anterior, el extremo más grueso de su alargado (25- 50 μm de ancho, por 100-125 μm de longitud) y flexible cuerpo. Otro rasgo distintivo es la ausencia de flagelo funcional o externo, aunque sí posee flagelo interno. También son llamativos los gránulos anaranjados de su citoplasma, cuya composición fue determinada hace una década mediante centrifugado: Fe y O, lo que confirma que secuestra hierro de medios hiperácidos, por lo que se estudia su utilidad para biorremediación.



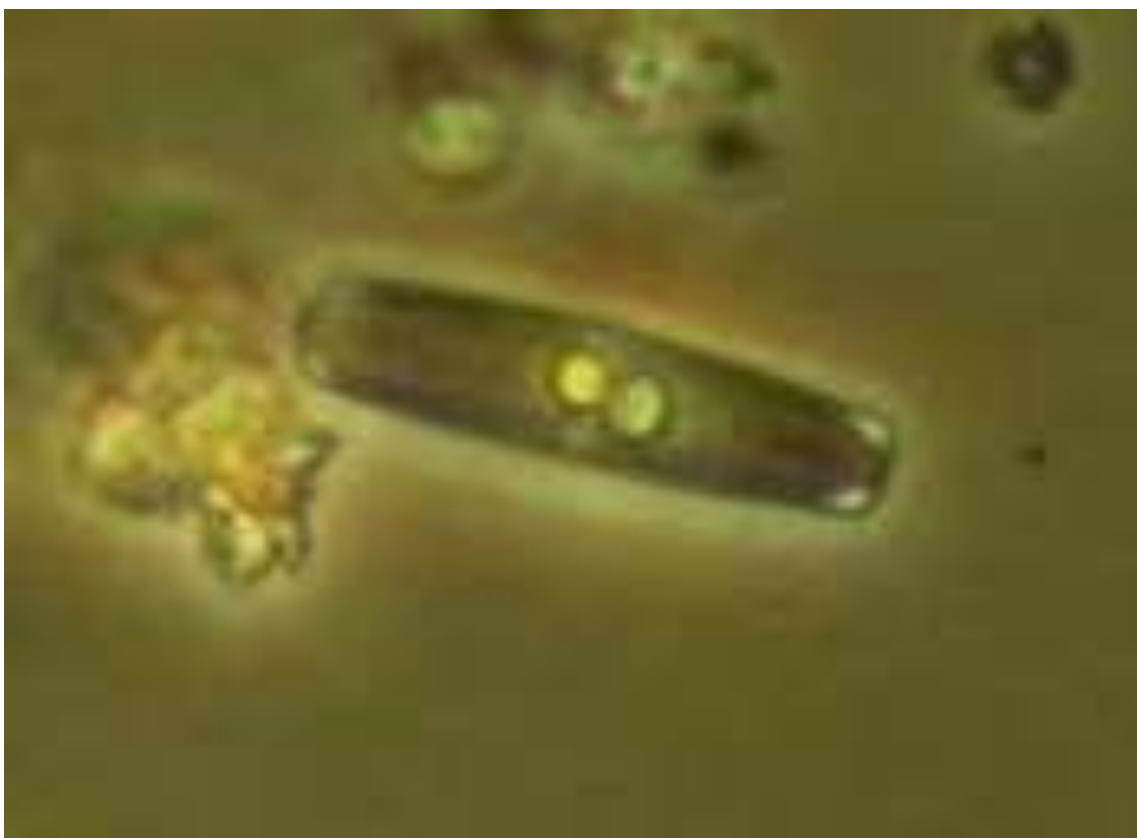
Euglenas mutabilis



Característica coloración de Euglena

1.1.3 ALGAS: DIATOMEAS

Diatomae es un subfilo de *Ochrophyta*, contenido en el Reino *Chromista*. Se conocen alrededor de 20000 especies, que colonizan todos los ecosistemas acuosos del planeta. Se pueden encontrar formando parte de bancos planctónicos o adheridas al sustrato. Su pared celular tiene una gran concentración de pectinas intrínsecas, a las que se suman cristales de SiO_2 . Así, se construye una coraza conocida como frústulo, dividida en dos piezas o tecas. En función de su configuración celular, se distinguen dos tipos de diatomeas: Centrales, de simetría radial, y Pennales, de simetría bilateral. Solo se hallaron estas últimas.

