



# **METAANÁLISIS SOBRE BACTERIAS ACIDÓFILAS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA**

Francisco Javier Requejo García

**Trabajo entregado para la obtención del grado de MÁSTER  
EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**Modalidad: “Investigación”**

15 de diciembre de 2021

Director:

Dr. Francisco Córdoba García

**Francisco Córdoba García**, Catedrático de Universidad, Departamento de Ciencias Integradas,

**INFORMA:**

Que el trabajo titulado “**Metaanálisis de bacterias acidófilas en la Península Ibérica**” presentado por **Don Francisco Javier Requejo García, con D.N.I.: 48946273L**, ha sido realizado bajo mi dirección, y AUTORIZO su presentación y defensa como **Trabajo Fin de Máster** (Modalidad: “Trabajo de Investigación”), para el Máster Universitario en Tecnología Ambiental de la Universidad de Huelva.

En Huelva, a 24 de noviembre de 2021

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and strokes, positioned centrally below the text.

## RESUMEN

Existe una variedad de artículos sobre las bacterias hiperacidófilas de la cuenca del río Tinto, pero hay una bibliografía muy limitada en otros ambientes de pH ácido, aunque no vinculados a la minería de piritas.

Por otra parte, la comunidad científica de Portugal también proporciona datos, aunque dispersos, sobre el mismo aspecto.

En otro sentido las bacterias hiperacidófilas agrupan un conjunto de especies con diversos metabolismos (aerobios, anaerobios y facultativos) cuya distribución en el medio es parcialmente conocida.

Este trabajo persigue recopilar y analizar la información de una diversidad de publicaciones que reúnen información dispersa, tanto por los objetivos de las publicaciones como por la metodología empleada en el análisis de las poblaciones bacterianas.

Al tratarse de un metaanálisis, se trata también de comparar y reunir datos publicados con objeto de obtener conclusiones de aplicación en futuros trabajos.

### **Palabras clave**

*bacteria, Drenaje Acido de Minas (AMD), pirita, agua ácida*

## ABSTRACT

There is a variety of articles on hyperacidophilic bacteria in the Rio Tinto basin, but there is a very limited bibliography on other acidic pH environments, although not linked to pyrite mining.

On the other hand, the Portuguese scientific community also provides data, albeit scattered, on the same aspect.

In another sense, hyperacidophilic bacteria group a set of species with various metabolism (aerobic, anaerobic and facultative) whose distribution in the environment is partially known.

This work seeks to collect and analyze the information from a diversity of publications that gather dispersed information, both for the purposes of the publications and for the methodology used in the analysis of bacterial populations.

As it is a meta-analysis, it is also about comparing and gathering published data in order to obtain conclusions of application in future studies.

### **Keywords**

*bacteria, Acid Mine Drainage (AMD), pyrite, acidic water.*

## **Agradecimientos**

*Deseo agradecer a mí tutor el profesor Dr. Francisco Córdoba García por su inestimable ayuda, por su dedicación y por las horas invertidas en ayudarme a elaborar un proyecto lo mejor posible, pese a los contratiempos e impedimentos surgidos y por sus valiosos consejos para la preparación del mismo.*

*A todos mis compañeros del máster por su ayuda y por hacer agradables todos los días de clase y de trabajo.*

*Un agradecimiento muy especial para todas aquellas personas que me dieron su amistad y depositaron su confianza en mí durante el transcurso del curso, por sus palabras de apoyo y por darme fuerza siempre que lo necesité.*

*Por último, quiero agradecer profundamente a mis padres por su amor, confianza y por apoyarme para cumplir todos mis objetivos.*

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. El entorno: La Faja Pirítica Ibérica .....	10
1.2. Causas físico-químicas y biológicas del Drenaje Ácido de Minas (AMD) .....	11
1.3. Etapas en la formación de aguas ácidas.....	15
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. Objetivos generales .....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	23
4.1. Microorganismos extremófilos. Clasificación .....	23
4.1.1. Dominio Archea .....	28
4.1.2. Dominio Bacteria .....	29
4.2. Aplicaciones de las extremoenzimas .....	31
4.3. Productos de los extremófilos y su aplicación.....	34
4.4. Especies bacterianas de la FPI.....	39
5. CONCLUSIONES .....	53
6. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS .....	54
7. ANEXOS .....	56

---

## INDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura n.1</b> Faja Pirítica Ibérica	12
<b>Figura n.2</b> Paisaje afectado por drenaje ácido de minas.	14
<b>Figura n.3</b> Etapas en la formación de aguas ácidas	16
<b>Figura n.4</b> Diagrama de flujo PRISMA	22
<b>Figura n.5</b> Árbol filogenético de los tres Dominios de la vida, y algunos ejemplos.	23
<b>Figura n.6</b> Sulfolobus solfataricus.	28
<b>Figura n.7</b> Sulfolobus tokodaii.	28
<b>Figura n.8</b> Metallosphaera sedula.	28
<b>Figura n.9</b> Acidianus manzaensis	28
<b>Figura n.10</b> Ferroplasma thermophilum.	29
<b>Figura n.11</b> Termophilum acidophilum.	29
<b>Figura n.12</b> Cuniculiplasma divulgatum.	29
<b>Figura n.13</b> Acidoplasma aeolicum.	29
<b>Figura n.14</b> Acidithiobacillus ferrooxidans.	29
<b>Figura n.15</b> Acidithiobacillus thiooxidans.	29
<b>Figura n.16</b> Acidithiobacillus albertensis.	30
<b>Figura n.17</b> Acidophilum cryptum.	30
<b>Figura n.18</b> Sulfolobus acidophilus.	30
<b>Figura n.19</b> Sulfolobus thermosulfidooxidans.	30
<b>Figura n.20</b> Leptospirillum ferrooxidans.	30
<b>Figura n.21</b> Picrophilus torridus.	30
<b>Figura n.22</b> Reacción en cadena de la enzima polimerasa.	32

---

## INDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla n.1</b> Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas.	34
<b>Tabla nº2</b> Resultados metaanálisis.	52
<b>Tabla n.3</b> Principales bacterias oxidantes de hierro y/o azufre	53
<b>Tabla n.4</b> Especies de bacterias.	68
<b>Tabla n.5</b> Métodos de identificación bacterianos.	71
<b>Tabla n.6</b> Métodos de identificación bacterias	78

## 1. INTRODUCCIÓN

El río Tinto, junto a otros ríos “rojos”, es un ambiente extremo caracterizado por un pH muy bajo y altas concentraciones de metales en disolución. Las extremas condiciones del río son en gran medida producidas y mantenidas por el componente biológico del ecosistema, principalmente por organismos procarióticos.

---

*El AMD se origina cuando un mineral sulfuroso entra en contacto con el oxígeno y la humedad atmosférica (Grande et al,2000).*

---

De todas las causas de contaminación de los cursos fluviales, quizás el drenaje ácido de minas (acid mine drainage o AMD, en la literatura sajona). Sea una de las más graves por su naturaleza, extensión y dificultad de resolución.

Los ríos afectados por este tipo de contaminación se caracterizan por su acidez, así como por el alto contenido en sulfatos y metales pesados de sus aguas y por el contenido metálico de sus sedimentos (Grande et al, 2003; Azcue, 1999; USEPA, 1994) así como los costes económicos de su remediación (Commonwealth of Pennsylvania, 1994).

En la superficie del mineral comienza entonces un complejo mecanismo que se inicia con la oxidación de los sulfuros, muy insolubles, transformándolos en sulfatos, de elevada solubilidad, con producción de ácido.

Junto a la oxidación de la pirita, finalmente se producen reacciones secundarias entre los productos de las reacciones anteriores y los restantes minerales presentes en la roca (Förstner y Wittmann,1983), siendo el resultado final un conjunto de contaminantes solubles depositados sobre el mineral, que posteriormente son disueltos y arrastrados por el agua de lluvia o de escorrentía, produciéndose un caudal líquido contaminante que lleva su acidez, sulfato y una diversidad de cationes metálicos hasta los cursos de agua.

La grave contaminación por AMD que sufren los ríos Tinto y Odiel, es debida a que sus cuencas están atravesadas por la Faja Pirítica Ibérica. Esta formación geológica, de dirección aproximada este-oeste, con una longitud de 230 Km y una anchura media de 50 Km, constituye uno de los mayores depósitos mundiales de sulfuros (Leistel et al, 1998).

En los ríos afectados por AMD existe una diversidad de vida microscópica constituida por organismos acidófilos o acidobiontes. Además, son organismos tolerantes a elevadas concentraciones de metales.

Comúnmente, organismos similares se encuentran en lugares naturales como grietas volcánicas submarinas, aguas termales y otros lugares, donde el pH está muy por debajo del del agua neutra (pH=7).

Sobreviven en condiciones que serían letales para cualquier otra forma de vida. Resisten temperaturas extremas, por encima del grado de ebullición del agua y por debajo del de congelación, condiciones de acidez, de falta de luz solar y de oxígeno.

El Drenaje Ácido de Minas es un problema ambiental derivado de la meteorización y oxidación de los sulfuros metálicos.

Consiste en un escurrimiento de soluciones ácidas sulfatadas, con un contenido significativo de metales disueltos, resultado de la oxidación química y biológica de minerales sulfurados y la lixiviación de metales pesados asociados.

Las reacciones de oxidación ocurren de forma natural, y se aceleran por el aumento de la exposición de la roca al oxígeno y al agua y por la acción catalizadora de algunas bacterias.

Es el resultado de una serie compleja de reacciones químicas que involucra:

- ✓ Generación de ácido sulfúrico, debido a la oxidación de los sulfuros por acción combinada del agua y del oxígeno; reacciones auto catalíticas aceleradas por la actividad bacteriana.
- ✓ Consumo del ácido por reacciones de neutralización con minerales consumidores; estas reacciones resultan en la precipitación de sulfato de calcio e hidróxidos metálicos, oxi-hidróxidos y otros compuestos.

Si la capacidad de consumo de ácido es más alta que la generación de ácido, es posible que el drenaje sea neutro o alcalino.

### **1.1 El entorno: La Faja pirítica Ibérica.**

La Faja Pirítica Ibérica o dominio central de la zona Sub-portuguesa, es una vasta concentración de sulfuros masivos que se extiende a lo largo de gran parte del sur de la Península Ibérica.

Tiene alrededor de 250 Km de largo y de 30 a 50 Km de ancho, desde Alcacer do Sal (Portugal), al noroeste, a la provincia de Sevilla (España), al sureste.

La Zona Sub-portuguesa (ZSP) es la unidad más meridional, en las coordenadas actuales, del segmento ibérico del Macizo Varisco. Se trata de un terreno exótico acecinado al autóctono ibérico como un cinturón de pliegues y cabalgamientos de

vergencia suroeste (*Silva et al, 1990; Quesada 1998*) y con un grado metamórfico bajo.

Schermerhorn en 1971, propone una división estratigráfica regional de la Faja Pirítica Ibérica en tres unidades principales, que de muro a techo quedarían representadas por:

- El Grupo Pizarroso Cuarcítico (PQ), al que Strauss (2000) atribuye una potencia superior a los 2000 metros quedando el techo de esta formación datado como Famenniense Superior.
- El complejo Volcano-Sedimentario (CVS) que alberga las mineralizaciones de sulfuros y potencias variables.
- El grupo Culm, de edad Carbonífero Inferior, con potencias que llegan a sobrepasar los 1000 metros y frecuentes cambios laterales de facies.

El Complejo Volcano-Sedimentario (CVS) incluye una compleja secuencia volcánica máfica-félsica intercalada con pizarra y algunos sedimentos químicos, y que ha sido datada como de edad Famenniense Superior a Viseense Inferior temprano (*Oliveira, 1990*).

Las estructuras de deformación presentes en la faja pirítica tradicionalmente se han agrupado en tres fases principales de deformación.

En una primera fase se generan pliegues al sur asociados a cabalgamientos, que son sincrónicos con el metamorfismo.

Las estructuras de segunda fase son las predominantes en la Faja Pirítica y consisten en pliegues y cabalgamientos al sur, subparalelos a los de primera fase.

La tercera fase se caracteriza por la presencia de un despegue que desplaza los materiales sin orogénicos, hacia el sur, disponiéndolos sobre la unidad de cabalgamientos que imbrican al grupo PQ y al CVS.

Los minerales explotados son esencialmente pirita ( $\text{FeS}_2$ ), blenda o esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y galena ( $\text{PbS}$ ), aunque también aparecen otros minerales, como calcopirita, y elementos minoritarios (plata y oro).

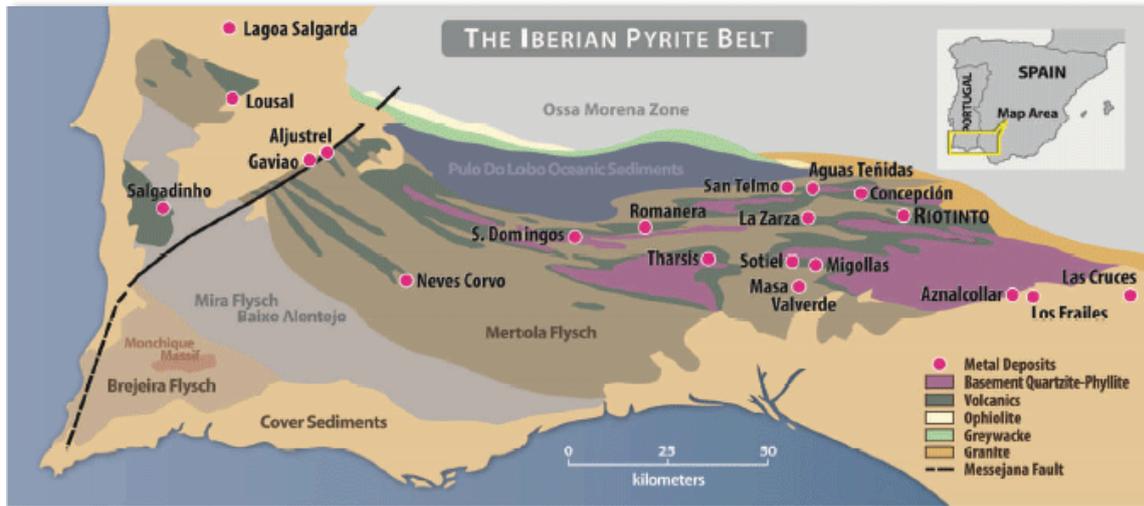


Figura n.1 Faja Pirítica Ibérica.

## 1.2 Causas físico-químicas y biológicas del Drenaje Ácido de Minas (DAM)

Los sitios de drenaje ácido de minas (AMD) son ambientes extremos altamente ácidos y distribuidos globalmente asociados con las actividades mineras (Akciil y Koldas,2016).

La AMD se genera principalmente a través de la oxidación catalizada microbianamente de sulfuros metálicos, como los sulfuros de hierro, en presencia de aire y agua (Kuyucak,2002).

En general, el proceso genera altas cantidades de ácido sulfúrico que reduce el pH de la solución y promueve la disolución de metales (Kuyucak,2002).

Por lo general, AMD se caracteriza por cantidades excesivas de sólidos disueltos totales, acidez mineral pronunciada y pH bajo (Akciil and Koldas,2006).

Estas características físicas y químicas representan un entorno extremo que tal vez sea intolerable para la mayoría de formas de vida. No obstante, se ha establecido que la AMD está poblada por distintos microorganismos (en su mayoría procariotas) dotados de nuevos mecanismos celulares adaptativos a las duras condiciones (Johnson and Hallberg,2006)

Los entornos de AMD han sido objeto de intensos estudios de ecología microbiana (Chen et al,2016). Debido a la baja diversidad de las comunidades microbianas de AMD y la simplicidad geoquímica, los entornos de AMD se perciben como sistemas modelo ideales para discernir la ecología microbiana, los procesos y las redes de interacción en conjuntos microbianos naturales (Baker and Banfield,2003; Deneff y col,2010; Kuang y col,2016).

A la luz del papel de algunos habitantes de AMD en su atenuación natural, se percibe que estos microbios son candidatos perfectos para limitar la producción de AMD y promover la biorremediación de sitios existentes (*Johnson and Hallberg, 2005*).

La producción de acidez se ve muy favorecida por la finura de grano de la piritita y se ve influenciada, entre otros factores, por la temperatura, velocidad de penetración del oxígeno, humedad o las características hidrogeológicas del lugar (*Stumm and Morgan, 1981*).

La oxidación del hierro es un mecanismo dependiente del pH y Eh. La actividad microbiana aumenta la velocidad de formación de AMD y puede ser responsable de la mayor parte del AMD generado, principalmente por poblaciones de bacterias quimiolitotróficas acidófilas o neutrofilas, cuyos mecanismos de actuación son diferentes (*Bonnefoy and Holmes, 2012; Dopson and Johnson, 2012; Klein et al, 2013; Ilbert and Bonnefoy, 2013*).

Las principales bacterias oxidantes de Fe en la formación de los AMD son las acidófilas del género *Acidithiobacillus* y las neutrofilas *Gallionella ferrugínea* y *Leptothrix* sp. (*Hedrich et al, 2011; Klein et al, 2013*), aunque pueden contribuir otros grupos, como el *Leptospirillum* sp., que lleva el pH a valores menores de 4, donde ya puede intervenir *Acidithiobacillus* (*Baker and Banfield, 2003; Johnson and Hallberg, 2003; Schippers et al., 2010; Korehi, Bloethe, and Schippers, 2014; Joshi 2014; Jones et al., 2015*).

El principal nutriente de estas bacterias autótrofas es el CO<sub>2</sub> (*Stumm and Morgan, 1981*). También es un importante nutriente el fósforo que se encuentra en trazas en los AMD (*Banks, Younger, Amesen, Iversen, and Banks, 1997*). El fosfato precipita como fosfatos de Fe o es adsorbido a minerales férricos (*Stumm and Morgan, 1981*). Otro nutriente importante es el nitrógeno presente en los nitratos que habitualmente se encuentran en los AMD como consecuencia del uso de explosivos de N en las actividades mineras (*Banks et al., 1997*). Otra fuente importante de N es el amonio, cuya falta puede provocar la reducción de la actividad bacteriana (*Tuovinen, Panda, and Tsuchiya, 1979*).

Mientras que la oxidación del ion ferroso es termodinámicamente favorable, su cinética es muy lenta cuando los valores de pH son menores que cuatro. Sin embargo, las bacterias oxidantes *Acidithiobacillus ferrooxidans* utilizan la energía y pueden aumentar de forma significativa su tasa de oxidación (*IPAT-UNESCO, 2000*). Las bacterias que actúan como catalizadores aceleran esta reacción de 4 a 50 veces, con el consiguiente aumento de la acidez de las aguas (*Johnson and Hallberg, 2003*).



**Figura n.2** Paisaje afectado por drenaje ácido de minas.

Tal y como afirmaron Johnson y Hallberg en su revisión bibliográfica, es considerablemente más rentable tratar el residuo y prevenir las condiciones que causan el deterioro que tratar las aguas ya degradadas (*Johnson & Hallberg, 2005*).

La naturaleza del problema de acidez depende del origen del residuo minero y su grado de meteorización, y esto debe tenerse en cuenta para determinar el método adecuado para el posttratamiento. El uso final deseado del área que ocupan los residuos mineros potencialmente generadores de AMD es también un factor crucial para la elección de las acciones de prevención. Los microorganismos influyen en la movilidad de los metales en el residuo de mina de muchas maneras.

