



# Geomicrobiología de revestimiento de rocas en un ambiente ácido extremo

---

José Jordán Soria



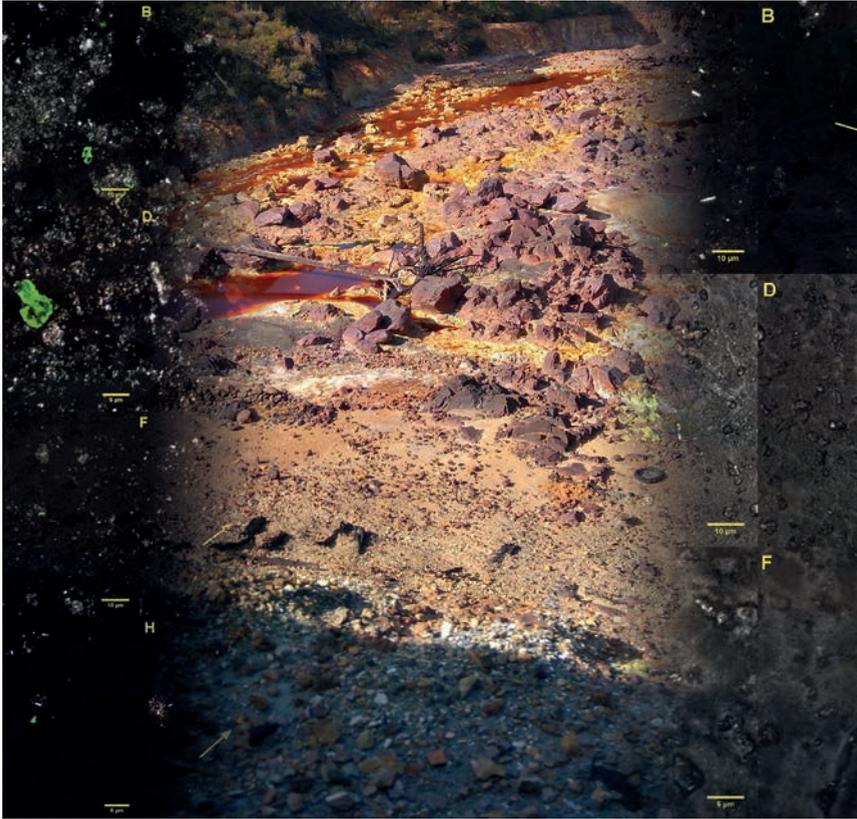
INSTITUTO NACIONAL DE  
TÉCNICA AEROSPAICIAL



José Jordán Soria (Valencia, 1990) es biólogo, especializado en biología evolutiva por la universidad de Valencia en el campus de Burjassot-Paterna. En 2019 obtuvo el grado de doctor en microbiología con mención Cum Laude por la universidad autónoma de Madrid, cuyos directores de tesis fueron Felipe Gómez Gómez y Ricardo Amils Pibernat. Su investigación para la obtención del grado de doctor se ha basado en la geomicrobiología de revestimientos rocosos presentes en la cuenca del río Tinto, ubicado en Andalucía, en la provincia de Huelva. Este río es un análogo marciano ampliamente estudiado en el departamento de planetología y habitabilidad, en el centro de Astrobiología CSIC-INTA en Torrejón de Ardoz (Madrid) donde José ha desarrollado su tesis junto al centro de biología molecular Severo Ochoa de la universidad autónoma de Madrid y cuyos resultados de la investigación realizada se plasman en el contenido de este libro.







# Geomicrobiología de revestimiento de rocas en un ambiente ácido extremo

José Jordán Soria



**MINISTERIO DE DEFENSA**

**CATÁLOGO GENERAL DE PUBLICACIONES OFICIALES**  
<https://cpage.mpr.gob.es>

Edita:



© Autor y editor, 2020

NIPO: 078-20-001-1 (edición en papel)

NIPO: 078-20-002-7 (edición en línea)

ISBN: 978-84-9091-518-9 (edición en papel)

Depósito Legal: M-21174-2020

Fecha de edición: noviembre 2020

Diseño / impresión: Vicente Aparisi / Din Impresores

Las opiniones emitidas en esta publicación son exclusiva responsabilidad del autor de la misma.

Los derechos de explotación de esta obra están amparados por la Ley de Propiedad Intelectual. Ninguna de las partes de la misma puede ser reproducida, almacenada ni transmitida en ninguna forma ni por medio alguno, electrónico, mecánico o de grabación, incluido fotocopias, o por cualquier otra forma, sin permiso previo, expreso y por escrito de los titulares del © Copyright.

En esta edición se ha utilizado papel 100% libre de cloro procedente de bosques gestionados de forma sostenible.



|   |           |
|---|-----------|
| Índice de figura .....  | 9         |
| Índice de tablas .....  | 13        |
| Lista de ecuaciones.....  | 15        |
| Lista de acrónimos .....  | 16        |
| <b>1. RESUMEN .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>21</b> |
| 2.1 Revestimientos en roca .....  | 21        |
| 2.1.1 Antecedentes y tipos de revestimiento .....                               | 21        |
| 2.2 Revestimientos enriquecidos en hierro .....                                 | 22        |
| 2.3 Barnices de roca. Generalidades .....                                       | 24        |
| 2.3.1 Química y mineralogía .....   | 27        |
| 2.3.1.1 Manganeso .....   | 27        |
| 2.3.1.2 Hierro .....  | 30        |
| 2.3.2 Características micro- y macromorfológicas de los barnices .....          | 31        |
| 2.3.3 Clasificación de los barnices .....                                       | 32        |
| 2.3.3.1 Tipo I .....  | 33        |
| 2.3.3.2 Tipo II .....   | 33        |
| 2.3.3.3 Tipo III .....  | 33        |
| 2.3.3.4 Tipo IV .....   | 34        |
| 2.3.3.5 Tipo V .....  | 34        |
| 2.4 Río Tinto .....   | 35        |
| 2.4.1 Sistema acuático.....   | 35        |
| 2.4.2 Sedimentos .....  | 37        |
| 2.4.3 Subsuelo .....  | 38        |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>  | <b>43</b> |
| 4.1 Áreas de muestreo .....   | 43        |
| 4.1.1 Zona Origen.....  | 43        |
| 4.1.2 Zona Berrocal .....   | 44        |
| 4.2 Caracterización mineralógica y de elementos químicos.....                   | 46        |
| 4.2.1 Difracción de rayos X (XRD) .....   | 46        |
| 4.2.2 Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) ..... | 46        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....                                | 47        |
| 4.4 Análisis geoquímico: 13C y 15N .....  | 48        |
| 4.5 Caracterización biológica .....   | 48        |
| 4.5.1 Extracción de ADN. Métodos de extracción y optimización .....               | 48        |
| 4.5.2 Análisis del ADN.....   | 48        |
| 4.5.3 Amplificación cuantitativa del ADN (qPCR) .....                             | 49        |
| 4.5.4 Amplificación del ADN (PCR) .....   | 50        |
| 4.5.5 Clonaje, secuenciación Sanger y tratamiento bioinformático .....            | 52        |
| 4.5.6 Secuenciación Illumina y tratamiento bioinformático .....                   | 53        |
| 4.5.6.1 Identificación y caracterización de secuencias no asignada .....          | 54        |
| 4.5.7 Cálculos de los parámetros de interés ecológico .....                       | 55        |
| 4.5.8 Cultivos de enriquecimiento .....   | 55        |
| 4.5.9 Hibridación <i>in situ</i> (CARD-FISH) .....                                | 55        |
| <b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>59</b> |
| 5.1 Análisis mineralógico y composición elemental de las muestras .....           | 59        |
| 5.1.1 Origen .....  | 59        |
| 5.1.2 Berrocal.....   | 62        |
| 5.2 Microscopía electrónica (SEM) .....   | 66        |
| 5.2.1 Unidad litoestratigráfica. Zona Orige .....                                 | 66        |
| 5.2.2 Zona Berrocal, muestra P1 .....   | 67        |
| 5.2.2.1 Ca, Mn y materia orgánica .....   | 70        |
| 5.3 Similitudes y diferencias de las muestras rocosas.                            |           |
| Comparación con otras muestras ambientales .....                                  | 74        |
| 5.4 Análisis isotópicos .....   | 79        |
| 5.5 Extracción de ADN .....   | 80        |
| 5.6 Caracterización de la biodiversidad.....                                      | 82        |
| <b>5.6.1 Secuenciación del ADN .....</b>  | <b>82</b> |
| 5.6.1.1 Zona Origen. Hem, Mag y Ror .....   | 84        |
| 5.6.1.1.1 Muestra Hem.....  | 84        |
| 5.6.1.1.2 Muestra Mag.....  | 89        |
| 5.6.1.1.3 Muestra Ror .....   | 92        |
| 5.6.1.2 Zona Berrocal .....   | 94        |
| 5.6.1.2.1 Muestra Berr .....  | 94        |
| 5.6.1.2.2 Muestra P1 .....  | 96        |
| 5.6.1.3 Cultivos de enriquecimiento .....   | 98        |
| 5.6.1.3.1 Cultivo Fe <sup>+2</sup> + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Berr) ..... | 99        |
| 5.6.1.3.2 Cultivo DG+S <sup>0</sup> (Hem y Mag) .....                             | 99        |
| 5.6.1.3.3 Cultivo DG (P1) .....   | 102       |

|   |            |
|---|------------|
| 5.6.2 Parámetros ecológicos microbianos.  |            |
| Comparación de las comunidades en las muestras ambientales .....  | 103        |
| 5.6.3 Inferencia metagenómica de metabolismos en las muestras ambientales secuenciadas por Illumina .....   | 105        |
| 5.6.3.1 Metabolismo del azufre .....  | 107        |
| 5.6.3.2 Metabolismo del nitrógeno .....   | 110        |
| 5.6.3.3 Transportadores de membrana y enzimas de interés .....  | 114        |
| 5.6.4 Diversidad microbiana identificada por CARD-FIS .....   | 117        |
| <b>6. DISCUSIÓN FINAL .....</b>   | <b>125</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES .....</b>  | <b>137</b> |
| <b>REFERENCIAS .....</b>  | <b>139</b> |
| <b>APÉNDICE .....</b>   | <b>155</b> |
| A) Ubicación de las principales referencias bibliográficas de estudios microbianos en revestimiento de roca ricos en hierro .....                                     | 155        |
| B) Protocolo de ligación y transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> One Shot TOP10 de Invitrogen utilizado en el laboratorio ... | 156        |
| C) Análisis geoquímicos Hem, Mag y P1 .....   | 157        |
| D) PCR específica de Cyanobacteri .....   | 158        |
| E) Estándares utilizados para la qPCR .....   | 159        |
| F) Curvas de rarefacción .....  | 160        |
| G) Secuenciación Illumina.....  | 163        |
| H) Árboles filogenético .....   | 164        |
| I) Datos de los diferentes umbrales de identidad analizados para realizar la inferencia metagenómica .....  | 170        |
| J) Información relativa a las inferencias filogenéticas realizada .....   | 172        |
| K) Códigos KEGG y descripción (disponible una mayor información en la página web <a href="https://www.genome.jp/kegg/">https://www.genome.jp/kegg/</a> ). .....       | 175        |
| L) Imágenes CARD-FISH .....   | 181        |
| M) XRD e ICP-MS. Datos originales obtenidos .....   | 194        |

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Modelos conceptuales propuestos para la formación de los barnices de roca. ....  | 26 |
| Figura 2: Cartografía geográfica de la cuenca de río Tinto .....   | 36 |
| Figura 3: Modelo geomicrobiológico del ciclo del Fe, S y C en la columna de agua de río Tinto  | 37 |
| Figura 4: Modelo geomicrobiológico de los sedimentos de Río Tinto .....  | 38 |
| Figura 5: Modelo propuesto del ciclo geomicrobiológico del subsuelo de la IPB .....  | 39 |
| Figura 6: Muestreo en la zona del Origen .....   | 43 |
| Figura 7: Ubicación aproximada de la zona de muestreo en Berrocal .....  | 44 |
| Figura 8: Representación de la ubicación de las muestras recogidas en la zona de Berrocal<br>en el margen y en la cuenca del cauce del río ..... | 45 |
| Figura 9: Muestra P1 recogida en Berrocal .....  | 45 |
| Figura 10: Diagrama del flujo de trabajo realizado .....   | 54 |
| Figura 11: Esquema de una hibridación in situ .....  | 57 |
| Figura 12: Composición elemental en la unidad litoestratigráfica del Origen .....  | 61 |
| Figura 13: Composición elemental de la muestra Ror .....   | 61 |
| Figura 14: Abundancia de los principales elementos en los sedimentos de Berrocal.....  | 62 |
| Figura 15: Composición elemental de elementos menores<br>presentes en los sedimentos de Berrocal .....   | 63 |
| Figura 16: Composición elemental de las partículas de roca<br>recolectadas alrededor de P1 (muestra N-Berrocal) .....                            | 64 |
| Figura 17: Composición elemental en el revestimiento de roca en Berrocal (P1) .....  | 65 |
| Figura 18: Observación por microscopía electrónica de barrido<br>y análisis EDX de la muestras Hem y Mag .....                                   | 66 |
| Figura 19: Imagen panorámica y de detalle de estructuras lisas<br>y planas incrustadas en la estructura botroidal en la muestra P1 .....         | 68 |
| Figura 20: Observación de distintas morfologías en la muestra P1 .....   | 69 |
| Figura 21: Detalle de una partícula orgánica en P1 y análisis .....  | 70 |
| Figura 22: Detección de Ca en P1 .....   | 71 |
| Figura 23: Detección de manganeso en dos zonas distintas de la muestra P1 .....  | 72 |
| Figura 24: Mapeado elemental exhaustivo en el área indicada<br>en la figura 23- 2 y abundancia relativa encontrada.....                          | 73 |
| Figura 25: PCA de las muestras rocosas de Río Tinto caracterizadas por ICP-MS .....  | 74 |
| Figura 26: Cociente de los valores de los elementos respecto del valor<br>medio encontrado en la corteza continental superior, la UCC .....      | 75 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 27: Correlación de elementos principales por PCA de nuestras muestras de revestimientos de roca de Río Tinto con respecto a diferentes barnices de roca descritos en la literatura .....              | 76  |
| Figura 28: Representación de los cocientes Al/Ni vs. Mn/Ba y Mn/REY vs. Mn/Ba de las muestras rocosas .....  | 78  |
| Figura 29: Valores de $\delta^{15}\text{N}$ y $\delta^{13}\text{C}$ de las muestras Hem, Mag y P1 .....  | 80  |
| Figura 30: Abundancia total de N y C en las muestras Hem, Mag y P1 .....   | 80  |
| Figura 31: qPCR que muestra la amplificación de las muestras ambientales versus el número de ciclos realizados .....   | 83  |
| Figura 32: qPCR que muestra la amplificación de los cultivos de enriquecimiento versus el número de ciclos realizado .....   | 84  |
| Figura 33: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en He .....   | 85  |
| Figura 34: Abundancias relativas de diferentes phyla y clases en la muestra Hem obtenido mediante la secuenciación por Illumina .....  | 87  |
| Figura 35: Análisis bayesiano de las secuencias desconocidas identificadas por Illumina en He .....  | 88  |
| Figura 36: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en la muestra Ma .....  | 90  |
| Figura 37: Abundancias relativas de diferentes Phyla y clases en la muestra Mag obtenidas mediante la secuenciación por Illumina .....   | 91  |
| Figura 38: Árbol filogenético por máxima verosimilitud de todas las secuencias identificadas como Chloroflexi en Hem y M .....   | 92  |
| Figura 39: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en la muestra Ro .....  | 93  |
| Figura 40: Grupos de secuencias Sanger identificadas en los sedimentos de Berrocal (Berr .....   | 95  |
| Figura 41: Abundancia relativa en la muestra P1 por Illumina .....   | 97  |
| Figura 42: Árbol de análisis bayesiano realizado para la agrupación de las secuencias no identificadas en la muestra P .....   | 98  |
| Figura 43: Abundancia relativa de grupos microbianos en el cultivo de enriquecimiento de la muestra Berr en el medio $\text{Fe}+\text{NH}_4\text{NO}_3$ mediante secuenciación Illumina .....                | 99  |
| Figura 44: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento de la muestra Hem en el medio $\text{DG} + \text{S}^0$ .....  | 100 |
| Figura 45: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento de la muestra Mag en el medio $\text{DG} + \text{S}^0$ .....  | 101 |
| Figura 46: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento P1 en el medio $\text{DG}$ .....  | 102 |
| Figura 47: Relaciones de los diferentes taxones microbianos identificados en las muestras secuenciadas por Illumina (Hem, Mag y P1) realizado por el programa bioinformático Calypso a nivel de phylum ..... | 104 |
| Figura 48: Abundancia relativa de cada ruta metabólica en las muestras ambientales .....   | 106 |
| Figura 49: Abundancia relativa del metabolismo del azufre en las muestras ambientales .....  | 107 |
| Figura 50: Diferencias significativas en el metabolismo del azufre entre la muestra P1 con respecto a las muestras Hem y Mag .....   | 108 |
| Figura 51: Diferencias significativas en el metabolismo del azufre de la muestra Hem respecto Mag y P1 .....   | 109 |

# Índice de figura

|   |     |
|---|-----|
| Figura 52: Abundancia relativa de las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno ...  | 110 |
| Figura 53: Diferencias en el metabolismo del nitrógeno en Hem con respecto a Mag y P1 .....   | 112 |
| Figura 54: Diferencias significativas encontradas en el metabolismo del nitrógeno en la muestra Mag con respecto a Hem y P1 .....                           | 113 |
| Figura 55: Abundancia relativa de diferentes tipos de transportadores ABC en las muestras ambientales .....   | 115 |
| Figura 56: Abundancia relativa de diferentes tipos de transportadores no ABC en las muestras ambientales .....  | 116 |
| Figura 57: Abundancia relativa de otras enzimas de interés en las muestras ambientales .....  | 116 |
| Figura 58: Hibridación positiva de Bacteria en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D), Hem(E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda EUB338-I-II-III combinadas ..... | 118 |
| Figura 59: Señal de hibridación en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D) y Mag (E-F) usando la sonda ARCH 915 .....   | 119 |
| Figura 60: Hipótesis de la evolución temporal de la comunidad microbiana de la unidad litoestratigráfica del Orige .....                                    | 126 |
| Figura 61: Modelo geomicrobiológico de la muestra Mag, en la unidad litoestratigráfica del Orige .....  | 127 |
| Figura 62: Modelo geomicrobiológico de la muestra Hem, en la unidad litoestratigráfica del Orige .....  | 129 |
| Figura 63: Modelo geomicrobiológico de la muestra Berr de la zona de Berrocal.....  | 131 |
| Figura 64: Modelo geomicrobiológico de la muestra P1, el revestimiento de roca situado en la cuenca de Berrocal .....                                       | 132 |
| Figura 65: Referencias bibliográficas de revestimientos ricos en Fe con su año y ubicación geográfica .....   | 155 |
| Figura 66: PCRs con cebadores específicos de Cyanobacteri .....   | 158 |
| Figura 67: Curva de rarefacción de la secuenciación Sanger de las muestras Hem y Mag .....  | 160 |
| Figura 68: Curva de rarefacción de las secuenciaciones Sanger en la muestra Ror .....   | 160 |
| Figura 69: Curva de rarefacción de la secuenciación Sanger de la muestra Berr .....   | 161 |
| Figura 70: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra Hem ...   | 161 |
| Figura 71: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra Mag ...   | 162 |
| Figura 72: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra P1 .....  | 162 |
| Figura 73: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias Hem. ....   | 165 |
| Figura 74: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias forward de las diferentes extracciones realizadas de Mag.....                         | 166 |
| Figura 75: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias reverse de las diferentes extracciones realizadas de Mag.....                         | 167 |
| Figura 76: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias de las extracciones realizadas en Ror .....   | 168 |
| Figura 77: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias obtenidas de las diferentes extracciones realizadas en Berr .....                     | 169 |
| Figura 78: Representación gráfica del pre-análisis en Piphillin para la selección del mejor umbral de identidad .....                                       | 170 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 79: Señal de hibridación de $\alpha$ -Proteobacteria en Berr (A-B),<br>P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda ALF 965 .....   | 181 |
| Figura 80: Señal de hibridación de $\beta$ -Proteobacteria en P1 (A-B),<br>Hem (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda BET 42a .....  | 182 |
| Figura 81: Señal de hibridación de $\gamma$ -Proteobacteria en Berr (A-B),<br>P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda GAM 42a .....   | 183 |
| Figura 82: Señal de hibridación en P1 (A-B) y Hem (C-D) utilizando la sonda<br>ACD 840 ( <i>Acidiphillium</i> sp.) y señal de hibridación en las muestras Berr (E-F)<br>y Hem (G-H) con la sonda ACI 145 ( <i>Acidovorax</i> sp.) ..... | 184 |
| Figura 83: Señal de hibridación en Berr (A-B), P1 (C-D)<br>y Hem (E-F) utilizando la sonda THIO820 ( <i>Acidithiobacillus</i> sp.) .....  | 185 |
| Figura 84: Señal de hibridación de Actinobacteria en las muestras de Berr (A-B),<br>P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda HGC 69a.....  | 186 |
| Figura 85: Señal de hibridación de Bacteroidetes (A-B) en Mag y Firmicutes en las muestras<br>Berr (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando las sondas CF 319a<br>y LGC 354a + b respectivamente .....                                   | 187 |
| Figura 86: Señal de hibridación de <i>Sulfobacillus</i> sp. en las muestras de Berr (A-B),<br>P1 (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda SUL 228 .....  | 188 |
| Figura 87: Señal de hibridación de <i>Chloroflex</i> en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D),<br>Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando sondas CFX 1223 + GNSB 938 combinadas .....  | 189 |
| Figura 88: Señal de hibridación de <i>Cyanobacteria</i> (A-B) en Hem y señal de hibridación SRB<br>en las muestras P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando las sondas<br>CYA 358 y SRB 385 respectivamente .....                     | 190 |
| Figura 89: Señal de hibridación de <i>Euryarchaeota</i> en las muestras Berr (A-B),<br>P1 (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda EURY 803 .....  | 191 |
| Figura 90: Señal de hibridación de Acidobacterias en las muestras Berr (A-B),<br>Hem (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda SS HOL 1400 .....  | 192 |
| Figura 91: Señal de hibridación de <i>Leptospirillum</i> sp. en las muestras de Berr (A-B),<br>P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda LF 655.....  | 193 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 1: Descripción de distintos tipos de revestimientos de roca (modificado de Dorn, 2013 ...  | 22  |
| Tabla 2: Valores promedio (en tanto por ciento) de los componentes de diferentes tipos de revestimiento rocoso observados en Fontana, California, USA .....  | 23  |
| Tabla 3: Datos cristalográficos y estructurales de los principales óxidos de manganes .....  | 29  |
| Tabla 4: Datos cristalográficos y estructura de los principales óxidos de hierro .....   | 31  |
| Tabla 5: Categorización de los barnices de roca en función de su estructura y composición química .....  | 32  |
| Tabla 6: Componentes y parámetros destacados del ICP-MS utilizado .....  | 47  |
| Tabla 7: Reactivos utilizados para la qPCR .....   | 49  |
| Tabla 8: Condiciones de la reacción de amplificación de la qPCR especificada por la casa comercial .....   | 49  |
| Tabla 9: Componentes del kit de amplificación de ADN de Invitrogen .....   | 50  |
| Tabla 10: Condiciones de amplificación utilizando el kit de Invitrogen (para la posterior secuenciación con Sanger).....   | 51  |
| Tabla 11: Componentes del kit de amplificación de ADN aKaRa .....  | 51  |
| Tabla 12: Condiciones de amplificación utilizando el kit de Invitrogen (para la posterior secuenciación por Illumina) .....  | 51  |
| Tabla 13: Cebadores utilizados en las diferentes PCR realizadas .....  | 52  |
| Tabla 14: Valores de los parámetros de eliminación del vector, regiones de baja calidad y ensamblaje utilizado en PreGap4 .....  | 53  |
| Tabla 15: Picos de excitación y de emisión de los fluoróforos usados para los experimentos de hibridación .....  | 56  |
| Tabla 16: Sondas para el CARD-FISH utilizadas en este trabajo. Se indica la secuencia, especificidad de la sonda, el % de formamida para la hibridación y la concentración de NaCl para el lavado de la sonda junto con el artículo de referencia en el que se describe la sonda ..... | 58  |
| Tabla 17: Resultados de las extracciones de DNA usando diferentes metodologías .....   | 81  |
| Tabla 18: Cálculo de parámetros ecológicos de interés en ecología microbiana de las muestras ambientales estudiadas .....  | 103 |
| Tabla 19: Tasa de reemplazo utilizando los valores Bray-Curtis en función de la abundancia de elementos químicos en P1, Hem y Mag .....  | 105 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabla 20: Grupos taxonómicos identificados a nivel de dominio, phylum y orden en las diferentes muestras analizadas con diferentes técnicas de ecología microbiana .....   | 135 |
| Tabla 21: Grupos taxonómicos identificados a nivel de Género en las diferentes muestras analizadas con diferentes técnicas de ecología microbiana .....  | 136 |
| Tabla 22: Cocientes de elementos obtenidos para la clasificación de las muestras en base al trabajo desarrollado por Macholdt et al., 2017 .....   | 157 |
| Tabla 23: Datos numéricos de los análisis geoquímicos realizados en las muestras Hem, Mag (Origen) y P1 (Berrocal) .....   | 157 |
| Tabla 24: Estándares usados en la qPCR .....   | 159 |
| Tabla 25: Información relativa a la secuenciación Illumina realizada de las muestras ambientales y cultivos .....  | 163 |
| Tabla 26: Resultados numéricos obtenidos de la inferencia metagenómica con la herramienta bioinformática Piphillin utilizando diferentes umbrales de identidad .....   | 171 |
| Tabla 27: Secuencias procedentes de las bases de datos utilizadas para agrupar las secuencias identificadas por secuenciación Sanger y realizar las inferencias filogenética de nuestras secuencias de interés ..... | 172 |
| Tabla 28: Identificación más probable por Blastn de secuencias no clasificadas por QII .....   | 173 |
| Tabla 29: Códigos KEGG de las rutas metabólicas .....  | 175 |
| Tabla 30: Códigos KEGG de las enzimas implicadas en el metabolismo del azufre .....  | 176 |
| Tabla 31: Códigos KEGG de las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno .....   | 177 |
| Tabla 32: Códigos KEGG de transportadores de membrana tipo ABC .....   | 178 |
| Tabla 33: Códigos KEGG de transportadores de membrana no ABC .....   | 179 |
| Tabla 34: Códigos KEGG de otras enzimas de interés .....   | 180 |

# Lista de ecuaciones

|  |     |
|--|-----|
| $\text{Mn}^{2+} + 1/2 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{MnO}_2 + 2 \text{H}^+$ ..... | 28  |
| $2 \text{Mn}^{3+} \leftrightarrow \text{Mn}^{2+} + \text{Mn}^{4+}$ .....                             | 28  |
| $\text{Mn}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{MnOOH} + 3 \text{H}^+$ .....            | 28  |
| $\text{MnO}_2 + 4 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 2 \text{H}_2\text{O}$ ..... | 28  |
| $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ .....                         | 29  |
| $\text{Fe}^{3+} + 3 \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 + 3 \text{H}^+$ .....  | 30  |
| $\text{Fe}^{2+} + 2 \text{H}^+ + h\nu \rightarrow 2 \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2$ .....               | 30  |
| $2 \text{H}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ .....        | 115 |
| $\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ .....                    | 115 |

# Lista de acrónimos

BioNJ: Bio Neighbor-Joining  
Ce\*: Cerio en estado excitado  
CPR: Candidate Phyla Radiation  
ECE: Mecanismo de transferencia electroquímica  
EDTA: Ácido etiléndiaminotetracético  
EDX: Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X  
EtOH: Etanol  
FAME: Análisis del éster metílico del ácido graso  
Ga: Gigaños  
GTR: General Time Reversible (modelo evolutivo)  
ICP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente  
IPB: Faja Ibérica Pirítica  
IRMS: Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas  
OTU(s): Unidad(es) Operacional(es) Taxonómica(s)  
PCA: Análisis de Componentes Principales  
PCR: Cadena en Reacción de la Polimerasa  
qPCR: PCR Cuantitativa  
RDP: Ribosomal Database Project  
REE(s): Elemento(s) de Tierras Raras  
REY(s): Elemento(s) de Tierras Raras + Itrio (Y)  
SEM: Microscopía Electrónica de Barrido  
TIM: Transitional model (modelo evolutivo)  
TN: Nitrógeno Total  
TOC: Carbono orgánico Total  
UCC: Corteza Continental Superior  
USA: Estados Unidos de América  
UV: Ultravioleta  
XRD: Difracción de Rayos-X

No quiero extenderme demasiado, así que me gustaría agradecer, sin ningún orden en particular, primero a todos los compañeros del Centro de Astrobiología: Juanjo (y Vero), Maca, Cris, Sara, Pilar, Joana, Gema, Esther-Acosta, Santos, Álex, Bruno, Diego, Juanma, Bea, Carol, Edu, Cris (CBM), Jose Miguel (CBM) y un largo etc., (¡que no se den por aludidos si alguno no aparece!) y, por supuesto, a Laura, Bea y Armando del Laboratorio de Extremofilia, de los que he aprendido mucho. Gracias a todos por su cariño en más de cuatro años y lo que he aprendido de sus investigaciones y de sus cosas, que no son pocas.

Por supuesto, recordar a los estudiantes que han pasado por el laboratorio durante mi etapa: Rafa, Robert, Adri, Silvia, María Antonia, Maria Vittoria y Víctor Rinaldo, que espero que continúe con éxito esta línea de investigación de los barnices de roca, y a todos investigadores presentes en el Centro de Astrobiología, de los cuales he aprendido muchísimo, en especial en las comidas diarias en el INTA, que han saciado mi curiosidad sobre las diferentes disciplinas que engloba el campo de la Astrobiología; ha sido muy instructivo para mí.

Por supuesto, agradecer a Felipe y Ricardo este tema de tesis y su apoyo y consejos en la realización del trabajo junto con Nuria, con su ayuda en el SEM, con las cosas del laboratorio, consejos y paciencia que han tenido conmigo. También agradecer a Christine Moiss-Eichinger y a su grupo de trabajo por los tres acogedores meses que pasé en Austria, en la Universidad Médica de Graz.

También a mis amistades de Valencia: Silvia, Màrius, Raquel... por su apoyo desde la distancia y al pueblo de Burjassot. Pocos sitios te ofrecen una universidad, centros de investigación y un gran centro cultural al lado de tu casa y debería ser potenciado por las administraciones públicas un mayor acercamiento de la ciencia a la sociedad.

Y por último, pero no menos importante, dar las gracias a mi hermana Esther, a mi yayo José y mi yaya Carmen, quienes me han criado y gracias a los cuales sólo he tenido que enfocarme en hacer las cosas que me gustan.

He hecho todo lo que he podido bajo mi punto de vista, y éste es el resultado del trabajo realizado en 5 años; primero financiado durante 2 años por la FPI de la universidad Autónoma de Madrid y después, los otros 2 años, por la FPU del ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Espero que los lectores les guste.



Río Tinto es un ambiente natural ácido extremo debido a la actividad microbiana en el subsuelo de la Faja Ibérica Pirítica (IPB). El río tiene una gran cantidad de metales pesados en solución, especialmente el hierro, cuyo efecto tamponador permite mantener un pH ácido constante en el cauce del río.

Uno de los nichos microbianos menos conocidos y estudiados en el sistema de Río Tinto y de manera general en el campo de la ecología microbiana son los revestimientos minerales que se depositan sobre la superficie de las rocas. En este ambiente poliextremo hay presentes comunidades microbianas interactuando con el sustrato rocoso y que son influenciadas de manera local y global por el ambiente donde se ubican.

El interés de los revestimientos enriquecidos en hierro son varios: por un lado, su carácter altamente oxidativo, la biodiversidad presente y los ciclos biogeoquímicos a pequeña escala que se desarrollan sobre su superficie, lo que lo convierte en un microambiente de gran interés para la búsqueda de biomarcadores en Astrobiología.

Esta tesis se ha caracterizado por la implementación de diferentes técnicas de ecología microbiana en los microorganismos presentes de los diferentes revestimientos de roca localizados en dos ubicaciones distintas de la cuenca del Río Tinto con diferentes características fisicoquímicas. Los resultados obtenidos muestran que la actividad microbiana de la comunidad que se observa en los revestimientos parece que está relacionada con la diversidad presente, el consumo de materia orgánica para su desarrollo y la biodisponibilidad de N en cada sistema particular estudiado.

**PALABRAS CLAVE:** ambiente ácido extremo, barniz de roca, biogeoquímica, biomineralización, diversidad microbiana, hierro, manganeso, película de hierro, revestimiento.



## 2.1 Revestimientos en roca

Los revestimientos sobre roca (*Rock coatings*) se definen como un sedimento geoquímico complejo y heterogéneo debido a la deposición de material y a la acción (bio)química sobre el sustrato, reflejando una estrecha relación entre la litosfera, la biosfera, la hidrosfera y la atmósfera (Schindler and Dorn, 2017), que conducen a la modificación del tono y color de los paisajes rocosos, lo que hace que muchas veces no sea observada la coloración y apariencia real de las rocas (Dorn, 2013).

La diversidad de revestimientos y las comunidades microbianas estudiadas en diferentes lugares reflejan cómo la dinámica evolutiva ha permitido a la vida adaptarse a todo tipo de condiciones ambientales diferentes y poliextremas (Gorbushina and Broughton, 2009), siendo un ambiente susceptible de colonización microbiana desde hace más de 2,6 Ga (Watanabe et al., 2000).

Cabría indicar que numerosos revestimientos han sido utilizados como lienzo por nuestros antepasados, realizando numerosos grabados (denominados en arqueología petroglifos), siendo estas obras prehistóricas el antecedente más cercano que se conoce a la escritura cuneiforme (Bradley et al., 1994).

### 2.1.1. Antecedentes y tipos de revestimiento

La primera descripción científica de revestimientos sobre rocas fue realizada por Alexander von Humboldt en el siglo XIX en su libro *Personal Narrative of Travels to the Equinoctial Regions of the New Continent During the Years 1799-1804* (Humboldt, 1852). Von Humboldt dedujo correctamente que la cubierta negra de las rocas en el río Orinoco (Venezuela) era una acumulación rica en Mn.

También Charles Darwin en su libro *Natural history and geology* de 1845 observó y describió fino revestimientos sobre rocas en sus expediciones a Sudamérica (Darwin, 1845). Ya en el siglo XX, los recubrimientos de roca han sido estudiados de manera sistemática en múltiples disciplinas (Gorbushina and Broughton, 2009).

Estos recubrimientos que se observan depositados sobre las rocas pueden encontrarse en una gran multitud de superficies litológicas expuestas, que van desde una escala microscópica a una escala planetaria, en cualquier tipo de meteorización terrestre, con condiciones fisicoquímicas muy diversas y en multitud de entornos geológicos, bioclimáticos y antropogénicos distintos (Dorn, 2013).

Las descripciones de diferentes tipos de revestimientos de roca en la literatura reflejan su gran variedad y características particulares (tabla 1). De todos ellos, este trabajo se centrará en los revestimientos que están altamente enriquecidos en hierro: los barnices de roca y las películas de hierro.

| Nombre del revestimiento                | Descripción   |
|---|---|
| <b>Película o barniz de hierro</b>      | Compuesto fundamentalmente por óxidos de hierro e hidróxidos, en más de tres cuartos su composición. Comúnmente son clastos enterrados en el subsuelo que han quedado expuestos superficialment           |
| <b>Barniz rocoso (o barniz de roca)</b> | Minerales de arcilla, óxidos de Mn y Fe en cantidades variables junto a elementos traza, con rango de colores variable de negro a naranja debido a las diferentes cantidades de los óxidos                |
| <b>Sílice glaseado</b>                  | De un color blanco claro y brillante está compuesto fundamentalmente por sílice amorfo y aluminio y a veces acompañado con algo de hierro   |
| <b>Corteza de carbonatos</b>            | Compuesto principalmente por carbonatos precipitados, normalmente $\text{CaCO}_3$ y a veces $\text{MgCO}_3$   |
| <b>Corteza de nitratos</b>              | Revestimientos de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{KNO}_3$ . Sus ubicaciones son en cuevas y refugios rocosos en zonas de piedra caliza  |
| <b>Corteza de oxalates</b>              | Formado por oxalatos de calcio y silicio con concentraciones variables de magnesio, aluminio, fósforo, azufre, bario y/o manganeso. Se forman cerca o sobre líquenes y normalmente son de un color oscuro |
| <b>Corteza de fosfatos</b>              | Minerales de fosfato (ej. fosfatos de hierro o apatita) mezclados con arcillas y a veces manganeso. Muchas veces se derivan de la descomposición de excrementos de pájaros                                |
| <b>Corteza de sulfatos</b>              | Compuesto por la superposición de sulfatos (ej. yesos, baritina) en la roca. No se debe confundir con el yeso que se deposita sedimentariamente   |
| <b>Corteza de sales</b>                 | Precipitación de cloruros ( $\text{NaCl}$ , $\text{KCl}$ ) en las superficies rocosas (ej. Tirez; depresión del Dallol)   |
| <b>Revestimiento por litobiontes</b>    | Los restos orgánicos y organismos presentes son el origen del revestimiento sobre la roca (ej. líquenes)  |
| <b>Pigmento</b>                         | Material natural o artificial colocado en superficies rocosas por sere humanos (ej. pinturas de Atapuerca)  |

Tabla 1: Descripción de distintos tipos de revestimientos de roca (modificado de Dorn, 2013 . ■

## 2.2. Revestimientos enriquecidos en hierro

Uno de los petroglifos más famosos y conocidos del mundo, situado en el condado de San Juan en Utah (USA), es el llamado *Newspaper Rock*, unas obras rupestres que fueron realizados por los antiguos habitantes de Norteamérica (Malotki and Wallace, 2011). Estos petroglifos fueron grabados eliminando mediante raspado el revestimiento oscuro sobre la roca en la que se asientan.

Es este revestimiento oscuro depositado sobre las rocas conocido en la literatura científica como barniz rocoso o barniz de roca, también llamado de manera equivalente barniz desértico cuando es observado en paisajes áridos, sitios en los que mejor ha sido estudiado este tipo de revestimiento (Dorn, 2007).

Básicamente, un barniz de roca se puede definir como una mezcla de materiales con un grosor delgado, de no más de 500  $\mu\text{m}$ , con aproximadamente dos tercios en su composición de minerales arcillosos cementados sobre una roca madre por cantidades variables de óxidos de hierro y manganeso que componen típicamente alrededor de una cuarta parte de su composición, pudiendo presentar una textura en capas impuesta por los minerales de arcilla (Dorn and Oberlander, 1981; Dorn, 2007).

La presencia de arcillas en las que se asientan los óxidos y la anomalía geoquímica de enriquecimiento en manganeso respecto al valor promedio que se encuentra en la corteza terrestre es algo que caracteriza a este tipo de revestimiento de roca y que permite diferenciarlo de otros revestimientos similares como las películas de hierro (tabla 2).

A diferencia de los barnices de roca, las películas de hierro (*iron film*) se forman donde el agua de rocío se puede concentrar fluyendo continuamente, envolviendo y penetrando clastos enterrados total o parcialmente en las capas superficiales de suelo o sedimentos y que cementa con la cristalización de los granos en vez de darse directamente sobre una superficie de roca desnuda, apareciendo posteriormente en pendientes que experimentan una erosión del suelo, quedando expuestas a la intemperie, sufriendo alteraciones químicas posteriores que le dan las características que se observan (Dorn and Meek, 1995; Dorn, 2007).

Los intereses de los revestimientos enriquecidos en hierro en investigación son muy diversos: como una potencial herramienta de datación de superficies rocosas (Dorn et al., 1990; Liu, 2003), como monitores ambientales para ciertos metales pesados (Dorn and Krinsley, 1991), el estudio de petroglifos (Dorn, 2000) y, por supuesto, de gran interés en ecología microbiana (ej. Kuhlman et al., 2006) debido a su carácter altamente oxidante, la biodiversidad presente y los ciclos biogeoquímicos a pequeña escala que se desarrollan en ellos, haciéndolo muy interesante de estudiar en el campo de la astrobiología (Allen et al., 2001; Malherbe et al., 2017).

Los nódulos de manganeso, aunque no puede considerarse un revestimiento de roca, ya que en su origen y formación no tienen una influencia atmosférica directa, reflejan una gran ubicuidad de los depósitos de hierro y manganeso en el planeta Tierra, con gran interés para tecnologías emergentes y para el enriquecimiento en determinados elementos que se dan en los mismos (Thiagarajan and Lee, 2004; Koschinsky and Hein, 2017).

| Tipo                      | Na <sub>2</sub> O | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | SiO <sub>2</sub> | CaO       | TiO <sub>2</sub> | MnO        | Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |
|---------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------|-----------|------------------|------------|--------------------------------|
| <b>Película de hierro</b> | ND                | 3,84±0,77                      | 1,36±0,44        | 0,78±0,06 | 0,26±0,10        | 0,86±0,12  | 79,33±1,38                     |
| <b>Sílice glaseado</b>    | 0,65±0,34         | 23,67±1,89                     | 43,15±2,18       | 1,36±0,24 | ND               | 2,64±0,06  | 4,82±0,47                      |
| <b>Barniz de roca</b>     | 1,38±0,67         | 12,10±3,12                     | 20,34±5,24       | 7,94±8,63 | 1,06±0,36        | 17,20±8,79 | 6,45±2,87                      |

ND: Por debajo del límite de detección. Los valores remarcados en negrita indican los componentes principales característicos de cada revestimiento, con más de un 5% de abundancia en promedio. Esos valores promedio se calcularon a partir de los datos procedentes de Dorn and Meek, 1995.

**Tabla 2: Valores promedio (en tanto por ciento) de los componentes de diferentes tipos de revestimiento rocoso observados en Fontana, California, USA. ■**

## 2.3. Barnices de roca. Generalidades

A pesar de su mayor estudio en ambientes desérticos debido a su fácil localización y a la erosión causada por el viento que puede favorecer su formación inicial, los barnices de roca pueden encontrarse en ambientes muy diversos (Dorn, 2013). La categorización y clasificación de barnices de roca de diferentes lugares es difícil debido a su heterogeneidad y a las condiciones fisicoquímicas particulares donde se forman, pero las principales observaciones realizadas, por primera vez de manera detallada por la química analítica Celeste Engel y el geomorfólogo Robert Sharp a mediados del siglo XX y los posteriores estudios de investigación de barnices de roca en diferentes lugares, permiten resumir en estos puntos principales las principales características que se observan en los barnices de roca (Engel and Sharp, 1958; Dorn, 2007; Macholdt et al., 2017):

- Los elementos principales son Si, Al, O y cantidades variables de Fe y Mn. Si y Al comprenden la mayor parte de la deposición de barniz de roca, conformada por minerales de arcilla cristalinos como la illita, la montmorillonita o arcillas similares, pudiendo tener una mezcla de varios tipos de arcilla, siendo estas arcillas habitualmente encontradas en todo tipo de ambientes.
- Los óxidos de hierro y manganeso comprenden típicamente de un cuarto a un tercio del barniz de roca, con una alta variabilidad local tanto en su abundancia a escala microscópica como a escala métrica. Este hecho refleja la influencia de numerosas interacciones en su formación. La birnesita  $[(\text{Na}, \text{Ca}, \text{K})_{0.6} (\text{Mn}^{+4}, \text{Mn}^{+3})_2\text{O}_4 \cdot 3/2 \text{H}_2\text{O}]$  y minerales de la familia de la birnesita como la manganita ( $\text{MnOOH}$ ) o la pirolusita ( $\text{MnO}_2$ ) suelen ser los principales minerales de manganeso que aparecen en barnices de roca estudiados. En el caso de los óxidos de hierro, los principales minerales que se observan son tres: la goetita  $[\alpha\text{-FeO}(\text{OH})]$ , la chamosita férrica  $[(\text{Fe}^{+2})_5\text{Al}(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_8]$  y la hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), siendo la hematita la más abundante en los barnices de roca estudiados. Estos óxidos se pueden encontrar en estructuras laminares impuestas por la deposición de los minerales de arcilla sobre la superficie de la roca en la que se asientan
- La heterogeneidad de un barniz se refleja en la abundancia y presencia de elementos menos abundantes que los nombrados anteriormente. En orden decreciente de concentración, éstos tienden a ser Ca, Mg, Na, K, Ti, P, S y Ba. Mg, K y Ca y se correlaciona su presencia con las arcillas, por los intercambios de cationes que ocurren típicamente en la formación de estructuras cristalinas.
  - Como elementos menores, los más abundantemente encontrados son Cu, Ni, Zr, Pb, V, Co, La, Y, B, Cr, Mo, Zn, Ag, Ga (Wayne et al., 2006).
- Ciertos elementos y trazas de metales pesados se correlacionan con los óxidos de Mn y Fe debido a las propiedades de los oxihidróxidos que estos elementos forman. Por esta razón, el Ca se correlaciona positivamente con la presencia de Mn, probablemente debido a la capacidad de los oxihidróxidos de Mn y Fe para incorporar iones de  $\text{Ca}^{+2}$  alrededor de su estructura cristalina (Raymond et al., 1993), aunque suele estar subenriquecida en los barnices con respecto a los valores promedios de la corteza continental superior (UCC). El Ba también se ha relacionado con la presencia de Mn y con la presencia de S como nanocristales de sulfatos de bario. El Ti se relaciona con el Fe en granos detríticos de titanomagnetitas (Dorn et al., 1990; Mancinelli et al., 2002), y elementos como el Ni y Pb, también parece tener correlación como resultado de la adsorción preferencial de cargas positivas en los cristales.

La comunidad científica considera que la clave de la formación de los barnices de roca está en explicar la cantidad de Mn que tienen, un elemento normalmente trazado en suelos y rocas (Dorn, 2007), ya que la relación de abundancia Mn:Fe en el barniz varía en algunos casos desde una proporción algo inferior a 1:1 a un 50:1, una proporción que se sitúa muy por encima de lo que se encuentra en la corteza terrestre, de 1:60 en promedio (Dorn, 2007).

Se han propuesto varios modelos conceptuales para explicar la formación de los barnices que implican mecanismos bióticos y/o abióticos (figura 1) en el que; las variaciones del pH en el barniz, el agua disponible y los microorganismos presentes pueden tener un importante papel al permitir solubilizar y/o precipitar compuestos, manteniendo al final el manganeso y el hierro en una condición inmóvil en el barniz como óxidos, permitiendo que éstos se acumulen a lo largo del tiempo (Dorn, 2007).

Sin embargo, los diferentes modelos tienen distintos problemas para sostenerse por sí mismos. El modelo abiótico es altamente problemático, ya que requiere de fluctuaciones rápidas en el pH para permitir la solubilización, concentración y precipitación de los óxidos. Aunque explica las características botroidales observadas, si las fluctuaciones no son rápidas, la acción continuada de los H<sup>+</sup> acabaría disolviendo el manganeso y el hierro del barniz, y, además, no explica la acumulación de elementos traza ni la menor cantidad de Mn (III) en los óxidos como cabría esperar si el modelo abiótico fuera el más probable (Tebo et al., 2004; Thiagarajan and Lee, 2004; Dorn, 2007).

La actividad biológica puede ser un mejor candidato para la formación de los barnices (Dorn and Oberlander, 1981). Numerosos microorganismos son capaces de oxidar el manganeso y el hierro (Tebo et al., 2005; Weber et al., 2006) y se ha descrito la presencia de comunidades microbianas en barnices de roca de diferentes lugares con una cierta similitud funcional (ej. Kuhlman et al., 2006; Kuhlman et al., 2008; Northup et al., 2010; Esposito et al., 2015; Alnaimat et al., 2017; para ver con más detalle las comunidades microbianas estudiadas en barnices de roca, ir a la figura 65, apéndice A). También se han publicado estudios sobre la posible transferencia electrónica extracelular entre minerales semiconductores y sus comunidades bacterianas (Ren et al., 2019).

Pero la sola presencia de microorganismos no es indicativa de que por sí mismos sean los responsables directos de la formación del barniz, ya que encontrar microorganismos en el barniz no prueba que juegan un papel en la formación de éste (Gorbushina et al., 2001). De hecho, revestimientos ricos en manganeso, similares en apariencia al barniz de roca terrestre, se han identificado en rocas marcianas ubicadas en el cráter Gale por el instrumento ChemCam en el rover Curiosity (Lanza et al., 2014), y esta observación puede reforzar la inclusión de parámetros abióticos en la formación del barniz de roca.

Los componentes orgánicos en los barnices, más allá de extracciones de ADN, no han sido bien estudiados por las limitaciones de la cantidad de barniz presente en una muestra (Perry and Kolb, 2004). Se han reportado en barnices rocosos la presencia de pequeñas cantidades de materia orgánica (Dorn and Oberlander, 1981, 1982; Dorn, 2007), aunque otros barnices tienen mayor cantidad de materia orgánica, con aminoácidos libres y péptidos como el barniz del desierto de Phoenix, y que pueden jugar un papel en la estabilización del barniz (Perry et al., 2003).

Aparte de encontrarse en el barniz de Phoenix aminoácidos clásicos, como lisina, valina o glicina, también se encuentran aminoácidos inusuales como la β-Alanina o el ácido γ-aminobutírico conocidos por formarse en procesos de descarboxilación enzimática, por lo que queda clara la presencia de componentes biogénicos en, al menos, algunos barnices (Perry et al., 2003).

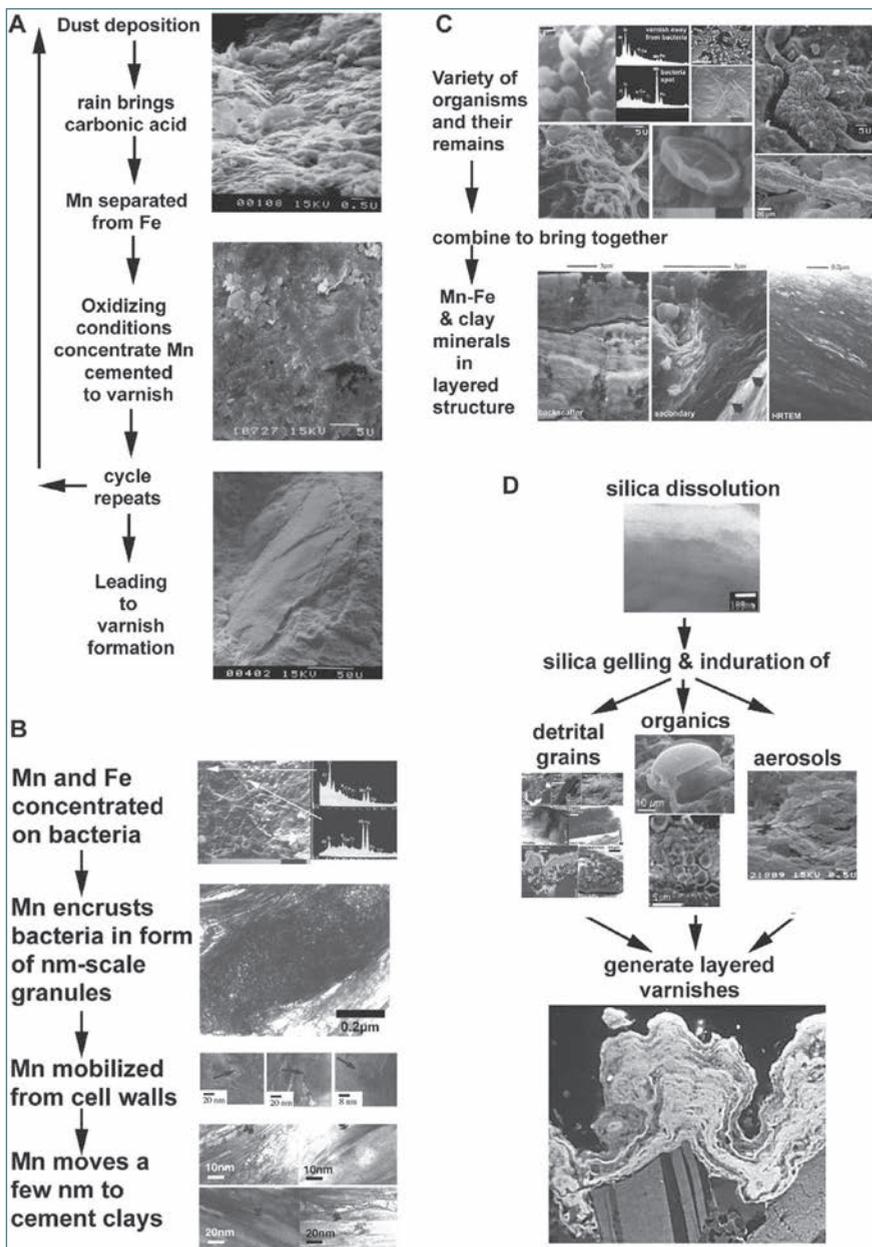


Figura 1: Modelos conceptuales propuestos para la formación de los barnices de roca. A) Enriquecimiento abiótico debido a interacciones de soluciones ácidas que separan el Mn+2 permitiendo las condiciones oxidantes de la roca concentrada. B) Interacciones entre arcilla y microorganismos donde la formación del barniz empieza con la oxidación y concentrado del Mn. Los eventos hídricos en el sistema disuelven a escala nanométrica los óxidos de Mn, generando estructuras estratificadas en los desiertos como consecuencia de los pocos eventos hídricos que padece el barniz. Los restos de bacterias cementan con las arcillas formando parte de la materia orgánica del sistema. C) Los litobiontes y/o sus remanentes orgánicos (esporas, biofilms...) realizan el papel principal de la deposición del barniz al concentrar óxidos y oxihidróxidos de Mn y Fe. D) La disolución del sílice a ácido silícico de partículas minerales transportadas y depositadas en la superficie del revestimiento, puede ser debido a la actividad biológica, y este proceso engloba a la materia orgánica, aerosoles, partículas de polvo y/o microorganismos presentes, depositándose a lo largo del tiempo (Perry and Kolb, 2004). Imágenes extraídas de Dorn, 2007 y texto modificado de Dorn, 200 . ■

También la presencia de enantiómeros como la D-alanina o el D-glutámico es consistente con la composición química del peptidoglicano de las bacterias gram positivas. Sin embargo, otras moléculas de interés microbiológico como el ácido diaminopimélico no se han detectado. Este compuesto forma parte del peptidoglicano de bacterias gram negativas, por lo que debería detectarse fácilmente si los microorganismos crecen de manera activa a lo largo del tiempo sobre el barniz, por tanto, junto con las observaciones de diversidad realizadas en barnices de roca en las que las comunidades microbianas tienen una mayor abundancia de bacterias gram positivas, sugiriendo que estos microorganismos puedan estar potencialmente más implicadas en los barnices que las bacterias gram negativas (Perry et al., 2003; Perry and Kolb, 2004).

Y la presencia, relativamente alta, de aminoácidos lábiles como la serina o la treonina puede revelar; una actividad más reciente de los microorganismos presentes en barniz de roca, que sea la comunidad microbiana más casual en el barniz y que, por tanto, no se implique activamente en su formación, algo que puede tener relación con los valores negativos encontrados en el cociente  $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ , típico de material orgánico sedimentado. Aunque procesos biológicos como la fotosíntesis también puede generar esos valores (Perry et al., 2003; Perry and Kolb, 2004; Vitoria et al. 2004).

Junto a estos análisis de aminoácidos y derivados, también ha tenido éxito la extracción de lípidos mediante la técnica FAME aplicado al barniz de roca y el suelo cercano al barniz en el desierto de Mojave, California (Schelble et al., 2005).

Los resultados del trabajo de Schelble *et al.* revelaron una mayor presencia en el barniz de lípidos correspondientes a bacterias gram positivas y hongos respecto a las gram negativas, apoyando los resultados anteriormente mencionados en el barniz del desierto de Phoenix (Perry et al., 2003). Sin embargo, esta tendencia se observó también en el suelo analizado alrededor del barniz, por lo que los investigadores concluyeron que los resultados obtenidos a partir de la composición lipídica no apoyaba la hipótesis de que la comunidad microbiana sea la que lidere la formación del barniz de roca y que esa variedad de microorganismos observada sea debida al azar y corresponda únicamente a que sea un hábitat aceptable para su desarrollo.

Probablemente sea una combinación de los modelos presentados en la figura 1 en función de las particularidades en donde se ubique un barniz de roca y el azar lo que mejor expliquen la formación de los barnices de roca, pero sigue vigente el debate sobre su biogenicidad.

### 2.3.1. Química y mineralogía

A continuación se comentarán aspectos generales de la química y la mineralogía en el barniz de roca de los dos elementos principales que componen y caracterizan a este tipo de revestimiento: el manganeso y el hierro.

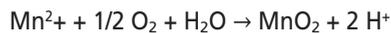
#### 2.3.1.1. Manganeso

El manganeso (<https://www.mindat.org/min-11478.html>), un micronutriente esencial para los seres vivos, puede encontrarse en la naturaleza con los estados de oxidación +2, +4 y, de manera menos habitual, +7. En contacto con oxígeno precipita de manera lenta como dióxido de manganeso y

su presencia suele estar asociada al hierro (Dorn, 2007). De hecho, los depósitos más abundantes de óxidos de manganeso se encuentran en la profundidad de los océanos como nódulos de ferromanganeso, cuyos tamaños oscilan de 0,5-25 cm de diámetro y que se estima que pueden cubrir en promedio hasta un 25% de los fondos oceánicos (Koschinsky and Hein, 2017).

Las reacciones redox entre Mn (II) y Mn (IV) están fuertemente gobernadas por el pH (Shihua et al., 1994). En aguas naturales, la oxidación del Mn (II) requiere valores de pH > 8,5 para oxidarse homogéneamente en semanas o meses sin asistencia de la actividad microbiana (Dorn, 2007). Esta tasa de oxidación puede incrementarse por la presencia de abundantes oxihidróxidos de Fe presentes en los barnices, pero la oxidación abiótica catalizada por los oxihidróxidos de Fe resultaría en la formación de oxihidróxidos de Mn (III), que no se encuentran de manera abundante en las muestras de barnices de roca estudiados (Tebo et al., 2004; Dorn, 2007).

El Mn (II) es la forma soluble más importante en aguas naturales; ya que el Mn (III) es menos estable termodinámicamente, el Mn (IV) es el principal oxihidróxido de Mn que puede encontrarse en el barniz de roca, con una valencia promedio entre +3,8 y +3,9, tal y como se muestra en la reacción 1 (McKeown y Post, 2001):

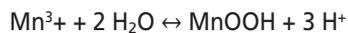


Un hecho interesante en la oxidación del Mn (II) a Mn (IV) es que la reacción no sucede directamente en un solo paso, sino en dos (Hem and Lind, 1983). Primero precipita como un oxihidróxido (MnOOH) y a partir de éste forma óxidos de Mn tetravalentes, como el MnO<sub>2</sub>, en la que el Mn(III) actúa de precursor tal y como se puede apreciar en la voltametría cíclica en 2 M de ácido sulfúrico, en el que se observan dos picos anódicos, siendo el primero más agudo que el segundo, indicando que la oxidación del Mn (II) soluble a MnO<sub>2</sub> ocurre en dos pasos (Nijjer et al., 2000), tal y como propone el mecanismo de transferencia electroquímica ECE (Svir et al., 2005) en el que el producto de una primera reacción de transferencia electrónica está involucrado en la siguiente reacción química, formando un compuesto más fácil de reducir (u oxidar) que la especie inicial.

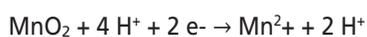
Así pues, el Mn (III) puede sufrir una dismutación espontánea a concentraciones altas de ácido como se aprecia en las reacciones 2 y 3 (Shihua et al., 1994; Nijjer et al., 2000):



O bien puede ser hidrolizado a un oxihidróxido intermediario, el MnOOH, con la participación del H<sub>2</sub>O:



Y posteriormente el producto intermediario, el oxihidróxido MnOOH, puede ser oxidado a MnO<sub>2</sub> como se ha comentado anteriormente, que a su vez puede ser atacado en condiciones ácidas, siendo la reacción global del proceso la reacción 4:



Lo que se observa es que, en condiciones químicas controladas de laboratorio, la reducción de depósitos de  $\text{MnO}_2$  es dependiente de la concentración de ácido en el electrolito de la solución (Shihua et al., 1994), y se forman grandes cantidades de  $\text{MnO}_2$  cuando la acidez se reduce, es decir, que una alta acidez inhibe la deposición de  $\text{MnO}_2$  mientras que una baja acidez incrementa la tasa de deposición, como podemos apreciar en las reacciones 1-4 (Nijjer et al., 2000).

En cuanto a la mineralogía, más de 30 especies minerales han sido validadas (<https://www.mindat.org/min-26664.html>), estando muchas veces asociadas con otros minerales como el cuarzo, la calcita, la goetita o la hematita.

La mayoría de los óxidos de Mn naturales suelen tener tamaños nanométricos y poco cristalinos, especialmente en suelos y sedimentos (Dixon and White, 2002), lo que dificulta su identificación por técnicas como el XRD por la extensa dilución que presentan donde se depositan. Su identificación sólo es posible si están concentradas como revestimientos (manganos) suficientemente grandes o nódulos (Barrón and Torrente, 2013).

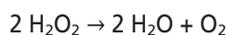
De todas las especies minerales de manganeso descritas, las comúnmente encontradas en barnices de roca son la birnesita y la pirolusita (tabla 3), aunque esto no excluye que otros óxidos de manganeso estén presentes (Macholdt et al., 2017).

| Mineral    | Fórmula (se indica el estado de oxidación del Mn)   | Sistema cristalino | Estructura cristalina   |
|------------|---|--------------------|---|
| Manganita  | $\text{Mn}^{+3}\text{OOH}$  | Monoclínico        |    |
| Birnesita  | $(\text{Na}, \text{Ca}, \text{K})_{0,6} (\text{Mn}^{+4}, \text{Mn}^{+3})_2 \text{O}_4 \cdot 1,5 \text{H}_2\text{O}$ | Monoclínico        |   |
| Pirolusita | $\text{Mn}^{+4}\text{O}_2$  | Tetragonal         |  |

En la estructura cristalina, el óxido de Mn se representa en marrón y las partículas en azul son las posibles impurezas que puede incorporar la estructura al cristalizar (tabla modificada de Barrón and Torrente, 2013)

**Tabla 3: Datos cristalográficos y estructurales de los principales óxidos de manganeso . ■**

Para terminar, es interesante remarcar en este punto que el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) es altamente reactivo con óxidos de manganeso como el  $\text{MnO}_2$ , siendo éste un excelente catalizador que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Omar, 2014; reacción 5), lo que convierte el barniz de roca en un excelente protector de la radiación UV (Allen et al., 2001).



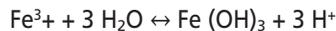
### 2.3.1.2. Hierro

El hierro es uno de los elementos más abundantes en la Tierra, el cuarto más abundante de la corteza terrestre y un elemento relativamente abundante en el universo tras el H, He y Li. No en vano en cosmología es un elemento fundamental, puesto que es el elemento más pesado que puede formarse por la fusión termonuclear en las estrellas masivas (Cornell and Schwertmann, 2003).

La oxidación y reducción microbiana del Fe (II) / Fe (III) es un componente fundamental de los ciclos biogeoquímicos, necesario como cofactor de numerosas enzimas fundamentales y que, además, influyen en los ciclos de otros elementos como el nitrógeno. Es por ello que se puede convertir en un importante factor limitante del crecimiento al ser su disolución en medios no ácidos, limitado. En consecuencia, los organismos han desarrollado mecanismos y estrategias para secuestrar el hierro e incorporarlo a las células como el uso de sideróforos (Weber et al., 2006).

El hierro puede encontrarse en la naturaleza en forma reducida (+2) o en forma oxidada (+3) y, dependiendo de las condiciones ambientales, el Fe puede formar compuestos estables con el estado divalente o trivalente (Cornell and Schwertmann, 2003).

A valores de pH neutro o básico, el hierro existe como mineral insoluble. La solubilidad del hierro se incrementa conforme el pH desciende y por debajo de un pH  $\approx$  4 el Fe (II) existe principalmente en forma soluble, siendo estable en solución acuosa incluso en presencia de oxígeno, evitando su precipitación (Barrón and Torrente, 2013). Además, el Fe (III) tiene un fuerte efecto tamponador del pH en condiciones ácidas (reacción 6) gracias a la acción del ión férrico, Fe (III), en solución:



Lo que explica que el pH de ambientes como río Tinto (Huelva, Andalucía) sea de un valor constante entorno a  $\approx$  2,3 (Amils et al., 2014).

También el Fe (II), que en solución puede formar  $\text{Fe}(\text{OH})^+$ , tiene la capacidad de absorber la radiación en el rango de los 200-400 nm, generando la formación de ión férrico, Fe (III) (ecuación 7), que se considera relevante en el eón Arcaico ya que, en ausencia de una capa de ozono, pudo ser un eficaz mecanismo de fotoprotección (Posth et al., 2013). De hecho, esta fotoprotección del Fe (II) ha sido evaluada como muy eficaz en experimentos de laboratorio, permitiendo la actividad fotosintética en condiciones altamente estresantes para las cadenas de transporte de electrones de estos organismos (Gómez et al., 2007).



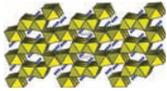
En cuanto a la mineralogía, el conocimiento detallado de la estructura cristalina, la morfología y el tamaño de los óxidos de Fe es crucial para entender muchas de sus propiedades, incluyendo el color, la solubilidad, capacidad de adsorción, o la reactividad de las nanopartículas de óxidos de hierro (Banfield and Zhang, 2001; Cornell and Schwertmann, 2003; Barrón and Torrente, 2013)

Esencialmente la transformación de los óxidos de Fe puede ser a través de dos mecanismos diferentes: por un lado, mediante la precipitación del Fe (II) o Fe (III) debido a la meteorización de la roca o por biomineralización (excepto la hematita) y, por otro lado, mediante la conversión de un

precursor de óxido de Fe por disolución y reprecipitación (Cornell and Schewertmann, 2003; Barrón and Torrente, 2013).

Las reacciones de hidrólisis, oxidación, deshidratación, deshidroxilación, redisolución y cristalización potencialmente involucradas son de una gran complejidad, donde la hematita y la goethita son los óxidos de Fe más comunes por su mayor estabilidad termodinámica (tabla 4).

Su precursor inicial habitualmente es la ferrihidrita, un óxido de hierro de estructura cristalina amorfa debido a la gran cantidad de moléculas de H<sub>2</sub>O en su estructura (tabla 4). La agregación, disolución, deshidratación y/o reestructuramiento molecular acaban por transformar la ferrihidrita en otros óxidos de hierro más estables (Barrón and Torrente, 2013).

| Mineral             | Fórmula   | Sistema cristalino /<br>Tipo de suelo presente           | Estructura cristalina   |
|---------------------|---|--|---|
| <b>Ferrihidrita</b> | $\text{Fe}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$ | Hexagonal /<br>Aguas estancadas, sedimentos,<br>gleys... |  Amorfa |
| <b>Goetita</b>      | $\alpha\text{-FeOOH}$   | Ortorómbico /<br>Aerobio y anaerobio                     |         |
| <b>Magnetita</b>    | $\text{Fe}_3\text{O}_4$   | Cúbico /<br>Anaerobio                                    |       |
| <b>Hematita</b>     | $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  | Trigonal /<br>Aerobio                                    |      |

En la estructura cristalina, el hierro se representa de color rojo, amarillo o gris en función del estado de oxidación que posee (rojo Fe<sup>+3</sup>, amarillo Fe<sup>+2</sup>, gris Fe<sup>+2</sup>/Fe<sup>+3</sup>). Tabla modificada de Cornell and Schewertmann, 2003 y Barrón and Torrente, 2013.

Tabla 4: Datos cristalográficos y estructura de los principales óxidos de hierro ■

### 2.3.2. Características micro y macromorfológicas de los barnices

El barniz de roca puede tener un acabado opaco, mate o brillante con un color de negruzco a marrón o anaranjado en función de la mayor o menor cantidad de manganeso presente. Las variaciones climáticas locales alteran profundamente las características morfológicas de los barnices rocosos donde, la abundancia de polvo atmosférico y la composición química de la zona en la que se ubican, constituyen un factor importante en la composición final de elementos que se observa en estos revestimientos (Dorn, 2007).

Los barnices poseen micromorfológicas que van desde un rango laminado a botroidal debido a los óxidos que poseen (Macholdt et al., 2017). La escasez de polvo permite agrupaciones de óxidos en el

barniz, favoreciendo las formas botroidales. En cambio, una gran abundancia de polvo conlleva una tendencia a la acumulación de Mn alrededor de los centros de nucleación, produciendo micromorfologías más laminadas (Dorn, 2007).

Partículas de materia orgánica y/o inorgánica pueden sedimentar en las depresiones morfológicas debido a la irregularidad de la superficie del revestimiento permitiendo, tras su transformación mediante acción biológica y/o química, la formación de una amplia variedad de otros minerales encontrados en muestras de barniz tales como feldespatos o magnetita (Dorn, 2013).

Otros factores también pueden influir en la micromorfología, como el tipo específico de arcilla, la abundancia de manganeso en las partículas de polvo, los tipos de organismos epilíticos o la abrasión de la superficie expuesta ambientalmente por la exposición directa a la luz y/o partículas de polvo (Dorn, 2007).

### 2.3.3. Clasificación de los barnices

La heterogeneidad de los barnices ha hecho que se clasifiquen de forma muy diversa, empezando por observaciones geoquímicas simples que muestran que el barniz de las piedras en los desiertos difiere del barniz presente en superficies rocosas que intermitentemente sufren inundaciones en ambientes hídricos (Lucas, 1905).

Solo recientemente se ha propuesto un primer intento serio de clasificación (Macholdt et al., 2017) que ha llevado a una subdivisión en categorías de los barnices de roca, como puede observarse en la tabla 5, proponiendo subdividirlos en cinco tipos, categorizándolos según la mayor o menor presencia de ciertos elementos y por los cocientes de la composición de elementos que pueden encontrarse en las muestras (Mn/Ba, Al/Ni, Mn/REY, Mn/Ce, Mn/Pb, La/Yb y Ce/Ce\*). Esta clasificación excluye a revestimientos como los nódulos de manganeso que se observan en los fondos de aguas dulces y océanos, ya que al tratarse de un medio sin la participación e influencia directa de la atmósfera, por definición no se puede considerar que sea un barniz de roca (Macholdt et al., 2017)

| Tipo       | Ambiente                     | Estructura                      | Ce  | Ba  | Mn    | Pb    | Mn/Ba  | Ce/Ce* | Total REEs |
|------------|------------------------------|---------------------------------|-----|-----|-------|-------|--------|--------|------------|
| <b>I</b>   | Desiertos áridos             | <b>Laminación bien definida</b> | +++ | +++ | ++    | ++    | + / ++ | +++    | +++        |
| <b>II</b>  | Semiárido                    | Sin laminación                  | +++ | +++ | +++   | ++    | + / ++ | +++    | +++        |
| <b>III</b> | Semiárido                    | Sin laminación                  | +   | +   | +++   | -     | +++    | +      | +          |
| <b>IV</b>  | Áreas urbanas                | Sin laminación                  | -   | +   | +     | +++   | ++     | -      | -          |
| <b>V</b>   | Húmedo, zonas de salpicadura | <b>Laminación discontinua</b>   | -   | +   | + / - | + / - | ++     | -      | +          |

En negrita se indican los valores que destacan y caracterizan a cada tipo de barniz. Tabla modificada de Macholdt et al., 2017.

Tabla 5: Categorización de los barnices de roca en función de su estructura y composición química. ■

### 2.3.3.1. Tipo I

Se localizan en regiones desérticas áridas y muestran estructuras de grano fino laminadas con partículas de polvo mineral de entre 1 a 10 nm. Siempre, y de manera clara, en este barniz se observa que se alternan capas de arcillas ricas en Mn y Fe de manera paralela a las laminaciones en la superficie de la roca huésped, pudiendo reflejar fluctuaciones de gran interés para estudios paleoclimáticos (Dorn, 1990). Junto con la observación de las capas alternadas ricas en Mn y Fe, se observan diferentes tipos de grano mineral con distinta composición elemental, probablemente, debido al transporte de polvo por el viento y que ha quedado erosionado y embebido en la matriz del barniz.

Se observa una correlación positiva entre la fracción de masa de Ce con la fracción de masa del Mn y todas las muestras poseen una anomalía positiva de Ce ( $Ce/Ce^* = 1,5-3,8$ ).

También, poseen una alta cantidad de elementos de tierras raras (REEs), el cual está más enriquecido con respecto al material polvoriento que se puede recolectar en los alrededores, así como una alta fracción de masa del elemento Ba, todas ellas claras señas de identidad de este tipo de barniz.

### 2.3.3.2. Tipo II

Como el tipo I, también se encuentran en ambientes desérticos áridos y en ambientes semiáridos con grandes áreas ricas en hierro. No se detectan estructuras definidas en capa a diferencia del barniz tipo I y el espesor del revestimiento es, por lo general, más grande.

Químicamente pueden diferenciarse del tipo I comparando las abundancias de Ce y Mn, cuyos valores se dispersan más. La composición de elementos es similar al tipo I pero difiere en mayores cantidades de Co, Cu y menores de Cr.

La fuerte correlación positiva existente entre el Ce y el Mn, los altos valores en enriquecimiento de Ce y la presencia de partículas más grandes en la matriz que las de tipo I, indican que algunas tienen una tasa de crecimiento más rápida que los barnices de tipo I.

### 2.3.3.3. Tipo III

Como el tipo I, se pueden encontrar en regiones áridas y como el tipo II, también en áreas semiáridas. Se ha argumentado que la presencia de grandes cantidades de minerales de Mn botroidal depositado es el resultado producido por cambios en la estructura mineral a lo largo del tiempo (Macholdt et al., 2015).

Las zonas de las rocas con mayor abundancia de barniz muestran un tapiz botroidal enriquecido en Mn y Ca. Se observa una gran cantidad de birnesita hexagonal, quizá indicando una génesis biológica, junto a una más reciente formación respecto a los barnices de tipo I o II.

Poseen altas fracciones de Mn y valores bajos de Pb y Ba. Se distinguen de los barnices tipo I, II y V comparando los cocientes Al/Ni vs. Mn/Ba, Mn/REY vs. Mn/Ba y se puede distinguir del tipo IV comparando el Mn vs. Pb y un bajo enriquecimiento de REEs con respecto al polvo del suelo adyacente.

#### 2.3.3.4. Tipo IV

Son recolectados en regiones con influencia urbana significativa. Muestran una estructura diferente a otros tipos de barniz, con una alta tasa de crecimiento posiblemente debido a que su origen es por una influencia indirecta antrópica a diferencia de los otros tipos de barnices

Algunas de las muestras analizadas reflejan que su barniz es grueso encajonado por una matriz rica de Mn con una estructura botroidal. Se observa en el SEM una cierta estratificación porque no llega a formar capas laminadas bien definidas como en el Tipo I

A pesar de que la composición química particular puede variar según la zona recolectada, muestra unas cantidades de Pb que se sitúan significativamente por encima de los otros tipos de barnices (0,2-1,4%). Pueden distinguirse de los barnices de tipo I y II comparando el Ce vs. Mn y de los barnices tipo III y V por la comparación entre el Pb y el Mn.

#### 2.3.3.5. Tipo V

Este barniz está influido por ambientes hídricos, en zonas donde puede incidir el agua sobre la roca (salpicaduras en márgenes de ríos, cataratas...). El revestimiento de roca descrito por von Humboldt (Humboldt, 1852) pertenece a este tipo de barniz, aunque es de los menos estudiados en la literatura científica

Su color puede variar desde negro a marrón claro según la cantidad de hierro y manganeso presente en el barniz, el cual puede ser muy variable. Probablemente, la alta variabilidad de los barnices tipo V es debido a que la fuente de los elementos del barniz está en el agua del río en el que se asienta, por lo que es asumible pensar que, en su formación y desarrollo, juega un papel muy importante la hidrología del sistema.

Esa gran heterogeneidad provoca que la comparativa entre diversos elementos no la ubiquen de manera consistente como un tipo concreto, a diferencia de los otros tipos de barniz, siendo incluidos en este grupo por exclusión respecto a los otros tipos de barniz.

Las comparaciones de los cocientes de Al/Ni vs. Mn/Ba y de los cocientes Mn/REY vs. Mn/Ba los sitúan como barnices intermedios entre los tipos I y II vs. los tipos III y IV, aunque dadas las peculiaridades de este tipo de barniz de roca, puede llevar a confusión y englobarse una muestra como otro tipo de barniz teniendo en cuenta únicamente los cocientes de los elementos. La comparación entre Pb y Mn es la única que permite, por exclusión, determinar que un barniz de roca puede ser de tipo V y no de tipo IV, al igual que sucede al comparar el barniz tipo IV con el tipo I, II y III por su contenido de Pb y Mn.