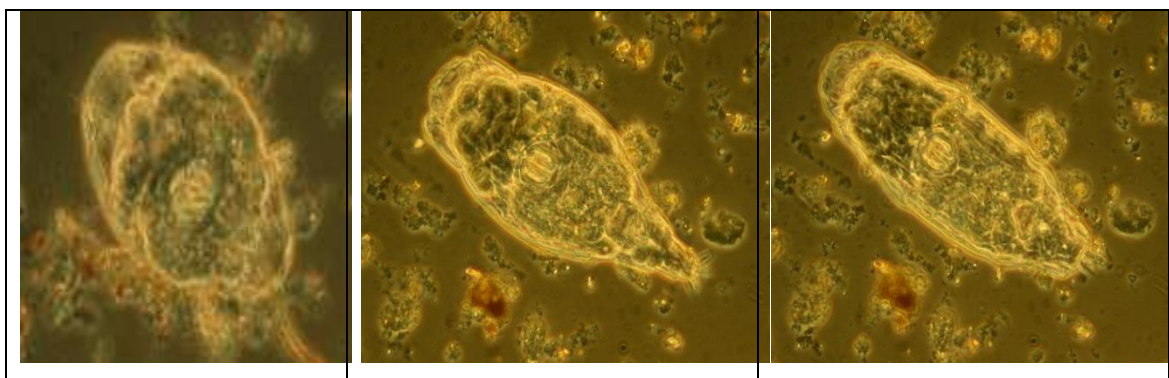


Diatomeas

1.1.4 ROTÍFEROS: Philodina sp.

Los Rotíferos son metazoos de vida libre cuyo rango de tamaños es comparable al de los ciliados, con los que llegan a competir. Se caracterizan por sus apéndices ciliares anteriores, para captar nutrientes, que se conducen hasta las dos piezas simétricas destinadas a la molienda del *mastax*. Son microanimales no metaméricos y

acelomados, con simetría bilateral. Su forma puede ser alargada, oblonga o redondeada, variando de una especie a otra, pero también en un mismo individuo, en función de sus movimientos. Su cuerpo está recubierto por una cutícula, cuya naturaleza permite distinguir los dos grandes tipos de rotífero: lorigados (segmentada, cuya zona rígida integra la loriga, esta sin metamerización) y no lorigados (revestimiento fino y no dividido). Lo más frecuente es que la cabeza no esté diferenciada del tronco, mientras que la parte caudal del cuerpo suele ser delgada y retráctil, como un catalejo; integrando el pie. Este, a su vez, puede estar provisto de un par de apéndices: los dedos o glándulas pedias, destinados a la fijación a un sustrato. Al igual que su cuarto trasero, el rotífero se puede acortar y alargar gracias a sus haces musculares longitudinales y dorso-ventrales. En la zona peristomática, se sitúa un disco densamente poblado por cilios, que forman el cíngulo. El aparato bucal, ubicado en la parte anterior, consta de múltiples piezas. Entre ellas, el órgano más singular es el *mastax*, que consta de un *incus* (constituido por un *fulcrum* y dos *rami*) y los *mallei* (constituidos por dos *uncus* y un *manubrium*). Toda la maquinaria del *mastax* está accionada por el musculoso bulbo esofágico. Su aparato excretor se basa en protonefridios y el nervioso, en ganglios (cerebral, subesofágico, caudal, del *mastax*...). Por otra parte, la reproducción puede seguir muy diversos caminos: desde la sexual por fecundación hipodérmica, hasta la asexual, pasando por la partenogénesis.