Algunos microorganismos causan una movilización del metal, mientras que otros contribuyen a que la disponibilidad del metal sea limitada (*Solano, 2005; Hallberg, 2010*). La influencia de los microorganismos en la movilidad del metal depende de cuál de estos procesos domina.

Los mecanismos de control de los mecanismos de liberación de iones de metales tóxicos pueden deberse a:

- Bacterias libres que constituyen partículas suspendidas móviles que pueden tener una capacidad de absorción del metal más elevada que las del ambiente circundante.
- Crecimiento de las bacterias, que se lleva a cabo en biopelículas formadas en las superficies de los minerales, lo cual los protege de la solubilización y, en consecuencia, reduce el transporte de los metales.

Además de estos mecanismos, Nancuqueo y Barrie-Johnson indicaron que los microorganismos producen agentes complejantes y otros metabolitos que pueden transformar los metales tóxicos en formas más o menos solubles, afectando el grado de solubilidad y movilidad (*Nancuqueo and Barrie Johnson, 2011, 2014*).

Desde el punto de vista microbiano, las posibles influencias de los microorganismos en el estado químico (especiación) y, en consecuencia, en la movilidad del metal, son numerosas y complejas, abarcando desde procesos directos, como la transformación del metal y la fijación intracelular, a influencias más indirectas a través de la producción de sustancias que hacen que el metal sea más o menos móvil a través de la complejación. Tales procesos pueden ocurrir en el ambiente que prevalece en los residuos mineros con alta concentración de metales y pueden ser determinantes para la magnitud del impacto ambiental de los residuos de mina (*Bernardes de Souza and Mansur, 2011*).

Estas interacciones entre metales y microorganismos pueden perturbarse por la presencia de otros compuestos, como minerales arcillosos, aniones inorgánicos, cationes competentes, materia orgánica complejante, etcétera. Los metales pueden llegar a estar hidratados, quelados o adsorbidos por estos compuestos, lo cual puede hacer que el metal esté menos disponible para la interacción microbiana.

Los microorganismos participan en el ciclo del carbono y por lo tanto influyen en la cantidad y carácter de la materia orgánica, y en la cantidad y tipo de agentes quelantes orgánicos capaces de unirse a los metales. En general, el tamaño del compuesto de coordinación entre el metal y el ligante orgánico determina si el complejo es móvil o inmóvil en el ambiente. La degradación microbiana puede de este modo cambiar los compuestos metal-orgánicos inmóviles a móviles y/o a formas de metal solubles en agua o viceversa. Sin embargo, la coordinación de los iones metálicos con la materia orgánica disminuye su grado de degradación (*Renella, Landi, and Nannipieri, 2004*).

Estas técnicas bactericidas son efectivas para el control de la contaminación del agua durante las fases de laboreo y de preparación de las escombreras, considerándose tecnologías más económicas al minimizar el tratamiento posterior del agua y sus costes asociados (*Ohimain, Andriesse, and Van Mensvoort, 2004*). *Ohimain et al.* señalan la persistencia del cambio que producen estas técnicas en la microbiología de las escombreras una vez desaparecido el bactericida, permitiendo así la estabilidad de la escombrera restaurada (*Ohimain et al., 2004*).

Dentro de estas técnicas microbianas existen hoy en día cuatro líneas de investigación fundamentales: la inhibición bacteriana biológica (*Johnson, Rolfe, Hallberg, and Iversen, 2001; Yang et al., 2008*); el empleo de detergentes aniónicos (*Li, Qi, and Liu, 2009; Urbanová et al., 2011*); el uso de sustancias orgánicas conservantes (*Bhatnagar and Singh, 1991*), y la aplicación de vegetación (*Johnson & Hallberg, 2005*), siendo el empleo de medidas microbiológicas mucho menos dañina para el medio ambiente, siempre que no implique la adición de agentes artificiales.

### 1.3. Etapas en la formación de aguas ácidas.

Los drenajes de minas en operación o abandono generan problemas de contaminación y degradación de los ecosistemas, pudiendo llegar a extinguir la vida acuática.

También imposibilita el uso de estas aguas para consumo humano, debido a su acidez y elevada concentración de metales disueltos como hierro, manganeso, aluminio, arsénico, selenio, cinc, níquel, y otros. Por otro lado, genera daños a las estructuras metálicas y de hormigón, así como la destrucción o desaparición de la vegetación y la fauna de los causes naturales.

Una forma de evitar la formación de aguas ácidas es la neutralización de las mismas, en este sentido la oxidación de una tonelada de piritita produce casi una tonelada de hidróxido férrico y cerca de tonelada y media de ácido sulfúrico. El proceso de formación de aguas ácidas, en su conjunto, también se puede explicar en tres etapas, como se observa en la figura.

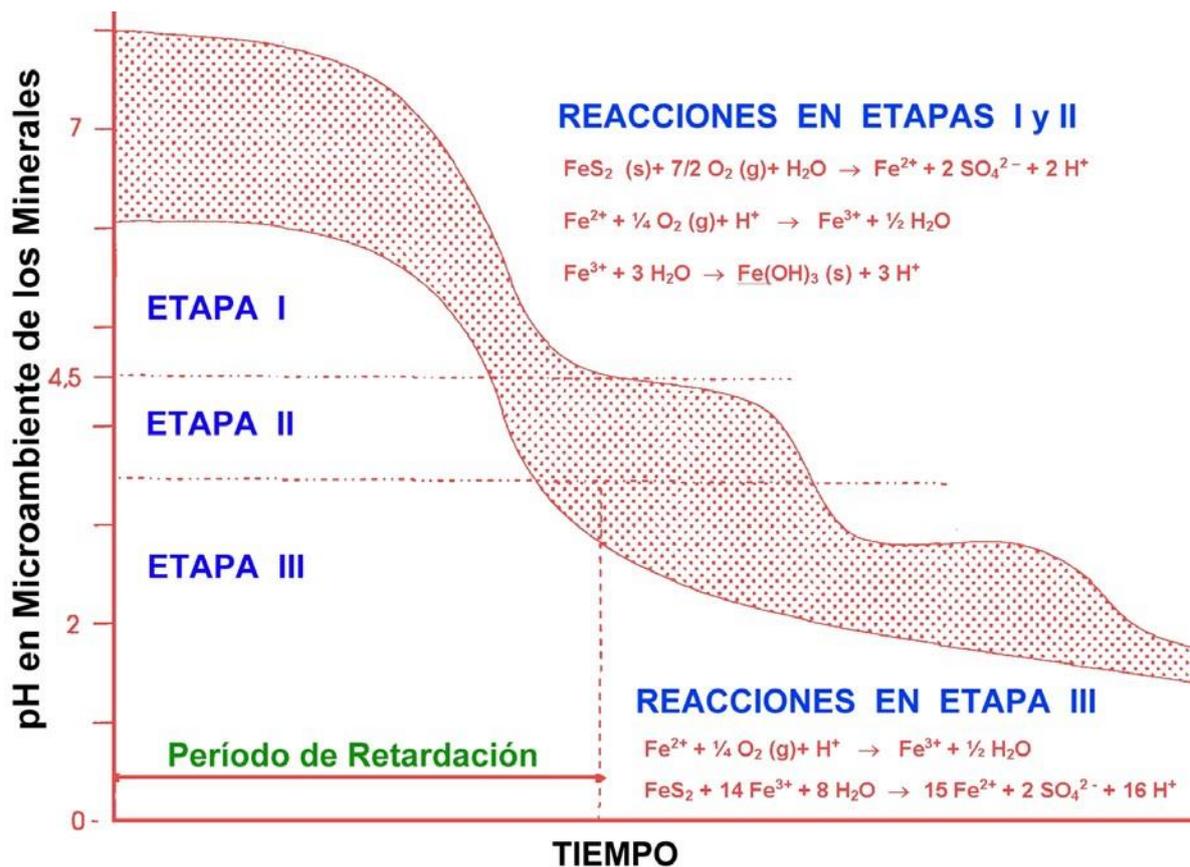


Figura n.3 Etapas en la formación de aguas ácidas. (Aduvire,2011).

**1ª etapa:** La oxidación de minerales sulfurosos libera hierro ferroso que bajo condiciones neutras se oxida químicamente y se transforma a hierro férrico que precipita como hidróxido y aporta acidez al medio. En esta etapa del proceso la velocidad de oxidación es baja en los dos mecanismos de generación ácida (directa e indirecta) y la formación de aguas ácidas por oxidación debida al aire y a las bacterias (fundamentalmente *Acidithiobacillus ferrooxidans*), se producen a un ritmo semejante. Por lo general, la alcalinidad disponible en el medio es suficiente para neutralizar parcialmente la acidez que se ha producido lentamente. (Aduvire,2006).

**2ª etapa:** La acidez acumulada supera la capacidad de neutralización del medio y el pH desciende y predomina la oxidación de la pirita por la acción bacteriana. En la reacción se produce el sulfato ferroso que al ser oxidado nuevamente se transforma en sulfato férrico, y éste a su vez en contacto con el agua da lugar al ácido sulfúrico y al hidróxido férrico, que es insoluble y es el que provoca la coloración amarilla de las aguas. En esta etapa disminuye la eficacia del mecanismo directo (oxidación por el aire) y aumenta mucho la del indirecto. (Aduvire,2006).

**3ª etapa:** Cuando el pH desciende por debajo de 3 en la proximidad de los granos de pirita (aproximadamente 4,5 en el agua), el ion férrico se ve afectado por las reacciones de oxidación-reducción y la acción bacteriana puede lixiviar el sulfuro de hierro directamente a sulfato. En esta etapa varía la generación de ácido al aumentar la solubilidad del hierro y disminuye la precipitación de hidróxido férrico. En resumen, el *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxida el ion ferroso a férrico que a su vez oxida a los sulfuros (pirita) produciendo más ácido. En este momento se producen grandes cantidades de ácido y se deben tener en cuenta los siguientes puntos:

- El mecanismo más importante es el indirecto, ya que es el que se auto cataliza (si se inhibe la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* la producción de ácido se reduce al menos en un 75%). (Aduvire,2006).

- Si el pH del agua sube por encima de 5, igualmente se inhibe la oxidación.

- Si el pH del agua desciende por debajo de 4,5 debe esperarse que todo el sulfuro de hierro termine oxidándose.

- Si el pH desciende por debajo de 2,5 se establece un equilibrio en el que la actividad bacteriana se estabiliza, ya que habrá alcanzado su óptimo de desarrollo (la velocidad de reacción se habrá incrementado entre 105 y 106 veces respecto al mecanismo directo).(Aduvire,2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo principal perseguido en la elaboración del presente Proyecto de Fin de Máster es el de realizar un metaanálisis sobre las bacterias acidófilas de la Península Ibérica, especialmente las asociadas al Drenaje Ácido de Minas.

Para ello se procederá a la recopilación y análisis de información de una diversidad de publicaciones que reúnen información dispersa, tanto por los objetivos de las publicaciones como por la metodología empleada en el análisis de las poblaciones bacterianas.

Por otro lado, al tratarse de un meta análisis, se trata también de comparar y reunir datos publicados con objeto de obtener conclusiones de aplicación en futuros trabajos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son:

- A) *Recopilación y análisis de información a través de la revisión de la literatura disponible de la temática objeto de estudio disponible en diferentes bases de datos.*
- B) *Elaboración de tablas-resumen de aspectos relacionados con la identificación de géneros y especies de bacterias listadas en los artículos.*
- C) *Establecer una asociación entre las bacterias identificadas y su metabolismo (quimiolitotrofos/heterótrofos; aerobios/anaerobios).*
- D) *Enumerar métodos usados para su cultivo e identificación (métodos morfológicos, ecológicos, bioquímicos, moleculares).*
- E) *Descripción de las aplicaciones de estos organismos extremófilos tanto en el campo industrial como en el de la biotecnología además de los diferentes hábitats en los que se distribuyen.*
- F) *Para finalizar, se procederá al análisis de los resultados de los diferentes estudios. Con todo ello se extraerán las conclusiones pertinentes.*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de la literatura científica con base en la adaptación de la metodología PRISMA [Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses] (Urrutia y Bonfill, 2010).

La revisión de la literatura científica es una estrategia de recopilación de información que emerge ante la necesidad de conocer de manera sintética los resultados de las investigaciones.

Las revisiones narrativas son el principal proceso desarrollado para tal fin, sin embargo, presentan dificultades, pues la confiabilidad de éste radica en la experiencia de los investigadores a la hora de realizarlo.

Ante los sesgos que se presentan – como la carencia de un método de selección de artículos, así como la falta de un procedimiento claro y reproducible de identificación, de selección y de filtración de los artículos acorde con su calidad- surgen las revisiones sistemáticas, las cuales, bajo los principios del método científico, dan cuenta de los pasos requeridos para hacer reproducible el proceso investigativo (Pai, et al.2004; Manterola y Zavando, 2009; Sacks et al.1987; Urrutia y Bonfill,2010).

Se han desarrollado metodologías para definir procesos jerárquicos de selección de la literatura científica, teniendo en cuenta criterios de calidad y de disminución de sesgos en la selección de los estudios incluidos en las revisiones sistemáticas, de modo que, hagan posible integrar la información existente filtrada a partir de dichos protocolos, así como sintetizar los hallazgos. (Pai, et al.2004; Manterola y Zavando, 2009; Sacks et al.1987; Urrutia y Bonfill,2010).

**Estrategia de búsqueda:** La búsqueda se realizó en las bases de datos electrónicas *Scopus*, *Web of Science* y *Science Direct* a partir de las siguientes palabras claves: *bacteria*, *Acid Mine Drainage (AMD)*, *pyrite*, *acidic water*, siendo unidos mediante el operador booleano *and*.

Las rutas específicas de búsqueda, se describen a continuación:

#### **Science Direct.**

(( bacteria AND acid AND mine AND drainage AND pyrite AND acidic AND wáter AND (LIMIT-TO(PUBYEAR, 2020) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2019) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2018) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2013) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2010) OR LIMIT TO (PUBYEAR, 2009) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2008) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2007) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2006) OR LIMIT- TO (PUBYEAR, 2005) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2004) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2003) OR LIMIT- TO (PUBYEAR, 2002) OR LIMIT-TO (PUBYEAR,2001) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2000)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE, “English”) OR LIMIT-TO (LANGUAGE, “Spanish”)) AND (LIMIT-TO (DOCUTYPE, “ar”) OR LIMIT-TO (DOCUTYPE, “re”)) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA, “INMU”)).

## Scopus.

(( bacteria AND acid AND mine AND drainage AND pyrite AND acidic AND wáter AND (LIMIT-TO(PUBYEAR, 2020) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2019) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2018) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2017) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2016) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2015) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2014) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2013) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2012) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2011) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2010) OR LIMIT TO (PUBYEAR, 2009) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2008) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2007) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2006) OR LIMIT- TO (PUBYEAR, 2005) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2004) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2003) OR LIMIT- TO (PUBYEAR, 2002) OR LIMIT-TO (PUBYEAR,2001) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2000)) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE, "English") OR LIMIT-TO (LANGUAGE, "Spanish")) AND (LIMIT-TO (DOCUTYPE, "ar") OR LIMIT-TO (DOCUTYPE, "re")) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA, "INMU")) AND (LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Bacteria") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Acid Mine Drainage") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Pyrite") OR LIMIT-TO (EXACTKEYWORD, "Acidiphilum"))).

## Web of Science.

bacteria (Topic) Refined by: Search within topic: Acid Mine Drainage, Search within topic: Pyrite, Search within topic: Acidic Water. Publication Years: ("2000" OR "2001" OR "2002" OR "2003" OR "2004" OR "2005" OR "2006" OR "2007" OR "2008" OR "2009" OR "2010" OR "2011" OR "2012" OR "2013" OR "2014" OR "2015" OR "2016" OR "2017" OR "2018" OR "2019" OR "2020")), Document Types: Articles or Review Articles or Others.

## Google Scholar.

(("bacteria" AND "acid mine drainage" AND "pyrite" AND "acidic water"))).

**Criterios de selección:** Para la selección de los diferentes artículos, se utilizaron los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:**

Artículos originales publicados en inglés y español.

Unidad de estudio: bacterias acidófilas relacionadas con el Drenaje Ácido de Minas.

Artículos publicados en el periodo comprendido entre los años 2000-2020.

Artículos originales publicados en Revisiones, Revisiones sistemáticas, Investigaciones y artículos.

Áreas temáticas: Inmunología y Microbiología.

Artículos disponibles a texto completo.

- **Criterios de exclusión:**

Estudios con un idioma diferente a inglés, como por ejemplo francés y portugués.

Artículos no descargables.

Artículos que no estuvieran relacionados con el objetivo de la revisión.

Artículos en cuyo texto no se nombre a algún género o especie de bacteria.

Artículos en cuyo título traten específicamente de alguna especie de bacteria.

Editoriales, opiniones de expertos, artículos de opinión, capítulos de libros, citas, mini revisiones, ect.