Pueden observarse capas laminares discontinuas de Mn, Fe y Ca en el SEM, aunque esta característica está en discusión pues no sucede con todas las muestras catalogadas como tipo V. Algunos elementos químicos como el Co, Th, V, Cs, Rb o Ti pueden encontrarse subenriquecidos, al tener valores que se encuentran significativamente por debajo de las cantidades que pueden encontrarse en la corteza continental superior y en otros tipos de barnices de roca.

## 2.4. Río Tinto

Río Tinto se ubica en Huelva, Andalucía. Nace en Peña de Hierro, en pleno corazón de la Faja Ibérica Pirítica (IPB), una entidad geológica localizada en la zona suroeste de la península Ibérica (figura 2).

Es un ambiente natural extremo inusual debido a su acidez ( $\text{pH} \approx 2,3$ ), longitud ( $\approx 92$  km), alta concentración de metales pesados ( $[\text{Fe}] > 20$  g/l) y con una gran diversidad microbiana, siendo considerado un excelente análogo geoquímico y mineralógico de Marte (Fernández-Remolar et al., 2005; Amils et al., 2014).

El clima de la zona por donde transcurre el río es mediterráneo cálido con una temperatura promedio de  $+17$  °C y una precipitación media anual de 45 mm, con un periodo seco que abarca de Mayo a Septiembre y otro húmedo de Octubre a Marzo, lo que le proporciona una clasificación climática Csa en la escala de Köppen-Geiger (<https://es.climate-data.org/europe/espana/andalucia/minas-de-riotinto-564382/>). Al no ser las precipitaciones en la zona constantes, la evaporación estacional de agua conduce a la formación de jarosita y schwertmanita, lo que provoca que el pH del río se mantenga constante debido al efecto tampón del ión férrico en solución (Fernández-Remolar et al., 2003; Amils et al., 2014).

La IPB donde transcurre la cuenca del río posee una extensión de 250 km de longitud y 70 kilómetros de ancho (figura 2), formada por la acción hidrotermal durante la orogénesis Herciniana (Fernández-Remolar et al., 2003), siendo uno de los mayores depósitos de sulfuros metálicos conocidos en el mundo y explotado por los seres humanos desde hace más de 5000 años (LeBlanc et al., 2000).

Compuesto principalmente por pirita y calcopirita (Tornos, 2006), la disolución de estos minerales debido a la actividad microbiana existente de biopelículas activas en el subsuelo de la IPB es la causante de la presencia de la elevada concentración de hierro que se observa en la cuenca del Río Tinto (Escudero et al., 2018; Escudero, tesis 2018).

### 2.4.1. Sistema acuático

El sistema acuático del Río Tinto es el más simple microbiológicamente (figura 3), algo razonable teniendo en cuenta que el flujo del río promueve la homogeneidad en el sistema. El 80% de la diversidad procariota presente en la columna de agua es compuesta, principalmente, por tres géneros de microorganismos del dominio Bacteria y que, a su vez, son miembros del ciclo del hierro: *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* y *Acidiphilium*.

*Acidithiobacillus* es capaz de oxidar el hierro aeróbiamente (al igual que *Leptospirillum*) o bien reducirlo en condiciones anaerobias, acoplándolo a la oxidación de azufre. *Acidiphilium* puede utilizar el ión férrico como aceptor final de electrones de la cadena respiratoria impulsada por la degradación de materia orgánica. Otros microorganismos como *Ferroplasma*, *Acidobacterium* o *Metallibacterium* también han sido identificados, pero su bajo número sugiere que juegan un papel secundario en el ciclo del hierro en la columna de agua (Amils et al., 2014).

El ciclo del azufre también está presente en la columna de agua (figura 3), el cual está principalmente gobernado por miembros del género *Acidithiobacillus* junto con bacterias sulfatoreductoras que se encuentran en menor cantidad (González-Toril, tesis 2002; González-Toril et al., 2003).

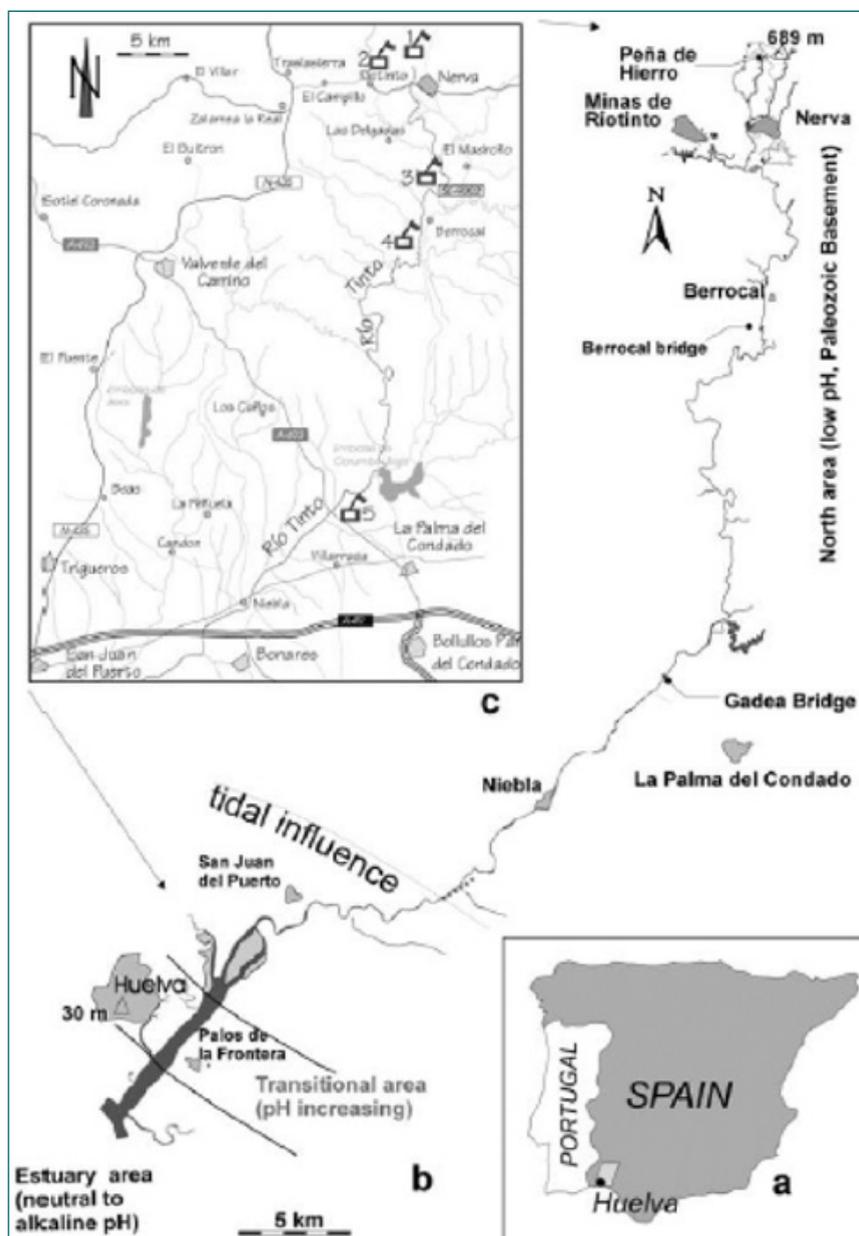


Figura 2: Cartografía geográfica de la cuenca de río Tinto. A) Ubicación general del río en la península Ibérica. B) Dominios en la cuenca del río: la zona norte, el área de transición y el área estuarina. C) Mapa detallado de la zona norte. Los puntos indicados del 1 al 5 corresponden a ubicaciones habituales de muestreo en investigaciones realizadas en la cuenca del río: 1) origen del río (Peña de Hierro); 2) Alto de la Mesa; 3) las Zarandas; 4) Berrocal; 5) La Palma del Condado. Imagen y texto de Fernández-Remolar et al., 2003. ■

También, es posible identificar microorganismos englobados en distintos phyla: Actinobacteria (orden Acidimicrobiales), Chloroflexi, Acidobacteria o Firmicutes, pero no son tan abundantes en el sistema (Santofimia et al., 2013)

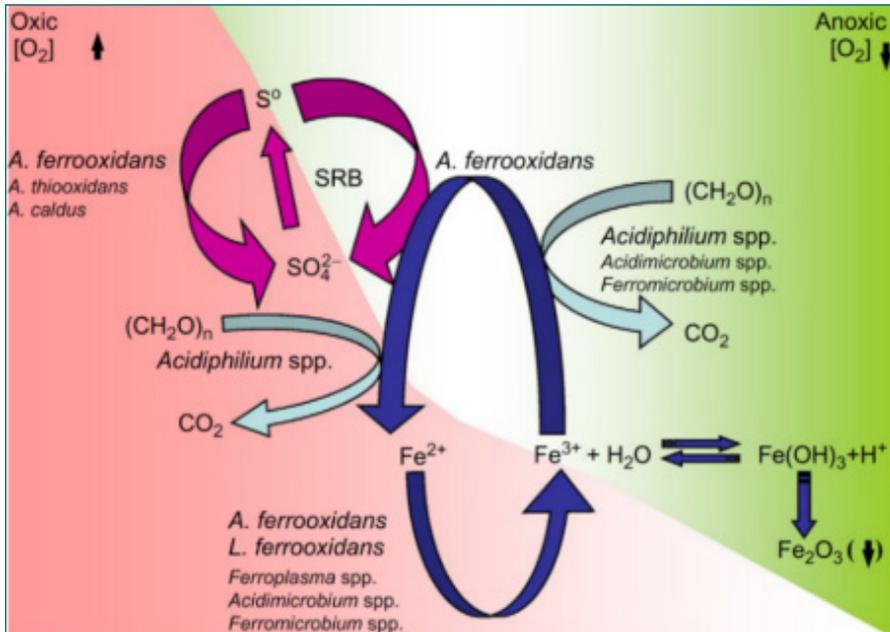


Figura 3: Modelo geomicrobiológico del ciclo del Fe, S y C en la columna de agua de río Tinto. Extraído de González-Toril et al., 2003. ■

## 2.4.2. Sedimentos

La complejidad microbiana que se observa en los sedimentos es mayor que en la columna de agua, con una mayor densidad celular y riqueza en diversidad debido a la estratificación geoquímica (figura 4). Esto permite el desarrollo de comunidades microbianas diferentes en distintos lugares de la cuenca del río (Sánchez-Andrea et al., 2011; García-Moyano et al., 2012), con una gran importancia de los microorganismos reductores del sulfato o microorganismos formadores de biofilms como *Metallibacterium* (Ziegler et al., 2013; Amils et al., 2014), asimismo, aparecen con menor abundancia del metabolismo desnitrificante productoras de hidrógeno (Firmicutes) y *Acidithiobacillus* que controla el ciclo del hierro y forma parte del ciclo del azufre en el sedimento (Sánchez-Andrea et al., 2011; Sánchez-Andrea et al., 2012).

También se ha descrito la presencia de actividad metanogénica (Sanz et al., 2011), aunque la abundancia del dominio Archaea encontrada es bastante baja y restringida a dos géneros principales que no son metanogénicos (Sánchez-Andrea et al., 2012): *Ferroplasma*, un acidófilo oxidador de Fe (II) (Golyshina et al., 2000) y *Thermoplasma*, un termoacidófilo heterótrofo (Ruepp et al., 2000)

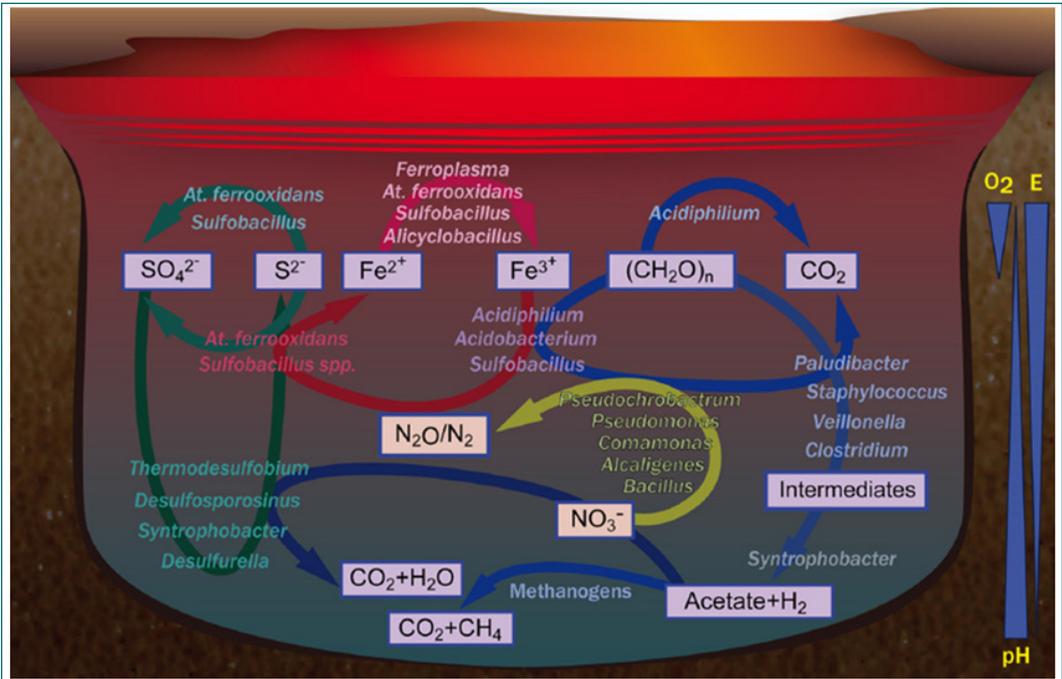


Figura 4: Modelo geomicrobiológico de los sedimentos de Río Tinto. Se indican los microorganismos implicados en el ciclo del Fe, S, C y N. Extraído de Sánchez-Andrea et al., 2011. ■

### 2.4.3. Subsuelo

Es un ambiente oligotrófico que destaca por su oscuridad permanente y anaerobiosis, y se mantiene mediante procesos con un bajo rendimiento energético, en el que la coexistencia de diferentes actividades microbiológicas en los biofilms lixivando el sustrato mineral en el que se asientan, es la base que sustenta a estas comunidades microbianas (figura 5; Escudero et al., 2018; Escudero, tesis 2018).

La diversidad de microorganismos en este ambiente es, como en la columna de agua y los sedimentos, mucho mayor que de Archaea, algo que ha sido corroborado tanto por secuenciación clásica de Sanger como por secuenciación masiva, por microarrays de oligonucleótidos, cultivos de enriquecimiento e hibridación *in situ*, estando ampliamente distribuidas las Proteobacterias, los Firmicutes y las Actinobacterias (Puente-Sánchez et al., 2016; Escudero et al., 2018; Escudero, tesis 2018). También, se han encontrado otros grupos de microorganismos pertenecientes a los phyla Acidobacteria y Chloroflexi, siendo un ambiente con una gran diversidad microbiana y metabólica (figura 5; Escudero, tesis 2018).

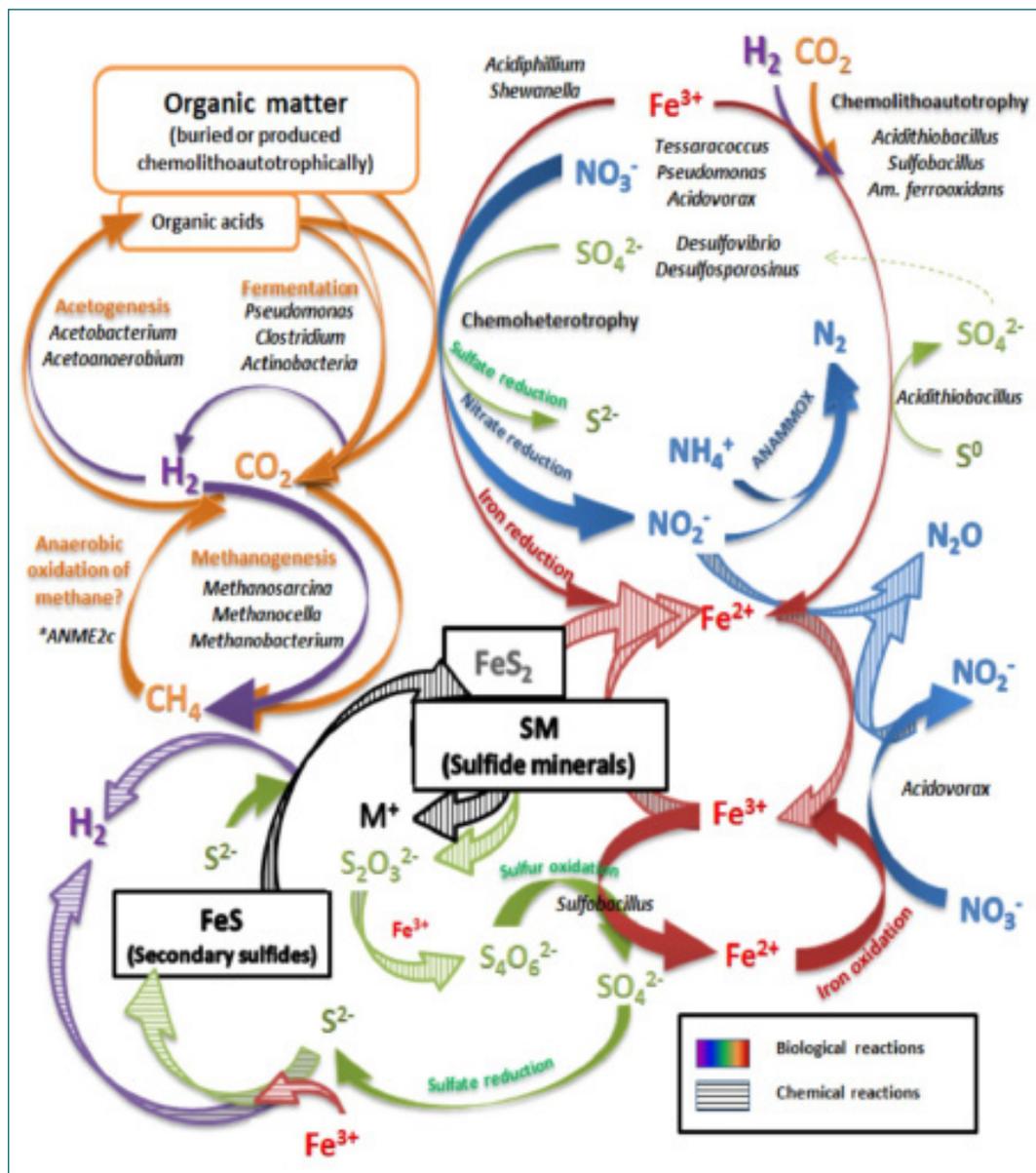


Figura 5: Modelo propuesto del ciclo geomicrobiológico del subsuelo de la IPB. Los diferentes colores hacen referencia a los ciclos del Fe, S, C y N. La actividad de los microorganismos lixivianando la pirita es la causante, en última instancia, de las características fisicoquímicas observadas en el río. Extraído de Escudero, tesis 2018 ■



# Objetivos

Los barnices de roca y las películas de hierro son dos tipos de revestimientos de roca que contienen micronichos de gran interés científico por su carácter altamente oxidante y ciclos biogeoquímicos que se desarrollan a pequeña escala en su superficie, revelando la gran complejidad de interacciones existentes entre la litosfera, la biosfera, la atmósfera y la hidrosfera.

El objetivo de esta tesis ha sido la caracterización de distintos revestimientos de roca identificado a lo largo del cauce del Río Tinto, utilizando distintas metodologías complementarias con el fin de averiguar si corresponden a barnices de roca, lo que supondría la descripción y caracterización microbiológica del primer barniz de roca en un ambiente ácido extremo. Para observar el flujo de trabajo realizado en esta tesis, consultar la figura 10 (apartado 4.5.6)

Los objetivos específicos desarrollados han sido los siguientes

- Caracterización fisicoquímica de las muestras de revestimientos de roca recolectadas en la cuenca de río Tinto en diferentes ubicaciones.
- Estudio de la diversidad y parámetros ecológicos de los diferentes taxones microbianos presentes en las comunidades microbianas de las muestras seleccionadas mediante la utilización de diferentes metodologías de ecología molecular
- Diseño de cultivos de enriquecimiento para aislar, caracterizar y confirmar las poblaciones microbianas de las muestras de roca
- Identificar las asociaciones de microorganismos y/o grupos de microorganismos con las distintas especies minerales en los distintos revestimientos seleccionados
- Identificar las similitudes y diferencias de los revestimientos estudiados con la columna de agua, los sedimentos y el subsuelo de la cuenca del río Tinto.
- Clasificar e identificar similitudes y diferencias con revestimientos de roca encontrados en otros ambientes
- Establecer una hipótesis general del modelo geomicrobiológico de la formación, desarrollo y funcionamiento de las comunidades microbianas presentes en los revestimientos de roca estudiados



# Material y Métodos

## 4.1. Áreas de muestreo

Un total de ocho muestras fueron seleccionadas en dos localizaciones diferentes en la cuenca de río Tinto; tres en el área del Origen, en la sierra del Padre Caro ( $37^{\circ} 43' 19,5''$  N;  $6^{\circ} 33' 04,3''$  W) y cinco en la zona correspondiente al municipio de Berrocal ( $37^{\circ} 35' 37,1''$  N;  $6^{\circ} 33' 04,7''$  W), recogidas y almacenadas en esterilidad. Su manipulación posterior en el laboratorio se realizó en campana de flujo laminar con herramientas estériles

### 4.1.1. Zona Origen

Se recogieron dos muestras de una misma unidad litoestratigráfica, la cual variaba en color gradualmente, siendo en su base cercana a la zona de contacto con el cauce del río de un color amarillento, pasando gradualmente a un color rojizo en la parte superior de la columna (figu a 6-A). Las muestras

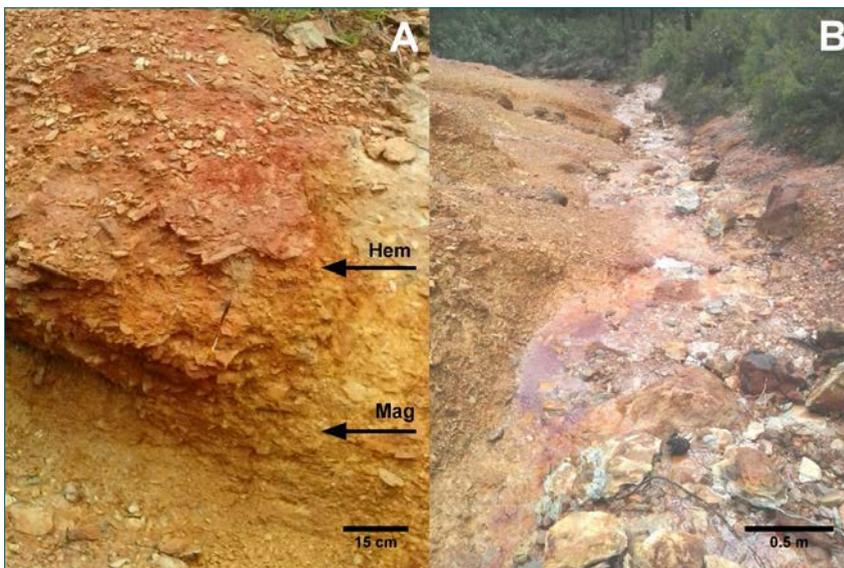


Figura 6: Muestreo en la zona del Origen. A) Unidad litoestratigráfica (Hem y Mag); B) Alrededores del área en la que se ubica la unidad litoestratigráfica ■

fueron denominadas “Amarilla” y “Roja”, y posteriormente se renombraron como “Mag” y “Hem” respectivamente. También se recogió una roca situada en los alrededores a la zona mencionada (figura 6-B), recubierta con un llamativo color rojo brillante, denominada inicialmente “3” y posteriormente “Ror”.

#### 4.1.2. Zona Berrocal

Se observó que la cuenca del Río Tinto en Berrocal tiene una gran cantidad de cantos rodados producto de la erosión por el transporte del río. Muchos de ellos, como se observa en la figura 7, poseen una llamativa cobertura de color marrón oscuro sobre la base de color grisáceo claro de la roca madre en la que se deposita.



Figura 7: Ubicación aproximada de la zona de muestreo en Berrocal. A la derecha, puede observarse el cauce del río y, a la izquierda, las rocas depositadas en los márgenes de éste erosionadas por la acción del río. Imagen cortesía de Felipe Gómez. ■

Se recogieron tres muestras de sedimentos del río, denominadas; **Berr1**, **Berr2** y **Berr3** (designadas colectivamente como **Berr'**), recogidas a unos 5, 10-15 y 15-20 cm del margen de la orilla del río respectivamente (figura 8)

También se tomó una roca con esa cobertura, situada a unos 15-20 metros del margen del río donde se recogió el sedimento, denominada "**P1**" (figura 7 y 9). Posteriormente, en el laboratorio, se procedió a separar la cobertura de color marrón respecto de la parte interna, resultando dos muestras denominadas; "**P1Ext**" y "**P1Int**", así como una tercera muestra denominada; "**P1Mix**" (figura 9), correspondiente al material no diferenciado entre la cobertura y la parte interna. Las muestras **P1Int** y **P1Mix** se utilizaron únicamente para los análisis mineralógicos y de composición elemental, determinando posibles diferencias con la muestra **P1Ext**. Para el resto de los análisis, se utilizó **P1Ext**, al cual se le ha denominado genéricamente **P1** para simplificar

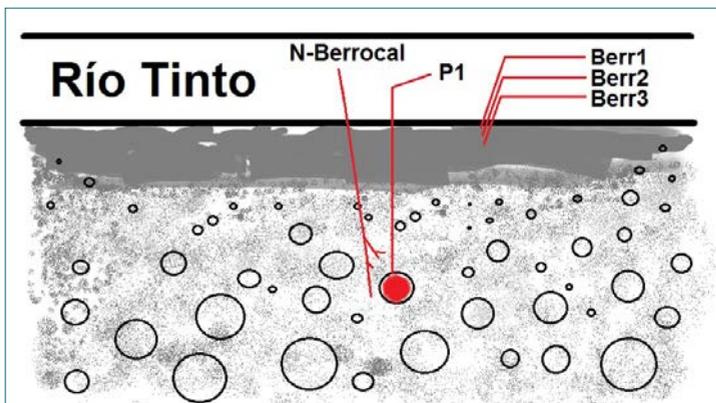


Figura 8: Representación de la ubicación de las muestras recogidas en la zona de Berrocal en el margen y en la cuenca del cauce del río. Los círculos negros representan las rocas y en rojo se representa el revestimiento sobre la roca. ■

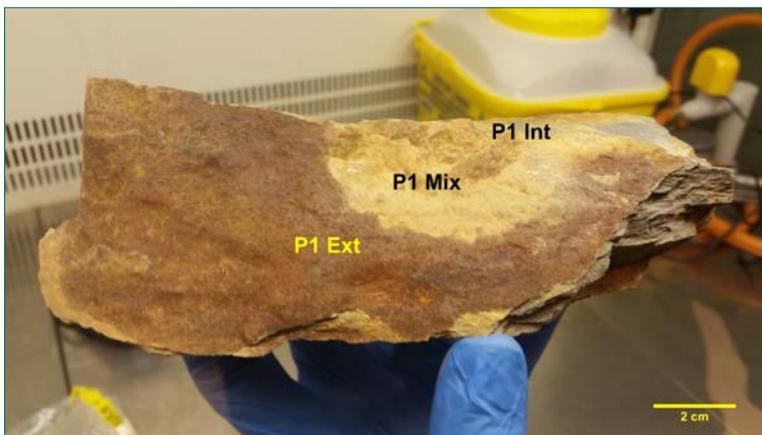


Figura 9: Muestra P1 recogida en Berrocal. En la imagen se indica de donde proceden las tres muestras obtenidas del procesamiento de P1. ■

(1) Cada vez que se nombre una muestra se remarcará en el texto en negrita.

También se recogieron, en los alrededores de la muestra **P1**, pequeños cantos redondeados que aparentemente no tenían recubrimiento. A dicha muestra se la denominó "**N-Berrocal**" (figura 7-8), analizándose mineralógicamente y en su composición elemental con el fin de determinar si había diferencias con **P1**.

## 4.2. Caracterización mineralógica y de elementos químicos

Las muestras fueron analizadas para determinar su composición química y mineralógica mediante diferentes técnicas:

### 4.2.1. Difracción de rayos X (XRD)

El material a analizar fue finamente molido con un mortero mecánico PULVERISETTE-2 de la casa comercial FRITSCH. En el caso de las muestras de sedimentos de la zona de Berrocal, dado su gran componente hídrico, se procedió previamente a secarlos durante una semana en una estufa a 40°C.

Los análisis de las muestras se realizaron en el centro de Astrobiología en un difractómetro de rayos X de polvo de la marca Seifert, modelo 3003 TT. La radiación que emite el equipo para el análisis es producida por un tubo de Cobre con radiación  $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ , estando equipado con un monocromador secundario de grafito para la eliminación de la radiación de fluorescencia de fondo y de la radiación  $K\beta$ , junto con un detector de centelleo que posee un límite de detección entorno al 1%, permitiendo identificar a un mineral si está en forma cristalina y al menos en un 1% de abundancia. El generador de rayos X se utilizó a un voltaje de aceleración de 40 kV y la emisión del filamento a 40 mA, siendo las muestras escaneadas secuencialmente entre 5° y 60°, y utilizándose un paso de 0,1° cada 2 s.

### 4.2.2. Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

La Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es una técnica de análisis químico inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar, tanto cuantitativa como cualitativamente, la mayoría de elementos de la tabla periódica en muestras líquidas o sólidas previo a un tratamiento de digestión que, en el caso de nuestras muestras, se realizó mediante microondas de alta presión y temperatura en el Centro de Astrobiología. De las muestras pulverizadas se tomaron fracciones para el posterior análisis de los elementos presentes por ICP-MS, siendo las cantidades utilizadas en promedio de unos 270 mg.

Cada muestra a digerir para el análisis, junto con un blanco comercial, se le adicionó 6 ml de  $\text{HNO}_3$ , 3 ml de HF, 1 ml de HCl y 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  procedente de la casa comercial Merck.

La digestión por microondas se realizó utilizando un equipo Ethos Touch Control Screen de Milestone con vasos de alta presión y temperatura que soportan hasta 100 bares de presión, realizando

una digestión a una temperatura de 220°C. Posteriormente, las muestras se enrasaron en matraces aforados a 100 ml con agua ultrapura suministrada por un equipo dispensador de agua Milli Q.

El procedimiento analítico seguido fue el siguiente: primero, el análisis del blanco, seguido de un estándar externo multielemental que contiene 47 elementos que cubren todo el rango de masas, las distintas muestras y, por último, un estándar de control de la deriva instrumental y posible efecto memoria del aparato con tal de garantizar la mayor precisión posible en el análisis. Los componentes y parámetros destacados del ICP-MS utilizado se muestran en la tabla 6.

| Componente / Parámetro                | Tipo / valor utilizado                |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Nebulizador                           | MEINHARD® pluss Glass Type C          |
| Spray Chamber                         | Ciclónica a 5°C                       |
| Conos Sampler y skimmer               | Níquel                                |
| Velocidad de aspiración de la muestra | 350 µL/min                            |
| RF Power                              | 1600 W                                |
| Inyector                              | 2.0 mm, diámetro interno de cuarzo    |
| Tiempo de permanencia                 | 50 s                                  |
| Scan Mode                             | Peak hopping                          |
| Mixing Tee                            | On-line addition of internal standard |
| KED Helium mode                       | 4 l/min                               |

Tabla 6: Componentes y parámetros destacados del ICP-MS utilizado. ■

### 4.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para las observaciones en el SEM, se procedió a recubrir con oro las muestras en un metalizador Bio-Rad SC502 y se analizaron en el centro de Astrobiología en un microscopio electrónico JEOL JSM 5600 LV con un sistema de lentes compuesto por; un condensador de 2 etapas electromagnético y un objetivo de hasta 3 nm de resolución. Se aplicó un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo 20 nm. La composición de elementos cuantitativos en regiones de interés se determinó por un microanálisis EDX, utilizándose un visor INCAx con un detector Si-Li (Oxford, Inglaterra), capaz de detectar elementos ligeros como C u O. Los datos numéricos cuantitativos son referenciados por defecto como el pico más alto obtenido de cada espectro. La visualización del microanálisis se realizó con el software INCA v.3.04.

## 4.4. Análisis geoquímico: $^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}$

Para determinar la cantidad de materia orgánica y nitrógeno en las muestras de **Hem**, **Mag** y **P1** se midieron los isótopos estables de carbono orgánico ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno total ( $\delta^{15}\text{N}$ ) por espectrometría de masas isotoperatio (IRMS), siguiendo los métodos del USGS (Révész et al., 2012).

Aproximadamente, 1 g de muestra se homogeneizó con un mortero, después, se añadió HCl para eliminar los carbonatos durante 24 h y se ajustó el pH a 7. Posteriormente, el residuo obtenido se secó a una temperatura de 50°C durante 72 h., analizándose en el IRMS del Centro de Astrobiología (MAT 253, ThermoFisher) usando tres estándares (USGS41, IAEA-600 y USGS40).

El contenido del total de carbono orgánico (TOC%) y nitrógeno total (TN%) se midió con un analizador elemental (HT Flash, ThermoFisher), siguiendo el procedimiento que se describe en Sánchez-García et al., 2019.

Para observar y comparar el cociente de los elementos con respecto a la UCC, se utilizaron los datos de Rudnick de 1995 (Rudnick and Fountain, 1995), debido a su previo empleo en otros estudios de revestimientos de roca y los datos posteriores publicados (Rudnick and Gao, 2003), no reflejando diferencias significativas en los valores de la UCC

## 4.5. Caracterización biológica

Se aplicaron diferentes técnicas microbiológicas con tal de describir y caracterizar las comunidades microbianas presentes en las muestras de sedimentos (**Berr**), **P1** de Berrocal y las muestras **Hem**, **Mag** y **Ror** de la zona del Origen.

### 4.5.1. Extracción de ADN. Métodos de extracción y optimización

En este trabajo se han comparado cuatro métodos distintos de extracción de ADN que se han aplicado a las muestras **Hem** y **Mag** con el fin de evaluar su rendimiento: el clásico protocolo del Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Stulnig and Amberger, 1994), tampón XS (Moissl-Eichinger, 2011), PowerSoil DNA Isolation Kit (ThermoFisher; 12888-50 o 12888-100) y un tratamiento con P/EtOH previo a la utilización del PowerSoil DNA Isolation Kit, una modificación propuesta para muestras terrestres análogas de Marte (Direito et al., 2012).

### 4.5.2. Análisis del ADN

La concentración de ADN se midió con un NanoDrop One (ThermoFisher, ND-ONE). Para los geles de electroforesis; 0,5 g se disolvieron en 50 ml de tampón TAE 1x, procedente de una solución stock 50x, quedando a una concentración final de un 1% y calentándose 45 s a unos 800 W. Asimismo, se aplicó un campo eléctrico constante de 80 V durante 45 minutos. Para identificar el tamaño de las bandas, se utilizó un marcador de pesos moleculares (O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, ThermoFisher,

SM1163). El revelado del ADN en el gel se hizo con SyberGold (ThermoFisher, S11494) durante 45 minutos.

### 4.5.3. Amplificación cuantitativa del ADN (qPCR)

La PCR cuantitativa se realizó en un termobloque de Biorad CFX96 en la Medical University de Graz (Austria). Para la reacción de amplificación de ADN de las muestras se utilizó el kit TaqMan Life Tech Gene Expression MM (tabla 7), el cual consiste en un mastermix, un par de cebadores de PCR específicos de Bacteria (331F y 797R) y una sonda específica para Bacteria que emite una señal de fluorescencia que mide el aparato. Las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 8.

Las muestras, junto con un control negativo y siete estándares con diferentes concentraciones de ADN procedente de *Escherichia coli-cep*a K12 (tabla 24, apéndice E), fueron utilizadas para determinar la cantidad de ADN real presente amplificada en las muestras y, como control, se realizó cada qPCR por triplicado con el fin de verificar el correcto funcionamiento de la reacción. Los archivos de salida generados fueron analizados y visualizados con el software LinReg qPCR<sup>2</sup> (Ruijter et al., 2009).

| Componente                       | Volumen<br>(Total= 10 ul) | Concentración fina |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Sso Advanced Universal Mastermix | 5 ul                      | 1X                 |
| 10 uM Forward cebador 331F       | 0,8 ul                    | 0,8 μM             |
| 10 uM Reverse cebador 797R       | 0,8 ul                    | 0,8 μM             |
| 10 uM Sonda HEX – Bacteria       | 0.2 ul                    | 0,2 μM             |
| DNA molde                        | 1 ul                      | -                  |

Tabla 7: Reactivos utilizados para la qPCR. ■

| Paso                      | Temperatura       | Tiempo         |
|---------------------------|-------------------|----------------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C             | 3 min          |
| 40 Ciclos de repetición   | Desnaturalización | 95 °C<br>3 s   |
|                           | Anillado          | 60 °C<br>30 s  |
| Mantenimiento             | 4 °C              | Indefinidament |

Tabla 8: Condiciones de la reacción de amplificación de la qPCR especificada por la casa comerci . ■

(2) El software LinReg puede ser descargado gratuitamente en <http://download.gene-quantification.info/>.

#### 4.5.4. Amplificación del ADN (PCR)

Se utilizaron dos kits para amplificar el ADN de las muestras. Para las muestras secuenciadas por el método de Sanger (**Berr, Ror, Hem y Mag**) se utilizó el kit de Invitrogen Platinum Taq DNA Polymere-  
rase (ThermoFisher, 10966034). Para las muestras secuenciadas por Illumina Mi-Seq (**P1, Hem, Mag**  
y cultivos de enriquecimiento) se utilizó el kit TaKaRa PCR Amplification Kit (número de catálogo:  
R011). Los componentes del kit de Invitrogen y las condiciones de amplificación de la PCR se muestran  
en las tablas 9 y 10, en las tablas 11 y 12 se muestran los componentes de la PCR y las condiciones de  
amplificación del kit TaKaRa

Para la amplificación del ADN se utilizaron diferentes cebadores con una especificidad dada (tabla  
13) que fueron utilizados en función de su grado de especificidad y el tipo de secuenciación posterior  
a realizar.

Como control para las PCR, se utilizó ADN procedente de un cultivo de *Escherichia coli* (cepa Hfr)  
con una concentración de 15,8 ng/ul.

Para la PCR con cebadores específicos de Cyanobacteria (Nübel et al., 1997) se utilizó como control  
positivo el ADN extraído de la cianobacteria planctónica *Microcystis aeruginosa* (cepa UAM-265) con  
una concentración de 50,8 ng/ul. Como control negativo complementario, se realizó una reacción  
dePCR usando el ADN de *Escherichia coli* comentado anteriormente.

| Componente              | Volumen (Total= 25 ul)* | Concentración fina |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| 10X Buffer PCR, - Mg    | 2,5 ul                  | 1X                 |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub> | 0,75 ul                 | 1,5 mM             |
| 10 mM dNTP mix          | 0,5 ul                  | 0,2 mM cada dNTP   |
| 10 uM cebador forward   | 0,5 ul                  | 0,2 μM             |
| 10 uM cebador reverse   | 0,5 ul                  | 0,2 μM             |
| Template                | 0,5 ul                  | -                  |
| Platinum Taq DNA pol    | 0,1 ul                  | 1 U                |

\* Agua-PCR hasta completar el volumen de 25 ul.

**Tabla 9: Componentes del kit de amplificación de ADN de Invitrogen . ■**

| Paso                      | Temperatura | Tiempo         |
|---------------------------|-------------|----------------|
| Desnaturalización inicial | 94°C        | 2 min          |
| Desnaturalización         | 94°C        | 30 s           |
| 35 Ciclos de repetición   | Anillado    | *              |
|                           | Extensión   | 72°C           |
| Extensión fina            | 72°C        | 5 min          |
| Mantenimiento             | 4°C         | Indefinidament |

\* La temperatura de anillado varió en función de los cebadores utilizados. Se empleó una temperatura de 55°C para las diferentes reacciones, excepto para la segunda y tercera PCR de la muestra Mag en las que se utilizó una menor temperatura de anillado: 52,7 y 51,5°C respectivamente.

**Tabla 10: Condiciones de amplificación utilizando el kit de Invitrogen (para la posterior secuenciación con Sanger . ■**

| Componente            | Volumen (Total= 30 ul)* | Concentración fina |
|-----------------------|-------------------------|--------------------|
| 10X Buffer PCR, + Mg  | 3 ul                    | 1X                 |
| 20 mg/ml BSA          | 1,5 ul                  | 1 mg/ml            |
| 10 mM dNTP mix        | 2,4 ul                  | 0,2 mM cada dNTP   |
| 10 uM cebador forward | 0,9 ul                  | 3 µM               |
| 10 uM cebador reverse | 0,9 ul                  | 3 µM               |
| Template              | 0,5 ul                  | -                  |
| ExTaq Polymerasa      | 0,1 ul                  | 1 U                |

\* Agua-PCR hasta completar el volumen de 30 ul.

**Tabla 11: Componentes del kit de amplificación de ADN TaKaRa ■**

| Paso                      | Temperatura | Tiempo         |         |
|---------------------------|-------------|----------------|---------|
| Desnaturalización inicial | 94°C        | 3 min          |         |
| Desnaturalización         | 94°C        | 45 s           |         |
| 35 Ciclos de repetición   | Anillado    | 50°C           | 1 min   |
|                           | Extensión   | 72°C           | 1,5 min |
| Extensión fina            | 72°C        | 10 min         |         |
| Mantenimiento             | 4°C         | Indefinidament |         |

**Tabla 12: Condiciones de amplificación utilizando el kit de Invitrogen (para la posterior secuenciación por Illumina . ■**

| Nombre           | Secuencia (5' → 3')       | Secuenciación / Especificidad | Referencia              |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Arq3F            | TTCCGGTTGATCCTGCCGGA      | Sanger / A                    | Giovannoni et al., 1988 |
| Bac27F           | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG      | Sanger / B                    | Lane, 1991              |
| Cya359F          | GGGGGATYTTCCGCAATGGG      | Sanger / Cy                   | Nübel et al., 1997      |
| U515F            | GTGYCAGCMGCCGCGGTAA       | Illumina / U                  | Parada et al., 2016     |
| U806R            | GGACTACNVGGGTWTCTAAT      | Illumina / U                  | Apprill et al., 2015    |
| Cya781R<br>(a)** | GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT | Sanger / Cy                   | Nübel et al., 1997      |
| Cya781R<br>(b)** | GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT | Sanger / Cy                   | Nübel et al., 1997      |
| 1492R            | TACGGYTACCTTGTTACGACTT    | Sanger / U                    | Lane, 1991              |

\* A= Arquea; B= Bacteria; Cy=Cyanobacteria; U= Bacteria y Arquea (universal para procariotas)

\*\* Mezclados equimolarmente

Tabla 13: Cebadores utilizados en las diferentes PCR realizadas. ■

#### 4.5.5. Clonaje, secuenciación Sanger y tratamiento bioinformático

Los productos de la PCR secuenciados por Sanger fueron ligados a un vector de clonación pCR4-TOPO TA (ThermoFisher, 450071) y transformados con el producto de ligación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* One Shot TOP10 (Invitrogen, C404010). El ADN plasmídico de las células transformadas se extrajo con el robot Ep Motion 5075 Vac de Eppendorf en el servicio de secuenciación del centro de Astrobiología. El protocolo de ligación y transformación utilizado en el laboratorio puede consultarse en el apéndice B.

Para comprobar la presencia del producto de PCR en el vector, se comprobó en un 15% de los pocillos mediante la digestión enzimática de una alícuota de 5 µl utilizando 0,25 µl de la enzima de restricción Eco RI (Roche, número de catálogo: 11175084001) y 5 µl de su buffer H.

Una vez realizadas las comprobaciones de los pocillos, el ADN plasmídico se secuenció en el Centro de Astrobiología con un secuenciador ABI 3730 de 48 capilares de Applied Biosystem, utilizando el kit de secuenciación Big Dye Terminator v.3.1 (ThermoFisher, 4337455) durante 35 ciclos de 96°C (10 s), 55°C (5 s), 60°C (4 min) y mantenimiento a 4°C, utilizando los cebadores M13 Forward y M13 Reverse proporcionados por el kit TOPO TA Cloning (ThermoFisher, 450071).

Una vez obtenidas las lecturas en las dos direcciones, fueron procesadas bioinformáticamente para obtener la secuencia final ensamblada mediante los programas PreGap4 y Gap4 del paquete bioinformático Staden (Staden, 1996) con una estimación de la precisión de la base de manera logarítmica y cuyos valores de los parámetros utilizados en PreGap4 se muestran en la tabla 14.

La ausencia en las lecturas ensambladas de fragmentos del vector de clonación se verificó utilizando la herramienta online del NCBI VecScreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>).

| Parámetros del Quality Clip                                | Valor usado |
|--|-------------|
| Longitud de ventana  | 50          |
| Valor de confianza promedi                                 | 15          |
| Longitud mínima (si es demasiado corto, lectura rechazada) | 100         |
| Parámetros del vector del clonaje                          | Valor usado |
| % mínimo emparejado en 5'                                  | 60          |
| % mínimo emparejado en 3'                                  | 80          |
| Posición 5' por defecto                                    | -1          |

**Tabla 14: Valores de los parámetros de eliminación del vector, regiones de baja calidad y ensamblaje utilizado en PreGap4. ■**

Para verificar que las lecturas ensambladas no fueran secuencias quiméricas, se utilizó la herramienta Mallard v1.02 (Ashelford et al., 2006) y las curvas de rarefacción de las secuencias se realizaron con el software Analytic Rarefaction v.1.3 (<https://strata.uga.edu/software/index.html>). De igual modo, el ajuste no lineal con la ecuación de Clench se utilizó el complemento SOLVER de EXCEL, con un ajuste mínimo mediante el método de resolución GRG y convergencia estándar de 0,0001, obteniendo el coeficiente de correlación que, elevado al cuadrado, proporciona el coeficiente de determinación del ajuste realizado.

La identificación más probable de las secuencias obtenidas se realizó mediante Blastn (Altschul et al., 1990) y RDPSeqMatch (Cole et al., 2014), agrupándose las secuencias en árboles filogenéticos para confirmar las afinidades entre ellas y secuencias procedentes de las bases de dato.

Para ello, se alinearon las secuencias en el RDPAligner (Cole et al., 2014) mediante el método INFERNAL (Nawrocki et al., 2009). Posteriormente, se seleccionaron las regiones informativas de interés con GBlocks (Castresana, 2010) y se seleccionó el modelo evolutivo más probable con jModelTest (Darriba et al., 2012) para poder realizar el análisis filogenético de las secuencias por máxima verosimilitud con el software PhyML (Guindon and Gascuel, 2003). Para construir los árboles filogenéticos se utilizó el software de libre acceso FigTree v1.4.3 (<https://github.com/rambaut/figtree/release>).

#### 4.5.6. Secuenciación Illumina y tratamiento bioinformático

La secuenciación Illumina se realizó utilizando el dispositivo Illumina Mi-Seq, insertando, previamente a la secuenciación, una secuencia barcode con 8 ciclos de PCR (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') para facilitar el tratamiento posterior bioinformático de las lecturas utilizando el kit MS-102-3003 V3-600 en el Core Facility Molecular Biology del Center for Medical Research en la Medical University of Graz (Austria), siguiendo el protocolo descrito en Mora et al., 2016.

El flujo de trabajo bioinformático del proceso de secuenciación masiva (figura 10) fue realizado con QIIME v.1.9.1 (Caporaso et al., 2010) en el servidor Galaxy de la Medical University of Graz (<https://galaxy.medunigraz.at/>).

Para la identificación de las secuencias se utilizaron las bases de datos de SILVA-128 de la SSU (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-128/>, Quast et al., 2013) al 97% de identidad y la base de datos de Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com/downloads>, DeSantis et al., 2006) de mayo de 2013 al 85% de identidad.

El archivo final fue procesado manualmente<sup>3</sup>, eliminando las secuencias presentes tanto en la muestra como en el control negativo. También se eliminaron las secuencias sospechosas de ser plausibles de ser contaminadas.

Una vez obtenida la tabla de abundancia de los OTUs en las diferentes muestras, se procedió, por un lado, a obtener una agrupación de las muestras en función de la similitud de las comunidades microbianas presentes utilizando el software online Calypso (Zakrzewski et al., 2017). En el análisis se optó por realizar una normalización de los datos, una transformación mediante raíz cuadrada (transformación Hellinger), re-

comendada por el servidor Calypso, y se utilizó el índice de correlación de Spearman (Spearman, 1904). Por otro lado, se realizó una inferencia metagenómica del metabolismo de la comunidad microbiana mediante la herramienta online Piphillin (Iwai et al., 2016).

#### 4.5.6.1. Identificación y caracterización de secuencias no asignadas

Para poder realizar la categorización de las secuencias que quedaron sin asignación taxonómica por QIIME, se procedió a buscarlas individualmente mediante Blastn (Altschul et al., 1990) y RDPSeq-Match (Cole et al., 2014), agrupándose en árboles filogenéticos con el fin de confirmar las afinidades entre las diferentes secuencias.

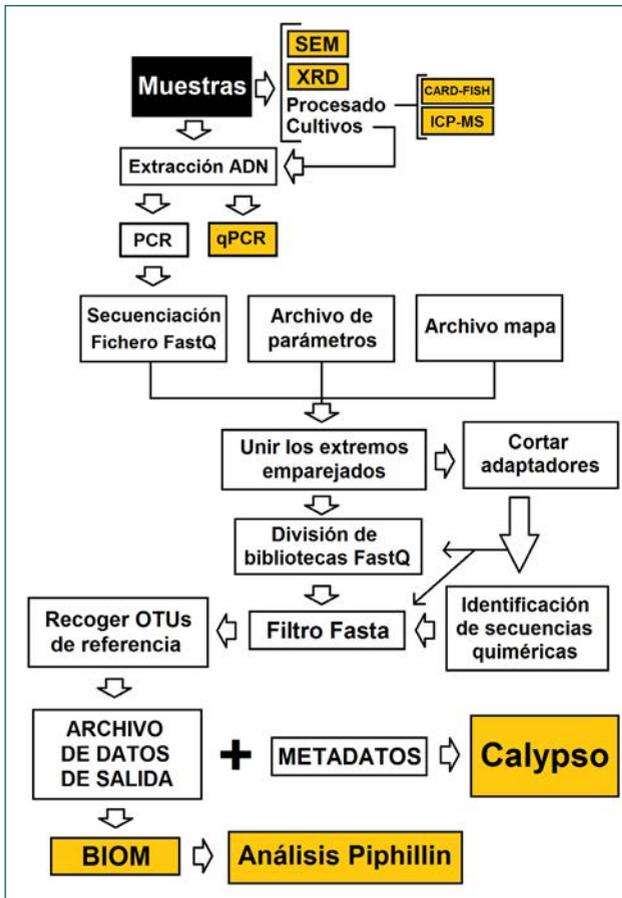


Figura 10: Diagrama del flujo de trabajo donde se especifica el procesado bioinformático de las muestras secuenciadas por Illumina Mi-Seq. Los recuadros amarillos hacen referencia a diferentes técnicas aplicadas o a herramientas utilizadas para el estudio de las muestras ambientales de este trabajo. ■

(3) Remarcar que para el procesamiento manual de las numerosas secuencias obtenidas, la utilización de herramientas bioinformáticas como FaBox v.1.5 y Bioedit v. 7.2.5 facilitó la tarea (Villesen, 2007; Hall, 1999).

Para ello, se alinearon las secuencias en el RDPAligner (Cole et al., 2014) mediante el método INFERNAL (Nawrocki et al., 2009). Posteriormente, se seleccionaron las regiones informativas de interés con GBLOCKS (Castresana, 2010) y se escogió el modelo evolutivo más probable con jModelTest (Darriba et al., 2012) para poder realizar el análisis filogenético de las secuencias por inferencia bayesiana (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) con 3·10<sup>7</sup> análisis de generaciones y un burnin del 25%.

#### 4.5.7. Cálculos de los parámetros de interés ecológico

Todos los cálculos de parámetros de interés ecológico realizados se hicieron con el software R v.3.3.3 (R core team, 2017) mediante el paquete vegan (Oksanen et al., 2017), excepto los análisis de componentes principales (PCA) que se realizaron con el software Past3 (Hammer et al., 2001). Los detalles matemáticos de los parámetros ecológicos utilizados pueden consultarse en Hill et al., 2003.

#### 4.5.8. Cultivos de enriquecimiento

Con el objetivo de obtener información complementaria sobre la presencia de microorganismos en las muestras, se realizaron los siguientes cultivos de enriquecimiento en condiciones anaerobias: Fe<sup>+2</sup> + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Schmid et al., 2014) con la muestra **Berr** para aislar miembros del género *Acidovorax* y DG + 2 g/l de S<sup>0</sup> (Pierson and Castenholz, 1974; Garrity and Holt, 2001) con las muestras **Hem** y **Mag** para aislar algún miembro de phylum Chloroflexi y medio DG (sin S<sup>0</sup>) en condiciones aerobias con la muestra **P1**.

Tras los procesos de extracción del ADN, secuenciación y revisión de las secuencias bioinformáticamente, se extrajo información complementaria sobre la diversidad de los microorganismos presentes en las distintas muestras ambientales.

#### 4.5.9. Hibridación *in situ* (CARD-FISH)

La técnica de hibridación *in situ* utilizando sondas fluorescentes (FISH) (figura 11) está basada en la utilización de un oligonucleótido complementario a una secuencia específica del ARN 16S de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos con el fin de identificarlos y cuantificarlos en muestras naturales mediante la permeabilización de los microorganismos y la exposición a la sonda convenientemente marcada con un colorante fluorescente (Kubota, 2013). A diferencia del FISH, la técnica CARD-FISH tiene etiquetada en el extremo 5' de la sonda una peroxidasa del rábano picante (HRP) que, con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, provoca la oxidación de la tiramida (Sigma, T2879) que tiene conjugado el fluoróforo, depositándose en las células hibridadas y permitiendo una amplificación de la señal de hibridación (figura 11, recuadro central). Los detalles del protocolo utilizado en este trabajo se indican en Schmidt et al., 2012.

Una pequeña porción de las muestras fue inmediatamente fijada en formaldehído al 4% en su recogida para su posterior inmovilización y permeabilización correspondiente en el laboratorio, evitando así cualquier alteración posterior en las muestras.

El fluoróforo seleccionado para detectar señales específicas de hibridación fue la Alexa 594 (Bio-mers, Molecular Probes; A20000), utilizado satisfactoriamente en estudios de hibridación en el subsuelo de la IPB (Escudero, tesis 2018). Para verificar la autenticidad de la señal de hibridación y evitar falsos positivos, se aplicó un fluoróforo genérico con afinidad al ADN, el Syto9 (ThermoFisher, S34854) que se ha reportado como el más adecuado para hibridaciones de roca en el subsuelo de la IPB (Escudero, tesis 2018), por lo que únicamente se consideran señales positivas de hibridación si los espectros de emisión de la Alexa 594 y el Syto9 coinciden con la longitud de onda a la cual tienen su máxima emisión (tabla 15).

Diferentes sondas con diferentes especificidades complementarias que van desde los dominios Bacteria y Archaea hasta nivel de género fueron utilizadas para complementar la descripción de las comunidades microbianas presentes en las muestras **Berr**, **P1**, **Hem** y **Mag** (tabla 16).

Las imágenes procedentes de las hibridaciones realizadas se obtuvieron con el láser confocal LSM 510 acoplado a un microscopio AxioObserver (Zeiss) equipado con un láser de Argón (488/514 nm) y un láser de Helio-Neón (543/633 nm), visualizándose con un objetivo de lente de 63x en aceite de inmersión (Inmersol, Zeiss).

Posteriormente las imágenes obtenidas en los diferentes canales (rojo para la sonda utilizada, verde para el Syto9 y gris para el reflejo) fueron ensambladas utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012).

| Nombre del fluorófor | Pico de excitación | Pico de emisión |
|----------------------|--------------------|-----------------|
| Alexa 594            | 590 nm             | 617 nm          |
| Syto 9               | 485 nm             | 500 nm          |

Tabla 15: Picos de excitación y de emisión de los fluoróforos usados para los experimentos de hibridación . ■

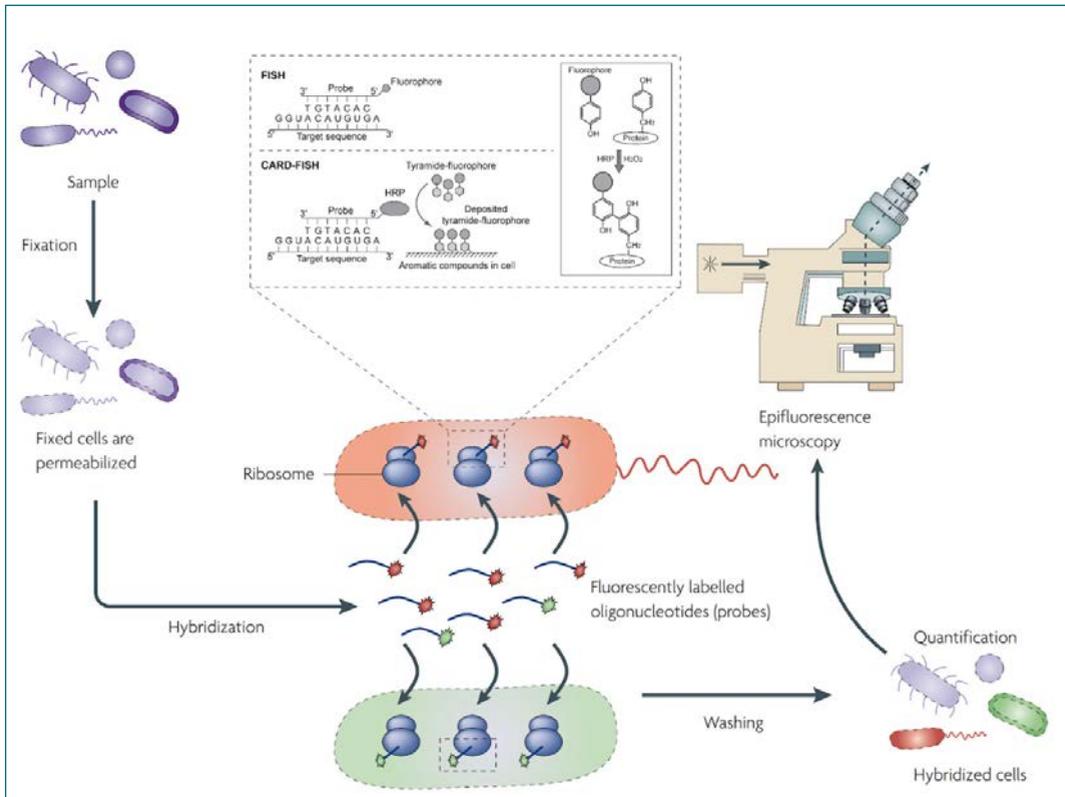


Figura 11: Esquema de una hibridación in situ. En el recuadro central superior se remarcan las diferencias entre un FISH y un CARD-FISH y la reacción que permite al fluoróforo depositarse en las células con la diana específica. Imagen modificada de Amann and Fuchs, 2009 y Kubota, 2013 ■

| Sondas utilizadas                | Secuencia (5' → 3')     | Especificada                           | % Formamida / [NaCl] (mM) | Referencia              |
|----------------------------------|-------------------------|--|---------------------------|-------------------------|
| ACD 840                          | CGACACTGAAGTGCTAAGC     | Acidiphillium sp.                      | 10 / 450                  | Bond and Banfield, 2001 |
| ACI 145                          | TTTCGCTTCGTTATCCCC      | Acidovorax spp.                        | 35 / 80                   | Schulze et al., 1999    |
| ALF 968                          | GGTAAGGTTCTGCGCGTT      | α-Proteobacteria                       | 20 / 225                  | Neef, 1997              |
| ARC 915                          | GTGCTCCCCCGCAATTCCT     | Archaea                                | 20 / 225                  | Stahl and Amann, 1991   |
| BET 42a <sup>1</sup>             | GCCTCCCACTCGTTT         | β-Proteobacteria                       | 35 / 80                   | Manz et al., 1992       |
| CF 319a                          | TGGTCCGTGCTCAGTAC       | Bacteroidetes                          | 35 / 80                   | Manz et al., 1996       |
| CFX 109                          | CACGTGTTCTCAGCCGT       | Chloroflexi (Div. 3)                   | 30 / 112                  | Björnsson et al., 2002  |
| CFX 1223 + GNSB 941 <sup>3</sup> | CCATTGTAGCGTGTGTGMG     | Chloroflex                             | 35 / 80                   | Björnsson et al., 2002  |
|                                  | AAACCACAGCTCCGCT        |  |                           | Gichet et al., 2001     |
| CYA 361                          | CCCATTGCGGAAAATTC       | Cyanobacteria                          | 35 / 80                   | Schönhuber et al., 1999 |
|                                  | GCTGCCTCCCGTAGGAGT      | Bacteria                               |                           | Amann et al., 1990      |
| EUB 338 I-II-III <sup>3</sup>    | GCAGCCACCCGTAGGTGT      | Planctomycetes                         | 35 / 80                   | Daims et al., 1999      |
|                                  | GCTGCCACCCGTAGGTGT      | Verrucomicrobia                        |                           |                         |
| EURY 806                         | CACAGCGTTTACACCTAG      | Euryarchaea                            | 20 / 225                  | Teira et al., 2004      |
| GAM 42a <sup>2</sup>             | GCCTCCCACTCGTTT         | γ-Proteobacteria                       | 35 / 80                   | Manz et al., 1992       |
| HGC 69a                          | TATAGTTACCACCGCCGT      | Actinobacteria                         | 25 / 159                  | Roller et al., 1994     |
| LF 665                           | CGCTTCCCTCTCCAGCCT      | L. ferrooxidans Grupos I, II, III      | 35 / 80                   | Bond and Banfield, 2001 |
| LGC 354a + LGC 354b <sup>3</sup> | TGGAAGATTCCTACTGC       | Firmicutes                             | 35 / 80                   | Meier et al., 1999      |
|                                  | CGGAAGATTCCTACTGC       |  |                           |                         |
| MSSH 859                         | TCGCTTACGGCTTCCCT       | Methanosarcinales                      | 35 / 80                   | Boetius et al., 2000    |
| NON 338                          | ACTCCTACGGGAGGCAGC      | Control Negativo                       | 0 / 900                   | Wallner et al., 1993    |
| SRB 385                          | GTTCTCCAGATATCTACGG     | Bacterias reductoras del sulfato (SRB) | 35 / 80                   | Amann et al., 1990      |
| SS HOL 1400                      | TTCGTGATGTGACGGGC       | Acidobacteria                          | 20 / 225                  | Meisinger et al., 2007  |
| SUL 228                          | TAATGGGCCGAGCTCCC       | Sulfobacillus sp.                      | 30 / 112                  | Bond and Banfield, 2001 |
| THIO 820                         | ACCAAACATCTAGTATTTCATCG | Acidithiobacillus sp.                  | 10 / 450                  | Peccia et al., 2000     |

1. La sonda no etiquetada Bet42a se usó en cantidades iguales como competidor para mejorar la especificidad.
2. La sonda no etiquetada Gam42a se usó en cantidades iguales como competidor para mejorar la especificidad. 3Se utilizaron las sondas en cantidad equimolares.

**Tabla 16: Sondas para el CARD-FISH utilizadas en este trabajo. Se indica la secuencia, especificidad de la sonda, el % de formamida para la hibridación y la concentración de NaCl para el lavado de la sonda junto con el artículo de referencia en el que se describe la sonda. ■**

# Resultados y Discusión

## 5.1 Análisis mineralógico y composición elemental de las muestras

El estudio mineralógico y elemental de los revestimientos de roca seleccionados de la cuenca del Río Tinto nos permitirá realizar una comparación con los datos de barnices de roca existentes en la literatura (apartado 5.3) con el fin de determinar si alguna de las muestras rocosas estudiadas puede englobarse dentro de alguna de las categorías establecidas para los barnices de roca.

Se procedió al análisis mineralógico de las muestras recolectadas en las dos zonas de muestreo; Origen y Berrocal, utilizando difracción de Rayos X (XRD) (apartado 4.2.1) y su composición elemental por ICP-MS (apartado 4.2.2) con el fin de detectar similitudes y diferencias entre ellas. La selección de estos dos lugares de muestreo se debe, principalmente, a las diferencias detectadas entre ambos puntos de muestreo, debido a que la zona del Origen tiene un carácter más extremo en su química mientras que la zona de Berrocal tiene características intermedias entre Origen y la desembocadura del río (Fernández-Remolar et al., 2003).

La morfología de la zona del Origen está formada por fragmentos de rocas que no muestran una gran erosión y no están fuertemente compactadas, tal y como se observa en la unidad litoestratigráfica (**Mag** y **Hem**), que muestra una gradación de color amarillo a color rojizo (figura 6-A) y en la muestra **Ror**, un fragmento de roca de aspecto terroso y de color rojo intenso situada cerca del margen del cauce del río (figura 6-B)

En cambio, en Berrocal, se observa que hay depositados numerosos cantos compactos redondeados de color grisáceo, producto de la erosión y transporte del cauce del río (Fernández-Remolar, 2003; Amils et al., 2014; figura 7). En la zona, puede observarse una gran cantidad de sedimentos acumulados en los márgenes del cauce del río que se depositan a lo largo de todo el lecho cuando el río sufre crecidas en el nivel del agua en época de lluvias, a diferencia de la zona del Origen cuyo flujo de agua es pequeño y constante comparado con Berrocal. Esto hace que sea de gran interés analizar los sedimentos del margen del río (muestra **Berr**) y los pequeños cantos redondos (**N-Berrocal**) cercanos a la muestra de roca **P1**, con el fin de determinar si la deposición de color marrón observada sobre la superficie de la muestra **P1** está acumulando o perdiendo ciertos elementos con respecto a los que se encuentran en su entorno.

### 5.1.1. Origen

La mineralogía observada en la capa roja superior (**Hem**) y en la amarilla inferior (**Mag**) de la unidad litoestratigráfica del Origen (apartado 4.1.1) es similar (XRDs en el apéndice M). En ambos casos está

compuesta por cuarzo y moscovita / illita. La diferencia fundamental entre ambas reside en los óxidos de hierro que poseen, siendo hematita en la muestra **Hem** y magnetita en la muestra **Mag**. Esta simple observación evidencia una transformación mineralógica con el paso del tiempo en la unidad litoestratigráfica, algo ya observado en la cuenca del río (Fernández-Remolar et al., 2003)

Aunque la muestra **Mag** reveló la presencia de magnetita, sería preciso indicar que, teniendo en cuenta que la magnetita es de color negro y la muestra **Mag** es de color amarillo, es muy probable que la magnetita sea sólo uno de los muchos minerales de hierro que componen la muestra, siendo más razonable pensar que el color amarillo de la muestra se debe a la presencia de limonita en la misma (<https://www.mindat.org/min-2402.html>).

La limonita se define como un óxido de hierro hidratado amorfo, lo que explica que solo hayamos detectado magnetita por XRD, ya que la magnetita sí es cristalina y, por lo tanto, detectable por esta técnica. La limonita es susceptible a sufrir alteraciones mineralógicas a lo largo del tiempo, algo lógico teniendo en cuenta que la muestra **Mag** se sitúa en la zona más próxima al cauce del río.

De hecho, la magnetita tiene dos átomos de hierro en estado oxidado y un átomo de hierro en estado reducido, con un promedio de + 2,66 en el estado de oxidación y una estructura cristalina cúbica isométrica. Sin embargo, la hematita tiene una estructura cristalina romboédrica con sus átomos de hierro en estado oxidado (Cornell and Schwertmann, 2003), por lo que queda claro que la unidad litoestratigráfica que hemos estudiado ha sufrido cambios en la estructura cristalina y que pueden deberse a la actividad microbiana o a alteraciones abióticas a lo largo del tiempo.

Los análisis semicuantitativos para determinar la composición elemental mostraron resultados similares en ambas muestras (figura 12) con el hierro, aluminio, sodio, potasio y titanio como los elementos principales encontrados en una gran abundancia (figura 12-A) y que coinciden con los elementos que se asocian a los minerales identificados por XRD. Del resto de elementos que poseen una abundancia menor, habría que destacar, en orden de abundancia en las muestras; la presencia de bario, magnesio, zirconio, vanadio, calcio, manganeso, cromo, litio, plomo, arsénico, cobre o zinc (figura 12-B)

Mientras que en la muestra **Ror**, a diferencia de las muestras de la unidad litoestratigráfica, puede observarse una mayor preponderancia del hierro con respecto al resto de elementos encontrados, algo compatible con la mineralogía identificada en **Ror**, en donde sólo se detectaron óxidos de hierro: hematita y goetita (apéndice M), evidenciando que posee un estado de oxidación alto.

Los principales elementos identificados en **Ror** fueron el hierro (56660 ppm), aluminio (11395 ppm) y potasio (5562 ppm). El resto de elementos detectados mostraron concentraciones por debajo de los 1000 ppm, siendo el sodio, bario, titanio, yodo y plomo los elementos más abundantes en esta muestra (figura 13), químicamente similar a las muestras de la unidad litoestratigráfica, aunque mucho más enriquecida en hierro.

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en películas de hierro descritos en entornos similares (Dorn y Meek, 1995, Dixon and White, 2002), con hierro, aluminio, potasio y sodio como los principales elementos y cantidades muy bajas de manganeso, vanadio o cobre en comparación a otros elementos como el yodo o el circonio, más abundantes en el análisis de la muestra **Ror**.

Este gran enriquecimiento en hierro con respecto al resto de elementos es habitual encontrarlo en películas de hierro, haciendo patente que en la zona del Origen la gran concentración de este elemento dificulta que otros puedan estar presentes en gran cantidad

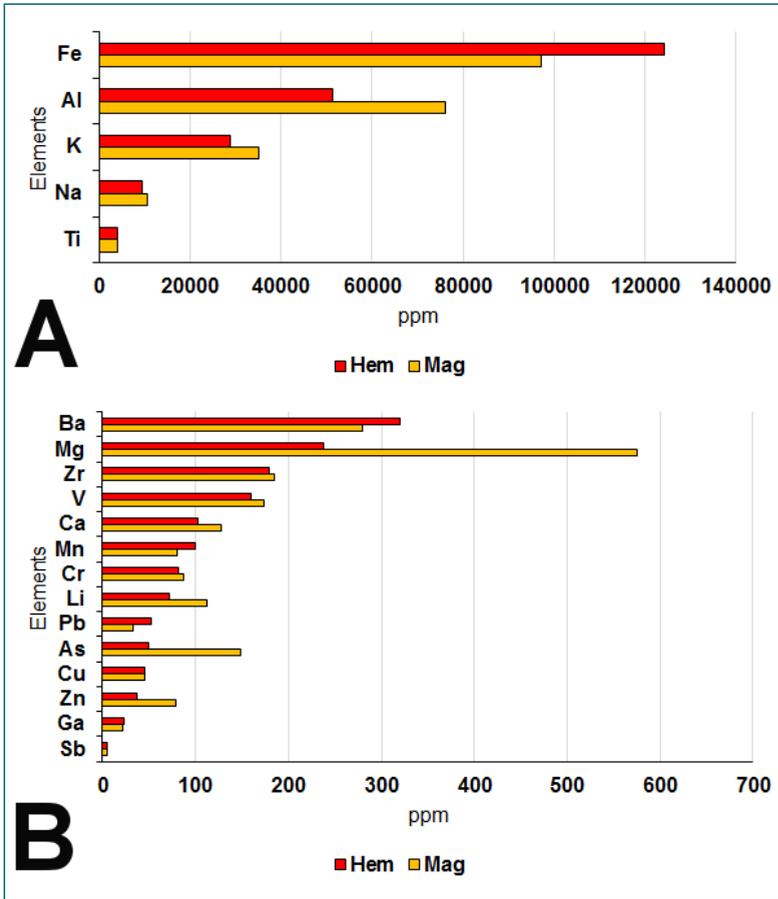


Figura 12: Composición elemental en la unidad litoestratigráfica del Origen. A: Los elementos más abundantes. B: Los principales elementos menores detectados en una cantidad apreciable por ICP-MS. ■

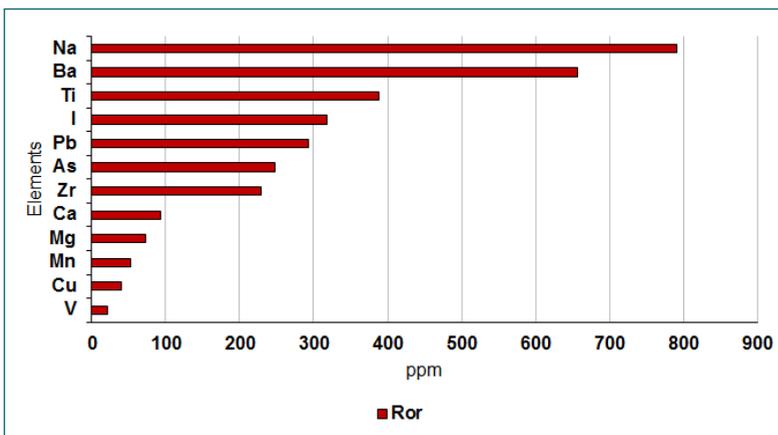


Figura 13: Composición elemental de la muestra Ror en la zona del Origen (no se muestran el hierro, aluminio y potasio, cuyos valores están indicados en el texto). ■

### 5.1.2. Berrocal

A diferencia de Origen, al ser el flujo del río mucho más abundante gracias a los aportes de distintos tributarios, se aprecia la presencia de numerosas partículas minúsculas transportadas por el cauce del río, así como la presencia de sedimentos en los márgenes.

El análisis de los tres sedimentos recogidos en el margen del río (**Berr1**, el más cercano al margen del río y **Berr2** y **Berr3** los más alejados del margen, figura 8, apartado 4.1.2) reflejan exactamente la misma mineralogía por XRD (cuarzo, jarosita, hematita y pirita, apéndice M). La pirita ( $\text{FeS}_2$ ), es un sulfuro de hierro precursor de los óxidos de hierro (Cornell and Schwertmann, 2003) y de la jarosita, un sulfato de potasio y hierro (<https://www.mindat.org/min-2078.html>), minerales secundarios que se forman por la oxidación de la pirita y de otros sulfuros metálicos en el ecosistema del Río Tinto (Amils et al., 2014). La hematita, en cambio, es un óxido de hierro estable producto final de transformaciones mineralógicas de otros óxidos de hierro, como la ferrihidrita (Cornell and Schwertmann, 2003).

Como ya apunta la mineralogía, y dadas las características del sistema que estamos estudiando, el elemento más abundante encontrado ha sido el hierro, con más de  $2 \cdot 10^5$  ppm en las muestras analizadas. El resto de elementos reflejan la química de metales pesados que hay en solución en el cauce del río (figura 14-15), algo lógico teniendo en cuenta que el punto de muestreo se sitúa muy próximo al margen del río y, por lo tanto, la química del agua del río debe influir de manera importante en la composición elemental de los sedimentos (Amils et al., 2014).

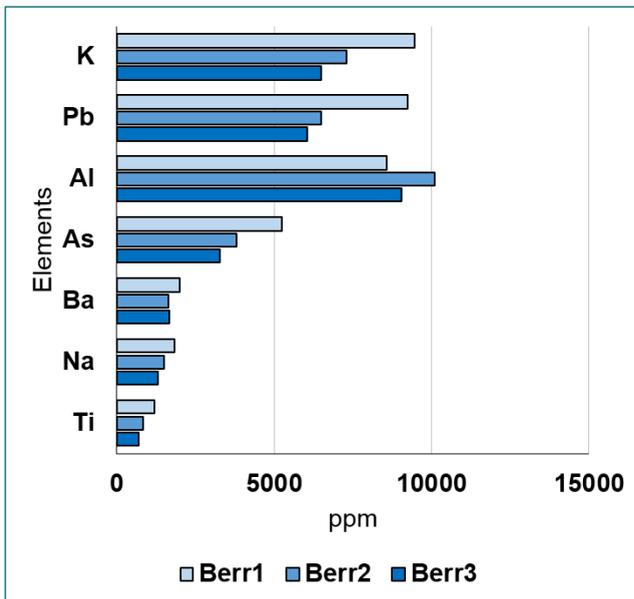


Figura 14: Abundancia de los principales elementos en los sedimentos de Berrocal (el hierro no se muestra; el valor del Fe se indica en el texto). ■

El análisis mineralógico de la muestra **N-Berrocal** mostró la presencia de hematita, jarosita y cuarzo, composición idéntica a las muestras **Berr**, a excepción de la pirita ausente en las muestra **N-Berrocal** (apéndice M). En cambio, la muestra de roca **P1**, cuyo núcleo en el que se deposita el revestimiento es un canto redondeado, reveló la presencia de cuarzo e illita (un mineral arcilloso) junto con chamosita férrica / clinocloro férrico, cuya presencia ha sido descrita en estudios de barnices de roca (apartado 2.3). La chamosita férrica / clinocloro férrico es un tipo de aluminosilicato que forma parte de un mineral transitorio de una solución sólida en el que el magnesio de la estructura cristalina se sustituye por hierro y contiene impurezas de elementos como calcio, potasio o manganeso en la estructura cristalina, los que le dan su tonalidad (Cornell and Schwertmann, 2003).