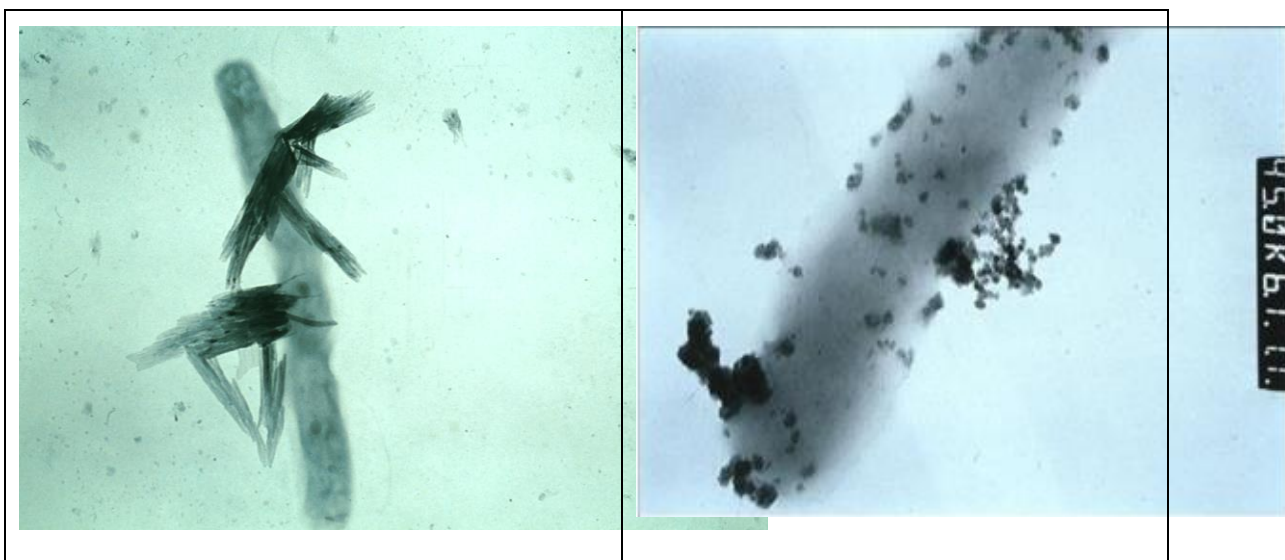
Rotíferos

1.2 Bacterias y Archeobacterias en la mina de Touro. Estudios de diversidad por ADN

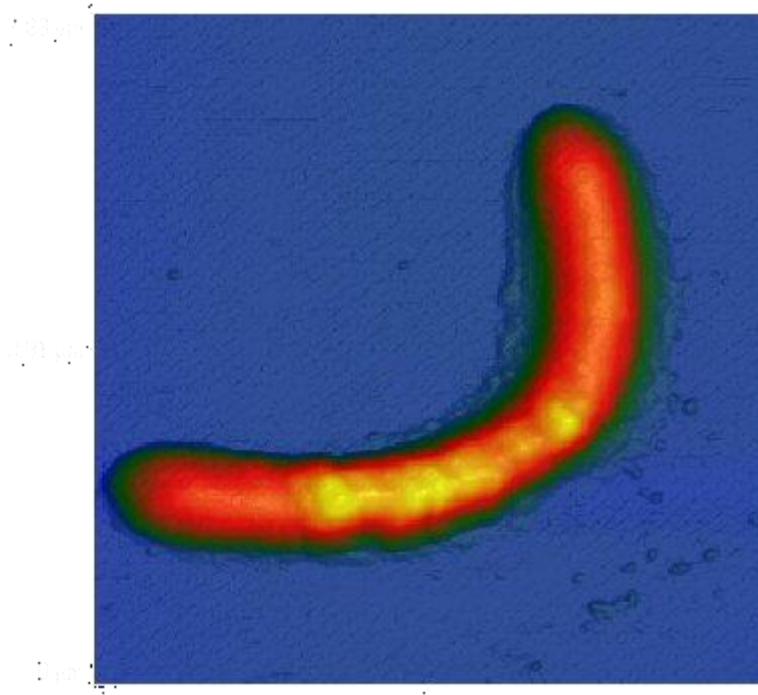
La presencia de bacterias ya se había puesto de manifiesto por las primeras observaciones al microscopio con fase de contraste y al microscopio electrónico, donde fue claramente identificada su característica forma de bacilo, su capacidad oxidativa de los sulfuros, con transformación de una pirita en schwermanita y la presencia de carga negativa en la pared bacteriana a la que se adhieren los minerales secundarios de Fe con carga positiva. También se habían visto e identificado en campo las características coloraciones e irisaciones que producen en diferentes zonas de aguas y suelos húmedos.