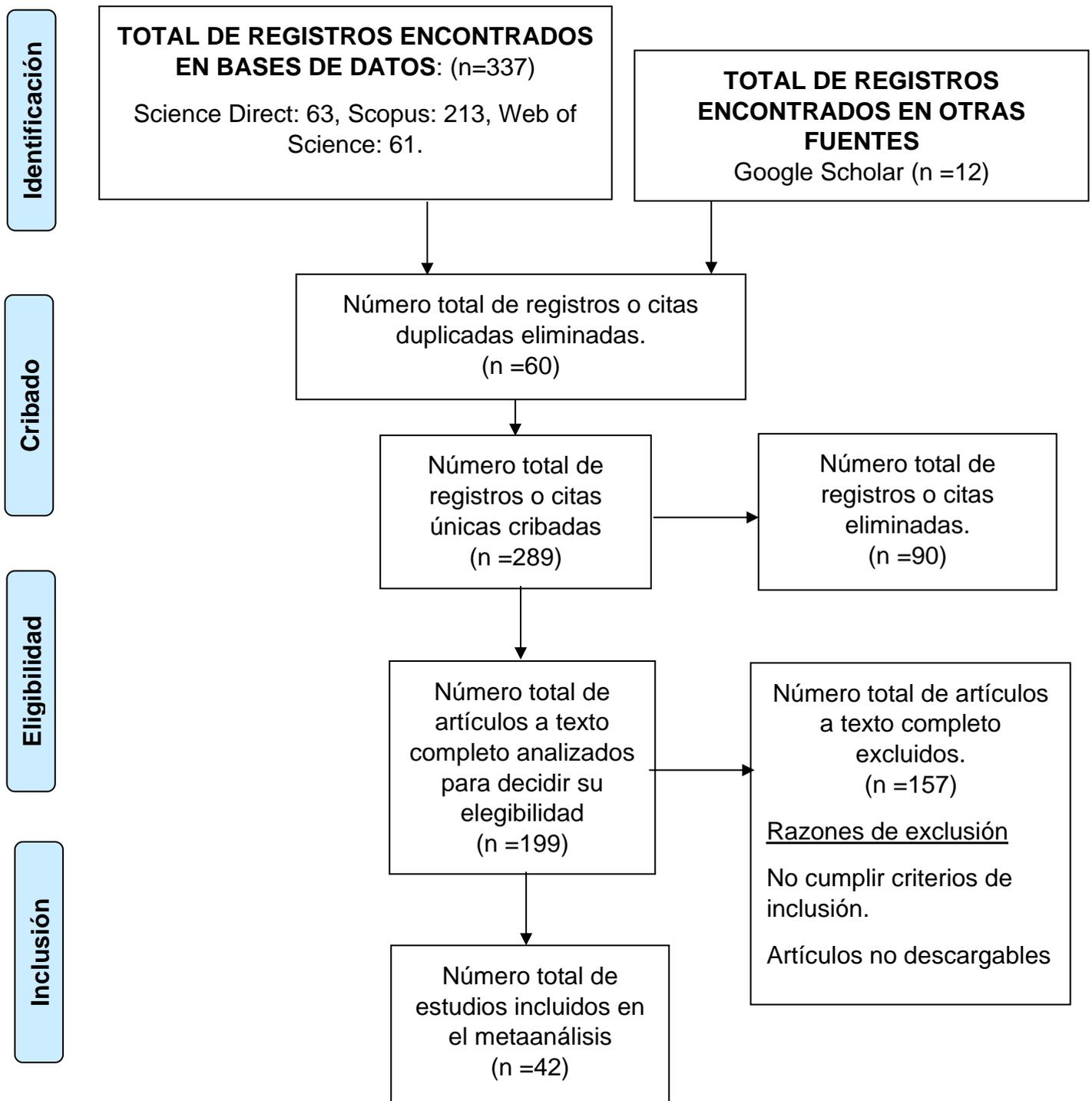


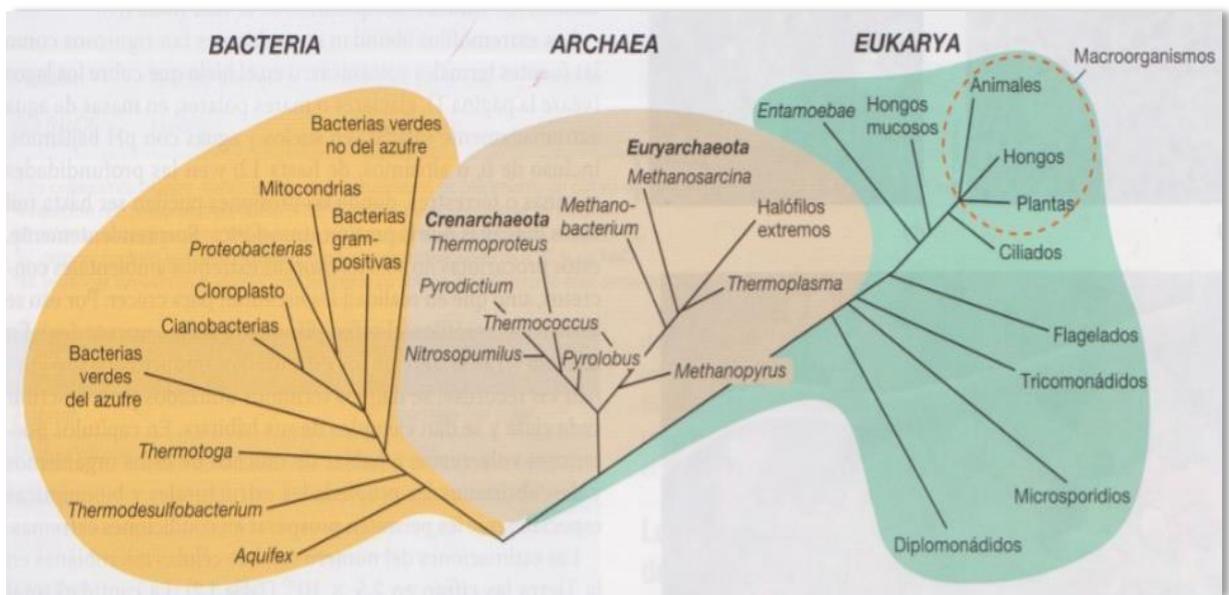
Figura n.4 Diagrama de flujo PRISMA (Urritia and Bonfill,2010).

## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1. Microorganismos extremófilos: Clasificación.

En 1977 Carl Woese, propuso una categoría superior a reino: Dominio, reconociendo tres linajes evolutivos: Archaea, Bacteria, y Eukarya.

Las características para separar estos dominios, son el tipo de célula, compuestos que forman la membrana y estructura del ARN.



**Figura n.5** Árbol filogenético de los tres Dominios de la vida, y algunos ejemplos (Madigan et al,2015).

### Bacterias oxidantes de hierro

Estas bacterias usan el hierro reducido como única fuente de energía.

El taxón mejor conocido por su capacidad de oxidar el hierro es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, es una bacteria gramnegativa, autótrofa, que utiliza el hierro ferroso o compuestos reducidos de azufre y se puede encontrar en drenajes ácidos de minas con pH ácido.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* también es conocida por una enzima llamada rusticianina que está implicada en el proceso de oxidación de hierro

Por otra parte, la arquea *Sulfolobus* también oxida el hierro en condiciones ácidas, pero lo hace si la temperatura es elevada, casi llegando al punto de ebullición del agua. Se le ha encontrado en aguas termales con alto contenido de azufre elemental.

Otra bacteria oxidadora de hierro muy conocida por su relación con procesos de corrosión, es *Gallionella ferruginea*, que oxida  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  sólo si el pH es neutro, lo que genera precipitados de hidróxido de hierro.

*Gallionella*, que es autótrofa, se encuentra en la red de tuberías que transportan agua potable, y también habita en los fondos oceánicos y en las minas de uranio en presencia de otros metales, como plomo, níquel y cobre.

### Bacterias reductoras de hierro

El proceso inverso a la oxidación, se conoce como reducción. Tanto la oxidación como la reducción, son procesos que implican dar o ceder electrones; en este caso en particular el hierro férrico recibe electrones (por lo tanto, es un aceptor), y así queda reducido a ferroso.

Las bacterias reductoras de hierro llevan a cabo un proceso que se denomina “reducción desasimilatoria”, en el que utilizan sulfatos, nitratos o  $CO_2$  como aceptores finales de electrones, y excretan el producto reducido.

Se pueden encontrar en sedimentos de cuerpos de agua dulce y marina, en aguas termales, en aguas residuales y en suelos.

Los taxones más estudiados son *Shewanella*, *Geobacter* y *Geothrix*. Otros microorganismos utilizan el hierro férrico en presencia de sulfuro de hidrógeno (o ácido sulfhídrico  $H_2S$ ), y habitan en ambientes anóxicos como en turberas, en sedimentos de cuerpo de agua como lagos y lagunas, y en sitios en donde se acumula agua con poco oxígeno disuelto, como charcas.

### Bacterias oxidantes de azufre.

Las bacterias oxidantes de azufre usan compuestos reducidos de azufre como fuente de energía. Su pH es neutro o alcalino. Son bacterias de forma filamentosa y suelen ser bacilos Gram negativos, aunque algunos son Gram positivos como el caso de *Sulfobacillus*.

Los donadores de electrones son  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}^0$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . El producto final de la oxidación es  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Las bacterias oxidantes de azufre la oxidación del  $\text{H}_2\text{S}$  ocurre por etapas. Primero se produce  $\text{S}^0$  que algunas bacterias lo depositan en forma de gránulos de reserva energética

En segundo lugar, cuando se agotan las fuentes externas de  $\text{H}_2\text{S}$ , utilizan este azufre elemental almacenado.

En tercer lugar, en aquellas situaciones donde el azufre elemental está disponible mediante fuentes exógenas, el organismo crece adherido a partículas de azufre, dada la alta solubilidad del  $\text{S}^0$ .

Los productos de azufre mencionado, hacen que aumente la concentración de protones por lo que reduce el pH y acidifica el medio. El ácido formado es el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

Dentro de este tipo de bacterias en el dominio Archaea destaca el Orden Sulfolobales como, por ejemplo, *Sulfolobus sp.*

En el dominio bacteria tenemos el Phylum Firmicutes, dentro de éste la clase Bacilli, como por ejemplo *Sulfobacillus sp.*

En el Phylum Proteobacteria tenemos ejemplos en las clases: Alphaproteobacteria como *Acidiphilum sp.*; Betaproteobacterias como, por ejemplo, *Acidithiobacillus thioparus* y Gammaproteobacteria como *Acidithiobacillus sp.*

### Bacterias Nitrificantes

Bacterias que consumen amoníaco, como su única y exclusiva fuente de energía, y producen nitritos mediante la oxidación del oxígeno.

Las bacterias nitrificantes son bacterias quimioautotróficas (sintetizan por sí solas todos los componentes químicos de sus estructuras a partir de elementos químicos simples), o quimiolitotróficas (sintetizan todos los componentes químicos de sus estructuras a partir de compuestos inorgánicos, y obtienen la energía durante este proceso).

Estas bacterias son muy abundantes en la naturaleza, encontrándose en el suelo, en los lagos y en las corrientes de los ríos con elevado contenido en aguas residuales.

El amoníaco que se encuentra en el suelo puede oxidarse y convertirse en nitritos y estos a su vez, posteriormente convertirse en nitratos. El proceso de conversión del amoníaco en nitritos y en nitratos se denomina nitrificación.

La nitrificación es un proceso que se realiza en dos etapas. En la primera el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) se oxida a nitritos por parte de las bacterias oxidantes de amonio y en la segunda, los nitritos son oxidados a nitratos por las bacterias oxidantes de nitritos.

Posteriormente los nitratos pueden convertirse de nuevo en nitrógeno libre por parte de las bacterias desnitrificantes, proceso denominado desnitrificación.

Entre las bacterias desnitrificantes se encuentran muchas bacterias gramnegativas anaerobias facultativas: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp*, *Paracoccus spp*; e incluso una de las bacterias nitrificantes, *Nitrosococcus spp*, ya que esta bacteria participa tanto en la nitrificación como en la desnitrificación. De esta forma el nitrógeno vuelve a la atmósfera completando el ciclo.

### Bacterias reductoras de sulfato

Son bacterias quimiolitotrofas que emplean sulfato como aceptor final de electrones en la degradación de la materia orgánica, proceso denominado sulfato reducción, que da como resultado la producción de  $H_2S$ .

Son ejemplo de estas bacterias, *Desulfotomaculum*, *Desulfosporosinus* entre otras.

Las bacterias reductoras de sulfato son anaerobias estrictas, que usan el sulfato, la forma más oxidada del azufre, como aceptor final de electrones, convirtiéndolo en la forma más reducida, sulfuro.

Además del sulfato, las bacterias reductoras de sulfato, pueden emplear otros compuestos oxidados de azufre como aceptores terminales de electrones, entre ellos los sulfitos y el tiosulfato, intermediarios de la sulfato reducción.

Entre estas bacterias también se encuentran algunas bacterias sulforreductoras facultativas, que utilizan azufre elemental como sustrato respiratorio en ausencia de otros posibles aceptores terminales de electrones tales como sulfato, sulfito, tiosulfato, nitrito o nitrato.

Así, aunque la mayoría de estas bacterias no pueden crecer mediante la reducción elemental de azufre, algunas bacterias de los géneros *Desulfomicrobium* y *Desulfovibrio*, utilizan azufre como un aceptor de electrones alternativo.

Estas bacterias pueden tener un metabolismo heterotrófico, autotrófico, litoautotrófico, o de tipo respiratorio bajo anaerobiosis

Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres que se vuelven anóxicos.

### Bacterias reductoras de azufre

Se caracterizan por su capacidad para reducir el azufre elemental a sulfuro, un proceso denominado sulforeducción.

Varios géneros de arqueas y bacterias quimiorganotróficas poseen la capacidad de oxidar sustratos orgánicos (principalmente péptidos pequeños, glucosa y almidón) anaeróticamente, utilizando  $S^0$  como aceptor final de electrones.

En las arqueas, este proceso de respiración anaerobia se observa mayormente en los géneros *Thermococcus* y *Thermoproteus*, y en menor grado en los géneros *Desulfurococcus*, *Thermophilum* y *Pyrococcus*

Entre las eubacterias, la respiración anaerobia de  $S^0$  es llevada a cabo por bacterias pertenecientes a los géneros *Desulfuromonas*, *Desulfurella* y *Campylobacter*. Estas bacterias acoplan la oxidación de sustratos tales como acetato y etanol a la reducción de azufre elemental a  $H_2S$

La capacidad para reducir azufre elemental se extiende también a bacterias aerobias facultativas quimiorganotróficas pertenecientes a los géneros *Proteus*, y *Pseudomonas*, entre otras, que también exhiben la capacidad de reducir compuestos sulfurados tales como tiosulfato, sulfito y dimetilsulfóxido.

### Bacterias oxidantes de hidrógeno

Las bacterias oxidantes de hidrógeno, son un grupo de autótrofos facultativos que pueden usar hidrógeno como donante de electrones.

Se pueden dividir en aerobios y anaerobios. Los primeros usan hidrógeno como donantes de electrones y oxígeno como aceptor, mientras que los segundos usan sulfato o dióxido de nitrógeno como aceptor de electrones.

Algunas especies de ambos tipos de bacterias, se han aislado en diferentes ambientes, por ejemplo, en aguas dulces, sedimentos, suelos, lodos activados, fuentes termales, respiraderos hidrotermales y agua de filtración

Estos organismos son capaces de explotar las propiedades especiales del hidrógeno (por ejemplo, potencial redox y coeficiente de difusión) gracias a la presencia de hidrogenasas.

Las bacterias aerobias oxidantes de hidrógeno son autótrofas facultativas, pero también pueden tener un crecimiento mixotrófico o completamente heterótrofo.

La mayoría de ellos muestran un mayor crecimiento sobre sustratos orgánicos. El uso del hidrógeno como donante de electrones, junto con la capacidad de sintetizar materia orgánica, a través de la asimilación reductora de  $CO_2$ , caracterizan a las bacterias oxidantes de hidrógeno.

Entre los géneros más representados de estos organismos encontramos: *Caminibacter*, *Aquifex*, *Ralstonia* y *Paracoccus*.

### Bacterias Metanótrofas

Los metanótrofos (a veces llamados metanófilos) son procariotas que metabolizan el metano como fuente de carbono y energía. Pueden ser bacterias o arqueas y pueden crecer de forma aeróbica o anaeróbica, y requieren compuestos de un solo carbono para sobrevivir.

Los metanótrofos son especialmente comunes en o cerca de ambientes donde se produce el metano, aunque algunos metanótrofos pueden oxidar el metano atmosférico.

Sus hábitats incluyen humedales, suelos, marismas, arrozales, vertederos, sistemas acuáticos (lagos, océanos arroyos) y más.

La metanotrofia es un caso especial de metilotrofia, que utiliza compuestos de un solo carbono que son más reducidos que el dióxido de carbono. Sin embargo, algunos metilótrofos también pueden hacer uso de compuestos de múltiples carbonos, lo que los diferencia de los metanótrofos que suelen ser oxidantes exigentes del metano y del metanol.

Los únicos metanótrofos facultativos aislados hasta la fecha son miembros del género *Methylocella silvestris*, *Methylocapsa aurea*, y varias cepas de *Methylocystis*.

#### 4.1.1. Dominio Archaea.

##### Ejemplos

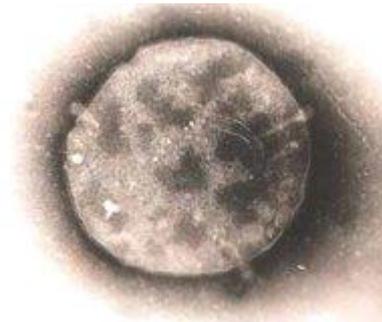


Figura n.6 *Sulfolobus solfataricus*

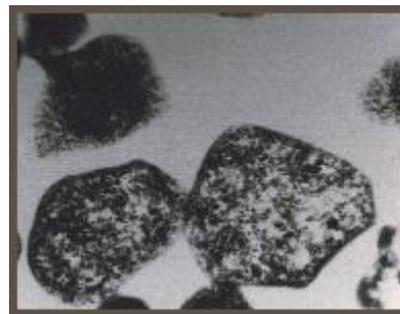


Figura n.7 *Sulfolobus tokodaii*

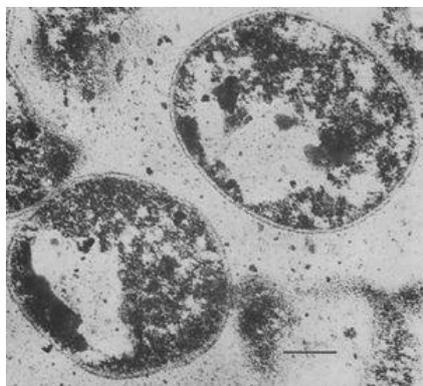
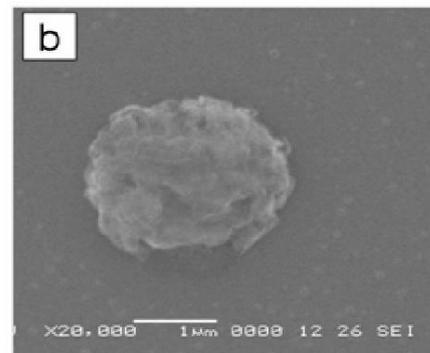