El análisis elemental por ICP-MS reflejó una composición y abundancia de elementos en **N-Berrocal** similar a las muestras de sedimentos, con abundancia de plomo, arsénico y bario (figura 16 y apéndice M). En cambio, la composición elemental de la muestra **P1** difiere sensiblemente de los sedimentos y de las partículas (figura 17 y apéndice M).

Puede observarse que **P1** posee una gran abundancia de hierro, aluminio, sodio, potasio y titanio, tanto en la muestra de la parte externa del barniz como en la parte interna que está en contacto con la roca madre y en la mezcla de material procedente del proceso de separación del revestimiento sobre la roca (figura 17-A), siendo la abundancia de elementos similar a la encontrada en las muestras del Origen, aunque no tan extrema la cantidad de hierro y con una mayor diversidad en la abundancia de elementos presentes.

Sin embargo, a diferencia de las muestras del Origen, en las cuales las deposiciones no están firmemente asentadas sobre la superficie de la roca, en la muestra **P1** se observa que la deposición está firmemente asentada.

Comparando la parte externa con la interna y con la mezcla de material, se puede observar un enriquecimiento en algunos elementos menores como manganeso, arsénico, bario o cobre y, de manera muy evidente, el enriquecimiento de otros elementos como el zirconio, plomo o calcio (Figura 17-B).

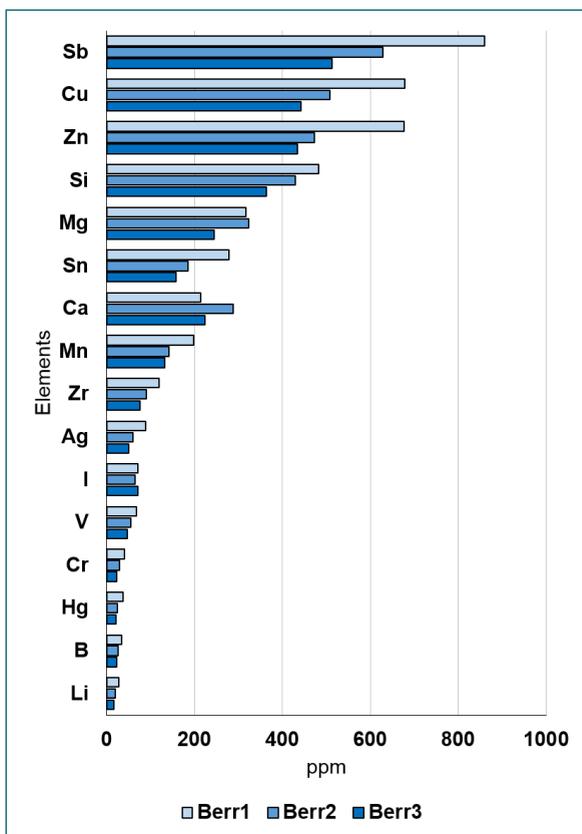


Figura 15: Composición elemental de elementos menores presentes en los sedimentos de Berrocal. ■

Dada la estructura cristalina del óxido de hierro identificado en **P1**, la presencia de distintas impurezas provoca la aparición de diversas tonalidades debido a la incorporación de diferentes iones en la matriz cristalina del mineral, en nuestro caso, el manganeso o el sodio (Barrón and Torrente, 2013). Por ello sugerimos que estos elementos se deben estar acumulando en la red cristalina del revestimiento, algo que, por otra parte, es característico de las deposiciones minerales sobre rocas (Dorn, 2007). La diferencia con las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen es que la ausencia de una influencia directa cíclica de deposición de elementos y la gran cantidad de hierro presente enmascara cualquier posibilidad de acumulación y de asentamiento firme sobre la superficie de las rocas.

Tras el análisis de la muestra de roca (**P1**), de las pequeñas partículas de roca recogidas en los alrededores de **P1** (**N-Berrocal**) y de los sedimentos (**Berr**), los resultados obtenidos por el XRD (apéndice M) parecen revelar una transición mineralógica de óxidos de hierro en los sedimentos del margen del río apoyada por un cambio en la composición de los elementos presentes en las muestras analizadas.

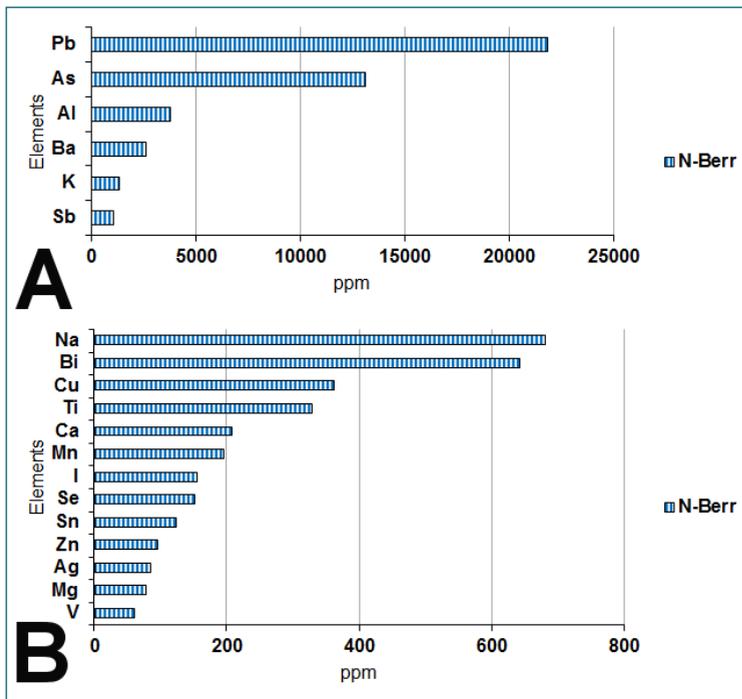


Figura 16: Composición elemental de las partículas de roca recolectadas alrededor de **P1** (muestra **N-Berrocal**). **A**: Principales elementos detectados (el hierro no se muestra en la figura). **B**: Elementos con menor abundancia. ■

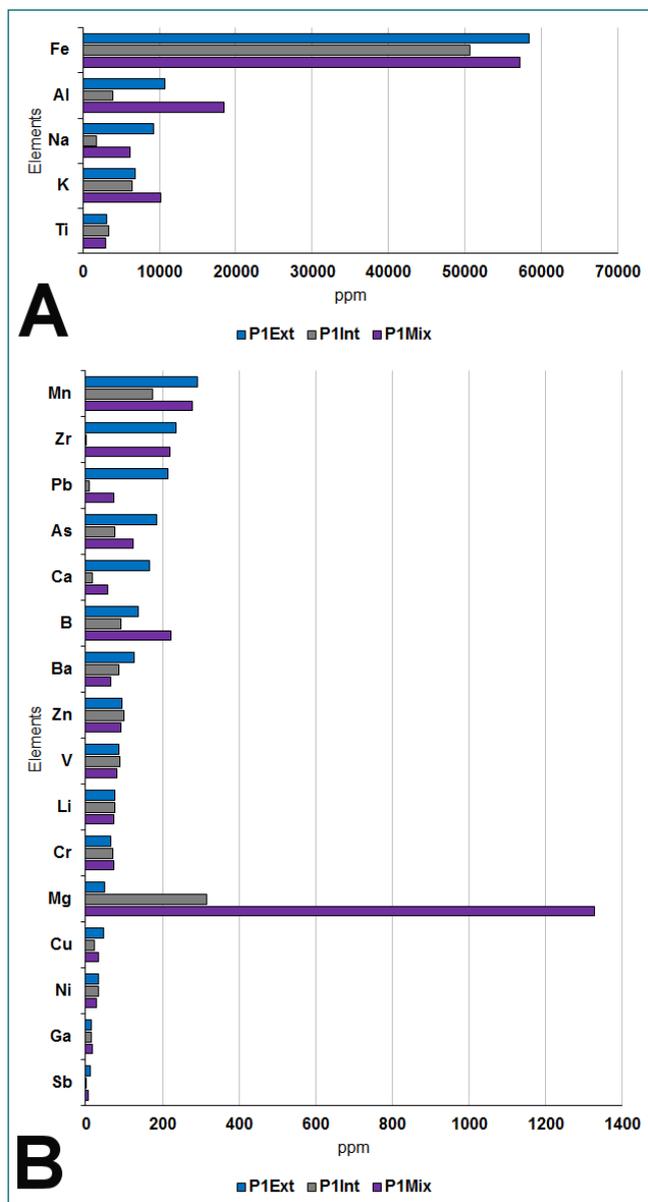


Figura 17: (Página anterior). Composición elemental en el revestimiento de roca en Berrocal (P1). [P1Ext], muestra de la parte externa; [P1Int], muestra de la parte interna y [P1Mix] mezcla de material. A: Elementos mayoritarios. B: Principales elementos menores. ■

## 5.2. Microscopía electrónica (SEM)

Con el fin de caracterizar la micromorfología y su relación con los elementos presentes en las muestras **P1** (zona Berrocal) y **Hem** y **Mag** (zona Origen) a nivel microscópico, se realizaron múltiples observaciones de las muestras en el SEM.

### 5.2.1. Unidad litoestratigráfica. Zona Origen

La morfología que presentan las muestras **Hem** y **Mag** resultó ser bastante homogénea, con un aspecto botroidal y con material parcialmente compactado (figura 18), algo que es típico de los óxidos de hierro (Barrón and Torrent, 2013). En determinados lugares de la muestra se puede observar una cierta orientación del material pero sin ser definido y sin formar estructuras que le den una consistencia claramente laminar. Probablemente, esto sea debido a una acción erosiva que se ha dado de manera progresiva en una determinada dirección sobre las muestras.

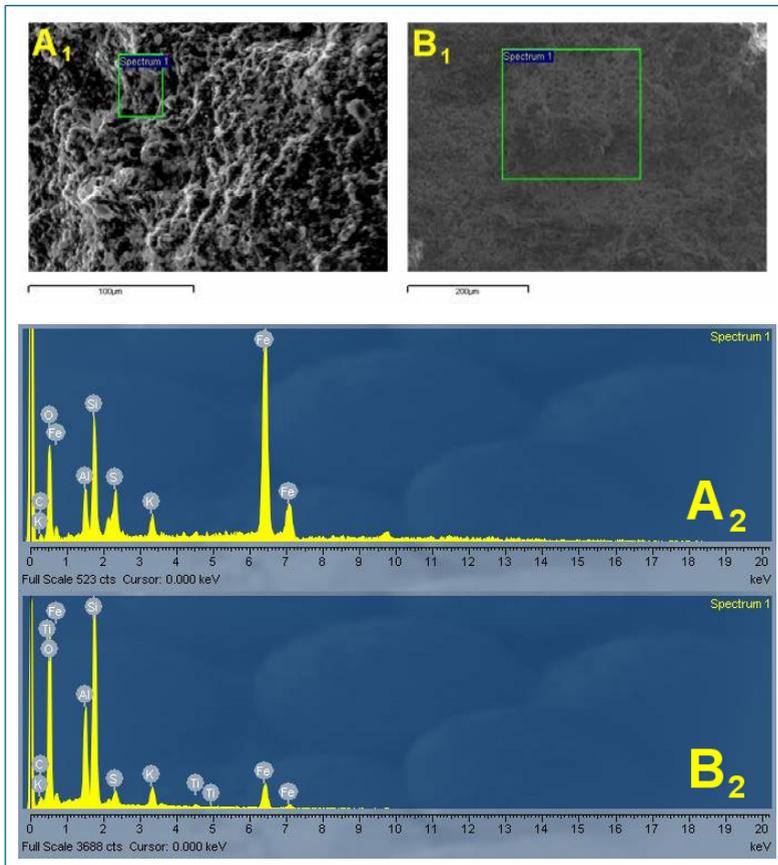


Figura 18: Observación por microscopía electrónica de barrido (indicado con el subíndice 1) y análisis EDX (indicado con el subíndice 2) de la muestras Hem (letra A) y Mag (letra B). Se puede observar en ambas muestras un pequeño pico de C y K, pero los elementos predominantes son el Fe, Si, Al en ambas muestras y además el Ti en Mag, aunque se encontró Ti también en Hem en algunas localizaciones dispersas (no mostrado en este análisis). Se puede observar la naturaleza botroidal de las muestras, especialmente en la imagen A1. ■

La similitud morfológica de **Hem** y **Mag** se puede encontrar también en los elementos identificados mediante el análisis por EDX: Si, O, Fe, Ti, Al, S, Na y K (figura 18-A<sub>2</sub> y 18-B<sub>2</sub>), cuya presencia coincide con el tipo de mineralogía identificada por XRD y los resultados de los principales elementos obtenidos por ICP-MS, algo lógico al tratarse de muestras que proceden de la misma unidad litoestratigráfica y cuya única diferencia apreciable es el tipo de óxido de hierro que poseen, tal y como se ha comentado previamente en el apartado 5.1.1.

También, se identificaron pequeños picos de carbono (figura 18) que pueden indicar la presencia de materia orgánica dispersa en la muestra, aunque no se observó que fueran particularmente relevantes en el conjunto de los análisis realizados en **Hem** y **Mag**.

### 5.2.2. Zona Berrocal, muestra P1

A diferencia de **Hem** y **Mag**, **P1** difiere considerablemente en la estructura y en algunos elementos identificados por SEM-EDX (figura 19-24), observándose una mayor diversidad de elementos, lo que apoya las observaciones realizadas por ICP-MS (apartado 5.1.2).

Junto con los elementos como el Si, Al, Fe o S encontrados tanto en la muestra **P1** como en **Hem** y **Mag**, hay que remarcar la presencia de elementos como P, Pb, Ca, As, Cu o Mn en algunos de los análisis realizados sobre la muestra **P1**, reflejando una gran diversidad de elementos presentes, algo que ya pudo observarse en el análisis de la muestra **P1** por ICP-MS (apartado 5.1.2).

Dadas las características de Berrocal respecto a Origen, es factible pensar que esta diferencia podría deberse a la influencia del agua del río; que contribuye al aporte de esos elementos en mayor cantidad en **P1** que en **Hem** y **Mag**, cuando el río inunda las partes superiores del cauce del río en sus crecidas estacionales (Fernández-Remolar et al., 2003).

A nivel microestructural, aunque también se observa de manera abundante formas botroidales como en las muestras de Origen, de igual modo que la presencia de formas laminares ausentes en las muestras **Hem** y **Mag** y que le confieren un aspecto muy diferente a la estructura botroidal observada en estas muestras (figura 19-20). Estas formas laminares están embebidas en la estructura botroidal de la muestra o bien hacen de nexo de unión en la estructura botroidal (figura 19-20), correspondiendo por la apariencia y por su análisis elemental a algún tipo de sedimento que estaría en consonancia con la idea de que, durante las crecidas del río, al sumergirse la roca en el agua se depositan sobre la misma no sólo elementos procedentes del agua, sino también pequeñas partículas de sedimentos que se cementan junto con la estructura cristalina de óxidos de hierro y que se observan, formando una laminación parcial en la superficie de la muestra. Esta idea además se ve reforzada por los valores negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  /  $\delta^{12}\text{C}$  encontrados en los análisis geoquímicos de la muestra (apartado 5.4), lo que podría indicar también algún tipo de biogenicidad en su formación.

Como en **Hem** y **Mag**, también se observaron en **P1** picos de carbono, pero a diferencia de éstos, los valores son especialmente elevados en algunos puntos de la muestra, especialmente en algunas de las estructuras planas observadas (figura 19-20) así como en los agregados de partículas que se analizaron en detalle (figura 21). Todo ello, compatible con la posibilidad de que se trate de acumulación de materia orgánica en la muestra, ya comentada previamente. Estos picos de carbono se observaron,

a veces, asociados a picos de calcio y de manganeso (figura 22-24), lo que permitiría sugerir que la presencia de estos dos elementos se debe al producto de la acción biológica, pero no se dispone de suficientes datos para contrastar esta hipótesis

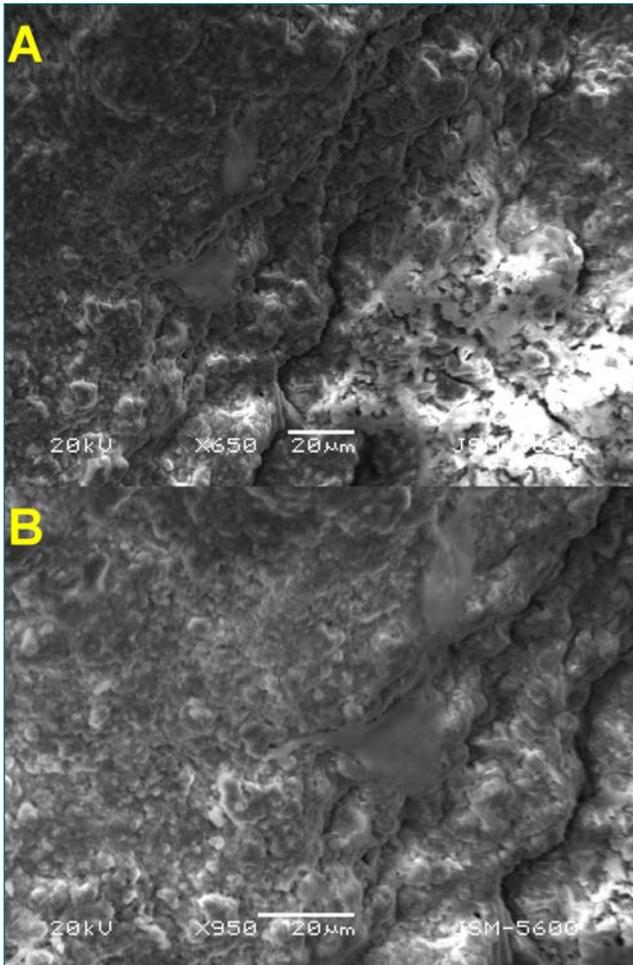


Figura 19: Imagen panorámica (A) y de detalle (B) de estructuras lisas y planas incrustadas en la estructura botroidal en la muestra P1. ■

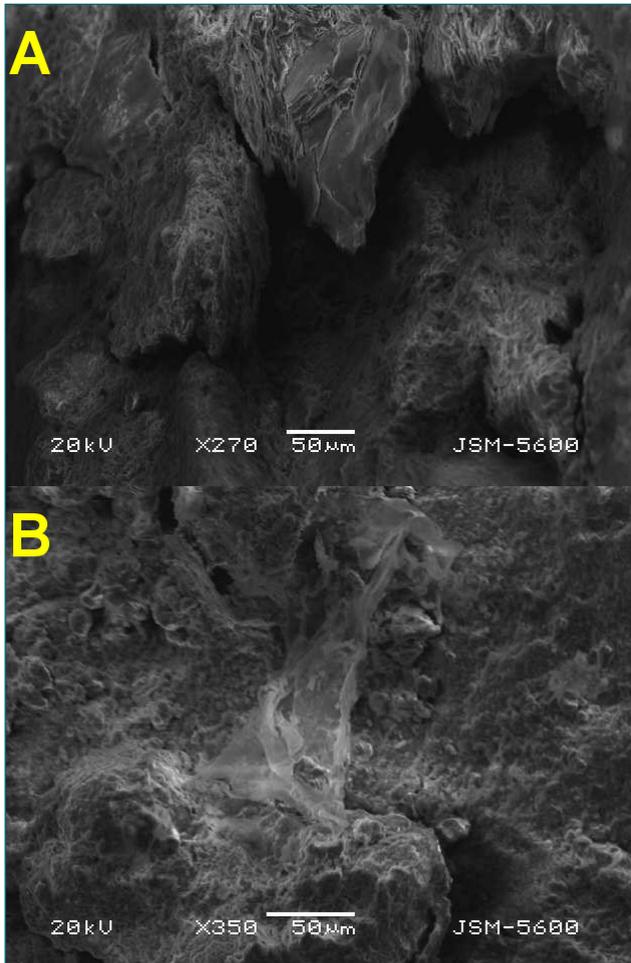


Figura 20: Observación de distintas morfologías en la muestra P1. La imagen tomada en A se sitúa entre la parte externa del barniz y la parte interna (figura 9). Puede observarse que la naturaleza botroidal es similar tanto en la parte superior como en la inferior, así como la existencia en dichas estructuras botroidales de finos filamentos tubulares sobre partículas de roca completamente planas (parte superior central de la imagen A). En B también puede observarse la naturaleza botroidal de la muestra y la presencia de estructuras planas distintas a otras estructuras existentes en la muestra intercomunicando las distintas partes de la estructura botroidal. ■

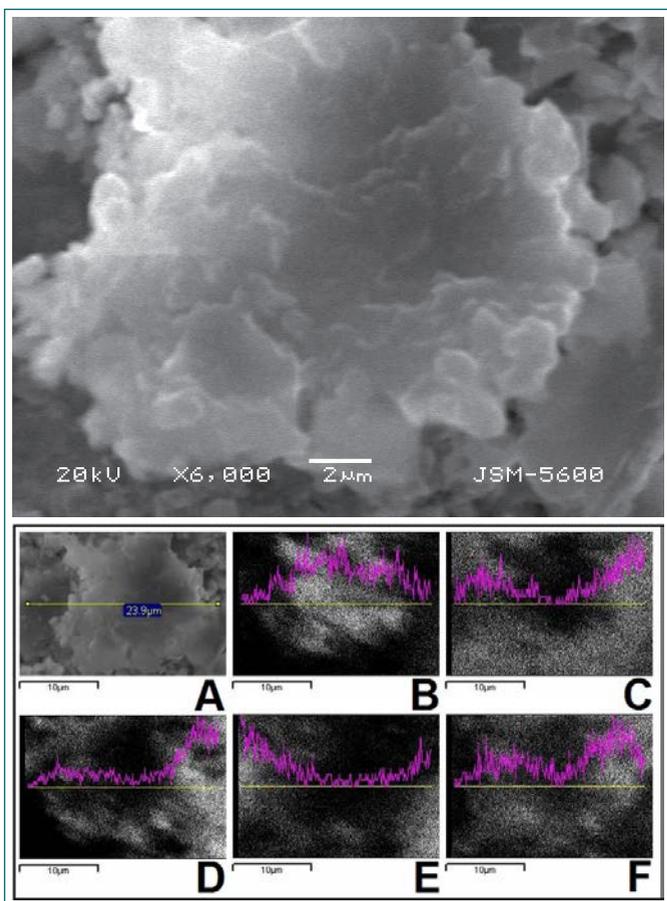


Figura 21: Detalle de una partícula orgánica en P1 (imagen superior). Se puede observar que no es sólida, que está formado por la agregación de otras partículas e incluso se pueden observar estructuras esféricas y bacilares que podrían corresponder a microorganismos incrustados en la partícula. Imagen inferior: Análisis elemental de la partícula orgánica.

A: Imagen en SEM con indicación del tamaño de partícula aproximado y línea del análisis de intensidad de los elementos analizados; B: señal de intensidad de carbono; C: señal de intensidad de hierro; D: señal de intensidad de oxígeno; E: señal de intensidad de silicio; F: señal de intensidad de azufre. ■

### 5.2.2.1. Ca, Mn y materia orgánica

Los picos de calcio y manganeso identificados en P1 son de gran interés puesto que, dada la química ácida del sistema de estudio, no deberían de aparecer precipitaciones en estos elementos (figur 22-24). Pero, de hecho, estructuras minerales precipitadas de calcio con hierro han sido previamente identificadas en la cuenca de Río Tinto y se ha demostrado en experimentos de laboratorio que pueden ser mediadas por la actividad biológica bajo condiciones ácidas extremas (Sánchez-Román et al., 2014).

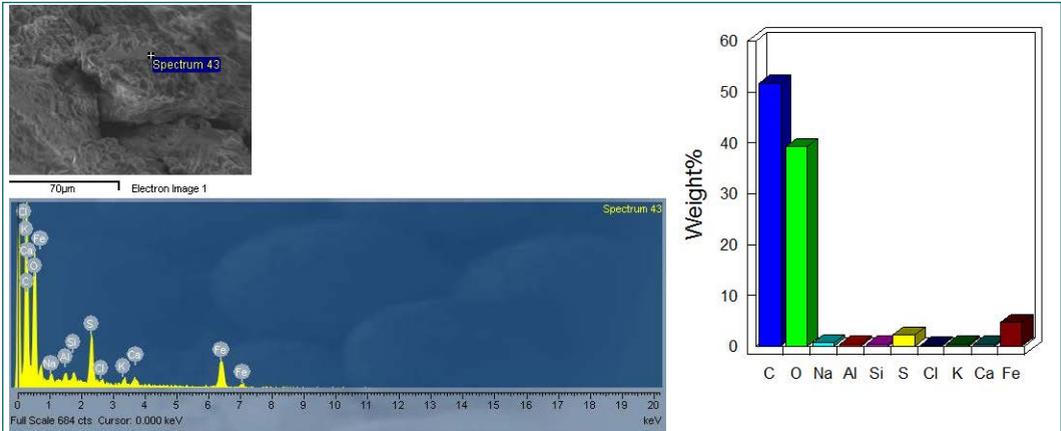


Figura 22: Detección de Ca en P1 (imagen en la parte superior izquierda) y asociado con una gran cantidad de materia orgánica (espectro del SEM en la parte inferior de la imagen y abundancia relativa observada en % a la derecha de la imagen). ■

El manganeso en condiciones ácidas es muy soluble, lo que evita su precipitación (Nijjer et al., 2000), por lo que su presencia junto con elementos como el calcio puede ser síntoma de un pH diferencial a nivel micrométrico (apartado 2.3.1.1). Sin embargo, los óxidos de manganeso suelen ser extremadamente pequeños y poco cristalinos debido a su elevada capacidad de intercambio catiónico, algo especialmente relevante en suelos y sedimentos, complicando su identificación mediante técnicas como el XRD (Barrón and Torrente, 2013). Su identificación es sólo posible en algunas formas de deposición como nódulos en los océanos o barnices sobre rocas en forma de manganos, como por ejemplo la pirolusita (Dorn, 2007; Barrón y Torrente, 2013).

No obstante, a pesar de estas dificultades, se pudieron observar pequeñas estructuras en la matriz de la superficie de la muestra (figura 23) que podrían corresponder a óxidos de manganeso, lo que pudo confirmarse con un mapeado exhaustivo (figura 24). Este pico de Mn parece tener relación espacial con la presencia de picos de C, pero se carece de datos suficientes que respalden esta posible relación.

Estos resultados están de acuerdo con los previamente descritos, utilizando ICP-MS para la parte externa de la superficie de la roca (**P1Ext**, apartado 5.1.2) en los que se observó que algunos elementos estaban enriquecidos con respecto a la roca madre en la que se aprecia la deposición, y esos elementos son precisamente; el Ca, Mn, As y Pb detectados por SEM-EDX. Lo que refuerza la idea previamente mencionada de que se está dando un enriquecimiento de elementos sobre la superficie de la roca, probablemente, como producto de la deposición de material debido a las diferentes crecidas que inundan periódicamente la superficie de las rocas en Berrocal

Además, los resultados obtenidos mediante el análisis por SEM-EDX para **P1** son similares a las observaciones realizadas por microscopía electrónica de algunos barnices de roca estudiados en la literatura (Dorn, 2007, apartado 2.3).

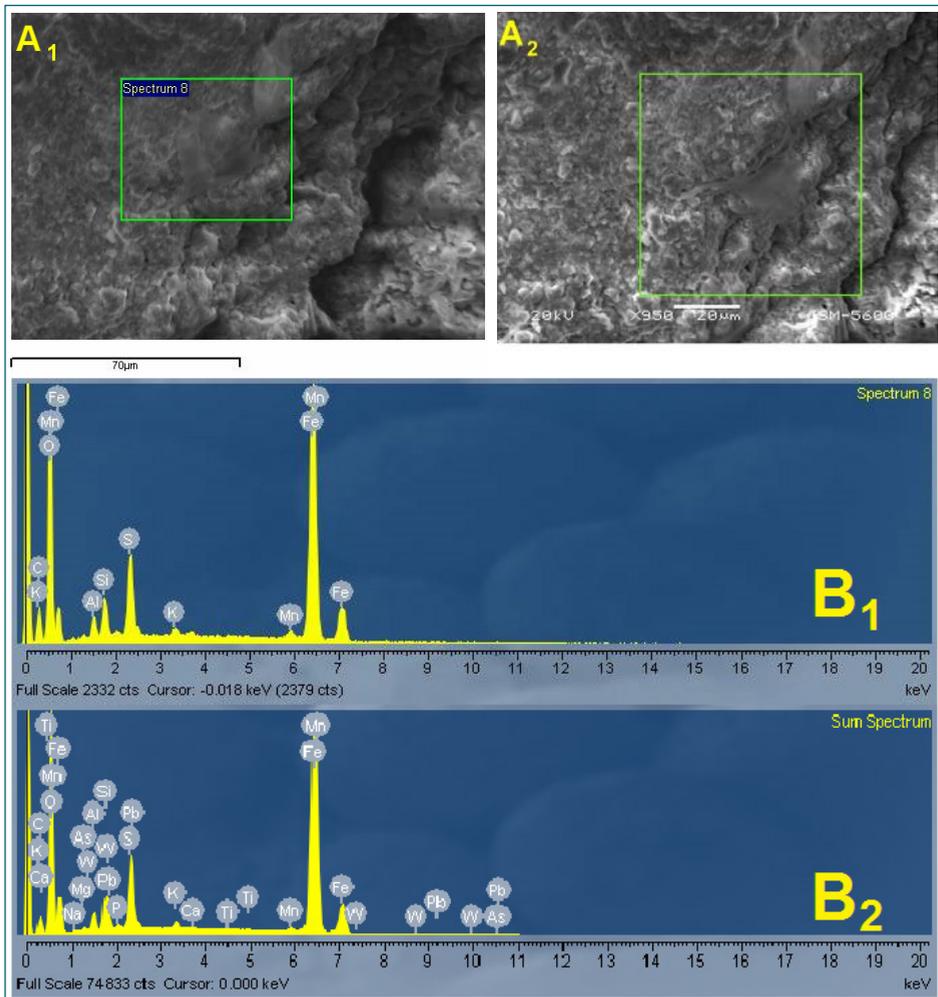


Figura 23: Detección de manganeso en dos zonas distintas (A1 y A2) de la muestra P1. Puede observarse que hay picos de C tanto en el espectro B1, correspondiente a la imagen A1, como en el B2, correspondiente a la imagen A2. También es posible observar en la imagen una cierta estratificación en capas. En la figura 24 se muestra un mapeado más detallado de la región en A2 corroborando la presencia de manganeso. En B2 no hay que tener en cuenta la presencia de W, al ser un elemento de la platina en la que se apoya la muestra. ■

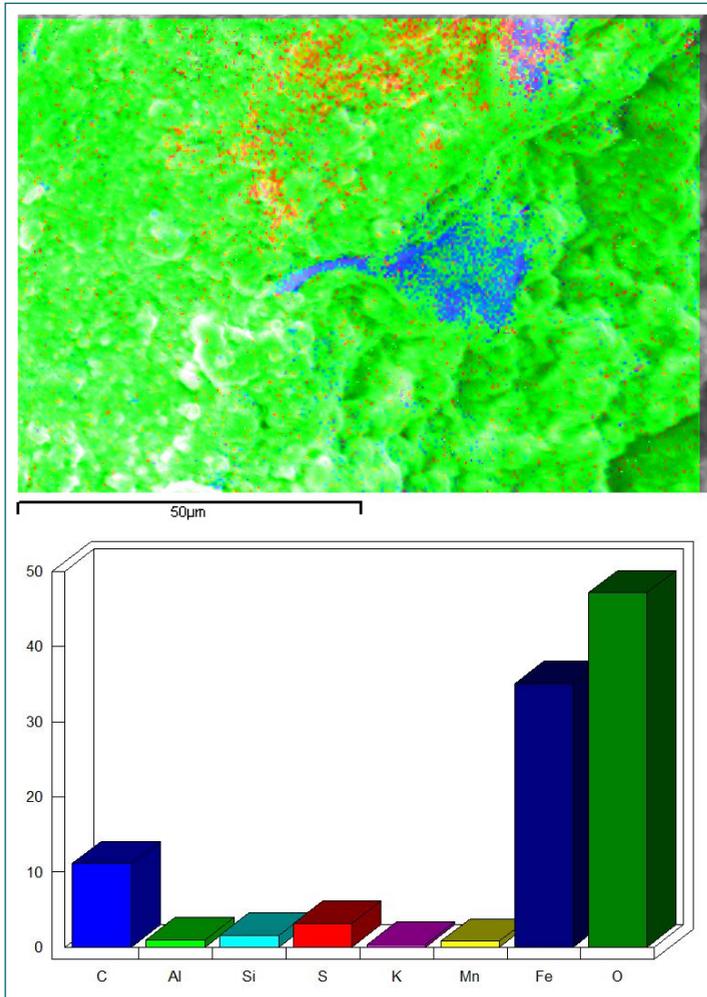


Figura 24: Mapeado elemental exhaustivo en el área indicada en la figura 23-A2 y abundancia relativa encontrada. En azul, C; en rojo, Mn; en verde, Fe. Se puede observar que el carbono se concentra en las partes planas de la imagen. Igualmente apreciable una baja concentración de Mn, Si, Al, K o S y una gran preponderancia en el área analizada de Fe y O junto con C. ■

### 5.3. Similitudes y diferencias de las muestras rocosas. Comparación con otras muestras ambientales

Para ver lo similares o diferentes que son las muestras rocosas del Origen con respecto al revestimiento de Berrocal, se realizó un análisis PCA de los resultados obtenidos por ICP-MS de las muestras **Hem**, **Mag**, **Ror** y **P1** (figura 25)

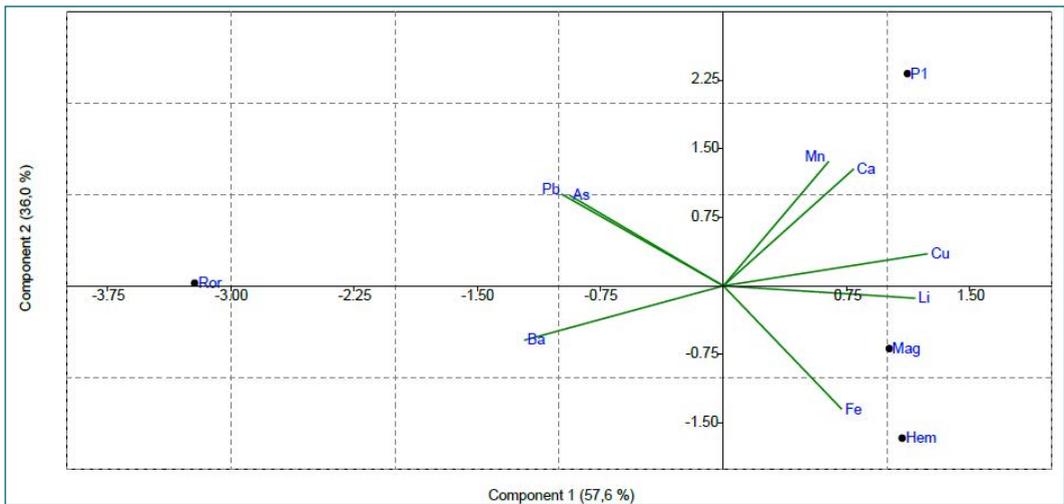


Figura 25: PCA de las muestras rocosas de Río Tinto caracterizadas por ICP-MS. Puede observarse que Hem y Mag quedan agrupadas en un mismo cuadrante, algo lógico dado que son parte de la misma unidad litoestratigráfica y muy separadas de P1. Ror queda alejado del resto de muestras (parte izquierda del gráfico), aunque en una posición intermedia entre P1, Hem y Mag teniendo en cuenta el primer componente. Las líneas verdes indican el vector de tendencia que sigue cada elemento en los diferentes datos utilizados y qué elementos tienen mayor influencia en cada muestra ■

En **P1** se tuvo en cuenta únicamente la parte externa de la roca de Berrocal, ya que es en esa capa donde podrían encontrarse los microorganismos activos del sistema. Se observa claramente que las muestras de Origen quedan separadas marcadamente de la muestra de Berrocal así como de la muestra **Ror**. También, se observa que el manganeso y el calcio tienen una buena correlación con **P1** y el hierro con las muestras **Hem** y **Mag**. En cambio el plomo, el arsénico y el bario tienden a correlacionarse con la muestra **Ror**, el cobre y el litio con **P1**, **Hem** y **Mag**. De hecho, hay que destacar la fuerte correlación negativa del bario con **P1**, sobre todo teniendo en cuenta el bajo enriquecimiento en Ba descrito en barnices de tipo V (Macholdt et al., 2017). Teniendo en cuenta que el Ba está subenriquecido en **P1**, esta es una observación que podría apoyar que el revestimiento de **P1** sea considerado como un barniz de roca de tipo V (apartado 2.3.3.5).

Para estudiar el enriquecimiento de elementos de nuestras muestras con respecto a muestras similares de barnices de roca descritos (Macholdt et al., 2017), se compararon entre sí con el fin de

averiguar si existía algún tipo de enriquecimiento en alguno de los elementos principales, calculando, para ello, un cociente de abundancia de los elementos con respecto al valor promedio de la corteza continental superior; la UCC (apartado 4.4), comparación habitualmente utilizada en estudios de barnices de roca (ej. Thiagarajan and Lee, 2004; Macholdt et al., 2015; Macholdt et al., 2017).

Los resultados de los cociente indican que nuestras muestras no están especialmente enriquecidas con respecto de la UCC, salvo en el caso del litio, el plomo, el cobre y el vanadio (excepto en la muestra **Ror**), con elementos característicos en barnices de roca como el manganeso, el estroncio o el bario. Estos elementos están subenriquecidos en nuestro caso, respecto a otros tipos de barnices de roca, con cocientes muy bajos (figura 26). Las concentraciones de calcio sí coinciden con las observadas en barnices de roca ya que suele ser un elemento subenriquecido comparado con la UCC.

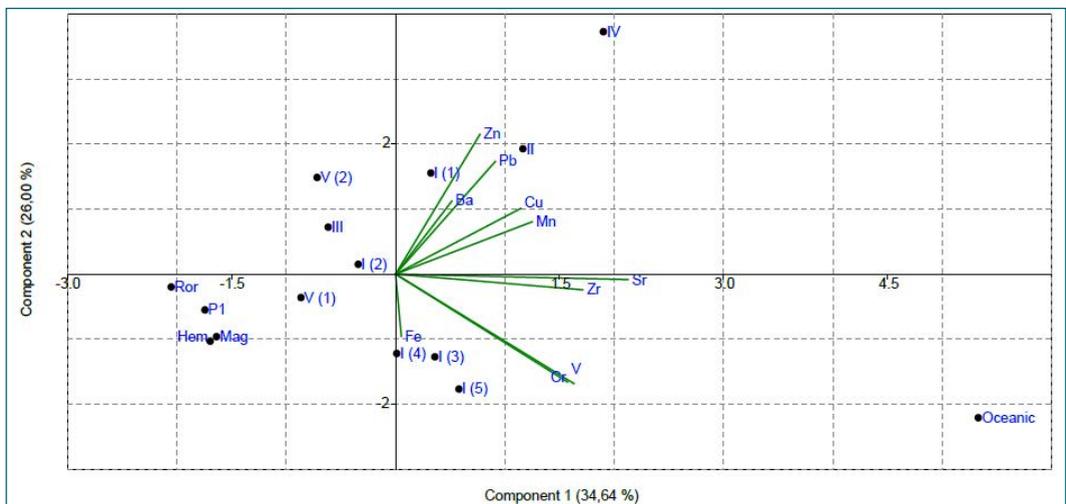
Para clarificar las similitudes y diferencias de nuestras muestras con los barnices de roca de la litadura, comparadas en la figura 26, se realizó un análisis de componentes principales (Figura 27), el cual parece reflejar una mayor similitud de nuestras muestras con barnices de roca tipo V. Es preciso

|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | Muestra / UCC |                |
|-----------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|---------------|----------------|
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | XXX           | + 50           |
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | XXX           | 10 - 50        |
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | XXX           | 1 - 10         |
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | XXX           | 0,5 - 1        |
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | XXX           | 0 - 0,5        |
|           |       |       |        |        |        |         |         |         |         |         |        |        |        |        | ND            | No determinado |
| Elementos | Hem   | Mag   | Ror    | P1     | V (1)  | V (2)   | IV      | III     | II      | I (1)   | I (2)  | I (3)  | I (4)  | I (5)  | Oceanic       |                |
| Li        | 3,620 | 5,600 | 0,450  | 3,870  | ND     | ND      | ND      | ND      | ND      | ND      | ND     | 9,375  | 2,870  | 5,000  | 0,070         |                |
| Fe        | 2,760 | 2,160 | 1,120  | 1,300  | 5,810  | 0,400   | 0,750   | 0,900   | 2,100   | 2,000   | 1,300  | 1,910  | 1,760  | 2,300  | 2,500         |                |
| V         | 2,650 | 2,892 | 0,210  | 1,460  | 3,000  | 0,430   | 0,880   | 0,800   | 2,500   | 2,000   | 2,800  | 5,800  | 4,100  | 5,270  | 11,000        |                |
| Pb        | 2,640 | 1,660 | 17,270 | 10,700 | 11,000 | 19,000  | 500,000 | 7,500   | 125,000 | 9,000   | 25,000 | 30,000 | 7,430  | 13,330 | 63,000        |                |
| Cr        | 2,320 | 2,470 | 0,076  | 1,900  | 0,350  | 0,200   | 0,700   | 0,550   | 0,300   | 1,250   | 1,800  | 6,020  | 9,230  | 15,280 | 22,700        |                |
| Cu        | 1,840 | 1,790 | 1,453  | 1,900  | 18,000 | 22,000  | 12,000  | 4,300   | 27,000  | 8,000   | 7,000  | 4,000  | 4,200  | 4,800  | 18,800        |                |
| Ga        | 1,390 | 1,290 | 0,560  | 0,930  | ND     | ND      | ND      | ND      | ND      | ND      | ND     | 1,940  | 1,700  | 2,500  | 0,720         |                |
| Zr        | 0,940 | 0,975 | 1,184  | 1,240  | 0,140  | 0,180   | 2,700   | 0,480   | 1,240   | 0,880   | 0,930  | 1,640  | 1,450  | 1,540  | 3,100         |                |
| Ti        | 0,790 | 0,800 | 0,060  | 0,623  | 0,280  | 0,100   | 0,380   | 0,550   | 1,000   | 1,500   | 1,200  | ND     | ND     | ND     | ND            |                |
| Ba        | 0,580 | 0,510 | 1,060  | 0,231  | 2,800  | 2,500   | 2,800   | 2,100   | 16,000  | 19,000  | 9,000  | 2,570  | 3,350  | 3,160  | 2,700         |                |
| Zn        | 0,520 | 1,110 | 0,260  | 1,340  | 17,000 | 25,000  | 75,000  | 9,000   | 19,000  | 38,000  | 6,500  | 3,310  | 3,260  | 3,830  | 8,700         |                |
| Al        | 0,338 | 0,500 | 0,074  | 0,070  | 0,300  | 0,180   | 0,580   | 0,380   | 1,000   | 1,300   | 1,200  | ND     | ND     | ND     | ND            |                |
| Mn        | 0,130 | 0,100 | 0,050  | 0,370  | 40,000 | 105,000 | 98,000  | 300,000 | 180,000 | 120,000 | 70,000 | 25,600 | 16,400 | 40,900 | 224,000       |                |
| Sr        | 0,047 | 0,051 | 0,035  | 0,030  | 0,850  | 1,120   | 1,700   | 1,100   | 1,500   | 1,800   | 1,500  | 1,640  | 1,340  | 1,110  | 4,250         |                |
| Ca        | 0,003 | 0,003 | 0,003  | 0,004  | 0,850  | 0,750   | 0,750   | 0,480   | 0,700   | 0,900   | 0,550  | ND     | ND     | ND     | ND            |                |
| Co        | ND    | ND    | 0,100  | 0,890  | 1,900  | 6,000   | 30,000  | 90,000  | 38,500  | 40,000  | 17,000 | 17,700 | 24,300 | 22,900 | 720,000       |                |
| Ni        | ND    | ND    | ND     | 1,612  | 1,810  | 17,000  | 6,000   | 13,000  | 4,000   | 10,000  | 11,000 | 5,850  | 9,330  | 12,300 | 211,000       |                |

Figura 26: Cociente de los valores de los elementos respecto del valor medio encontrado en la corteza continental superior, la UCC (datos para UCC de Rudnick and Fountain, 1995). Se muestra en cada celda, junto con el color, el valor del cociente obtenido. A la izquierda, el nombre en negrita de las muestras rocosas estudiadas. Referencias utilizadas para los cálculos en las muestras ambientales: barniz de roca tipo I [(1) y (2)]: Macholdt et al., 2015 (nombre de las muestras: MT e IS) y barniz de roca tipo I [(3), (4) y (5)]: Thiagarajan and Lee, 2004 (nombre de los datos de las muestras: BM, OF 14.5 y MC14); barniz de roca tipo II: Macholdt et al., 2017 (nombre de los datos de la muestra: AZ AC); barniz de roca tipo III: Macholdt et al., 2015 (nombre de los datos de la muestra: SA-1); barniz de roca tipo IV: Vicenzi et al., 2016 (nombre de los datos de la muestra: FM); barniz de roca tipo V [(1) y (2)]: Krinsley et al., 2012 (nombres de los datos de las muestras: R River y E Canal); Oceanic: datos procedentes de nódulos de manganeso del océano atlántico de Thiagarajan and Lee, 2004 (nombre de los datos de la muestra: Mi3). ■

indicar que tanto nuestras muestras como la de otros barnices de roca se sitúan muy distanciados de los nódulos de manganeso presentes en los fondos oceánicos, reflejándose en el PCA las diferencias en la formación de los nódulos respecto de los barnices de roca.

Tal y como se realiza en el trabajo de clasificación de barnices de roca de Macholdt et al., 2017, nuestras muestras se representaron utilizando distintos cocientes: Al/Ni vs. Mn/Ba por un lado (figura 28-A) y Mn/REY (elementos traza más itrio) vs. Mn/Ba (figura 28-B) por otro. Estos cocientes permiten diferenciar distintos tipos de barnices de roca, facilitando su clasificación, por lo que complementan los análisis realizados anteriormente (consultar la tabla 22 del apéndice C para una información detallada de los cocientes).



**Figura 27: Correlación de elementos principales por PCA de nuestras muestras de revestimientos de roca de Río Tinto con respecto a diferentes barnices de roca descritos en la literatura (las nomenclaturas son las mismas a las utilizadas en la figura 26). Las líneas verdes indican la tendencia que sigue cada elemento en los diferentes datos utilizados y qué elementos tienen mayor influencia en cada muestra ■**

La representación de los cocientes de las muestras del Origen no se pudieron realizar en el caso del Al/Ni vs. Mn/Ba (figura 28-A) al no haberse determinado la cantidad de Ni en el análisis por ICP-MS. Sin embargo, sí pudo representarse en el caso del Mn/REY vs. Mn/Ba, mostrando que quedan alejadas de los barnices de roca descritos por Macholdt et al., 2017.

Es interesante remarcar en la figura 28-B que las muestras de la zona del Origen quedan muy alejadas de las muestra de roca de Berrocal y de los análisis de barnices de roca de Macholdt et al., 2017, reflejando esta observación junto con las características observadas *de visu* en el campo, el análisis por SEM-EDX, la mineralogía, la composición de elementos, la abundancia de los elementos y la comparación del enriquecimiento o subenriquecimiento con respecto a la UCC y a barnices de roca en la literatura. Así, las muestras del Origen pueden considerarse como películas de hierro depositadas

sobre la superficie de las partículas rocosas, algo lógico teniendo en cuenta que es el punto de la cuenca de río Tinto donde existe mayor concentración de hierro (Amils et al., 2014), enmascarando al resto de elementos.

En cuanto a la muestra **P1**, las evidencias fisicoquímicas que se muestran indican que es diferente a la deposición observada en la zona del Origen y con valores que se asemejan a los encontrados en barnices de roca en la literatura (figura 28). También, como se ha comentado anteriormente (apartado 5.2.2), se observaron en el SEM evidencias de sedimentos dispuestos parcialmente en capas, con una textura diferente al resto de la roca. Estas estructuras en **P1** se asemejan a observaciones microscópicas de barnices de roca descritas en la literatura.

Es interesante observar el hecho de que los barnices de roca de tipo V queden clasificados por exclusión de los otros cuatro tipos de barnices según Macholdt et al., 2017. En su trabajo argumenta que debido a la gran influencia hídrica en este tipo de muestras, no quedan agrupados en una única área en las representaciones de los cocientes, pero poseen suficientes características químicas y morfológicas similares que las diferencian del resto de barnices, sugiriendo que la fuente del origen del barniz se encuentra en la composición química del agua circundante donde se ubican las muestras (Macholdt et al., 2017).

Dadas las características de extrema acidez del río Tinto, poco habituales de un sistema acuoso, **P1** puede representar un caso extremo de barniz tipo V. La influencia hidrológica de la cuenca del río y su acidez quedan reflejadas en la extremadamente baja concentración de elementos como Mn, Ca, Sr o Ba con respecto a la UCC y a los distintos barnices de roca descritos (figura 26, 27 y 28)

Al igual que otros barnices de roca de tipo V, su clasificación dentro del gráfico depende de la química que posee el barniz, sobre el cual las condiciones químicas del agua influyen en su composición, de ahí que no queden agrupados los barnices de roca tipo V en una única área.

El Mn oxidado es un elemento típico en barnices de roca, pero en condiciones ácidas se disuelve con mayor facilidad (Nijjer et al., 2000) lo que, dada la evidente menor cantidad de Mn en el sistema de estudio, puede llegar a dificultar la formación y detección de óxidos e hidróxidos de este tipo

En el caso de los elementos Ca, Sr y Ba, todos ellos pertenecientes al grupo de los alcalino-térreos y sus hidróxidos, las sales de hidróxidos de cationes de los elementos alcalinos y del ión amonio son solubles en agua, a diferencia de otros tipos de hidróxidos como el  $\text{Fe(OH)}_3$ , lo que puede explicar el porqué de la baja cantidad de estos elementos en **P1**. Aunque el Ba correlaciona negativamente con la muestra **P1**, el Ca, sin embargo, se correlaciona positivamente (figura 25), lo que podría deberse a la acción biológica aún bajo condiciones ácidas extremas, tal y como ya se ha demostrado en experimentos de laboratorio (Sánchez-Román et al., 2014).

No obstante, es interesante remarcar que en **P1Ext** se observa con respecto a **P1Int** una mayor cantidad del Mn, Ca o Ba (figura 17-B; apartado 5.1.2), cuyos valores en algunos casos son bastante llamativos lo que, junto con las observaciones del SEM (apartado 5.2.2.1), robustece la idea de una acumulación de este tipo de elementos sobre la superficie de la roca **P1**, reforzando su candidatura a barniz de roca dadas las características observadas y con al menos una indirecta influencia biológica en la presencia mayor de estos elementos en **P1Ext**.

---

(4) Valor de solubilidad del  $\text{Ba(OH)}_2 > \text{Sr(OH)}_2 > \text{Ca(OH)}_2$  en el agua a una presión de 1 atm entre 10°C y 40°C; <https://srdata.nist.gov/solubility/index.aspx>.

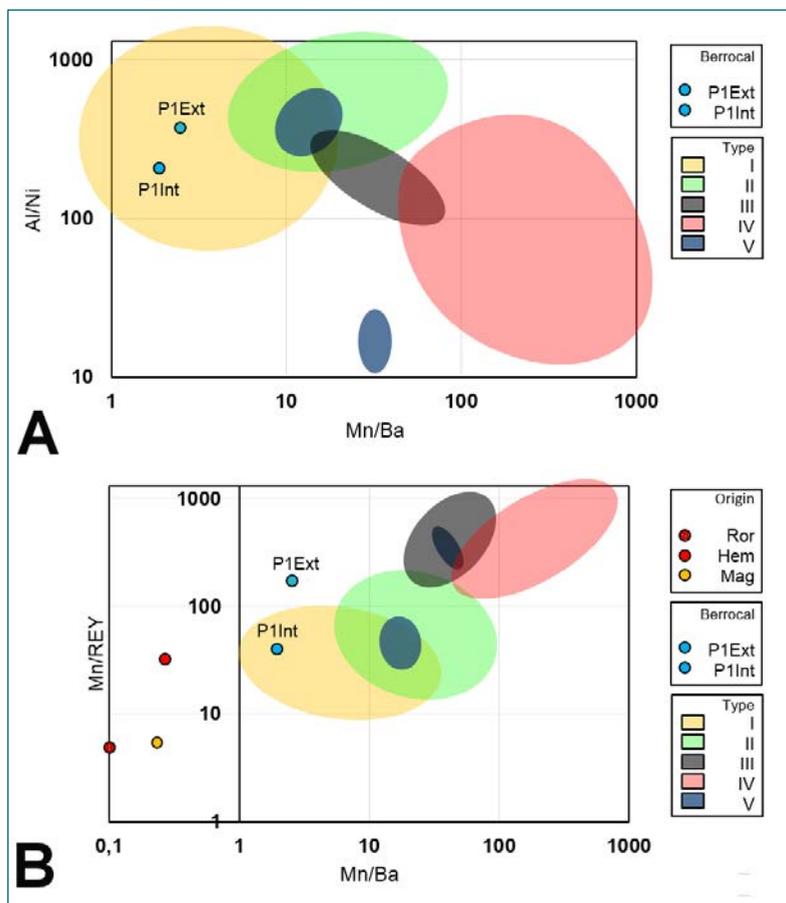


Figura 28: Representación de los cocientes Al/Ni vs. Mn/Ba (A) y Mn/REY vs. Mn/Ba (B) de las muestras rocosas (puntos de colores). Las áreas de colores representan las ubicaciones de los valores de muestras caracterizadas como barnices de roca tipo I (amarillo), II (verde), III (gris oscuro), IV (rosa) y V (azul), tal y como se especifica en Macholdt et al., 2017. Hay que tener en cuenta que los barnices de tipo V en la gráfica corresponden a dos tipos de muestras diferentes de barniz tipo V analizadas por estos investigadores. En A) las muestras rocosas de la zona del Origen no pudieron representarse al no disponer de la concentración de Ni. En la muestra de Berrocal, P1, se diferencia la parte externa (P1Ext) y la parte interna (P1Int) ya que se detectaron diferencias significativas en algunos elementos (para mayor información de estas diferencias, revisar la figura 17, apartado 5.1.2). Mientras que en A) ambas muestras se engloban dentro del barniz tipo I, en B) la muestra P1Ext queda fuera de todas las agrupaciones obtenidas por Macholdt et al., 2017. ■

Una posible explicación para las diferencias encontradas en los elementos comentados en el párrafo anterior podría ser que; la parte externa se haya depositado más recientemente y, por lo tanto, pueda tener mayor cantidad de los elementos que han podido depositarse al evaporarse el agua que moja la roca, aunque los lavados por el agua ácida del río al incidir sobre la roca pueden provocar que algunos elementos se eliminen si no están anclados a la matriz, lo que contrasta con los barnices de roca de los desiertos, con una clara tendencia a la acumulación de material debido a la falta de agua que pueda lixiviar los elementos presentes.

Otra explicación podría deberse a la actividad microbiana, que pudiera favorecer la deposición de dichos elementos, tal y como se ha comentado antes con el calcio (Sánchez-Román et al., 2014; Bohu et al., 2016), o bien que la presencia de microorganismos creciendo activamente pudiera favorecer de manera indirecta la deposición gracias a la adsorción de cationes en sus paredes y membranas celulares (Silhavy et al., 2010).

## 5.4. Análisis isotópicos

Dadas las características mineralógicas y de elementos químicos presentes en las diferentes muestras de roca, se decidió realizar un análisis isotópico tanto en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen (**Hem** y **Mag**) como en la muestra de roca **P1**, con el fin de detectar similitudes y diferencias en la cantidad de nitrógeno y carbono total presente en las mismas y determinar el impacto que pudiera tener la composición de las muestras en las posibles comunidades microbianas presentes en ellas o bien si estas comunidades pudieran influir en la química y mineralogía de las muestras (apartado 4.4).

Los datos isotópicos del  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  obtenidos de las muestras **Hem**, **Mag** y **P1** reflejan, por un lado, una clara diferencia entre las dos muestras del Origen respecto de **P1** (figura 29), algo que podría ser debido por la diferente localización de las muestras (Origen versus Berrocal), ya que son lugares con características fisicoquímicas muy diferentes (apartado 4.1). Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  /  $\delta^{12}\text{C}$  obtenidos (tabla 23, apéndice C) indican que puede tratarse la materia orgánica como un producto de deposición sedimentaria (Vitoria et al., 2004).

La relación C / N, en **Hem** es de 5,5 que es más de 2 veces superior a la relación calculado para **Mag** y **P1**, los cuales son mucho más similares entre sí (2,1 y 2,4 respectivamente). Situándose **P1** en una posición intermedia a las muestras del Origen, aunque más próximo al ratio calculado para **Mag** (figura 30 y tabla 23, apéndice C), lo que refleja una importante pérdida de nitrógeno en la muestra **Hem** ya que la mayor cantidad de materia orgánica presente en la muestra no va acompañada de un incremento proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en la misma, algo que es compatible con la idea de un cambio redox en la unidad litoestratigráfica (Godfrey and Falkowski, 2009), apoyando los análisis isotópicos y los resultados mineralógicos observados para estas muestras (apartado 5.1).

Como veremos más adelante, los resultados bioinformáticos de la inferencia metabólica realizada con el software Piphillin a partir de los datos de secuenciación también apoyan las observaciones comentadas sobre el N, con la desnitrificación como ruta metabólica principal en el metabolismo del nitrógeno, lo que podría explicar la pérdida de nitrógeno observado en **Hem** (apartado 5.6.3.2).

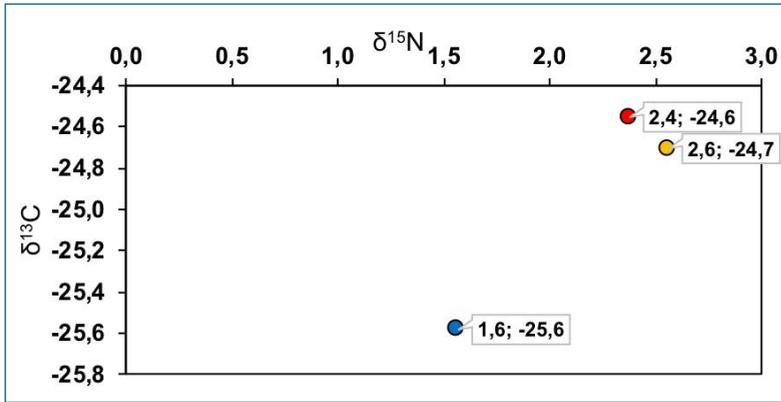


Figura 29: Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  (indicados en los recuadros de cada punto) de las muestras Hem (punto rojo), Mag (punto amarillo) y P1 (punto azul). ■

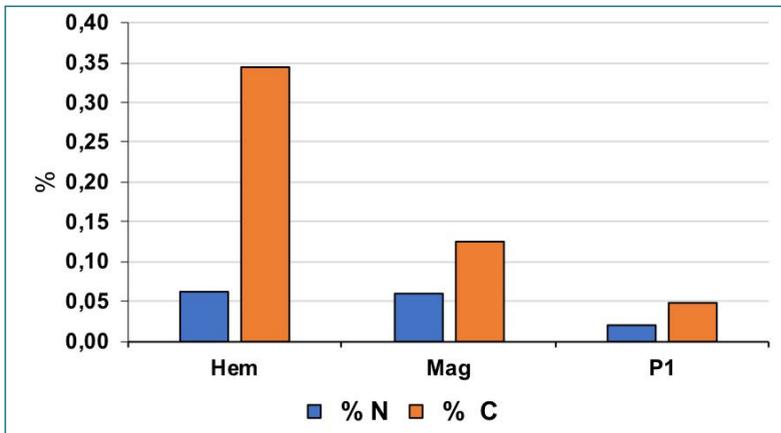


Figura 30: Abundancia total de N y C en las muestras Hem, Mag y P1. Se observa una gran cantidad de materia orgánica en Hem respecto Mag y P1; sin embargo, las muestras del Origen poseen una cantidad de nitrógeno mayor. ■

## 5.5. Extracción de ADN

Para estudiar la caracterización de la diversidad de las comunidades microbianas que puedan estar presentes en las muestras, se han aplicado distintas técnicas de extracción de ADN con el fin de seleccionar el método más eficiente (tabla 17)

Esta optimización es consecuencia de las dificultades intrínsecas para extraer ADN de muestras enriquecidas en hierro y metales pesados; la baja biomasa inherente a este tipo de muestras y la poca cantidad de material disponible de las muestras seleccionadas dada su naturaleza, lo que se convierte en un reto para obtener una cantidad de ADN suficiente y de calidad para una correcta amplificación y posterior secuenciación (Direito et al., 2012).

Se aplicaron cuatro metodologías diferentes utilizando las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen (**Hem** y **Mag**). Se decidió utilizar estas muestras ya que son similares a las muestras **Ror** y **P1** en mineralogía y composición elemental a diferencia de los sedimentos y, además, porque se dis-

ponía de una mayor cantidad de material, ya que en las muestras **Ror** y **P1** la extracción de material de los revestimientos sobre la roca no permitieron obtener más de 5 gramos de material en total, que debió ser dedicado no sólo a la caracterización biológica sino también a los análisis de XRD, ICP-MS e isótopos, lo que limitó severamente su utilización en pruebas de optimización.

| Métodos aplicados                    | Parámetros  | Hem      | Mag      |
|--------------------------------------|-------------|----------|----------|
| Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico  | [ADN] ng/ul | 0,28     | 0,18     |
|                                      | A260 / A280 | 1,01     | 1,03     |
|                                      | A260 / A230 | 0,36     | 0,36     |
| Tampón-XS                            | [ADN] ng/ul | 2,69 [1] | 1,71 [1] |
|                                      | A260 / A280 | 1,35     | 1,35     |
|                                      | A260 / A230 | 0,48     | 0,33     |
| PowerSoil DNA Isolation Kit          | [ADN] ng/ul | 12,20    | 1,57     |
|                                      | A260 / A280 | 1,94     | 0,56     |
|                                      | A260 / A230 | 0,55     | 0,53     |
| P/EtOH + PowerSoil DNA Isolation Kit | [ADN] ng/ul |          |          |
|                                      | A260 / A280 | [2]      | [2]      |
|                                      | A260 / A230 |          |          |

[1]: Se observó un color rojizo al final de la extracción, especialmente en Mag.

[2]: Se formaron precipitados durante el proceso de incubación con P/EtOH.

**Tabla 17: Resultados de las extracciones de DNA usando diferentes metodologías. ■**

En términos generales el PowerSoil DNA Isolation Kit generó resultados significativamente mejores respecto a las otras técnicas empleadas, como la modificación del protocolo PowerSoil DNA Isolation Kit de Direito et al., 2012, lo que refleja, de alguna manera, la gran dificultad en el tratamiento de estas muestras (tabla 17).

De hecho, para la muestra **Mag** con el fin de obtener ADN suficiente para amplificar y secuenciar, fue necesario realizar la extracción un total de tres veces utilizando hasta 1,5 gramos de muestra con el fin de obtener resultados fiables para la secuenciación Sanger, a diferencia de **Hem** que con 0,5 g de material fue suficiente, algo que puede estar en consonancia con la menor disponibilidad de material orgánico detectado en esta muestra en los análisis isotópicos (apartado 5.4).

Dados los resultados obtenidos (tabla 17), se consideró que el PowerSoil DNA Isolation Kit sin modificaciones era la mejor opción para utilizar en las muestras ambientales. En el caso de los cultivos, se obtuvo un buen resultado utilizando el método del tampón-XS. De hecho, en dos de las tres muestras de cultivos (DG + S° de **Hem** y **Mag**) que han podido ser satisfactoriamente secuenciadas, el ADN fueron extraídas con esta metodología.

## 5.6. Caracterización de la biodiversidad

Se aplicaron distintas técnicas para la caracterización de la biodiversidad de las muestras con el fin de obtener resultados complementarios que permitan identificar aquellos resultados apoyados por metodologías independientes (apartado 4.5). Las técnicas empleadas fueron, por un lado, la secuenciación de las muestras ambientales utilizando dos métodos de secuenciación diferentes: primeramente, Sanger (apartado 4.5.5); para los sedimentos del margen del río en Berrocal cuya diversidad ya es conocida por trabajos precedentes (Amils et al., 2014) y para las muestras **Ror**, **Hem** y **Mag** del Origen y, en segundo lugar, illumina (apartado 4.5.6) para las muestras consideradas más relevantes; las de la unidad litoestratigráfica del Origen (**Hem** y **Mag**) y la roca de Berrocal (**P1**), permitiendo además contrastar la información obtenida por secuenciación Sanger de las muestras **Hem** y **Mag**.

También se aplicó en las muestras **Berr**, **Hem**, **Mag** y **P1** la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, CARD-FISH, con el fin de identificar y cuantificar los microorganismos presentes en las muestras, evitando los problemas de autofluorescencia de los minerales. Igualmente, se obtuvieron cultivos de enriquecimiento con el fin de determinar los microorganismos capaces de desarrollarse en distintos medios, apoyando y ampliando los resultados de diversidad obtenidos a partir de la extracción y secuenciación del ADN de las muestras ambientales. Los microorganismos o grupos de microorganismos identificados, utilizando distintas metodologías, facilitan la selección de los elementos más importantes en el ecosistema, en nuestro caso, facilitando la comparación de las comunidades microbianas asociadas a los distintos tipos de roca analizados.

Combinando los diferentes resultados obtenidos, se han desarrollado diferentes modelos geomicrobiológicos de las muestras de roca con el fin de entender su papel en los distintos ciclos biogeoquímicos que se desarrollan en los revestimientos de roca en un ambiente ácido extremo como es la cuenca del Río Tinto (figura 60-64, apartado 6)

### 5.6.1. Secuenciación del ADN

Las muestras de ADN secuenciadas mediante el método de Sanger (**Berr**, **Ror**, **Hem** y **Mag**) fueron amplificadas mediante PCR específicas usando los cebadores 27F y 1492R para Bacteria y 3F y 1492R para las Achaeta. En las PCRs sólo se observó amplificación positiva con los cebadores de Bacteria. Posteriormente, se realizaron clonajes de los productos de PCR obtenidos y se secuenciaron los transformantes positivos, procediéndose a la identificación de los microorganismos clonados y a la realización de las oportunas curvas de rarefacción (apéndice F).

Con el fin de contrastar y obtener una información ecológica más completa de las comunidades microbianas de lo que puede aportar la secuenciación Sanger en las muestras **Hem** y **Mag** y sobre la limitada cantidad obtenida de la muestra de roca **P1**, se aplicó el método de secuenciación Illumina Mi-Seq. La selección de estas muestras para la secuenciación masiva se debió a que se consideraron las más interesantes a analizar por ser una unidad litoestratigráfica: **Hem** y **Mag**, que nos permitiría estudiar los cambios de composición microbiana en la superficie de las rocas a lo largo del tiempo y **P1**, por ser su deposición sobre la roca un revestimiento muy diferente a las muestras del Origen.

Los cultivos de enriquecimiento desarrollados (apartado 4.5.8) también fueron secuenciados con Illumina Mi-Seq para su posterior análisis y comparación, excepto el cultivo DG de P1 que se secuenció por Sanger (apartado 5.6.1.3.3).

Previo a su secuenciación por Illumina Mi-Seq, las muestras fueron analizadas por qPCR (figur 31-32) con el fin de asegurar que los resultados de secuenciación fueran fiables y de utilidad para el recuento de abundancias (apartado 4.5.3). Es por ello que se incluyó un control negativo para contrastarlo con las muestras y eliminar los sesgos debido a la presencia de ADN contaminante en las muestras.

En el control negativo utilizado para las muestras ambientales, más del 80% de las lecturas de la secuenciación se clasificaron como  $\gamma$ -Proteobacteria, perteneciendo a los géneros bacterianos *Escherichia-Shigella*, *Enhydrobacter* y *Pseudomonas*.

En el caso de los cultivos de enriquecimiento, el control negativo fue muy similar al control negativo de las muestras ambientales, con más de la mitad de las secuencias identificadas como  $\gamma$ -Proteobacteria (Pseudomonadales, Oceanospirillales, Enterobacteriales) y como miembros de la familia de las Corynebacteriales Sphingomonadales y Lactobacillales.

Se pudo comprobar que los triplicados de las qPCR de las muestras ambientales generaron una amplificación mayor que el triplicado del control negativo (figura 31). La curva de amplificación de P1 reflejó un valor aproximado de  $10^4$  copias de ARNr, en Hem un valor de  $10^5$  y en Mag reflejó un valor entre  $10^2$  y  $10^3$  copias de ARNr 16S por  $\mu\text{l}$  de acuerdo a los estándares de las qPCR utilizadas en el laboratorio en el que se realizaron las secuenciaciones (apéndice, apartado E).

En el caso de los cultivos de enriquecimiento solo se pudieron analizar tres muestras: Hem y Mag DG + S<sup>+</sup>, cuyas extracciones se realizaron con el tampón-XS y Berr Fe<sup>+2</sup> + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, cuya extracción de ADN se realizó con el kit de PowerSoil. Estas muestras pasaron el escrutinio de la qPCR (figura 32)

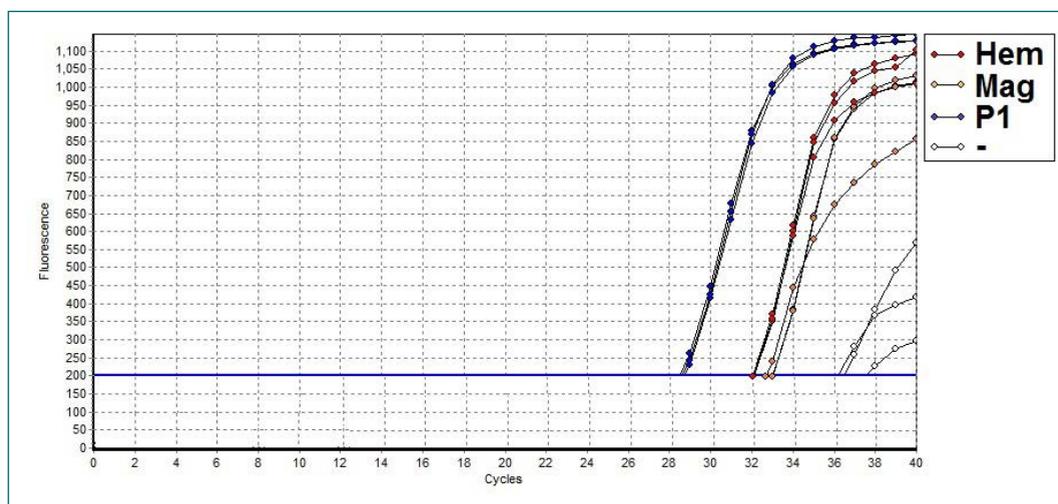


Figura 31: qPCR que muestra la amplificación revelada por fluorescencia de las muestras ambientales versus número de ciclos realizados. En rojo, Hem; en amarillo, Mag; en azul, P1; en blanco, control negativo. La línea azul horizontal determina dónde el programa considera que comienza la amplificación exponencial de las muestras ■

y el resultado de la secuenciación se consideró satisfactorio con respecto a la comparación con los resultados obtenidos en el control negativo.

Se obtuvieron en torno a  $3 \cdot 10^6$  de lecturas para cada una de las secuenciaciones Illumina para **Hem**, **Mag** y **P1**. Tras pasar los filtros bioinformáticos de calidad, quedaron un 32,7% de lecturas en **Hem** y un 14,7% en **Mag**, que fueron procesados por QIIME para obtener la afiliación taxonómica de cada lectura y contrastarlo con la secuenciación del control negativo con el fin de eliminar las lecturas presentes en éste (99 875 lecturas en **Hem** y 48 992 lecturas en **Mag**). En el caso de **P1**, se obtuvieron un 7,5% de lecturas tras pasar los diferentes filtros bioinformáticos de calidad y se obtuvo, posteriormente, la afiliación taxonómica de cada secuencia (18 468 lecturas en total). Para una mayor información de los datos brutos de secuenciación, consultar el apartado G del apéndice.

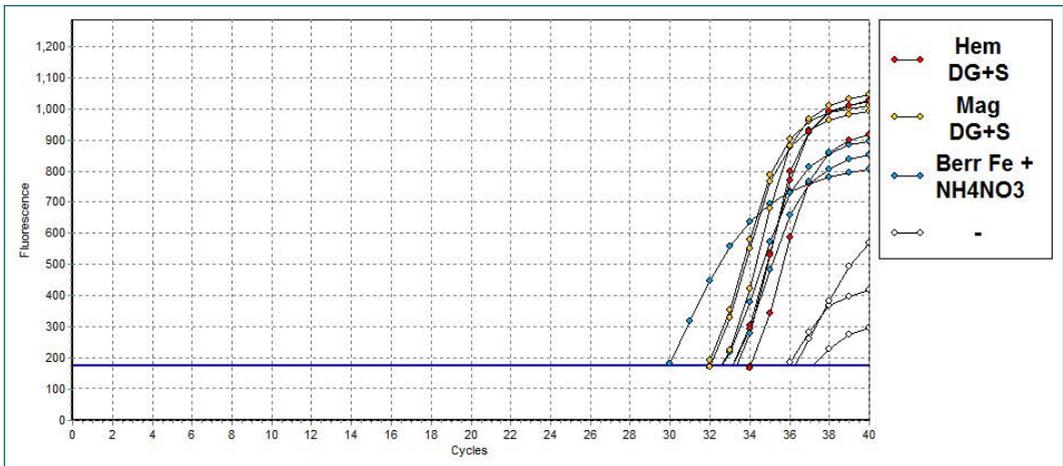


Figura 32: qPCR que muestra la amplificación revelada por fluorescencia de los cultivos de enriquecimiento versus el número de ciclos realizado. En rojo, cultivo DG + S0 Hem; en amarillo, En rojo, cultivo DG + S0 Mag; en azul, cultivo Fe+2 + NH4NO3 Berr; en blanco, control negativo. La línea azul horizontal determina dónde el programa considera que la amplificación exponencial comienza en las muestras ■

### 5.6.1.1. Zona Origen. Hem, Mag y Ror

#### 5.6.1.1.1. Muestra Hem

La secuenciación por Sanger reveló en **Hem** un total de 39 secuencias correctamente ensambladas. Las secuencias identificadas en **Hem** reflejan una diversidad de microorganismos mayor que la muestra **Mag** (apartado 5.6.1.1.2), entre las que destacaron secuencias de Actinobacteria (similares algunas de ellas en un 90-92% a *Aciditerrimonas*), Chloroflexi y Acidobacteria (secuencias similares a géneros como *Edaphobacter*, *Bryocella* y otras no clasificadas más allá del phylum), comunes en ambientes de suelos y rocas, entre ellas, los barnices de roca y las películas de hierro (Northup et al., 2003; Kuhlman et al., 2008; Marnocha et al., 2014). También, se han detectado algunas secuencias pertenecientes

a  $\alpha$ -Proteobacterias (*Acidiphilium* sp.),  $\beta$ -Proteobacterias (secuencias similares en un 92-93% a los géneros *Ralstonia* y *Pseudomonas*) y una secuencia del phylum Planctomycetes (HEM30; figura 73, apéndice H; *Nostocoida*, JQ067914). Además, una secuencia desconocida (HEM39; figura 73; apéndice H) que ya había sido previamente identificada en trabajos anteriores en Río Tinto (HM745453, González-Toril et al., 2011) y cuya búsqueda con RDP indica que se asemeja al phylum Firmicutes.