Colonias de bacterias y arqueobacterias en la mina Touro



Imágenes al microscopio electrónico de bacterias con forma de bacilo con piritas convirtiéndose en shwermanitas y compuestos secundarios de Fe adsorbidos en la pared bacteriana de carga negativa.



Acidithiobacillus ferrooxidans

Inicialmente estas bacterias fueron consideradas como *Acidithiobacillus* por su similitud con estas y su papel como biocatalizador oxidativo de los sulfuros.

En 2008 un equipo mixto de las Universidades de Santiago de Compostela y Sao Paulo (Brasil). Estudiaron las comunidades de bacterias y arqueas presentes en los sedimentos de la balsa. El trabajo fue presentado y premiado en el X Simposio de Microbiología de Brasil (Premio Ernesto Hofer) y posteriormente fue ampliado y publicado en el 2013 (Luceta et al., 2013).

Para ello se escogieron tres puntos de muestreo, con una distancia entre puntos aproximada de 1 m, en los que se apreciaban diferencias visuales en los sedimentos (figura 1).

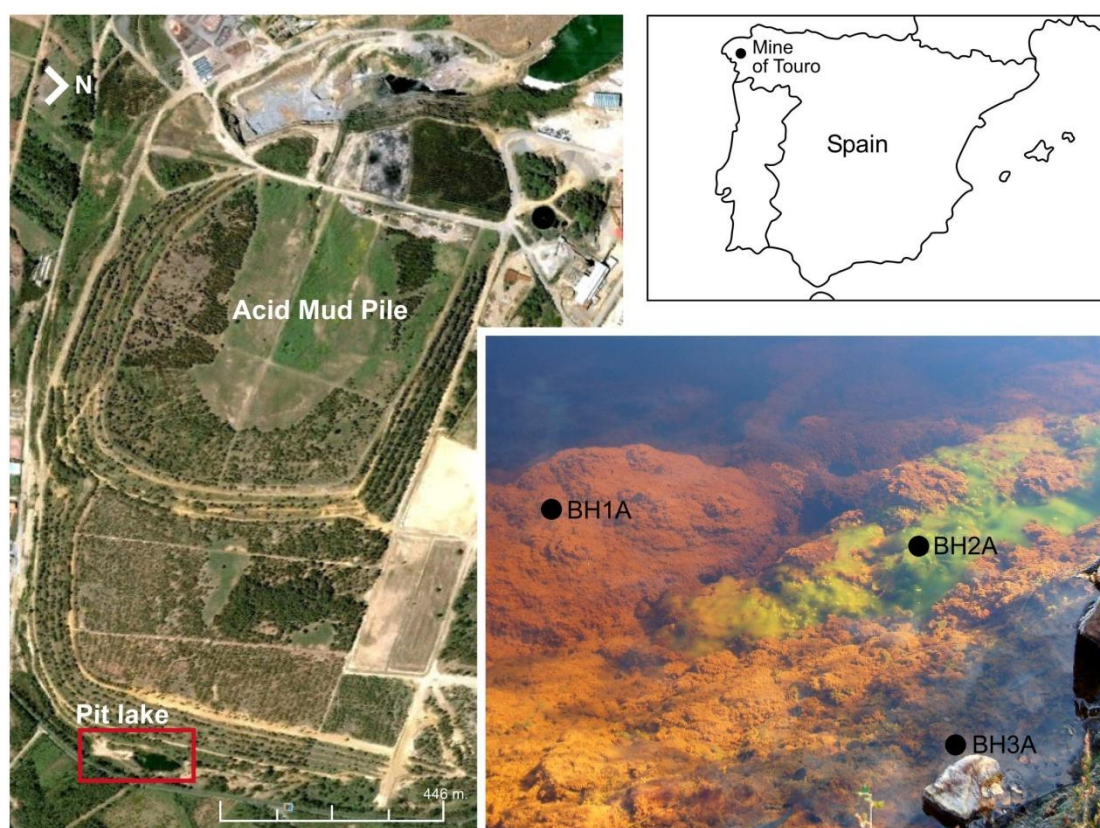
Fondo de la base (profundidad de la columna de agua: entre 0.5 y 1 m)