Figura n.8 *Methallosphaera sedula*



1. Scanning electron micrographs of strain

Figura n.9 *Acidianus manzaensis*

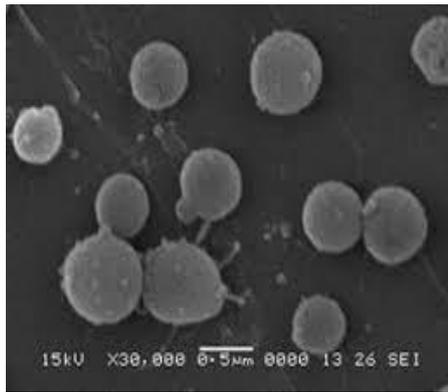


Figura n.10 *Ferroplasma thermophilum*

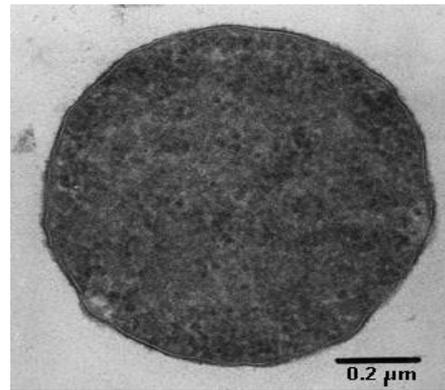


Figura n.11 *Thermoplasma acidophilum*

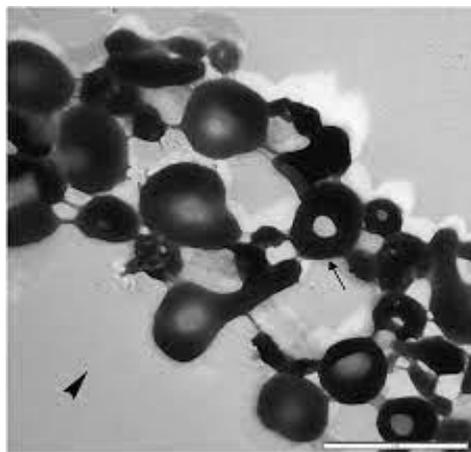


Figura n.12 *Cuniculiplasma divulgatum*

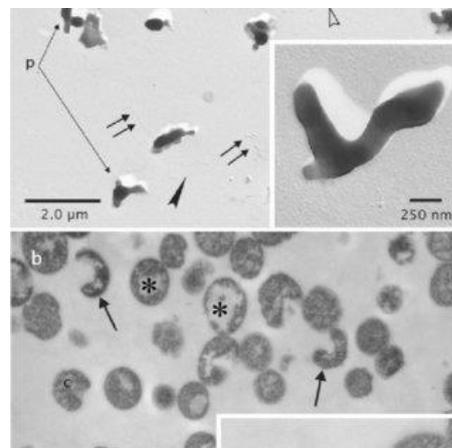


Figura n.13 *Acidiplasma aeolicum*

#### 4.1.2. Dominio Bacteria.

##### Ejemplos



Figura n.14 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

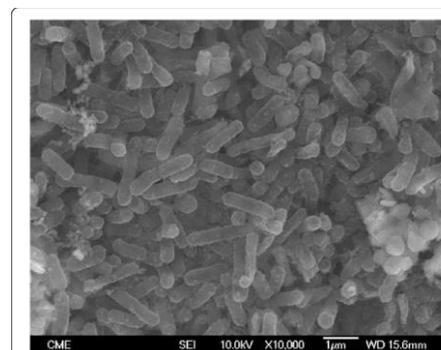


Figura n.15 *Acidithiobacillus thiooxidans*

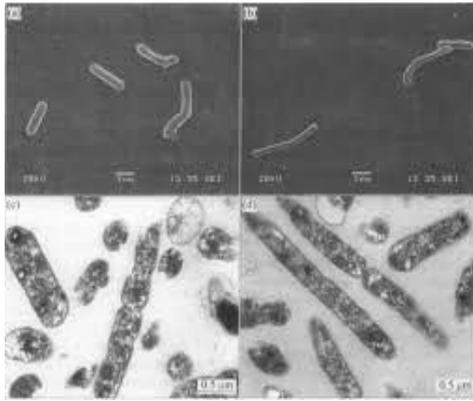


Figura n.16 *Acidithiobacillus albertensis*



Figura n.17 *Acidiphilum cryptum*

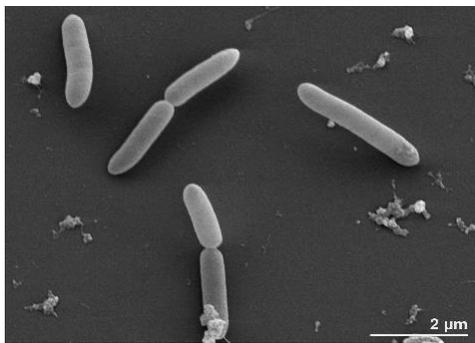


Figura n.18 *Sulfobacillus acidophilus*

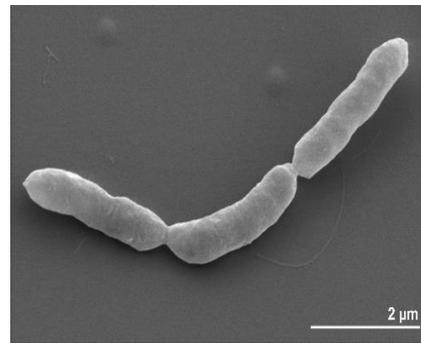


Figura n.19 *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*

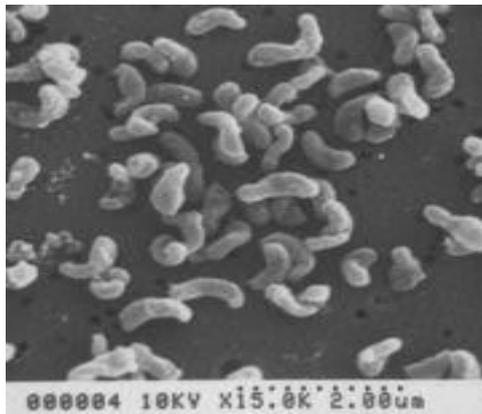


Figura n.20 *Leptospirillum ferrooxidans*

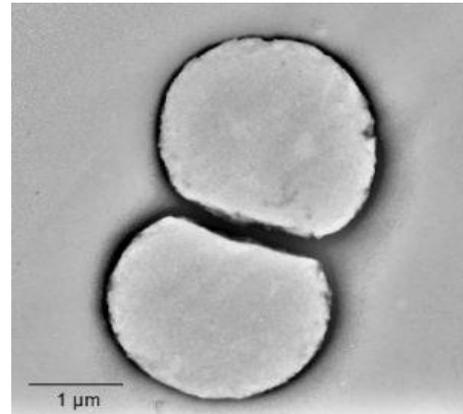


Figura n.21 *Picrophilus torridus*

## 4.2. APLICACIONES DE LAS EXTREMOENZIMAS

La gran biodiversidad existente entre los microorganismos extremófilos y su capacidad para sintetizar proteínas y enzimas (extremoenzimas), capaces de funcionar bajo condiciones extremas, ha abierto un prometedor panorama en la biotecnología, ya que gran parte de los procesos industriales ocurren bajo condiciones extremas de temperatura, presión, fuerza iónica, pH y solventes orgánicos.

Además, las extremoenzimas pueden ser usadas como un modelo para diseñar y construir proteínas con nuevas propiedades de interés para determinadas aplicaciones industriales, a través de la manipulación genética de microorganismos (*Haki y Rakshit,2003; Eijsink y col,2004; Jia y col,2013; Red y col,2013*).

Se han obtenido y caracterizado extremoenzimas provenientes de diferentes grupos de microorganismos extremófilos, muchas de ellas se aplican actualmente en procesos industriales sustentables, como la síntesis enantioselectiva de fármacos (*Littlechild,2015*).

Al ser biodegradable, su empleo es amigable con el ambiente, tienen una alta estabilidad bajo condiciones extremas (lo que elimina la necesidad de modificar las condiciones lo largo de los procesos), permiten la utilización de materia prima sin procesar, permiten una reducción de costos y generan pocos productos secundarios y materiales de desecho (*Reed y col.,2013*).

Las principales industrias que se han visto beneficiadas con el uso de extremoenzimas son las productoras de detergente, la alimentaria, la textil, la peletera, la papelera y la farmacéutica (*Van-Den-Burg,2003; Hasan y col,2010*).

Los termófilos y los hipertermófilos son los grupos de extremófilos más estudiados; las enzimas que han sido aisladas de ellos han sido objeto de diversas investigaciones y aplicaciones industriales y biotecnológicas, ya que son extremadamente termoestables y generalmente resistentes a la acción de agentes caotrópicos, desnaturalizantes, detergentes, solventes orgánicos y a la exposición a valores extremos de pH (*Sarmiento y col,2015*).

La realización de procesos biotecnológicos a elevadas temperaturas tiene muchas ventajas.

El incremento de la temperatura tiene una influencia significativa en la biodisponibilidad y solubilidad de los compuestos orgánicos, en la disminución en la viscosidad y el incremento en el coeficiente de difusión de los compuestos orgánicos (en especial sustrato hidrofóbicos poco solubles, como hidrocarburos y grasas alifáticas), por lo que las velocidades de reacción son más altas (*Van-Den-Burg,2003*).

Esto es especialmente importante en procesos que involucran el manejo enzimático de lípidos y de efluentes industriales ricos en aceites.

En la industria de los alimentos, las lipasas termoestables se requieren para el procesamiento enzimático de algunos lípidos, como la manteca animal y el aceite de

palma, que son los principales materiales utilizados en la producción de ácidos grasos libres, pero se encuentran en estado sólido a las temperaturas normales en las que se llevan a cabo estas reacciones (Haki y Rakshit,2003; Hasan y col,2010).

El ejemplo más conocido de una enzima termoestable es la de la enzima Taq polimerasa asilada de *Termus aquáticus* que significo un avance trascendental en la biología molecular, al permitir la automatización de la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite la amplificación de fragmentos de DNA en unas cuantas horas, lo cual representó una gran ventaja para laboratorios e industrias. (Reed y col,2013).

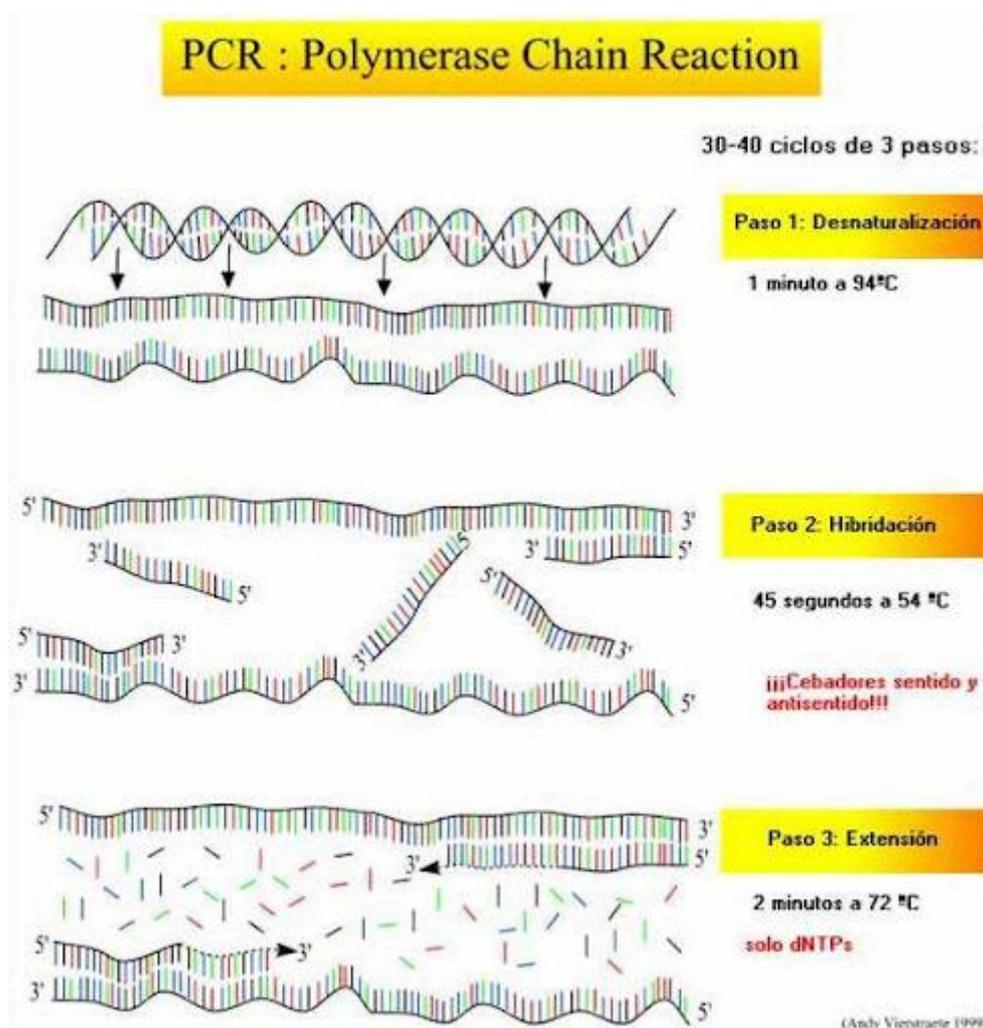


Figura n.22: Reacción en cadena de la enzima polimerasa. (Vierstracte,1999).

Debido a su excelente capacidad para realizar reacciones específicas regioselectivas, en presencia de solventes orgánicos, las lipasas termoestables se usan en la síntesis de compuestos quirales de interés farmacéutico.

A través de reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación, en presencia de solventes orgánicos, las lipasas participan en la síntesis de compuestos enantioméricamente puros, que se recomiendan particularmente en el campo de los farmoquímicos y sus intermediarios sintéticos, también llamados bloques de construcción quiral, debido a las diferencias en las propiedades biológicas de dos enantiómeros (*Gotor-Fernández y col,2006*).

Por otro lado, los procesos biocatalíticos son más eficientes, se acompañan de menos reacciones secundarias y son ambientalmente aceptables, en contraste con los métodos químicos convencionales que utilizan catalizadores a base de metales pesados (*Gavrilescu y Chisti,2005*).

La combinación de procedimientos químicos con métodos biocatalíticos puede resultar una excelente estrategia para la producción de la industria farmacéutica y de productos químicos finos en general (*Simon y col,2013*).

Una aplicación muy exitosa de las enzimas termófilas y alcalófilas ha sido como aditivos de los detergentes biológicos, para la remoción de depósitos orgánicos en la ropa, como grasas y aceites.

Se han utilizado enzimas del tipo de las amilasas, proteasas, celulasas y lipasas, que además de ser activas a altas temperaturas y en las condiciones alcalinas de las aguas de lavado, son resistentes a los componentes de los mismos (*Hasan y col,2010*).

Las enzimas de los psicrófilos, que catalizan reacciones a bajas temperaturas, tienen también un gran potencial de aplicación en la biotecnología y en la industria. Por ejemplo, la aplicación de enzimas hidrolíticas, como proteasas, lipasas, amilasas y celulasas, en la formulación de detergentes, ofrecen la gran ventaja de reducir el consumo de energía y el deterioro de las telas al llevar a cabo el lavado en frío (*Cavicchioli y col,2011; Sarmiento y col,2015*).

Las enzimas psicrófilas se han utilizado también en la industria de los alimentos, por ejemplo, para la extracción y clarificación de jugos de frutas con pectinasas, y en el caso de las proteasas, como aditivos en la industria de alimentos para el ablandado y la potenciación del sabor en carnes refrigeradas (*Cavicchioli y col,2011; Reed y col,2013*).

En el área ambiental, las lipasas, oxidasas, peroxidasas y catalasas de termófilos y psicrófilos, se han utilizado como alternativa a los métodos fisicoquímicos de biorremediación de sólidos y aguas residuales contaminados con hidrocarburos, aceites y lípidos (*Hasan y col,2006*).

Algunas enzimas de alcalófilos y acidófilos se han utilizado en la producción de detergentes y en el procesamiento de almidón.

De manera particular, algunas enzimas alcalófilas, tales como xilanasas, lipasas y proteasas, ya se producen a gran escala para ser utilizadas en diferentes aplicaciones, como en el depilado del cuero, que se lleva a cabo a pH entre 8 y 10, y en la

recuperación de plata a partir de placas de rayos X, donde la proteólisis ocurre a pH 10 (Horikoshi, 1999; Wiegel y Kevbrin, 2004).

Tipo	Microorganismos	Enzimas	Aplicación
Termófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i> sp.</li> <li>• <i>Streptomyces</i> sp.</li> <li>• <i>Bacillus licheniformis</i></li> <li>• <i>Trichoderma</i> sp.</li> <li>• <i>Bacillus</i> sp.</li> <li>• <i>Geobacillus</i> sp.</li> <li>• <i>Bacillus</i> sp.</li> <li>• <i>Thermus aquaticus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Glucosilhidrolasas (amilasas, glucoamilasas, celulasas)</li> <li>• Quitinasas</li> <li>• Xilanasas</li> <li>• Lipasas, esterases</li> <li>• DNA polimerasas</li> <li>• Deshidrogenasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes, hidrólisis en alimentos y bebidas, panificación</li> <li>• Procesamiento de almidón, celulasas, pectinas y procesamiento de textiles</li> <li>• Modificación de quitina para uso farmacéutico y alimenticio</li> <li>• Blanqueo de papel</li> <li>• Detergentes, modificación de grasas y lácteos, reacciones estero-específicas y biosíntesis orgánicas, biocatálisis en disolventes orgánicos y curtido de pieles</li> <li>• Biología molecular (PCR)</li> <li>• Reacciones de óxido-reducción</li> </ul>
Psicrófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Pseudoalteromonas</i> sp.</li> <li>• <i>Cytophaga</i> sp.</li> <li>• <i>Vibrio</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Amilasas</li> <li>• Deshidrogenasas</li> <li>• Lipasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes, industria de alimentos</li> <li>• Detergentes y panificación</li> <li>• Biosensores</li> <li>• Detergentes, alimentos y cosméticos</li> </ul>
Halófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Halobacterium</i> sp.</li> <li>• <i>Haloarcula</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas</li> <li>• Deshidrogenasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síntesis de péptidos</li> <li>• Biocatálisis en disolventes orgánicos</li> </ul>
Alcalófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteasas, celulasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detergentes e industria de los alimentos</li> </ul>
Acidófilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus acidocaldarius</i></li> <li>• <i>Desulfurolobus</i> sp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amilasas, glucoamilasas</li> <li>• Proteasas y celulasas</li> <li>• Oxidasas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento de almidón</li> <li>• Componentes de alimentos</li> <li>• Desulfuración del carbono</li> </ul>

**Tabla n.1** Clasificación de los microorganismos extremófilos y ejemplos de aplicación de sus enzimas: clasificación y algunas aplicaciones enzimáticas (Van-Den-Burg, 2003; Hassan y col, 2010)

### 4.3. PRODUCTOS DE LOS EXTREMÓFILOS Y SU APLICACIÓN.

#### Biominería

La biominería se refiere a la extracción de metales de minerales sulfídicos y concentrados utilizando las capacidades de los microorganismos quimiolitotróficos acidófilos para acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurados (Rawlings and Johson, 2007).

La biominería se inicia con el descubrimiento de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a mediados de la década del cuarenta.

Las investigaciones iniciales mostraron que las bacterias fueron eficaces en la biooxidación de la pirita y la biolixiviación de sulfuros de cobre como la calcopirita, enargita y covelina.

---

Biolixiviación: La recuperación de metales base (como cobre, cobalto, níquel, zinc, uranio entre otros), allí la bacteria cataliza el proceso de disolución del metal.

Biooxidación: Empleo de las bacterias para eliminar la interferencia del sulfuro que contiene ocluido el oro y/o plata, ya que los metales (hierro y arsénico entre otros) que acompañan al sulfuro no tienen valor comercial en este tipo de procesos.

---

En lo referente a las bacterias del hierro, tienen su parte relevante en la oxidación del mineral pirita ( $\text{FeS}_2$ ), tiene lugar en las minas de carbón, cuando las rocas que contienen pirita se someten a movimiento, la pirita entra en contacto con las bacterias, estas acidifican el medio, provocando el fenómeno de drenaje ácido de minas.

*Acithiobacillus ferrooxidans*: Se desarrollan cuando la temperatura oscila entre 20-30°C y el pH es moderadamente ácido (entre 2-4). Son mesófilos y acidófilos. Es el tipo más común de bacteria en los depósitos residuales de minas. Incrementan la proporción de pirita en los depósitos de carbón.

El proceso de oxidación que realizan, aparte de ser perjudicial para el medio colindante, puede ser beneficioso para el ser humano, ya que permite la separación de materiales como el cobre y el uranio (biolixiviación).

*Leptospirillum ferrooxidans*: Se desarrollan cuando la temperatura oscila entre 30-50°C y pH entre 1-2. Se encuentran en las aguas profundas de las minas, envueltas en un biofilm rosado que flota sobre la superficie del agua que surge de la mina. Son utilizados para la extracción de metales de los minerales. (biooxidación).