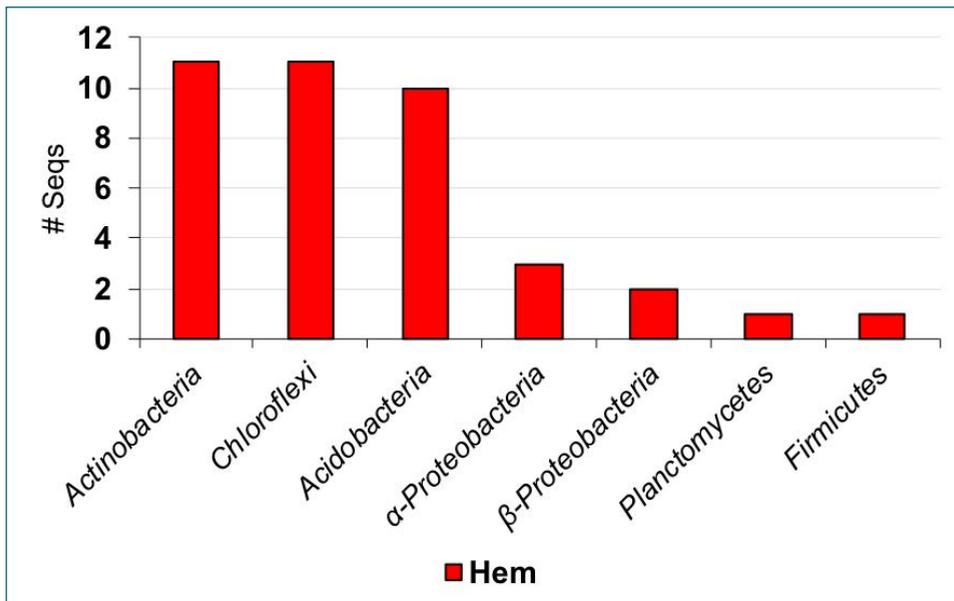


Figura 33: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en Hem ■

Es de interés remarcar que se han podido distinguir dos clases de secuencias diferentes en **Hem** dentro del phylum Chloroflexi, con una abundancia similar, lo que se pudo contrastar con el árbol filogenético de las secuencias mostrado en la figura 73, apéndice H (HEM1-11; HEM1-6 por un lado y HEM7-11 por otro lado) y en la figura 38, apartado 5.6.1.1.2, en la que se muestra el árbol filogenético obtenido con estas secuencias y con las secuencias de Chloroflexi identificadas mediante secuenciación Illumina en **Hem** y en **Mag** con el fin de comprobar la relación entre las mismas. La búsqueda por Blastn de los dos tipos de secuencias identificadas por Sanger reflejó que ambas eran similares a la clase Ktedonobacteria, aunque con menos de un 90% de identidad, un linaje caracterizado por corresponder a microorganismos heterótrofos filamentosos y formadores de esporas en suelos (Cavaletti et al., 2006; Yokota, 2012).

Todas las secuencias Sanger obtenidas para la muestra **Hem** se agruparon en un árbol filogenético (figura 73, apéndice H y tabla 27, apéndice J) con el objetivo de corroborar los resultados del Blastn así como las relaciones de las diferentes secuencias identificadas por Sanger (10 OTUs en total), utilizando la base de datos del NCBI. La curva de rarefacción de la secuenciación Sanger de la muestra se puede consultar en la figura 67, apéndice F

En la secuenciación Illumina Mi-Seq en **Hem** se obtuvieron un total de 99 875 lecturas que pasaron los filtros de calidad y el escrutinio del control negativo. La curva de rarefacción de la secuenciación Illumina de la muestra se puede consultar en la figura 70, apéndice F

Las secuencias identificadas revelaron una gran abundancia de los phyla Actinobacteria [30,05%], con diferentes miembros del orden de las Frankiales [6,15%], como *Acidothermus* [4,06%] y del orden Acidimicrobiales [0,53%]; miembros de la familia Sporichthyaceae [0,83%], Geodermatophilaceae (*Modestobacter* [0,002%]), orden Micrococcales [1,66%], Propionibacteriales (*Aeromicrobium* [0,44%]); Takashi AC-B11 [0,44%] y miembros de la familia de las Solirubrobacterales [2,66%], como *Conexibacter* [0,73%] o géneros como *Actinospica* [17,74%]. También, el phylum Bacteroidetes [26,30%], con el orden Flavobacteriales [11,31%], con microorganismos del género *Flavobacterium* [8,33%] y *Fluviicola* [2,98%]; así como el orden de los Sphingobacteriales [8,30%] con *Sedimentibacterium* [6,95%] o el grupo marino "NS11-12" [0,66%] y el orden de las Cytophagales [5,66%], con los géneros *Pseudarciella* [3,77%], *Cytophaga* [1%] y *Arcicella* [0,86%]. También,  $\alpha$ -Proteobacteria [10,36%], entre los que destacan el orden de los Rhizobiales [5,51%], con géneros como *Bradyrhizobium* [1,43%], *Mesorhizobium* [0,13%], *Nitrobacter* [0,08%] y *Ochrobactrum* [0,07%]. Además, géneros como *Acidiphilium* ([2,37%], perteneciente al orden Rhodospirillales [2,71%]), *Sphingomonas* [0,81%] o *Sphingopyxis* [0,38%] (pertenecientes al orden Sphingomonadales [1,87%]) y el orden Caulobacteriales [0,20%] con los géneros *Asticcacaulis* [0,12%] y *Caulobacter* [0,08%]. Igualmente, en las  $\beta$ -Proteobacteria [17,03%], con el orden Burkholderiales [5,90%] con miembros como *Polynucleobacter* [1,01%], *Acidovorax* [0,58%], *Herbaspirillum* [0,19%], *Rhizobacter* [0,16%], *Delftia* [0,04%], *Ralstonia* [0,03%], *Undibacterium* [0,03%], *Tepidimonas* [0,02%] y *Hermiinimonas* [0,002%] y el orden de los Methylophilales [10,68%] y de los Nitrosomonadales [*Nitrosomonas*; 0,17%]. De igual modo, miembros de  $\gamma$ -Proteobacteria, en las que destacan los géneros *Acinetobacter* [0,19%] y *Azotobacter* [0,003%] (orden Pseudomonadales; 0,19%), el género *Metallibacterium* [1,08%], del orden Xantomonadales [1,73%] y algunas lecturas pertenecientes al género *Gilliamella* (orden Orbales; 0,65%). Y por último, los phyla Chloroflexi [4,31%] y Acidobacteria [2,33%], componiendo estos microorganismos entorno al 85% de la diversidad observada en la muestra.

Se identificaron, aunque en muy baja cantidad, secuencias de diferentes miembros de las CPR, un grupo filogenético (superphylum) recientemente propuesto para que se denomine Patescibacteria (Hug et al., 2016; Parks et al., 2018) pero que, en conjunto, conformaron un nada despreciable 1,7% del total de lecturas identificadas en las que se incluyen las Parcubacteria [1,25%], Microgenomates [0,27%], Peregrinibacteria [0,15%], Berkelbacteria [0,01%], Gracilibacteria [0,01%] y Saccharibacteria [0,01%].

También, se observaron secuencias pertenecientes a las  $\delta$ -Proteobacteria [1,85%], a Firmicutes [0,42%] (con miembros pertenecientes a los órdenes Bacillales [0,37%] y Clostridiales [0,03%]), Microgenomates [0,27%], Gemmatimonadetes [0,21%], Planctomycetes [0,17%], Verrucomicrobia [0,10%] y Archaea (Euryarchaeota [0,73%]) (figura 34), junto con un total de 3,71% del total de lecturas de la muestra **Hem** distribuidas en 17 secuencias que no pudieron ser inicialmente clasificadas por QIIME

Aunque el análisis por CARD-FISH de la muestra **Hem** reveló una señal positiva con la sonda específica de Cyanobacteria, dado que no se obtuvo ningún tipo de amplificación utilizando una PCR específica y la única secuencia identificada inicialmente como Cyanobacteria resultó estar próxima filogenéticamente a secuencias de Actinobacterias, esta secuencia compuesta por 2 lecturas fue eliminada de los análisis de cálculo de abundancias.

Durante el procesado manual de los datos de secuenciación, se observaron un total de 417 lecturas del phyla Fusobacteria correspondiendo a un 0,4% de las secuencias de esta muestra. Este phyla no se observó en el control negativo de la secuenciación, pero fue eliminado del análisis al tratarse de un grupo de microorganismos descritos como presentes en el tracto intestinal de animales y como contaminante común de PCRs (Bennett and Eley, 1993; Salter et al., 2014).

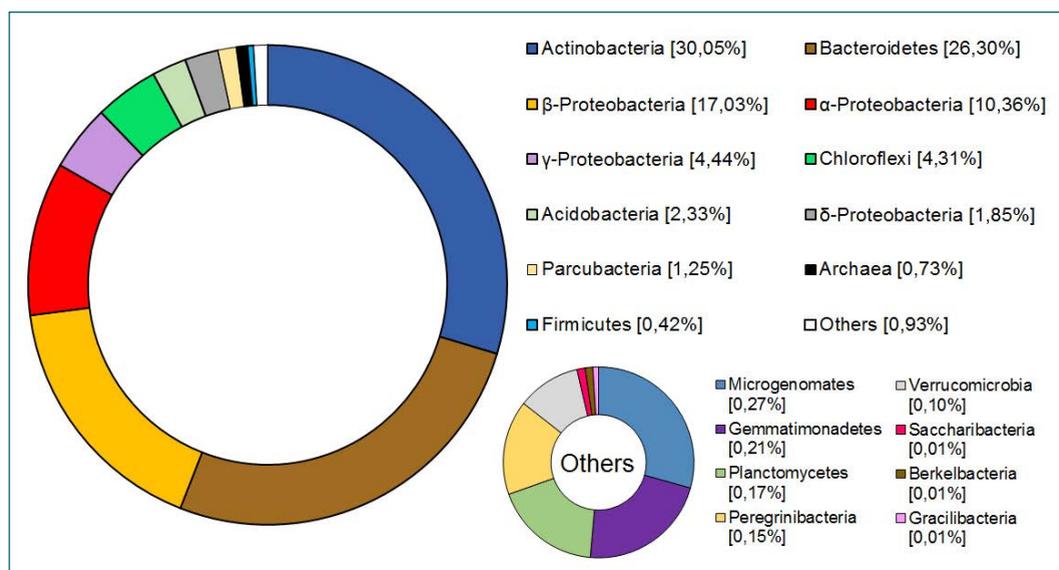


Figura 34: Abundancias relativas de diferentes phyla y clases en la muestra Hem obtenido mediante la secuenciación por Illumina. ■

Para averiguar la identificación más probable de las 17 secuencias no clasificadas por QIIME, se realizó un árbol filogenético mediante inferencia bayesiana con el fin de explorar el conjunto de árboles más probable de agrupar estas secuencias, junto con una búsqueda exhaustiva de cada secuencia utilizando las herramientas Blastn y RDP Seqmatch con el fin de darles una categorización taxonómica apropiada para realizar un cálculo adecuado de las abundancias relativas de cada grupo microbiano (figura 35 y tabla 28, apéndice J)

El análisis reveló que un 35% de las secuencias fueron identificadas como Parcubacteria y otro 35% como Proteobacteria, clasificadas en diferentes clases (excepto una de ellas que no pudo ser identificada con la suficiente rigor). El resto de secuencias se identificaron como Actinobacteria, Planctomycetes, Cyanobacteria y Euryarchaea.

A nivel general habría que destacar una mayor diversidad en la muestra Hem que en las muestras Mag y P1, tanto a nivel taxonómico como metabólico. Entre ellos, una gran presencia de Acidobacteria, Acidimicrobiales (conocidos en taxonomía por ser oxidadores de hierro; Stackebrandt et al., 1997), *Acidiphillium* (San Martin-Uriz et al., 2011) o *Acidovorax* (Chakraborty et al., 2011), también

oxidadores de hierro; Frankiales o Rhizobiales (fijadores de nitrógeno), y numerosos heterótrofos (Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, *Acinetobacter*, *Metallibacterium*...).

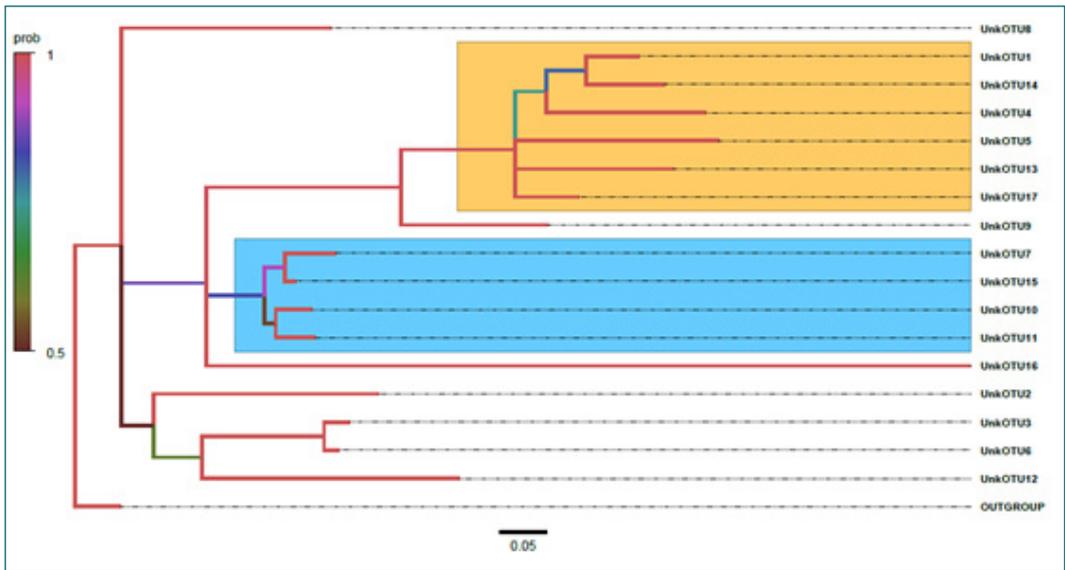


Figura 35: Análisis bayesiano de las secuencias desconocidas identificadas por Illumina en Hem. En azul las identificadas como Actinobacterias, en marrón las identificadas como Parcubacteria. Modelo de sustitución - cleotídica GTR+ $\lambda$  ( $\lambda = 0,460$ ); Log-likelihood= -2667,0830; f(A)= 0,2821; f(T)= 0,2243; f(C)=0,1894; f(G)= 0,3042. Como outgroup se utilizó una secuencia 16S de *Escherichia coli* (Van de Peer et al., 1996). ■

Para finalizar con los datos de secuenciación de la muestra **Hem**, habría que hacer una mención especial a las bacterias CPR (Patescibacteria), un nuevo superphylum del árbol de la vida recientemente propuesto (Parks et al., 2018) y cuyos análisis metagenómicos revelan un posible estilo de vida simbiótico, muchos de ellos implicados en la degradación de compuestos orgánicos y algunos como las Parcubacteria, con capacidad potencial de reducción del nitrato (Castelle et al., 2018; Leon-Zayas et al., 2017).

Un total de 6 taxones CPR en la secuenciación por Illumina fueron identificados: Berkelbacteria, Gracilibacteria, Microgenomates, Parcubacteria, Peregrinibacteria y Saccharibacteria, estando exclusivamente presentes en la muestra **Hem**, excepto Saccharibacteria, que también se encontró en la secuenciación masiva de **P1** y Parcubacteria en el cultivo de enriquecimiento de **Mag**. Su abundancia, del 1,7%, permite pensar que tengan un papel importante en simbiosis metabólicas dadas las características de la comunidad en **Hem** con abundancia de degradadores de materia orgánica.

### 5.6.1.1.2. Muestra Mag

La secuenciación por Sanger sólo permitió obtener en la primera extracción de ADN realizada en **Mag** (denominada **Mag-1**) un total de 8 secuencias ensambladas (figura 36)

La identificación de las secuencias en **Mag-1** reveló que algunas pertenecen a *Streptococcus* y *Enterobacter* (MAG8 y MAG49-50; figura 75, apéndice H), microorganismos que son contaminantes comunes de la amplificación por PCR (Salter et al., 2014). Así que dada la poca fiabilidad y bajo número de lecturas obtenidas en esta primera extracción, se procedió a una nueva extracción de ADN, amplificación y clonaje, permitiendo obtener un mayor número de lecturas, principalmente del phylum Firmicutes (**Mag-2**). Para despejar cualquier tipo de duda sobre las secuencias y la calidad del ADN obtenido, se realizó una nueva extracción de ADN, amplificación y clonaje (**Mag-3**), obteniéndose en este caso un gran número de secuencias (> 40, figura 36). Las secuencias sospechosas de contaminación fueron excluidas para el posterior cálculo de abundancias relativas de cada OTU.

El análisis del Ji-cuadrado no reveló que la 2ª y 3ª extracción de la muestra **Mag** fueran significativamente diferentes (p-valor= 0,3075). Las curvas de rarefacción (figura 67, apéndice F) y la comparación de secuencias y OTUs entre **Hem** y **Mag** reflejan que la diversidad en **Mag** es menor que en **Hem**, por lo que estas diferencias podrían deberse a un mayor secuestro del ADN por parte de los minerales presentes en la muestra **Mag**. Sin embargo, el hecho de encontrar mayores dificultades en la extracción de ADN, amplificación y clonaje en la muestra **Mag** con respecto a **Hem** podría estar relacionado con una menor cantidad de biomasa en **Mag**, tal y como muestran los resultados isotópicos (apartado 5.4).

La mayoría de secuencias identificadas pertenecen al *phylum Firmicutes* (*Bacillus*, *Paenibacillus*). El segundo *phylum* más abundante fueron las Actinobacterias (*Aciditerrimonas*, *Ferrimicrobium* y otras que no pudieron clasificarse más allá del nivel de *Phylum*) y algunas secuencias de  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -Proteobacterias, correspondientes a los géneros *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Ralstonia* y *Enhydrobacter-Moraxella*, siendo estas últimas pertenecientes a la misma familia que *Acinetobacter* (Moraxellaceae) y que fueron abundantes en la secuenciación por Illumina.

Las secuencias de **Mag** fueron agrupadas en un árbol filogenético con el objetivo de corroborar los resultados del Blastn y las relaciones de las diferentes secuencias de cada OTU encontrado por Sanger, utilizando las secuencias de la base de datos del NCBI. Dada las dificultades de ensamblar muchas de las secuencias obtenidas en las secuenciaciones Sanger de **Mag** con su correspondiente lectura reversa, se procedió a obtener dos árboles para confirmar los resultados del Blastn y comparar la agrupación de las lecturas, uno para las lecturas en una dirección y otro árbol filogenético con las lecturas reversas, e incluyendo en ambos árboles filogenéticos realizados las lecturas que sí fueron correctamente ensambladas por Pregap4/Gap4 (figura 74-75, apéndice H)

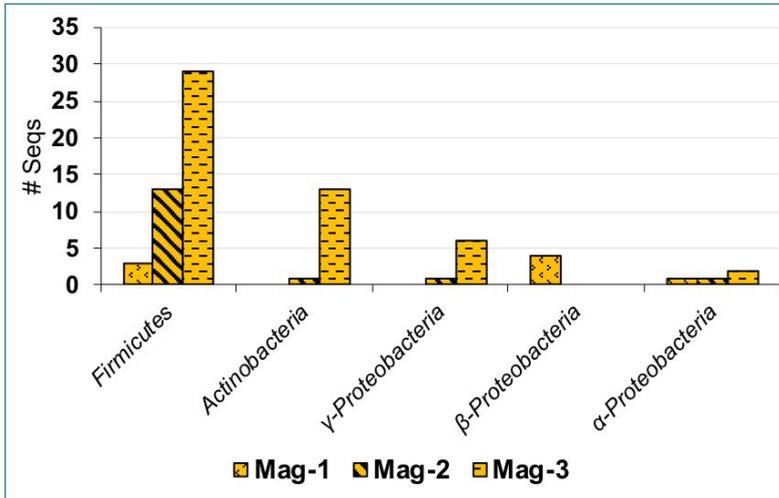


Figura 36: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en la muestra Mag (Mag-1, Mag-2 y Mag-3: 1ª, 2ª y 3ª extracción realizadas). ■

Con una menor diversidad observada en la muestra **Mag** con respecto a **Hem** o **P1**, los principales grupos microbianos identificados en las 48 992 lecturas de secuenciación Illumina Mi-Seq que pasaron los diferentes filtros bioinformáticos y del control negativo fueron (en orden de mayor a menor abundancia relativa): el *phylum* Actinobacteria [27,20%], con miembros de las Acidimicrobiales [21,72%], Micrococcales [2,62] y Frankiales [2,48%] y el dominio Archaea [20,88%] (género *Thermoplasma* [20,78%] y microorganismos del orden de los Methanosarcinales, como *Methanomethylovorans* [0,10%]). También, el *phylum* Firmicutes [16,21%] (orden Bacillales [4,08%]; el *Bacillus* [3,97%], *Staphylococcus* [0,11%] y orden Clostridiales [12,13%] con géneros, como *Clostridium* [3,75%], *Peptoniphilus* [2,85%], *Anaerococcus* [2,52%], *Paraclostridium* [1,45%], *Sulfobacillus* [1,30%] y *Fonticella* [0,19%]). Además, encontramos las proteobacterianas ( $\alpha$  [8,33%],  $\beta$  [2,56%],  $\lambda$  [16,16%]), destacando géneros del orden Rhizobiales [2,65%] como *Methylobacterium* [2,03%] y *Ochrobactrum* [0,36%]. Por otro lado, en el orden Rhodospirillales [5,67%] con géneros como *Roseomonas* [5,16%] y *Skermanella* [0,51%]. En  $\alpha$ -Proteobacteria; *Herbaspirillum* [1,52%], *Ralstonia* [0,12%], *Delftia* [0,07%], *Tepidimonas* [0,05%], *Undibacterium* [0,01%] o *Acidovorax* [0,01%] y en  $\beta$ -Proteobacteria (todas del orden Burkholderiales [2,56%]). En las  $\gamma$ -Proteobacteria: *Acinetobacter* [14,29%] y *Enhydrobacter* [0,025%] (orden Pseudomonadales [14,31%]); *Photobacterium* ([1,50%]; algunos capaces de ser bioluminiscentes, simbiontes de otros microorganismos y degradadores de carbohidratos complejos; Vezzi et al., 2005) y *Actinobacillus* [0,33%]. Igualmente, encontramos Chloroflexi [4,58%] y Bacteroidetes [4,08] (destacando el género *Capnocytophaga* [3,09%], encontrado en suelos glaciares (Li Yang et al., 2016), situándose todos estos *phyla* microbianos con al menos un 2% de abundancia relativa en la muestra (figura 37). Para obtener una mayor información acerca de la curva de rarefacción y la secuenciación masiva de esta muestra, ver la figura 71 del apéndice F y la tabla 25 del apéndice G respectivamente.

Durante el procesamiento de la muestra **Mag** se observaron un total de 2 399 lecturas clasificada por la herramienta QIIME como Cyanobacteria / Chloroplast, representando un 4,67% del total de

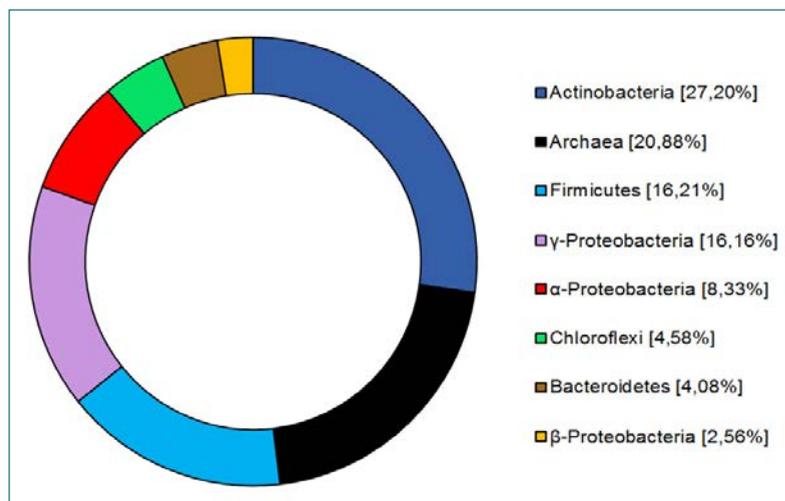


Figura 37: Abundancias relativas de diferentes Phyla y clases en la muestra Mag obtenidas mediante la secuenciación por Illumina. ■

las lecturas de la muestra. Dado que la PCR específica para Cyanobacteria no obtuvo amplificación y además la hibridación no reveló ninguna señal positiva de Cyanobacteria, se procedió a eliminar este resultado de los análisis. A diferencia de la muestra **Hem** y de la muestra **P1**, no se observaron secuencias sin identificar por QIIME

Como ya se ha comentado en el apartado 5.6.1.1.1, se pudieron distinguir dos clases de secuencias en **Hem** por Sanger con una abundancia análoga para ambas lecturas y similares a Ktedonobacteria, aunque con menos del 90% de identidad. Para contrastar si las secuencias obtenidas por Illumina de **Hem** y **Mag** y las secuencias Sanger de **Hem** corresponden a las mismas secuencias de microorganismos, se procedió a la construcción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud con el fin de evidenciar las relaciones que presentan (figura 38)

Este análisis reveló la existencia de algunas secuencias con gran similitud a las obtenidas en **Hem** procedentes tanto por secuenciación Sanger como por Illumina, no sólo confirmando los dos tipos de secuencias de Chloroflexi observados por Sanger, sino que además se pudieron identificar 4 grupos claramente diferenciados filogenéticamente. Todas estas secuencias, a su vez, difirieron de las secuencias generadas en la muestra **Mag** por Illumina. Aunque la abundancia relativa de Chloroflexi en la secuenciación masiva en **Hem** y **Mag** fue similar (entorno al 4%), existe claramente una mayor diversidad de secuencias Chloroflexi en **Hem** que en **Mag**, algo que puede ser compatible con las observaciones generalizadas de las secuenciones entre las dos muestras.

Entre los microorganismos identificados en **Mag**, cabría destacar la gran cantidad de microorganismos heterótrofos encontrados (*Thermoplasma*, *Bacillus*, *Sulfobacillus*, *Clostridium*, *Methylobacterium*, *Acinetobacter*), microorganismos fijadores de nitrógeno (en mayor abundancia que en **Hem**), microorganismos con capacidad de oxidar y/o reducir azufre como el género *Sulfobacillus* (Justice et al., 2014), el género *Clostridium*, la familia de las Pepto(strepto)cocacceae (Castro et al., 2000; Petzsch et al., 2015) y metales pesados, de los cuales destaca el hierro (el *phylum* Actinobacteria, cuya mayoría de secuencias son de la clase Acidimicrobiales han sido descritos como oxidadores de hierro

[Stackebrandt et al., 1997], así como géneros microbianos como *Ferroplasma* -Archaea-, *Ralstonia*, *Acinetobacter* o *Roseomonas*)<sup>5</sup> que indican de manera significativa que hay un fuerte acople metabólico del ciclo del azufre y, sobre todo, del ciclo del hierro con el ciclo del carbono en el ecosistema y con dependencia de otros microorganismos, lo que se traduciría con el paso del tiempo en la oxidación de la magnetita a hematita debido a la oxidación de Fe, tal y como observamos en la unidad litoestratigráfica (apartado 5.1.1)

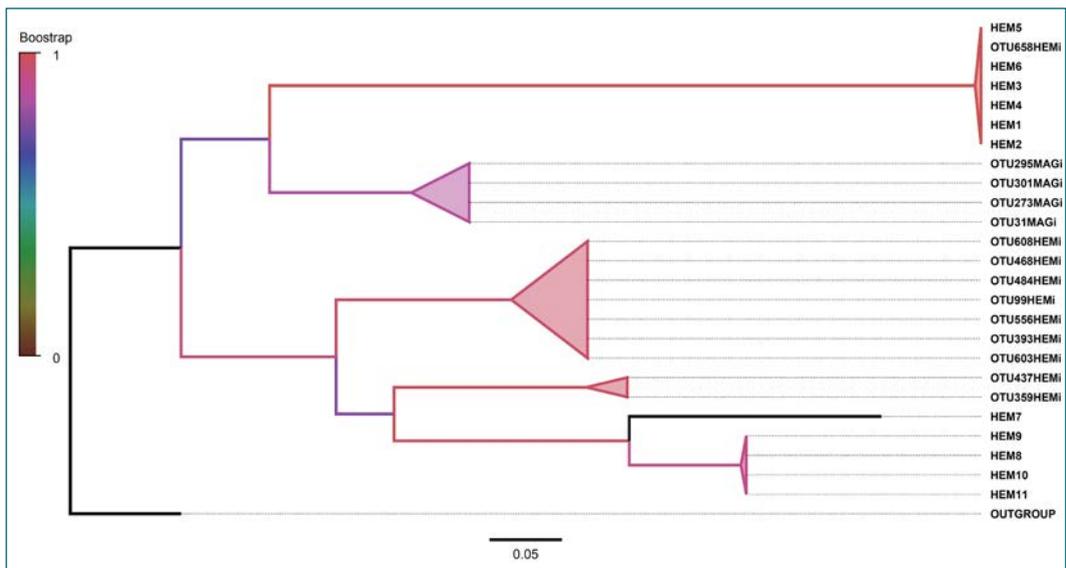


Figura 38: Árbol filogenético por máxima verosimilitud de las secuencias identificadas como Chloroflexi Hem y Mag por Sanger (denominadas HEM) como por Illumina (denominadas OTUHEM u OTUMAG en función de la muestra de la que proceden y con una i al final del nombre). Se puede observar que las secuencias enco - tradas en Mag forman dos grupos bien diferenciados del resto de las secuencias que han sido identificadas en Hem. En Hem, teniendo en cuenta los datos de Sanger e Illumina se observan 4 grupos claramente diferenciados. Topología: NNI; árbol inicial: BioNJ; modelo de sustitución nucleotídica GTR+ $\lambda$ +I ( $\lambda$  =1,860; I=0,317); Log-likelihood= -1780,30635; f(A)= 0,22192; f(T)= 0,15849; f(C)=0,22961; f(G)= 0,38999. Como outgroup se utilizó una secuencia 16S de *Escherichia coli* (Van de Peer et al., 1996). ■

### 5.6.1.1.3. Muestra Ror

En cuanto a la muestra de roca **Ror**, en un primer análisis (**Ror-1**) se obtuvieron por Sanger un total de 15 secuencias ensambladas de 96 (figura 39). Dado el bajo número de lecturas obtenidas, se procedió a una nueva extracción en la que se obtuvieron un total de 71 secuencias (**Ror-2**, figura 39). Las se-

(5) Microorganismos como *Acinetobacter* o *Roseomonas* son capaces de oxidar / reducir ciertos metales pesados como Mn o As (Boswell et al., 2001; Bagade et al., 2016).

cuencias identificadas como Chloroflexi correspondieron a dos tipos diferentes, igual a lo encontrado en la secuenciación de **Hem**. También, se identificaron dos tipos de lecturas de Chlorophyta en los análisis por Blastn.

La revisión de todas las lecturas reveló una secuencia identificada como *Streptococcus salivarius* (Ror71; figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J) por lo que fue eliminada para los posteriores cálculos de abundancia.

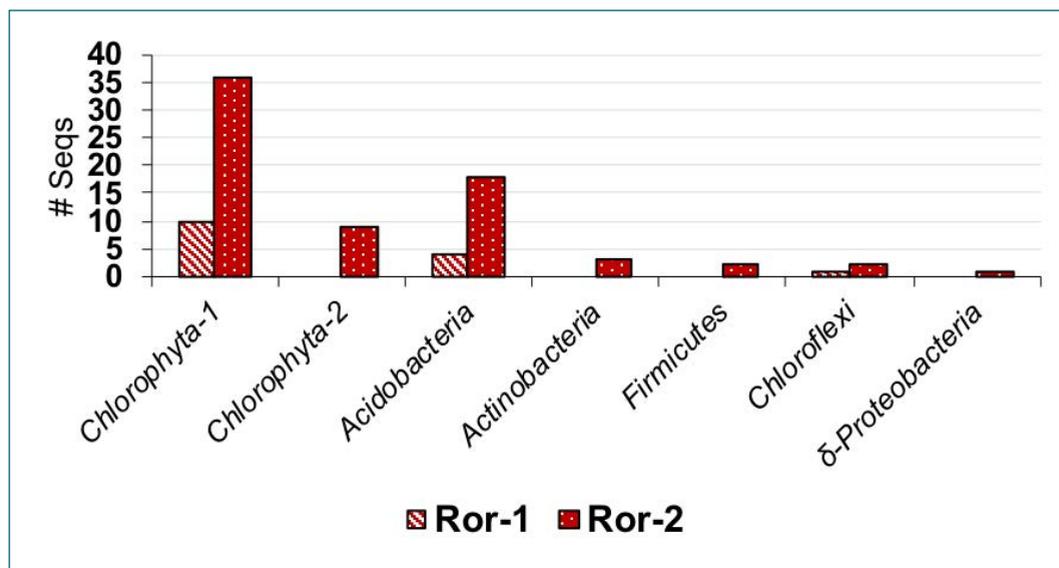


Figura 39: Grupos de secuencias identificadas por Sanger en la muestra Ror (1ª y 2ª extracción). La Ji-cuadrado no reveló diferencias significativas entre ambas extracciones ■

Las curvas de rarefacción (figura 68, apéndice F) muestran que los datos de la primera extracción no son representativos de la comunidad microbiana. Por esta razón, se procedió a una segunda extracción de ADN, amplificación y clonaje que representará adecuadamente la diversidad existente en la muestra.

La identificación de la mayoría de secuencias, cuyas agrupaciones se confirmaron con un árbol filogenético (figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J), indicó que Ror se caracteriza por corresponder a una comunidad microbiana potencialmente fotótrofa (Chloroflexi, Ror69, 70 y 85 similares a las secuencias de **Hem**; y especialmente Chlorophyta, Ror24-68; figura 76, apéndice H), aunque un análisis en detalle refleja que Ror85 pertenece al phylum Armatimonadetes. Dado que los cebadores 27F y 1492R utilizados son genéricos, no puede saberse con certeza si las secuencias de Chlorophyta obtenidas provienen de cloroplastos algales o corresponden a secuencias del *phylum* Cyanobacteria, microorganismos que en ambos casos han sido identificados en el ambiente ácido extremo de Río Tinto (Aguilera et al., 2004; Puente-Sánchez et al., 2018).

Aunque se realizó una PCR utilizando cebadores para la amplificación específica de Cyanobacteria en todas las muestras, únicamente se obtuvo resultado positivo en la muestra **Ror** (figura 66, apéndice D) obteniéndose dos grupos de secuencias con un porcentaje de identidad del 93% con muestras ambientales del desierto de Utah (EU751426, EU751583) y la filosfera de bosques templados (KU219399). Estos resultados únicamente nos permiten confirmar la presencia de organismos fotosintéticos en la muestra **Ror**.

También, se observaron secuencias de Acidobacteria (Ror1-18, 73, 75, 81, 83; figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J), que pueden dividirse en 2 OTUs diferentes y que se asemejan a Acidobacterias de suelos; secuencias de Actinobacteria (Ror19, 21 y 22; figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J), todas con un porcentaje de similitud del 89-91% a secuencias del orden Acidimicrobiales; una secuencia adicional de Firmicutes diferente de la secuencia de *Streptococcus salivarius* encontrada (Ror23; figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J), perteneciente al orden de los Bacillales (similar a *Alicyclobacillus*) y una secuencia de  $\delta$ -Proteobacteria (Ror20; figura 76, apéndice H y tabla 27, apéndice J).

Los resultados obtenidos con la muestra **Ror** vienen a respaldar las observaciones realizadas en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen que claramente muestran que; conforme aumenta el estado de oxidación del sistema, aumenta la diversidad microbiana, apareciendo microorganismos que están ausentes en las condiciones menos oxidantes.

### 5.6.1.2. Zona Berrocal

#### 5.6.1.2.1. Muestra Berr

Dada la similitud química, mineralógica y de los microorganismos encontrados, las tres muestras de sedimentos se trataron como una única muestra. En este caso, 3 OTUs diferentes fueron identificados mediante el Blastn dentro de las  $\gamma$ -Proteobacteria: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (30 lecturas en total; Berr4, 7-8, 11, 16, 19-20, 23, 28, 30-32, 37, 39-41, 43, 48, 50, 52, 54, 56, 59-60, 62, 64-65, 70-72), *Metallibacterium scheffler* (10 lecturas; Berr5-6, 9-10, 12-13, 21, 25, 33, 35) y las 26 lecturas del tercer OTU correspondieron a secuencias de la familia Sinobacteraceae (Berr3, 14, 17-18, 22, 27, 29, 34, 36, 38, 42, 44-47, 49, 51, 53, 57-58, 61, 63, 66-69) con un rango de identidad entre el 94% y el 97%, capaces de degradar moléculas orgánicas complejas (Fahrback et al., 2008) y de utilizar el nitrato como aceptor de electrones pudiendo acoplarlo a la oxidación de hierro (Straub et al., 2003; Ho et al., 2017).

Los otros 3 OTUs identificados con una menor abundancia fueron *Leptospirillum* sp. (Berr01-02); Acidobacteria, similar en un 97% de identidad a *Edaphobacter* (Berr15 y 26) y Firmicutes clasificados dentro del orden de los Clostridiales, cercanos en un 98% de identidad a *Clostridium* (Berr24 y 55). En la figura 40 se pueden observar los grupos de secuencias identificados, en la figura 77, apéndice H y tabla 27, apéndice J, se puede consultar la información del árbol filogenético realizado con los grupos de secuencias obtenidas (Berr) y en la figura 69, apéndice F, la curva de rarefacción obtenida.

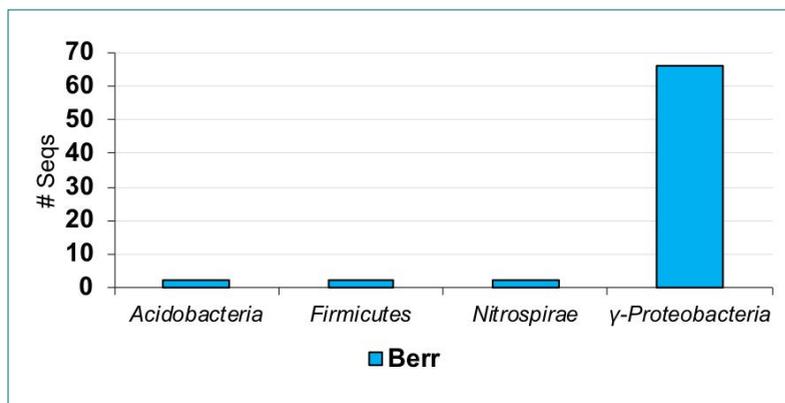


Figura 40: Grupos de secuencias Sanger identificadas en los sedimentos de Berrocal (Berr). ■

Las características metabólicas de los diferentes microorganismos identificados reflejan un activo ciclo del hierro en los sedimentos del margen del río, en el que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es el principal microorganismo oxidador y reductor de hierro (confirmado por hibridación). La presencia de las secuencias de *Leptospirillum* involucrado en la oxidación del hierro apoya la importancia del ciclo del hierro en la muestra. La presencia de *Metallibacterium*, un microorganismo versátil presente en ambientes ácidos de minas, es particularmente interesante ya que es formador de biofilms y para su crecimiento en cultivo requiere caseína proteolizada, un requerimiento nutricional basado en la degradación de péptidos gracias a la secreción de numerosos tipos de exoproteinasas codificada en su genoma. También, es capaz de reducir el ión férrico (Ziegler et al., 2013; Bartsch et al., 2017).

No es de extrañar la presencia de Firmicutes del orden Clostridiales, ampliamente detectado en trabajos anteriores en la cuenca del río Tinto (Sánchez-Andrea et al., 2011, 2012), lo que puede reflejar la presencia de material orgánico que está siendo consumido acoplado con la oxidación y/o reducción del azufre. Dada la actividad proteolítica de *Metallibacterium* y de miembros de los *phyla* Firmicutes y Bacteroidetes y de la clase γ-Proteobacteria, como *Acinetobacter*, que se conoce que su capacidad degradadora de biopolímeros complejos (Toren et al., 2001; Elifantz et al., 2005,) es razonable sugerir que la acumulación de material orgánico en el margen del río permite a *Metallibacterium* y los microorganismos detectados utilizar la materia orgánica como fuente de carbono y energía.

Sería preciso remarcar que la utilización de los aminoácidos, por los microorganismos acumulados en el margen del río, generaría la producción de amonio, tal y como sucede en cultivos de laboratorio con *Metallibacterium* (Bartsch et al., 2017). El cambio de pH local en el biofilm producto resultante de la actividad metabólica permite a *Metallibacterium* disponer de un mecanismo adaptativo a las condiciones ácidas que imperan en la columna de agua (Nancuqueo and Johnson, 2010; Bartsch et al., 2017). Junto con Acidobacterias, Firmicutes y otros microorganismos identificados por hibridación, como *Acidiphillum* sp. (apartado 5.6.4; figura 82, apéndice L) implicado en el ciclo del hierro mediante la oxidación de materia orgánica utilizando el ión férrico como aceptor de electrones, estarían otros microorganismos oportunistas alimentándose de la degradación de la materia orgánica de los productores primarios, impulsando la ecología microbiana del ecosistema.

### 5.6.1.2.2. Muestra P1

En la secuenciación Illumina Mi-Seq de **P1**, se obtuvieron un total de 18 468 lecturas tras pasar los diferentes filtros bioinformáticos de calidad y del escrutinio del control negativo. Para mayor información de la secuenciación de la muestra y para observar la curva de rarefacción obtenida, consultar la tabla 25 del apéndice G y la figura 72 del apéndice F respectivamente

La diversidad observada, intermedia entre **Hem** y **Mag**, reveló la presencia (en orden de mayor a menor abundancia) de los *phyla* Firmicutes [53,19%] (con la identificación en el orden Bacillales [9,50%] de los géneros *Staphylococcus* [2,29%], *Bacillus* [2,10%], *Geobacillus* [1,08%], *Ammoniphilus* [0,48%], *Abiotrophia* [0,20%] y en el orden Clostridiales [41,59%] a los géneros *Sulfobacillus* [29,39%], *Anaerococcus* [16,50%], *Finexordia* [3,22%], Peptococcus (familia Peptococcaceae) [1,20%], *Ezakiella* [0,84%], *Peptoniphilus* [0,74%] *Sedimentibacter* [0,66%] y *Clostridium* [0,006%]). También, Proteobacteria (clases  $\alpha$  [11,68%],  $\beta$  [0,63%],  $\gamma$  [11,33%]), con miembros en las  $\alpha$ -Proteobacteria del orden de las Caulobacteriales (*Caulobacter* [1,90%]), orden Rhizobiales [2,63%], con los géneros *Methylobacterium* [1,60%] y *Pelagibacterium* [0,55%] y *Ochrobactrum* [0,27%]; Rhodobacteriales [1,19%] (*Rubellimicrobium* [1,13%], *Paracoccus* [0,16%]); Rhodospirillales [4,85%] (*Roseomonas* [2,27%], *Acidiphilium* [1,19%], *Craurococcus* [0,88%]) y el orden Sphingomonadales (*Sphingomonas* [1,13%]).

En las  $\gamma$ -Proteobacteria [11,33%] podemos encontrar a *Marinomonas* [2,72%], *Lysobacter* [1,10%], *Aeromonas* [0,56%], *Acidithiobacillus* [0,51%], *Photobacterium* [0,35%], *Actinobacillus* [0,005%] pero sobretodo lecturas correspondientes al género *Acinetobacter* [5,65%], un género encontrado en estudios de barnices de roca y en el desierto de Atacama, lo que puede indicar que sea un miembro importante en la formación de barnices (Kulhman et al., 2008; Azúa-Bustos, 2018; Ren et al., 2019). En cuanto al *phylum* Actinobacteria [10,81%], se identificaron secuencias pertenecientes al género *Iamia* [0,11%], del orden Acidimicrobiales [0,11%]; al género *Rhodococcus* [0,77%], del orden Corynebacteriales; a los géneros *Paeniglutamibacter* [5,08%] y *Arthobacter* [0,19%], pertenecientes al orden Micrococcales [6,40%]; el género *Nocardioides*, del orden Propionibacteriales [0,19%]; *Prauserella* (orden Pseudonocardiales [0,04%]), *Streptomyces*, orden Streptomycetales [0,83%] y miembros del orden Gaiellales, clase Thermoleophilia [0,92%]. Asimismo, en el *phylum* Bacteroidetes [7,46%] se identificaron secuencias pertenecientes al orden Bacteroidales [4,67%], Sphingobacteriales [1,33%], Cytophagales [0,82%] y Flavobacteriales [0,62%] (género *Capnocytophaga* [0,62%]). Todos estos microorganismos constituyen más del 85% de la biodiversidad detectada en la muestra. Cerca de un 2% de lecturas corresponden al dominio Archaea (género *Ferroplasma* [1,85%]). También, se observaron lecturas de Nitrospira (todas de *Leptospirillum* [0,49%]),  $\beta$ -Proteobacteria [0,93%] (todas del orden Burkholderiales con la identificación de los géneros *Ralstonia* [0,11%], *Delftia* [0,08%], *Aquabacterium* [0,02%], *Herbaspirillum* [0,01%], *Undibacterium* [0,01%]),  $\delta$ -Proteobacteria [0,07%] y Saccharibacteria [2,13%], un miembro de las CPR (figura 41)

Un 2,54% del total de lecturas distribuidas en 34 secuencias no pudieron ser identificadas por QIIME en **P1**, por lo que se procedió a obtener un árbol filogenético con inferencia bayesiana para la identificación más probable de las secuencias junto al análisis individual de cada secuencia por Blastn y RDP Seqmatch. Todas las lecturas fueron identificadas como Actinobacteria, excepto una de

ellas que fue identificada como un Firmicutes (género *Dethiosulfatibacter*), quedando muy alejada respecto del resto de secuencias no identificadas (figura 42 y tabla 28, apéndice J)

Durante el procesado manual de los datos de la secuenciación, un 4,6% de las lecturas fueron clasificadas por la herramienta bioinformática QIIME como Cyanobacteria / Chloroplast, pero ni la PCR específica de Cyanobacteria ni la hibridación revelaron una señal positiva de su presencia en la comunidad microbiana, por lo que estos resultados fueron eliminados en el cálculo de abundancias relativas.

También, hay que indicar que 3 310 lecturas, que representarían un 14,8% del total de lecturas en **P1**, se identificaron dentro del género bacteriano *Fusobacterium*. Por el mismo motivo comentado anteriormente en la muestra **Hem**, se procedió a eliminar estas secuencias de los cálculos de análisis de abundancia relativa.

Se puede observar que en la muestra **P1** hay algunos microorganismos detectados en **Hem** y otros detectados en **Mag**, lo que indica que la composición y diversidad microbiana de **P1** se sitúa entre las dos, hecho que posteriormente ha sido confirmado (apartado 5.6.2 y 5.6.3). Teniendo en cuenta que las características de la ubicación de **P1** son completamente distintas a las de la unidad litoestratigráfica del Origen. Una posible explicación factible podría estar en las crecidas estacionales del cauce del río, las cuales aportarían, junto con partículas orgánicas e inorgánicas, microorganismos procedentes del río y de los sedimentos a la vez que se eliminarían por arrastre la presencia de otros, restableciendo parcialmente la comunidad microbiana del ecosistema.

En la figura 47 (apartado 5.6.2) se muestra que la composición microbiana de **P1** es claramente más semejante a **Mag**, una comunidad microbiana que no está madura al no haber tenido los microorganismos el tiempo suficiente para realizar los cambios geoquímicos que permiten un aumento de la complejidad en el ecosistema.

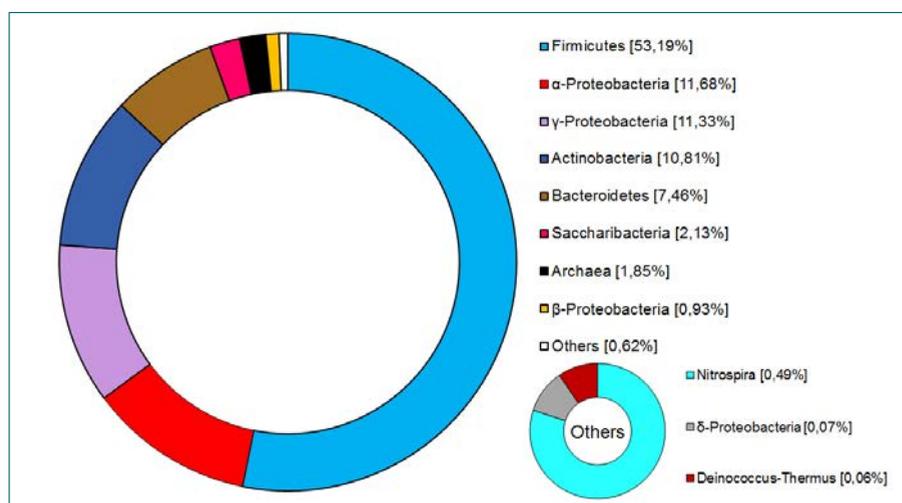


Figura 41: Abundancia relativa en la muestra P1 obtenida por Illumina. ■

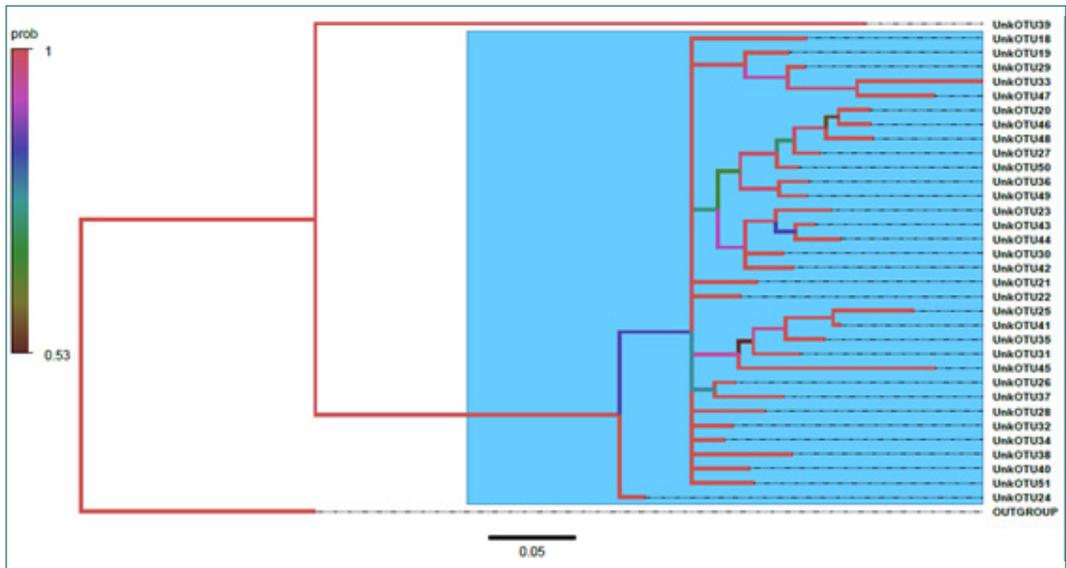


Figura 42: Árbol de análisis bayesiano realizado para la agrupación de las secuencias no identificadas en la muestra P1. En azul, las secuencias identificadas como Actinobacteria forman un único clado. UnkOTU39 fue identificado como un Firmicutes (*Thermodesulfobacteria*) con una abundancia total relativa del 0,33 % en P1. Modelo de sustitución nucleotídica utilizado GTR+ $\lambda$  ( $\lambda = 0,5250$ ;  $I = 0,3460$ ); Log-likelihood= -2148,8046;  $f(A) = 0,2708$ ;  $f(T) = 0,2304$ ;  $f(C) = 0,1378$ ;  $f(G) = 0,3609$ . El outgroup es una secuencia 16S de *Escherichia coli* (procedente de Van de Peer et al., 1996). ■

### 5.6.1.3. Cultivos de enriquecimiento

Los resultados de secuenciación por Illumina Mi-Seq obtenidos a partir de tres cultivos anaerobios: muestra **Berr**, utilizando el medio  $Fe^{2+} + NH_4NO_3$  y muestras **Hem** y **Mag** utilizando el medio DG +  $S^0$ , y que han superado los requisitos de la amplificación en la qPCR y comparación con el control negativo, confirmaron la presencia de algunos de los microorganismos encontrados en las muestras ambientales.

Para mayor detalle de los datos de secuenciación de los cultivos de enriquecimiento, consultar la tabla 25, apéndice G.

Los índices de diversidad de Shannon de los cultivos anaerobios mostraron valores entre 2 y 3, mientras que las muestras ambientales fueron mayores (cerca de 4 o superiores), algo lógico dado que la diversidad que se puede observar es menor en un cultivo de enriquecimiento ya que se favorece, por la composición del medio, el desarrollo selectivo de algunos tipos de microorganismos. En el caso del cultivo aerobio DG de P1, no es posible comparar de manera fiable la diversidad al haberse realizado con una técnica de secuenciación diferente a los tres cultivos anaerobios mencionados.

En términos generales, los resultados de la secuenciación de los cultivos de enriquecimiento apoyan los resultados obtenidos mediante la secuenciación de las muestras ambientales y como veremos más adelante en el apartado 5.6.4, apoyan los resultados mediante la utilización de técnicas de hibridación sobre las muestras ambientales.

### 5.6.1.3.1. Cultivo $Fe^{+2} + NH_4NO_3$ (Berr)

De los tres cultivos anaerobios analizados por secuenciación masiva, este cultivo tiene la riqueza ( $S=27$ ), diversidad ( $H'=2,24$ ) e índice de Pielou ( $J'=0,679$ ) más bajas (figura 43). Las secuencias de  $\gamma$ -Proteobacteria [80,30%] identificadas corresponden al género *Acinetobacter* (orden Pseudomonadales) que se encuentra con mayor o menor frecuencia en las diferentes muestras estudiadas. Las secuencias que fueron identificadas como  $\beta$ -Proteobacterias [13,07%] correspondieron al orden de las Burkholderiales, relacionadas con los géneros *Ralstonia* [1,49%], *Undibacterium* [0,75%] (identificadas en otras muestras), y con *Paucibacter* [1,12%], no identificada en las muestras ambientales

Con respecto a las  $\alpha$ -Proteobacterias [3,83%] y Firmicutes [2,80%], destacaron las secuencias identificadas dentro del orden de las Sphingomonadales [3,36%] y Rhodospirillales (género *Roseomonas* [0,47%]) por un lado y secuencias del orden Clostridiales [2,24%] (*Clostridium* [1,59%], *Anaerococcus* [0,65%]) por el otro lado, siendo todas ellas secuencias identificadas en las muestras ambientales del área de Berrocal (Berr y P1).

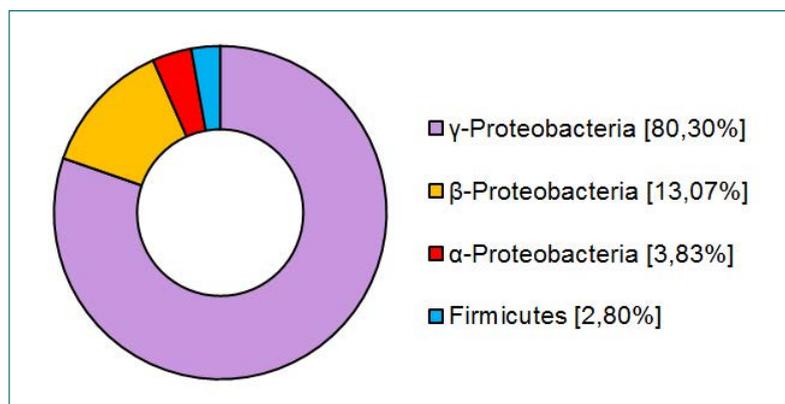


Figura 43: Abundancia relativa de grupos microbianos en el cultivo de enriquecimiento de la muestra Berr en el medio  $Fe+NH_4NO_3$  mediante secuenciación Illumina. ■

### 5.6.1.3.2. Cultivo DG+S<sup>0</sup> (Hem y Mag)

El mayor número de OTU de las tres secuencias ( $S=83$ ) se obtuvo en la muestra **Hem** con un  $J'=0,697$ , aunque con una diversidad inferior a la del cultivo **Mag** ( $H'=3,08$ ; figuras 44 y 45)

De los principales taxones identificados en el cultivo **Hem** (figura 44), destacan los Firmicutes [53,13%], con secuencias del orden Clostridiales [45,13%] de los géneros *Fonticella* [29,75%], *Clostridium* [5,81%], *Paraclostridium* [3,92%], *Peptoniphilus* [1,96%], *Sporotomaculum* [1,36%], *Desulfotomaculum* [1,28%] y *Sedimentibacter* [0,98%], correspondiendo algunos a miembros de las familias Pepto(strepto)cocacceae. En el *phylum* de las  $\alpha$ -Proteobacterias [18,79%] se detectaron secuencias del orden Rhizobiales [6,11%], del género *Methylobacterium* [6,11%] (detectados en las muestras ambientales de **Mag** y **P1** pero no en **Hem**); del orden Rhodospirillales [10,55%] el género *Roseomonas* [9,13%] y *Acidiphillium* [1,36%]; del orden Sphingomonadales [1,35%] se identificó

el género *Spingobium* [0,90%] y del orden Caulobacteriales, el género *Caulobacter* [0,68%]; en las  $\gamma$ -Proteobacteria [10,33%], todas del orden Pseudomonadales con secuencias de *Acinetobacter* [9,58%] y algunas secuencias de *Pseudomonas* [0,75%], relacionadas con ambientes extremos. Igualmente, en  $\beta$ -Proteobacteria [1,74%], todas las secuencias identificadas son del orden Burkholderiales, con los géneros *Ralstonia* [0,38%], *Ccomamonas* [0,38%] y *Delftia* [0,23%]. También se observaron secuencias de  $\delta$ -Proteobacteria [4,30%].

En el dominio Archaea [7,62%], además de las secuencias de *Ferroplasma* [5,88%] y *Thermoplasma* [1,21%], el cual se identificó también en la muestra ambiental **Mag**, asimismo identificando una secuencia como Woesearchaeota [0,53%], no identificada en ninguna de las muestras ambientales ni observada en otros cultivos secuenciados.

De igual modo, se identificaron algunas secuencias de Chloroflexi [1,96%] que coinciden con las obtenidas en las muestras ambientales **Hem** y **Mag**, revelando la presencia ubicua en el sistema de estudio de este *phylum* aunque en porcentajes que no les confiere ser miembros principales de los ecosistemas analizados pero que pueden indicar un papel importante en el mantenimiento de las diferentes comunidades microbianas estudiadas. También, se encontraron secuencias pertenecientes al *phylum* Actinobacteria [1,22%] del orden Acidimicrobiales [0,30%], identificándose al género *Ferrihrix* [0,15%] y secuencias del *phylum* Acidobacteria [0,91%].

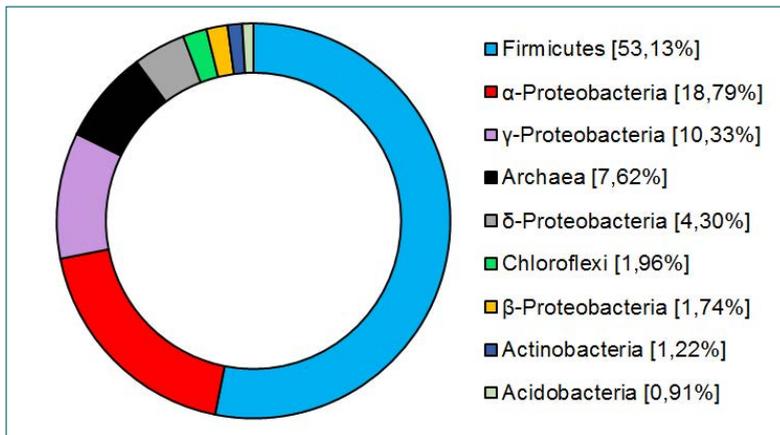


Figura 44: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento de la muestra Hem en el medio DG + S<sup>o</sup>. ■

En el caso de **Mag** se obtuvo una  $S=77$ , pero con la mayor diversidad observada de las tres muestras secuenciadas ( $H'=3,20$ ), con un  $J'=0,737$ . La mayoría de las secuencias obtenidas, casi un 50%, correspondieron a los géneros *Thermoplasma* [29,65%] y *Ferroplasma* [11,50%] del dominio Archaea (figura 45), también identificadas en el cultivo de la muestra d **Hem**.

En los Firmicutes [29,76%] se detectaron secuencias de Clostridiales [29,15%], del género *Clostridium* [14,20%] y secuencias de *Fonticella* [8,35%], *Sporotomaculum* [1,51%] *Paraclostridium* [1,41%], *Sulfobacillus* [0,21%] y *Peptoclostridium* [3,24%], un miembro de la familia Pepto(strepto)cocacceae. En el orden Bacillales [0,63%], se identificaron los géneros *Macrococcus* [0,42%] y *Staphylococcus* [0,16%]

También, fueron detectadas lecturas de  $\alpha$ -Proteobacterias [18,75%] identificadas también en el cultivo de enriquecimiento de la muestra **Hem** (*Methylobacterium* [4,80%], orden Rhizobiales [5,80%]; *Roseomonas* [12,32%] y *Acidiphillum* [0,63%], observadas tanto en las muestras ambientales por secuenciación como por señal de hibridación. También se detectaron  $\beta$ -Proteobacterias, todas del orden Burkholderiales [1,57%] con los géneros *Ralstonia* 0,47% y *Deftia* 0,16% presentes.

Se debe resaltar, nuevamente, la presencia de miembros del orden Pseudomonadales [4,17%] con secuencias del género *Pseudomonas* [0,41%] y especialmente del género *Acinetobacter* [3,77%], presente en todas las muestras ambientales secuenciadas por Illumina, habiendo sido descrito como un microorganismo muy versátil metabólicamente (Berardinis et al., 2009), presente de manera habitual en ambientes extremos como el desierto (Azúa-Bustos et al., 2018) y en las superficies de barnices de roca (Kuhlman et al., 2008) y en Atacama o en drenaje ácido de minas donde se han sido aislado (Ghosh and Das, 2017). De hecho, todas las lecturas identificadas como *Acinetobacter* resultaron ser muy similares a las secuencias de estos ambientes.

Igualmente, se observaron lecturas identificadas con el género *Acidibacter* [0,26%], un miembro perteneciente al orden Xantomonadales; este microorganismo es un acidófilo mesofílico capaz de catalizar la reducción de minerales con ión férrico en condiciones microaerobias y anaerobias, lo que está en consonancia con las propiedades de la muestra **Mag**, más reductora que **Hem** (apartado 5.1.1).

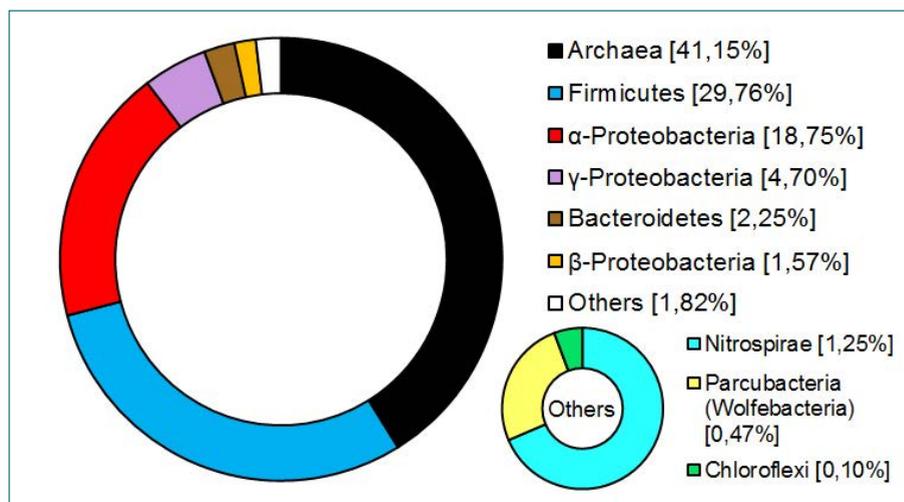


Figura 45: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento de la muestra **Mag** en el medio DG + S<sup>0</sup>. ■

Miembros del género *Tolumonas* [0,26%] no identificado anteriormente en ninguna secuenciación realizada en este trabajo, ha sido descrito como un microorganismos facultativo, capaz de crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias, así como productor de tolueno a partir de precursores como la fenilalanina, y cuya identificación en **Mag** refuerza la importancia de la degra-

dación de los compuestos orgánicos en las comunidades microbianas estudiadas, tal y como se puede observar mediante el análisis del metabolismo de la comunidad microbiana de la muestra **Mag** con el programa Piphillin (apartado 5.6.5).

También, se han detectado secuencias correspondientes al *phylum* Bacteroidetes [2,25%] (no identificadas en el cultivo de **Hem** denominada vadinBC27 wastewater-sludge group [1,41%] y secuencias del género *Capnocytophaga* [0,84%]), algunas secuencias de *Nitrospira* (correspondiente al género *Leptospirillum* [1,25%]) y del *phylum* Chloroflexi [0,10%], la misma secuencia identificada en el cultivo de **Hem** y en la muestra ambiental. Por último, cabría resaltar la presencia de algunas lecturas de la CPR pertenecientes a las *Parcubacteria* e identificada como *Wolfbacteria* [0,47%]

### 5.6.1.3.3. Cultivo DG (P1)

Con una  $S=5$ , una  $H'=1,30$  y un  $J'=0,81$ , la secuenciación por Sanger (figura 46) reveló una diversidad en la que casi la mitad de las secuencias del cultivo de enriquecimiento aerobio DG (sin  $S^{\circ}$ ) se identificaron dentro del género *Sphingomonas* [55,55], una  $\alpha$ -Proteobacteria [en total: 77,77%] (97-99% de identidad). Además, se identificaron secuencias del género *Caulobacter* [11,11%] (con un 95-99% de identidad), también identificada en las muestras ambientales **P1** y **Hem**, con capacidad de oxidar el manganeso (Francis et al., 2001); *Methylobacterium* sp. ([11,11%], con un 96-99% de identidad), identificada en el cultivo DG +  $S^{\circ}$  de **Hem** y en las muestras ambientales **P1** y **Hem** secuenciadas por Illumina; del *phylum* Acidobacteria [11,11%] (identificada en la muestra ambiental **Hem**) y *Bacillus* sp. / *Quasibacillus thermotolerans*, con un 99% de identidad [11,11%], microorganismos ampliamente distribuidos en diferentes muestras estudiadas (apartados 5.6.1.1.2, 5.6.1.1.3, 5.6.1.2.2) y en los otros cultivos de enriquecimiento (apartados 5.6.1.3.1 y 5.6.1.3.2). En todos los casos las secuencias identificadas hacen referencia de manera próxima a microorganismos identificados previamente en suelos.

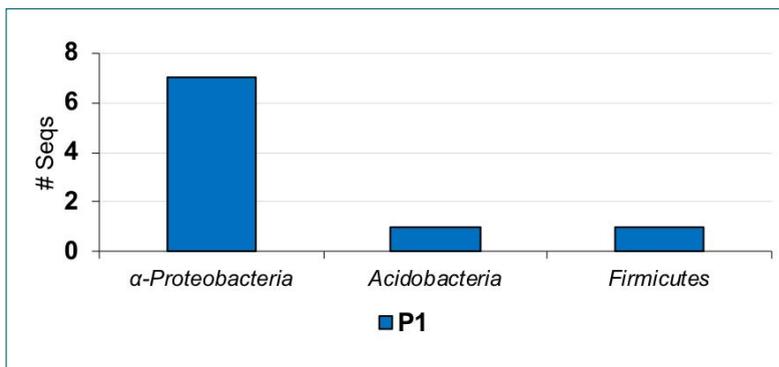


Figura 46: Abundancias relativas de diferentes grupos microbianos del cultivo de enriquecimiento P1 en el medio DG. ■

### 5.6.2. Parámetros ecológicos microbianos. Comparación de las comunidades en las muestras ambientales

Con el fin de comparar la diversidad obtenida, se calcularon en las distintas muestras ambientales la riqueza de especies, el índice de diversidad de Shannon para comparar la diversidad presente y el índice de Pielou para medir la uniformidad de las poblaciones microbianas.

Los resultados de los cálculos de los parámetros ecológicos que se muestran en la tabla 18 indican que, tanto por Sanger como por Illumina en la unidad litoestratigráfica del Origen, la riqueza de OTUs y la diversidad encontrada en la muestra **Hem** es mayor que la observada en las muestras **Mag** y **P1**, algo que también se observa en la muestra **Hem** cuando se compara con el resto de muestras secuenciadas solo por Sanger (**Berr** y **Ror**).

El índice de Pielou muestra un mayor valor para la muestra **Hem** con respecto a la muestra **Mag**, indicando la existencia en **Hem** de una comunidad microbiana más estable y madura que en **Mag**, aunque este valor es menor que el valor obtenido para la muestra **P1**, lo que en este caso indicaría que la comunidad del recubrimiento en esta muestra es más estable que las de la unidad litoestratigráfica del Origen, indicando que podría deberse a que conforme acontece la deposición mineral y su asentamiento sobre la roca, aunque haya aporte y lavado de diferentes tipos de microorganismos como consecuencia de la crecida del cauce del río, los principales microorganismos del ecosistema permanecen, lo que sería compatible con el hecho de que **P1** tenga una diversidad intermedia a las muestras del Origen a pesar de tener una menor riqueza de OTUs que la muestra **Mag**.

| Muestra<br>[Ubicación] | S  | H'   | S   | H'   | Índice de Pielou<br>(equitatividad)<br>$J' = H' / \ln(S)$ | Bray-Curtis (BC <sub>ij</sub> ) |       |       |
|------------------------|----|------|-----|------|---|---------------------------------|-------|-------|
|                        | SG |      | ILU |      |   | P1                              | Hem   | Mag   |
| Berr [Berrocal]        | 6  | 1,31 |     |      | 0,73  |                                 |       |       |
| P1 [Berrocal]          |    |      | 387 | 4,20 | 0,71  |                                 | 0,995 | 0,920 |
| Hem [Origen]           | 10 | 1,80 | 658 | 4,31 | 0,78 [SG] 0,67 [ILLU]                                     | 0,995                           |       | 0,990 |
| Mag [Origen]           | 9  | 1,45 | 422 | 3,83 | 0,66 [SG] 0,63 [ILLU]                                     | 0,920                           | 0,990 |       |
| Ror [Origen]           | 8  | 1,37 |     |      | 0,66  |                                 |       |       |

S: Riqueza de OTUs; H': índice de Shannon; J': Índice de Pielou; BCij: Bray-Curtis (sólo con los datos de secuenciación Illumina); SG: Muestras secuenciadas por Sanger; ILU: Muestras secuenciadas por Illumina Mi-Seq. En gris, sin datos.

**Tabla 18: Cálculo de parámetros ecológicos de interés en ecología microbiana de las muestras ambientales estudiadas. ■**

De igual modo, se calculó el valor de disimilaridad Bray-Curtis con el fin de evaluar el cambio en la composición de la comunidad microbiana entre las diferentes muestras. Estos valores indican una composición microbiana de **P1** más similar a **Mag**. En base al valor de Bray-Curtis, se calculó un cociente utilizando la diferencia de la abundancia de elementos entre las diferentes muestras a comparar y que, multiplicado por 100, muestra la tasa de replazo en las comunidades microbianas comparadas en función de los cambios observados en la cantidad de un elemento medido por ICP-MS (tabla 19).

Los valores de Bray-Curtis reflejan lo mismo que se observa con el índice de Shannon (tabla 18) y, realizando la representación de las relaciones de las comunidades microbianas de las diferentes muestras secuenciadas por Illumina mediante el programa Calypso (figura 47), se evidencia que la muestra **P1** posee una diversidad intermedia entre **Hem** y **Mag**, lo que podría deberse a la ubicación de la muestra **P1** en relación con las muestras del Origen. Las crecidas estacionales del río que periódicamente inunda el lecho de los cantos redondeados del cauce en Berrocal, aporta tanto material como microorganismos y detritos, provocando una mayor tasa de reemplazo de OTUs en **P1** con respecto a **Mag**, resultando en un reseteo parcial de la comunidad microbiana que impide que aumente su complejidad y, que como, resultado muestra características microbiológicas intermedias entre **Hem** y **Mag** (figura 47)

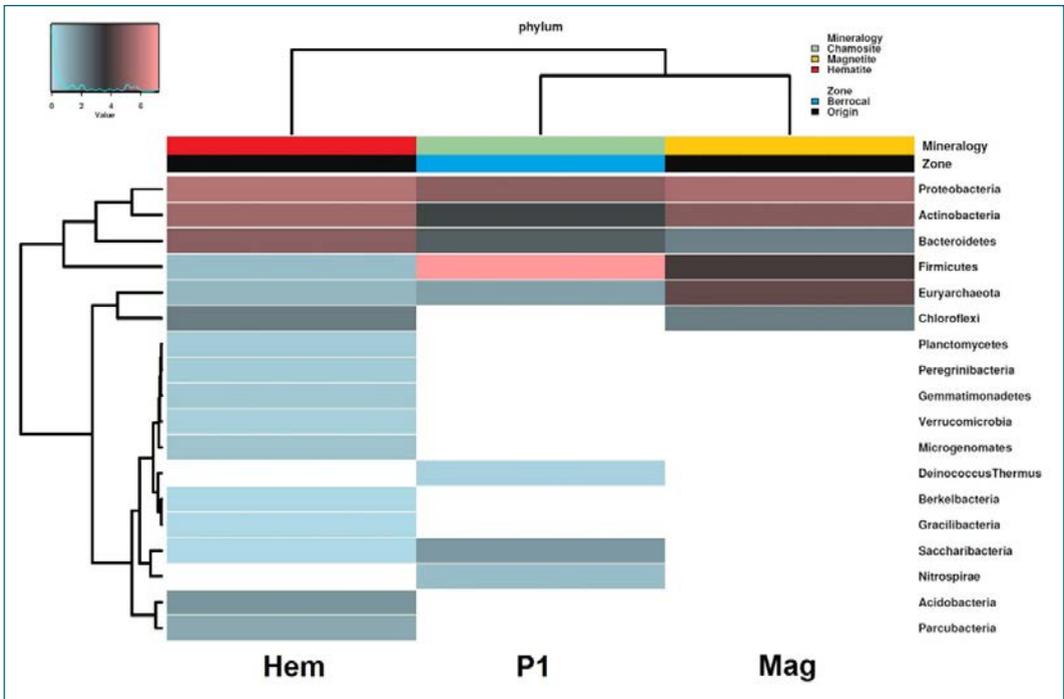


Figura 47: Relaciones de los diferentes taxones microbianos identificados en las muestras secuenciadas por Illumina (Hem, Mag y P1) realizado por el programa bioinformático Calypso a nivel de phylum y que refleja que la comunidad microbiana P1 es más próxima a la muestra Mag. Los códigos de colores muestran la abundancia relativa de cada grupo microbiano en función del conjunto de las muestras (parte superior izquierda de la imagen). ■

|         | Ba      | Mn      | Pb      | As      | Ca      | Li       |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Hem-Mag | +2,41 % | +4,95 % | +4,95 % | -0,99 % | -3,96 % | -2,48 %  |
| P1-Hem  | -0,52 % | +0,52 % | +0,62 % | +0,72 % | +1,61 % | +19,90 % |
| P1-Mag  | -0,61 % | +0,43 % | +0,51 % | +2,49 % | +2,49 % | -2,63 %  |

Este valor no se ha calculado para los principales elementos, ya que el sesgo que pueda tener la medición por ICP-MS de los elementos con elevadas concentraciones de Fe y Ti puede ser importante y no significativo. De todas maneras, la PCA de la figura 25 (apartado 5.3) permite observar la mayor importancia a nivel químico del Fe en las muestras del Origen con respecto a la muestra P1 de Berrocal, lo cual es compatible con las características de los sistemas donde se localizan las muestras.

**Tabla 19: Tasa de reemplazo utilizando los valores Bray-Curtis en función de la abundancia de elementos químicos en las muestras P1, Hem y Mag. ■**

En base a los valores de Bray-Curtis, la tasa de reemplazo de los OTUs en las diferentes muestras en función de la cantidad de elementos presentes, calculado previamente (véase apartado 5.1), refleja que el manganeso, plomo y calcio son los elementos que más influyen en el cambio observado entre **Hem** y **Mag**. En las transformaciones observadas entre las comunidades de la roca de Berrocal y las del Origen destaca la influencia del litio, el calcio y el arsénico (tabla 19)

### 5.6.3. Inferencia metagenómica de metabolismos en las muestras ambientales secuenciadas por Illumina

Se probaron diferentes porcentajes de umbral de identidad con el programa bioinformático Piphillin, desde el 80% (el mínimo disponible) pasando por el 85%, 90%, 95% y 99% (el más alto disponible), con el fin de identificar el porcentaje de umbral de identidad que englobe en el análisis el mayor número de secuencias posibles y que, al mismo tiempo, evite introducir un excesivo ruido de fondo en los cálculos de los valores de abundancia de las enzimas y rutas metabólicas.