- **Punto BH1A:** Sedimentos con un marcado precipitado rojo.
- **Punto BH2A:** Sedimentos rojos con organismos verdes filamentosos (clorofíceas).

Borde del lago (profundidad de la columna de agua: 0.1 m)

● **Punto BH3A.** Sedimento superficial con forma de costra

Los sedimentos muestreados mostraron unas condiciones extremadamente ácidas y oxidantes, con un rango de pH desde 2.2 a 3.5, un potencial redox mayor de 700mV, y altas concentraciones de Fe^{+2} y Fe^{+3} en el agua de los poros de los sedimentos.



Localización de la balsa (pit lake) en la mina de Touro y distribución de los tres puntos en los que se recogieron los sedimentos (Lucheta et al. 2013)

Utilizando técnicas de biología molecular (PCR- DGGE), y comparando las secuencias de los genes que codifican para los ARNr 16S (que permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas), encontraron que en cada punto hay una comunidad bacteriana distinta, y que las presentes en los puntos BH2A y BH3A tenían una mayor similitud entre sí que con la del punto BH1A. (Lucheta et al., 2013).

El *phylum Chloroflexi* es el más abundante con diferencia en los tres sedimentos, en los cuales también se encontraron representantes de *phyla Actinobacteria, Planctomycetes y Proteobacteria*. *Acidobacteria* sólo fue detectado en BH1A y *Cyanobacteria* sólo en los sedimentos de los puntos BH2A y BH3A.

A pesar de mostrar una estructura de comunidad distinta, no se encontraron diferencias significativas en la riqueza y diversidad bacteriana entre los 3 sedimentos.

La riqueza bacteriana observada es comparable a la que Brofft et al. (2002) encontraron en humedales impactados por el drenaje de aguas ácidas procedentes de escombreras de minas de carbón, o en los relaves abandonados de minas de plomo-zinc (Zhang et al. 2007), pero mayor a la riqueza observada en aguas de drenaje de mina afectadas por sulfuros (He et al. 2007)

Siguiendo un procedimiento similar con las arqueas se encontró que presentan unos niveles de desemejanza mayores a los observados en el caso de las comunidades bacterianas y que las comunidades que forman en los sedimentos muestreados son diferentes estadísticamente.

Aproximadamente el 58% de las secuencias identificadas en el sedimento del punto BH1A fueron asignadas al *phylum Euryarchaeota*, y el 92% del punto BH2A a *Crenarchaeota*. Las secuencias restantes, que incluyen aproximadamente el 98% de las secuencias del punto BH3A, no mostraron similitudes a las otras secuencias presentes en las bases de datos y fueron asignadas a las *Archaea* sin clasificar (Tabla 1)

La comunidad microbiana asociada a los sedimentos del drenaje de la mina de Touro está altamente dominada por unos pocos grupos de bacterias que puede ser atribuido a las condiciones ácidas y energéticamente limitado por sustratos minerales en un medio en el que el metabolismo autótrofo es predominante. El análisis filogenético de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) indica similitudes con bacterias no cultivadas relacionadas con *Chloroflexi* encontradas en aguas de drenajes ácidos de ambientes que han sufrido impactos mineros y/o procedentes de áreas volcánicas.