Las bacterias del azufre, presentan gran importancia biotecnológica y ecológica, ejemplo de ello puede ser la biominería o la biolixiviación de minerales como el uranio y el cobre. (Los minerales se liberan del mineral por solubilización con el ácido sulfúrico derivado de la oxidación del azufre en la membrana de las bacterias oxidadoras del azufre como *Acidithiobacillus*.)

Participan también en la desulfuración del carbón ayudando a separar el azufre inorgánico de éste.

Lo transforman en un compuesto soluble en agua para evitar que en la combustión se produzca SO<sub>2</sub>, un gas contaminante, que en la atmósfera da lugar a lluvia ácida.

A pesar de las aparentes ventajas que presenta la biominería sobre las otras alternativas, fundamentalmente, desde el punto de vista ambiental, y que los nuevos depósitos minerales descubiertos tienen bajas leyes haciendo aún menos rentables las operaciones pirometalúrgicas, el impacto de esta tecnología en las operaciones comerciales, es relativamente bajo (15% de la producción mundial para el caso del cobre y 5% para el oro, siendo prácticamente despreciable para el resto de los metales).

Sin duda, los procesos extractivos podrían mejorarse significativamente en velocidad y en eficiencia, a menores valores de pH e incluso a mayores valores de temperatura.

Para la modificación de estas y otros parámetros durante el proceso extractivo, los microorganismos utilizados deberían ser capaces de desarrollarse adecuadamente bajo esas condiciones.

En las últimas décadas, la modificación genética de los microorganismos se convirtió en una herramienta fundamental para el mejoramiento de procesos biotecnológicos en muchas áreas.

Sin embargo, en procesos como los de la biominería, que se desarrollan esencialmente “en campo”, bajo condiciones no completamente controladas y en ambientes no estériles, se descarta cualquier intento de mejoramiento genético de las especies.

Es por eso, que la búsqueda de extremófilos constituye frecuentemente el punto de partida para mejorar procesos biotecnológicos de interés o incluso para generar nuevos procesos.

En el caso de la biominería, son importantes los extremófilos con determinadas características fisiológicas pero que además se desarrollen en medios con bajos valores de pH (acidófilos), a altas temperaturas (termófilos o hipertermófilos) y que sean muy resistentes (o al menos, tolerantes) a altas concentraciones de metales pesados.

Por otro lado, la fuerte presión de la sociedad por disminuir el impacto ambiental de la minería, ha puesto el foco en la necesidad de disminuir las operaciones mineras tanto como sea posible.

Las estrategias más relevantes de la metalurgia extractiva implican la extracción de rocas de la mina, generando enormes hoyos en el lugar de la mena (en el caso de una minería a cielo abierto) o grandes extensiones de túneles y galerías (en la minería subterránea) que provocan cambios hidrogeológicos (y paisajísticos) significativos; a esto deben sumarse operaciones de acondicionamiento del mineral (trituración y molienda) que generan polvo y alto impacto ambiental.

La perspectiva de contar con microorganismos más eficientes y rápidos, abre la posibilidad de implementar estrategias “in situ” donde fracturas controladas dentro de la mena permiten el drenaje de soluciones lixiviantes y microorganismos para actuar en todo el cuerpo minero; los lixiviados son posteriormente retirados para la recuperación de los metales solubilizados.

Estas operaciones “in situ” auxiliadas por la acción de microorganismos lixiviantes de alta eficiencia, permitirán una minería capaz de extraer de los recursos naturales necesarios para el mantenimiento del estándar tecnológico de nuestra sociedad moderna, y con mínimo impacto ambiental.

El estrés provocado por las drásticas condiciones ambientales ha seleccionado aquellas poblaciones de microorganismos capaces de sintetizar compuestos que protegen a la célula del estrés ambiental en un amplio rango de salinidad o temperatura.

Estos productos denominados extremolitos o solutos compatibles, mantienen el balance de agua y protegen a las macromoléculas biológicas.

Desde el punto de vista químico, son moléculas diversas; en los organismos mesófilos las más frecuentes son: aminoácidos (prolina), azúcares (trehalosa), betainas (glicina, betaina), ácido aminosulfónico (taurina) (*Bonaterre y col, 2005*); mientras que los termófilos sintetizan altas concentraciones de derivados de mioinositol (DIP), en el caso de las *Thermotogales*, o diglicerol fosfato (DGP y cDGP) acumulado por algunas arqueobacterias termófilas y metanógenas (*Lenzen y Schwarz, 2006*).

Desde el punto de vista biotecnológico estos compuestos son interesantes para la estabilización de macromoléculas, enzimas y como protectores celulares por su respuesta al estrés hídrico (*Margesin y Schinner, 2001*).

Uno de los más frecuentes es la ectoína, que en el caso de *Halomonas elongata* puede incrementar sus niveles en un 50%, cuando la concentración de NaCl es del orden del 20%, lo que permite estabilizar la actividad enzimática de lipasas, amilasas, celulasas o proteasas (*Sauer y Gallinski, 1998*).

La trehalosa es un osmolito que puede ser utilizado como crioprotector, o bien el diglicerol fosfato, producido por *Arqueolobus fulgidus*, que es un potente estabilizador de proteínas frente a la temperatura (*Margesin y Schinner, 2001*). Otro de los productos utilizados como moléculas para el reconocimiento celular son las lectinas, especialmente la concanavalina A, producida por arqueobacterias halófilas que se usan como indicadores de las modificaciones de la superficie celular en la detección de células malignas (*Lei y Chang, 2007*).

### Biopolímeros

De gran interés biotecnológico en la industria farmacéutica son los biopolímeros extracelulares de diversos organismos extremófilos, como el polígama-D-glutámico (PGA) con propiedades de espesante y humectante (*Kunioka, 1997*), o la capa S de

las arqueobacterias, que contiene una glicoproteína situada en la parte exterior de la célula y que tiene la propiedad de auto ensamblarse, formando una malla altamente regular, que ha despertado gran interés en la nanotecnología (Sara y col,2006).

En lo concerniente al desarrollo alternativo de los plásticos y de nuevas aplicaciones en el campo de la biomedicina, se han utilizado muy poco los organismos extremófilos, posiblemente debido a las dificultades de su manipulación, a pesar de que, algunos de ellos son capaces de acumular hasta el 60% del peso seco de polihidroxi-alcanoato (PHA), como es el caso de *Haloferax mediterranei* (Hezayen y col,2000).

Otro grupo importante de biopolímeros son los exopolisacáridos (EPS), compuestos de alto peso molecular que los microorganismos secretan al medio ambiente y que pueden actuar adhesinas favoreciendo la asociación entre macroorganismos. Estas biomoléculas son utilizadas en diversas áreas industriales, ya que pueden actuar como emulsificantes, espesantes, antioxidantes y quelantes (Freitas y col,2011).

Diversos organismos extremófilos tales como, los halófilos de los géneros *Haloterrigena* y *Halomonas*, termo acidófilos de los géneros *Sulfolobus* y *Thermococcus* y termófilos del género *Bacillus*, producen biopolímeros con propiedades emulsificantes y antioxidantes (Squillaci y col,2016).

#### Biotensoactivos y emulsionantes

La colonización de hábitats altamente salinos y con alto contenido de material oleoso, como los yacimientos petrolíferos, ha actuado como agente de presión selectiva sobre microorganismos productores de biotensoactivos (Khire, 2010).

Estos compuestos anfífilos que tienen la capacidad de solubilizar fases inmiscibles, son producidos por bacterias en hábitats con un alto grado de salinidad, hidrofobicidad y temperatura.

Se han detectado tensoactivos producidos por microorganismos termófilos tales como *Bacillus sterothermophilus* o bien a partir del termófilo halófilo *Methanobacterium thermoautotro phicum*. En el otro extremo de la escala está *Arthrobacter protophormiae*, microorganismo psicrófilo asilado de la Antártida (Khire, 2010).

Otra estrategia para proteger a la célula y permitir la emulsificación de nutrientes en hábitats psicrófilos, es la acumulación de material extracelular alrededor de la célula.

Estas matrices extracelulares están formadas por diversos materiales, como exopolisacáridos, y por vesículas derivadas de la membrana externa. Debido a que tienen una alta capacidad emulsionante, poseen un gran potencial biotecnológico en la industria farmacéutica y cosmética (Frias y col, 2010).

#### 4.4. ESPECIES BACTERIANAS DE LA FPI

Título artículo	Autor/es	Año	Hallazgos
<i>The microbiology of acidic mine water</i>	Johnson and Hallberg	2003	<i>Acidiphilum cryptum</i> <i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Desulfosporosinus orientis</i> <i>Desulfotomaculum spp</i> <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> <i>Ferrimicrobium spp</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i> <i>Ferroplasma acidiphilum</i> <i>Gallionella ferruginea</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Leptothrix discophora</i> <i>Metallosphaera sedula</i> <i>Sulfobacillus spp</i> <i>Sulfolobus metallicus</i> <i>Thermoplasma acidophilum</i> <i>Thiomomas spp</i>
<i>Microbial communities in acid mine drainage</i>	Baker and Banfield	2003	<i>Acidianus brierleyi</i> <i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> <i>Acidiphilum cryptum</i> <i>Acidithiobacillus acidophilus</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidobacteria spp</i>

			<p><i>Acidobacterium capsulatum</i>  <i>Ferromicrobium acidarmanus</i>  <i>Ferromicrobium acidophilus</i>  <i>Ferromicrobium spp</i>  <i>Ferroplasma acidarmanus</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>  <i>Metallosphaera prunae</i>  <i>Metallosphaera sedula</i>  <i>Metallosphaera spp</i>  <i>Sulfobacillus acidophilus</i>  <i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>  <i>Sulfobacillus spp</i>  <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>  <i>Thermoplasma spp</i></p>
<p><i>Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River.</i></p>	<p>Toril et al</p>	<p>2003</p>	<p><i>Acidiphilum cryptum</i>  <i>Acidiphilum multivorum</i>  <i>Acidiphilum organovorum</i>  <i>Acidiphilum spp</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Thermoplasma acidophilum</i></p>

<p>Diversity of Microorganism in Fe-As-Rich Acid Mine Drainage Waters of Carnoules, France.</p>	<p>Bruneel et al</p>	<p>2005</p>	<p><i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus plumbophilus</i> <i>Desulfobacterium indolicum</i> <i>Desulfomonile tiedjei</i> <i>Gallionella ferruginea</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Thiomonas spp</i></p>
<p>Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine</p>	<p>Okabayashi et al</p>	<p>2005</p>	<p><i>Acidiphilum cryptum</i> <i>Acidiphilum organovorum</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acithiobacillus plumbophilus</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p>Biological manganese removal from acid mine drainage in constructed wetlands and prototype bioreactors.</p>	<p>Hallberg and Johnson</p>	<p>2005</p>	<p><i>Leptothrix discophora</i></p>
<p>Macroscopic Streamer Growths in Acidic, Metal-Rich Mine Waters in North Wales Consist of Novel and Remarkably Simple Bacterial Communities</p>	<p>Hallberg et al</p>	<p>2006</p>	<p><i>Acidimicrobium sp</i> <i>Acidimicrobium sp</i> <i>Acidiphillum sp</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidobacterium capsulatum</i> <i>Actinobacteria sp</i> <i>Ferrimicrobium sp</i> <i>Ferromicrobium acidophillum</i> <i>Ferroplasma sp</i> <i>Gallionella ferruginea</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Leptospirillum sp</i></p>

			<i>Nitrospirae sp</i> <i>Sulfobacillus sp.</i>
<i>Diversity of microorganism in Fe-As-rich acid mine drainage waters of Carnoulès, France</i>	<i>Bruneel et al</i>	2006	<i>Acidithiobacillus ferroxidans</i> <i>Acidithiobacillus plumbophilus</i> <i>Desulfobacterium indolicum</i> <i>Desulfomonile tiedjei</i> <i>Gallionella ferruginea</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Thiomonas sp</i>
<i>Activity and Diversity of Fe (III)-reducing bacteria in a 3000-year-old acid mine drainage site analogue</i>	<i>Adams et al</i>	2007	<i>Acidimicrobium spp</i> <i>Acidiphilum cryptum</i> <i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Ferroplasma acidiphilum</i> <i>Geobacter spp</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
<i>. Bacterial diversity and community structure in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China.</i>	<i>Yang et al</i>	2007	<i>Acidiphilum sp</i> <i>Acidithiobacillus ferroxidans</i> <i>Acidithiobacillus sp</i> <i>Acidobacteria sp</i> <i>Acidocella sp</i> <i>Acidosphaera rubrifaciens</i> <i>Actinobacteria sp</i> <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Leptospirillum sp</i> <i>Nitrospira sp</i>
			<i>Acidimicrobium ferroxidans</i>

<p><i>Characterization of a Bacterial Community in an Abandoned Semiarid Lead-Zinc Mine Tailing Site.</i></p>	<p>Mendez et al</p>	<p>2008</p>	<p><i>Acidiphilium acidophilum Acidithiobacillus ferrooxidans Ferrimicrobium acidiphilum Leptospirillum ferriphilum Leptospirillum ferrooxidans Sulfobacillus thermosulfidooxidans Sulfobacillus yellowstonesis</i></p>
<p><i>Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site</i></p>	<p>Tan et al</p>	<p>2009</p>	<p><i>Acidithiobacillus ferrooxidans Desulfosarcina variabilis Ferromicrobium acidiphilum Ferroplasma myxofaciens Leptospirillum ferrodiazotrophum Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p><i>Biofilm Bacterial Community Structure in Streams Affected by Acid Mine Drainage</i></p>	<p>Lear et al</p>	<p>2009</p>	<p><i>Acidiphilium spp Acidisphaera spp Acidithiobacillus ferrooxidans Acidithiobacillus thiooxidans Acidobacterium capsulatum Acidocella spp Ferrimicrobium acidiphilum Gallionella ferruginea Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p><i>Community Genomic and Proteomic Analyses of Chemoautotrophic Iron-Oxidizing “Leptospirillum rubarum (Group II) and Leptospirillum ferrodiazotrophum” (Group III) Bacteria in Acid Mine Drainage Biofilms.</i></p>	<p>Aliaga et al</p>	<p>2009</p>	<p><i>Hydrogenobacter thermophilus Leptospirillum ferriphilum Leptospirillum ferrodiazotrophum Leptospirillum rubarum Methanococcus maripaludis</i></p>

<p><i>Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination</i></p>	<p>Martins <i>et al</i></p>	<p>2009</p>	<p><i>Desulfobulbus rhabdoformis</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>Desulfovibrio fructosivorans</i></p>
<p><i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> gen. nov., sp nov and <i>Ferrithrix thermotolerans</i> gen. nov., sp nov.: Heterotrophic iron-oxidizing extremely acidophilic actinobacteria</p>	<p>Johnson <i>et al</i></p>	<p>2009</p>	<p><i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidocella facilis</i> <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> <i>Ferrithrix thermotolerans</i></p>
<p><i>Metals tolerance in moderately thermophilic isolated from a spent copper sulfide heap, closely related to Acidithiobacillus caldus, Acidimicrobium ferrooxidans and Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i></p>	<p>Watkin <i>et al</i></p>	<p>2009</p>	<p><i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> <i>Acidimicrobium sp</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Sulfobacillus sp</i> <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i></p>
<p><i>Analysis of iron-and sulfur-oxidizing bacteria in a treatment plant of acid rock drainage from a Japanese pyrite mine by use of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit gene</i></p>	<p>Kamimura <i>et al</i></p>	<p>2010</p>	<p><i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus denitrificans</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Leptospirillum spp</i></p>
<p><i>Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea in industrial biomining of minerals</i></p>	<p>Orell <i>et al</i></p>	<p>2010</p>	<p><i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i> <i>Ferroplasma acidiphilum</i></p>

			<p><i>Metallosphaera sedula</i>  <i>Pseudomonas syringae</i>  <i>Sulfolobus acidianus</i>  <i>Sulfolobus acidocaldarius</i>  <i>Sulfolobus metallicus</i>  <i>Sulfolobus metallicus</i>  <i>Sulfolobus solfataricus</i></p>
<p><i>GeoChip-Based Analysis of the Functional Gene Diversity and Metabolic Potential of Microbial Communities in Acid Mine Drainage.</i></p>	Xie et al	2011	<p><i>Acidimicrobium spp</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus sp</i>  <i>Anabaena variabilis</i>  <i>Ferromicrobium spp</i>  <i>Ferroplasma sp</i>  <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>  <i>Leptospirillum rubarum</i>  <i>Methylocapsa acidiphila</i>  <i>Nitrosococcus oceani</i>  <i>Nitrosomonas sp</i>  <i>Paenibacillus macerans</i>  <i>Rhodospirillum rubrum</i>  <i>Sulfobacillus spp</i></p>
<p><i>Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy</i></p>	Kimura et al	2011	<p><i>Acidithiobacillus caldus</i>  <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>  <i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Alicyclobacillus spp</i>  <i>Ferromicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Ferrovum myxofaciens</i>  <i>Gallionella ferruginea</i>  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Ralstonia pickettii</i>  <i>Sufobacillus spp</i>  <i>Sulfobacillus spp</i></p>
<p><i>Mine Waters: Acidic to Circumneutral</i></p>	Nordstrom	2011	<p><i>Acidimicrobium sp</i>  <i>Acidiphilum sp</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus sp</i></p>

			<p><i>Ferroplasma acidarmanus</i> <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Leptospirillum rubarum</i> <i>Sulfobacillus sp</i></p>
<p>Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal Acid Mine Effluent (Iberian Pyrite Belt, Spain).</p>	<p>Toril et al</p>	<p>2011</p>	<p><i>Acidiphilium angustum</i> <i>Acidiphilium cryptum</i> <i>Acidiphilium sp</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidobacterium sp</i> <i>Acidosphaera sp</i> <i>Desulfosporosinus sp</i> <i>Leptospirillum ferridiazotrophum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Thermoplasmata sp</i> <i>Thermoplasmatales sp</i></p>
<p>Quantification of Tinto River Sediment Microbial Communities: Importance of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Role in Attenuating Acid Mine Drainage.</p>	<p>Andrea et al</p>	<p>2012</p>	<p><i>Acidiphilium sp</i> <i>Acidiphilium sp</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus sp</i> <i>Acidobacterium capsulatum</i> <i>Acidobacterium sp</i> <i>Bacillus sp</i> <i>Clostridium sp</i> <i>Desulfoporosinus sp</i> <i>Desulfosporosinus sp</i> <i>Desulfurella genera</i> <i>Desulfurella sp</i> <i>Desulfurella sp</i> <i>Ferroplasma sp</i> <i>Sulfobacillus sp</i> <i>Thermodesulfobium sp</i></p>
<p>. Microbial Diversity and Its Relationship to Physicochemical Characteristics of the Water in Two Extreme Acidic Pit Lakes from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain).</p>	<p>Santofimia et al</p>	<p>2013</p>	<p><i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Ferroplasma myxofaciens</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> <i>Leptospirillum spp</i></p>