Los resultados de este pre-análisis mostraron que el 85% era el valor umbral más adecuado para proceder con el análisis de inferencia, en el que, al menos, el 93% de las secuencias introducidas pudieron ser utilizadas en el análisis por Piphillin (tabla 26 y figura 78, apéndice I)

La información de la secuenciación Illumina de las muestras ambientales refleja importantes diferencias entre **Hem** y **Mag** (figura 48) en las rutas de la fotosíntesis (ko00195), los ribosomas (ko03010), la biosíntesis de lipopolisacáridos (ko00540), la biosíntesis de peptidoglicanos (ko00550), el metabolismo del azufre y el nitrógeno (ko00910 y ko00920; para más detalles ver las figuras 49 y 52). Asimismo, muestra resistencia a  $\beta$ -Lactámicos (ko01501), resistencia a Vancomicina (ko01502), formación de biopelículas (ko02026 y ko05111) y sistema de secreción bacteriana (ko03070), siendo, en general, los valores para la muestra **Hem** los más altos, excepto en el caso de los ribosomas (ko03010). En cuanto a la ruta de la fotosíntesis (ko00195), la discrepancia de valores entre las rutas se debió a elementos particulares de la cadena de transporte de electrones y enzimas implicadas en la respiración celular, pero no a componentes propios de la cadena de electrones fotosintética.

En términos generales, la muestra **P1** y la muestra **Hem** mostraron valores similares (figura 48-B), difiriendo en la biosíntesis de lipopolisacáridos (mayor en **Hem** y similares en **Mag** y **P1**, ko00540), en degradación de compuestos aromáticos (mayor en **P1** pero similar el valor obtenido en **Mag**, ko01220) y en el sistema fosfotransferasa (en este caso mayor en **P1** que en las muestras **Hem** y **Mag**, ko02060).

Por otro lado, en **Mag**, los transportadores ABC (ko02010), aunque inferiores al valor en **Hem**, no difirieron de manera significativa en más de un 10%, a diferencia de **P1** que mostró diferencias significativas comparando con **Mag** (figura 48-A)

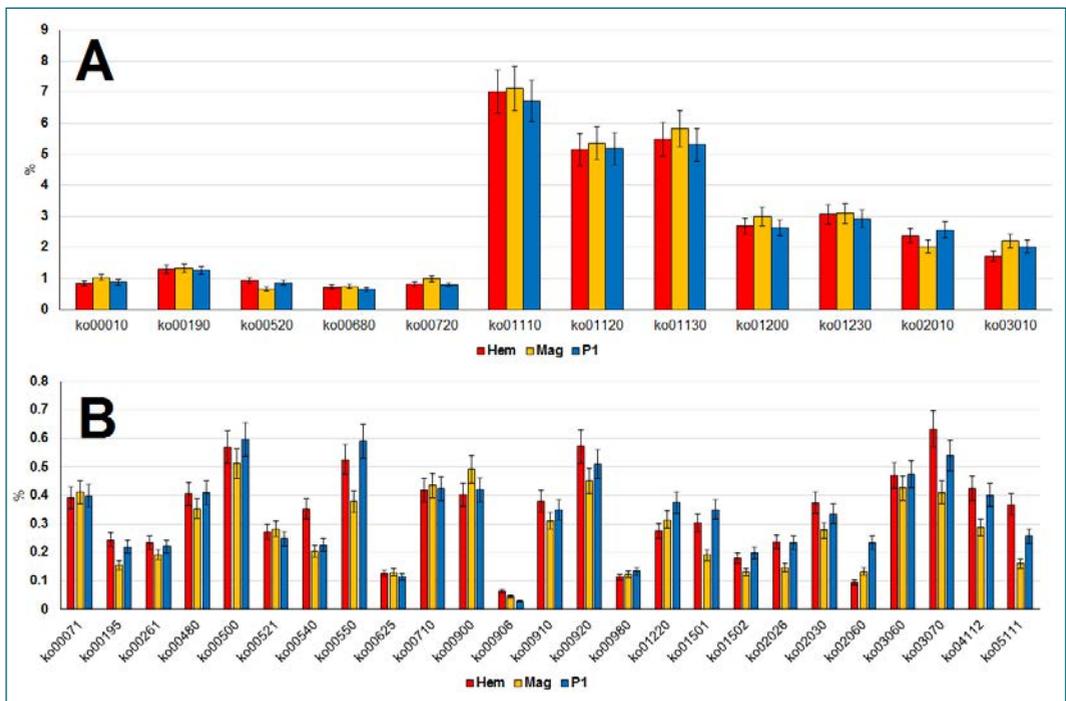


Figura 48: Abundancia relativa de cada ruta metabólica en las muestras ambientales (en A con un porcentaje de abundancia superior al 0,8% y en B inferior al 0,8%). Los porcentajes obtenidos se muestran con una barra de error del 10% asignado a cada valor obtenido. Para saber a qué ruta metabólica corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 29, apéndice K. ■

### 5.6.3.1. Metabolismo del azufre

Analizando en detalle las enzimas involucradas en el metabolismo del azufre (figura 49), se observa que **Hem** difiere notablemente con **P1** y **Mag** (figura 50), que **Mag** y **P1** no destacan de manera particular en ninguna ruta involucrada en el metabolismo del azufre y que, de hecho, en algunas enzimas como K00381 o K00390 **Mag** es significativamente inferior tanto a **Hem** como a **P1** (figura 49). Igualmente, **P1** destaca en la conversión de tiosulfato en tetracionato (figura 50), sin embargo, la muestra **Hem** destaca en la reducción asimilativa de sulfato a sulfuro y en el sistema SOX que convierte el tiosulfato y el tetracionato en sulfato (figura 51).

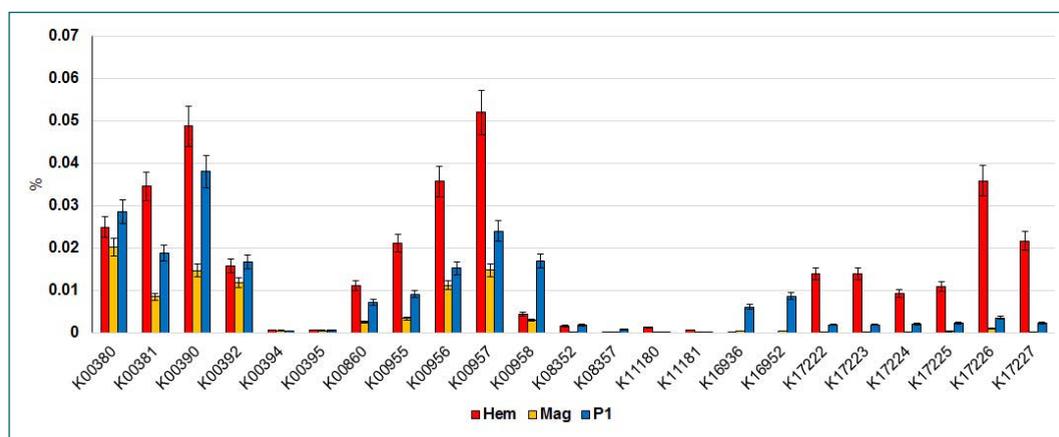


Figura 49: Abundancia relativa del metabolismo del azufre en las muestras ambientales. Los porcentajes obtenidos se muestran con una barra de error del 10% asignado a cada valor obtenido. Para saber a que enzima corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 30, apéndice K. ■

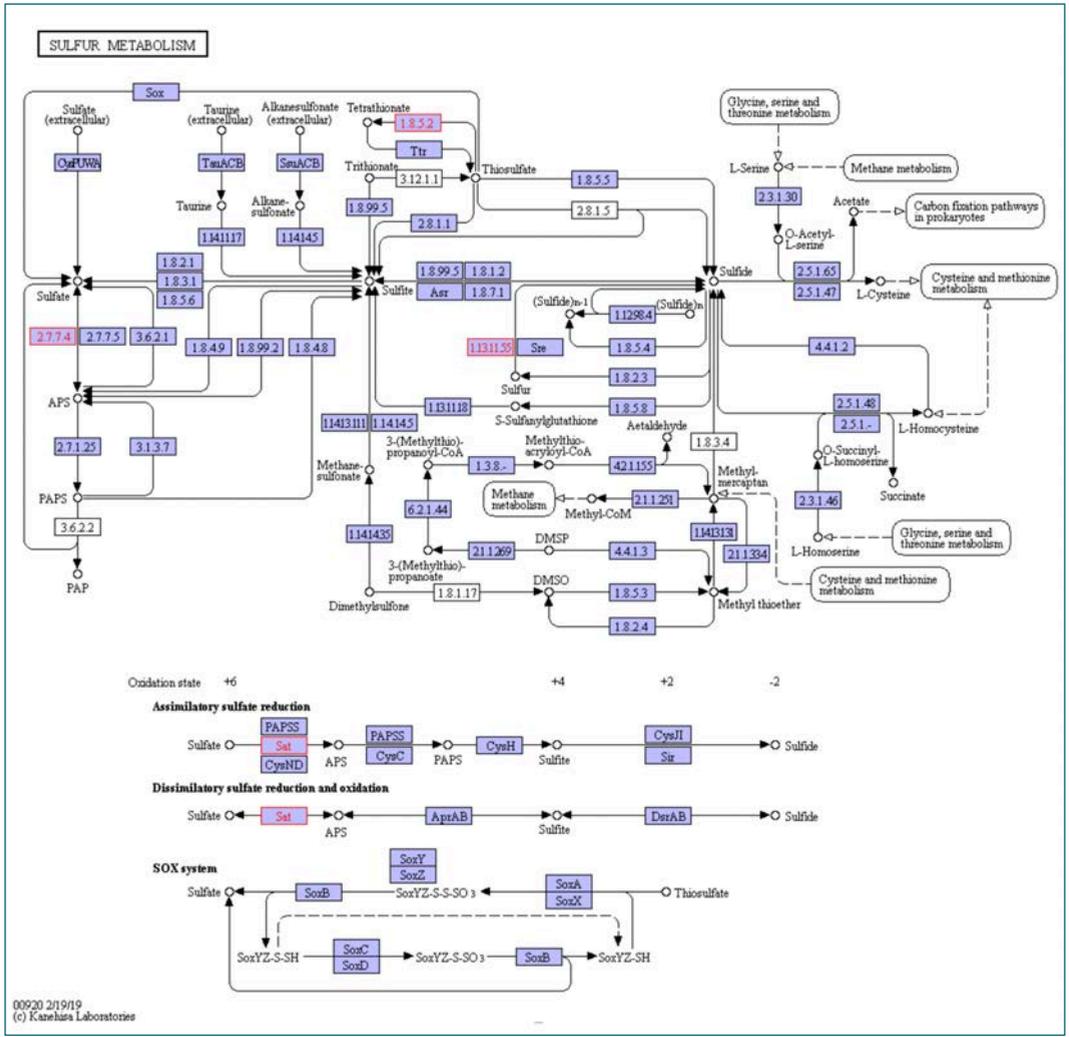


Figura 50: Diferencias significativas en el metabolismo del azufre entre la muestra P1 (Berrocal) con respecto a las muestras Hem y Mag (Origen), mostradas en los recuadros rojos. En la imagen destacada, la primera parte de la reducción asimilativa y desasimilativa del azufre, oxidación y conversión de tiosulfato a tetrationato. ■

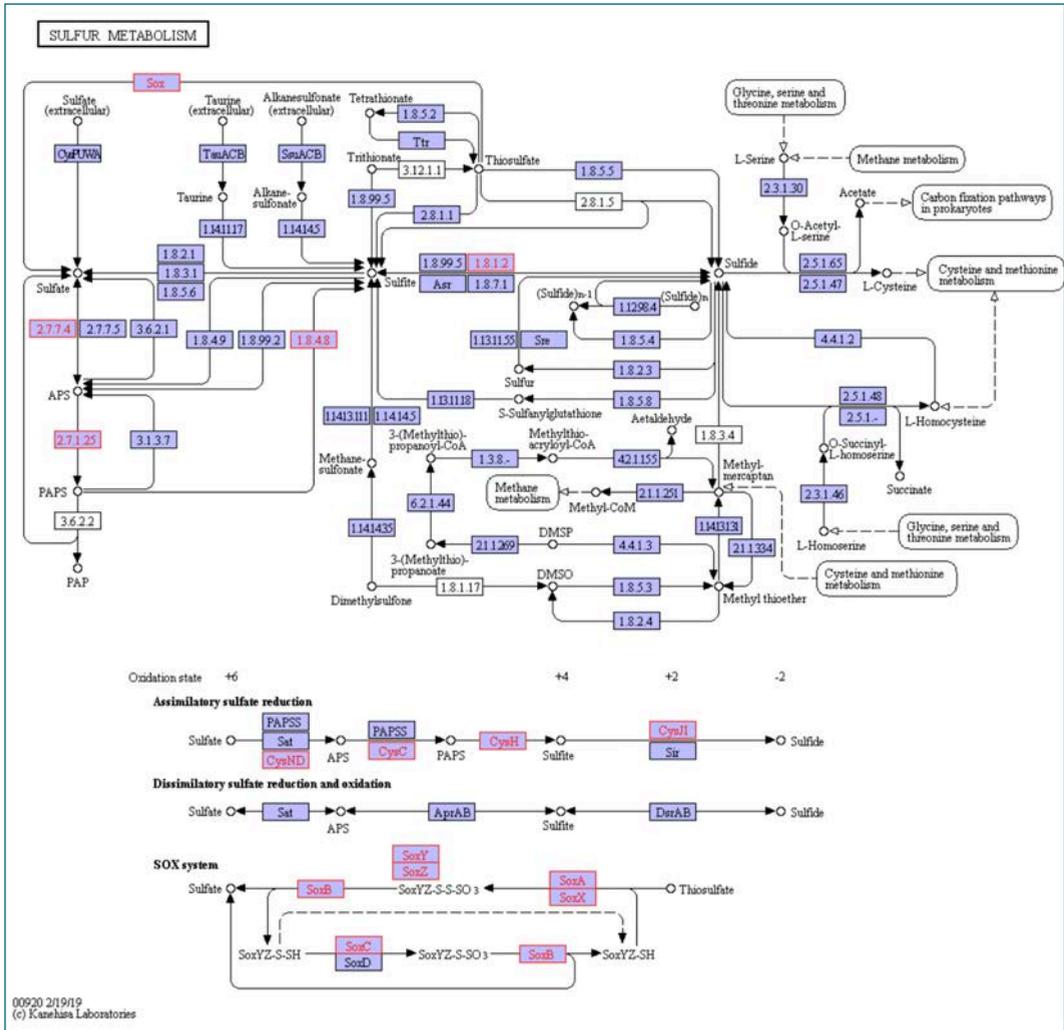


Figura 51: Diferencias significativas en el metabolismo del azufre de la muestra Hem respecto Mag y P1, mostradas en los recuadros rojos. Destacar en la imagen la reducción asimilativa del azufre y la ruta del sistema SOX. ■

La ruta SOX, utilizada por numerosas bacterias oxidadoras de azufre para convertir el tetratiónato a sulfato (Friedrich et al., 2005), está ampliamente extendido en muchos grupos microbianos, entre los que destacan las  $\alpha$ ,  $\beta$  Proteobacterias, algunas  $\lambda$ -Proteobacteria quimiolitotrofas facultativas y los Bacteroidetes (Ghosh et al., 2009), lo que es compatible con la gran abundancia relativa de Proteobacteria encontrada en todas las muestras.

A partir de estos resultados, se puede concluir que en la comunidad microbiana de la muestra P1 destaca la conversión de tetratiónato a tiosulfato, lo que podría indicar que hay una disolución y

precipitación de sulfuros y sulfatos. En otras palabras, esta observación puede indicar una biomineralización, ya que podría favorecer cambios en la estructura cristalina del revestimiento cuando se produce la precipitación de minerales de hierro favoreciendo una transición mineralógica como la observada en la unidad litoestratigráfica del Origen (apartado 5.1.1)

### 5.6.3.2. Metabolismo del nitrógeno

Se han observado grandes diferencias en el metabolismo del nitrógeno entre las muestras **Hem** y **Mag**. En las figuras 52 y 53 se puede ver que en **Hem** destaca la ruta de la desnitrificación, lo que conlleva una pérdida de nitrógeno en la comunidad, pudiendo explicar el cociente elevado de C / N encontrado en el análisis geoquímico de esta muestra (figura 30 y tabla 23, apéndice C). También, se puede observar la importancia del catabolismo de aminoácidos en la comunidad microbiana de **Hem** (figura 53). Por otro lado, en **Mag** cabría destacar el valor elevado de la fijación de nitrógeno y en la reducción del nitrito a amonio) lo que sugiere una mayor implicación en el reciclaje del nitrógeno en esta comunidad microbiana (figura 54)

La muestra de Berrocal, **P1**, no destaca particularmente con respecto de las muestras del Origen, salvo en K00368 y K00374 que corresponden a la desnitrificación y la reducción desasimilatoria del nitrato (figura 54), algo que lo posiciona claramente de manera intermedia al comparar el metabolismo del nitrógeno en estas tres muestras (figura 52-54), lo cual es compatible con el hecho de ser una comunidad microbiana con características intermedias entre las muestras **Hem** y **Mag**.

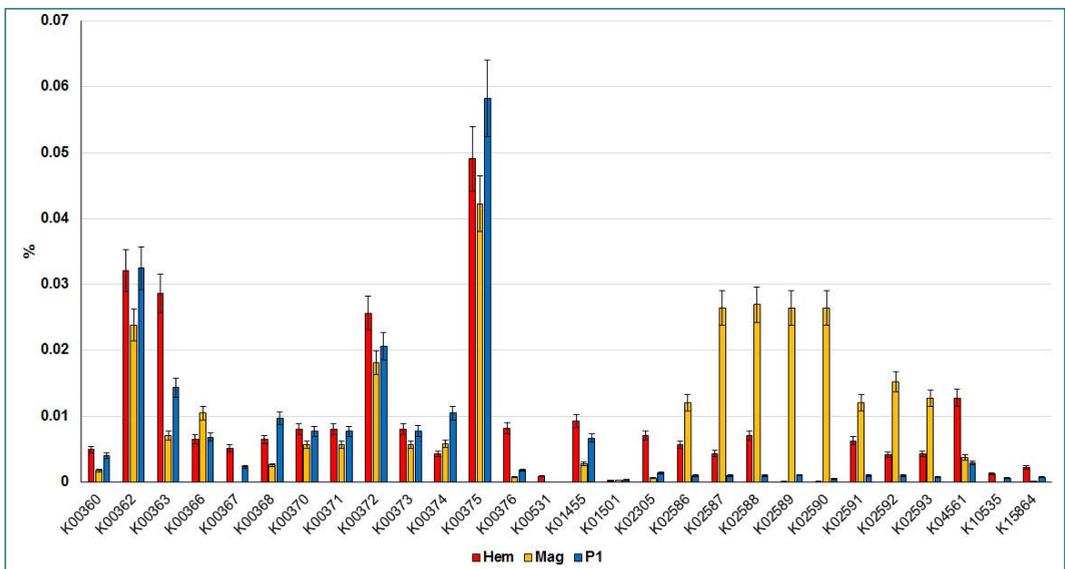


Figura 52: Abundancia relativa de las enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno. Los porcentajes obtenidos se muestran con una barra de error del 10% asignado a cada valor obtenido. Para saber a que encima corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 31, apéndice K. ■

A la vista de estos resultados, lo más parsimonioso es pensar que se da una acumulación progresiva de nitrógeno en el sistema; por un lado, la fijación de nitrógeno en las comunidades microbianas, impulsado por el crecimiento de microorganismos autótrofos fijadores de nitrógeno, como *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* y, por otro lado, una fuente de nitrógeno dependiente de la acumulación de microorganismos procedente de manera externa a las comunidades, lo que favorecería el desarrollo de microorganismos más oportunistas en el ambiente. En el caso de que el nitrógeno sea un factor limitante, la comunidad puede disponer de una biomasa suficiente, provocando la menor dependencia de la limitación de nitrógeno en el sistema, favoreciéndose, en este caso, procesos que limitan el reciclaje de este importante elemento como la desnitrificación.

Los microorganismos heterótrofos obtienen, gracias a la liberación al medio de exopeptidasas, la fuente de carbono y de nitrógeno necesarios para su metabolismo energético y procesos vitales, que en el caso de los sedimentos de Berrocal pueden ser las algas y quimiolitotrofos abundantes en el río que se acumulan en el margen. Sin embargo, la mayor necesidad de una fuente de carbono para sus procesos energéticos excede a la necesidad de nitrógeno, que gracias a la desaminación tienen disponible, lo que permite que el excedente de amonio sea aprovechado por otros microorganismos como fuente de nitrógeno.

Un ambiente extremo oligotrófico con relativamente poca energía debe estar sometido a una fuerte presión selectiva con el fin de mantener el nitrógeno, un factor limitante para el desarrollo del ecosistema, favoreciendo el reciclaje de este elemento, ya que la fijación del nitrógeno atmosférico es un proceso muy costoso energéticamente (Vitousek et al., 2002). Este concepto sería compatible con los bajos valores de la ruta de nitrificación encontrados en las muestras **Mag** y **P1**, lo que podría explicarse por el hecho de que los microorganismos de las comunidades microbianas tienen un aporte adecuado de grupos amonio para la síntesis de aminoácidos. Así mismo la observación de una menor cantidad de materia orgánica en **Mag** apoyaría esta idea.

El amonio de la materia orgánica termina oxidado, convertido en nitrato o nitrito los cuales pueden ser rápidamente metabolizados, lo que evita que el nitrógeno disponible se pierda por desnitrificación, siendo reincorporado a la materia orgánica. En cambio, como se aprecia en la muestra **Hem**, mucho más madura ecológicamente, los valores de desnitrificación son mucho más elevados, lo que podría explicarse por el hecho de que en dicha comunidad microbiana se dispone de una cantidad de nitrógeno suficiente y, al disminuir la presión selectiva, una parte de los nitratos y nitritos puede ser destinada a la ruta de la desnitrificación con el fin de obtener más energía (Zehn et al., 2003), lo que es compatible con la observación de que la fijación de nitrógeno es más importante en **Mag** que en **Hem**.

Los grupos amonio, liberados al sistema debido a la desaminación de los aminoácidos, aumentarían localmente el pH, algo que ya ha sido demostrado en cultivos de enriquecimiento y que se considera una estrategia de supervivencia en ambientes ácidos extremos (Ziegler et al., 2013). Este hecho podría crear micronichos aptos para que otros microorganismos que no toleren condiciones ácidas puedan estar desarrollándose en el sistema como oportunistas. Esto explicaría, además, porqué entre **Hem** y **Mag** se observan grandes diferencias en el cociente C / N, consecuencia de que el nitrógeno es más limitado en una comunidad microbiana más inmadura. Pero con el tiempo, la comunidad, al poder garantizar el suministro suficiente de nitrógeno, opta por utilizar la desnitrificación como sistema de obtención de energía, lo cual es una opción ecológica viable al no haber una limitación

sobre la disponibilidad de nitrógeno, favoreciendo el establecimiento de una mayor diversidad, tal y como se observa en **Hem** respecto de **Mag**.

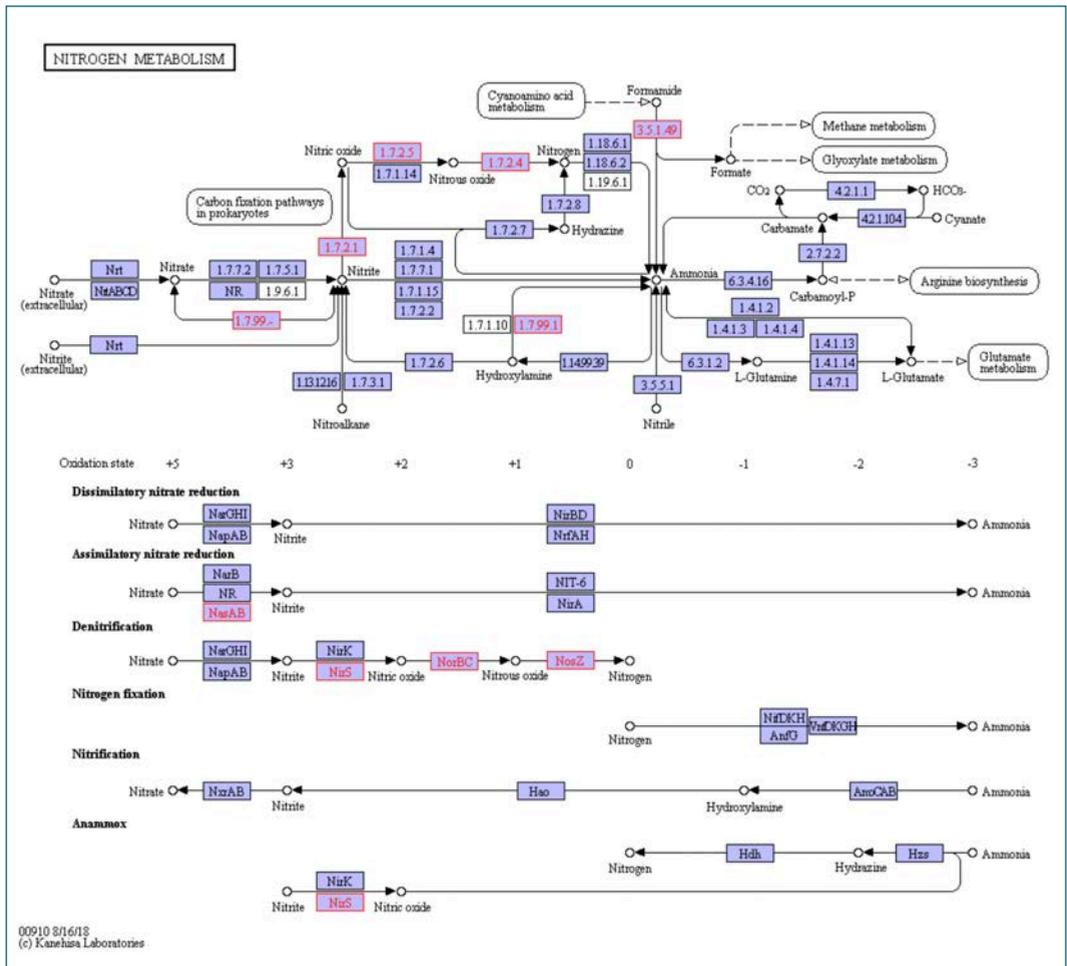


Figura 53: Diferencias en el metabolismo del nitrógeno en Hem con respecto a Mag y P1 remarcados en los cuadrados rojos. Resalta en la imagen la primera parte de la reducción asimilativa de nitrato y desnitrificación. Además, la ruta del metabolismo de los cianoaminoácidos revela la importancia de la degradación de los aminoácidos en la comunidad microbiana. ■

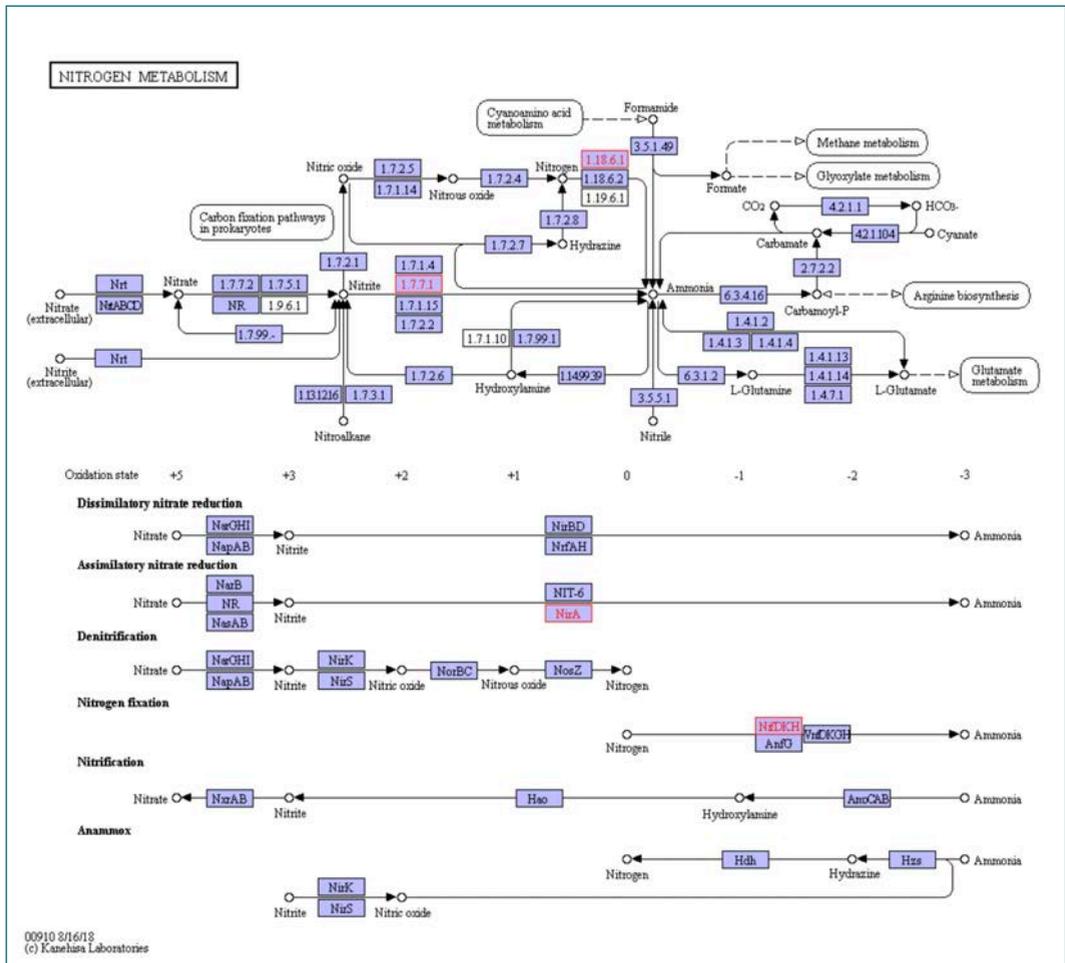


Figura 54: Diferencias significativas encontradas en el metabolismo del nitrógeno en la muestra Mag con respecto a Hem y P1, remarcadas en los recuadros rojos. Se resalta en la imagen la segunda parte de la reducción de nitrato por asimilación y la fijación de nitrógeno. ■

También, la limitación del nitrógeno puede generar una fuerte presión selectiva que conlleve que se favorezcan estrategias metabólicas entre microorganismos con tal de maximizar la energía obtenida con la menor cantidad de nitrógeno, lo que explicaría que en **Hem** encontremos microorganismos que potencialmente han sido descritos como simbiontes en ambientes naturales con capacidad de realizar desnitrificación heterótrofa (Gtari et al., 2012; Castelle et al., 2018)

La presencia de amonio y el aumento del pH favorecerían la oxidación del hierro, provocando que el sistema sea más oxidante con el paso del tiempo, lo que es compatible con la mineralogía observada en **Hem** respecto de **Mag**.

Este cambio de potencial redox también afectaría a la composición de la comunidad microbiana a lo largo del tiempo, por lo que es razonable postular que las comunidades microbianas pueden estar provocando alteraciones químicas que llevan a cambios observables en la mineralogía de las muestras. Sin embargo, no se han encontrado evidencias directas inequívocas de que la presencia de los microorganismos detectados sean precursores directos de los cambios mineralógicos y de composición elemental observados (apartado 5.1), por lo que sería conveniente en un futuro contrastar esta hipótesis y confirmar si los microorganismos están implicados activamente en el proceso, puesto que la mera presencia de microorganismos en un sistema no permite concluir que estén implicados directamente en los procesos.

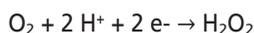
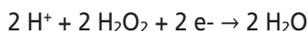
### 5.6.3.3. Transportadores de membrana y enzimas de interés

Dadas las diferencias químicas detectadas en las muestras cuya diversidad se ha analizado por secuenciación, la exploración de los diferentes transportadores de membrana en las comunidades microbianas puede darnos una idea sobre la influencia del ambiente en el que viven. Aunque los transportadores ABC no mostraron diferencias significativas entre **Hem** y **Mag** en términos generales (ko02010, figura 48-A), sí se observaron diferencias a nivel de transportadores específicos (figura 55), destacando en la muestra **Hem** la presencia de transportadores de fosfato, sulfato, Mn/Fe y osmoprotección. En **Mag**, cabría destacar la presencia de determinados transportadores de oligopéptidos (K101823 y K15583), aunque otros transportadores de oligopéptidos fueron más abundantes en la muestra **Hem** (K15581 y K15582), por lo que no se pueden considerar diferencias significativas a este respecto. En el caso de **P1**, los valores fueron similares a la muestra de **Hem**, aunque en la muestra **P1** habría que destacar, al comparar con las muestras del Origen, la presencia de un transportador de hierro (K02012) y de valores elevados en transportadores de oligopéptidos (figura 55)

En cuanto a otros tipos de transportadores, tanto en las comunidades microbianas **P1** como **Hem**, los transportadores de aminoácidos fueron más abundantes (K03293, K03294, K03305) y en **Hem**, los transportadores más abundantes fueron para Mn (K03322), As (K03325) y, especialmente, para Mg y  $\text{SO}_4$  (K03284, K03321; figura 56). Finalmente, como enzimas de interés biológico, habría que destacar el valor ligeramente mayor en **Hem** de la enzima manganoso oxidasa (cotA, K06324) que ha sido descrita en las endosporas de los Firmicutes (Sathiyarayanan et al., 2016).

Cabría destacar en términos generales una gran actividad catalasa en la muestra **Hem** (K03781, aunque en **P1** con la enzima K03781 se destaca ligeramente con respecto a **Hem** y **Mag**), así como la citocromo c peroxidasa en **Hem** (K00428, figura 57) que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. Esto puede deberse a dos factores: por un lado, la presencia de sulfuros metálicos como la piritita que pueden catalizar la producción de peróxido de hidrógeno (Borda et al., 2001) altamente reactivo y con capacidad de dañar las estructuras celulares; por otro lado, la gran cantidad de citocromo c peroxidasa observada puede ser el producto de actividad fotoprotectiva como consecuencia de la formación de peróxido de hidrógeno por la incidencia de la luz sobre moléculas de agua (Kim et al., 2014). En cualquier caso, este peróxido de hidrógeno mediante la citocromo c peroxidasa, puede ser utilizado por los microorganismos como un excelente agente oxidante y así estimular la utilización de fuentes de carbono alternativas (Kaya et al., 2017). Aunque hasta la fecha sólo se ha demostrado el uso del  $\text{H}_2\text{O}_2$  para este fin en *Escherichia coli* (Khademian and Imlay, 2017) y en la bacteria anaerobia *Bacteroides thetaiotaomicron* (Mishra and Imlay, 2013), es razonable pensar que

podiera ser una estrategia muy útil a nivel ambiental, pudiendo actuar tanto como agente oxidante (ecuación 8) como agente reductor (ecuación 9), pero serán necesarias futuras investigaciones para poder demostrar esta habilidad de los microorganismos y si tiene un papel relevante en muestras como las nuestras.



Lo que sí refleja claramente la citocromo c oxidasa en **Hem**, es un mayor estado de oxidación, lo que estaría de acuerdo con los resultados sobre la mineralogía de **Hem**, más oxidante que **Mag**.

En la muestra **Mag** se observó la existencia de un número elevado de transposones (K07481, K07483, K07491, K07493, K07496 y K07497) lo que podría indicar una presencia mayor de elementos genéticos móviles en esta muestra (figura 57), algo que sería compatible con el estrés celular ya que, en condiciones muy estresantes como las generadas por determinadas condiciones ambientales, los microorganismos tienden a ser más propensos al intercambio de material genético o al movimiento de elementos genéticos y expresión diferencial de genes, lo que ha podido favorecer la adaptación y evolución de linajes microbianos en diferentes ambientes (Ward et al., 2018; Zeinert et al., 2018).

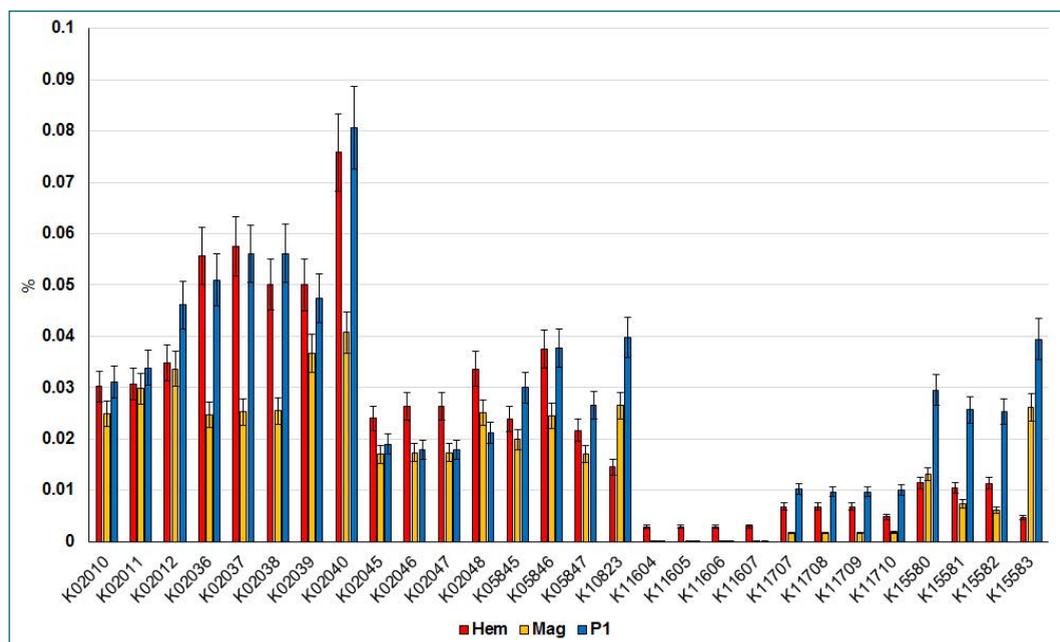


Figura 55: Abundancia relativa de diferentes tipos de transportadores ABC en las muestras ambientales. A cada valor obtenido se le ha asignado un error del 10%. Para saber a que actividad corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 32, apéndice K. ■

También, es interesante observar la presencia de transportadores de compuestos antimicrobianos (K03297), los cuales están algo más representados en las muestras **Mag** y **P1** que en **Hem**.

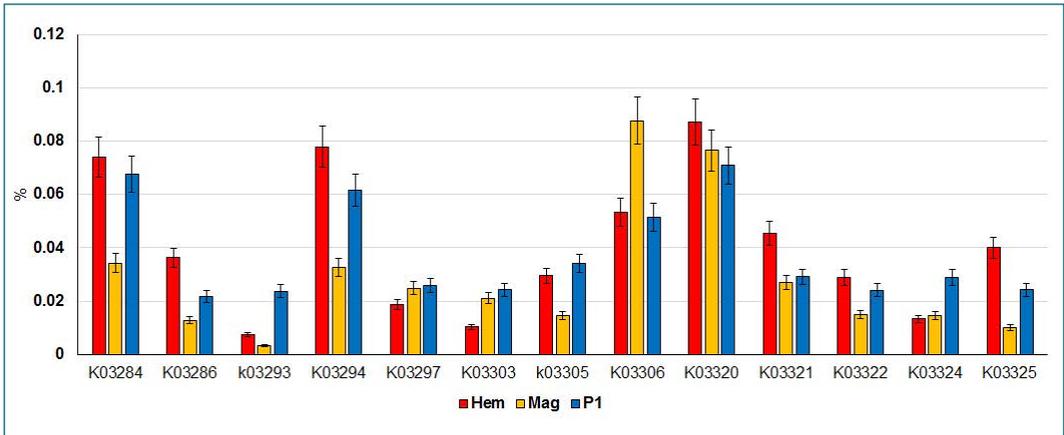


Figura 56: Abundancia relativa de diferentes tipos de transportadores no ABC en las muestras ambientales y se muestra con una barra de error del 10% asignada a cada valor obtenido. Para saber a que actividad corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 33, apéndice K. ■

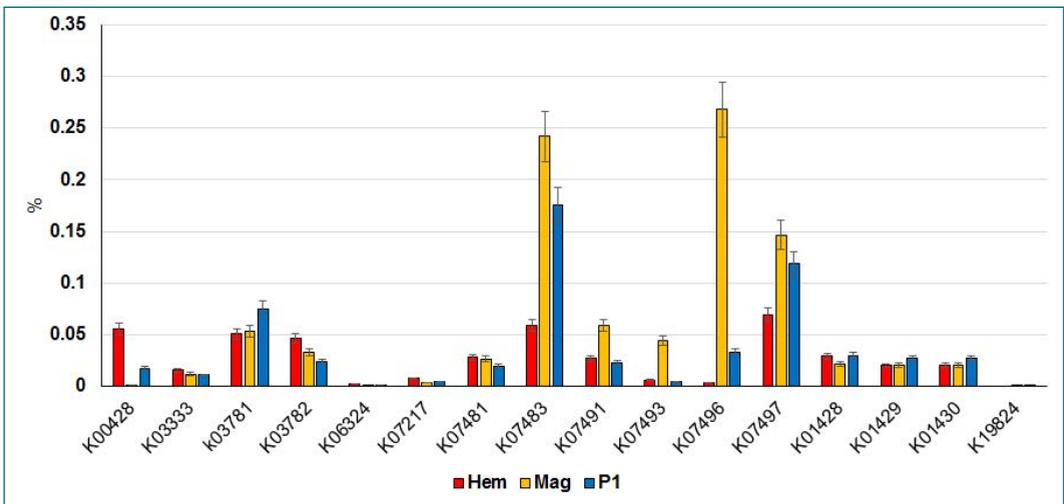


Figura 57: Abundancia relativa de otras enzimas de interés en las muestras ambientales y se muestra con una barra de error del 10% asignada a cada valor obtenido. Para saber a que enzima corresponde cada acrónimo, consultar la tabla 34, apéndice K. ■

#### 5.6.4. Diversidad microbiana identificada por CARD-FISH

Una metodología importante en los estudios de diversidad microbiana en sistemas sólidos como los revestimientos de roca estudiados en este trabajo es la utilización de la hibridación *in situ* con marcadores fluorescentes (CARD-FISH). En el capítulo de Materiales y Métodos (apartado 4.5.9), se explica el fundamento de esta metodología y su utilidad en muestras con minerales que acostumbran a ser autofluorescentes y, por lo tanto, interfieren con la señal de hibridación. En nuestro caso, se han utilizado sondas con especificidades complementarias desde el grupo taxonómico de dominio a género con el fin de apoyar los datos de diversidad obtenidos por secuenciación.

Utilizando la sonda general de Bacterias (EUB338-I-II-III), se pudo detectar la presencia de las mismas en todas las muestras analizadas: **Berr**, **P1**, **Hem** y **Mag**. Las hibridaciones con esta sonda se muestran en la figura 58.

En el caso del dominio Archaea en todas las muestras analizadas se detectó hibridación positiva con la sonda ARCH 915, excepto en la muestra **Hem**, que no mostró ninguna señal de hibridación (figura 59), lo que está de acuerdo con los datos de secuenciación obtenidos, en la que apenas se obtuvieron lecturas para microorganismos de este dominio (apartado 5.6.1.1.1).

Los *phyla* más ampliamente distribuidos en las diferentes muestras hibridadas (**Berr**, **P1**, **Hem** y **Mag**) fueron Actinobacteria, Proteobacteria (clase  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), Chloroflexi y Firmicutes, lo que reflejan su ubicuidad en el sistema del Río Tinto (Amils et al., 2014; Escudero et al., 2018), incluyendo, en nuestro caso, las muestras de revestimiento de rocas.

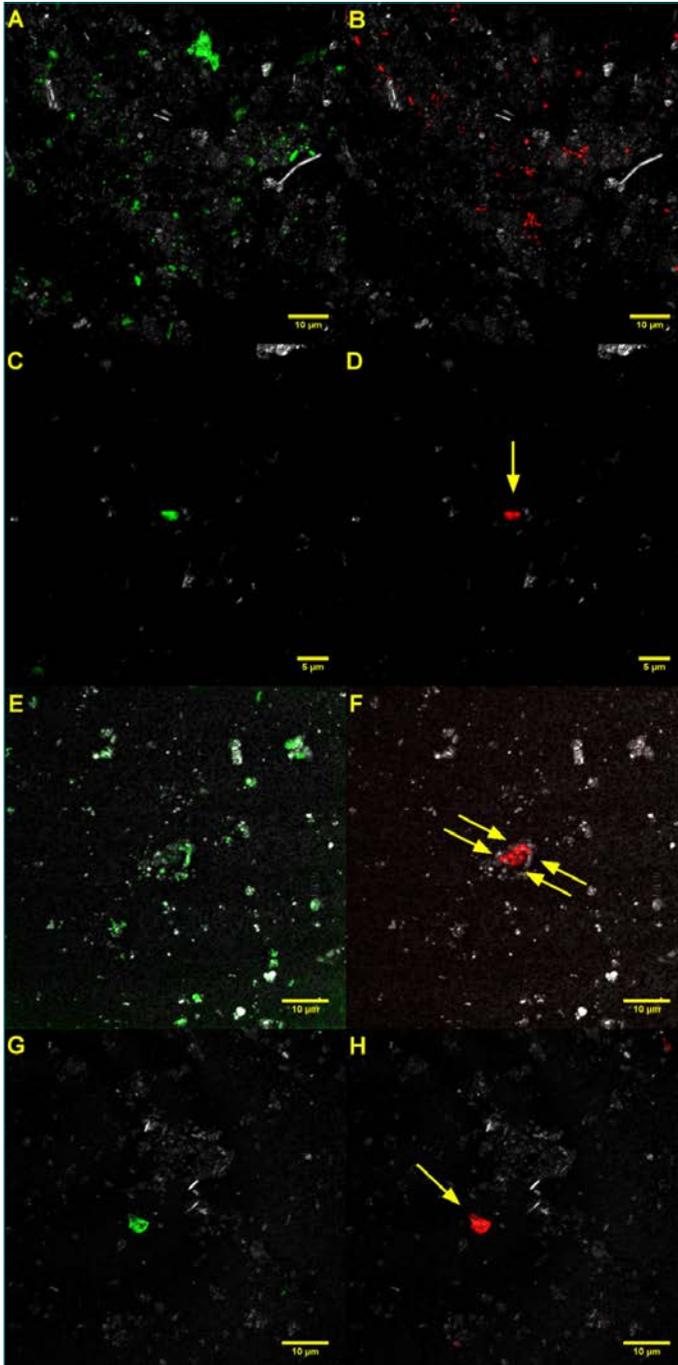


Figura 58: Hibridación positiva de Bacteria en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D), Hem(E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda EUB338-I-II-III combinadas. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH; en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$ , excepto C y D (5  $\mu\text{m}$ ). ■

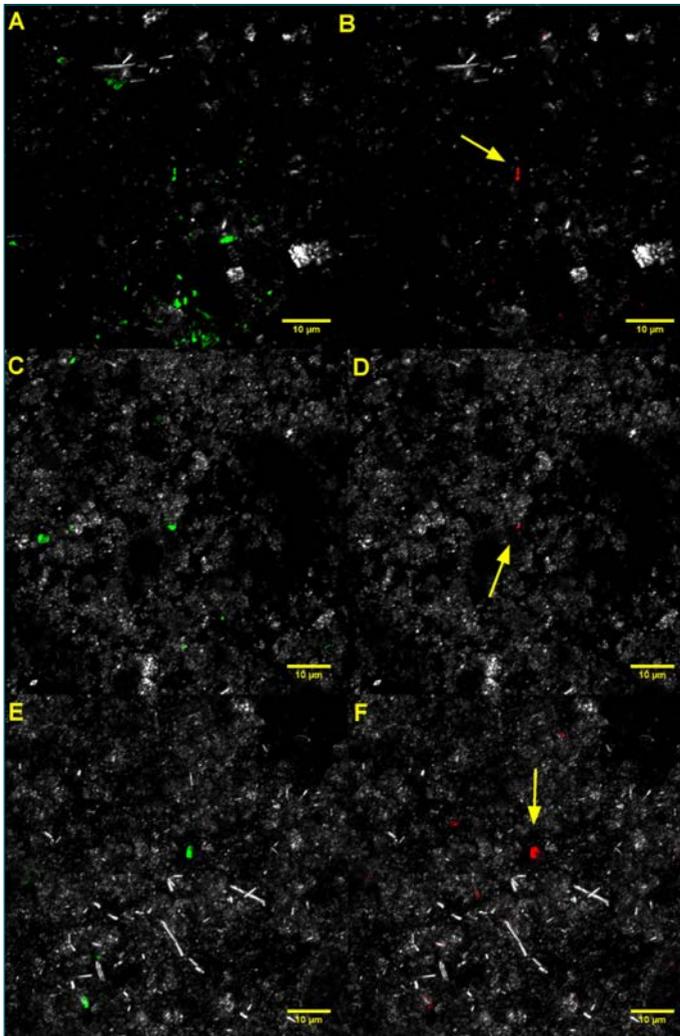


Figura 59: Señal de hibridación en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D) y Mag (E-F) usando la sonda ARCH 915. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH; en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$ . ■

También, se han detectado miembros de las clases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -Proteobacterias en todas las hibridaciones realizadas en las muestras, excepto para  $\beta$ -Proteobacterias en la muestra **Berr** (figura 79-81, apéndice L).

*Acidiphillium* sp. corresponde a una  $\alpha$ -Proteobacteria reductora de hierro en condiciones anaerobias utilizando la materia orgánica como dador de electrones (San Martin-Uriz et al., 2011). Se encontraron señales de hibridación positiva empleando una sonda específica para este género en las muestras **Hem**, **P1** y **Mag**. Estos datos se corresponden con los datos de secuenciación obtenidos para **Hem** y **P1**. En el caso de **Mag**, únicamente disponemos de datos de presencia de *Acidiphillium* por hibridación no habiéndose detectado secuencias de este microorganismo en esta muestra (figura 82

A-D, apéndice L). *Acidovorax* sp., que corresponde a una  $\beta$ -Proteobacteria capaz de oxidar el hierro (II) utilizando nitrato como aceptor de electrones (Carlson et al., 2013; Escudero, tesis 2018) y oxidar As (Suhadolnik et al., 2017). Se encontraron señales de hibridación positiva en todas las muestras analizadas, lo que corrobora los resultados obtenidos por secuenciación (figura 82 E-H, apéndice L), a excepción de la muestra **Mag**, a pesar de que se encontraron miembros de este género en la secuenciación masiva de la muestra.

*Acidithiobacillus ferrooxidans*, es una  $\gamma$ -Proteobacteria capaz de oxidar el hierro en condiciones aerobias o reducirlo en condiciones anaerobias utilizando azufre como donador de electrones (Valdés et al., 2008). Este microorganismo se ha detectado por hibridación y secuenciación en todas las muestras excepto en la muestra **Mag**, lo cual sugiere que el papel de este microorganismo en esta muestra no debe ser relevante, ya que dos técnicas complementarias como secuenciación e hibridación no han evidenciado su presencia (figura 83, apéndice L)

La sonda específica para Actinobacterias ha permitido detectar su presencia en todas las muestras hibridadas (figura 84, apéndice L), lo que, junto a los datos de secuenciación, subraya que se trata de un *phylum* abundantemente distribuido en el ecosistema sujeto de estudio, esperable de un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en suelos y rocas jugando un importante papel en la degradación de la materia orgánica, en la simbiosis entre microorganismos y en algunos géneros en la fijación de nitrógeno, como por ejemplo *Frankia* (Battistuzzi and Hedges, 2008; Gtari et al., 2012; Lewin et al., 2016).

Los microorganismos de los *phyla* Bacteroidetes y Firmicutes fueron ampliamente detectados, tal y como hemos visto mediante secuenciación, y junto con otros microorganismos pueden estar implicados en la degradación de la materia orgánica y en la oxidación / reducción de hierro y manganeso (Nealson et al., 1991; Battistuzzi and Hedges, 2008; Bohu et al., 2016). Sin embargo, las hibridaciones utilizando una sonda específica para Bacteroidetes sólo mostraron una señal positiva de hibridación en la muestra **Mag** (figura 85 A-B) y en el caso de Firmicutes se encontró una señal positiva de hibridación en todas las muestras excepto en la muestra **P1** (figura 85 C-H), tal vez debido a problemas en la permeabilización, ya que sí se encontró señal positiva de hibridación en dicha muestra utilizando una sonda específica para *Sulfobacillus* (figura 86, apéndice L), un género bacteriano incluido en el *phylum* Firmicutes y detectado también por secuenciación (apartado 5.6.1).

De sobra es conocido la capacidad de los Firmicutes de formar endosporas altamente resistentes que pueden haber eludido la permeabilización a la sonda (Amann and Fuchs, 2008). Miembros de *Sulfobacillus* sp. han sido identificados en el subsuelo de la Faja Pirítica Ibérica mediante secuenciación, microarrays de oligonucleótidos, inmunochips (LD300chip) y CARD-FISH (Puente-Sánchez et al., 2016; Escudero, tesis 2018). Este microorganismo es capaz de oxidar el hierro (II) usando como aceptor de electrones el azufre elemental o bien puede oxidar compuestos del azufre para su metabolismo energético (Guo et al., 2016). También, puede reducir arsénico si las condiciones ambientales se lo permiten, probablemente como sistema de detoxificación (Zhang et al., 2017)

*Sulfobacillus* puede desarrollarse en consorcios microbianos con microorganismos de la familia Acidimicrobiales (Actinobacteria). En nuestro caso, hemos identificado numerosos OTUs pertenecientes a esta familia en la muestra **Hem** y con especial abundancia en la muestra **Mag**, lo que apoya la posibilidad de que el desarrollo de ambos tipos de microorganismos en cultivos mixtos sean capaces de oxidar el hierro (II), tal y como se ha podido demostrar en cultivos de laboratorio (Watling et

al. 2008), o de que miembros del género *Sulfobacillus* puedan crecer mixotróficamente utilizando compuestos producidos por *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Clark y Norris, 1996) o *Acidovorax*, encontrándose íntimamente asociados con *Sulfobacillus* en la IPB formando colonias mixtas (Escudero, tesis 2018), siendo estas observaciones compatibles con las características de las comunidades detectadas en la unidad litoestratigráfica del Origen (apartados 5.6.1 y 5.6.3.1). Además, la ausencia de *Sulfobacillus* en la muestra **Hem** evidenciada tanto por secuenciación como por hibridación, así como la menor presencia de Acidimicrobiales en esta muestra estaría de acuerdo con la observación mineralógica de un estado más oxidado en **Hem**, lo que dificultaría el desarrollo de *Sulfobacillus* pudiendo ser desplazado por otros microorganismos más adaptados a las condiciones oxidantes de la muestra (apartado 5.6.3.1).

Se detectaron miembros del *phylum* Chloroflexi en todas las hibridaciones realizadas usando las sondas CFX1223 y la sonda GNSB941 en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen, lo que estaría de acuerdo con los datos de secuenciación, aunque no se identificarían secuencias correspondientes a este *phylum* en **P1** (figura 87, apéndice L)

Habría que indicar que los miembros del *phylum* Chloroflexi son componentes microbianos importantes en numerosos barnices de roca (ej. Northup et al., 2010), lo que permite concluir que pueden ser, junto con los quimiolitotrofos, un eslabón fundamental de la microbiología en las muestras rocosas.

Asimismo, se realizaron hibridaciones con una sonda específica para la subdivisión III de Chloroflexi (CFX109), que incluye microorganismos filamentosos tales como los géneros *Chloroflexu* u *Oscillochloris* y que se sabe que son fotótrofos anoxigénicos (Garrity and Holt, 2001). Sin embargo, esta sonda tampoco reveló ninguna hibridación positiva en las muestras ensayadas.

Para probar la posible presencia de Cyanobacteria en las muestras de roca estudiadas, se realizó una hibridación específica con la sonda CYA361 y, aunque se detectó una señal positiva de hibridación en la muestra **Hem** (figura 88 A-B, apéndice L), ni la secuenciación por Illumina (cuya única secuencia se identificó como secuencias similares a Actinobacteria, apartado 5.6.1.1.1) ni la PCR con cebadores específicos para este grupo de microorganismos revelaron su presencia en **Hem** (figura 71 A-B).

En el caso de las muestras **Mag** y **P1**, sí se detectaron secuencias en Illumina clasificadas como Cyanobacteria / Chloroplast, pero la PCR específica para Cyanobacteria no reveló ninguna señal positiva ni tampoco la hibridación con la sonda CYA 361. Dada la similitud existente entre las secuencias de cloroplastos de eucariotas y las de las cianobacterias (Raven and Allen, 2003), ha resultado imposible diferenciar si estas secuencias realmente corresponden a cianobacterias o corresponden a secuencias de cloroplastos. Estos resultados han sugerido su eliminación en la evaluación del modelo ecológico de las muestras estudiadas, excepto en la muestra **Ror**, ya que en este caso sí hubo amplificación con la PCR específica (apartado 5.6.1)

En cuanto a las bacterias reductoras de sulfato (SRB), cabría resaltar su detección con la sonda específica en todas las muestras analizadas, excepto en la muestra **Berr** (figura 88 C-H, apéndice L). La detección de secuencias por Illumina en **P1** y **Mag** de microorganismos miembros de las familias Peptococcaceae y Peptostreptococcaceae (Firmicutes), las cuales tienen miembros con capacidad reductora de sulfato desasimilativa, y en la muestra **Hem** la detección de secuencias pertenecientes a  $\delta$ -Proteobacteria confirman que esta actividad metabólica está presente en todos los revestimientos

de roca estudiados y que, probablemente, estén acopladas al ciclo de azufre así como a la generación de sulfuros metálicos, tal y como se observa en los sedimentos de Río Tinto (Sanchez-Andrea et al., 2012), favoreciendo los cambios mineralógicos que se observan en la unidad litoestratigráfica del Origen asociados a su capacidad de reducir metales pesados como Cu (II), Fe (III), Mn (IV) o U (VI) (Lovley et al., 2004). Este hecho también podría explicar la presencia de numerosos metales pesados detectados por SEM-EDXM en la muestra de Berrocal **P1** y que no se observan tan abundantemente en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen

La presencia del *phylum* Acidobacteria detectadas por secuenciación en las muestras **Hem** y **Berr** ha sido confirmada por las hibridaciones positivas detectadas en estas muestras (figura 90, apartado L). Sin embargo, se ha evidenciado una hibridación positiva en la muestra **Mag** utilizando una sonda específica para Acidobacteria, lo que no ha podido ser corroborado por los datos de secuenciación (figura 90 E-F, apartado L)

Todas las lecturas identificadas en el *phylum* Nitrospirae corresponden a secuencias del género *Leptospirillum* sp., un microorganismo diazotrófico, acidófilo que oxida el hierro (II) (Fujimura et al., 2012). Se han encontrado señales de hibridación positiva en todas las muestras, utilizando la sonda específica LF 655 (figura 91, apéndice L), pero la secuenciación reveló su presencia únicamente en las muestras de Berrocal (**P1** y **Berr**), un ambiente más susceptible a una mayor presencia de *Leptospirillum* sp. debido a su abundancia en la columna de agua del río (González-Toril et al., 2003).

Existen varios casos en los que no coinciden los datos de secuenciación con los de hibridación. Cabría destacar el caso de los miembros de los *phyla* Bacteroidetes y Firmicutes. Pero como ya se ha comentado en el apartado 5.4.6.2, la falta de señal positiva de hibridación puede ser una consecuencia de la permeabilización de las células, necesaria para que penetre la sonda y se pueda dar la hibridación. La característica de los Firmicutes como los Clostridia de formar endosporas puede explicar, a efectos de hibridación, la ausencia de reconocimiento al existir la posibilidad de no haberse realizado una permeabilización adecuada (Amann and Fuchs, 2008).

El que se haya visto una correlación entre los datos de secuenciación y los de hibridación para *Sulfobacillus* en algunas muestras, hace particularmente relevante el no encontrarlas en la muestra **Hem**, indicando la ausencia de miembros de este género en dicha muestra.

También, es relevante y particularmente sorprendente el hecho de no encontrar en la muestra **Mag** señal positiva de hibridación, ni secuencias por Sanger ni por Illumina de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, un miembro comúnmente encontrado en el ambiente de Río Tinto (Amils et al. 2014). Y más aún cuando la muestra **Mag** está cercana a la base donde fluye el río al brotar del subsuelo, lo que podría ser debido a su degradación rápida a causa de la actividad de otros microorganismos heterótrofos y cuya materia orgánica impulsaría la diversidad microbiana identificada en esta muestra.-

Además, es oportuno remarcar la ausencia de señal de hibridación frente a la sonda específica para *Acidovorax* en **Mag**. En este caso, el número de lecturas identificadas de este género en la muestra fueron muy bajas, por lo que existe la posibilidad de que el número bajo de células haya imposibilitado su identificación por hibridación. Sería recomendable realizar nuevas hibridaciones con el fin de determinar el papel de este interesante microorganismo, capaz de oxidar Fe en condiciones anaerobias en la muestra **Mag**.

En cuanto al dominio Archaea, se encontraron señales positivas de hibridación en todas las muestras para la sonda específica de Euryarchaeota (EURY 806, figura 89, apéndice L), excepto en la

muestra de **Hem**, confirmando los resultados de hibridación obtenidos con la sonda genérica para Archaea (ARCH 915, figura 59) que fueron también negativas para esta muestra, a pesar de haberse encontrado una secuencia por Illumina que las identificaba en la muestra, lo que indica que la importancia de las Archaea en **Hem** debe ser poco significativa a diferencia de la muestra **Mag**, donde pueden tener un mayor peso. Este hecho podría deberse a las diferentes condiciones fisicoquímicas de las muestras ya que, por ejemplo, *Ferroplasma* es un acidófilo oxidador de Fe (II) que requiere la presencia de quimiolitótrofos como *Acidithiobacillus* o *Leptospirillum* que bajen el pH del sistema para poder desarrollarse (Golyshina et al., 2000), lo que debe suceder en la muestra **Mag**. Obviamente, también habría que considerar la distinta mineralogía existente entre ambas muestras.

El 0,5% de las lecturas que han sido identificadas como Archaea en la secuenciación Illumina de **Mag** correspondieron a miembros del género *Methanomethylovorans*, una arquea metanogénica que utiliza metanol como dador de electrones (Jiang et al., 2005), por lo que, en dicha muestra, podría darse actividad metanogénica, proceso metabólico que se da si las condiciones son lo suficientemente reductoras, algo que es más factible de que ocurra en la muestra **Mag** que en la muestra **Hem** dadas las características mineralógicas observadas de su estado de oxidación (apartado 4.1.1). Sin embargo, la hibridación con una sonda específica de Methanosarcinales (MSSH 859) resultó negativa en todas las muestras, lo que podría deberse a su baja abundancia en las muestras estudiadas. Teniendo en cuenta que ya ha habido detección de actividad metanogénica en sedimentos anaerobios del cauce del Río Tinto (Sanz et al., 2011), no es descartable la presencia de actividad metanogénica en **Mag**.



## Discusión fina

Los resultados obtenidos muestran claras diferencias en la composición elemental de las muestras rocosas del Origen y las de Berrocal, lo cual puede ser explicado por las particularidades de cada punto de muestreo (apartado 4.1 y 5.1; Fernández-Remolar et al., 2003).

Las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen no tienen una fuerte influencia directa del cauce del río ya que, en esta zona, el flujo de agua es muy bajo y únicamente está en contacto con la base de la unidad (**Mag**) a la que erosiona. Conforme pasa el tiempo progresivamente se pierde la poca influencia del flujo y se observa una importante transición mineralógica, desde minerales de hierro menos oxidados como la limonita, en la muestra **Mag**, a minerales más oxidados como la hematita, en la muestra **Hem** (apartado 5.1.1).

Estas observaciones de mineralogía, obtenidas por XRD (apartado 5.1.1), muestran una clara diferencia en los estados de oxidación de **Hem** y **Mag**. Además, los análisis bioinformáticos muestran que la comunidad microbiana en **Hem** tiene procesos metabólicos más oxidantes que en **Mag** (apartado 5.6.3), reforzando la idea de una evolución geoquímica temporal en la unidad litoestratigráfica del Origen que va acompañada de una evolución de la composición de la comunidad microbiana (figura 60)

Se han identificado numerosos taxones microbianos en las diferentes muestras del Origen y de Berrocal. Las distintas técnicas aplicadas (secuenciación, hibridación y cultivos de enriquecimiento) han revelado la presencia de microorganismos comunes que se encuentran en las diferentes muestras (ej. *Acidiphilium*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Ralstonia*) mientras que algunos microorganismos se han observado asociados a determinados estados de oxidación, como por ejemplo el género *Sulfobacillus*, detectado en **Mag** y **P1** pero no en **Hem**, o miembros del *phylum* Acidobacteria, ampliamente detectado en **Hem** por diferentes técnicas a diferencia de **Mag** y **P1**, detectado ocasionalmente (apartado 5.6.1).

Las tablas 20 y 21, que se encuentran al final de esta discusión, muestran un resumen de los resultados de diversidad obtenidos mediante las diferentes metodologías utilizadas en este trabajo, en el que se observan las similitudes y diferencias de microorganismos y grupos taxonómicos presentes con sus abundancias relativas con el fin de disponer de una visión global de las características biogeoquímicas y de biodiversidad de las diferentes muestras ambientales estudiadas.

Aparte de una transición geoquímica y mineralógica, la microbiología estudiada en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen, **Mag** y **Hem**, reflejan una transición ecológica definida (figura 61 y 62 respectivamente), con una menor diversidad microbiana y metabólica asociada al estado de menor oxidación del sistema (**Mag**) y que, conforme aumenta el estado oxidado del sistema (**Hem**), aumenta tanto la diversidad microbiana como la diversidad metabólica de la comunidad (figura 60; apartados 4.6.2 y 4.6.3).

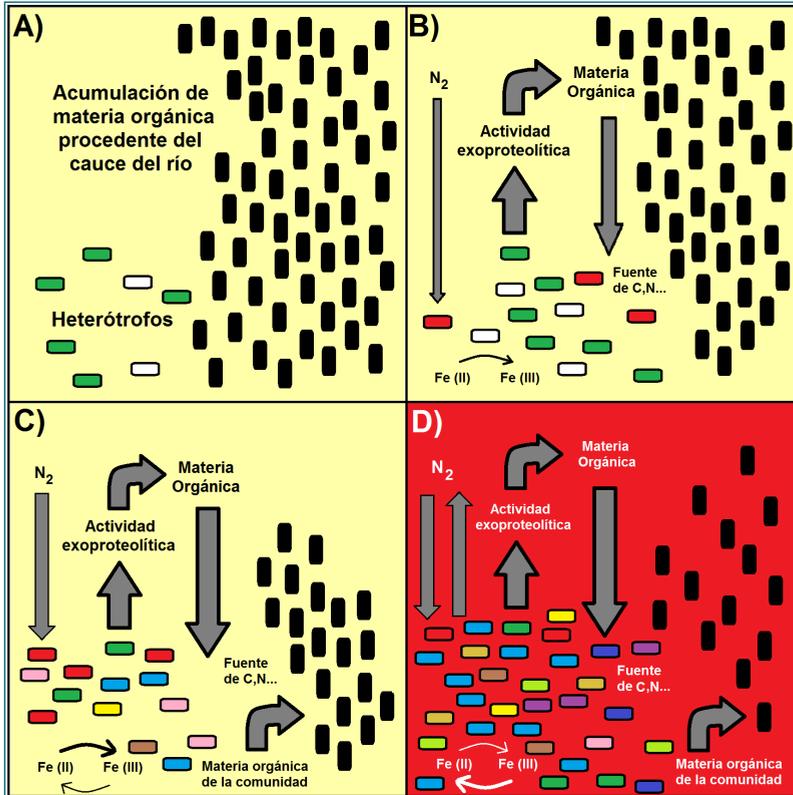


Figura 60: Hipótesis de la evolución temporal de la comunidad microbiana de la unidad litoestratigráfica del Origen. La materia orgánica inicialmente acumulada por el río es utilizada por microorganismos heterótrofos (A), generándose una primera comunidad microbiana sobre la roca, cuya fuente principal de C, N y energía es la materia orgánica acumulada (B). Conforme pasa el tiempo, la comunidad depende menos de esa fuente de N y la actividad microbiana sobre la superficie de la roca provoca cambios geoquímicos (C). Finalmente, la comunidad microbiana es metabólicamente sostenible e independiente del aporte de materia orgánica exterior (D). Se observa, que conforme pasamos de A a D se ha producido la oxidación generalizada del sistema y un aumento en la diversidad de la comunidad microbiana (representado por distintos colores) así como la aparición de procesos energéticos como la desnitrificación cuando el N ya no es un recurso limitante en el sistema ■

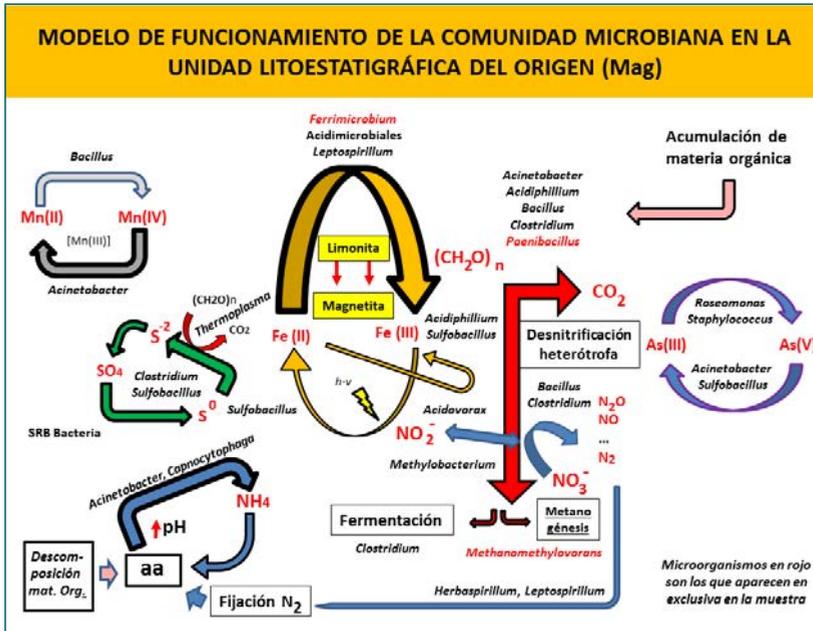


Figura 61: Modelo geomicrobiológico de la muestra Mag, en la unidad litoestratigráfica del Origen. En amarillo, el ciclo del Fe; en rojo, el ciclo del C; en azul el ciclo del N; en verde, el ciclo del S; en azul-violeta, el ciclo del As y en azul pálido el ciclo de Mn. h-v hace referencia a que la luz puede reducir el Fe (III) un posible agente fotoprotector del ecosistema (Gómez et al., 2007). El grosor de las flechas indica la importancia de la ruta en el sistema; en negro, se indican algunos de los principales microorganismos encontrados y en rojo los exclusivos de la muestra. ■

En **Mag**, es evidente una mayor presencia de microorganismos oxidadores de Fe, como *Ferrimicrobium*, un género del *phylum* Actinobacteria. Este género y numerosas secuencias no identificadas más allá del nivel de orden (Acidimicrobiales), están presentes entorno a un 20% de abundancia relativa tanto por secuenciación Sanger como por Illumina. Esto es particularmente interesante por el hecho de que las Acidimicrobiales son un grupo taxonómico dentro de las Actinobacterias que se caracterizan por ser todas ellas oxidadoras de hierro (Stackebrandt et al., 1997). Sin embargo, microorganismos oxidadores comunes de hierro en el sistema de Río Tinto como *Acidithiobacillus* no fueron identificados ni por secuenciación ni por hibridación, *Leptospirillum* sólo fue identificado por hibridación y un pequeño porcentaje de lecturas en el cultivo de enriquecimiento pero no directamente en la muestra.

En **Hem**, destacan microorganismos que se han encontrado de manera exclusiva y que poseen habilidad de fijar  $N_2$  (ej. *Acidothermus*, *Bradyrhizobium*) y, sobretodo, microorganismos con capacidad de utilizar compuestos orgánicos y reducir el ión férrico como *Metallibacterium*, especialmente *Acidiphillum*, identificado en gran abundancia en **Hem**. También, se han observado microorganismos capaces de realizar procesos de desnitrificación (ej. *Ralstonia*, Acidobacteria), tal y como se observó en los análisis bioinformáticos realizados (apartado 5.6.3.2).

Igualmente, destaca la presencia en **Mag** respecto de **Hem** de microorganismos que poseen metabolismos que requieren condiciones reductoras para llevarse a cabo, como la metanogénesis (género *Methanometylovorans*) o la sulfatorreducción (SRB), con la identificación por hibridación de SRB y por secuenciación masiva de microorganismos de la familia Peptococcaceae, Peptostreptococcaceae y, sobretodo, de microorganismos pertenecientes al género *Thermoplasma*, una Archaea acidófil anaerobia facultativa ampliamente identificada en la secuenciación masiva, lo que está en consonancia con el hecho de que sea el sistema más reducido de la unidad litoestratigráfica. También, se identificaron en las muestras microorganismos involucrados con otros ciclos biogeoquímicos, como el del Mn o el del As en **Mag** y **Hem**, pero no parecen ser tan importantes en estos revestimientos, especialmente el del Mn.

Es interesante mencionar en este contexto que hay autores que consideran que el metabolismo del azufre favorece la aparición de asociaciones simbióticas entre microorganismos (Overmann and van Gemerden, 2000), identificándose en las muestras de la unidad litoestratigráfica del Origen microorganismos descritos como potenciales simbiosistas (ej. *Photobacterium* en **Mag** y especialmente CPR en **Hem**), lo que podría indicar la existencia de algún tipo de presión selectiva que favorezca la cooperación metabólica entre distintos tipos de microorganismos para poder obtener el C, N y la energía necesaria para subsistir en el revestimiento.

Aunque en mayor o menor medida en todas las muestras analizadas aparecen microorganismos heterótrofos, es interesante observar que el análisis bioinformático de las comunidades microbianas más oxidadas, **Hem** y **P1**, destacan por una mayor representación de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de compuestos antimicrobianos como la Vancomicina y  $\beta$ -Lactámicos (ko01501 y ko01502, figura 48-B, apartado 5.6.3.3) que podrían ser producidos por las comunidades microbianas de estas muestras para disminuir la competencia interespecífica facilitando la obtención de fuentes de C, N y energía en un sustrato altamente oligotrófico, aunque para confirmar este punto serían necesarios experimentos de laboratorio con aislados o mezclas de los microorganismos presentes en estos revestimientos con el fin de demostrar su operatividad

Dadas las observaciones realizadas en los sedimentos de Berrocal (**Berr**, apartado 5.6.1.2.1), una posible explicación para el mantenimiento de las comunidades, así como el aumento de diversidad durante la maduración de los revestimientos de la unidad litoestratigráfica del Origen, podría ser la acumulación de materia orgánica (figura 60). Esta acumulación propiciaría su utilización por microorganismos heterótrofos impulsando la actividad metabólica de las comunidades microbianas al proveer una importante fuente de C y, sobretodo, de N, un factor limitante del crecimiento.

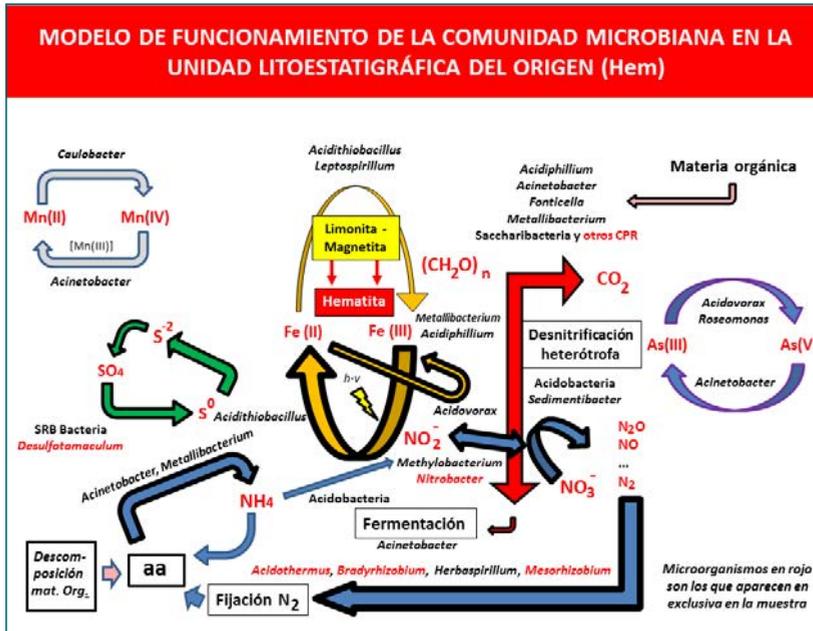


Figura 62: Modelo geomicrobiológico de la muestra Hem, en la unidad litoestratigráfica del Origen. En amarillo, el ciclo del Fe; en rojo, el ciclo del C; en azul, el ciclo del N; en verde, el ciclo del S; en azul-violeta, el ciclo del As y en azul pálido, el ciclo de Mn. h-v hace referencia a que la luz puede reducir el Fe (III) un agente fotoprotector del ecosistema (Gómez et al., 2007). El grosor de las flechas indica la importancia de la ruta en el sistema; en negro, se indican algunos de los principales microorganismos encontrados y en rojo los exclusivos en la muestra. ■

El crecimiento microbiano requiere N, pero la fijación biológica de  $N_2$  requiere un alto coste energético, esto implica que en el ambiente oligotrófico de las superficies rocosas debe de existir un aumento de la presión selectiva que favorezca el reciclaje, lo más efectivo posible, del nitrógeno presente en el sistema, una idea en consonancia con trabajos experimentales realizados (Navarro-González et al., 2001) y con los resultados presentados en este trabajo.