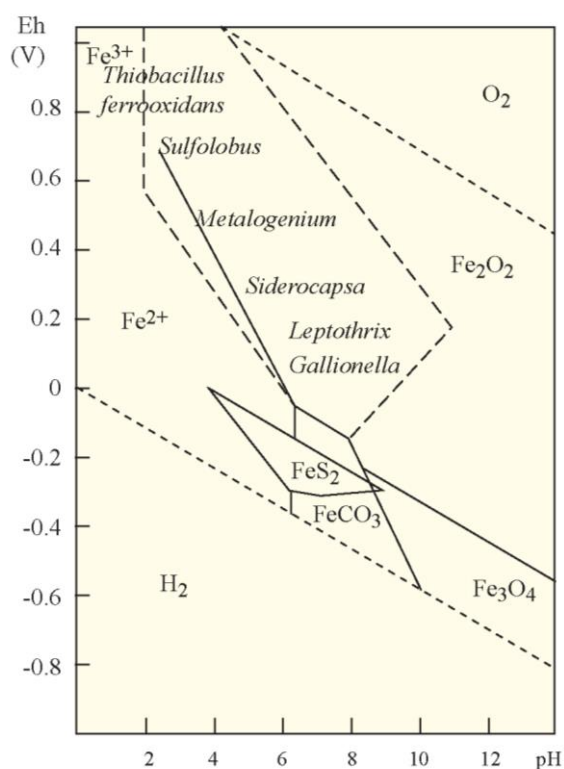
Tabla 1 Abundancia relativa de los grupos filogenéticos encontrados en los sedimentos de la balsa. (Modificado de Lucheta et al. 2013)

Dominio	Grupo Filogenético	BH1A	BH2A	BH3A
Bacteria	<i>Acidobacteria</i>	2.3%	ND	ND
	<i>Actinobacteria</i>	8.0%	30.3%	13.3%
	<i>Cyanobacteria</i>	ND	1.3%	7.2%
	<i>Planctomyctes</i>	1.1%	10.5%	8.4%
	<i>Proteobacteria</i>	1.1%	1.3%	2.4%
	<i>Cloroflexi</i>	81.6%	56.6%	62.7%
	Sin clasificar	5.7%	ND	6.0%
Archaea	<i>Crenarchaeota</i>	ND	91.8%	1.6%
	<i>Euryarcheota</i>	57.7%	ND	ND
	Sin clasificar	42.4%	8.2%	98.4%

La fijación de carbono por algas filamentosas acidófilas, como por ejemplo ***Zygnematales*** (presente en el punto BH2A), podría contribuir al crecimiento de organismos heterotróficos reductores del hierro, como propone Rowe et al. (2007). Nancuqueo y Barrie Hohnson en 2012 observaron que los heterótrofos acidófilos *Acidiphilium* y *Acidobacterium spp* son capaces de metabolizar monosacáridos producidos por *Chlorella* y *Euglena* en ambientes creados por los drenajes ácidos de mina.

Es posible que en las aguas ácidas procedentes del drenaje de la mina, con $\text{pH} < 3$, bacterias oxidantes de hierro/azufre moderadamente acidófilas jueguen un rol en la oxidación de metales, minimizando la importancia de los oxidantes acidófilos extremos. La ausencia de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* puede estar relacionada con la disminución de sus substratos más favorables, como el Fe (II), cuya concentración no es excesivamente elevada en las aguas intersticiales. Las condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de las poblaciones de *Thiobacillus ferrooxidans* son: concentración de O₂ superior al 1%; intervalo de temperaturas entre 5 y 55°C con una temperatura óptima en torno a los 30°C y pH entre 1,5 y 5,0, con el óptimo en 3,2

(Jaynes y col., 1984). Los valores de pH característicos del hábitat de este microorganismo oscilan entre 1,5 y 3,5 (Roman y Benner, 1973), condición a la que se llega mediante la acción de una sucesión bacteriana que comienza con el dominio del género *Thioparus* (pH neutro), dando paso a bacterias metalogénicas, con pH 3,5-4,5 (Walsh y Mitchell, 1972) y finalmente, a *Thiobacillus ferrooxidans* en las condiciones de mayor acidez.