<p><i>Evolution of Microbial “Streamer” Growths in an Acidic, Metal-Contaminated Stream Draining an Abandoned Underground Copper Mine.</i></p>	<p>Kay et al</p>	<p>2013</p>	<p><i>Acidiphilum rubrum</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithrix ferrooxidans</i> <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i> <i>Ferrovum myxofaciens</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p><i>New cultivation medium for “Ferrovum” and Gallionella-related strains</i></p>	<p>Tischler et al</p>	<p>2013</p>	<p><i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus albertensis</i> <i>Acidithiobacillus curpithermicus</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Ferrithrix termotolerans</i> <i>Ferromicrobium acidiphilum</i> <i>Ferrovum myxofaciens</i> <i>Ferrovum spp</i> <i>Gallionella spp</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p><i>Analysis of the microbial community in moderately acidic drainage from the Yanahara pyrite mine in Japan</i></p>	<p>Wang et al</p>	<p>2014</p>	<p><i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Ferrovum myxofaciens</i> <i>Ferrovum spp</i> <i>Gallionella sp</i> <i>Gallionella spp</i> <i>Geobacter sp</i></p>

			<p><i>Leptospirillum ferroxidans</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Magnetospirillum sp</i>  <i>Rhodospirillales sp</i>  <i>Sulfobacillus spp</i>  <i>Thermoplasmatales spp</i></p>
<p><i>Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generatoing acid mine drainage</i></p>	<p>Korehi et al</p>	<p>2014</p>	<p><i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Alycyclobacillus spp</i>  <i>Desulfobacterium spp</i>  <i>Desulfosporosinus spp</i>  <i>Desulfurispora spp</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Ferrovum spp</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Sulfobacillus spp</i></p>
<p><i>Microorganism in subterranean acidic waters within Europe's deepest metal mine.</i></p>	<p>Kay et al</p>	<p>2014</p>	<p><i>Acidicaldus organivorans</i>  <i>Acidiphilum cryptum</i>  <i>Acidiphilum spp</i>  <i>Acidiphilum spp</i>  <i>Acidisphaera rubrifaciens</i>  <i>Acidithiobacillus caldus</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferromicorbium spp</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Ferrovum myxofaciens</i>  <i>Leptospirillum ferridiazotropum</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Metallibacterium scheffleri</i>  <i>Thermoplasma acidophilum</i>  <i>Thiomonas spp</i></p>
			<p><i>Acidiphilum cryptum</i></p>

<p><i>Diversity of Acidophilic prokaryotes at two acid mine drainage sites in Turkey</i></p>	<p>Aytar et al</p>	<p>2014</p>	<p><i>Acidiphilum organovororum</i> <i>Acidiphilum rubrum</i> <i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidocella spp</i> <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> <i>Ferroplasma spp</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum spp</i> <i>Sulfobacillus acidophilus</i> <i>Sulfobacillus spp</i></p>
<p><i>Novel and Unexpected Microbial Diversity an Acid Mine Drainage in Svalbard (78°N), Revealed by Culture-Independent Approaches.</i></p>	<p>Moyano et al</p>	<p>2015</p>	<p><i>Acetobacteraceae sp</i> <i>Acidiphilium sp</i> <i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidobacteria sp</i> <i>Acidocella sp</i> <i>Actinobacteria sp</i> <i>Ferrovum myxofaciens</i> <i>Gallionella ferruginea</i></p>
<p><i>Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats</i></p>	<p>Méndez-García et al</p>	<p>2015</p>	<p><i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> <i>Acidimicrobium spp</i> <i>Acidiphilum acidophilum</i> <i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus ferridurans</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acithiobacillus albertensis</i> <i>Acithiobacillus ferrooxidans</i></p>

			<p><i>Ferrimicrobium</i> spp  <i>Ferroplasma acidarmanus</i>  <i>Ferroplasma acidiphilum</i>  <i>Ferrovum myxofaciens</i>  <i>Gallionella ferruginea</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum rubarum</i>  <i>Leptospirillum</i> spp  <i>Sulfobacillus benefaciens</i>  <i>Sulfobacillus</i> spp  <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i></p>
<p><i>Microbial Ecology and Evolution in the Acid Mine Drainage Model System</i></p>	Huang et al	2016	<p><i>Acidiphilum</i> spp  <i>Acidithiobacillus denitrificans</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferroplasma</i> spp  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum</i> spp  <i>Thiomonas</i> sp</p>
<p><i>Lesson learned from thirty years of geomicrobiological studies of Río Tinto</i></p>	Amils, 2016	2016	<p><i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferromicrobium</i> spp  <i>Ferroplasma</i> spp  <i>Ferrovum</i> spp  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i></p>
<p><i>Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystem</i></p>	Chen et al	2016	<p><i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>  <i>Acidiphilum</i> spp  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus</i> spp  <i>Acidithrix ferrooxidans</i></p>

			<p><i>Alycyclobacillus spp</i>  <i>Ferromicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Ferrovum spp</i>  <i>Gallionella ferruginea</i>  <i>Leptospirillum spp</i>  <i>Metallibacterium scheffleri</i>  <i>Sulfobacillus spp</i>  <i>Thiomonas spp</i></p>
<p><i>Indirect redox transformations of iron, copper, and chromium catalyzed by extremely acidophilic bacteria</i></p>	<p>Johnson et al</p>	<p>2017</p>	<p><i>Acidiphilum cryptum</i>  <i>Acidiphilum spp</i>  <i>Acidithiobacillus caldus</i>  <i>Acidithiobacillus ferridurans</i>  <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferromicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>  <i>Leptospirillum spp</i></p>
<p>Identification of trehalose as a compatible solute in different species of acidophilic bacteria</p>	<p>Galleguillos et al</p>	<p>2018</p>	<p><i>Acidiphilum cryptum</i>  <i>Acidithiobacillus albertensis</i>  <i>Acidithiobacillus caldus</i>  <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>  <i>Acidithiobacillus spp</i>  <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>  <i>Ferromicrobium acidiphilum</i>  <i>Ferroplasma acidarmanus</i>  <i>Ferroplasma spp</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i>  <i>Leptospirillum ferriphilum</i></p>

			<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> <i>Leptospirillum spp</i> <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> <i>Sulfolobus spp</i>
<i>Diversity and functional profile of bacterial communities at Lancaster acid mine drainage dam, South Africa as revealed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing analysis</i>	Lukhele et al	2019	<i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Methanobacterium spp</i> <i>Picrophilus torridus</i>
<i>Microbial communities of polymetallic deposits' acidic ecosystem continental climatic zone with high temperature contrast</i>	Gavrilov et al, 2019	2019	<i>Acidiphilum spp</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Gallionella spp</i> <i>Leptospirillum spp</i>
<i>Uncovering microbial responses to sharp geochemical gradients in a terrace contaminated by acid mine drainage</i>	Xu et al	2020	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
<i>Characterization of bacterial communities from an active minning site and assessment of its potential metal solubilizing activity</i>	Lopes et al	2020	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus spp</i> <i>Leptospirillum spp</i> <i>Methalospaera spp</i>

**Tabla n.2** Resultados metaanálisis (Elaboración propia a partir de los diferentes artículos seleccionados de diferentes bases de datos).

Como puede observarse en la tabla anterior, el género más citado es *Acidithiobacillus* (103 citas), seguido por *Leptospirillum* (73 citas), *Acidiphilium* (52 citas) y *Sulfobacillus* (25 citas). Las especies más citadas son *Acidithiobacillus ferrooxidans* (24 citas), y *Leptospirillum ferrooxidans* (18 citas).

Estas bacterias pueden oxidar hierro y/o azufre, siendo las más abundantes de la flora microbiológica de las aguas ácidas de la Faja Pirítica Ibérica, y las principales responsables del Drenaje Ácido de Mina.

Bacteria	Fe	S
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	+	+
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	+	-
<i>Acidiphilium spp.</i>	+	-
<i>Sulfobacillus spp</i>	-	+

**Tabla n.3** Principales bacterias oxidantes de hierro y/o azufre. (Elaboración propia a partir de datos de tabla n.2).

En el presente estudio se ha puesto de manifiesto como el río Tinto constituye el principal referente de la diversidad de microorganismos eucariotas que habitan los sistemas AMD. (Amaral Zettler y col., 2002, 2003; Aguilera et al., 2006, 2007; Amaral-Zettler, 2012).

La diversidad eucariota en la cuenca del Tinto era mucho mayor que la de los procariontes (Amils, 2016).

Las bacterias parecen dominar completamente las capas de sedimentos anóxicos del río Tinto. (Andreas et al, 2012).

Las bacterias asociadas con entornos contaminados con AMD incluyen organismos acidófilos, como *Acidobacterium capsulatum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidiphilium spp.*, *Acidocella spp.*, y *Acidisphaera spp.*, todas las cuales pueden tolerar altas concentraciones de protones en el agua circundante. (Lear et al, 2009).

Dentro de este grupo, las especies *Acidithiobacillus spp* y *Leptospirillum spp* son actores claves en la generación de Drenaje Ácido de Minas. (Chen et al, 2016).

Los taxones más estudiados son los oxidantes de hierro y/o sulfuro *Acidithiobacillus spp.* (Williams and Kelly, 2013; Hedrich and Johnson, 2013), y oxidante de hierro *Leptospirillum spp.*

En el Phylum *Euryarchaeota*, miembros del género oxidante de hierro y sin pared celular *Ferroplasma spp* son los más detectados. (Cheng et al,2016).

Dentro del Phylum *Crenarchaeota*, los oxidantes de hierro y / o azufre de géneros *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Stygiolobus*, *Sulfolobus* y *Sulphurisphaera* se han identificado principalmente como termófilos extremos que habitan en ecosistemas de AMD. (Cheng et al,2016).

Se pone de manifiesto como los índices de diversidad indican una mayor riqueza de especies en los sedimentos, aunque la mayoría de los taxones se comparten entre las comunidades de sedimentos y agua. Los sedimentos como microhábitats con mayor riqueza de especies que el agua. (Lukhele et al,2019).

Como se menciona en (Gavrilov et al,2019 Huang et al,2016), tanto las comunidades bacterianas de agua como de sedimentos mostraron una alta prevalencia de secuencias relacionadas con *Acidiphilum spp*.

Otros estudios, como en el de (Lear et al,2009) se sugiere que el análisis de la estructura de la comunidad de biopelículas bacterianas puede proporcionar una medida sensible del grado de degradación del ecosistema y ser una herramienta útil para monitorear el éxito de la restauración ecológica en los arroyos afectados por AMD.

La caracterización de las comunidades bacterianas de las minas, ya sean superficiales o subterráneas, es importante tanto desde una perspectiva ecológica como biotecnológica (Merino et al, 2019; Donati et al,2016). Se ha afirmado que el uso de la biotecnología es una forma prometedora de recuperar metales valiosos presentes en minerales de baja ley y relaves de minas, reduciendo sus impactos ambientales y contribuyendo al reciclaje de recursos. (Lopes et al,2020).

Como se menciona en (Martins et al,2009), las bacterias reductoras de sulfato, tienen la capacidad de reducir el sulfato a sulfuro y este sulfuro reacciona con ciertos metales disueltos, como el cobre, el hierro y el zinc, formando precipitados insolubles. (Benedetto et al,2005). Se ha informado que la reducción anaeróbica de sulfato por este tipo de bacterias, se utiliza para el tratamiento de una variedad de efluentes industriales que contienen sulfato (Icgen and Harrison,2006; Gibert et al,2004), siendo las aguas residuales mineras, ricas en metales pesados, uno de los ejemplos más relevantes.

## 5. CONCLUSIONES

1. La razón para la realización de este metaanálisis es la gran cantidad de información dispersa acerca de la temática que ha sido objeto de estudio a lo largo de este trabajo, y, por tanto, la necesidad de recopilar y actualizar dicha información.
2. Las diferentes condiciones de los distintos ambientes que colonizan estos microorganismos, cambian mucho de las que son apropiadas para el resto de organismos vivos.
3. Los microorganismos extremófilos pueden clasificarse desde un punto de vista metabólico como aerobios, anaerobios, facultativos, y desde un punto de vista metabólico en autótrofos y heterótrofos, siendo las bacterias de más interés por su contribución al Drenaje Ácido de Mina, las autolitotrofas. Los aerobios son organismos que viven en presencia de oxígeno y sus reacciones son de tipo oxidativo y utilizan como fuente de energía la luz solar; Los organismos anaerobios, viven en condiciones anóxicas y las reacciones que llevan a cabo son de tipo reductivo, utilizando como fuente de energía la materia orgánica. Los litotrofos obtienen su energía de la oxidación de los compuestos inorgánicos.
4. Para finalizar, destacar la deficiencia de artículos en relación con estudios sobre la Cuenca del Odiel si lo comparamos con la literatura disponible sobre el Río Tinto. Por tanto, se abre una oportunidad en la investigación en esta zona de la Faja Pirítica de cara a futuros trabajos.

## 6. FUENTES BIBLIOGRÁFICAS

- Akcil A, Koldas S (2006) Acid mine drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *J Clean Prod* 14: 1139-1145.
- Adams, L. K., Harrison, J. M., Lloyd, J. R., Langley, S., and Fortin, D. (2007). Activity and Diversity of Fe (III)-Reducing Bacteria in a 3000-Year-Old Acid Mine Drainage Site Analogue. *Geomicrobiology Journal*, 24(3-4):295-305.
- Amils, R. (2016). Lessons learned from thirty years of geomicrobiological studies of Río Tinto, *Research in Microbiology*.167: 539-545.
- Aytar, P., Kay, C. M., Mutlu, M. B., Çabuk, A., and Johnson, D. B. (2014). Diversity of acidophilic prokaryotes at two acid mine drainage sites in Turkey. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8):5995-6003.
- Baker, B. J., and Banfield, J. F. (2003). MiniReview: Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.*44:139-152.
- Banks, D., Younger, P., Amesen, R., Iversen, E., and Banks, S. B. (1997). Mine-water chemistry: The good, the bad and the ugly. *Environ. Geol.*32:157-174.
- Benedetto, J.S., De Almeida, S.K., Gomes, H.A., Vazoller, R.F., Ladeira, A.C.Q. (2005). Monitoring of sulfate-reducing bacteria in acid water from uranium mines, *Min. Eng.* 18:1341-1343.
- Bernardes de Souza, C. M., and Mansur, M. B. (2011). Modelling of Acid Mine Drainage (AMD) in columns. *Braz. J. Chem. Eng.*, 28:425-432.
- Bhatnagar, M., and Singh, G. (1991). Growth inhibition and leakage of cellular material from *Thiobacillus ferrooxidans* by organic compounds. *J. Environ. Biol.*12:385-399.
- Bonnefoy, V., and Holmes, D. S. (2012). Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ. Microbiol.*, 14:1597-1611.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8):601-608.
- Bruneel, O., Duran, R., Casiot, C., Elbaz-Poulichet, F., & Personne, J.-C. (2006). Diversity of Microorganisms in Fe-As-Rich Acid Mine Drainage Waters of Carnoules, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 551-556.
- Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S., and Williams, T. J. (2011). Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial biotechnology*. 4(4): 449-460.

- Chen, L., Huang, L., Méndez-García, C., Kuang, J., Hua, Z., Liu, J., and Shu, W. (2016). Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 150-158.
- Denef VJ, Mueller RS, Banfeld JF (2010) AMD biofilms: using model communities to study microbial evolution and ecological complexity in nature. *ISME J* 4:599-610.
- Donati, E-R., Castro, C., M.S. Urbieta., M.S. (2016). Thermophilic microorganisms in biomining, *World J. Microb. Biot.* 32(11):179
- Dogan, P.A. (1999). Characterization of mine waste for prediction of acid mine drainage. In Azcue JM (ed *Environmental impacts of minning activities*. Springer):19-40.
- Dopson, M. and Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(10): 2620-2631.
- Eijsink, V. G. H., Björk, A., Gaseidnes, S., Sirevag, B., Syntad, B., Van-Den-Burg, G., and Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *Journal of Biotechnology*. 113(1): 105-120.
- Förstner, U y Wittmann G.T.W. (1983). *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer Verlag. 18(2):486.
- Freitas, F., Alves, V. D., and Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*. 29(8):388-398.
- Galleguillos, P. A., Grail, B. M., Hallberg, K. B., Demergasso, C. S., & Johnson, D. B. (2018). Identification of trehalose as a compatible solute in different species of acidophilic bacteria. *Journal of Microbiology*, 56(10), 727–733.
- Galván, L. y Olías, M. (2015). Estudio de la contaminación por drenaje ácido de minas en la cuenca del Río Odiel. *Macla: revista de la Sociedad Española de Mineralogía*. 20:51- 52.
- Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005). Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 23(7): 471-499.
- Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005). Biotechnology a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 23(7):471-499.
- Gavrilov, S. N., Korzhenkov, A. A., Kublanov, I. V., Bargiela, R., Zamana, L. V., Popova, A. A., ... Golyshina, O. V. (2019). Microbial Communities of Polymetallic Deposits' Acidic Ecosystems of Continental Climatic Zone With High Temperature Contrasts. *Frontiers in Microbiology*. 10.

- Gibert, O., De Pablo, J., Cortina, J.L., Ayora, C. (2004). Chemical characterization of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage, *Water Res.* 38:4186-4196.
- Goltsman, D. S. A., Deneff, V. J., Singer, S. W., VerBerkmoes, N. C., Lefsrud, M., Mueller, R. S., Banfield, J. F. (2009). Community Genomic and Proteomic Analyses of Chemoautotrophic Iron-Oxidizing "Leptospirillum rubrum" (Group II) and "Leptospirillum ferrodiazotrophum" (Group III) Bacteria in Acid Mine Drainage Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(13):4599-4615.
- González-Toril, E., Aguilera, Á., Souza-Egipsy, V., López Pamo, E., Sánchez España, J., and Amils, R. (2011). Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal Acid Mine Effluent (Iberian Pyritic Belt, Spain). *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2685-2694.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., and Amils, R. (2003). Microbial Ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8):4853-4865.
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., and Gotor, V. (2006). Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 40(3): 111-120.
- Grande Gil, J.A. (Ed). (2016). Drenaje ácido de mina en la Faja Pirítica Ibérica. Técnicas de estudio e inventario de explotaciones. Universidad de Huelva Publicaciones.
- Grande J.A., Borrego, J., y Morales, J.A. (2000). A study of heavy metal pollution in the Tinto-Odiel estuary in southwestern Spain using factor analysis. *Environmental Geology*. 39(10):1095-1101.
- Grande, J.A., Borrego, J., De la Torre, M.L., y Sainz, A. (2003). Application of Cluster Analysis to the Geochemistry Zonation of the Estuary Waters in the Tinto and Odiel Rivers (Huelva, Spain). *Environmental Geochemistry and Health*. 25(2):233-246.
- Grande, J.A., De la Torre M.L., Santisteban M, Fortes J.C. (2017). Hydrochemical characterization and evaluation of the impact of AMD processes on river basin areas in the Iberian Pyrite Belt. *Water Policy*.
- Haki, G. D. and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89(1): 17-34.
- Hallberg, K. B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*, 104:448-453.
- Hasan, F., Shah, A. A., and Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 235-251.

- Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., and Hameed, A. (2010). Enzymes used in detergents: lipases. *African Journal of Biotechnology* 9(31): 4836-4844.
- Hedrich, S., Lünsdorf, H., Kleeberg, R., Heide, G., Seifert, J., & Schlömann, M. (2011). Schwertmannite formation adjacent to bacterial cells in a mine water treatment plant and in pure cultures of *Ferroplasma myxofaciens*. *Environ. Sci. Technol.*, 45:7685-7692.
- Hedrich S, Johnson DB. (2013). *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.*63:4018-4025.
- Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A., Eberhardt, R., and Steinbüchel, A. (2000). Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54(3):319-325.
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4):735-750.
- Huang, L.-N., Kuang, J.-L., and Shu, W.-S. (2016). Microbial Ecology and Evolution in the Acid Mine Drainage Model System. *Trends in Microbiology*, 24(7):581-593.
- Icgen, B., and Harrison, S. (2006). Exposure to sulphide causes populations shifts in sulphate reducing consortia, *Res. Microbiol.*157:784-791.
- Ilbert, M., and Bonnefoy, V. (2013) Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim Biophys Acta.*, 1827(2):161-175.
- IPAT-UNESCO, BORRA (2000). Pesquisa e desenvolvimento de metodologias para o controle de drenagem ácida e tratamento de efluentes de industria carbonífera. Relatório técnico. Criciúma: Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense:184
- Jia, B., Cheong, G. W., and Zhang, S. (2013). Multifunctional enzymes in archaea: promiscuity and moonlight. *Extremophiles*. 17(2): 193-203.
- Johnson, D. B., and Hallberg, K. B. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Res. Microbiol.* 154:466-473.
- Johnson, D. B., and Hallberg, K. B. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci. Total Environ.*338:3-14.
- Johnson, D. B., Bacelar-Nicolau, P., Okibe, N., Thomas, A., and Hallberg, K. B. (2009). *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59(5):1082-1089.

- Johnson, D. B., Hedrich, S., and Pakostova, E. (2017). Indirect Redox Transformations of Iron, Copper, and Chromium Catalyzed by Extremely Acidophilic Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K. B., and Iversen, E. (2001). Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environ. Microbiol.*, 3: 630-637.
- Jones, D. I. S., Kohl, C., Grettenberger, C., Larson, L. N., Burgos, W. D., and Macalady, J. L. (2015). Geochemical niches of iron-oxidizing acidophiles in acidic coal mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4):1242-1250.
- Jonhson, D.B. and Hallberg, K.B. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in microbiology*. 154(7):466-473.
- Jonhson, D.B. y Quatrini, R. (2020). Acidophile Microbiology in Space and Time. *Current Issues in Molecular Biology*.39:63-76.
- Joshi, K. B. (2014). Microbes: Mini iron factories. *Indian J. Microbiol.*, 54(4):483-485.
- Kamimura, K., Okabayashi, A., Kikumoto, M., Manchur, M. A., Wakai, S., & Kanao, T. (2010). Analysis of iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a treatment plant of acid rock drainage from a Japanese pyrite mine by use of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit gene. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(3):244-248.
- Kay, C. M., Haanela, A., & Johnson, D. B. (2014). Microorganisms in subterranean acidic waters within Europe's deepest metal mine. *Research in Microbiology*, 165(9), 705-712.
- Kay, C., Rowe, O., Rocchetti, L., Coupland, K., Hallberg, K., & Johnson, D. (2013). Evolution of Microbial "Streamer" Growths in an Acidic, Metal-Contaminated Stream Draining an Abandoned Underground Copper Mine. *Life*, 3(1), 189-210.
- Khire, J. M. (2010). Bacterial surfactants and their role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). En R. Sen (Ed.), *Biosurfactants. Advances in experimental medicine and biology series*. Springer:146-157.
- Kimura, S., Bryan, C. G., Hallberg, K. B., and Johnson, D. B. (2011). Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environmental Microbiology*, 13(8):2092–2104.
- Klein, R., Tischler, J. S., Muhling, M., and Schlomann, M. (2013). Bioremediation of mine water. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 141:109-172.
- Korehi, H., Bloethe, M., & Schippers, A. (2014). Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in Microbiology*, 165(9):713-718.

- Korehi, H., Blöthe, M., and Schippers, A. (2014). Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in Microbiology*, 165(9), 713–718.
- Kuang J, Huang L, He Z et al (2016). Predicting taxonomic and functional structure of microbial communities in acid mine drainage. *ISME J* 10: 1527-1539
- Kunioka, M. (1997). Biosynthesis and chemical reaction of poly (amino acid) from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47(5):469-475.
- Kuyucak N (2002) Role of microorganism in minnig:generation of acid rock drainage and its mitigation and treatment. *Eur J Miner Process Environ Prot* 2: 179–196.
- Lear, G., Niyogi, D., Harding, J., Dong, Y., and Lewis, G. (2009). Biofilm Bacterial Community Structure in Streams Affected by Acid Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11):3455-3460.
- Lei, H. Y. and Chang, C. P. (2007). Induction of autophagy by concanavalin A and its application in antitumor therapy. *Autophagy*. 3(4):402-404.
- Leistel, J.M.; Marcoux, E.; Thiéblemont, D.; Quesada, C.; Sánchez, A.; Almodóvar, G.R.; Pascual, E. y Sáez, R. (1998). The volcanic-hosted massive sulphide deposits of the iberian Pyrite Belt. Review and preface to the Thematic Issue. *Mineralium Deposita*.33:2-30.
- Li, C. Q., Qi, W. G., & Liu, X. B. (2009). The SLS system of caving mining simulation and its application. *Journal of Wuhan University of Technology*, 31:132-134.
- Littlechild, J. A. (2015). Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts. *Archaea*. 2015: 1-10.
- Lopes, A. R., Madureira, D., Diaz, A., Santos, S., Vila, M. C., & Nunes, O. C. (2020). Characterisation of bacterial communities from an active mining site and assessment of its potential metal solubilising activity. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(6), 104495.
- López-Archilla, A. (2005). Riotinto: un universo de mundos microbianos. *Revista Ecosistemas*. 14(2).
- Lukhele, T., Selvarajan, R., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2019). Diversity and functional profile of bacterial communities at Lancaster acid mine drainage dam, South Africa as revealed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing analysis. *Extremophiles*, 23(6):719-734.
- Margesin, R. and Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5(2):73-83.
- Martins, M., Faleiro, M. L., Barros, R. J., Veríssimo, A. R., Barreiros, M. A., & Costa, M. C. (2009). Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant

- sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3):706–713.
- Mellado D., González Clavijo, E., Tornos, F. y Conde, C. (2006). Geología y estructura de la Mina de Rio Tinto (Faja Piritica Ibérica, España). *Geogaceta*.40:231-240.
- Mendez, M. O., Neilson, J. W., and Maier, R. M. (2008). Characterization of a Bacterial Community in an Abandoned Semiarid Lead-Zinc Mine Tailing Site. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12):3899–3907.
- Mendez-García, C., Peláez, A. I., Mesa, V., Sanchez, J., Golyshina, O. V., & Ferrer, M. (2015). Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Merino, N., Aronson, H.S., Bojanova, D.P., Feyhl-Buska, J., Wong, M.L., Zhang, S., y Giovanelli, D. (2019). Living at the Extremes: Extremophile and the Limits of Life in a Planetary Context. *Fontiers in Microbiology*.10:1-25.
- Nancuqueo, I., & Barrie-Johnson, D. (2011). Significance of microbial communities and interactions in safeguarding reactive mine tailings by ecological engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*77:8201-8208.
- Nancuqueo, I., and Barrie-Johnson, D. (2014). Removal of sulfate from extremely acidic mine waters using low Ph sulfidogenic bioreactors. *Hydrometallurgy*. 150:222-226.
- Nicholson, R.V. (1994). Iron-sulfide oxidation mechanism. In White AF, Brantley RJ (Eds). *Chemical weathering rates of silicate minerals*. Mineralogical Society of America, *Env In Mineralogy*.31:173-225.
- Ninfa Ramírez, D., Serrano Ortega, J.A., Trujillo, H.S. (2006). Extremophile microorganism. Halophile actinomycetes in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceúticas*.37(3):56-71.
- Nordstrom, D. K. (2011). Mine Waters: Acidic to Circmneutral. *Elements*, 7(6):393–398.
- Ohimain, E. I., Andriesse, W., and Van Mensvoort, M. E. F. (2004). Environmental impacts of abandoned dredged soils and sediments: Available options for their handling, restoration and rehabilitation. *J. Soil Sediment*, 4:59-65.
- Oliveria, J.T. (1990). South Portuguese Zone: Introduction. *Stratigraphy and synsedimentary tectonism*, In: PreMesozoic Geology of Iberia. Dailmeyer R.D., Martínez García e. (eds) Springer Verlag, Hedidelberg:333-347.
- Orell, A., Navarro, C. A., Arancibia, R., Mobarec, J. C., and Jerez, C. A. (2010). Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology Advances*, 28(6):839-848.

- Pai, M., McCulloch, M., Gorman, J.D., Pai, N., Enanoria, W., Kennedy, G., Tharyan, P., y Colford, Jr, J.M., (2004). Sytematic review and meta-analyses: An illustrated, step-by-step guide. *The national medicinal journal of India*.17(2):86-95.
- Pinzón-Martínez, D. L., Rodríguez-Gómez, C., Miñana-Galbis, D., Valerio-Alfaro, G., and Oliart-Ros, R. M. (2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: Isolation and potential applications. *Environmental Technology*. 31(8-9): 957-966.
- Quistián García, H., Ramirez, J., Ramos, M., Rascón, L., Diego, R. (2014).Microbiología:Metabolismo bacteriano.Sitio web:  
<http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>.
- Quatrini, R. and Johnson, D.B. (2018). Microbiomes in extremely acidic enviroments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH. *Current Opinion in Microbyology*.43:139-147.
- Quesada, C. (1998). A comparison of stratigraphy, structure and paleogeography of the South Portuguese Zone and Southwest England, European Variscides Geoscience in south-west England.The Scott Simpson Lecture, Annual Conference of the Ussher Society:141-159.
- Rawlings, D. E and Johnson, D.B. (2007). The microbiology of biomining:development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia.*Microbiology*.153:315-324.
- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* 2013: 1-14.
- Renella, G., Landi, L., and Nannipieri, P. (2004). Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma*, 122:311-315.
- Rohwerder, T. Gehrke, T. Kinzler, K. Sand, W. (2003). Bioleaching review part a. *Appl. Microbiol. Biotechnol*.63:239-248.
- Sánchez-Andrea, I., Knittel, K., Amann, R., Amils, R., and Sanz, J. L. (2012). Quantification of Tinto River Sediment Microbial Communities: Importance of Sulfate-Reducing Bacteria and Their Role in Attenuating Acid Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4638-4645.
- Sánchez-España, J. (2008). Acid Mine Drainage in the Iberian Pyrite Belt: an Overview with Special Emphasis on Generation Mechanisms, Aqueous Composition and Associated Mineral Phases. *Macla*.10:34-43.
- Santofimia, E., González-Toril, E., López-Pamo, E., Gomariz, M., Amils, R., & Aguilera, Á. (2013). Microbial Diversity and Its Relationship to Physicochemical Characteristics of the Water in Two Extreme Acidic Pit Lakes from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *PLoS ONE*, 8(6), e66746.

- Sára, M., Egelseer, E. M., Huber, C., Ilk, N., Pleschberger, M., Pum, D., and Sleytr, U. B. (2006). Slayer proteins: potential application in nano (bio) technology. En B. H. Rehn (Ed.), *Microbial bionanotechnology: biological self-assembly systems and biopolymer-based nanostructures*:307-338.
- Sarmiento, A.M (2007). Estudio de la contaminación por drenajes ácidos de mina de las aguas superficiales en la cuenca del río Odiel (SO España). Tesis Doctoral. Universidad de Huelva.
- Sarmiento, F., Peralta, R., and Blamey, J. M. (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3:148.
- Sauer, T. and Gallinski, E. A. (1998). Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering* 57(3):306-313.
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., & Wright, T. L. (2010). The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe (II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104:342-350.
- Sharma, A., Kawarabayasi, Y. y Satyanarayana, T. (2012). *Extremophile: Microbial Life Under Extreme Conditions*. Springer.16:1-19.
- Silva, J.B., Oliveira, J.T., Ribeiro, A. (1990): Structural outline of the South Portuguese Zone, in: *PreMesozoic Geology of Iberia*. Dallmeyer R.D., Martínez García, E. (ed). Springer-Verlag, Heidelberg:348-362.
- Simon, R. C., Mutti, F. G., and Kroutil, W. (2013). Biocatalytic synthesis of enantiopure building blocks for pharmaceuticals. *Drug Discovery Today: Technologies*. 10(1):37-44.
- Solano, A. M. (2005). Movilización de metales pesados en residuos y suelos industriales afectados por la hidrometalurgia del cinc. Tesis de doctorado. Murcia: Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Universidad de Murcia.
- Squillaci, G., Finamore, R., Diana, P., Restaino, O. F., Schiraldi, C., Arbucci, S., and Morana, A. (2016). Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica* *Applied Microbiology and Biotechnology*.100(2):613-623.
- Stumm, W., and Morgan, J. (1981). *Aquatic chemistry: An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*, 2nd edition. New York: Wiley-Interscience.
- Tan, G.-L., Shu, W.-S., Zhou, W.-H., Li, X.-L., Lan, C.-Y., & Huang, L.-N. (2009). Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site. *FEMS Microbiology Ecology*.70(2):277–285.

- Tischler, J. S., Jwair, R. J., Gelhaar, N., Drechsel, A., Skirl, A.-M., Wiacek, C., Schlömann, M. (2013). New cultivation medium for “Ferrovum” and Gallionella-related strains. *Journal of Microbiological Methods*.95(2):138–144.
- Tuovinen, O. H., Panda, F., and Tsuchiya, H. (1979). Nitrogen requirement of iron-oxidizing Thiobacilli for acidic ferric sulfate regeneration. *Appl. Environ. Microbiol.*37:954-958.
- Urbanová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Ságová-Marečková, M., Elhottová, D., Kyselková, M., Moënné-Loccoz, Y., & Baldrian, P. (2011). *FEMS Microbiol. Ecol.* 78: 59-69.
- Urrutia, G., y Bonfill, X. (2010). PRISMA declaration: A proposal to improve the publication of systematic reviews and meta-analyses. *Med Clin (Barc)*.135(11):507-511.
- Van-Den-Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology.* 6(3): 213-218.
- Wang, Y., Yasuda, T., Sharmin, S., Kanao, T., & Kamimura, K. (2014). Analysis of the microbial community in moderately acidic drainage from the Yanahara pyrite mine in Japan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(7), 1274-1282.
- Watkin, E. L. J., Keeling, S. E., Perrot, F. A., Shiers, D. W., Palmer, M.-L., & Watling, H. R. (2008). Metals tolerance in moderately thermophilic isolates from a spent copper sulfide heap, closely related to *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.36(3):461–465.
- Wiegel, J. and Kevbrin, V. V. (2004). Alkalithermophiles. *Biochemical Society Transactions.* 32(2):193-198.
- Williams KP, Kelly DP. (2013). Proposal for a new class within the phylum Proteobacteria, *Acidithiobacillia* classis nov., with the type order *Acidithiobacillales*, and emended description of the class *Gammaproteobacteria*. *Int J Syst Evol Microbiol.*63:2901-29
- Xie, J., He, Z., Liu, X., Liu, X., Van Nostrand, J. D., Deng, Y., Qiu, G. (2010). GeoChip-Based Analysis of the Functional Gene Diversity and Metabolic Potential of Microbial Communities in Acid Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3):991-999.
- Xu, R., Li, B., Xiao, E., Young, L. Y., Sun, X., Kong, T., Sun, W. (2020). Uncovering microbial responses to sharp geochemical gradients in a terrace contaminated by acid mine drainage. *Environmental Pollution*,261.114226.
- Yang, Y., Shi, W., Wan, M., Zhang, Y., Zou, L., Huang, J., Qiu, G., & Liu, X. (2008). Diversity of bacterial communities in acid mine drainage from the Shenbu copper mine, Gansu province, China. *Electron. J. Biotechnol.*11:1-12.

Yang, Y., Wan, M., Shi, W., Peng, H., Qiu, G., Zhou, J., and Liu, X. (2007). Bacterial diversity and community structure in acid mine drainage from Dabaoshan Mine, China. *Aquatic Microbial Ecology*.47:141-151.

## 7. ANEXOS

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<b>Proteobacteria</b>	<b>Acidithiobacillia</b>	<b>Acidithiobacillales</b>	<b>Acidithiobacillaceae</b>	<b>Acidithiobacillus</b>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> <i>Acidithiobacillus caldus</i> <i>Acidithiobacillus cuprithermicus</i> <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> <i>Acidithiobacillus plumbophilus</i> <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> <i>Acidithiobacillus denitrificans</i> <i>Acidithiobacillus acidophilus</i>
<b>Nitrospirae</b>	<b>Nitrospira</b>	<b>Nitrospirales</b>	<b>Nitrospiraceae</b>	<b>Leptospirillum</b>	<i>Leptospirillum ferriphilum</i> <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>

					<i>Leptospirillum rubarum</i> <i>Leptospirillum ferrodiazotropum</i> <i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Betaproteobacteria</b>	<b>Burkholderiales</b>	<b>Burkholderiaceae</b>	<b>Ralstonia</b>	<i>Ralstonia eutropha</i> <i>Ralstonia picketti</i>
<b>Euryarchaeota</b>	<b>Thermoplasmata</b>	<b>Thermoplasmatales</b>	<b>Ferroplasmaceae</b>	<b>Ferroplasma</b>	<i>Ferroplasma acidophilum</i> <i>Ferroplasma acidarmanus</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Betaproteobacteria</b>	<b>Gallionellales</b>	<b>Gallionellaceae</b>	<b>Gallionella</b>	<i>Gallionella ferruginea</i>
<b>Euryarchaeota</b>	<b>Thermoplasmata</b>	<b>Thermoplasmatales</b>	<b>Ferroplasmaceae</b>	<b>Acidiphilium</b>	<i>Acidiphilium cryptum</i> <i>Acidiphilium rubrum</i> <i>Acidiphilium organovororum</i> <i>Acidiphilium acidophilum</i> <i>Acidiphilium angustum</i> <i>Acidiphilium multivorum</i>
<b>Actinobacterias</b>	<b>Acidimicrobiia</b>	<b>Acidimicrobiales</b>	<b>Acidimicrobiáceas</b>	<b>Ferrithrix</b>	<i>Ferrithrix thermotolerans</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Betaproteobacteria</b>	<b>Ferrovales</b>	<b>Ferrovaceae</b>	<b>Ferrovum</b>	<i>Ferrovum myxofaciens</i>
					<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>

Proteobacteria	Deltaproteobacterias	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	Desulfovibrio	<i>Desulfovibrio genera</i> <i>Desulfovibrio fructosivorans</i>
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Gallionellales	Gallionellaceae	Gallionella	<i>Gallionella ferruginea</i>
Proteobacteria	Deltaproteobacterias	Desulfobacterales	Desulfobacteraceae	Desulfobacterium	<i>Desulfobacterium indolicum</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Rhodospirillum	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Hyphomicrobiales	Beijerinckiaceae	Methylocapsa	<i>Methylocapsa acidiphila</i>
Cyanobacteria	Cyanophyceae	Nostocales	Nostocaceae	Anabaena	<i>Anabaena variabilis</i>
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	<i>Paenibacillus macerans</i>
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Chromatiales	Chromatiaceae	Nitrosococcus	<i>Nitrosococcus oceani</i>
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Incertae Sedis	Sulfobacillus	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> <i>Sulfobacillus yellowstonensis</i> <i>Sulfobacillus disulfidooxicans</i> <i>Sulfobacillus thermosulfidooxicans</i> <i>Sulfobacillus benefaciens</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	Acidimicrobium	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>
Acidobacteria	Acidobacterias	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobacterium	<i>Acidobacterium capsulatum</i>