Cuando la biomasa en la comunidad es lo suficientemente grande, se pueden favorecer metabolismos más adecuados a las condiciones más oxidantes del sistema (**Hem**), favoreciendo metabolismos que permitan obtener una mayor cantidad de energía, como la desnitrificación (apartado 5.6.3.2). Lo que de alguna manera indica es que la cantidad de N presente en la comunidad es lo suficientemente abundante como para no requerir su reciclaje, favoreciendo procesos como la desnitrificación, un sistema alternativo de obtención de energía. Los análisis isotópicos realizados indican que la muestra **Hem** presenta una importante pérdida de nitrógeno con respecto a la muestra **Mag** (apartado 5.4), lo cual estaría de acuerdo con el análisis bioinformático del metabolismo del N (apartado 5.6.3.2) y la diversidad metabólica observada en ambas muestras (figuras 61 y 62).

Por lo tanto, las observaciones realizadas en la unidad litoestratigráfica del Origen parecen indicar que un aumento de la diversidad permite llevar a cabo procesos metabólicos más complejos, con

mayor producción de energía y aprovechamiento de los recursos disponibles, facilitando la supervivencia en un ambiente oligotrófico como el revestimiento de las rocas. La presencia de microorganismos del reciente super-*phylum* Patescibacteria (CPR) en la muestra **Hem**, podría estar relacionada con su importante papel en el reciclado de materia orgánica y de N en esta comunidad (Castelle et al., 2018). También, cabe resaltar la posible presencia de microorganismos procarióticos fotosintéticos, aunque su identificación no ha podido ser claramente confirmada, tal y como se discute en la sección de resultados. Por otra parte, conocemos la existencia e identificación en el sistema de estudio de microorganismos fotótrofos eucarióticos (Aguilera et al., 2007), los cuales pueden aportar biomasa como fuente de C, N y energía en las muestras.

A nivel geomicrobiológico, ocurre algo similar a lo descrito para la unidad estratigráfica del Origen puede suceder en la muestra de revestimiento de roca de la zona de Berrocal. En los sedimentos de Berrocal (**Berr**, figura 63), se observa una gran actividad heterótrofa, probablemente nutriéndose de la biomasa de microorganismos quimiolitótrofos acumulados en el margen del río, convenientemente degradada por las exoproteinasas de microorganismos, como *Metallibacterium*. Esto les permite obtener una fuente de C y de N, que, a su vez, gracias a la desaminación de los aminoácidos provoca un aumento local del pH, favoreciendo que otros microorganismos puedan prosperar en estos micronichos al margen de las condiciones ácidas globales en las que se encuentra el ecosistema. Por lo que los sedimentos de Berrocal (**Berr**) pueden ser un buen ejemplo del inicio del desarrollo de las comunidades microbianas sobre las superficies rocosas de esta zona de la cuenca del río Tinto, permitiendo evaluar las distintas variables del sistema y su evolución temporal (pH, oxidación de metales pesados...).

La inundación periódica de los revestimientos de roca en la ubicación de Berrocal, debido al aumento de caudal del cauce del río en la zona en la época lluviosa, introduce una importante variable que no se observa en la zona del Origen, en donde el flujo es mínimo y constante. Por lo tanto, es factible un reciclaje parcial no sólo de la composición de elementos del revestimiento sino también de los microorganismos presentes en el revestimiento.

Esta hipótesis explicaría porqué la comunidad microbiana identificada en la muestra **P1** alcanza un nivel de complejidad intermedia entre la observada en **Mag** y **Hem**, esta última con un mayor grado de oxidación mineralógica. Un elemento importante a tener en cuenta, y que no debemos perder de vista, es intentar averiguar si la comunidad microbiana identificada en **P1** es responsable de los cambios mineralógicos observados en este revestimiento (apartado 5.6.1.2.2 y figuras 47 y 64).

La modificación parcial y recurrente de las condiciones geoquímicas del revestimiento de Berrocal (**P1**), debido a los cambios de flujo del río, debe influir en las condiciones de formación del revestimiento, impidiendo que progrese en su metamorfosis mineralógica a un estado de completa oxidación del hierro, tal y como se observa en **Hem**. Consecuentemente, en **P1** se observan minerales poco comunes como la chamosita férrica, que es difícil de observar en la naturaleza, y que se encuentra, generalmente, asociado a depósitos de hierro (apartado 5.1.2).

A pesar de la dificultad inherente debido a las características ácidas extremas del ecosistema, ha sido posible observar en **P1**, mediante el análisis por SEM, la presencia de elementos no identificados en las muestras de revestimiento de roca del Origen (**Mag** y **Hem**), tales como el Mn o As, en forma de deposiciones en determinadas zonas de la muestra **P1**, asociadas a la presencia de materia orgánica (apartado 5.2.2.1), lo que podría indicar el posible papel de los microorganismos de la comunidad en los cambios mineralógicos observados en este revestimiento.

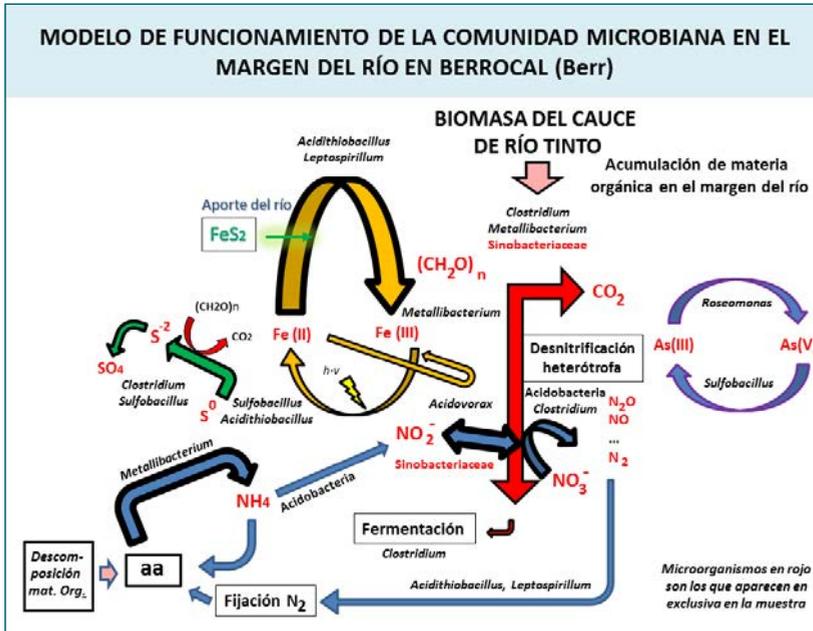


Figura 63: Modelo geomicrobiológico de la muestra Berr de la zona de Berrocal. En amarillo, el ciclo del Fe; en rojo, el ciclo del C; en verde, el ciclo del S; en azul-violeta, el ciclo del As. h-v hace referencia a que la luz puede reducir el Fe (III) un agente fotoprotector del ecosistema (Gómez et al., 2007). El grosor de las flechas indica la importancia de la ruta en el sistema; en negro, se indican algunos de los principales microorganismos encontrados y en rojo, se indican los encontrados de manera exclusiva en la muestra. ■

Por otra parte, la identificación de microorganismos en P1 como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter* (bastante abundante respecto de Hem) y algunos presentes de manera exclusiva en este revestimiento de roca, como *Arthrobacter* y *Paeniglutamibacter*, son capaces todos ellos de oxidar y/o reducir metales pesados (Tebó et al. 2005; Carmichael and Bräuer, 2015), algunos con la habilidad de generar deposiciones acopladas con polímeros extracelulares (Ghiorse and Hirsch, 1979; apartado 5.6.1.2.2), y la observación de precipitados de Mn por SEM (apartado 5.2.2.1), sugieren que determinados procesos, únicamente identificados en Berrocal, son debidos a la influencia de los cambios de flujo del cauce del río, reflejando cambios a nivel local en el pH del revestimiento que pueden estar alejados de las condiciones ácidas extremas imperantes en el sistema, como la presencia de Ca identificada por SEM (apartado 5.2.2.1). De hecho, es previsible que elementos como el Ca o el Mn puedan acumularse en mayor cantidad en los revestimientos situados más alejados del margen del río, ya que están menos expuestos a la lixiviación ácida por el agua del río.

Las evidencias apuntan a la idea de que la deposición en el revestimiento de roca de Berrocal (muestra P1) de cationes como Mn, Ca, As o Fe es inducida biológicamente de manera directa y/o indirecta, compatible con descripciones recientes en la que se postula una transferencia electrónica

extracelular entre minerales semiconductores y comunidades bacterianas electroactivas en barniz de roca (Ren et al., 2019), con una participación importante del pH y la composición química del agua presente en el ambiente y que incide de manera local en la superficie del revestimiento. El flujo de agua favorecería la disolución y renovación de ciertos componentes, mientras que el pH determinaría qué elementos quedan fuertemente anclados sobre la superficie de la roca o cuales se lixivian de la superficie del revestimiento, impidiendo acumularse de manera progresiva a lo largo del tiempo, como por ejemplo el Mn.

Teniendo en cuenta que en el ecosistema del río Tinto es más común encontrar hierro en solución que el manganeso, la lixiviación por el agua ácida explicaría por qué el revestimiento de roca P1 posee un menor enriquecimiento en manganeso y en REEs respecto a la UCC que los revestimientos de roca encontrados en los desiertos y ambientes semiáridos, donde la menor influencia del agua favorece mayores ciclos de acumulación del material polvoriento, una de las principales fuentes de elementos de este tipo de barnices de roca (Macholdt et al., 2017).

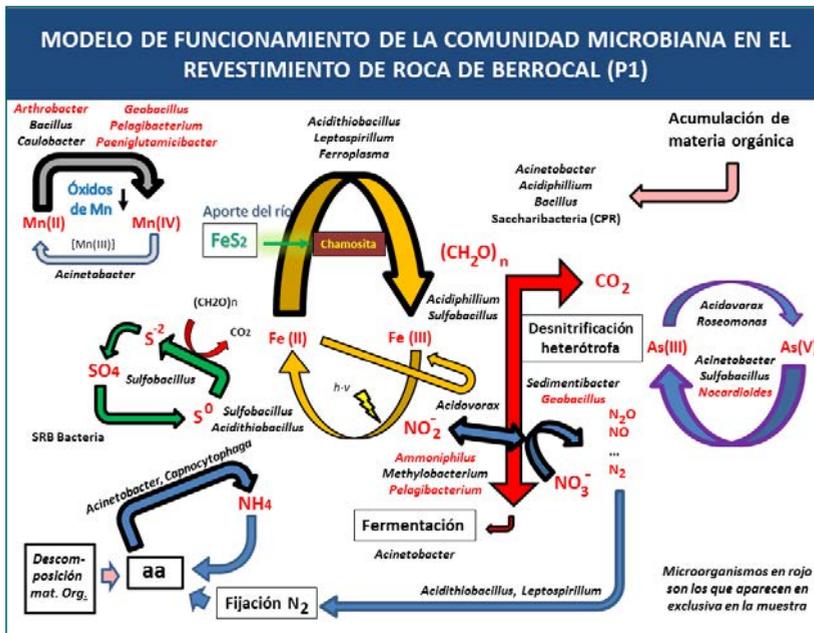


Figura 64: Modelo geomicrobiológico de la muestra P1, el revestimiento de roca situada en la cuenca de Berrocal. En amarillo, el ciclo del Fe; en rojo, el ciclo del C; en azul, el ciclo del N; en verde, el ciclo del S; en azul-violeta, el ciclo del As y en azul pálido, el ciclo de Mn. h-ν hace referencia a que la luz puede reducir el Fe (III) un agente fotoprotector del ecosistema (Gómez et al., 2007). El grosor de las flechas indica la importancia de la ruta en el sistema; en negro, se indican algunos de los principales microorganismos encontrados y en rojo los encontrados de manera exclusiva en la muestra. ■

Además, a diferencia de las muestras del Origen **Hem** y **Mag**, en **P1** se observan por SEM estructuras lisas, no botroidales y con diferentes elementos como Pb, Mn o As, lo que corrobora los resultados obtenidos por ICP-MS sobre la deposición de este tipo de elementos en el revestimiento de roca de Berrocal. Esta deposición se debe, probablemente, al cauce del río que deposita una fina capa de sedimento sobre la roca que finalmente acaba por embeberse en la matriz mineral del revestimiento, facilitando la actividad microbiana su precipitación y fijación sobre la roca. La hipótesis de la deposición de sedimento en el revestimiento **P1** está de acuerdo con el valor negativo del cociente  $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$  medido, típico de acumulación de materia orgánica (Vitoria et al., 2004).

Algunos de los microorganismos singulares encontrados en **P1** han sido descritos anteriormente en el sistema de Río Tinto y en lagos de drenaje ácido de minas enriquecidos en Mn (Santofimia et al., 2013), en los que se observó correlaciones fuertemente positivas con elementos como Mn o Ca así como una correlación negativa con Ba, similar a lo que se ha observado en el revestimiento **P1**, aunque en nuestro caso en roca y no en la columna de agua.

Estos autores encontraron que el pH correlaciona negativamente con la presencia de estos microorganismos en los lagos ácidos de drenaje de minas estudiados y, aunque en nuestro caso la medida del pH en **P1** no fue posible, la tendencia observada para estos microorganismos en esos lagos ácidos permite sugerir que la comunidad de microorganismos en la muestra **P1** podría tener una cierta independencia de las condiciones fisicoquímicas del sistema, algo que apoyaría las observaciones de la presencia de microorganismos como *Metallibacterium* en Berrocal, capaz de modificar el pH del ambiente circundante como consecuencia de su actividad metabólica (Bartsch et al., 2017).

Se ha observado que las películas de hierro y los barnices de roca descritos en la literatura científica (apartado 2.2) tienen similitudes con las diferentes muestras de revestimientos de roca analizadas en la cuenca de Río Tinto. La mineralogía y elementos presentes en **Hem**, **Mag** y **Ror** permiten considerar estas muestras como películas de hierro (apartado 5.3). La comparación de estos revestimientos con las características descritas para los barnices de roca muestra un claro alejamiento de las mismas, lo que refuerza el argumento de considerarlas como películas de hierro (ej. Marnocha et al., 2014). Sin embargo, las características detectadas en **P1** son claramente distintas del resto de los revestimientos analizados (**Hem**, **Mag** y **Ror**) y similares a las descritas para los barnices de roca.

La mineralogía y geoquímica observadas en **P1** es similar a la de los barnices de roca (presencia de arcillas como la Illita, gran cantidad de Fe, enriquecimiento de 3 a 5 veces de Li). Por otro lado, el análisis de la parte externa respecto a la parte interna del revestimiento, que es donde la deposición mineral se asienta, revela un enriquecimiento a nivel local en ciertos elementos químicos compatible con datos observados de otros barnices de roca (Dorn, 2007; Macholdt et al., 2017), Sin embargo, las particularidades de la físico-química de las aguas del río Tinto enmascaran algunas de las características del barniz de roca de Berrocal.

Las condiciones de reincidencia estacional del agua del cauce del río en Berrocal permiten argumentar por qué no se han detectado de manera abundante óxidos de manganeso, una de las características principales de un barniz de roca ya que estamos en un ambiente hídrico ácido extremo que favorece la disolución de óxidos de manganeso (Macholdt et al., 2017), además de la dificultad intrínseca de su detección por técnicas como el XRD y de que la gran cantidad de hierro presente en el sistema enmascara la detección de otros óxidos (Barrón and Torrente, 2013).

La comparación de **P1** con barnices de roca de otros lugares indica que tiene características únicas respecto a otro tipo de barnices (baja cantidad de Mn, ubicación en un ambiente hidrico ácido); por otra parte, los análisis de PCA revelaron una cierta proximidad del revestimiento **P1** con las muestras de barniz tipo V clasificadas por Macholdt et al., 2017, aunque hay que tener en cuenta que los análisis realizados no permiten distinguir entre diferentes barnices tipo V, debido al hecho de que la influencia hídrica particular de cada ambiente genera unos valores de cocientes de elementos diferentes (apartado 5.3).

Dadas las características descritas anteriormente, así como la presencia en **P1** de microorganismos que como *Acinetobacter*, *Arthrobacter* o Acidobacterias han sido recurrentemente asociados a barnices de roca bien caracterizados (ej. Kulhman et al., 2008), consideramos que el revestimiento de roca de la muestra **P1** corresponde a un barniz de roca tipo V peculiar, debido a las condiciones del ambiente ácido extremo en el que se desarrolla. Este barniz de roca es el primero que se ha descrito asociado a las condiciones ácidas extremas existentes en Río Tinto. Sería conveniente caracterizar otros revestimientos de roca en ambientes ácidos extremos con el fin de determinar si definitivamente corresponden al tipo V o pudieran constituir una nueva clase de barniz de roca.

Tabla 20: (Página siguiente) Grupos taxonómicos identificados a nivel de dominio, phylum y orden en las diferentes muestras analizadas con diferentes técnicas de ecología microbiana. Las celdas muestran por un lado las abundancias relativas obtenidas de la secuenciación (apartado 4.6.1) y por otro lado, la presencia o ausencia de hibridación (apartado 4.6.4). El color en la columna del grupo taxonómico indica si se trata de Dominio, Phylum, Clase u Orden. Para su inclusión en la tabla se han seleccionado aquellas que superan el 1% en alguna muestra o bien han sido detectadas por lo menos por dos metodologías. Se incluye en la parte inferior derecha un resumen de los parámetros ecológicos de interés de las muestras ambientales y de los cultivos de enriquecimiento en función del tipo de secuenciación empleado. [1]: Incluye lecturas identificadas como cloroplastos. [2]: Confirmado con PCR específica. [3]: Taxón microbiano recientemente descrito (CPR; Hug et al., 2016). [4]: Se indica en la fila la señal de hibridación con la sonda SRB. [5] Detectado, pero no computado al no ser confirmado por la PCR específica realizada

| Grupo Taxonómico identificado | Zona Origen |      |    |     |    |      |     |      |    | Zona Berrocal |     |     |      |    |     |
|-------------------------------|-------------|------|----|-----|----|------|-----|------|----|---------------|-----|-----|------|----|-----|
|                               | Mag         |      |    | Hem |    |      | Ror | Berr |    |               | P1  |     |      |    |     |
|                               | SG          | ILLU | CE | Hbr | SG | ILLU | CE  | Hbr  | SG | SG            | CE  | Hbr | ILLU | CE | Hbr |
| <b>Archaea</b>                |             |      |    |     |    |      |     | NEG  |    |               |     |     |      |    |     |
| Euryarchaeota                 |             |      |    |     |    |      |     | NEG  |    |               |     |     |      |    |     |
| Methanosarcinales             |             |      |    | NEG |    |      |     | NEG  |    |               |     | NEG |      |    | NEG |
| <b>Bacteria</b>               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Acidobacteria                 |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Actinobacteria                |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Acidimicrobiales              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Frankiales                    |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Micrococcales                 |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Solirubrobacteriales          |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Armatimonadetes               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Bacteroidetes                 |             |      |    | NEG |    |      |     | NEG  |    |               |     | NEG |      |    |     |
| Bacteroidales                 |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Cytophagales                  |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Flavobacteriales              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Sphingobacteriales            |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Chloroflexi                   |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Cyanobacteria [1]             |             | ND   |    | NEG |    | ND   |     | [2]  |    | ND            | NEG | ND  |      |    | NEG |
| Firmicutes                    |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    | NEG |
| Bacillales                    |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Clostridiales                 |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| <b>Patescibacteria [3]</b>    |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Parcubacteria                 |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Saccharibacteria              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Planctomycetes                |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| <b>α-Proteobacteria</b>       |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Caulobacteriales              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Rhizobiales                   |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Rhodobacterales               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Rhodospirillales              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Sphingomonadales              |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| <b>β-Proteobacteria</b>       |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     | NEG |      |    |     |
| Burkholderiales               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Methylophilales               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| <b>γ-Proteobacteria</b>       |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Nevskiales                    |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Pseudomonadales               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| Xanthomonadales               |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     |     |      |    |     |
| <b>δ-Proteobacteria [4]</b>   |             |      |    |     |    |      |     |      |    |               |     | NEG |      |    |     |
|                               | SG          | ILLU | CE | Hbr | SG | ILLU | CE  | Hbr  | SG | SG            | CE  | Hbr | ILLU | CE | Hbr |
|                               | Mag         |      |    | Hem |    |      | Ror | Berr |    |               | P1  |     |      |    |     |

SG = Sanger / ILLU = Illumina / CE = Cultivo de enriquecimiento / Hbr = Hibridación *in situ*

| SECUENCIACIÓN DEL ADN     | SECUENCIACIÓN DEL ADN        | PARÁMETROS ECOLÓGICOS DE INTERÉS (SD= Sin datos) |  |    |  |      |  |
|---------------------------|------------------------------|--|--|----|--|------|--|
|                           |                              | Muestra  |  | SG |  | ILLU |  |
| > 25% Abundancia relativa | Hibridación positiva         |  |  |    |  |      |  |
| 10% - 25%                 | Hibridación negativa         | NEG  |  |    |  |      |  |
| 3% - 10%                  | hibridación no realizada     |  |  |    |  |      |  |
| 1% - 3%                   | <b>GRUPO TAXONÓMICO</b>      |  |  |    |  |      |  |
| < 1%                      | Dominio                      |  |  |    |  |      |  |
| No detectado              | Superphylum / Phylum / Clase |  |  |    |  |      |  |
| No determinado [5]        | Orden                        |  |  |    |  |      |  |

| Géneros identificados         | Zona Origen |      |    |     |     |      |    |     | Zona Berrocal |    |     |      |    |     |
|-------------------------------|-------------|------|----|-----|-----|------|----|-----|---------------|----|-----|------|----|-----|
|                               | Mag         |      |    |     | Hem |      |    |     | Berr          |    |     | P1   |    |     |
|                               | SG          | ILLU | CE | Hbr | SG  | ILLU | CE | Hbr | SG            | CE | Hbr | ILLU | CE | Hbr |
| <b>Archaea</b>                |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Ferroplasma</i>            |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Methanomethylovorans</i> * |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Thermoplasma</i>           |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <b>Bacteria</b>               | SG          | ILLU | CE | Hbr | SG  | ILLU | CE | Hbr | SG            | CE | Hbr | ILLU | CE | Hbr |
| <i>Abiotrophia</i>            |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Acidiphilium</i>           |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     | NEG  |    |     |
| <i>Acidithiobacillus</i>      |             |      |    | NEG |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Acidovorax</i> *           |             |      |    | NEG |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Acinetobacter</i>          |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Anaerococcus</i>           |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Arthrobacter</i> *         |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Bacillus</i>               |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Capnocytophaga</i>         |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Caulobacter</i>            |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Clostridium</i>            |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Desulfotomaculum</i> *     |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Ferrimicrobium</i> *       |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Fonticella</i>             |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Herbaspirillum</i> *       |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Leptospirillum</i>         |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Metallibacterium</i>       |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Methylobacterium</i>       |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Paeniglutamicibacter</i> * |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Peptoniphilus</i>          |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Photobacterium</i> *       |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Ralstonia</i>              |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Roseomonas</i>             |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Sedimentibacter</i> *      |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Sphingomonas</i>           |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Staphylococcus</i>         |             |      |    |     |     |      |    |     |               |    |     |      |    |     |
| <i>Sulfobacillus</i>          |             |      |    |     |     |      |    | NEG |               |    |     |      |    |     |
|                               | SG          | ILLU | CE | Hbr | SG  | ILLU | CE | Hbr | SG            | CE | Hbr | ILLU | CE | Hbr |
|                               | Mag         |      |    |     | Hem |      |    |     | Berr          |    |     | P1   |    |     |

SG = Sanger / ILLU = Ilumina / CE = Cultivo de enriquecimiento / Hbr = Hibridación *in situ*

| SECUENCIACIÓN DEL ADN     | SECUENCIACIÓN DEL ADN    | PARÁMETROS ECOLÓGICOS DE INTERÉS (SD=Sin Datos) |      |      |       |      |      |       |
|---------------------------|--------------------------|---|------|------|-------|------|------|-------|
| > 25% Abundancia relativa | Hibridación positiva     | Muestra   | SG   |      |       | ILLU |      |       |
| 10% - 25%                 | Hibridación negativa     |   | H'   | J'   | H' CE | H'   | J'   | H' CE |
| 3% - 10%                  | hibridación no realizada |   | Mag  | 1,45 | 0,66  | SD   | 3,83 | 0,63  |
| 1% - 3%                   | <b>GRUPO TAXONÓMICO</b>  | Hem   | 1,80 | 0,78 | SD    | 4,31 | 0,67 | 3,08  |
| < 1%                      | Dominio                  | Ror   | 1,37 | 0,66 | SD    | SD   | SD   | SD    |
| No detectado              | Género                   | Berr  | 1,31 | 0,73 | SD    | SD   | SD   | 2,24  |
|                           |                          | P1  | SD   | SD   | 1,30  | 4,20 | 0,71 | SD    |

Tabla 21: Grupos taxonómicos identificados a nivel de Género en las diferentes muestras analizadas con diversas técnicas de ecología microbiana. Las celdas muestran, por un lado, las abundancias relativas obtenidas de la secuenciación (apartado 4.6.1) y, por otro lado, la presencia o ausencia de hibridación (apartado 4.6.4). Para su inclusión en la tabla, se han seleccionado aquellas que superan el 1% en alguna muestra y han sido detectadas por lo menos en dos metodologías independientes. Las excepciones a este filtro, que se han considerado interesantes por las características metabólicas que pueden ejercer en el sistema, se indican con un asterisco al final del nombre del género. Se incluye en la parte inferior derecha un resumen de los parámetros ecológicos de interés de las muestras ambientales y de los cultivos de enriquecimiento en función del tipo de secuenciación empleado.

# Conclusiones

- Las muestras del *Origen* dadas las características morfológicas y geoquímicas pueden ser consideradas *películas de hierro*. Sin embargo, la roca de *Berrocal, P1*, es un revestimiento diferente y que, dadas las características de composición química, mineralógica, observaciones microscópicas y comparación con otros barnices de roca, puede ser caracterizado como un *barniz de tipo V particular* por la química del ambiente hídrico en el que se desarrolla (ácido extremo).
- La conclusión anterior implica que *P1* es el *primer estudio de barniz de roca descrito en un ambiente natural ácido* y el primero en utilizar técnicas complementarias para caracterizar los diferentes taxones microbianos presentes.
- Las Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi y Acidobacteria son los *phyla más abundantes* en las diferentes muestras de roca estudiadas. Los resultados están en consonancia con microorganismos encontrados en trabajos anteriores en la cuenca del Río Tinto y con trabajos de caracterización microbiana de barnices de roca en otros ambientes. Se observa, en la superficie de los revestimientos, un cambio partiendo desde una población microbiana típica de drenaje ácido de minas a una población microbiana subaérea
- A nivel microbiológico se observa un *incremento de la diversidad* y un aumento de la cantidad de materia orgánica en los sistemas *cuando las condiciones oxidantes aumentan* sobre la superficie de los revestimientos, algo claramente observable en la unidad litoestratigráfica del Origen, implicando una *pérdida de nitrógeno* en el sistema que parece correlacionarse con un *aumento de la complejidad* en la microbiología.
- Ese *aumento de complejidad en el sistema* permite llevar a cabo procesos metabólicos menos favorables dadas las limitaciones ambientales del sistema en un estadio de complejidad microbiana mayor, lo que *puede favorecer interacciones ecológicas entre microorganismos* con tal de aprovechar los recursos metabólicos disponibles, tal y como queda reflejado con la *presencia de las CPR* cuando las condiciones oxidantes en el sistema son elevadas.
- Dadas las características microscópicas de las muestras y la diversidad metabólica encontrada (predominantemente *heterótrofa*), éstas pueden tener una importante *influencia en el estado redox sobre la superficie de la roca*, debido a un *pH diferencial* que puede generarse como con-

secuencia del desarrollo de la comunidad microbiana en el sistema, influyendo en los cambios mineralógicos a lo largo del tiempo.

- Se ha establecido un ***modelo geomicrobiológico global*** de funcionamiento de la comunidad microbiana en los diferentes revestimientos sobre la roca en el que destacan el ciclo de hierro, azufre, nitrógeno y carbono con el manganeso y, en menor medida, arsénico, maximizando la cantidad de nitrógeno disponible procedente de la degradación microbiana y usando la materia orgánica disponible como fuente de carbono y energía impulsando con la oxidación del hierro el desarrollo de las comunidades microbianas.

# Referencias

- Aguilera, A.; Souza-Egipsy, V.; Gómez, F. & Amils, R. (2007). Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology*, 53, 294-305.
- Allen, C.C.; Westall, F.; Schelble, R.T. (2001). Importance of a Martian hematite site for astrobiology. *Astrobiology*, 1(1), 111-123.
- Alnaimat, S.; Shattal, S. A.; Althunibat, O.; Alsbou, E.; Amasha, R. (2017). Iron (II) and other heavy-metal tolerance in bacteria isolated from rock varnish in the arid region of Al-Jafer Basin, Jordan. *Biodiversitas*, 18(3), 1250-1257.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Amann, R.; Binder, B.J.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W.; Devereux, R.; Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology*, 56, 1919-1925.
- Amann, R.; Fuchs, B.M. (2008). Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nature Reviews*, 6, 339-348, doi: 10.1038/nrmicro1888.
- Amils, R.; Fernández-Remolar, D.; IPBSL Team (2014). Río Tinto: a geochemical and mineralogical terrestrial analogue of Mars. *Life*, 4, 511-534, doi:10.3390/life4030511.
- Apprill, A.; McNally, S.; Parsons, R.; Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129-137.
- Ashelford, K.E.; Chuzhanova, N.A.; Fry, J.C.; Jones, A.J.; Weightman, A.J. (2006). New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clones libraries contains chimeras. *App. Envir. Microbiol.*, 72, 5734-5741.
- Azúa-Bustos, A.; Fairén, A.G.; González-Silva, C.; Ascaso, C.; Carrizo, D.; Fernández-Martínez, M.A.; Fernández-Sampedro, M.; García-Descalzo, L.; García-Villadangos, M.; Martín-Redondo, M.P.; Sánchez-García, L.; Wierzbos, J.; Parro, V. (2018). Unprecedented rains decimate surface microbial communities in the hyperarid core of the Atacama Desert. *Nature*, 8, 16706, doi: 10.1038/s41598-018-35051-w.
- Bagade, V.; Bachate, P.S.; Dholakia, B.B.; Giri, A.P.; Kodam, K.M. (2016). Characterization of Roseomonas and Nocardioides spp. for arsenic transformation, *Journal of Hazardous Materials*, 318, 742-750, doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.062.
- Banfield, J.F.; Zhang, H. (2001). Nanoparticles in the environment. In: *Nanoparticles and the environment* (Banfield, J.F.; Navrotsky, A., editors). Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 44, Washington, D.C., pp. 1-58.

Barrón, V.; Torrente, J. (2013). Iron, manganese and aluminium oxides and oxyhydroxides. *EMU Notes in Mineralogy*, 14(9), 297-336.

Bartsch, S.; Gensch, A.; Stephan, S.; Doetsch, A.; Gescher, J. (2017). *Metallibacterium scheffle* i: genomic data reveal a versatile metabolism. *FEMS Microbiol Ecol.*, 93 (3), fix01, doi: 10.1093/femsec/fix011

Battistuzzi, F.U.; Hedges, S.B. (2009). A major clade of prokaryotes with ancient adaptations to life on land. *Mol. Biol. Evol.*, 26(2), 335-343, doi: 10.1093/molbev/msn247.

Bennett, K.W.; Eley, A. (1993). *Fusobacteria*: New taxonomy and related diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 39(4), 246-254, doi: 10.1099/00222615-39-4-246.

Berardinis, V.; Durot, M.; Weissenbach, J.; Salanoubat, M. (2009). *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Opinion in Microbiology*, 12, 568-576, doi: 10.1016/j.mib.2009.07.005.

Björnsson, L.; Hugenholtz, P.; Tyson, G.W.; Blackall, L.L. (2002). Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology*, 148, 2309-2318.

Boetius, A.; Ravensschlag, K.; Schubert, C.J.; Rickert, D.; Widdel, F.; Gieseke, A.; Amann, R.; Jørgensen, B.B.; Witte, U.; Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*, 407(6804), 623-626.

Bohu, T.; Akob, D.M.; Abratis, M.; Lazar, C.S.; Küsel, K. (2016). Biological low-Ph Mn (II) oxidation in a manganese deposit influenced by metal-rich groundwater. *Appl. Envir. Microbiol.*, 82(10), 3009-3021.

Bond, P.; Banfield, J. (2001). Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for *in situ* detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments. *Microbial ecology*, 41, 149-161.

Borda, M.J.; Elsetinow, A.R.; Schoonen, M.A.; Strongin, D.R. (2001). Pyrite-induced hydrogen peroxide formation as a driving force in the evolution of photosynthetic organisms on an early Earth. *Astrobiology*, 1(3), 283-288.

Boswell, C.D.; Dick, R.E.; Eccles, H.; Macaskie, L.E. (2001). Phosphate uptake and release by *Acinetobacter johnsonii* in continuous culture and coupling of phosphate release to heavy metal accumulation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 333-340.

Bradley, R.; Boado, F. C.; Valcarce, F. (1994). Rock art research as landscape archaeology. A pilot study in Galicia, North-West Spain. *World Archaeology*, 25(3), 374-390.

Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; González-Peña, A.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.C.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.; Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh, P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7(5), 335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.

Carmichael, S.K.; Bräuer, S.L. (2015). Microbial diversity and manganese cycling: a review of Mn-oxidizing microbial cave communities. In: Engel, A.S. (Ed.), *Microbial Life of Cave Systems. Life in Extreme Environments*. De Gruyter, Boston, MA, pp. 137-160.

- Castelle, C.J.; Brown, C.T.; Anantharaman, K.; Probst, A.J.; Huang, R.H.; Banfield, J.F. (2018). Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature reviews Microbiol.*, 16, 629-645, doi: 10.1038/s41579-018-0076-2.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.*, 17, 550-552.
- Castro, H.F.; Williams, N.H.; Ogram, A. (2000). Phylogeny of Sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.*, 31, 1-9.
- Cavaletti, L.; Monciardini, P.; Bamonte, R.; Schumann, P.; Rohde, M.; Sosio, M.; Donadio, S. (2006). New lineage of filamentous, spore-forming, Gram-Positive bacteria from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6), 4360-4369. doi: 10.1128/AEM.00132-06.
- Chakraborty, A.; Roden, E.E.; Schieber, J.; Picardal, F. (2011). Enhanced growth of *Acidovorax* sp. strain 2AN during nitrate-dependent Fe(II) oxidation in batch and continuous-flow systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(24), 8548-8556, doi: 10.1128/AEM.06214-11.
- Clark, D.A.; Norris, P.R. (1996). Acidimicrobium ferrooxidans gen. nov., sp.nov: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, 142, 785-790.
- Cole, J.R.; Wang, Q.; Fish, J.A.; Chai, B.; McGarrell, D.M.; Sun, Y.; Brown, C.T.; Porras-Alfaro, A.; Kuske, C.R.; Tiedje, J.M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, 42, D633-D642. doi: 10.1093/nar/gkt1244.
- Cornell, R. M.; Schwertmann, U. (2003). *The iron Oxides*. Wiley-VCH.
- Daims, H.; Brühl, A.; Amann, R.; Schleifer, K.-H.; Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 434-444.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. (2012). jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772.
- Darwin, C. (1845). *Journal of Researches into the natural history and geology of the countries visited during the voyage of the H.M.S. Beagle round the world, under the command of captain Fitz Roy*. 2<sup>nd</sup> ed. London, Abermale Street.
- DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Delevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *App. Envir. Microbiol.*, 72(7), 5069-5072. doi: 10.1128/AEM.03006-05.
- Direito, S.O.; Marees, A.; Röling, W.F. (2012). Sensitive life detection strategies for low-biomass environments: optimizing extraction of nucleic acids adsorbing to terrestrial and Mars analogue minerals. *FEMS Microbiol Ecol.*, 81(1), 111-123, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01325.x.
- Dixon, J.B.; White, N. (2002). Manganese oxides. In: *Soil Mineralogy with Environmental Applications* (Dixon, J.B; Schulze, D.G., editors). SSSA Book Series, Madison, Wisconsin, USA, pp. 323-366.
- Dorn, R. I.; Oberlander, T. M. (1981). Microbial origin of desert varnish. *Science*, 213, 1245-1247. doi:10.1126/science.213.4513.1245.
- Dorn, R.I.; Cahill, T.A.; Eldred, R.A.; Gill, T.E.; Kusko, B.; Bach, A.; Elliot-Fisk, D.L. (1990). Dating rock varnishes by the cation method with PIXE, ICP, and the electron microprobe. *International Journal of PIXE*, 1, 157-195.
- Dorn, R.I.; Krinsley, D. H. (1991). Cation-leaching sites in rock varnish. *Geology*, 19, 1077-1080.

Dorn, R. I.; Meek, N. (1995). Rapid formation of rock varnish and other rock coatings on slag deposits near Fontana. *Earth Surface Processes and Landforms*, 20, 547-560.

Dorn, R.I. (2000). Petroglyphs in Petrified Forest National Park: role of rock coatings as agents of sustainability and as indicators of antiquity. *Bulletin of Museum of Northern Arizona*, 63, 52-63.

Dorn, R.I. (2007). Rock Varnish. In Nash, D.J. & McLaren, S.J. (Eds.), *Geochemical sediments and landscapes* (Ch.8; pp.246-297). Wiley-Blackwell.

Dorn, R.I. (2013). Rock coatings. In Shroder, J. (Chief editor), Pope, G.A. (Ed.), *Treatise of Geomorphology* (Ch.4; pp.70-97). Academic Press San Diego, C.A.

Druschel, G.K.; Baker, B.J.; Gihring, T.M.; Banfield, J.F. (2004). Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California. *Geochemical transactions*, 5(2), 13-32.

Elifantz, H.; Malmstrom, R.R.; Cottrell, M.T.; Kirchman, D.L. (2005). Assimilation of polysaccharides and glucose by major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7799-7805, doi: 10.1128/AEM.71.12.7799-7805.2005.

Engel, C.G.; Sharp, R.S. (1958). Chemical data on desert varnish. *Geological Society of American Bulletin*, 69, 487-518.

Eppard, M.; Krumbein, W.E.; Koch, C.; Rhiel, E.; Staley, J.E.; Stackebrandt, E. (1996). Morphological, physiological, and molecular characterization of Actinomycetes isolated from dry soil, rocks, and monument surfaces. *Arch. Microbiol.*, 166, 12-22.

Escudero, C. (2018). Fluorescence microscopy for the *in situ* study of the Iberian Pyrite Belt subsurface geomicrobiology (PhD Thesis). Universidad Autónoma de Madrid.

Escudero, C.; Vera, M.; Oggerin, M.; Amils, R. (2018). Active microbial biofilms in deep poor porous continental subsurface rocks. *Scientific Report* , 8, 1538. doi: 10.1038/s41598-018-19903-z.

Esposito, A.; Ahmed, E.; Ciccazzo, S.; Sikorski, J.; Overmann, J.; Holmström, S. J. M.; Brusetti, L. (2015). Comparison of rock varnish bacterial communities with surrounding non-varnish rock surfaces: taxon-specific analysis and morphological description. *Microb. Ecol.* doi:10.1007/s.00248-015-0617-4.

Fahrbach, M.; Kuever, J.; Remesch, M.; Huber, B. E.; Kampfer, P.; Dott, W.; Hollender, J. (2008). *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *International Journal of Syst. Evol. Microbiol.*, 58(9), 2215-2223. doi:10.1099/ijs.0.65342-0.

Fernández-Remolar, D.C.; Rodríguez, N.; Gómez, F.; Amils, R. (2003). Geological record of an acidic environment driven by iron hydrochemistry: the Tinto river system. *Journal of Geophysical research*, 108(E7), 5080, doi: 10.1029/2002JE001918.

Fernández-Remolar, D.C.; Morris, R.V.; Gruener, J.E.; Amils, R.; Knoll, A.H. (2005). The rio Tinto basin, Spain: mineralogy, sedimentary geobiology, and implications for interpretation of outcrop rocks at Meridiani Planum, Mars. *Earth and Planetary Science Letters*, 240, 149-167, doi: 10.1016/j.epsl.2005.09.043.

Francis, C.A.; Co, E-M.; Tebo, B.M. (2001). Enzymatic manganese (II) oxidation by a marine  $\alpha$ -Proteobacterium. *App. Environ. Microbiol.*, 67(9), 4024-4029, doi: 10.1128/AEM.67.9.4024-4029.2001.

Friedrich, C.G.; Bardischewsky, F.; Rother, D.; Quentmeier, A.; Fisher, J. (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Current opinion Microbiol.*, 8, 253-259, doi: 10.1016/j.mib.2005.04.005.

- Fujimura, R.; Sato, Y.; Nishizawa, T.; Oshima, K.; Kim, S-W.; Hattori, M.; Kamijo, T.; Ohta, H. (2012). Complete Genome Sequence of *Leptospirillum ferrooxidans* Strain C2-3, Isolated from a Fresh Volcanic Ash Deposit on the Island of Miyake, Japan. *Journal Bacteriol.*, 194(15), 4122-4123.
- García-Moyano, A.; González-Toril, E.; Aguilera, A.; Amils, R. (2012). Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Río Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 81, 303-314.
- Garrity, G.M.; Holt, J.G. (2001). Phylum BVI. Chloroflexi phy. nov.. In Boone D.R.; Castenholz, R.W. (eds.). *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. In Garrity, G.M. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, (2nd ed., Vol 1, pp. 427-446). Springer-Verlag, New York.
- Ghiorse, W.C.; Hirsch, P. (1979). An ultrastructural study of iron and manganese deposition associated with extracellular polymers of *Pedomicrobium*-like budding bacteria: *Archives of Microbiology*, 123, 213-226.
- Ghosh, W.; Mallick, S.; DasGupta, S.K. (2009). Origin of the SOX multienzyme complex system in ancient thermophilic bacteria and coevolution of its constituent proteins. *Research in Microbiology*, 160, 409-420.
- Ghosh, S.; Das, A.P. (2017). Bioleaching of manganese from mining waste residues using *Acinetobacter* sp. *Geology, Ecology and Landscapes*, 1:2, 77-83, doi: 10.1080/24749508.2017.1332847.
- Gich, F.; Garcia-Gil, J.; Overmann, J. (2001). Previously unknown and phylogenetically diverse members of the green non-sulfur bacteria are indigenous to freshwater lakes. *Archives of microbiology*, 177, 1-10.
- Giovannoni, S.J.; DeLong, E.F.; Olsen, G.J.; Pace, N.R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, 170(2), 720-726.
- Godfrey, L.V.; Falkowski, P.G. (2009). The cycling and redox state of nitrogen in the Archaeean ocean. *Nature Geoscience*, 2(10), 725-729, doi: 10.1038/ngeo633.
- Golyshina, O.V.; Pipovarova, T.A.; Karavaiko, G.I.; Kondrat'eva, T.F.; Moore, E.R.B.; Abraham, W-R.; Lünsdorf, H.; Timmis, K.N.; Yakimov, M.M.; Golyshin, P.N. (2000). *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int. Journal Syst. Evol. Biol.*, 50, 997-1006.
- Gómez, F.; Aguilera, A.; Amils, R. (2007). Soluble ferric iron as an effective protective agent against UV radiation: implications for early life. *Icarus*, 191, 352-359, doi: 10.1016/j.icarus.2007.04.008.
- González-Toril, E. (2002). *Ecología molecular de la comunidad microbiana de un ambiente extremo: el río Tinto*. (PhD Thesis). Universidad Autónoma de Madrid.
- González-Toril, E.; Llobet-Brossa, E.; Casamayor, E.O.; Amann, R.; Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto river. *Appl. Env. Microbiol.*, 69(8), 4853-4865.
- González-Toril, E.; Aguilera, A.; Souza-Egipsy, V.; López-Pamo, E.; Sánchez-España, J.; Amils, R. (2011). Geomicrobiology of La Zarza-Perrunal Acid mine effluent (Iberian Pyrite Belt, Spain). *Appl Environ Microbiol.*, 77(8), 2685-2694.
- Gorbushina, A.A.; Boettcher, M.; Brumsack, H-J.; Krumbein, W.E.; Vendrell-Saz, M. (2001). Biogenic forsterite and opal as a product of biodeterioration and lichen stromatolite formation in the table mountain systems (Tepuis) of Venezuela. *Geomicrobiol. J.*, 18, 117-132.

Gorbushina, A.A.; Broughton, W.J. (2009). Microbiology of the atmosphere-rock interface: how biological interactions and physical stresses modulate a sophisticated microbial ecosystem. *Annu. Rev. Microbiol.*, 63,431-450.

Gtari, M.; Ghodhbane-Gtari, M.; Nouioui, I.; Beauchemin, N.; Tisa, L.S. (2012). Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing Actinobacteria. *Arch. Microbiol.*, 194, 3-11, doi: 10.1007/s00203-011-0733-6.

Guindon, S.; Gascuel, O. (2003). PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biology*, 52(5), 696-704.

Guo, W.; Zhang, H.; Zhou, W.; Wang, Y.; Zhou, H.; Chen, X. (2016). Sulfur metabolism pathways in *Sulfobacillus acidophilus* TPY, a Gram-Positive moderate thermoacidophile from a hydrothermal vent. *Front. Microbiol.*, 7, 1861, doi: 10.3389/fmicb.2016.01861.

Hall, T.A. (1999). Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, 41, 95-98.

Hammer, Ø.; Harpen, D.A.T.; Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.

Hem, J.D.; Lind, C.J. (1983). Nonequilibrium models for predicting forms of precipitated manganese oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47, 2037-2046.

Hill, T.C.J.; Walsh, K.A.; Harris, J.A.; Moffett, B.F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43(1), 1-11, doi: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x.

Houlton, B.Z.; Morford, S.L.; Dahlgren, R.A. (2018). Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science*, 360, 58-62.

Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F. (2001). Mr.Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755, doi: 10.1093/bioinformatics/17.8.754.

Hug, L.A.; Baker, B.J.; Anantharaman, K.; Brown, C.T.; Probst, A.J.; Castelle, C.J.; Butterfield, C.N.; Hemsdorf, A.W.; Amano, Y.; Ise, K.; Suzuki, Y.; Dudek, N.; Relman, D.A.; Finstad, K.M.; Admonson, R.; Thomas, B.R.; Banfield, J.F. (2016). A new view of the tree of life. *Nature Microbiol.*, 1, 16048, doi: 10.1038/NMICROBIOL.2016.48.

Humboldt, A. (1852) *Personal narrative of travels to the equinoctial regions of America during the years 1799-1804*. Henry Bohn, London, England.

Hungate, B.; Danin, A.; Pellerin, N.B.; Stemmler, J.; Jkellander, P.; Adams, J.B.; Staley, J.T. (1987). Characterization of manganese oxidizing (MnII → MnIV) bacteria from Negev Desert rock varnish: implications in desert varnish formation. *Can. J. Microbiol.*, 33, 939-943.

Iwai, S.; Weinmaier, T.; Schmidt, B.L.; Albertson, D.G.; Poloso, N.J.; Dabbagh, K.; DeSantis, T.Z. (2016). Piphillin: improved prediction of metagenomic content by direct inference from human microbiomes. *PLOS*, 11(11), e0166104, doi: 10.1371/journal.pone.0166104.

Jiang, B.; Parshina, S.N.; Doesburg, W.C.J.; Lomans, B.P. (2005). Methanomethylovorans *thermophila* sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol. *Int. Journal Syst. Evol. Biol.*, 55, 2465-2460, doi: 10.1099/ijs.0.63818-0.

Justice, N.B.; Norman, A.; Brown, C.T.; Singh, A.; Thomas, B.C.; Banfield, J. (2014). Comparison of environmental and isolate *Sulfobacillus* genomes reveals diverse carbon, sulfur, nitrogen, and hydrogen metabolisms. *BMC Genomics*. 15(1): 1107, doi: 10.1186/1471-2164-15-1107.

- Kabir, M.; Sudhamsu, J.; Crane, B.R.; Yeh, S.-R.; Rosseau, D.L. (2012). Substrate-Ligand interactions in *Geobacillus Stearothermophilus* Nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 47(47), 12389-12397, doi: 10.1021/bi801491e.
- Kaya, A.; Mariotti, M.; Gladyshev, V.N. (2017). Cytocrome c peroxidase facilitates the beneficial use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in prokaryotes. *PNAS*, 114(33), 8678-8680, doi: 10.1073/pnas.1710943114.
- Khademian, M.; Imlay, J.A. (2017). *Escherichia coli* cytochrome c peroxidase is a respiratory oxidase that enables the use of hydrogen peroxide as and terminal electron acceptor. *PNAS*, 114:E6922–E6931.
- Kielak, A.M.; Barreto, C.C.; Kowalchuk, G.A.; Van Veen, J.A.; Kuramae, E.E. (2016). The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front. Microbiol.*, 7, 744, doi: 10.3389/fmicb.2016.00744
- Kim, E.-J.; Oh, E.-K.; Lee, J.K. (2014). Peroxidase and photoprotective activities of magnesium Protoporphyrin XI. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(1), 36-43, doi: 10.4014/jmb.1311.11088.
- Koschinsky, A.; Hein, J.R. (2017). Marine ferromanganese encrustations: archives of changing oceans. *Elements*, 13, 177-182.
- Krinsley, D.H.; Dorn, R.I.; DiGregorio, B.E.; Langworthy, K.A.; Ditto, J. (2012). Rock varnish in New York: an accelerated snapshot of accretionary processes. *Geomorphology* 138, 339–351. doi: 10.1016/j.geomorph.2011.09.022.
- Kubota, K. (2013). CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes Environ.*, 28(1), 3-12. doi: 10.1264/jsme2.ME12107.
- Kuhlman, K. R.; Allenbach, L. B.; Ball, C. L.; Fusco, W. G.; La Duc, M. T.; Kuhlman, G. M.; Anderson, R. C.; Stuecker, T.; Erickson, I.K.; Benardini, J.; Crawford, R. L. (2005). Enumeration, isolation, and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains, California. *Icarus*, 174, 585-595.
- Kuhlman, K. R.; Fusco, W. G.; La Duc, M. T.; Allenbach, L. B.; Ball, C. L.; Kuhlman, G. M.; Anderson, R. C.; Erickson, I. K.; Stuecker, T.; Benardini, J.; Strap, J. L.; Crawford, R. L. (2006). Diversity of microorganisms within rock varnish in the Whipple Mountains, California. *Appl. Env. Microbiol.*, 72(2), 1708-1715.
- Kuhlman, K.R.; Venkat, P.; La Duc, M.T.; Kuhlman, G.M.; McKay, C.P. (2008). Evidence of a microbial community associated with rock varnish at Yungay, Atacama desert, Chile. *J. Geol. Research*, 113 (G04022), 1-14, doi:10.1029/2007JG000677.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Eds.), John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- Lang-Yona, N.; Maier, S.; Macholdt, D.S.; Müller-Germann, I.; Yordanova, P.; Rodriguez-Cabalero, E.; Jochum, K.P.; Al-Amri, A.; Andreae, M.O.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Weber, B. (2018). *Env. Microbiol. Reports*, 10(3), 264-271, doi: 10.1111/1758-2229.12634.
- Lanza, N.L.; Fischer W.W.; Wiens, R.C.; Grotzinger J.; Ollila, A.M.; Cousin, A.; Anderson, R.B.; Clark, B.C.; Gellert, R.; Mangold, N.; Maurice, S.; Le Mouélic, S.; Nachon, M.; Schmidt, M.; Berger, J.; Clegg, S.M.; Forni, O.; Hardgrove, C.; Melikechi, N.; Newsom, H.E.; Sautter, V. (2014). High manganese concentrations in rocks at Gale Crater, Mars. *Geophys. Res. Lett.*, 41:5755–5763.

Leblanc, M., Morales, J., Borrego, J., and Elbaz-Poulichet, F. (2000). 4500-year-old mining pollution in southwestern Spain: long-term implications for modern mining pollution. *Economic Geology*, 95, 655-662.

Leon-Zayas, R.; Peoples, L.; Biddle, J.; Podell, S.; Novotny, M.; Cameron, J.; Lasken, R.S.; Bartlett, D.H. (2017). The metabolic potential of the single cell genomes obtained from the Challenger Deep, Mariana Trench within the candidate superphylum Parcubacteria (OD1). *Environ. Microbiol.*, 19(7), 2769-2784, doi: 10.1111/1462-2920.13789.

Lewin, G.R.; Carlos, C.; Chevrette, M.C.; Horn, H.A.; McDonald, B.R.; Stankey, R.J.; Fox, B.G.; Currie, C.R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual Rev. Microbiol.*, 70, 235-254, doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095748.

Liu, T. (2003). Blind testing of rock varnish microstratigraphy as a chronometric indicator: results on late Quaternary lava flows in the Mojave Desert, California. *Geomorphology*, 53, 209-234.

Li Yang, G.; Hou, S.G.; Baoge, R.L.; Li, Z.G.; Xu, H.; Liu, Y.P.; Du, W.T.; Liu, Y.Q. (2016). Differences in bacterial diversity and communities between glacial snow and glacial soil on the Chongce Ice Cap, west Kunlun mountains. *Nature Science Reports*, 6:36548, doi: 10.1038/srp36548.

Lovley, D. R.; Holmes, D. E.; Nevin, K. P. (2004). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Advances in microbial physiology*, 49, 219-286.

Lozano, R.P.; Rossi, C. (2012). Exceptional preservation of Mn-oxidizing microbes in cave stromatolites (El Soplao, Spain). *Sedimentary Geology*, 255-256, 42-55.

Lucas, A. (1905). *The blackened rocks of the Nile cataracts and of the Egyptian deserts*, Cairo: National Printing Department.

Macholdt, D. S.; Jochum, K. P.; Pöhlker, C.; Stoll, B.; Weis, U.; Weber, B.; Müller, M.; Kappl, M.; Buhre, S.; Kilcoyne, A. (2015). Microanalytical methods for in-situ high resolution analysis of rock varnish at the micrometer to nanometer scale. *Chem. Geology*, 411, 57–68.

Macholdt, D. S.; Jochum, K. P.; Pöhlker, C.; Arangio, A.; Förster, J. -D.; Stoll, B.; Weis, U.; Weber, B.; Müller, M.; Kappl, M.; Shiraiwa, M.; Kilcoyne, A.; Weigand, M.; Scholz, D.; Haug, G.H.; Al-Amri, A.; Andreae, M.O. (2017) Characterization and differentiation of rock varnish types from different environments by microanalytical techniques. *Chem. Geology*, 459, 91-118.

Malherbe, C.; Hutchinson, I.B.; Ingley, R.; Boom, A.; Carr, A.S.; Edwards, H.; Vertruyen, B.; Gilbert, B.; Eppe, G. (2017). On the habitability of desert varnish: a combined study by micro-Raman spectroscopy, X-ray diffraction and methylated pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Astrobiology*, 17, 11, doi: 10.1089/ast.2016.1512.

Malotki, E; Wallace, H.D. (2011). Columbian Mammoth petroglyphs from the San Juan river near Bluff, Utah, United States. *Rock Art Research*, 28(2), 143-152.

Mancinelli, R.L.; Bishop, J.L.; De, S. (2002). Magnetite in desert varnish and applications to rock varnish on Mars. *Lunar and Planetary Science*, 33, 1046.

Manz, W.; Amann, R.; Ludwig, W.; Wagner, M.; Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and applied microbiology*, 15, 593-600.

Marnocha, C.L.; Dixon, J.C. (2013). Bacterial communities in Fe/Mn films, sulphate crusts, and aluminium glazes from Swedish Lapland: implications for astrobiology on Mars. *International Journal Astrobiology*, 12(4), 345-356, doi: 10.1017/S1473550413000232.

- Marnocha, C.L.; Dixon, J.C. (2014). Endolithic bacterial communities in rock coatings from Kärkevage, Swedish Lapland. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 90, 533-542. doi: 10.1111/1574-6941.12415.
- McKeown, D.A.; Post, J.E. (2001). Characterization of manganese oxides mineralogy in rock varnish and dendrites using X-ray absorption spectroscopy. *American mineralogist*, 86, 701-713.
- Meier, H.; Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1999). Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 186-196.
- Meisinger, D.B.; Zimmermann, J.; Ludwig, W., Schleifer, K.H.; Wanner, G.; Schmid, M.; Bennet, P.C; Engel, A.S.; Lee, N.M. (2007) In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental microbiology*, 9, 1523-1534.
- Mishra, S.; Imlay, J.A. (2013). An anaerobic bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, uses a consortium of enzymes to scavenge hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*, 90(6), 1356-1371, doi: 10.1111/mmi.12438.
- Moissl-Eichinger, C. (2011). Archaea in artificial environments: their presence in global spacecraft clean rooms and impact on planetary protection. *ISME Journal*, 5, 209-219, doi: 10.1038/ismej.2010.124.
- Mora, M.; Perras, A.; Alekhova, T.A.; Wink, L.; Krause, R.; Aleksandrova, A.; Novozhilova, T.; Moissl-Eichinger, C. (2016). Resilient microorganisms in dust samples of the International Space Station. Survival of the adaptation specialist. *Microbiome*, 4, 65. doi: 10.1186/s40168-016-0217-7.
- Navarro-González, R.; McKay, C.P.; Mvondo, D.N. (2001). A possible nitrogen crisis for Archaean life due to reduced nitrogen fixation by lightning. *Nature*, 412, 61-64.
- Nawrocki, E.P., Kolbe, D.L.; Eddy, S.R. (2009). Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics*, 15, 25 (10), 1335-7, doi: 10.1093/bioinformatics/btp157.
- Nealson, K.H.; Myers, C.R.; Wimpee, B.B. (1991). Isolation and characterization of manganese-reducing bacteria and estimates of microbial Mn (IV)-reducing potential in the Black Sea. *Deep-Sea Research*, 38(2), 907-920.
- Neef, A. (1997). Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozöosen. Munich, Germany. Technical University Munich.
- Nijjer, S.; Thonstad, J.; Haarberg, G. M. (2000). Oxidation of manganese (II) and reduction of manganese dioxide in sulphuric acid. *Electrochimica Acta*, 46, 395-399.
- Northup, D. E.; Burns, S.M.; Yu, L.E.; Spilde, M.N.; Schelbe, R.T.; Dano, K.E.; Crossey, L.J.; Conolly, C.A.; Boston, P.J.; Natvig, D.O.; Dahm, C.N. (2003). Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechugilla and Spider caves. *Environm. Microbiol.*, 5(11), 1071-1086. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00500.x.
- Northup, D. E.; Snider, J. R.; Spilde, M. N.; Porter, M. L.; van de Kamp, J. L.; Boston, P. J.; Nyberg, A. M.; Bargar, J. R. (2010). Diversity of rock varnish bacterial communities from Black Canyon, New Mexico. *J. Geol. Research*, 115 (G02007), 1-19, doi: 10.1029/2009JG001107.
- Nübel, U.; Garcia-Pichel, F.; Muyzer, G. (1997). PCR Primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *App. Environ. Microbiol.*, 63(8), 3327-3332.

Oksanen, J.; Blanchet, F.G.; Friendly, M.; Kindt, R.; Legendre, P.; McGlin, D.; Minchin, P.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.; Solymos, P. and others (2017). *vegan*: community ecology package. R package version 2.4-3.

Omar, K.A. (2014). Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on manganese dioxide nanoparticles at different pH values. *IMPACT: IJRET*, 2(5), 241-248.

Overmann, J.; van Gernerden, H. (2000). Microbial interactions involving sulfur bacteria: implications for the ecology and evolution of bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol.*, 24(5), 591-599, doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00560.x.

Palmer, F.E.; Staley, J.T.; Murray, R.G.E; Counsell, T.; Adams, J.B. (1986). Identification of manganese-oxidizing bacteria from desert varnish. *Geomicrobiology Journal*, 4(4), 343, 360, doi: 10.1080/01490458609385943.

Parada, A.E.; Needham, D.M.; Fuhrman, J.A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.*, 18(5), 1403-1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023.

Parks, D.H.; Chuvochina, M.; Waite, D.W.; Rinke, C.; Skarshewski, A.; Chaumeil, P.A.; Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotech.*, 36, 996-1004, doi: 10.1038/nbt.4229.

Peccia, J.; Marchand, E.A.; Silverstein, J.; Hernandez, M. (2000). Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilium*. *Applied and environmental microbiology*, 66, 3065-3072.

Perry, R.S.; Engel, M. H.; Botta, O.; Staley, J. T. (2003). Amino acid analyses of Desert varnish from the Sonoran and Mojave deserts. *Geomicrobiol. Journal*, 20, 427-438.

Perry, R.S.; Kolb, V. (2004). Biological and organic constituents of desert varnish: review and new hypothesis. *Proceedings of SPIE*. doi: 10.1117/12.509695.

Petzsch, P.; Poehlein, A.; Johnson, D.B.; Daniel, R.; Schölmann, M.; Mühling, M. (2015). Genome sequence of the acidophilic Sulfate-Reducing *Peptococcaceae* strain CEB3. *Genome Announc.*, 3(4), e00886-15, doi: 10.1128/genomeA.00886-15.

Pierson B.K.; Castenholz, R.W. (1974) A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch. Microbiol.*, 100, 5–24.

Posth, N. R.; Konhauser, K.O.; Kappler, A. (2013). Microbial processes in banded iron formation deposition. *Sedimentology*, 60, 1733-1754, doi: 10.1111/sed.12051.

Puente-Sánchez, F., Sánchez-Román, M., Amils, R., and Parro, V. (2014) *Tessaracoccus lapidicaptus* sp. nov., an actinobacterium isolated from the deep subsurface of the Iberian pyrite belt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 3546-3552.

Puente-Sánchez, F. (2016) Microbial ecology of the Iberian Pyrite Belt deep subsurface. (PhD Tesis), Universidad Autónoma de Madrid.

Puente-Sánchez, F., Arce-Rodríguez, A.; Oggerin, M.; García-Villadangos, M.; Mmoreno-Paz, M.; Blanco, Y.; Rrodríguez, N.; Bird, L.; Lincon, S.A.; Tornos, F.; Prieto-Ballesteros, O.; Freeman, K.H.; Pieper, D.H.; Timmis, K.N.; Amils, R.; Parro, V. (2018). Viable Cyanobacteria in the deep continental subsurface. *PNAS*, 115(42), 10702-10707.

- Quast, C.; Pruesse E.; Yilmaz P.; Gerken J.; Schweer T.; Yarza P.; Peplies J.; Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.*, 41(D1), D590-D596.
- R Core Team (2014). R: An language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Raven, J.A.; Allen, J.F. (2003). Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biology*, 4(3), 209, PMID: 12620099.
- Raymond, R.; Guthrie, G.; Bish, D.; Reneau, S.; Chipera, S. (1993). Biomineralization of manganese in rock varnish. *Catena Supp.*, 21, 321.
- Ren, G.; Yan, Y.; Nie, Y.; Lu, A.; Wu, X.; Li, Y.; Wang, C.; Ding, H. (2019). Natural extracellular electron transfer between semiconducting minerals and electroactive bacterial communities occurred on the Rock Varnish. *Frontiers in Microbiology*, 10, 293, doi: 10.3389/fmicb.2019.00293.
- Révész, K.; Qi, H.; Coplen, T. B. (2012). Determination of the d15N and d13C of total nitrogen and carbon in solids. RSIL lab code 1832. (Révész, K.; Coplen T.B. Eds.). Stable isotope-ratio methods, in *Methods of the Reston Stable Isotope Laboratory* (Reston: U.S. Geological Survey).
- Roller, C.; Wagner, M.; Amann, R.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (1994). In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology*, 140, 2849-2858.
- Rudnick, R.L.; Fountain, D.M. (1995). Nature and composition of the continental crust: a lower crustal perspective. *Reviews of Geophysics*, 33(3), 267-309.
- Rudnick, R.L.; Gao, S. (2003). Composition of the continental crust. *Treatise of Geochemistry*, 3, 1-64. doi: 10.1016/B0-08-043751-6/03016-4.
- Ruepp, A.; Graml W.; Santos-Martinez M.L.; Koretke K.K.; Volker C.; Mewes H.W.; Frishman D.; Stocker S.; Lupas A.N.; Baumeister W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*, 407(6803), 508-513.
- Ruijter, J.M.; Ramakers, C.; Hoogars, W.M.; Karlen, Y.; van der Hoff, M.J.; Moorman, A.F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.*, 37(6), e45, doi:10.1093/nar/gkp045.
- Sakurai, K.; Yoshikawa, H. (2012). Isolation and identification of bacteria able to form biofilms from deep subsurface environments. *Journal of Nuclear Science Technology*, 49(3), 287-292.
- Salter, S.J.; Cox, M.J.; Turek, E.M.; Calus, S.T.; Cookson, W.O.; Moffart, M.F.; Turner, P.; Parkhill, J.; Loman, N.J.; Walker, A.W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 12, 87.
- Samarkin, V.A.; Madigan, T.M.; Bowles, M.W.; Casciotti, K.L.; Priscu, J.L.; McKay, C.P.; Joye, S.B. (2010). Abiotic nitrous oxide emission from the hypersaline Don Juan Pond in Antarctica. *Nature Geoscience*, 3, 341-344.
- San Martín-Uriz, P.; Gómez, M.; Arcas, A.; Bargiela, R. (2011). Draft genome sequence of the electricigen *Acidiphilium* sp. strain PM (DSM 24941). *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5585-5586, doi: 10.1128/JB.05386-11.
- Sánchez-Andrea, I.; Rodríguez, N.; Amils, R.; Sanz, J.L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl. Env. Microbiol.*, 77, 6085-6093.

Sánchez-Andrea, I.; Knittel, K.; Amann, R.; Amils, R.; Sanz, J.L. (2012). Quantification of Tinto river sediment microbial communities: importance of sulphate-reducing bacteria and their role in attenuating acid mine drainage. *Appl. Env. Microbiol.*, 78(13), 4638-4645.

Sánchez-García, L., Fernández-Martínez, M.A.; García-Villadangos, M.; Blanco, Y.; Cady, S.L.; Hinman, N.; Bowden, M.E; Pointing, S.B.; Lee, K.C.; Warren-Rhodes, K.; Lacap-Bugler, D.; Cabrol, N.A.; Parro, V.; Carrizo, D. (2019). Microbial biomarker transition in high-altitude Sinter Mounds from El Tatio (Chile) through different stages of hydrothermal activity. *Front. Microbiol.*, 9, 3350, doi: 10.3389/fmicb.2018.03350.

Sánchez-Román, M.; Fernández-Remolar, D.; Amils, R.; Sánchez-Navas, A.; Schmid, T.; San Martín-Uribe, P.; Rodríguez, N.; McKenzie, J.; Vasconcelos, C. (2014). Microbial mediated formation of Fe-carbonate minerals under extreme acidic conditions. *Nature Scientific Reports*, 4, 4767, doi: 10.1038/srep04767.

Santofimia, E.; González-Toril, E.; López-Pamo, E.; Gomariz, M.; Amils, R.; Aguilera, A. (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*, 8(6), e66746.

Sanz, J.L.; Rodríguez, N.; Díaz, E.E.; Amils, R. (2011). Methanogenesis in the sediments of Río Tinto, an extreme acidic river. *Env. Microbiol.*, 13, 2336-2341.

Sathiyarayanan, G.; Fillipidou, S.; Junier, T.; Rufatt, J.M.; Jeanneret, N.; Wunderlin, T.; Sieber, N.; Dorador, C.; Junier, P. (2016). Manganese-II oxidation and Copper-II resistance in endospore forming Firmicutes isolated from uncontaminated environmental sites. *AIMS Environmental Sciences*, 3(2), 220-228, doi: 10.3934/environsci.2016.2.220.

Schelble, R.T.; McDonald, G.D.; Hall, J.A.; Neelson, K.H. (2005). Community structure comparison using FAME analysis of desert varnish and soil, Mojave desert, California. *Geomicrobiology Journal*, 22, 353-360, doi: 10.1080/01490450500248754.

Schindler, M.; Dorn, R.I. (2017). Coatings on rocks and minerals: the interface between the lithosphere and biosphere, hydrosphere and atmosphere. *Elements*, 13, 155-158.

Schmid, G.; Zeitvogel, F.; Hao, L.; Ingino, P.; Floetenmeyer, M.; Stierhof, Y.D.; Schroepfel, B.; Burkhardt, C.J.; Kappler, A.; Obst, M. (2014). 3-D analysis of bacterial cell-(iron) mineral aggregates formed during Fe (II) oxidation by the nitrate-reducing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1 using complementary microscopy tomography approaches. *Geobiology*, 12, 340-361.

Schmidt, H.H.; Eickhorst, T.T.; Tippkötter, R.R. (2012). Evaluation of tyramide solutions for an improved detection and enumeration of single microbial cells in soil by CARD-FISH. *J. Microbiol. Methods*, 91(3), 399-405.

Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.

Schönhuber, W.; Zarda, B.; Eix, S.; Rippka, R.; Herdman, M.; Ludwig, W.; Amann, R. (1999). In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology*, 65, 1259-1267.

Schulze, R.; Spring, S.; Amann, R.; Huber, I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Kämpfer, P. (1999). Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 22, 205-214.

- Shihua, T.; Racz, G.J.; Boon Goh, T. (1994). Transformations of synthetic birnessite as affected by pH and manganese concentration. *Clays and Clay Minerals*, 42(3), 321-330.
- Silhavy, T.J.; Kahne, D.; Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2, a00414, doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
- Spearman, C. (1904). The proof and measurement of association between two things. *American Journal Psychology*, 15(1), 72-101.
- Stackebrandt, E.; Rainey, F.; Ward—Rainey, N. (1997). Proposal of a new Hierarchic classification system Actinobacteria classis nov. *Int. Journal Sys. Bacteriol.*, 47(2), 479-491.
- Staden, R. (1996). The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233-241.
- Stahl, D.A.; Amann, R. (1991). *Development and application of nucleic acid probes*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Stanton, C.L.; Reinhard, C.T.; Kasting, J.F.; Ostrom, N.E.; Haslun, J.A.; Lyons, T.M.; Glass, J.B. (2018). Nitrous oxide from chemodenitrification: a possible missing link in the Proterozoic greenhouse and the evolution of aerobic respiration. *Geobiology*, 16(6), 597-609.
- Stulnig, T.M.; Amberger, A. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques*, 16, 402-404.
- Suhadolnik, M.L.S.; Salgado, A.P.C.; Scholte, L.L.S.; Bleicher, L.; Costa, P.C.; Reis, M.P.; Dias, M.F.; Ávila, M.P.; Barbosa, F.A.R.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A. (2017). Novel arsenic-transforming bacteria and the diversity of their arsenic-related genes and enzymes arising from arsenic-polluted freshwater sediment. *Nature Scientific report*, 7, 12321, doi: 10.1038/s41598-017-11548-8.
- Svir, I.; Oleinick, A.; Yunus, K.; Fisher, A.C.; Wadhawan, J.D.; Davies, T.J.; Compton, R.G. (2005). Theoretical and experimental study of the ECE mechanism at microrring electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 578, 289–299.
- Tanabe, Y.; Okazaki, Y.; Yoshida, M.; Matsuura, H.; Kai, A.; Shiratori, T.; Ishida, K-I.; Nakano, S-I.; Watanabe, M.M. (2015). A novel alphaproteobacterial ectosymbiont promotes the growth of the hydrocarbon-rich green alga *Botryococcus braunii*. *Nature*, 5, 10467, doi: 10.1038/srep10467.
- Tao, Z.; Miao, L.; Jian, S.; Yingwu, S.; Jun, Y.; Kai, L. (2012). Bacterial diversity in rock varnish of extreme arid region of Turpan Basin. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 265-270, doi: 10.1016/j.chnaes.2012.07.006.
- Tebo, B.M.; Bargar, J.R.; Clement, B.G.; Dick, G.J.; Murray, K.J.; Parker, D.; Verity, R.; Webb, S.M. (2004). Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. *Annual Review Earth and Planetary Science*, 32, 287-328.
- Tebo, B.M.; Johnson, H.A.; McCarthy, J.K.; Templeton, A.S. (2005). Geomicrobiology of manganese (II) oxidation. *Trends in Microbiology*, 13(9), 421-428.
- Teira, E.; Reinthaler, T.; Pernthaler, A.; Pernthaler, J.; Herndl, G.J. (2004). Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4411-4414.
- Thiagarajan, N.; Lee, C.A. (2004). Trace-element evidence for the origin of desert varnish by direct aqueous atmospheric deposition. *Earth and Planetary Science Letters*, 224, 131-141.
- Toren, A.; Navon-Venezia, S.; Ron, E.Z.; Rosenberg, E. (2001). Emulsifying activities of purified alasin proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Envir. Microbiol.*, 67, 1102-1106.

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

Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R.J.; Tettelin, H.; Blake, R.; Eisen, J.A.; Holmes, D.S. (2008). Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*, 9, 597, doi: 10.1186/1471-2164-9-597.

Van de Peer, Y.; Chapelle, S.; De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res*, 24, 3381-3391.

Vezzi, A.; Campanaro, S.; D'Angelo, M.; Simonato, F.; Vitulo, N.; Lauro, F.M.; Cestaro, A.; Malacrida, G.; Simionati, B.; Cannata, N.; Romualdi, C.; Bartlett, D.H.; Valle, G. (2005). Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science*, 307 (5714), 1459-1461.

Vicenzi, E.P.; Grissom, C.A.; Livingston, R.A.; Weldon-Yochim, Z. (2016). Rock varnish on architectural stone: microscopy and analysis of nanoscale manganese oxide deposits on the Smithsonian Castle, Washington, DC. *Heritage Science*, 4(26), doi: 10.1186/s.40494-016-0093-2.

Villesen, P. (2007). FaBox: an online toolbox for FASTA sequences. *Molecular Ecology Notes*, 7, 965-968, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x.

Vitoria, L.; Otero, N.; Soler, A.; Canals, A. (2004). Fertilizer characterization: isotopic data (N, S, O, C and Sr), *Environ. Sci. Technol.*, 38, 3254-3262.

Vitousek, P.M.; Cassman, K.; Cleveland, C.; Crews, T.; Field, T.; Grimm, N.B.; Howarth, W.; Marino, R.; Martinelli, L.; Rastteter, E.B.; Sprent, J.I. (2002). *Biogeochemistry*, 57/58, 1-45, doi: 10.1023/A:1015798428743.

Walker, J.J.; Pace, N.R. (2007). Phylogenetic composition of rocky mountain endolithic microbial ecosystems. *Appl. Microbiol. Environ.*, 73(11), 3497-3504, doi: 10.1128/AEM.02656-06.

Wallner, G.; Amann, R.; Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14, 136-143.

Ward, L.M.; Hemp, J.; Patrick, M.S.; Shawn E.M.; Woodward W.F. (2018). Evolution of phototrophy in the Chloroflexi phylum driven by horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 9, 260, doi: 10.3389/fmicb.2018.00260.

Watanabe, Y.; Martini, J.E.; Ohmoto, H. (2000). Geochemical evidence for terrestrial ecosystems 2.6 billion years ago. *Nature*, 408, 574-578.

Watling, H.; Perrot, F.; Shiers, D. (2008). Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments. *Hydrometallurgy*, 93, 57-65.

Wayne, D. M.; Diaz, T. A.; Fairhurst, R.; Orndorff, R. L.; Pete, D. V. (2006). Direct major- and minor-element analysis of rock varnish by high resolution laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICPMA). *Appl. Geochem.*, 21, 1410-1431, doi:10.1016/j.apgeochem.2006.04.005.

Weber, K. A.; Achenbach, L.A.; Coates, J.D. (2006). Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Rev. Microbiol.*, 4(10), 752-764.

Yokota, A. (2012). Cultivation of uncultured Bacteria of the class Ktedonobacteria in the phylum Chloroflexi. *Makara Journal Science*, 16(1), 1-8.

Zhang, X.; Liu, X.; Liang, Y.; Guo, X.; Xiao, Y.; Ma, L.; Miao, B.; Liu, H.; Peng, D.; Huang, W.; Zhang, Y.; Yin, H. (2017). Adaptive evolution of extreme acidophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* po-

tentially driven by horizontal gene transfer and gene loss. *Appl Environ Microbiol.*, 83: e03098-16, doi: 10.1128/AEM.03098-16.