Algunos microorganismos especializados en la oxidación de sulfuros metálicos y campos Eh-pH en que son activos.

Bibliografía

Amils, R. (2012). Ambientes extremos y geología: el caso de Río Tinto. *Revista de Enseñanza de las Ciencias de la Tierra* (2012, 20.2), páginas 122-132. ISBN 1132-9157.

Barnes, R. D. (1969). *Zoología de los invertebrados*. Interamericana.

Brake, S. S.; Connors, K. A.; Dannelly, H.K.; Hasiotis, S. T. (2000). Influence of water chemistry on the distribution of an acidophilic protozoan in an acid mine drainage system at the abandoned Green Valley coal mine, Indiana, USA. Pergamon

Brofft, J. E., McArthur, J. V., & Shimkets, L. J. (2002). Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environmental Microbiology*, 4(11), 764-769.

D'Ancona, H. (1966). *Tratado de Zoología*. Editorial Labor. Díaz-Tena, E.; López, M.; Rodríguez, N. (2012). Biomecanizado con microorganismos extremófilos.

<http://www.xixcnim.uji.es/CDActas/Documentos/ComunicacionesOrales/07-31.pdf> (16-1-2013)

Gómez, E. (1994). Aislamiento y caracterización de microorganismos de aguas de minas. <http://pendientedemigracion.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/X/3/X3024401.pdf> (16-1- 2013)

He, Z., Xiao, S., Xie, X., Zhong, H., Hu, Y., Li, Q., ... & Qiu, G. (2007). Molecular diversity of microbial community in acid mine drainages of Yunfu sulfide mine. *Extremophiles*, 11(2), 305-314.

Lucheta, A. R., Otero, X. L., Macías, F., & Lambais, M. R. (2013). Bacterial and archaeal communities in the acid pit lake sediments of a chalcopyrite mine. *Extremophiles*, 17(6), 941-951.

Lucheta, A. R.; Lambais, M. R.; Otero, X. L.; Macías, F. 2008. Bacterial diversity in the acid drainage sediments of the mine of Touro (Galicia, Spain). 2008.- Premio Ernesto Hofer. 2008. Melhor Trabalho Escrito, XI Encontro Nacional de Microbiología Ambiental e X Simpósio Brasileiro de Microbiología do Solo. Sociedade Brasileira de Microbiología. SBM. 2008.

Macías García, F.; Macías Vázquez, F.; Nieto, C. (2012). Didáctica de la mina de Touro. http://www.enciga.org/files/boletins/76/CN_Didactica_Mina_de_Touro.pdf (16-1- 2013)

Mora, M.; Sánchez, E.; Serrano, A.; Sittenfeld, A.; Vargas, M. (2003). Una nueva especie de Euglena. <http://www.biologiatropical.ucr.ac.cr/attachments/volumes/vol52-1/03-SITTENFELD-27-30.pdf> (16-1-2013)

Natarajan, K. A. (2008). Microbial aspects of acid mine drainage and its bioremediation. Departamento de Ingeniería de los Materiales, Instituto Indio de la Ciencia. <http://www.ysxbcn.com/down/upfile/soft/200916/08-p1352.swf> (16-1-2013)

Patterson, D. J. (1992). *Free-Living Freshwater Protozoa*. Wolfe Publishing. Pérez Valcárcel, C. (2010). *Guía dos microorganismos das augas continentais*. Baía Edicións.

Rowe, O. F., Sánchez-España, J., Hallberg, K. B., & Johnson, D. B. (2007). Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide

mine (Huelva, Spain) underpinned by two functional primary production systems. *Environmental microbiology*, 9(7), 1761-1771.

Zhang, H. B., Shi, W., Yang, M. X., Sha, T., & Zhao, Z. W. (2007). Bacterial diversity at different depths in lead-zinc mine tailings as revealed by 16S rRNA gene libraries. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*,45(6), 479-484.