<b>Actinobacteria</b>	<b>Acidimicrobiia</b>	<b>Acidimicrobiales</b>	<b>Acidimicrobiáceas</b>	<b>Ferromicrobium</b>	<i>Ferromicrobium acidiphilum</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Deltaproteobacteria</b>	<b>Desulfuromonadales</b>	<b>Geobacteraceae</b>	<b>Geobacter</b>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Epsilonproteobacteria</b>	<b>Campylobacteriales</b>	<b>Helicobacteraceae</b>	<b>Thiomicrospira</b>	<i>Thiomicrospira acidophilum</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Deltaproteobacteria</b>	<b>Syntrophobacterales</b>	<b>Syntrophaceae</b>	<b>Desulfomonile</b>	<i>Desulfomonile tiedjei</i>
<b>Aquificae</b>	<b>Aquificales</b>	<b>Aquificales</b>	<b>Aquificaceae</b>	<b>Hydrogenobacter</b>	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>
<b>Euryarchaeota</b>	<b>Methanococci</b>	<b>Methanococcales</b>	<b>Methanococcaceae</b>	<b>Methanococcus</b>	<i>Methanococcus maripaludis</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Bataproteobacteria</b>	<b>Burkholderiales</b>	<b>Comamonadaceae</b>	<b>Leptothrix</b>	<i>Leptothrix discophora</i>
<b>Actinobacteria</b>	<b>Actinobacteria</b>	<b>Acidimicrobiales</b>	<b>Acidimicrobiáceas</b>	<b>Acidithrix</b>	<i>Acidithrix ferrooxidans</i>
<b>Actinobacteria</b>	<b>Acidimicrobiia</b>	<b>Acidimicrobiales</b>	<b>Incertae sedis</b>	<b>Aciditerrimonas</b>	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Deltaproteobacteria</b>	<b>Desulfobacterales</b>	<b>Desulfobulbaceae</b>	<b>Desulfobulbus</b>	<i>Desulfobulbus rhabdoformis</i>
<b>Firmicutes</b>	<b>Clostridium</b>	<b>Clostridiales</b>	<b>Peptococcaceae</b>	<b>Desulfoporosinus</b>	<i>Desulfoporosinus orientis</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Gammaproteobacteria</b>	<b>Pseudomonales</b>	<b>Pseudomonaceae</b>	<b>Pseudomonas</b>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Alphaproteobacteria</b>	<b>Rhodospirillales</b>	<b>Acetobacteraceae</b>	<b>Acidocella</b>	<i>Acidocella facilis</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Alphaproteobacteria</b>	<b>Rhodospirillales</b>	<b>Acetobacteraceae</b>	<b>Acidisphaera</b>	<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>
<b>Crenarchaeota</b>	<b>Thermoprotei</b>	<b>Sulfolobales</b>	<b>Sulfolobaceae</b>	<b>Metallosphaera</b>	<i>Metallosphaera prunae</i>

					<i>Metallosphaera sedula</i>
<b>Proteobacteria</b>	<b>Deltaproteobacteria</b>	<b>Desulfobacteriales</b>	<b>Desulfobacteraceae</b>	<b>Desulfosarcina</b>	<i>Desulfosarcina variabilis</i>
<b>Euryarchaeota</b>	<b>Methanococci</b>	<b>Methanococcales</b>	<b>Methanococcaceae</b>	<b>Methanococcus</b>	<i>Methanococcus maripaludis</i>
<b>Crenarchaeota</b>	<b>Thermoprotei</b>	<b>Sulfolobales</b>	<b>Sulfolobaceae</b>	<b>Acidianus</b>	<i>Acidianus brierleyi</i>
<b>Euryarchaeota</b>	<b>Thermoplasmata</b>	<b>Thermoplasmatales</b>	<b>Picrophilaceae</b>	<b>Picrophilus</b>	<i>Picrophilus torridus</i>

**Tabla n.4** Enumeración de especies bacterias (Elaboración propia a partir de tabla n.2).

Especie	Metabolismo
<i>Acidianus brierleyi</i>	Anaerobio/Autótrofo
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Aerobio//Autótrofo-Heterótrofo
<i>Acidiphilum cryptum</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Acidithiobacillus acidophilus</i>	Aerobio/Autótrofo
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Aerobio/Autótrofo-Quimiolitotrofo.
<i>Acidithiobacillus cuprithermicus</i>	Aerobio/Autótrofo
<i>Acidithiobacillus denitrificans</i>	Anaerobio/Quimiolitotrofo
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Anaerobio-Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Acidithiobacillus plumbophilus</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Acidithiobaillus thioxidans</i>	Aerobio/Autótrofo
<i>Acidithrix ferrooxidans</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Anaerobio/Quimioorganotrofo
<i>Acidocella facilis</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Acidosphaera rubrifaciens</i>	Aerobio/Quimioorganotrofo
<i>Anabaena variabilis</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Desulfobulbus genera</i>	Anaerobio/Quimioorganotrofo
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	Anaerobio/Autótrofo

<i>Desulfoporosinus orientis</i>	Anaerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Anaerobio/Quimioorganoheterótrofo
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Anaerobio/Organotro-Litotrofo
<i>Desulfovibrio fructosivorans</i>	Anaerobio/Quimiolitotrofo
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Anaerobio/Quimiolitotrofo
<i>Ferrithrix thermotolerans</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Ferromicrobium acidiphilum</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Ferrovum myxofacies</i>	Aerobio/Quimiolitotrofo
<i>Gallionella ferruginea</i>	Aerobio/Quimiolitotrofo
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Anaerobio-Aerobio
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Aerobio-Anaerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Aerobio/Quimiolitoautótrofo
<i>Leptothrix discophora</i>	Aerobio/Quimioorganoheterótrofo
<i>Methallosphaera prunae</i>	Anaerobio/Heterótrofo-Autótrofo
<i>Methallosphaera sedula</i>	Aerobio/Heterótrofo-Autótrofo
<i>Methanococcus maripaludis</i>	Anaerobio/Autótrofo
<i>Methanococcus maripaludis</i>	Anaerobio/Autótrofo
<i>Methylocapsa acidiphila</i>	Aerobio/Metanotrofo
<i>Nitrosococcus oceani</i>	Aerobio/Quimioautótrofo

<i>Paenibacillus macerans</i>	Anaerobio/Heterótrofo
<i>Picrophilus torridus</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Pseudomonas syringae</i>	Aerobio/Heterótrofo
<i>Ralstonia eutropha</i>	Aerobio-Anaerobio//Autótrofo-Heterótrofo
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Anaerobio/Heterótrofo-autótrofo
<i>Sulfobacillus benefaciens</i>	Anaerobio/Autótrofo
<i>Sulfobacillus disulfidooxicans</i>	Anaerobio// Autótrofo o Heterótrofo
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxicans</i>	Anaerobio/ Autótrofo o Heterótrofo
<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	Aerobio/Quimiolitotrofo
<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	Aerobio/Quimioautótrofo

**Tabla n.5** Metabolismo bacterias. (Elaboración propia a partir de tabla n.2).

Métodos basados en criterios fisiológicos	Métodos basados en criterios metabólicos	Métodos basados en criterios ecológicos	Métodos basados en criterios moleculares
<p><u>Cocos</u>: Bacterias de forma más o menos esférica. Los cocos según los planos en que se dividan pueden presentarse en diversas formas.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Diplococos</u>: Que son los cocos que permanecen en pares luego de la división.</li> <li>- <u>Estreptococos</u>: luego de la división permanecen en cadenas de cuatro o más células.</li> <li>- <u>Tétradas</u>: Son agrupaciones de cuatro cocos en una disposición cuadrada. Se</li> </ul>	<p>Los distintos tipos de metabolismo microbiano se pueden clasificar según tres criterios distintos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Según la forma en la que el organismo obtiene el carbono para la construcción de la masa celular: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Autótrofo</u>: El carbono se obtiene del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).</li> <li>• <u>Heterótrofo</u>: El carbono se obtiene de compuestos orgánicos (glucosa, por ejemplo).</li> </ul> </li> <li>2. Según la forma en la que el organismo obtiene los equivalentes reductores para la conservación de la energía o en las reacciones biosintéticas:</li> </ol>	<p>Los hábitats donde viven los extremófilos, incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos;</p> <p>Lagos salinos y ambientes con valores de pH extremo, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura</p>	<p>Una amplia variedad de genes ha sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa.</p> <p>Sin embargo, en otras circunstancias, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o géneros.</p> <p>En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie.</p>

<p>dividen en dos direcciones perpendiculares.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Sarcinas</u>: Paquetes cúbicos de ocho células. Resultan de la división en tres direcciones perpendiculares.</li> <li>- <u>Estafilococos</u>: Se agrupan en forma de racimos, no siguen un patrón regular de orientación en divisiones sucesivas.</li> </ul> <p><u>Bacilos</u>: Bacterias de forma cilíndrica, que también pueden encontrarse aislados o agrupados, cuando permanecen juntos luego del proceso de división.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Cocobacilos</u>: Ciertas especies se presentan como bacilos pequeños.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Litotrofo</u>: Los equivalentes reductores se obtienen de compuestos inorgánicos.</li> <li>• <u>Organotrofo</u>: Los equivalentes reductores se obtienen de compuestos orgánicos</li> </ul> <p>3. Según la forma en la que el organismo obtiene la energía para vivir y crecer.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Quimiotrofo</u>: La energía se obtiene de compuestos químicos externos.</li> <li>• <u>Fototrofo</u>: La energía se obtiene de la luz.</li> </ul>	<p>y alta presión, en los fondos marinos.</p> <p>Categorías:</p> <p><u>Termófilos</u>: Se consideran aquellos microorganismos que crecen en temperaturas por encima de 65°C, la temperatura para un crecimiento óptimo se encuentra entre 70-80°C y la máxima entre 80-113°C. La mayoría de las bacterias mesófilas crecen más rápidamente entre 25 y 40°C.</p> <p><u>Psicrófilos</u>: El agua es el disolvente primordial para la vida y debe estar presente en estado líquido para que ésta ocurra.</p> <p>Esto pone un límite para el crecimiento de organismos por</p>	<p><u>El ARNr 16S(rrs)</u>: Es un polirribonucleótido codificado por el gen rrs o AND ribosomal ARNr 16S (AND 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano.</p> <p>De distribución universal, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación.</p> <p>La secuencia del gen ARNr 16S presenta de forma aproximada 1500pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.</p> <p><u>16S-23S ARNr</u>: Espacio intergénico del 16S-23S ARNr (ITS). Estas ITS se presentan en un número variable en función del número de operones ARNr o alelos rrs.</p>
---	--	--	---

<ul style="list-style-type: none"><li>- <u>Diplobacilos:</u> Pares de bacilos.</li><li>- <u>Estreptobacilos:</u> Bacilos agrupados en cadenas.</li><li>- <u>Formas filamentosas:</u> Bacilos que crecen en forma de fibras.</li><li>- <u>Bacilos fusiformes:</u> Bacilos que tienen los extremos más delgados.</li></ul> <p><u>Bacterias en forma de espiral:</u> Son aquellas bacterias que presentan más de una o más curvaturas y nunca son rectas.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- <u>Vibriones:</u> Bacterias curvas (en forma de coma).</li><li>- <u>Espirilos:</u> Bacterias que poseen una configuración helicoidal, semejante a la de un tirabuzón, cuyos cuerpos</li></ul>	<p>Por lo tanto, existen distintos tipos de organismos según como aprovechan el carbono y el tipo de energía que utilizan:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <u>Quimiolitautótrofos:</u> Obtienen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos y el carbono de la fijación del dióxido de carbono. Ejemplo: bacterias nitrificantes, bacterias oxidantes del azufre, bacterias oxidantes del hierro, bacterias oxidantes del hidrógeno.</li><li>• <u>Fotolitautótrofos:</u> Obtienen energía de la luz y el carbono de la fijación del dióxido de carbono, usando compuestos inorgánicos como equivalentes reductores. Ejemplo: <i>Cyanobacteria</i>.</li><li>• <u>Quimiolitoheterótrofos:</u> Obtienen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, pero no pueden fijar el dióxido de carbono.</li></ul>	<p>debajo de los 0°C. Típicamente los organismos psicrófilos pueden crecer en temperaturas por debajo de los 5°C, aunque su rango de temperatura de crecimiento puede ir desde los 20°C hasta menos de 0°C.</p> <p><u>Alcalófilos:</u> Se llaman alcalófilos aquellos organismos que viven en ambientes con pH por encima de 9.</p> <p>Los microorganismos alcalófilos se encuentran por lo general en hábitats muy básicos como lagos sódicos y lagos mu carbonatados.</p> <p><u>Acidófilos:</u> Se consideran acidófilos aquellos organismos que viven en medios con pH menor de 5.</p> <p>Los ambientes ácidos surgen naturalmente de actividades geoquímicas, como pueden</p>	<p>Este elevado grado de diversidad observado en las ITS en diferentes géneros, diferentes especies, diferentes cepas, y en una misma cepa producido por variaciones en el número, tamaño y composición de las ITS del 16S-23S ARNr, constituye la base para su utilización en identificación, filogenia y/o tipificación.</p> <p><u>ARNr 23S:</u> Puede ser una buena alternativa en los que la fracción 16S no proporciona resultados concluyentes.</p> <p>Un aumento en el coste y alguna dificultad técnica en la ampliación de fragmentos más grandes pueden limitar su uso, aunque es utilizado como actualidad como un método auxiliar útil con fines taxonómicos y filogenéticos.</p>
--	---	---	---

son relativamente rígidos. Se desplazan con la ayuda de apéndices externos llamados flagelos.

Espiroquetas: Son microorganismos helicoidales y flexibles. Se desplazan mediante filamentos axiales que se asemejan a los flagelos, pero están rodeados por una vaina externa flexible.

Ejemplos: algunas bacterias oxidantes del hidrógeno.

- Quimioorganoheterótrofos: Obtienen energía, carbono y equivalentes reductores para las reacciones biosintéticas de compuestos orgánicos. Ejemplos: la mayoría de las bacterias, como *Escherichia coli*, *Bacillus spp.*
- Fotoorganotrofos: Obtienen energía de la luz y el carbono y los equivalentes reductores para las reacciones biosintéticas de compuestos orgánicos.

Según los requerimientos de oxígeno:

Respiración aerobia: El metabolismo aeróbico ocurre en Bacterias, Arqueas y Eucariontes.

ser la producción de gases sulfurosos de emanaciones volcánicas.

También es posible crear ambientes ácidos debido a la propia actividad o metabolismo de los organismos (Río Tinto).

Metalófilos: Los microorganismos que pueden crecer en la presencia de altas concentraciones de metales se llaman metalófilos.

Estos organismos, colonizan los sedimentos, los suelos o las basuras industriales con alto contenido de metales pesados.

*rpoB* (subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa):

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y constituye la diana final de las diferentes rutas que controlan la expresión génica en los organismos vivos.

El uso de este marcador ofrece algunas ventajas respecto a los marcadores moleculares precedentes, entre ellas las secuencias del *rpoB* presentan en numerosas ocasiones mayor calidad que las del ARNr 16S.

	<p>Aunque la mayoría de las especies bacterianas son anaeróbicas, muchos son aerobios facultativos u obligados.</p> <p>La mayoría de las especies de arqueas viven en ambientes extremos que a menudo son altamente anaeróbicos. Sin embargo, hay varios casos de arqueas aeróbicas como <i>Thermoplasmata</i>, <i>Sulfolobus</i>, <i>Halobacterium</i>.</p>		
<p><u>Otras morfologías:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Bacterias en forma de estrella</u>, género <i>Stella</i>.</li> <li>- <u>Células planas y rectangulares</u> (<i>Archaea Halofilas</i>), género <i>Haloarcula</i>.</li> <li>- <u>Células triangulares</u>.</li> </ul>	<p><u>Respiración anaerobia:</u> Los organismos anaerobios utilizan receptores de electrones que tienen un potencial más alto de reducción que el oxígeno, lo que significa que la respiración es menos eficiente y conduce generalmente a tasas de crecimiento más lenta que en los aerobios.</p> <p>Muchos anaerobios facultativos pueden utilizar tanto oxígeno como receptores finales de electrones alternativos para la respiración de las condiciones ambientales.</p>	<p><u>Piezófilos:</u> Los microorganismos que requieren condiciones de alta presión (superior a 1 atm) para su Desarrollo y crecimiento se llaman los piezófilos (conocidos antes como barófilos) Se encuentran en las profundidades marinas. Los océanos son el principal hábitat para los piezófilos, incluyendo varios termófilos e hipertermófilos.</p> <p><u>Halófilos:</u> Se llaman halófilos a aquellos organismos que requieren cierta concentración</p>	<p>También otro factor importante y favorable, es que existe mayor correlación en la similitud de la secuencia del <i>rpoB</i> con el criterio de inclusión en la misma especie de la hibridación ADN-ADN (DDH&lt;70%).</p> <p>Por último, otra circunstancia del análisis del <i>rpoB</i> es su aplicación como instrumento de genotificación y de filogenia.</p> <p>Consecuencia de que las sustituciones nucleotídicas que se</p>

<p>- <u>Microorganismos en forma alargada o de pera</u>, producen una yema al final de la hifa, género <i>Hyphomicrobium</i>.</p>	<p>La mayoría de los organismos de respiración anaerobia son heterótrofos, aunque hay algunos autótrofos.</p>	<p>de NaCl para su desarrollo y crecimiento.</p>	<p>producen son silentes (tercera posición del codón), que por su función <i>housekeeping</i> probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética.</p>
<p>- <u>Bacterias que forman pedunculos no celulares</u> como <i>Gallionella</i>.</p>		<p>Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren.</p> <p>La diversidad de los microorganismos halófilos es muy variada.</p> <p>Muchos de estos microorganismos han sido aislados de hábitats que presentan alta salinidad ubicados en diferentes puntos geográficos del planeta.</p> <p>Los ambientes extremadamente salinos son raros, la mayoría se encuentran en zonas calientes y secas como son lagos salinos, suelos salados ect.</p>	<p><u><i>gyrB</i> (subunidad β de la ADN girasa):</u></p> <p>Es el gen codificante de la subunidad β de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del AND bacteriano.</p> <p>De distribución universal, la presencia en monocopia de <i>gyrB</i> permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros <i>Aeromonas</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Vibrio</i>, y también</p>

			enterobacterias, microbacterias, ect.  Es un marcador de gran utilidad en la sistemática bacteriana al presentar una tasa de sustituciones sinónicas o silentes que se estima en al menos cuatro veces mayor que la del ARNr 16S.
--	--	--	---

**Tabla n.6** Métodos de identificación. (Bou *et al*,2011; Hylary,2014; Ramírez *et al*,2006).