Zakrzewski, M.; Proietti, C.; Ellis, J.J.; Hasan, S.; Brion, M-J.; Berger, B.; Krause, L. (2017). Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome–environment interactions. *Bioinformatics*, 33(5), 782-783.

Zehn, J.P.; Jenkins, B.D.; Short, S.M.; Steward, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.*, 5(7), 539-554.

Zeinert, R.; Martinez, E.; Schmitz, J.; Senn, K.; Usman, B.; Anantharaman, V.; Aravind, L.; Waters, L.S. (2018). Structure–function analysis of manganese exporter proteins across bacteria. *J. Biol. Chem.*, 293(15), 5715-5730.

Ziegler, S.; Waidner, B.; Itoh, T.; Schumann, P.; Spring, S.; Gescher, J. (2013). *Metallibacterium scheffleri* gen. nov., sp. nov., an alkalinizing gammaproteobacterium isolated from an acidic biofilm *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63, 1499-1504, doi: 10.1099/ijs.0.042986-0.



## A) Ubicación de las principales referencias bibliográficas de estudios micobianos en revestimiento de roca ricos en hierro

| LUGAR                          |                  | REFERENCIA               |  | [1] | [2] | [3] |
|--------------------------------|------------------|--------------------------|--|-----|-----|-----|
| Xinjiang, Gobi (China)         |                  | Ren et al., 2019         |  |     | D   |     |
| Mojave (USA)                   |                  | Lang-Yona et al., 2018   |  |     | D   |     |
| Al-Jafar basin (Jordania)      |                  | Almalinat et al., 2017   |  |     | A   |     |
| Matsch valley (Tirolo, Italia) |                  | Esposito et al., 2015    |  |     | D   |     |
| Kärkevagge (Suecia)            |                  | Marmocha and Nixon, 2014 |  |     | D   |     |
|                                |                  | Marmocha and Nixon, 2013 |  |     | A   |     |
| Turpan basin (China)           |                  | Tao et al., 2012         |  |     | D   |     |
| Black Canyon (N. Méx., USA)    |                  | Northup et al., 2010     |  |     | DA  |     |
| Yungay, Atacama (Chile)        |                  | Kuhman et al., 2008      |  |     | D   |     |
| Colorado y Wyoming (USA)       |                  | Walker and Pace, 2007    |  |     | D   |     |
| Whipple Mountains (USA)        |                  | Kuhman et al., 2006      |  |     | A   |     |
|                                |                  | Kuhman et al., 2005      |  |     | D   |     |
| Lechugilla (N. Méx., USA)      |                  | Northup et al., 2003     |  |     | DA  |     |
| Vancouver (Canadá)             |                  | Eppard et al., 1996      |  |     | A   |     |
| Negev (Israel)                 |                  | Hungate et al., 1987     |  |     | A   |     |
| Sonora y Mojave (USA)          |                  | Palmer et al., 1986      |  |     | A   |     |
|                                |                  |                          |  |     |     |     |
|                                |                  |                          |  |     |     |     |
| Dominio, Phylum                | Clase, Orden     | [3]                      |  |     |     |     |
| <b>Archaea</b>                 |                  |                          |  |     |     |     |
| Crenarchaeota                  |                  |                          |  |     |     |     |
| Euryarchaeota                  |                  |                          |  |     |     |     |
| <b>Bacteria</b>                |                  |                          |  |     |     |     |
| Acidobacteria                  |                  |                          |  |     |     |     |
| Actinobacteria                 |                  |                          |  |     |     |     |
| Bacteroidetes                  |                  |                          |  |     |     |     |
| Chlorobium                     |                  |                          |  |     |     |     |
| Chloroflexi                    |                  |                          |  |     |     |     |
| Cyanobacteria                  |                  |                          |  |     |     |     |
| Deinococcus-Thermus            |                  |                          |  |     |     |     |
| Firmicutes                     | Clostridiales    |                          |  |     |     |     |
|                                | Bacilliales      |                          |  |     |     |     |
| Gemmatimonadetes               |                  |                          |  |     |     |     |
| Nitrospira                     |                  |                          |  |     |     |     |
| Planctomyces                   |                  |                          |  |     |     |     |
| Proteobacteria                 | α-Proteobacteria |                          |  |     |     |     |
|                                | β-Proteobacteria |                          |  |     |     |     |
|                                | γ-Proteobacteria |                          |  |     |     |     |
|                                | δ-Proteobacteria |                          |  |     |     |     |
| Verrucomicrobia                |                  |                          |  |     |     |     |

| Tipo de ambiente [1] | Tipo de estudio [2]         | Abundancia [3] | Taxón microbiano = SI |
|----------------------|-----------------------------|----------------|-----------------------|
| Árido-Semiárido      | D Diversidad                | Alta (>5)      | ■                     |
| Glaciar              | A Aislamiento               | Media (3-5)    | ■                     |
| Otros                | DA Diversidad y aislamiento | Baja (<3)      | ■                     |

Figura 65: Referencias bibliográficas de revestimientos ricos en Fe con su año y ubicación geográfica. [1] Indica el tipo de ambiente en el que se encuentra el barniz; [2] Indica el tipo de estudio microbiano de secuenciación de ADN realizado. [3] La abundancia de cada taxón teniendo en cuenta todos los trabajos analizados. En rojo, se indica la presencia del taxón microbiano de las columnas de la izquierda. En blanco, indica la no detección. ■

## **B) Protocolo de ligación y transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* One Shot TOP10 de Invitrogen utilizado en el laboratorio**

### **LIGACIÓN:**

1. Añadir 4 ul de producto de PCR + 1 ul de solución salina + 1 ul del vector.
2. Incubar al menos 30 min a 4°C (se puede dejar toda la noche).

### **TRANSFORMACIÓN:**

1. 2 horas antes de empezar el proceso de transformación sacar las placas LB con ampicilina (añadida antes de fundirse el agar del LB a una concentración de 100 ug/ml) y añadir 32 ul de X-Gal, extendiéndose por la placa.
2. 5 min antes de empezar, descongelar las células competentes dejándolas en hielo.
3. Añadir a cada vial 2ul de la reacción de ligación.
4. Incubar en hielo 30 min.
5. Incubar 30 s a 42°C en baño y rápidamente pasarlo al hielo y dejarlo 2 min.
6. Añadir a cada vial 250 ul de medio SOC (debe estar atemperado a 37°C).
7. Incubar 1h a 37°C a 200 rpm. Ir atemperando las placas a 37°C.
8. Plaquear 30 ul del tubo a una placa y el resto centrifugar a máxima velocidad 2 min. Desechar 240 ul y resuspender el pellet en el volumen restante y sembrarlo todo en otra placa. Con esto conseguiremos maximizar el número de células en placa.
9. Incubar toda la noche a 37°C las placas.
10. Picar las colonias blancas y pasarlas a una placa multipocillo de 96 con 1,5 ml de TB + Ampicilina (a una concentración de 100 ug/ml). Colocar tapa de filtro para permitir la respiración de las células y obtener una biomasa adecuada.
11. Incubar la placa multipocillo toda la noche a 37°C en agitación leve (200 rpm).
12. Centrifugar 10 min a 3000 rpm.
13. Desechar el sobrenadante con cuidado de no llevarte el pellet y guardar a -20°C. Listo para extraer el ADN plasmídico de las células.

## C) Análisis geoquímicos Hem, Mag y P1

| Muestra    | Al / Ni                | Mn / Ba                 | Mn / REY |
|------------|------------------------|-------------------------|----------|
| P1 (P1Ext) | 333,63                 | 2,30                    | 112,53   |
| P1 (P1Int) | 114,50                 | 2,02                    | 42,62    |
| N-Berr     | 1,67 · 10 <sup>4</sup> | 6,30 · 10 <sup>-3</sup> | 0,61     |
| Berr*      | ND                     | 0,40                    | 67,66    |
| Ror        | ND                     | 0,08                    | 6,91     |
|            | ND                     | 0,31                    | 35,69    |
| Mag        | ND                     | 0,28                    | 7,07     |

ND: No determinado (Valor del Ni = 0 en el análisis ICP-MS)

\* Media realizada con los análisis ICP-MS Berr1, Berr2 y Berr3

Tabla 22: Cocientes de elementos obtenidos para la clasificación de las muestras en base al trabajo desarrollado por Macholdt et al., 2017. ■

|   | Hem                                   | Mag                                   | P1                                    |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| $\delta^{15}\text{N} / \delta^{14}\text{N}$ (Medidas) | 2,446; 2,192;<br>2,309; 2,550         | 2,401; 2,691; 2,603;<br>2,535         | 1,587; 1,704; 1,475;<br>1,500         |
| Media (Desv. estándar)                                | 2,37 (0,16)                           | 2,56 (0,12)                           | 1,57 (0,10)                           |
| $\delta^{13}\text{C} / \delta^{12}\text{C}$ (Medidas) | -24,472; -24,607;<br>-24,687; -24,569 | -24,782; -24,779;<br>-24,687; -24,588 | -25,802; -25,565;<br>-25,481; -25,483 |
| Media (Desv.)   | -24,56 (0,06)                         | -24,71 (0,09)                         | -25,58 (0,15)                         |
| % TN  | 0,06                                  | 0,06                                  | 0,02                                  |
| % TOC   | 0,34                                  | 0,12                                  | 0,05                                  |
| C / N   | 5,5                                   | 2,1                                   | 2,4                                   |

Tabla 23: Datos numéricos de los análisis geoquímicos realizados en las muestras Hem, Mag (Origen) y P1 (Berrocal). ■

#### D) PCR específica de Cyanobacteri

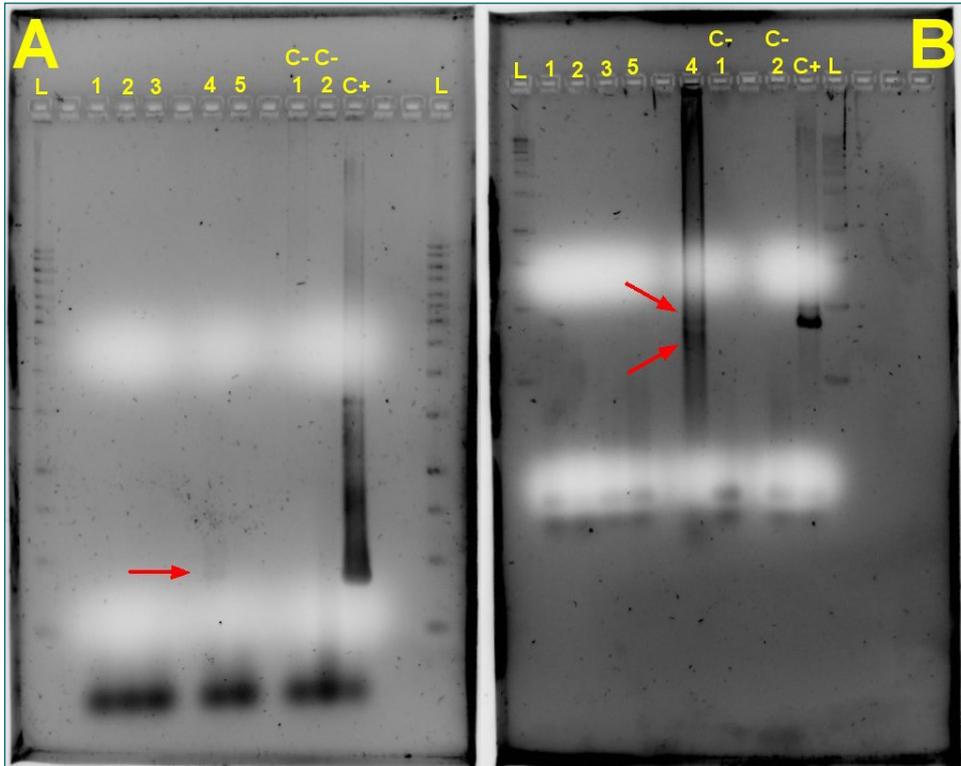


Figura 66: PCRs realizadas con cebadores específicos de Cyanobacteria. L: Ladder, 1: Muestra Hem, 2: Muestra Mag, 3: Muestra P1, 4: Muestra Ror, 5: Muestra Berr (Berr1), C-(1): Control negativo sin ADN (agua milliQ), C-(2): Control negativo con ADN de Escherichia coli (cepa Hfr), C+: Control positivo con ADN de Microcystis aeruginosa (cepa UAM-265). Se puede observar que en ambas PCRs se observa un producto de amplificación en el pocillo donde se cargó la PCR de la muestra Ror que coincide con el tamaño de banda esperado que amplifican los cebadores utilizados, y que se puede observar también en el control + de las PCRs. ■

## E) Estándares utilizados para la qPCR

| Nombre | Dilución ADN utilizada | Número de copias de 16S ARNr / ul |
|--------|------------------------|-----------------------------------|
| STD-10 | $10^{-10}$             | $2,68 \cdot 10^1$                 |
| STD-9  | $10^{-9}$              | $2,68 \cdot 10^2$                 |
| STD-8  | $10^{-8}$              | $2,68 \cdot 10^3$                 |
| STD-7  | $10^{-7}$              | $2,68 \cdot 10^4$                 |
| STD-6  | $10^{-6}$              | $2,68 \cdot 10^5$                 |
| STD-5  | $10^{-5}$              | $2,68 \cdot 10^6$                 |
| STD-4  | $10^{-4}$              | $2,68 \cdot 10^7$                 |

Concentración de ADN inicial de Escherichia coli (cepa K12): 46 ng/ul. Éste fue diluido tal y como se indica en la tabla para obtener las diluciones correspondientes.

**Tabla 24: Estándares usados en la qPCR. ■**

F) Curvas de rarefacción

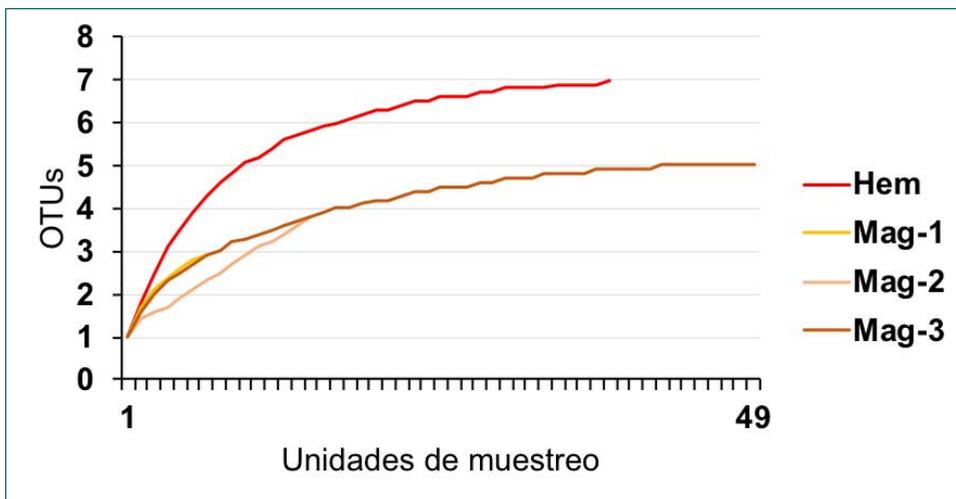


Figura 67: Curva de rarefacción de la secuenciación Sanger de las muestras Hem y Mag (de las tres extracciones realizadas). El ajuste de Clench para Hem es 0,998 y para Mag-1, Mag-2 y Mag-3 son 0,978, 0,995 y 0,991 respectivamente. Las extracciones Mag-1 y Mag-2 se ajustaron mejor a un ajuste logarítmico ( $R^2=0,999$ ) y a un ajuste con tendencia lineal ( $R^2=0,996$ ) así que los datos obtenidos de estas extracciones no fueron confiables para determinar una riqueza de especies razonable. ■

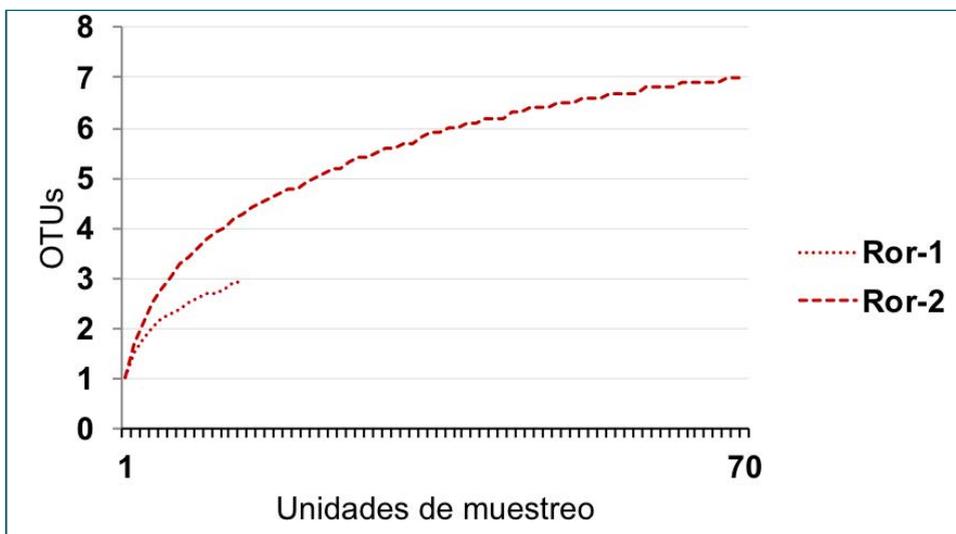


Figura 68: Curva de rarefacción de las secuenciaciones Sanger en la muestra Ror. El ajuste de Clench para Ror-1 es 0,994 y para Ror-2 0,995. ■

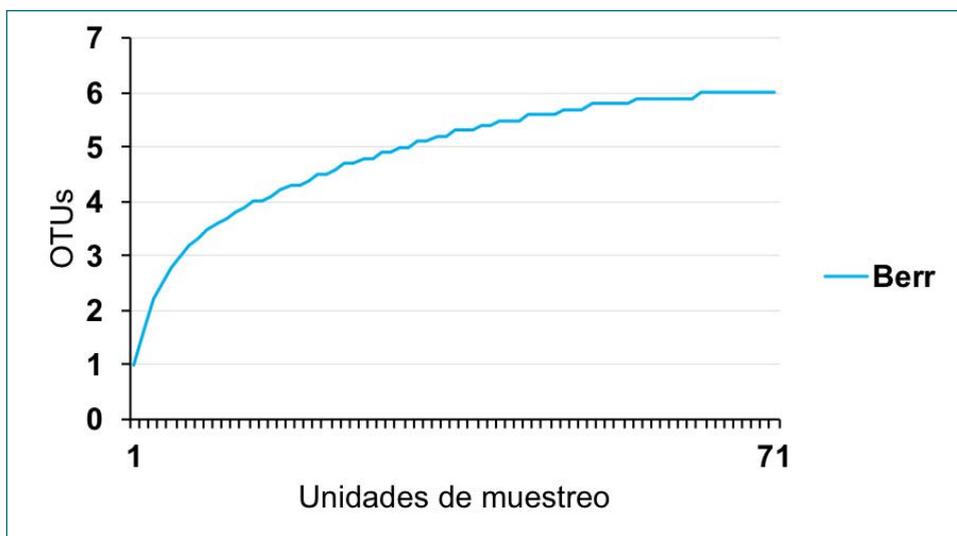


Figura 69: Curva de rarefacción de la secuenciación Sanger de la muestra Berr. El ajuste de Clench fue 0,98. ■

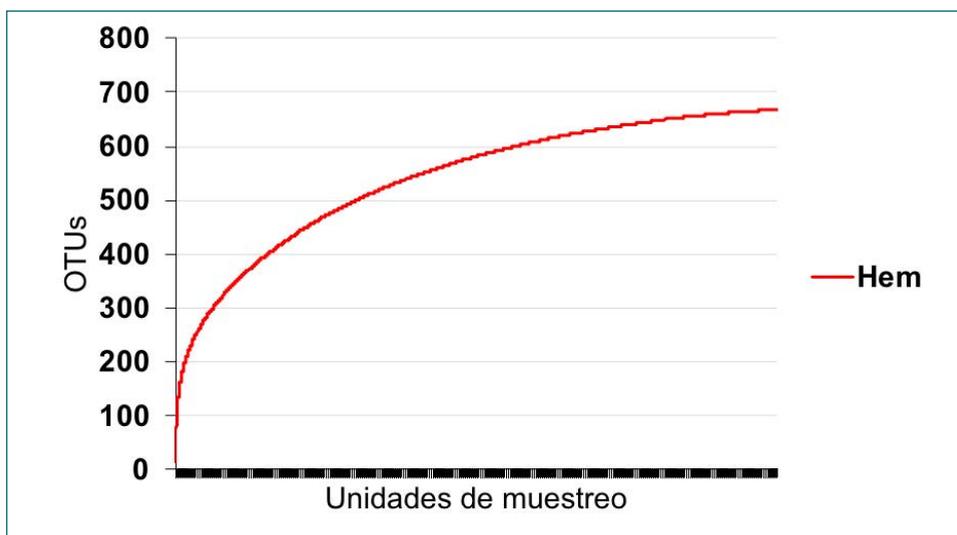


Figura 70: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra Hem. El ajuste de Clench fue 0,967. ■

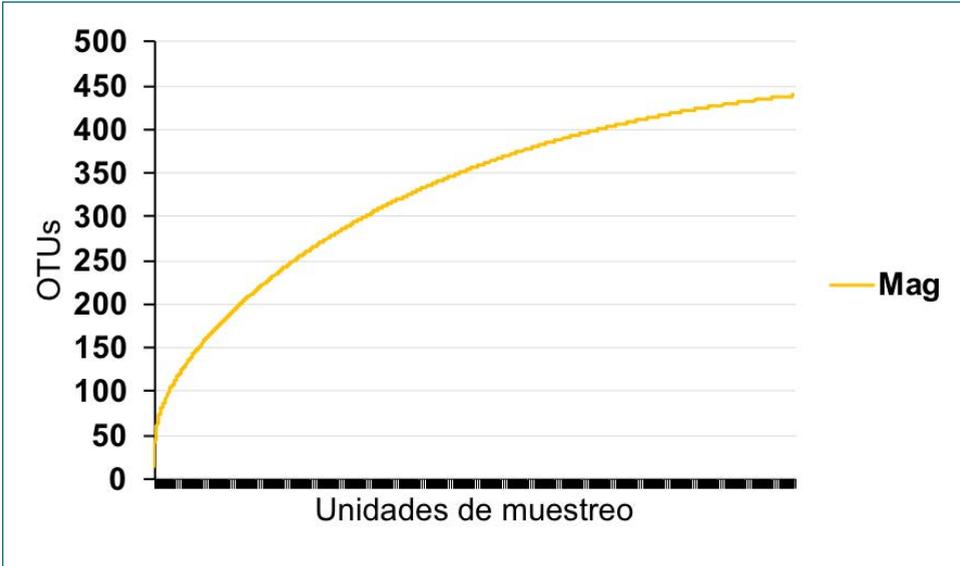


Figura 71: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra Mag. El ajuste de Clench fue 0,996. ■

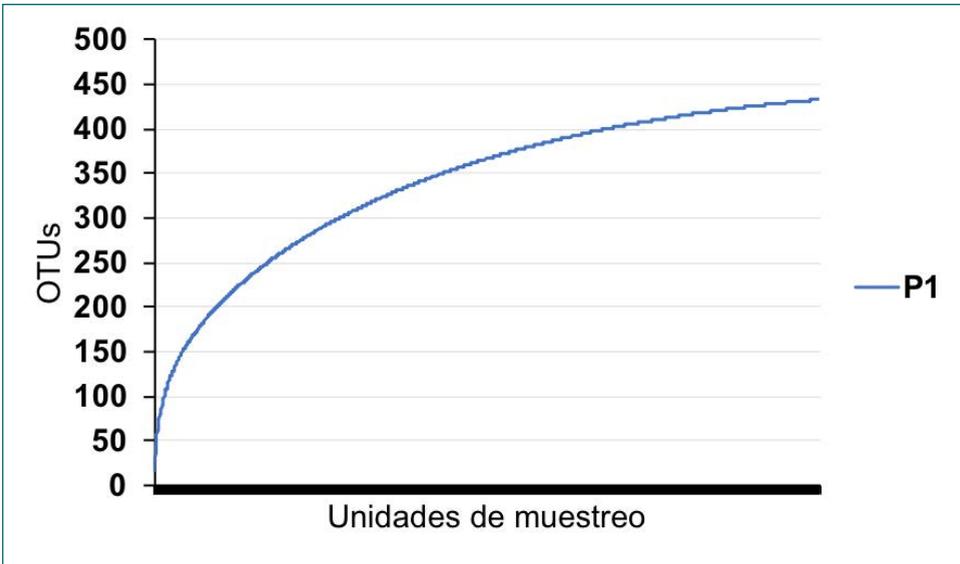


Figura 72: Curva de rarefacción de la secuenciación por Illumina Mi-Seq de la muestra P1. El ajuste de Clench fue 0,981. ■

## G) Secuenciación Illumina

| Muestras                                   | Suma de lecturas Illumina | Media GC en % (Forward / Reverse) | % de lecturas que pasaron los controles bioinformáticos | Índice de Shannon / Índice de Pielou (H' / J') | % OTUs del control – detectado |
|--|---------------------------|-----------------------------------|---|--|--------------------------------|
| Control negativo-1                         | 312028                    | 55 / 56                           | -   | 2,69 / 0,38                                    | -                              |
| P1   | 298105                    | 55 / 56                           | 7,5   | 4,20 / 0,71                                    | 41,47                          |
|  | 305420                    | 53 / 54                           | 32,7  | 4,31 / 0,67                                    | 42,61                          |
| Mag  | 333406                    | 54 / 54                           | 14,7  | 3,83 / 0,63                                    | 61,02                          |
| Control negativo-2                         | 164743                    | 54 / 55                           | -   | 3,49 / 0,50                                    | -                              |
| Berr (Fe+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) | 26621                     | 54 / 54                           | 4,1   | 2,24 / 0,68                                    | 81,57                          |
|  | 11190                     | 53 / 54                           | 26,6  | 3,08 / 0,70                                    | 88,16                          |
| Mag (DG +S)                                | 4834                      | 45 / 45                           | 39,6  | 3,20 / 0,74                                    | 60,38                          |

Control negativo-1: Muestras ambientales; Control negativo-2: Cultivos

**Tabla 25: Información relativa a la secuenciación Illumina realizada de las muestras ambientales y cultivos. ■**

## H) Árboles filogenético

A continuación, se exponene en las páginas siguientes los diferentes árboles filogenéticos realizados con el objetivo de confirmar las afinidades taxonómicas de las secuencias obtenidas mediante el método de secuenciación de Sanger (consultar en la tabla del apartado J las secuencias de GenBank utilizadas para las inferencias filogenéticas realizadas

El orden en el que aparecen los árboles de cada muestra corresponde a: **Hem, Mag** (primero el de los cebadores foward y después las secuencias obtenidas con los cebadores reverse), **Ror** y **Berr**. En todos los casos las filogenias aquí mostradas se realizaron por máxima verosimilitud

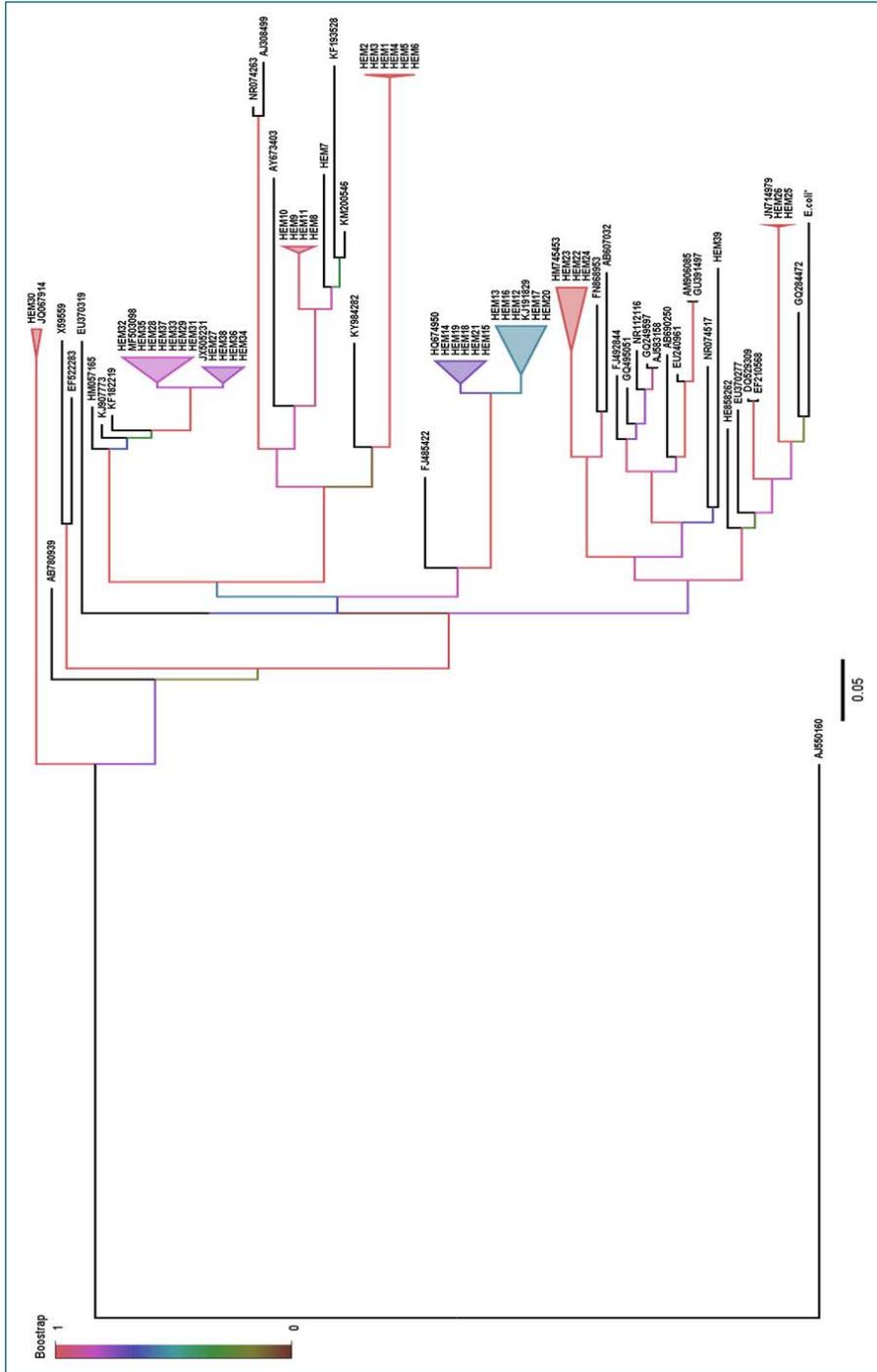


Figura 73: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias Hem. Topología: SPR; árbol inicial: BioNJ; modelo de sustitución nucleotídica GTR+ $\lambda$ +I ( $\lambda=0,601$ ; I=0,292); Log-likelihood= -10336,4 f(A)= 0,24317; f(T)= 0,18832; f(C)=0,24133; f(G)= 0,32718. El outgroup es una secuencia de Archaea (GenBank: AJ550160). ■

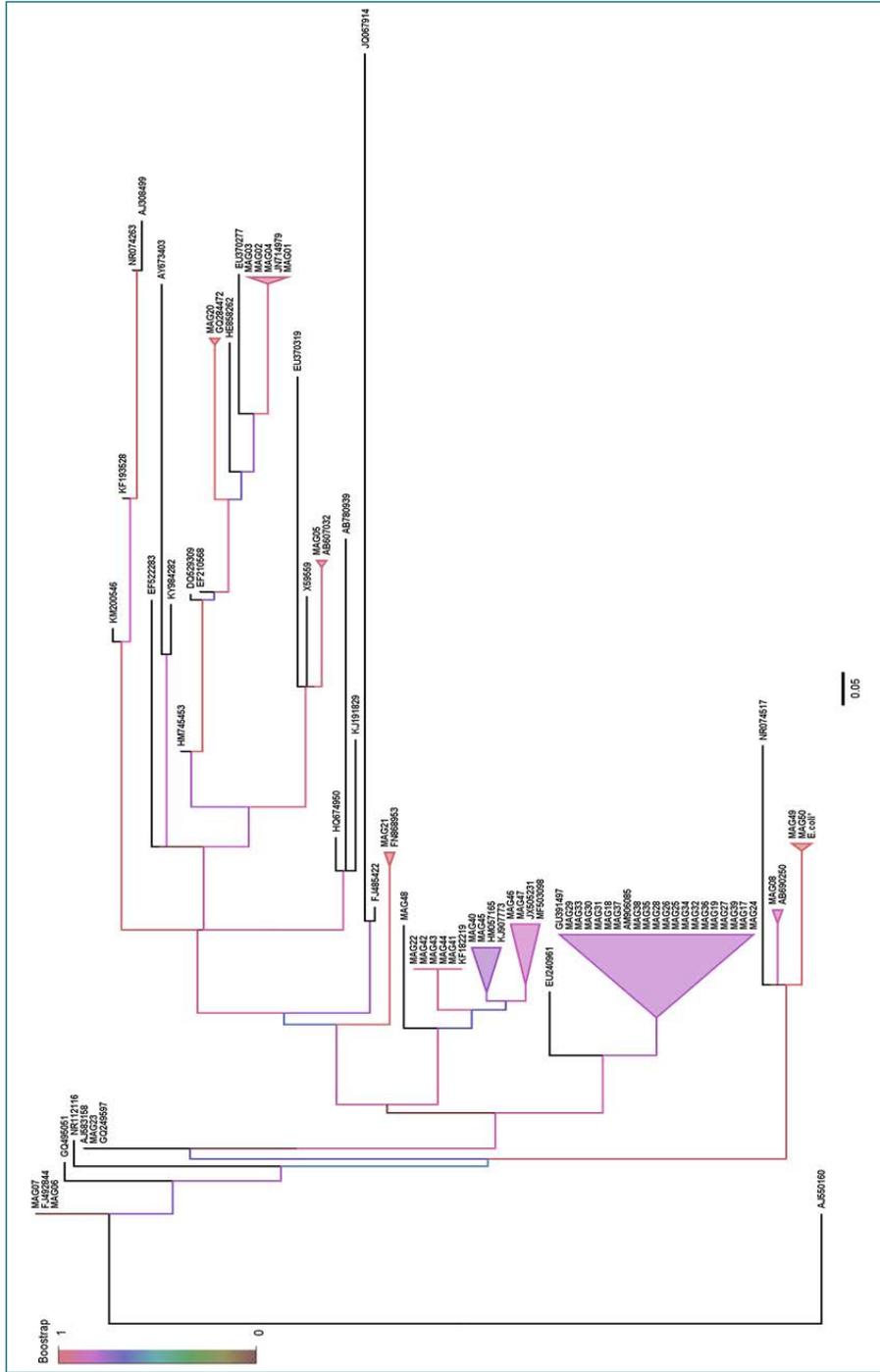


Figura 74: Árbol de máxima verosimilitud realizado con las secuencias forward de las diferentes extracciones realizadas de Mag. También, se incluyen las secuencias que pudieron ser correctamente ensambladas por los programas bioinformáticos. Topología: SPR; árbol inicial: BioNJ; modelo de sustitución nucleotídica GTR+ $\lambda$ +1 ( $\lambda$  =0,926;  $l$ =0, 121); Log-likelihood= -2398,25299;  $f(A)$ = 0,25283;  $f(T)$ = 0,19097;  $f(C)$ =0,24063;  $f(G)$ = 0,31556. El outgroup es una secuencia de Archaea (GenBank: AJ550100). ■







I) Datos de los diferentes umbrales de identidad analizados para realizar la inferencia metagenómica

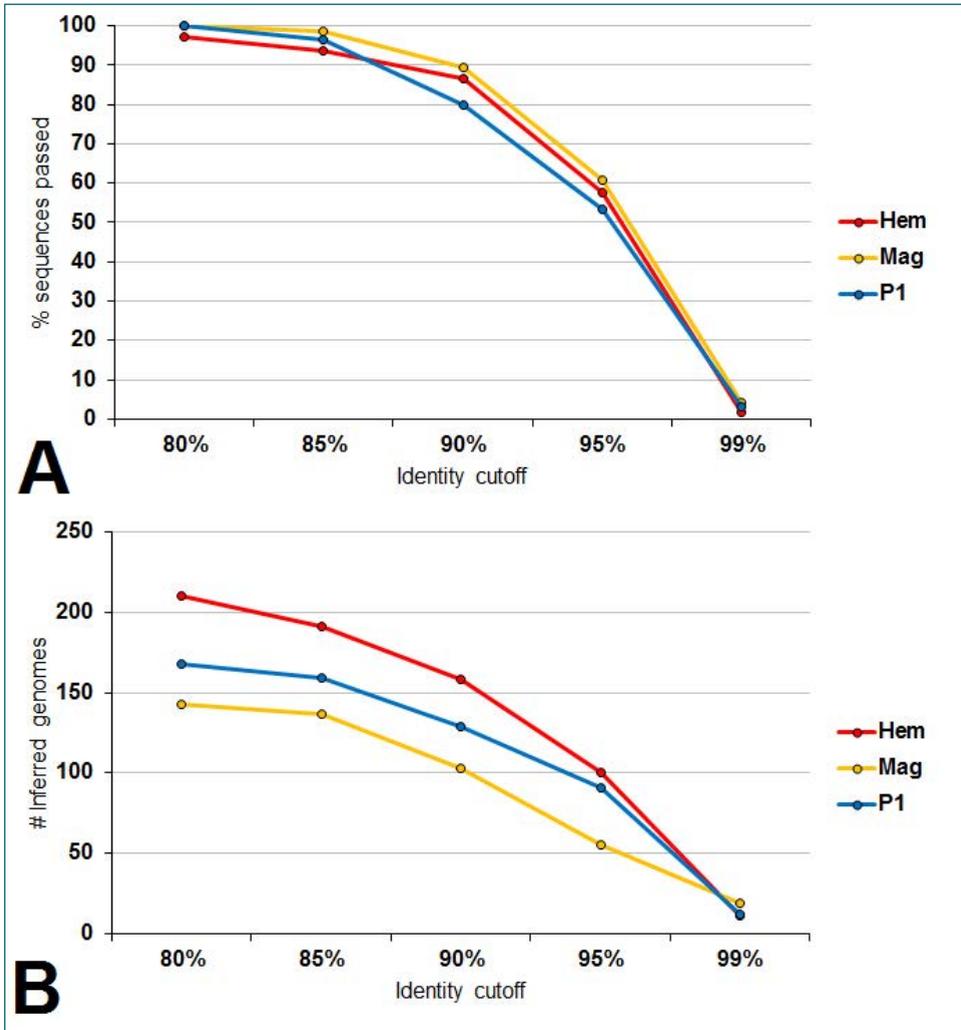


Figura 78: Representación gráfica del pre-análisis en Piphillin para la selección del mejor umbral de identidad. A: Umbral de identidad versus porcentaje total de secuencias que pasan el filtro del análisis. B: Umbral de identidad versus número de genomas inferidos para el análisis. ■

|     | 80%  |     | 85%  |     | 90%  |     | 95%  |     | 99%  |    |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|----|
|     | %    | GI  | %    | GI  | %    | GI  | %    | GI  | %    | GI |
|     | 97,1 | 210 | 93,6 | 191 | 86,5 | 158 | 57,7 | 100 | 1,67 | 11 |
| Mag | 100  | 143 | 98,6 | 137 | 89,3 | 103 | 60,7 | 55  | 4,03 | 19 |
| P1  | 100  | 168 | 96,4 | 159 | 80,0 | 129 | 53,5 | 91  | 3,10 | 12 |

?: Cobertura respecto del total de OTUs de la muestra

GI: Genomas inferidos en el análisis

**Tabla 26: Resultados numéricos obtenidos de la inferencia metagenómica con la herramienta bioinformática Piphillin utilizando diferentes umbrales de identidad. ■**

## J) Información relativa a las inferencias filogenéticas realizadas

| Código GenBank | Clasificación taxonómica                              |
|----------------|---|
| JN714979       | Betaproteobacteria; <i>Ralstonia insidiosa</i>        |
| AB607032       | Alfaproteobacteria; <i>Sphingomonas</i> sp.           |
| FJ492844       | Firmicutes; <i>Staphylococcus</i> sp.                 |
| AB690250       | Firmicutes; <i>Streptococcus</i> sp.                  |
| AM906085       | Firmicutes; <i>Paenibacillus</i> sp.                  |
| GQ284472       | Gammaproteobacteria; <i>Moraxella</i>                 |
| FN868953       | Alfaproteobacteria; <i>Methylobacterium</i> sp.       |
| KJ907773       | Actinobacteria; <i>Aciditerrimonas</i> sp.            |
| GQ249597       | Firmicutes; environmental samples                     |
| NR112116       | Firmicutes; <i>Bacillus subtilis</i>                  |
| KF182219       | Bacteria; environmental samples                       |
| HM057165       | Actinobacteria; environmental samples                 |
| AJ583158       | Firmicutes; <i>Bacillus indicus</i>                   |
| GU391497       | Firmicutes; <i>Paenibacillus humicus</i>              |
| NR074263       | Chloroflexi; <i>Chloroflexus aurantic</i>             |
| AJ308499       | Chloroflexi; <i>Chloroflexus aggrega</i>              |
| HM745453       | Bacteria; environmental samples                       |
| GQ495051       | Firmicutes; <i>Bacillus</i> sp.                       |
| EU240961       | Firmicutes; <i>Paenibacillus</i> sp.                  |
| EU370277       | Bacteria; environmental samples                       |
| EU370319       | Bacteria; environmental samples                       |
| DQ529309       | Cyanobacteria; <i>Anabaena</i> sp.                    |
| DQ529309       | Proteobacteria; <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |
| AB780939       | Thermodesulfobacteria; environmental samples          |
| KF193528       | Chloroflexi; <i>Thermogemmatispor</i>                 |
| KY984282       | Chloroflexi; environmental sample                     |
| EF210568       | Proteobacteria; <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |
| KM200546       | Chloroflexi; <i>Ktedonobacteri</i>                    |
| HE858262       | Gammaproteobacteria; <i>Metallibacterium</i> sp.      |
| HQ674950       | Acidobacteria; environmental samples                  |
| KJ191829       | Acidobacteria; environmental samples                  |
| JQ067914       | Planctomycetes; <i>candidatus Nostocoida</i>          |
| JX505231       | Actinobacteria; <i>Aciditerrimonas</i> sp.            |
| FJ485422       | Deltaproteobacteria; environmental samples            |
| MF503098       | Actinobacteria; strain USS-CCA1                       |
| AY673403       | Bacteria; <i>Chloroflex</i>                           |
| NR074517       | Firmicutes; <i>Heliobacterium modesticaldum</i>       |
| EF522283       | Eukaryota; Chlorophyta                                |
| AJ550160       | Archaea; <i>Methanobacterium</i>                      |
| E.coli*        | Secuencia procedente de Van de Peer et al., 1996      |

Tabla 27: Secuencias procedentes de las bases de datos utilizadas para agrupar las secuencias identificadas por secuenciación Sanger y realizar las inferencias filogenéticas de nuestras secuencias de interés . ■

| CAPA ROJA ORIGEN (Hem) |                    |                   |   |
|------------------------|--------------------|-------------------|---|
| Lecturas               | Código Genbank     | Distancia         | Identificación más probabl                  |
| UnkOTU1                | AY193186,          | 0,0751;           | OD1 (Parcubacteria)                         |
|                        | LC287971,          | 0,0844;           |   |
|                        | DQ093901,          | 0,0933;           |   |
|                        | KX133470           | 0,1202            |   |
| UnkOTU2                | GU245906,          | 0,1336;           | Delta proteobacteria (similar a Pelobacter) |
|                        | HM134896,          | 0,2199;           |   |
|                        | MG803329           | 0,2699            |   |
| UnkOTU3                | AF355035,          | 0,1002;           | Alfa proteobacteria (similar a Azotobacter) |
|                        | KX710021, DQ906056 | 0,1168;<br>0,1988 |   |
| UnkOTU4                | AY193186           | 0,0900            | OD1 (Parcubacteria)                         |
| UnkOTU5                | GQ348762,          | 0,2402;           | OD1 (Parcubacteria)                         |
|                        | KX123470,          | 0,2502;           |   |
|                        | LN880482,          | 0,2588;           |   |
|                        | KX123461           | 0,2764            |   |
| UnkOTU6                | KF414382,          | 0,1329;           | Gamma Proteobacteria                        |
|                        | JQ700719,          | 0,1369;           |   |
|                        | EU119136,          | 0,1371;           |   |
|                        | HM798893           | 0,1405            |   |
| UnkOTU7                | AY222299,          | 0,1306;           | Unculture Cyanobacterium                    |
|                        | EU626142,          | 0,2042;           |   |
|                        | AF355035,          | 0,2759;           |   |
|                        | MG803329           | 0,3279            |   |
| UnkOTU8                | MG803329,          | 0,1081;           | Delta Proteobacteria                        |
|                        | JN038644,          | 0,1721;           |   |
|                        | AF355035,          | 0,2227;           |   |
|                        | EU626142           | 0,3179            |   |
| UnkOTU9                | AY555639,          | 0,1172;           | Planctomycetes                              |
|                        | MF440008,          | 0,1356;           |   |
|                        | KX123521,          | 0,1921;           |   |
|                        | JQ886452           | 0,3333            |   |
| UnkOTU10               | FJ662339           | 0,1749            | Actinobacteria, uncultured                  |
| UnkOTU11               | KY611717,          | 0,1460;           | Beta Proteobacteria (Burkholderiales)       |
|                        | EU642006,          | 0,1464;           |   |
|                        | FN434379           | 0,1469            |   |
| UnkOTU12               | GQ072663,          | 0,1998;           | Proteobacteria (clase desconocida)          |
|                        | EU642006           | 0,3358            |   |
| UnkOTU13               | GU245925,          | 0,1449;           | OD1 (Parcubacteria) / Uncult. Cyanobacteria |
|                        | FJ774063,          | 0,1450;           |   |
|                        | AY922093           | 0,1498            |   |
|                        | KX123470           | 0,0800            |   |
| UnkOTU14               | MH813396,          | 0,1302;           | OD1 (Parcubacteria)                         |
|                        | EU626142,          | 0,1302;           |   |
|                        | JQ401518,          | 0,1583;           |   |
|                        | DQ448734           | 0,1600            |   |
| UnkOTU15               | JQ724815           | 0,0600            | Actinobacteria, uncultured                  |
| UnkOTU16               | JQ724815           | 0,0600            | Archaea (Uncultured Euryarchaeota)          |
| UnkOTU17               | LT858996           | 0,1000            | OD1 (Parcubacteria)                         |

Tabla 28: Identificación más probable por Blastn de secuencias no clasificadas por QII . ■

**REVESTIMIENTO DE ROCA DE BERROCAL (P1)**

| Lecturas | Código Genbank                                  | Distancia                               | Identificación más probable                |
|----------|---|---|--|
| UnkOTU18 | MG856133  | 0,1731                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU19 | MG856133  | 0,1686                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU20 | MG856133  | 0,1269                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU21 | MG856133  | 0,1846                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU22 | MG856133  | 0,1693                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU23 | MG856133  | 0,1394                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU24 | MG856133  | 0,1555                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU25 | MG856133  | 0,1584                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU26 | MG856133  | 0,1645                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU27 | MG856133  | 0,1532                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU28 | MG856133  | 0,1395                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU29 | MG856133  | 0,1741                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU30 | MG856133  | 0,1443                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU31 | MG856133  | 0,1649                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU32 | MG856133  | 0,1406                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU33 | MG856133  | 0,1586                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU34 | MG856133  | 0,1437                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU35 | MG856133  | 0,1344                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU36 | MG856133  | 0,1044                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU37 | MG856133  | 0,1461                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU38 | MG856133  | 0,1413                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU39 | LT624765,<br>LT625239,<br>LT624360,<br>JQ087100 | 0,0814;<br>0,1075;<br>0,1098;<br>0,1229 | Firmicutes (similar a Dethiosulfatibacter) |
| UnkOTU40 | MG856133  | 0,1300                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU41 | MG856133  | 0,1347                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU42 | MG856133  | 0,1003                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU43 | MG856133  | 0,1229                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU44 | MG856133,<br>AJ003055                           | 0,1154;<br>0,1154                       | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU45 | AB108481  | 0,1198                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU46 | FJ662339,<br>EU626142                           | 0,1180;<br>0,1492                       | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU47 | KY122000,<br>DQ177491,<br>EU642006              | 0,1178;<br>0,1265;<br>0,1300            | Beta Proteobacteria (Burkholderiales)      |
| UnkOTU48 | FJ662339,<br>EU626142,<br>AJ003055              | 0,1011;<br>0,1294;<br>0,1998            | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU49 | MG856133  | 0,1311                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU50 | MG856133  | 0,1369                                  | Actinobacteria, uncultured                 |
| UnkOTU51 | MG856133  | 0,1273                                  | Actinobacteria, uncultured                 |

Las lecturas no clasificadas por QIIME fueron analizadas individualmente lanzándolas al Blastn y al RDP sequence match y se sacaron algunas de las secuencias más similares de cada una de ellas para hacer una base de datos local utilizando Bioedit (Hall, 1999). Posteriormente, las secuencias no clasificadas se alinearon mediante RDP Align con las secuencias de la base de datos local y se obtuvo la matriz de distancias mediante DNA Dist.3.5 (disponible en Bioedit). Con la información obtenida del Blastn RDPSeqmatch y la matriz de distancias se le asignó la identificación más probable a cada OTU no clasificado.

**Tabla 28: Identificación más probable por Blastn de secuencias no clasificadas por QII . (cont.) ■**

K) Códigos KEGG y descripción (disponible una mayor información en la página web <https://www.genome.jp/kegg/>).

| Código  | Ruta metabólica                              |
|---------|--|
| ko00010 | Glycolysis / Gluconeogenesis                 |
| ko00071 | Fatty acid degradation                       |
| ko00195 | Photosynthesis                               |
| ko00261 | Monobactam biosynthesis                      |
| ko00480 | Glutathione metabolism                       |
| ko00500 | Starch and sucrose metabolism                |
| ko00520 | Amino sugar and nucleotide sugar metabolism  |
| ko00521 | Streptomycin biosynthesis                    |
| ko00540 | Lipopolysaccharide biosynthesis              |
| ko00550 | Peptidoglycan biosynthesis                   |
| ko00625 | Chloroalkane and chloroalkene degradation    |
| ko00680 | Methane metabolism                           |
| ko00710 | Carbon fixation in photosynthetic organism   |
| ko00720 | Carbon fixation pathways in prokaryote       |
| ko00900 | Terpenoid backbone biosynthesis              |
| ko00906 | Carotenoid biosynthesis                      |
| ko00910 | Nitrogen metabolism                          |
| ko00920 | Sulfur metabolism                            |
| ko00980 | Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 |
| ko01110 | Biosynthesis of secondary metabolites        |
| ko01120 | Microbial metabolism in diverse environments |
| ko01130 | Biosynthesis of antibiotics                  |
| ko01200 | Carbon metabolism                            |
| ko01220 | Degradation of aromatic compounds            |
| ko01230 | Biosynthesis of amino acids                  |
| ko01501 | Beta-Lactam resistance                       |
| ko01502 | Vancomycin resistance                        |
| ko02010 | ABC transporters                             |
| ko02026 | Biofilm formation - Escherichia coli         |
| ko02030 | Bacterial chemotaxis                         |
| ko02060 | Phosphotransferase system (PTS)              |
| ko03010 | Ribosome                                     |
| ko03060 | Protein export                               |
| ko03070 | Bacterial secretion system                   |
| ko04112 | Cell cycle – Caulobacter                     |
| ko05111 | Biofilm formation - Vibrio cholera           |

Tabla 29: Códigos KEGG de las rutas metabólicas. ■

| Código | Descripción de la enzima   | Nombre |
|--------|--|--------|
| K00380 | Sulfite reductase (NADPH) flavoprotein alpha-component [EC:1.8.1.  | CysJ   |
| K00381 | Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component [EC:1.8.1.2   | CysI   |
| K00390 | Phosphoadenosine phosphosulfate reductase<br>[EC:1.8.4.8 1.8.4.10] | CysH   |
| K00392 | Sulfite reductase (ferredoxin) [EC:1.8.7.1                         | Sir    |
| K00394 | Adenylylsulfate reductase, subunit A [EC:1.8.99.2]                 | AprA   |
| K00860 | Adenylylsulfate kinase [EC:2.7.1.25]                               | CysC   |
| K00955 | Bifunctional enzyme CysN/CysC [EC:2.7.7.4 2.7.1.25]                | CysNC  |
| K00956 | Sulfate adenylyltransferase subunit 1 [EC:2.7.7.4]                 | CysN   |
| K00957 | Sulfate adenylyltransferase subunit 2 [EC:2.7.7.4]                 | CysD   |
| K00958 | Sulfate adenylyltransferase [EC:2.7.7.4]                           | Sat    |
| K08352 | Thiosulfate reductase / polysulfide reductase chain A [EC:1.8.5.5  | PshA   |
| K08357 | Tetrathionate reductase subunit A                                  | TtrA   |
| K11180 | Dissimilatory sulfite reductase alpha subunit [EC:1.8.99.5         | DsrA   |
| K11181 | Dissimilatory sulfite reductase beta subunit [EC:1.8.99.5          | DsrB   |
| K16936 | Thiosulfate dehydrogenase [quinone] small subunit [EC:1.8.5.2]     | DoxA   |
| K16952 | Sulfur oxygenase/reductase [EC:1.13.11.55]                         | Sor    |
| K17222 | Sulfur-oxidizing protein SoxA                                      | SoxA   |
| K17223 | Sulfur-oxidizing protein SoxX                                      | SoxX   |
| K17224 | S-sulfosulfanyl-L-cysteine sulfohydrolase [EC:3.1.6.20]            | SoxB   |
| K17225 | Sulfane dehydrogenase subunit SoxC                                 | SoxC   |
| K17226 | Sulfur-oxidizing protein SoxY                                      | SoxY   |
| K17227 | Sulfur-oxidizing protein SoxZ                                      | SoxZ   |

Tabla 30: Códigos KEGG de las enzimas implicadas en el metabolismo del S. ■

| Código | Descripción de la enzima  | Nombre    |
|--------|---|-----------|
| K00360 | Assimilatory nitrate reductase electron transfer subunit [EC:1.7.99.-]          | NasB      |
| K00362 | Nitrite reductase (NADH) large subunit [EC:1.7.1.15]                            | NirB      |
| K00363 | Nitrite reductase (NADH) small subunit [EC:1.7.1.15]                            | NirD      |
| K00366 | Ferredoxin-nitrite reductase [EC:1.7.7.1]                                       | NirA      |
| K00367 | Ferredoxin-nitrate reductase [EC:1.7.7.2]                                       | NarB      |
| K00368 | Nitrite reductase (NO <sub>x</sub> -forming) [EC:1.7.2.1]                       | NirK      |
| K00370 | Nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-] | NarG      |
| K00371 | Nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, beta subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]  | NarH      |
| K00372 | Assimilatory nitrate reductase catalytic subunit [EC:1.7.99.-]                  | NasA      |
| K00373 | Nitrate reductase molybdenum cofactor assembly chaperone NarJ/NarW              | NarJ      |
| K00374 | Nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]                           | NarI      |
| K00375 | GntR transcriptional regulator / MocR family aminotransferase                   | K00375    |
| K00376 | Nitrous-oxide reductase [EC:1.7.2.4]  | NosZ      |
| K00531 | Nitrogenase delta subunit [EC:1.18.6.1]   | AnfG      |
| K01455 | Formamidase [EC:3.5.1.49]   | E3.5.1.49 |
| K01501 | Nitrilase [EC:3.5.5.1]  | E3.5.5.1  |
| K02305 | Nitric oxide reductase subunit C  | NorC      |
| K02586 | Nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain [EC:1.18.6.1]                   | NifD      |
| K02587 | Nitrogenase molybdenum-cofactor synthesis protein NifE                          | Knife     |
| K02588 | Nitrogenase iron protein NifH   | NifH      |
| K02589 | Nitrogen regulatory protein PII 1   | nifHD1    |
| K02590 | Nitrogen regulatory protein PII 1   | nifHD2    |
| K02591 | Nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1]                    | NifK      |
| K02592 | Nitrogenase molybdenum-iron protein NifN  | NifN      |
| K02593 | Nitrogen fixation protein Nif   | NifT      |
| K04561 | Nitric oxide reductase subunit B [EC:1.7.2.5]                                   | NorB      |
| K10535 | Hydroxylamine dehydrogenase [EC:1.7.2.6]  | Hao       |
| K15864 | Nitrite reductase (NO-forming) / hydroxylamine reductase [EC:1.7.2.1 1.7.99.1]  | NirS      |

Tabla 31: Códigos KEGG de las enzimas implicadas en el metabolismo del N. ■

| Código | Sustrato transportado         | Nombre |
|--------|-------------------------------|--------|
| K02010 | Fe <sup>+3</sup>              | AfuC   |
| K02011 | Fe <sup>+3</sup>              | AfuB   |
| K02012 | Fe <sup>+3</sup>              | AfuA   |
| K02036 | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | PstB   |
| K02037 | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | PstC   |
| K02038 | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | PstA   |
| K02039 | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | PhoU   |
| K02040 | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> | PstS   |
| K02045 | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | CysA   |
| K02046 | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | CysU   |
| K02047 | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | CysW   |
| K02048 | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | CysP   |
| K05845 | Osmoprotectant                | OpuC   |
| K05846 | Osmoprotectant                | OpuBD  |
| K05847 | Osmoprotectant                | OpuA   |
| K10823 | Oligopeptide                  | OppF   |
| K11604 | Mn/Fe                         | Sita   |
| K11605 | Mn/Fe                         | SitC   |
| K11606 | Mn/Fe                         | SitD   |
| K11607 | Mn/Fe                         | SitB   |
| K11707 | Mn/Zn/Fe                      | TroA   |
| K11708 | Mn/Zn/Fe                      | TroC   |
| K11709 | Mn/Zn/Fe                      | TroD   |
| K11710 | Mn/Zn/Fe                      | TroB   |
| K15580 | Oligopeptide                  | OppA   |
| K15581 | Oligopeptide                  | OppB   |
| K15582 | Oligopeptide                  | OppC   |
| K15583 | Oligopeptide                  | OppD   |

Tabla 32: Códigos KEGG de transportadores de membrana tipo ABC. ■

| Código | Finalidad                     | Nombre                 |
|--------|-------------------------------|------------------------|
| K03284 | Mg <sup>+2</sup>              | CorA                   |
| K03286 | OmpA-OmpF porin               | TC.OOP                 |
| K03293 | Aa                            | TC.AAT                 |
| K03294 | aa : polyamine antiporter     | TC.APA                 |
| K03297 | Small multidrug               | emrE, qac, mmr,<br>smr |
| K03303 | Lactate                       | LctP                   |
| K03305 | Oligopeptide                  | TC.POT                 |
| K03306 | P                             | TC.PIT                 |
| K03320 | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>  | Amt                    |
| K03321 | SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> | TC.SULP                |
| K03322 | Mn <sup>+2</sup>              | MntH                   |
| K03324 | P : Na <sup>+</sup> Symporter | YjbB                   |
| K03325 | As <sup>-3</sup>              | ArsB                   |

Tabla 33: Códigos KEGG de transportadores de membrana no ABC. ■

| Código | Descripción de la enzima                              | Nombre      |
|--------|---|-------------|
| K00428 | Cytochrome c peroxidase [EC:1.11.1.5]                 | EC:1.11.1.5 |
| K03333 | Cholesterol oxidase [EC:1.1.3.6]                      | ChoD        |
| K03781 | Catalase [EC:1.11.1.6]                                | KatE        |
| K03782 | Catalase-peroxidase [EC:1.11.1.21]                    | KatG        |
| K06324 | Spore coat protein A, manganese oxidase [EC:1.16.3.3] | CotA        |
| K07217 | Catalase containing Mn                                | K07217      |
| K07481 | Transposase IS5 family                                | K07481      |
| K07483 | Transposase   | K07483      |
| K07491 | Putative transposase                                  | K07491      |
| K07493 | Putative transposase                                  | K07493      |
| K07496 | Putative transposase                                  | K07496      |
| K07497 | Putative transposase                                  | K07497      |
| K01428 | Urease subunit alpha [EC:3.5.1.5]                     | UreC        |
| K01429 | Urease subunit beta [EC:3.5.1.5]                      | UreB        |
| K01430 | Urease subunit gamma [EC:3.5.1.5]                     | Urea        |
| K19824 | Rubryerythrin   | FprB        |

Tabla 34: Códigos KEGG de otras enzimas de interés. ■

## L) Imágenes CARD-FISH

A continuación se muestran las imágenes de hibridación de las muestras (excepto las de las sondas de nivel de dominio; para verlas, ir al apartado 5.6.4). Cada imagen contiene su correspondiente barra de escala (la mayoría son de 10  $\mu\text{m}$ ):

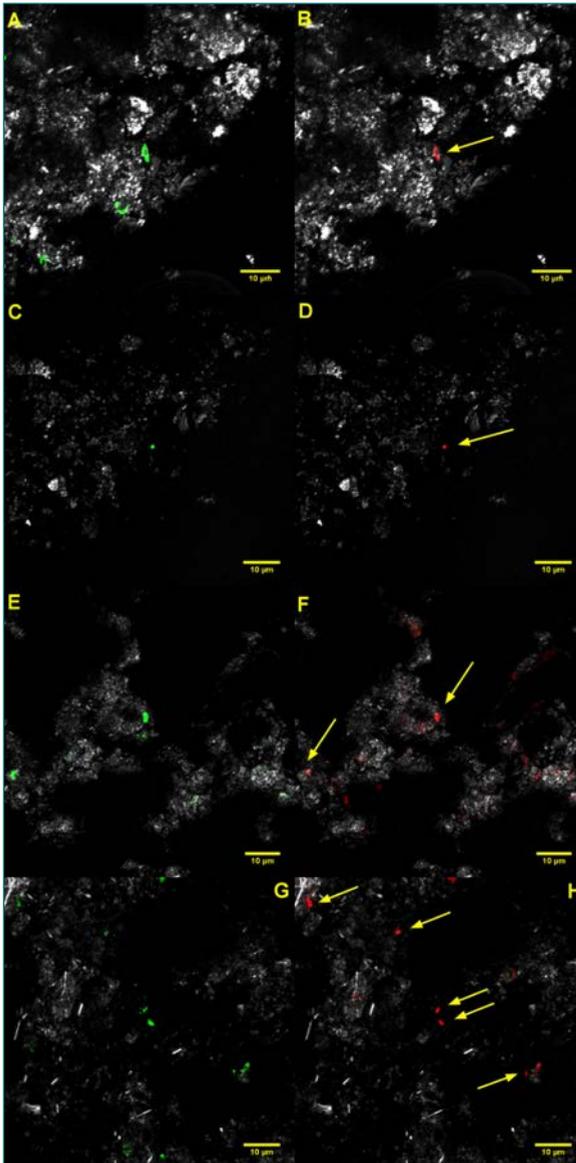


Figura 79: Señal de hibridación de  $\alpha$ -Proteobacteria en Berr (A-B), P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda ALF 965. En verde la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH; en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$ . ■

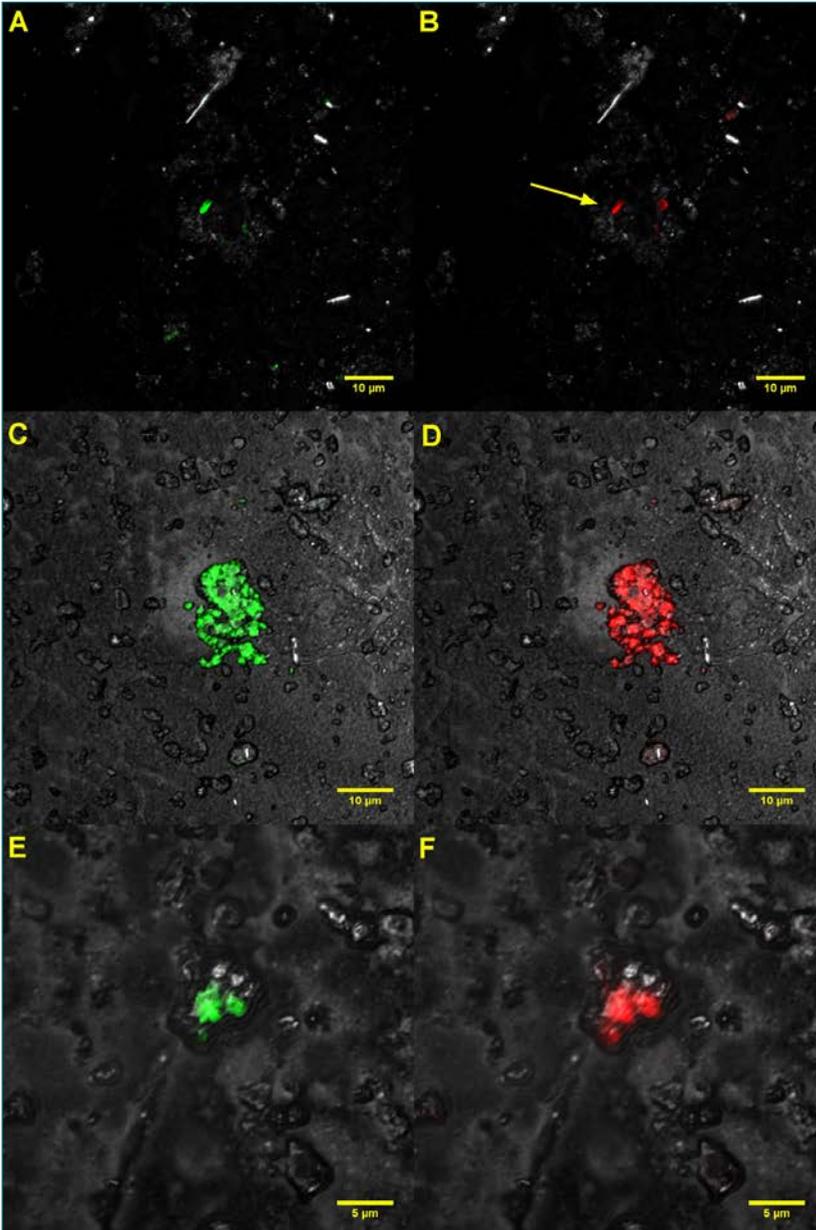


Figura 80: Señal de hibridación de  $\beta$ -Proteobacteria en P1 (A-B), Hem (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda BET 42a. En verde la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH; en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu$ m, excepto E-F (5  $\mu$ m). ■

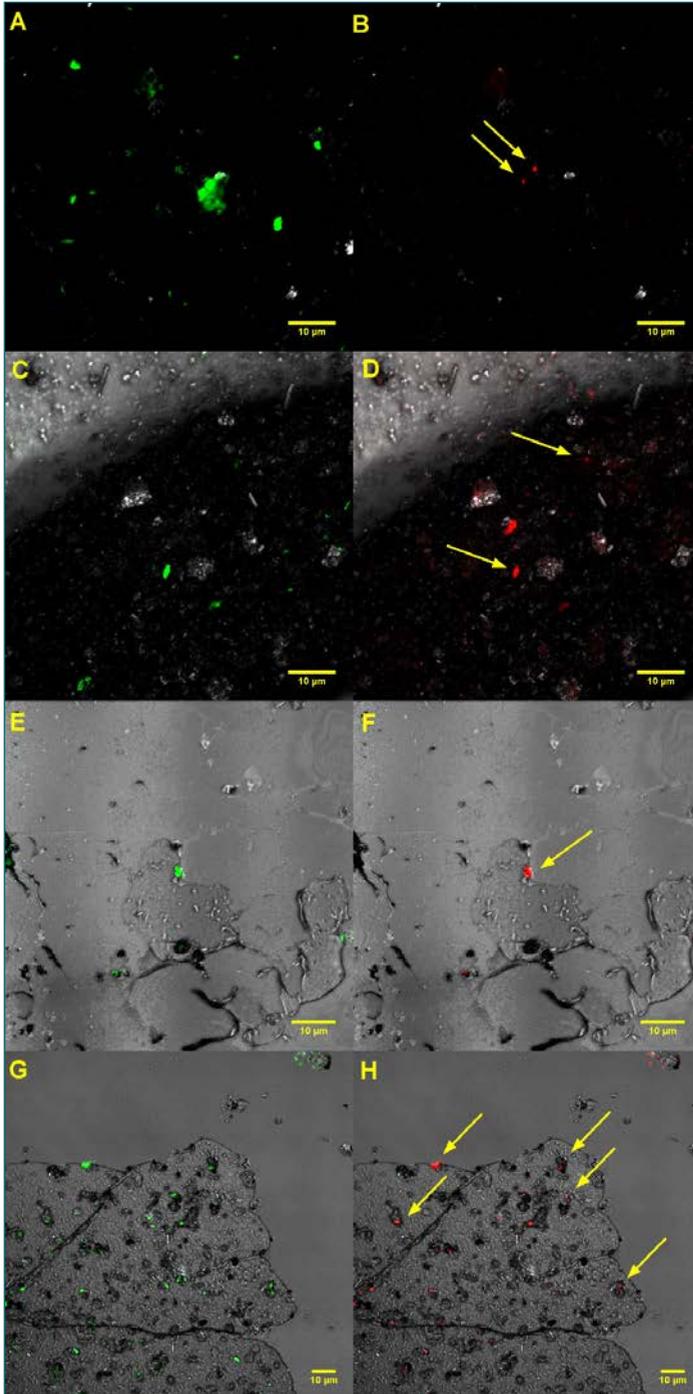


Figura 81: Señal de hibridación de  $\gamma$ -Proteobacteria en Berr (A-B), P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda GAM 42a. En verde la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH; en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$ . ■

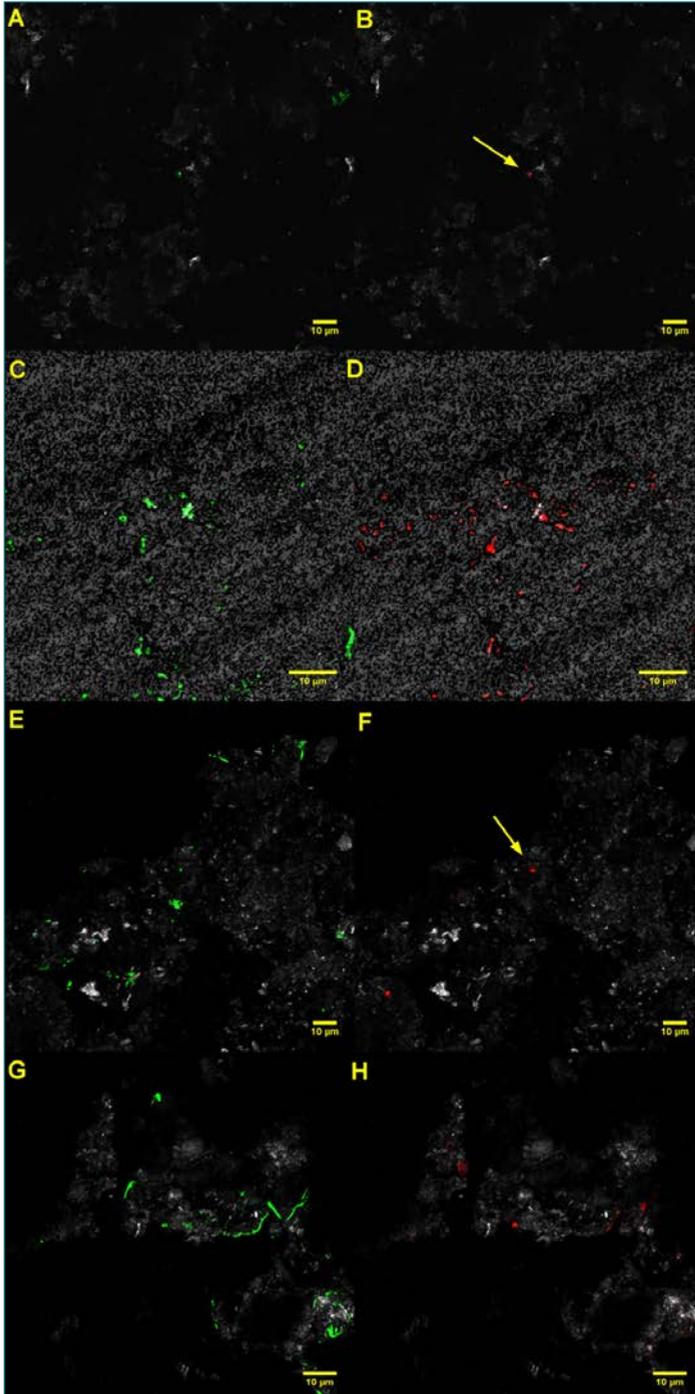


Figura 82: Señal de hibridación en P1 (A-B) y Hem (C-D) utilizando la sonda ACD 840 (*Acidiphillium* sp.) y señal de hibridación en las muestras Berr (E-F) y Hem (G-H) con la sonda ACI 145 (*Acidovorax* sp.). En verde, la señal de Syto9, en rojo la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

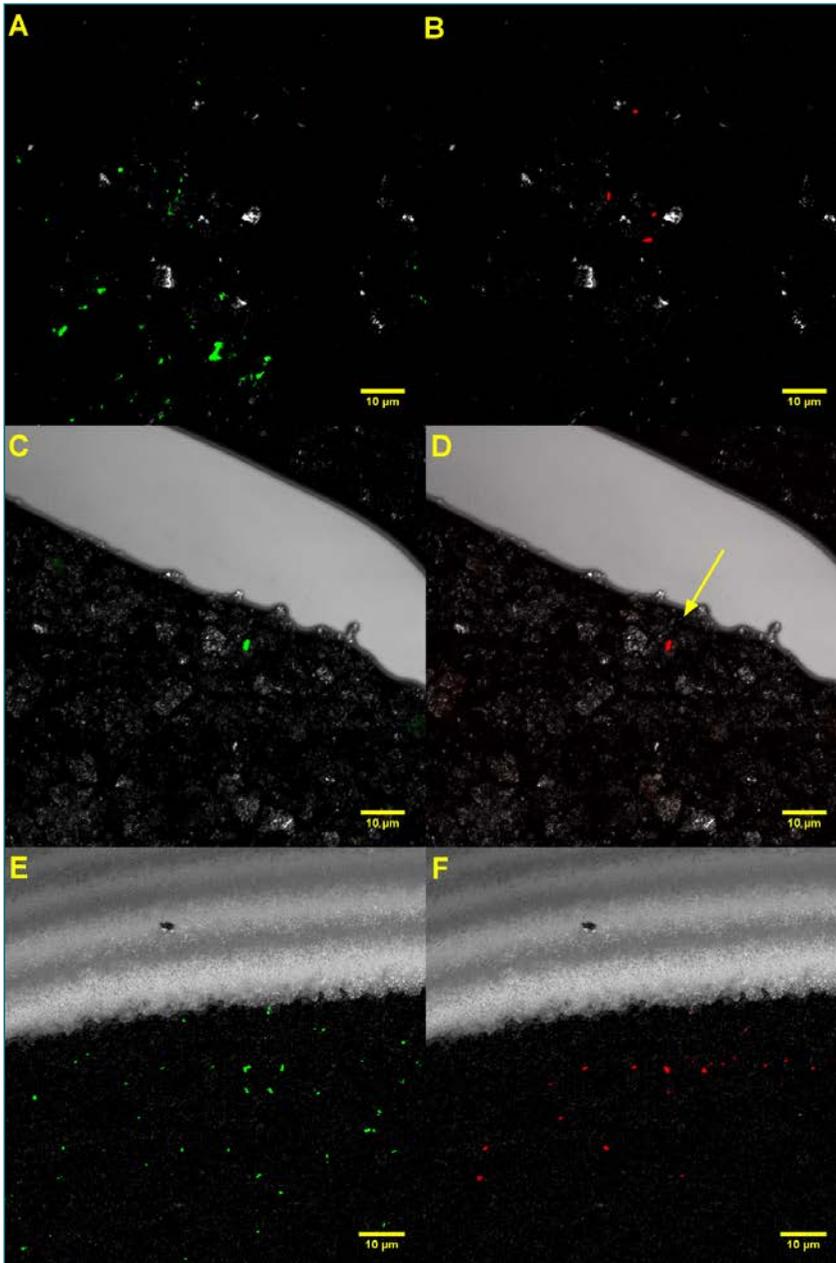


Figura 83: Señal de hibridación en Berr (A-B), P1 (C-D) y Hem (E-F) utilizando la sonda THIO820 (*Acidithiobacillus* sp.). En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal CARD-FISH y en gris la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

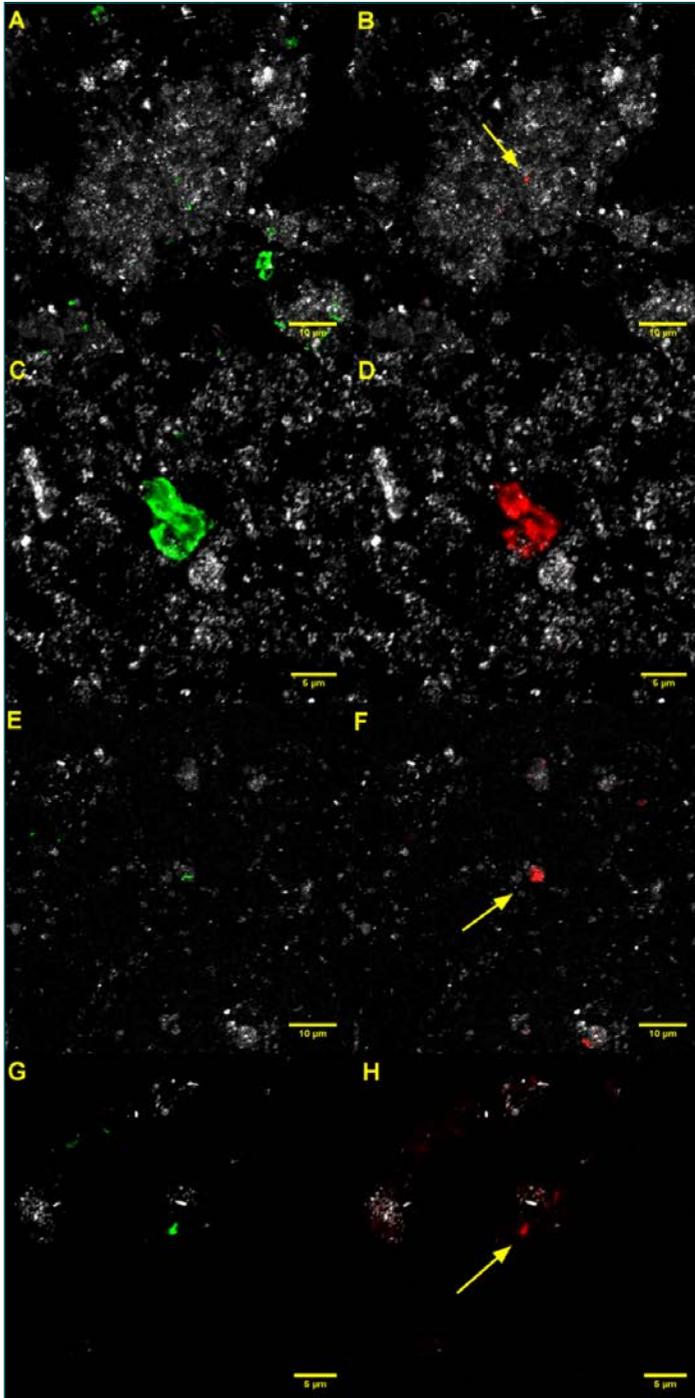


Figura 84: Señal de hibridación de Actinobacteria en las muestras de Berr (A-B), P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda HGC 69a. En verde, la señal de Syto9, en rojo la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10 µm en A-B-E-F y 5 µm en las imágenes C-D-G-H. ■

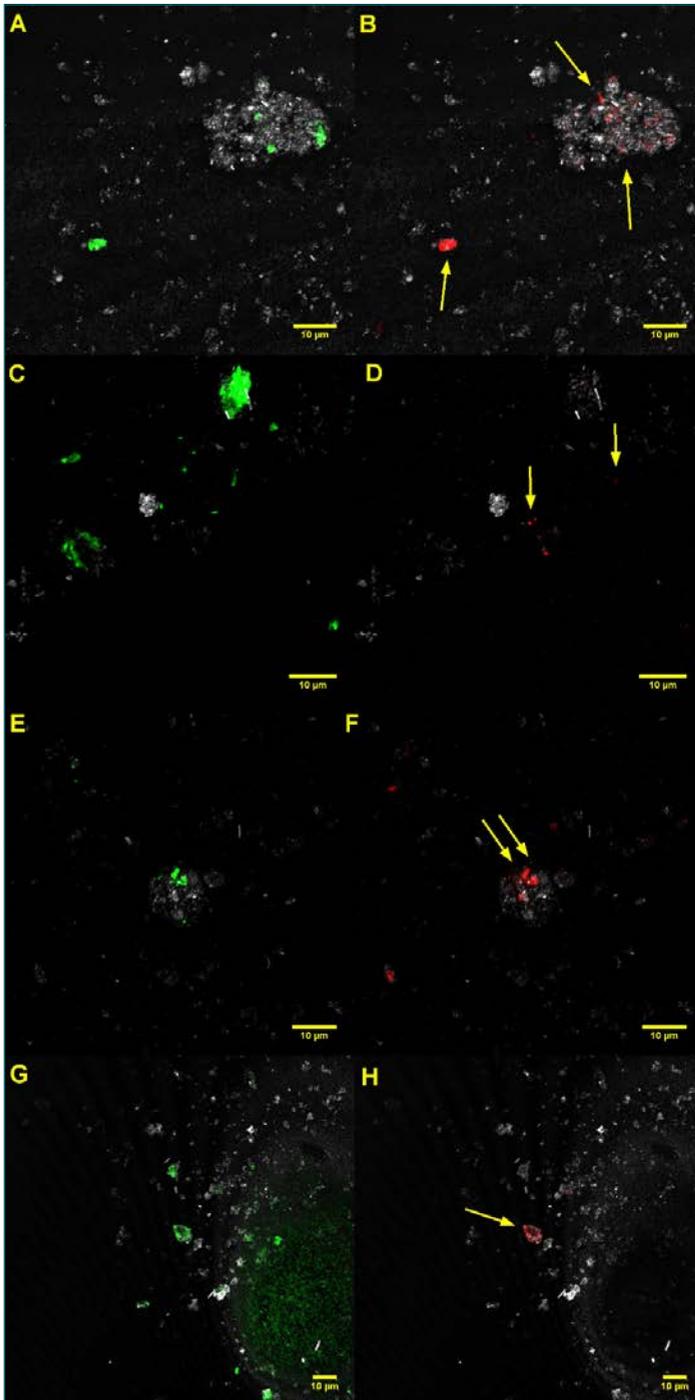


Figura 85: Señal de hibridación de Bacteroidetes (A-B) en Mag y Firmicutes en las muestras Berr (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando las sondas CF 319a y LGC 354a + b respectivamente. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

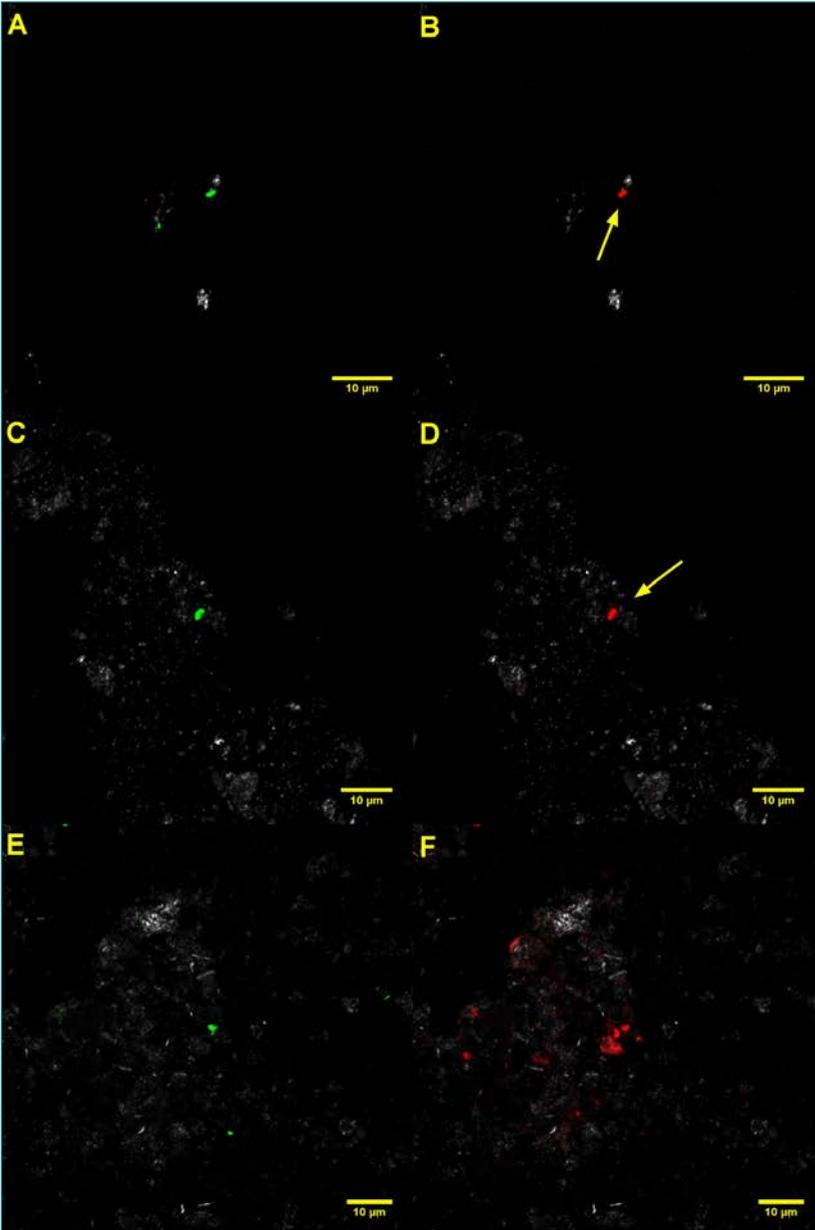


Figura 86: Señal de hibridación de *Sulfobacillus* sp. en las muestras de Berr (A-B), P1 (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda SUL 228. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

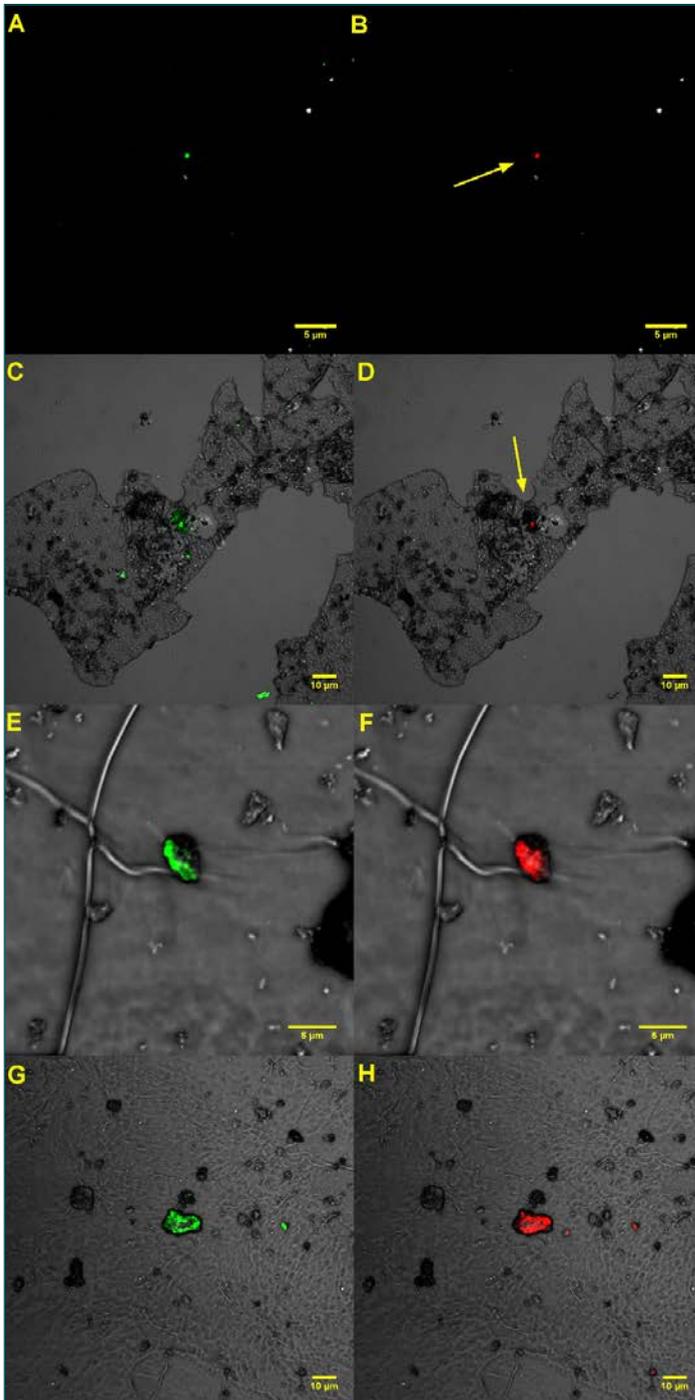


Figura 87: Señal de hibridación de Chloroflexi en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando sondas CFX 1223 + GNSB 938 combinadas. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son 10  $\mu\text{m}$  en A-B-E-F y 5  $\mu\text{m}$  en las imágenes C-D-G-H. ■

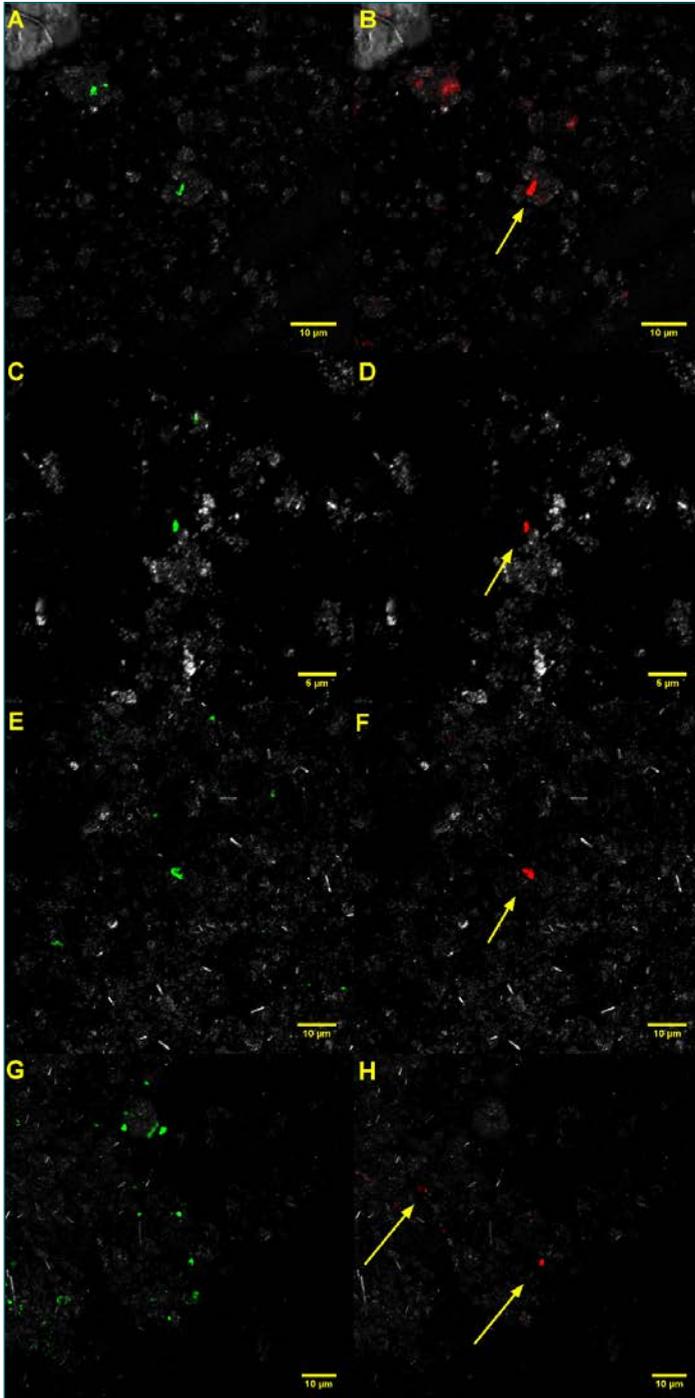


Figura 88: Señal de hibridación de Cyanobacteria (A-B) en Hem y señal de hibridación SRB en las muestras P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando las sondas CYA 358 y SRB 385 respectivamente. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH y en gris, reflexión. Escala: 10 µm excepto C-D (5 µm). ■

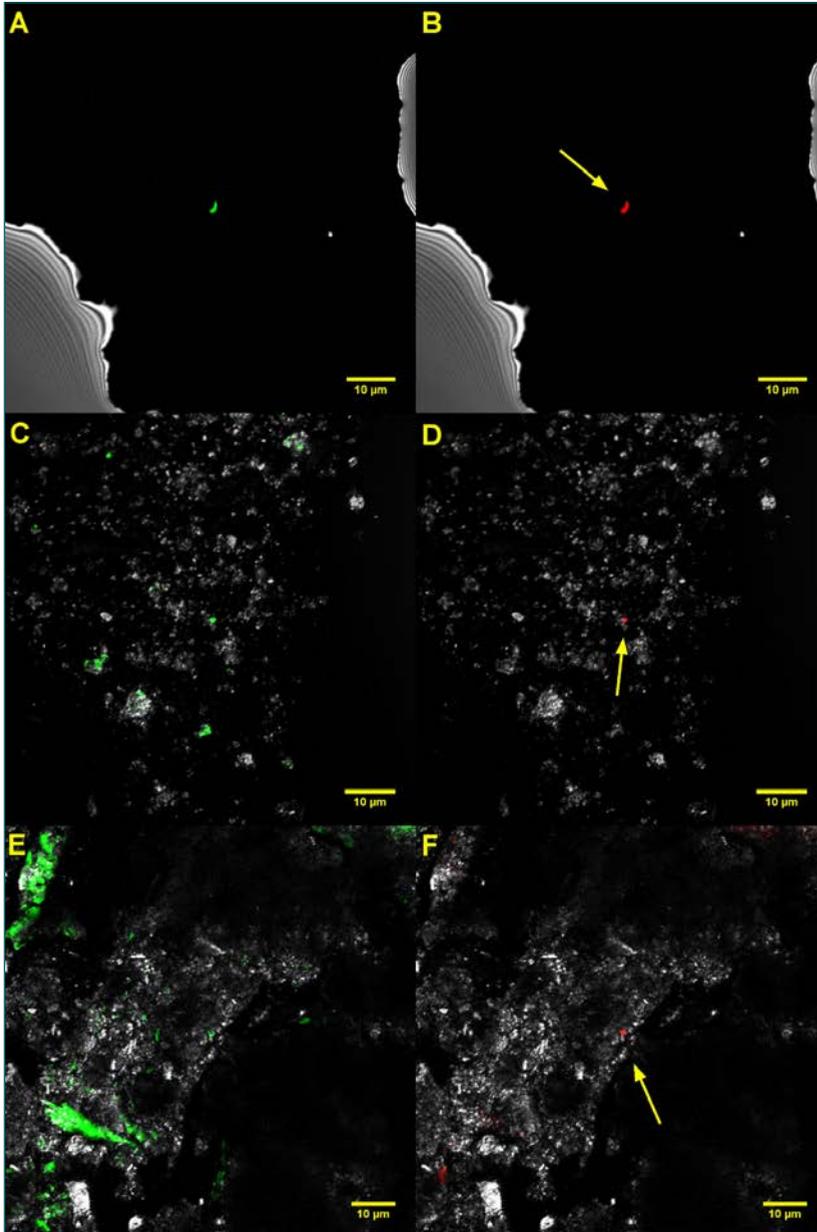


Figura 89: Señal de hibridación de Euryarchaeota en las muestras Berr (A-B), P1 (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda EURY 803. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

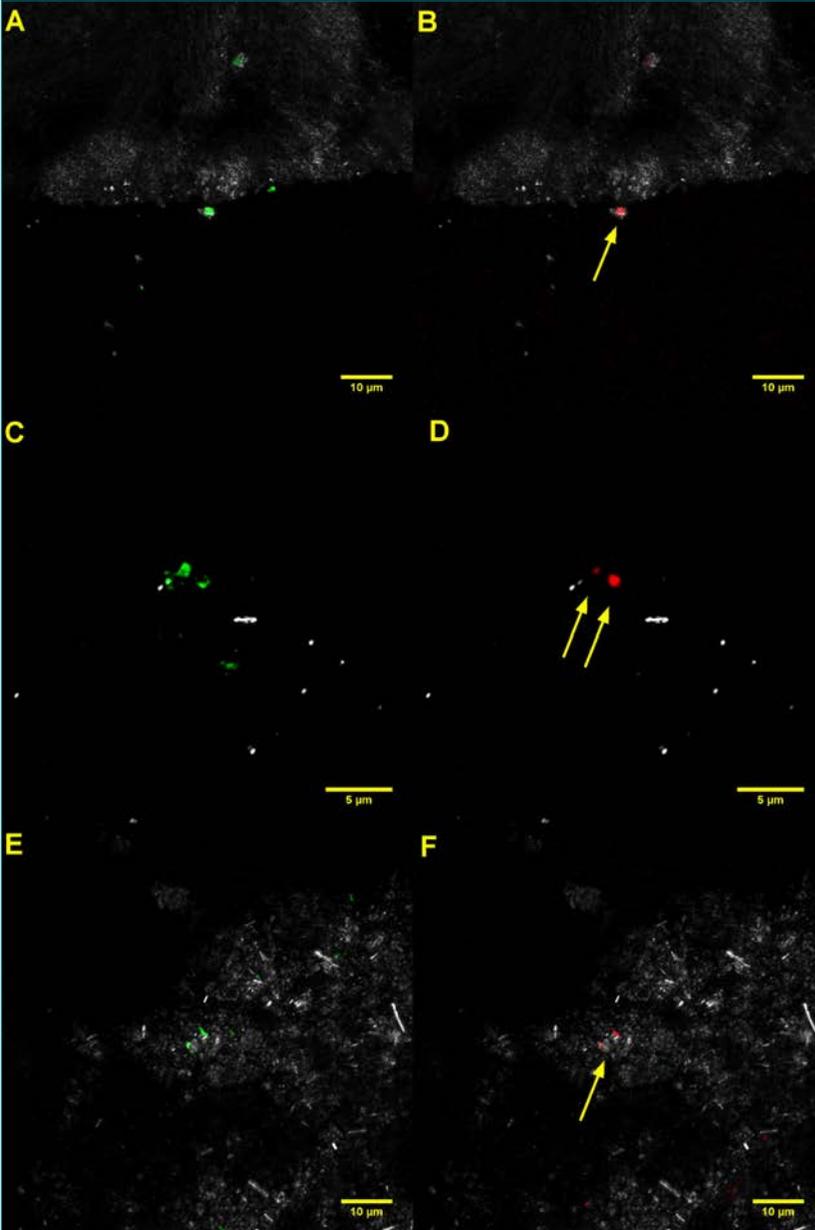


Figura 90: Señal de hibridación de Acidobacterias en las muestras Berr (A-B), Hem (C-D) y Mag (E-F) utilizando la sonda SS HOL 1400. En verde, la señal de Syto9; en rojo la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10  $\mu\text{m}$ . ■

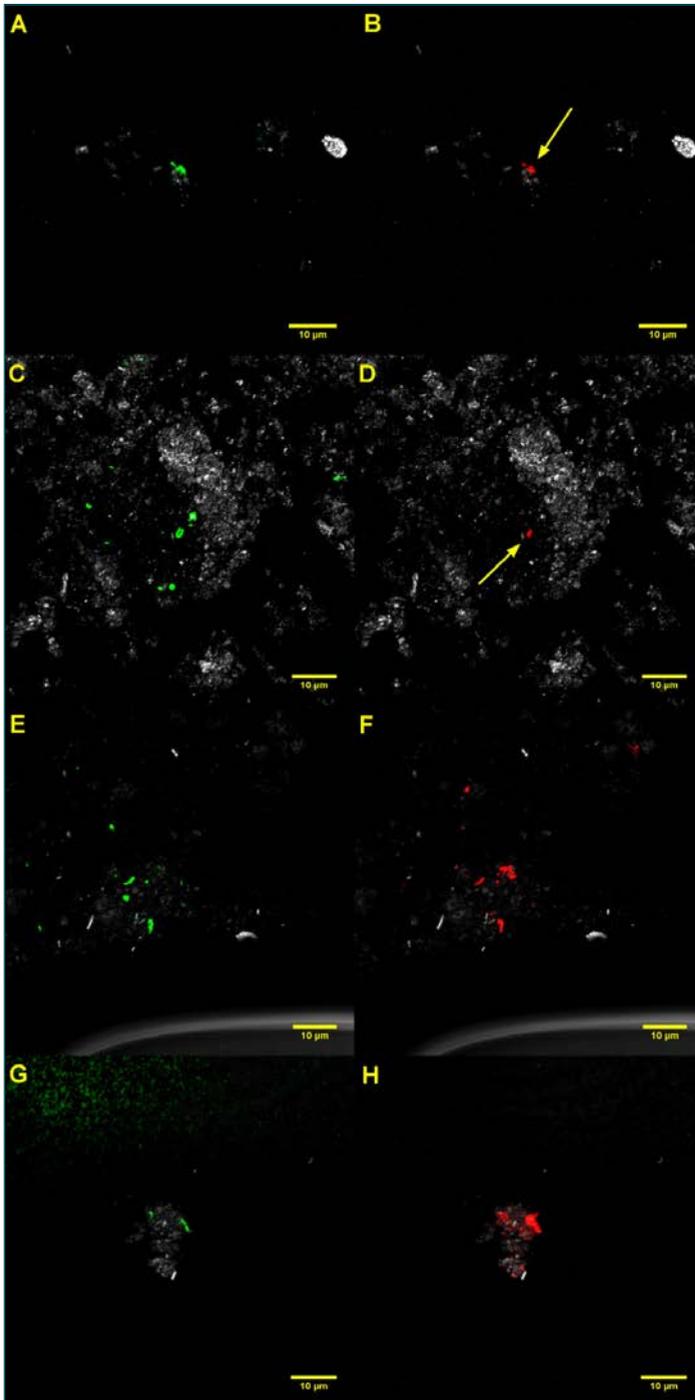
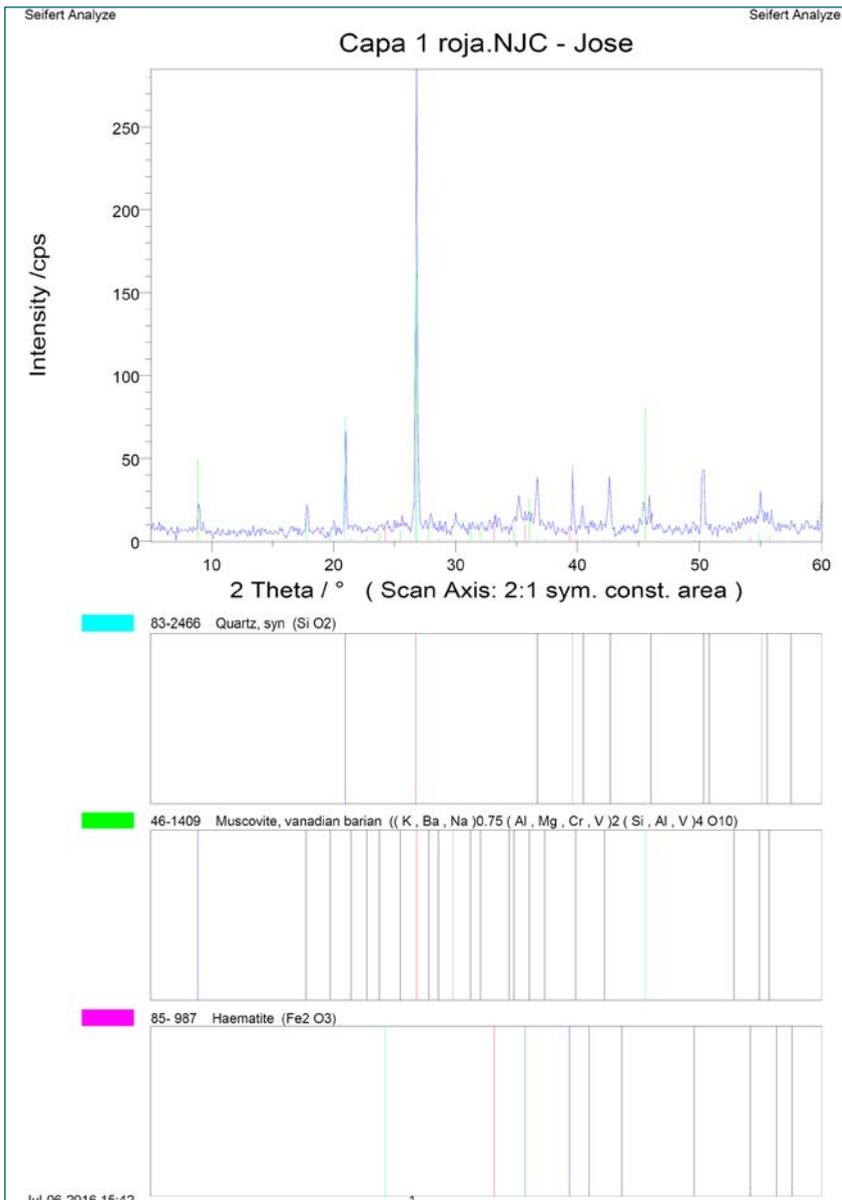


Figura 91: Señal de hibridación de *Leptospirillum* sp. en las muestras de Berr (A-B), P1 (C-D), Hem (E-F) y Mag (G-H) utilizando la sonda LF 655. En verde, la señal de Syto9; en rojo, la señal de CARD-FISH y en gris, la reflexión. Las barras de escala son de 10 µm. ■

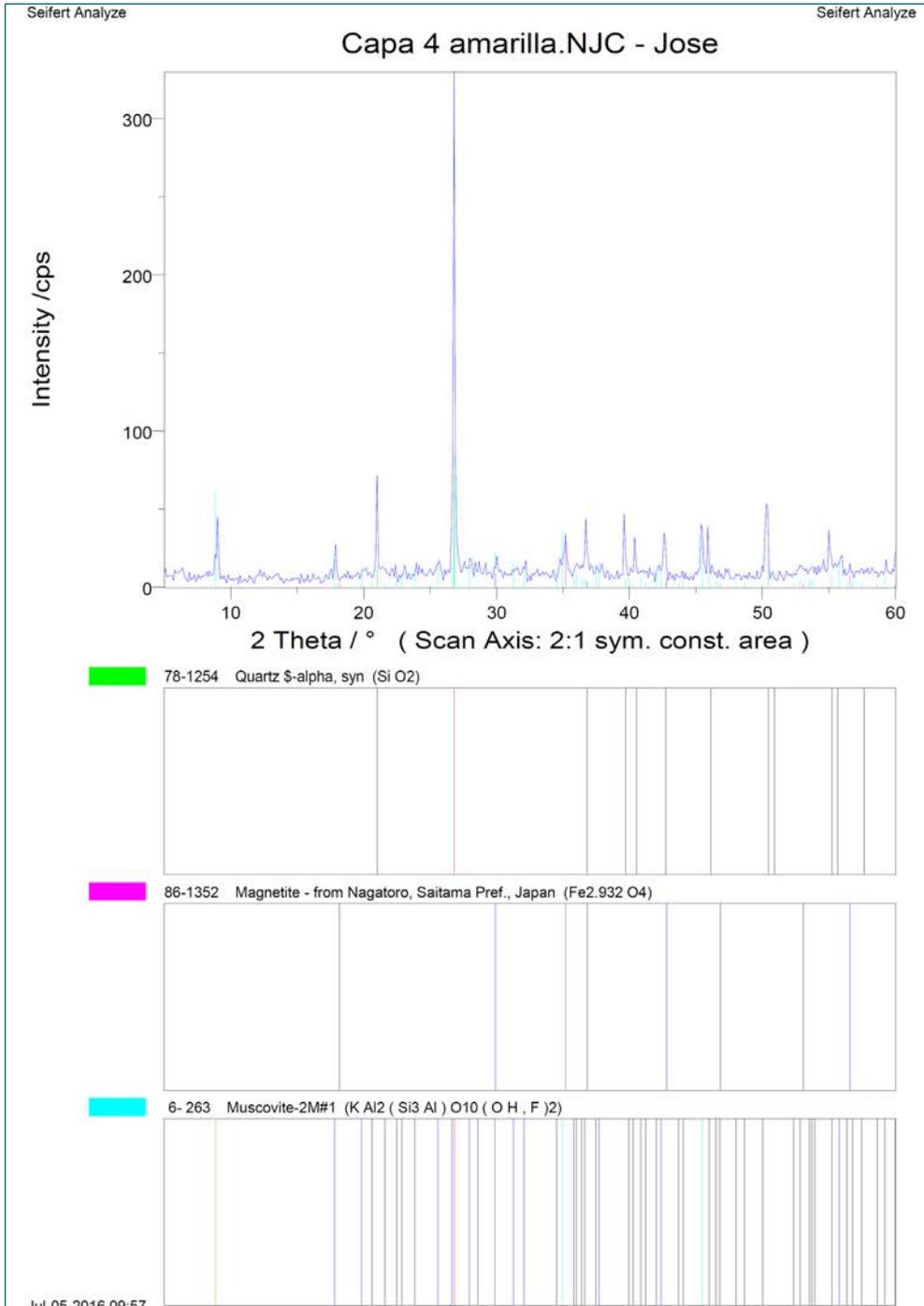
### M) XRD e ICP-MS. Datos originales obtenidos

En las páginas siguientes se mostrarán primero los datos brutos obtenidos del XRD y, posteriormente, los datos brutos de los análisis semicuantitativos del ICP-MS. El orden que siguen en las páginas sucesivas en ambos casos son: **Hem, Mag, Ror, Berr1, Berr2, Berr3, N-Berrocal, P1Ext, P1Int, P1Mix:**



| Seifert Analyze       | Search/Match Report  | Seifert Analyze |
|-----------------------|--|-----------------|
| Job:                  | Capa 1 roja.NJC - Jose   |                 |
| Scan Axis:            | 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s  |                 |
| Radiation:            | Cu = 0.15405980nm  |                 |
| Database:             | PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2                                    |                 |
|                       | Number of PDF phases : 124564  |                 |
| Results:              |  |                 |
| Peaks:                | 16 matched: 14   |                 |
| Phases:               | 35 accepted: 3   |                 |
|                       | <span style="color: cyan;">■</span> 83-2466 Quartz, syn FOM=0.506 SOM=1.984                    |                 |
|                       | <span style="color: magenta;">■</span> 46-1409 Muscovite, vanadian barian FOM=0.783 SOM=17.697 |                 |
|                       | <span style="color: red;">■</span> 85-987 Haematite FOM=2.785 SOM=40.000                       |                 |
| Settings:             |  |                 |
| Method:               | 2 Strongest Lines  |                 |
| Deleted Phases:       | used   |                 |
| Long Search           |  |                 |
| Error Window:         | 0.1° *(1+sin(Theta))   |                 |
| Theta Shift:          | 0.000°   |                 |
| Max Proposals:        | 500  |                 |
| rel. Intensity Level: | 60%  |                 |
| Intensity Threshold:  | 0%   |                 |
| Database:             | Set 1-49 with Subfile selection  |                 |
|                       | Mineral File   |                 |
| Jul-06-2016 15:42     | 2  |                 |

| No | d_Fit(A1) | $\angle_{\text{Parab}}$ | $\angle_{\text{COG}}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM   |
|----|-----------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------|
| 1  | 9.9087    | 8.9173                  | 8.9460                | 8.8000               | 9.1000               | 19.64            | 0.00             | 0.2637 |
| 2  | 4.9742    | 17.8171                 | 17.8419               | 17.7000              | 18.0000              | 19.10            | 0.00             | 0.2569 |
| 3  | 4.2272    | 20.9985                 | 21.0119               | 20.8000              | 21.1000              | 42.56            | 0.00             | 0.1832 |
| 4  | 3.3242    | 26.7974                 | 26.8112               | 26.6000              | 27.0000              | 100.52           | 0.00             | 0.2074 |
| 5  | 3.3242    | 26.7974                 | 26.8112               | 26.6000              | 27.0000              | 100.52           | 0.00             | 0.2074 |
| 6  | 2.6884    | 33.3000                 | 33.3105               | 32.6000              | 33.8000              | 16.00            | 0.00             | 0.7143 |
| 7  | 2.5470    | 35.2074                 | 35.2098               | 34.7000              | 36.4000              | 24.69            | 0.00             | 1.0892 |
| 8  | 2.4478    | 36.6842                 | 36.7063               | 36.4000              | 36.9000              | 35.17            | 0.00             | 0.3344 |
| 9  | 2.2732    | 39.6148                 | 39.6156               | 39.5000              | 39.8000              | 30.42            | 0.00             | 0.2328 |
| 10 | 2.2301    | 40.4136                 | 40.4164               | 40.2000              | 40.6000              | 18.29            | 0.00             | 0.3699 |
| 11 | 2.1207    | 42.5971                 | 42.6158               | 42.3000              | 42.8000              | 33.09            | 0.00             | 0.3489 |
| 12 | 1.9939    | 45.4519                 | 45.4585               | 45.3000              | 45.7000              | 20.98            | 0.00             | 0.3866 |
| 13 | 1.9744    | 45.9259                 | 45.9105               | 45.7000              | 46.0000              | 20.09            | 0.00             | 0.3049 |
| 14 | 1.8157    | 50.2062                 | 50.3114               | 50.1000              | 50.5000              | 43.88            | 0.00             | 0.3251 |
| 15 | 1.6676    | 55.0205                 | 55.0121               | 54.6000              | 55.3000              | 12.22            | 0.00             | 0.6553 |
| 16 | 1.6676    | 55.0205                 | 55.0121               | 54.6000              | 55.3000              | 12.22            | 0.00             | 0.6553 |



Job: Capa 4 amarilla.NJC - Jose  
Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s  
Radiation: Cu = 0.15405980nm  
Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2  
Number of PDF phases : 124564

## Results:

Peaks: 21 matched: 19

Phases: 46 accepted: 3

■ 78-1254 Quartz  $\beta$ -alpha, syn FOM=0.325 SOM=4.919

■ 86-1352 Magnetite - from Nagatoro, Saitama Pref., Japan FOM=1.051 SOM=7.055

■ 6- 263 Muscovite-2M#1 FOM=1.851 SOM=6.532

## Settings:

Method: 2 Strongest Lines

Deleted Phases: not used

Long Search

Error Window:  $0.1^\circ \cdot (1 + \sin(\Theta))$ Theta Shift:  $0.000^\circ$ 

Max Proposals: 500

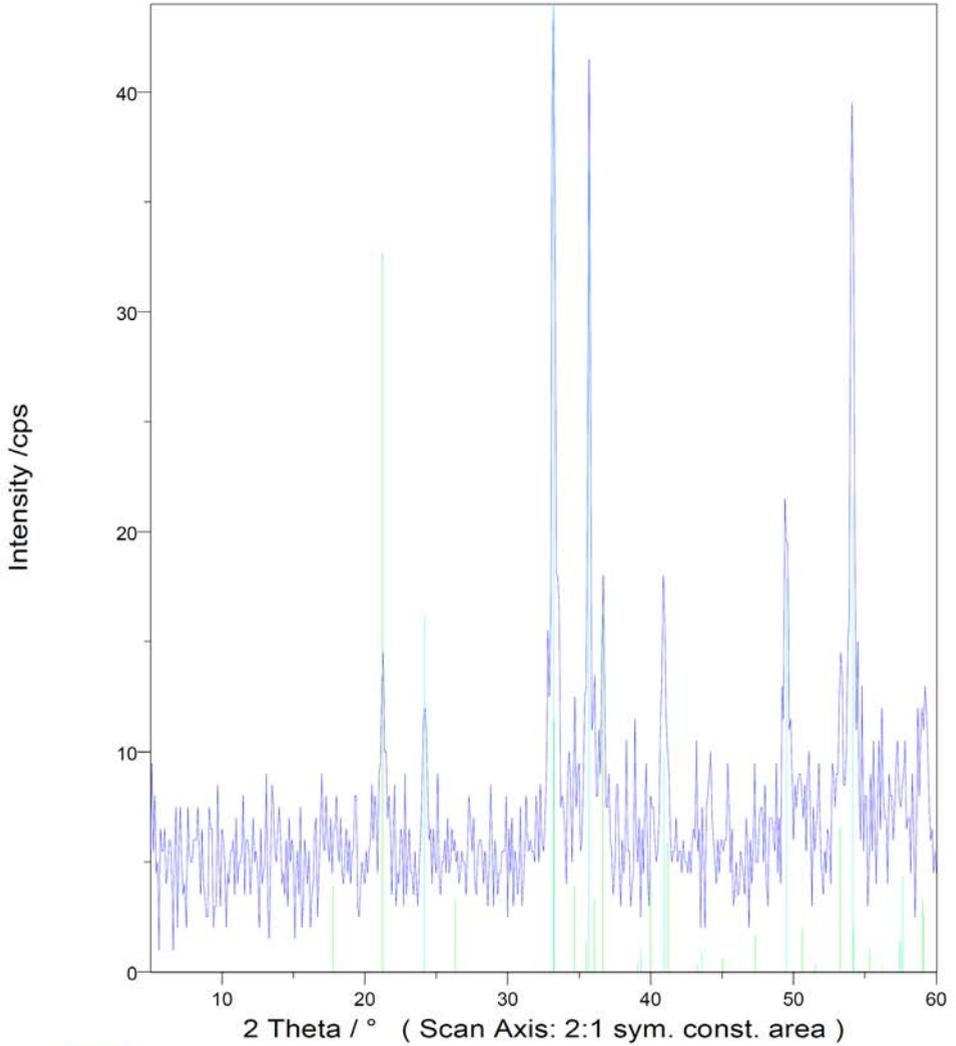
rel. Intensity Level: 60%

Intensity Threshold: 0%

Database: Set 1-49 with Subfile selection  
Mineral File

| Seifert Analyze |           |                  |                |                      |                      |                  |                  | Seifert Analyze |
|-----------------|-----------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| No              | d_Fit(A1) | $\angle_{Parab}$ | $\angle_{COG}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM            |
| 1               | 9.8532    | 8.9677           | 9.0119         | 8.7000               | 9.2000               | 31.80            | 0.00             | 0.3393          |
| 2               | 4.9529    | 17.8945          | 17.9094        | 17.7000              | 18.0000              | 21.23            | 0.00             | 0.2506          |
| 3               | 4.2267    | 21.0010          | 21.0122        | 20.8000              | 21.1000              | 44.54            | 0.00             | 0.1808          |
| 4               | 3.4736    | 25.6248          | 25.6304        | 25.2000              | 26.0000              | 15.87            | 0.00             | 0.6921          |
| 5               | 3.3239    | 26.7995          | 26.8126        | 26.6000              | 27.0000              | 52.80            | 0.00             | 0.1817          |
| 6               | 3.3239    | 26.7995          | 26.8126        | 26.6000              | 27.0000              | 105.60           | 0.00             | 0.1817          |
| 7               | 2.9791    | 29.9700          | 30.0108        | 29.7000              | 30.4000              | 7.96             | 0.00             | 0.6890          |
| 8               | 2.9791    | 29.9700          | 30.0108        | 29.7000              | 30.4000              | 7.96             | 0.00             | 0.6890          |
| 9               | 2.7890    | 32.0658          | 32.2004        | 30.5000              | 32.3000              | 13.36            | 0.00             | 1.7595          |
| 10              | 2.5494    | 35.1739          | 35.2098        | 34.6000              | 35.4000              | 28.03            | 0.00             | 0.4527          |
| 11              | 2.4458    | 36.7156          | 36.7146        | 36.5000              | 37.0000              | 4.12             | 0.00             | 0.3293          |
| 12              | 2.4458    | 36.7156          | 36.7146        | 36.5000              | 37.0000              | 4.12             | 0.00             | 0.3293          |
| 13              | 2.4458    | 36.7156          | 36.7146        | 36.5000              | 37.0000              | 16.47            | 0.00             | 0.3293          |
| 14              | 2.2727    | 39.6236          | 39.6162        | 39.5000              | 39.8000              | 32.73            | 0.00             | 0.2506          |
| 15              | 2.2304    | 40.4081          | 40.4150        | 40.3000              | 40.6000              | 23.15            | 0.00             | 0.2651          |
| 16              | 2.1199    | 42.6138          | 42.6292        | 42.4000              | 42.8000              | 30.18            | 0.00             | 0.2971          |
| 17              | 1.9946    | 45.4360          | 45.4473        | 45.3000              | 45.8000              | 34.15            | 0.00             | 0.2800          |
| 18              | 1.9755    | 45.8988          | 45.9146        | 45.8000              | 46.1000              | 25.73            | 0.00             | 0.2370          |
| 19              | 1.8122    | 50.3095          | 50.3509        | 50.1000              | 50.5000              | 53.40            | 0.00             | 0.2910          |
| 20              | 1.6670    | 55.0435          | 55.0165        | 54.9000              | 55.3000              | 27.33            | 0.00             | 0.3747          |
| 21              | 1.5568    | 59.3120          | 59.3131        | 59.1000              | 59.7000              | 14.05            | 0.00             | 1.0711          |

### 3B origen izquierda.NJC - Jose



79- 7 Hematite (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

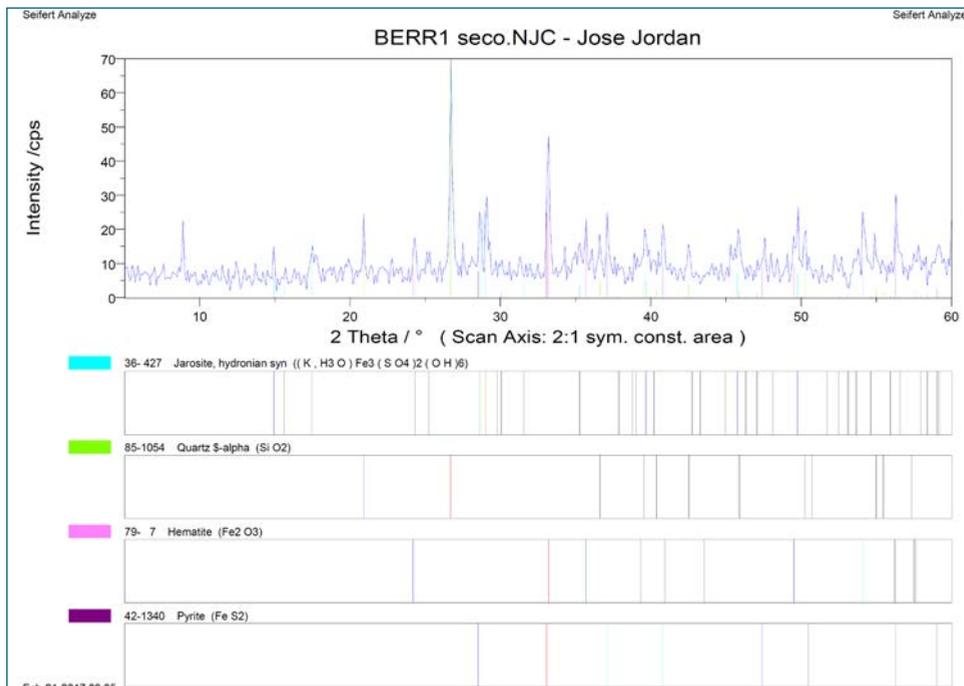


29- 713 Goethite (Fe O ( OH ))



| Seifert Analyze       | Search/Match Report   | Seifert Analyze |
|-----------------------|---|-----------------|
| Job:                  | 3B origen izquierda.NJC - Jose                              |                 |
| Scan Axis:            | 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s         |                 |
| Radiation:            | Cu = 0.15405980nm   |                 |
| Database:             | PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2 |                 |
|                       | Number of PDF phases : 124564                               |                 |
| Results:              |   |                 |
| Peaks:                | 21 matched: 16  |                 |
| Phases:               | 48 accepted: 2  |                 |
|                       | 79- 7 Hematite FOM=0.211 SOM=3.262                          |                 |
|                       | 29- 713 Goethite FOM=0.917 SOM=2.629                        |                 |
| Settings:             |   |                 |
| Method:               | 3 Strongest Lines   |                 |
| Deleted Phases:       | used  |                 |
| Long Search           |   |                 |
| Error Window:         | 0.1° *(1+sin(Theta))  |                 |
| Theta Shift:          | 0.000°  |                 |
| Max Proposals:        | 500   |                 |
| rel. Intensity Level: | 60%   |                 |
| Intensity Threshold:  | 0%  |                 |
| Database:             | Set 1-49 with Subfile selection                             |                 |
|                       | Mineral File  |                 |
| Dec 16 2016 12:15     | 2   |                 |

| No | d_Fit(A1) | $\angle_{\text{Parab}}$ | $\angle_{\text{COG}}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM   |
|----|-----------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------|
| 1  | 4.1702    | 21.2892                 | 21.2748               | 20.3000              | 21.9000              | 13.27            | 0.00             | 0.8436 |
| 2  | 3.6759    | 24.1922                 | 24.2159               | 23.8000              | 25.3000              | 12.13            | 0.00             | 0.5940 |
| 3  | 2.7290    | 32.7913                 | 32.8197               | 30.0000              | 32.9000              | 15.50            | 0.00             | 0.4208 |
| 4  | 2.6964    | 33.1985                 | 33.1703               | 32.6000              | 33.8000              | 21.74            | 0.00             | 0.3514 |
| 5  | 2.6964    | 33.1985                 | 33.1703               | 32.6000              | 33.8000              | 21.74            | 0.00             | 0.3514 |
| 6  | 2.5820    | 34.7150                 | 34.7102               | 34.1000              | 35.2000              | 12.50            | 0.00             | 0.5455 |
| 7  | 2.5130    | 35.7004                 | 35.7152               | 35.2000              | 36.5000              | 35.41            | 0.00             | 0.3123 |
| 8  | 2.4851    | 36.1141                 | 36.0531               | 35.9000              | 36.2000              | 13.50            | 0.00             | 0.2172 |
| 9  | 2.4475    | 36.6897                 | 36.6739               | 35.9000              | 37.3000              | 16.78            | 0.00             | 0.5708 |
| 10 | 2.3475    | 38.3116                 | 38.3125               | 37.9000              | 38.6000              | 9.20             | 0.00             | 0.4258 |
| 11 | 2.3141    | 38.8862                 | 38.9142               | 38.6000              | 40.5000              | 10.11            | 0.00             | 0.2865 |
| 12 | 2.2042    | 40.9090                 | 40.9434               | 40.5000              | 41.5000              | 16.90            | 0.00             | 0.6862 |
| 13 | 2.0902    | 43.2495                 | 43.2116               | 42.2000              | 43.5000              | 10.50            | 0.00             | 0.5778 |
| 14 | 2.0514    | 44.1100                 | 44.1067               | 43.8000              | 45.8000              | 9.31             | 0.00             | 0.6865 |
| 15 | 1.8506    | 49.1955                 | 49.2384               | 46.9000              | 49.3000              | 13.00            | 0.00             | 0.5056 |
| 16 | 1.8401    | 49.4940                 | 49.4922               | 49.0000              | 51.2000              | 21.61            | 0.00             | 0.6522 |
| 17 | 1.7174    | 53.3000                 | 53.3194               | 52.5000              | 53.7000              | 14.46            | 0.00             | 1.5770 |
| 18 | 1.6937    | 54.1041                 | 54.0966               | 53.6000              | 54.7000              | 19.67            | 0.00             | 0.3754 |
| 19 | 1.6937    | 54.1041                 | 54.0966               | 53.6000              | 54.7000              | 19.67            | 0.00             | 0.3754 |
| 20 | 1.6069    | 57.2876                 | 57.5414               | 55.6000              | 58.5000              | 9.82             | 0.00             | 1.5653 |
| 21 | 1.5605    | 59.1580                 | 59.1326               | 58.5000              | 59.8000              | 12.38            | 0.00             | 0.9952 |



Search/Match Report

Job: BERR1 seco.NJC - Jose Jordan  
 Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°; 0.100° 2.0s  
 Radiation: Cu = 0.15405989nm  
 Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\power diffraction file\pdf2  
 Number of PDF phases : 124564

Results:  
 Peaks: 30 matched; 28  
 Phases: 4 accepted; 4

|         |   |
|---------|---|
| 85-1054 | Quartz $\beta$ -alpha FOM=0.224 SOM=3.549   |
| 79-7    | Hematite FOM=0.498 SOM=3.253                |
| 42-1340 | Pyrite FOM=0.825 SOM=2.981                  |
| 36-427  | Jarosite, hydronian syn FOM=1.034 SOM=7.100 |

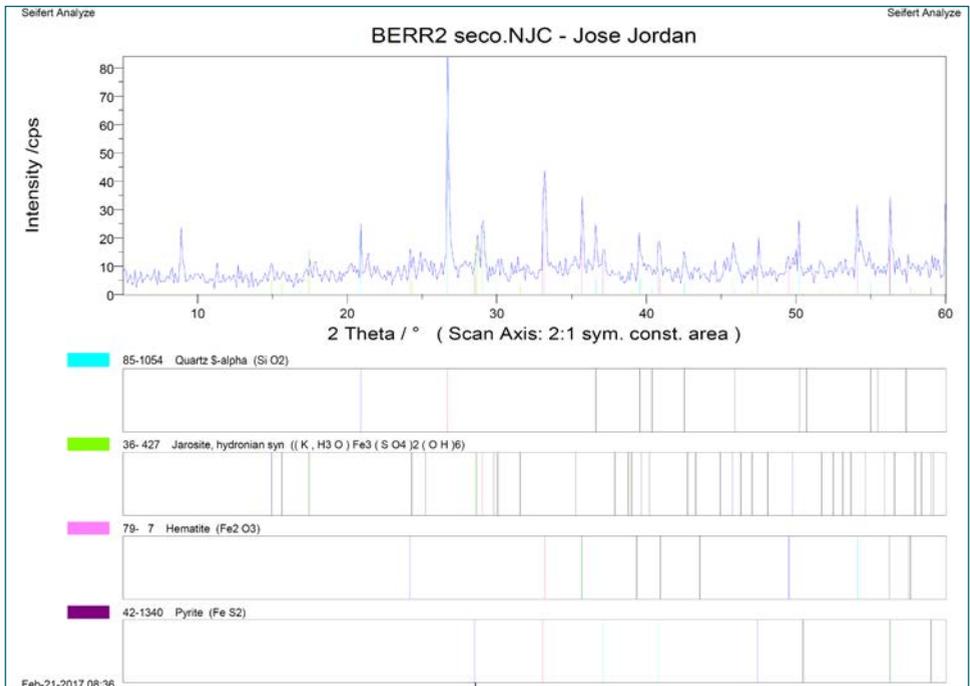
Settings:  
 Method: 1 Strongest Lines  
 Deleted Phases: not used  
 Long Search  
 Error Window: 0.1° \*(1+sin(Theta))  
 Theta Shift: 0.000°  
 Max Proposals: 500  
 rel. Intensity Level: 60%  
 Intensity Threshold: 0%  
 Database: Set 1-49 with Subfile selection  
 Mineral File  
 Zeolites

Feb-21-2017 08:35

Seifert Analyze Seifert Analyze

| No | d_Fit(A) | $f_{\text{Pvrb}}$ | $f_{\text{CoO}}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Up</sub> | $I_{\text{ref}}$ | $I_{\text{sp}}$ | FWHM   |
|----|----------|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|------------------|-----------------|--------|
| 1  | 9.9290   | 8.8990            | 9.9105           | 8.7000               | 9.0000              | 21.53            | 0.00            | 0.1966 |
| 2  | 9.9404   | 14.9012           | 14.9166          | 14.8000              | 15.1000             | 13.66            | 0.00            | 0.2216 |
| 3  | 4.2471   | 20.8990           | 20.9125          | 20.8000              | 21.0000             | 23.28            | 0.00            | 0.1774 |
| 4  | 3.6606   | 24.2953           | 24.2774          | 24.1000              | 24.5000             | 8.43             | 0.00            | 0.3411 |
| 5  | 3.6606   | 24.2953           | 24.2774          | 24.1000              | 24.5000             | 8.43             | 0.00            | 0.3411 |
| 6  | 3.3359   | 26.7012           | 26.7137          | 26.5000              | 27.0000             | 67.65            | 0.00            | 0.2043 |
| 7  | 3.1164   | 28.6206           | 28.6506          | 28.5000              | 28.9000             | 11.65            | 0.00            | 0.2868 |
| 8  | 3.1164   | 28.6206           | 28.6506          | 28.5000              | 28.9000             | 11.65            | 0.00            | 0.2868 |
| 9  | 3.0665   | 29.0964           | 29.0832          | 28.9000              | 29.4000             | 27.82            | 0.00            | 0.3893 |
| 10 | 2.6964   | 33.1985           | 33.2102          | 32.9000              | 33.4000             | 22.53            | 0.00            | 0.2774 |
| 11 | 2.6964   | 33.1985           | 33.2102          | 32.9000              | 33.4000             | 22.53            | 0.00            | 0.2774 |
| 12 | 2.5130   | 35.7003           | 35.7079          | 35.5000              | 35.9000             | 21.94            | 0.00            | 0.2786 |
| 13 | 2.4533   | 36.5996           | 36.6125          | 36.3000              | 36.8000             | 16.99            | 0.00            | 0.4536 |
| 14 | 2.4214   | 37.0985           | 37.1139          | 36.9000              | 37.4000             | 23.59            | 0.00            | 0.3009 |
| 15 | 2.2729   | 39.6204           | 39.6385          | 39.2000              | 40.0000             | 9.05             | 0.00            | 0.7662 |
| 16 | 2.2729   | 39.6204           | 39.6385          | 39.2000              | 40.0000             | 9.05             | 0.00            | 0.7662 |
| 17 | 2.2089   | 40.3180           | 40.3365          | 40.0000              | 41.0000             | 9.44             | 0.00            | 0.3715 |
| 18 | 2.2089   | 40.3180           | 40.3365          | 40.0000              | 41.0000             | 9.44             | 0.00            | 0.3715 |
| 19 | 1.9794   | 45.8044           | 45.8395          | 45.2000              | 46.2000             | 8.69             | 0.00            | 0.9254 |
| 20 | 1.9794   | 45.8044           | 45.8395          | 45.2000              | 46.2000             | 8.69             | 0.00            | 0.9254 |
| 21 | 1.9105   | 47.5552           | 47.6075          | 47.2000              | 47.7000             | 14.43            | 0.00            | 0.3061 |
| 22 | 1.8294   | 49.8043           | 49.8103          | 49.4000              | 50.0000             | 24.46            | 0.00            | 0.4642 |
| 23 | 1.8131   | 50.2834           | 50.2863          | 50.1000              | 50.4000             | 18.00            | 0.00            | 0.2913 |
| 24 | 1.6934   | 54.1163           | 54.1321          | 54.0000              | 54.5000             | 23.48            | 0.00            | 0.3582 |
| 25 | 1.6710   | 54.8993           | 54.9159          | 54.4000              | 55.7000             | 17.61            | 0.00            | 0.4369 |
| 26 | 1.6326   | 56.3057           | 56.3157          | 56.2000              | 56.8000             | 14.11            | 0.00            | 0.2662 |
| 27 | 1.6326   | 56.3057           | 56.3157          | 56.2000              | 56.8000             | 14.11            | 0.00            | 0.2662 |
| 28 | 1.5842   | 57.7876           | 57.8207          | 57.1000              | 58.4000             | 13.85            | 0.00            | 1.2170 |
| 29 | 1.5603   | 59.1650           | 59.1640          | 58.4000              | 59.9000             | 7.66             | 0.00            | 1.0204 |
| 30 | 1.5603   | 59.1650           | 59.1640          | 58.4000              | 59.9000             | 7.66             | 0.00            | 1.0204 |

Feb-21-2017 08:35 3



Seifert Analyze Search/Match Report Seifert Analyze

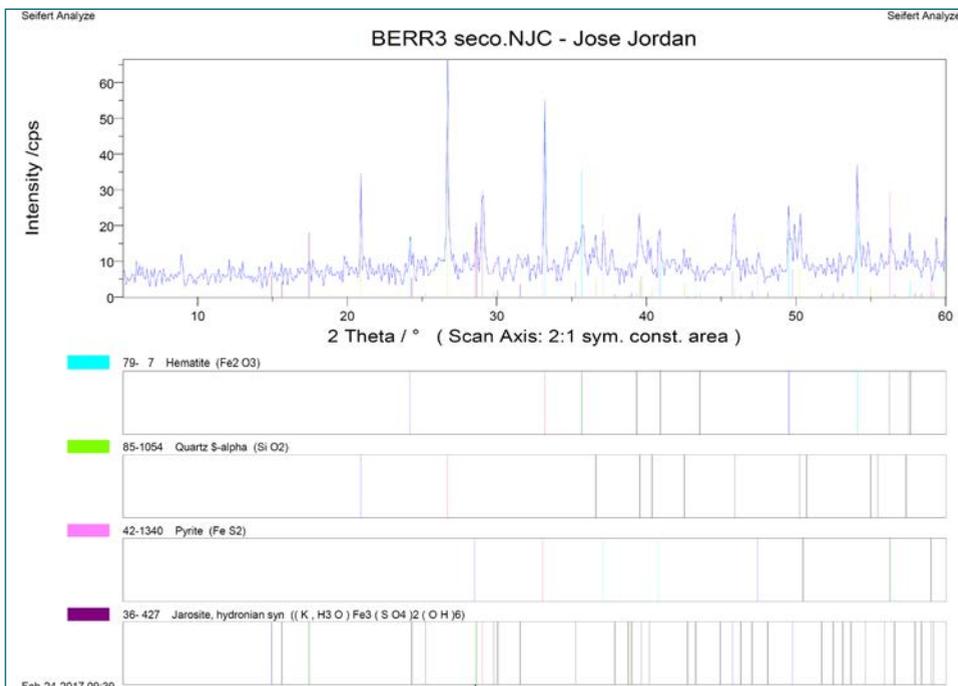
Job: BERR2 seco.NJC - Jose Jordan  
 Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°; 0.100° 2.0s  
 Radiation: Cu = 0.15405980nm  
 Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\power diffraction file\pdf2  
 Number of PDF phases : 124564

Results:  
 Peaks: 19 matched: 18  
 Phases: 4 accepted: 4

- 85-1054 Quartz S-alpha FOM=0.221 SOM=3.559
- 79- 7 Hematite FOM=0.496 SOM=4.289
- 42-1340 Pyrite FOM=1.194 SOM=4.359
- 36- 427 Jarosite, hydronian syn FOM=1.966 SOM=29.360

Settings:  
 Method: 1 Strongest Lines  
 Deleted Phases: not used  
 Long Search  
 Error Window: 0.1° \*(1+sin(Theta))  
 Theta Shift: 0.000°  
 Max Proposals: 500  
 rel. Intensity Level: 60%  
 Intensity Threshold: 0%  
 Database: Set 1-49 with Subfile selection  
 Mineral File  
 Zeolites

Feb-21-2017 08:36 2



Seifert Analyze Search/Match Report Seifert Analyze

Job: BERR3 seco.NJC - Jose Jordan  
 Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°; 0.100° 2.0s  
 Radiation: Cu = 0.15405980nm  
 Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\power diffraction file\pdf2  
 Number of PDF phases : 124564

Results:  
 Peaks: 23 matched; 22  
 Phases: 82 accepted; 4

■ 36-427 Jarosite, hydronian syn FOM=1.608 SOM=19.566  
■ 79-7 Hematite FOM=0.178 SOM=2.449  
■ 85-1054 Quartz S-alpha FOM=0.209 SOM=3.367  
■ 42-1340 Pyrite FOM=0.893 SOM=2.950

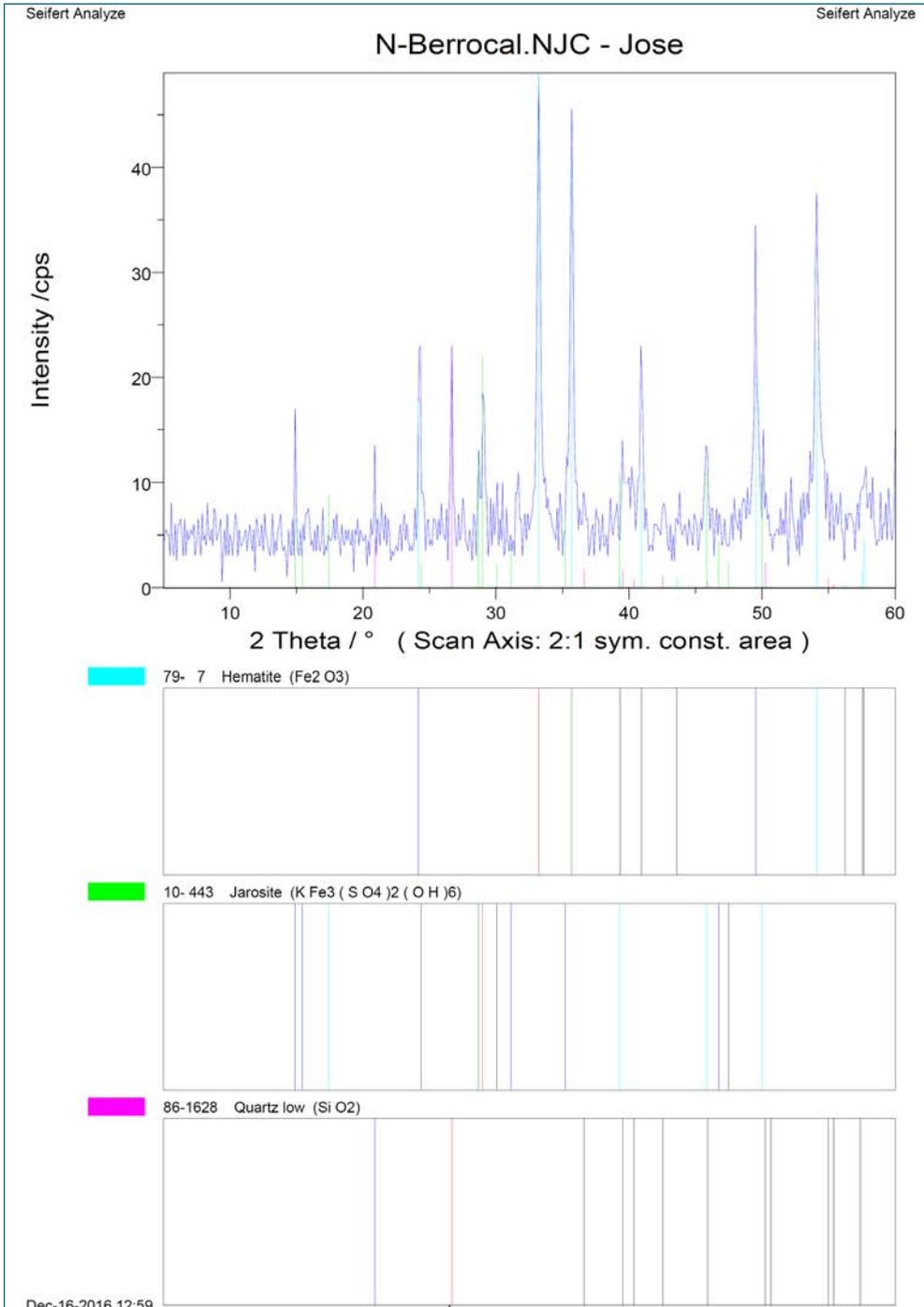
Settings:  
 Method: 1 Strongest Lines  
 Deleted Phases: not used  
 Long Search  
 Error Window: 0.1° \*(1+sin(Theta))  
 Theta Shift: 0.000°  
 Max Proposals: 500  
 rel. Intensity Level: 60%  
 Intensity Threshold: 0%  
 Database: Set 1-49 with Subfile selection  
 Mineral File  
 Zeolites

Feb-24-2017 09:39 2

Seifert Analyze Seifert Analyze

| No | d_Fit(A1) | $\epsilon_{\text{peak}}$ | $\epsilon_{\text{cog}}$ | Limit <sub>low</sub> | Limit <sub>high</sub> | I <sub>int</sub> | I <sub>sp</sub> | FWHM   |
|----|-----------|--------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-----------------|--------|
| 1  | 4.2474    | 20.8976                  | 20.9126                 | 20.8000              | 21.0000               | 32.00            | 0.00            | 0.1358 |
| 2  | 3.6757    | 24.1938                  | 24.2125                 | 24.0000              | 24.5000               | 7.65             | 0.00            | 0.4423 |
| 3  | 3.6757    | 24.1938                  | 24.2125                 | 24.0000              | 24.5000               | 7.65             | 0.00            | 0.4423 |
| 4  | 3.3362    | 26.6991                  | 26.7127                 | 26.5000              | 26.9000               | 64.69            | 0.00            | 0.1439 |
| 5  | 3.1185    | 28.6015                  | 28.6152                 | 28.5000              | 28.8000               | 8.94             | 0.00            | 0.2718 |
| 6  | 3.1185    | 28.6015                  | 28.6152                 | 28.5000              | 28.8000               | 8.94             | 0.00            | 0.2718 |
| 7  | 3.0688    | 29.0744                  | 29.0626                 | 28.8000              | 29.3000               | 26.75            | 0.00            | 0.2995 |
| 8  | 2.6963    | 33.1993                  | 33.2124                 | 33.0000              | 33.3000               | 26.04            | 0.00            | 0.1485 |
| 9  | 2.6963    | 33.1993                  | 33.2124                 | 33.0000              | 33.3000               | 26.04            | 0.00            | 0.1485 |
| 10 | 2.5128    | 35.7028                  | 35.7600                 | 34.8000              | 36.1000               | 19.57            | 0.00            | 1.1095 |
| 11 | 2.4534    | 36.5969                  | 36.6143                 | 36.1000              | 37.0000               | 16.07            | 0.00            | 0.8127 |
| 12 | 2.4200    | 37.1203                  | 37.1384                 | 37.0000              | 37.3000               | 17.13            | 0.00            | 0.2894 |
| 13 | 2.2794    | 39.5028                  | 39.5138                 | 39.3000              | 40.0000               | 22.19            | 0.00            | 0.4927 |
| 14 | 2.2050    | 40.8939                  | 40.8797                 | 40.7000              | 41.2000               | 8.83             | 0.00            | 0.3969 |
| 15 | 2.2050    | 40.8939                  | 40.8797                 | 40.7000              | 41.2000               | 8.83             | 0.00            | 0.3969 |
| 16 | 1.9767    | 45.8700                  | 45.8736                 | 45.6000              | 46.1000               | 10.52            | 0.00            | 0.3694 |
| 17 | 1.9767    | 45.8700                  | 45.8736                 | 45.6000              | 46.1000               | 10.52            | 0.00            | 0.3694 |
| 18 | 1.8398    | 49.5033                  | 49.5171                 | 49.4000              | 49.8000               | 23.05            | 0.00            | 0.3564 |
| 19 | 1.8259    | 49.9072                  | 49.9170                 | 49.6000              | 50.2000               | 17.62            | 0.00            | 2.0743 |
| 20 | 1.8124    | 50.3030                  | 50.3168                 | 50.0000              | 50.5000               | 21.24            | 0.00            | 0.3234 |
| 21 | 1.6936    | 54.1072                  | 54.1150                 | 54.0000              | 54.4000               | 34.68            | 0.00            | 0.2044 |
| 22 | 1.6327    | 56.3024                  | 56.3174                 | 56.1000              | 56.7000               | 9.00             | 0.00            | 0.5667 |
| 23 | 1.6327    | 56.3024                  | 56.3174                 | 56.1000              | 56.7000               | 9.00             | 0.00            | 0.5667 |

Feb-24-2017 09:39 3



Job: N-Berrocal.NJC - Jose  
Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s  
Radiation: Cu = 0.15405980nm  
Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2  
Number of PDF phases : 124564

## Results:

Peaks: 18 matched: 17

Phases: 55 accepted: 3

|     |      |            |           |           |
|-----|------|------------|-----------|-----------|
| 79- | 7    | Hematite   | FOM=0.246 | SOM=2.899 |
| 86- | 1628 | Quartz low | FOM=0.266 | SOM=4.157 |
| 10- | 443  | Jarosite   | FOM=1.281 | SOM=3.689 |

## Settings:

Method: 3 Strongest Lines

Deleted Phases: used

Long Search

Error Window:  $0.1^\circ \cdot (1 + \sin(\Theta))$ Theta Shift:  $0.000^\circ$ 

Max Proposals: 500

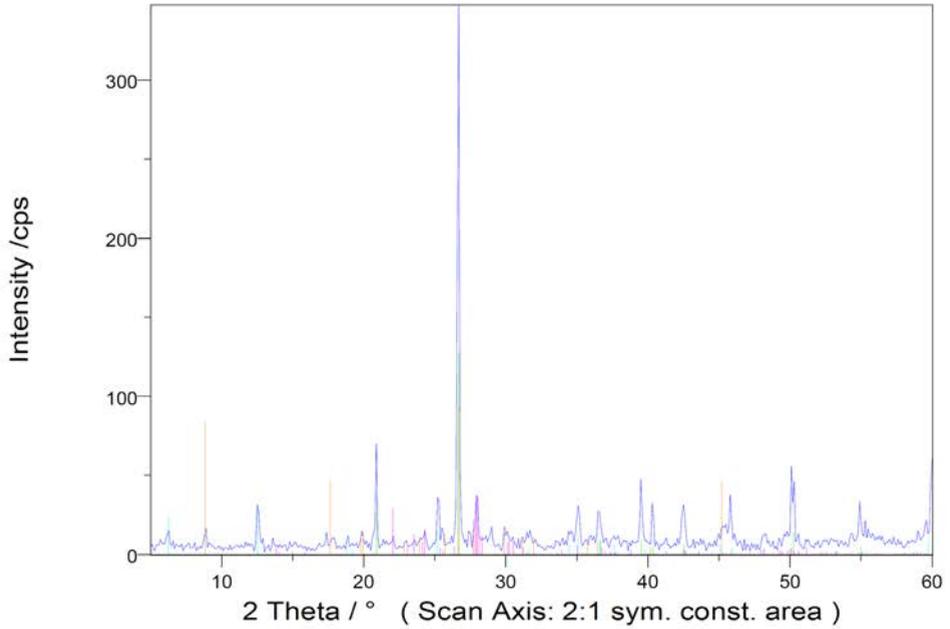
rel. Intensity Level: 60%

Intensity Threshold: 0%

Database: Set 1-49 with Subfile selection  
Mineral File

| Seifert Analyze |           |                  |                |                      |                      |                  |                  | Seifert Analyze |
|-----------------|-----------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| No              | d_Fit(A1) | $\angle_{Parab}$ | $\angle_{COG}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM            |
| 1               | 5.9432    | 14.8942          | 14.9143        | 14.8000              | 15.0000              | 10.83            | 0.00             | 0.1986          |
| 2               | 4.2428    | 20.9205          | 20.9106        | 20.3000              | 22.1000              | 13.50            | 0.00             | 0.1543          |
| 3               | 3.6629    | 24.2794          | 24.2611        | 24.1000              | 24.4000              | 10.30            | 0.00             | 0.2779          |
| 4               | 3.6629    | 24.2794          | 24.2611        | 24.1000              | 24.4000              | 10.30            | 0.00             | 0.2779          |
| 5               | 3.3377    | 26.6871          | 26.7083        | 26.5000              | 26.8000              | 17.77            | 0.00             | 0.2837          |
| 6               | 3.1062    | 28.7168          | 28.7136        | 28.2000              | 28.9000              | 11.82            | 0.00             | 0.3568          |
| 7               | 3.0732    | 29.0323          | 29.0520        | 28.9000              | 29.3000              | 16.51            | 0.00             | 0.5682          |
| 8               | 2.8274    | 31.6192          | 31.6369        | 31.4000              | 32.0000              | 9.63             | 0.00             | 0.5179          |
| 9               | 2.6961    | 33.2026          | 33.1981        | 32.9000              | 33.5000              | 44.50            | 0.00             | 0.3511          |
| 10              | 2.5131    | 35.6978          | 35.7010        | 35.4000              | 36.0000              | 41.77            | 0.00             | 0.3349          |
| 11              | 2.2768    | 39.5500          | 39.7015        | 39.3000              | 40.5000              | 12.21            | 0.00             | 1.1425          |
| 12              | 2.2033    | 40.9264          | 40.9301        | 40.6000              | 41.2000              | 19.51            | 0.00             | 0.4644          |
| 13              | 1.9774    | 45.8528          | 45.8431        | 43.4000              | 49.2000              | 6.47             | 0.00             | 0.5126          |
| 14              | 1.9774    | 45.8528          | 45.8431        | 43.4000              | 49.2000              | 6.47             | 0.00             | 0.5126          |
| 15              | 1.8393    | 49.5179          | 49.5140        | 49.2000              | 49.9000              | 27.02            | 0.00             | 0.4551          |
| 16              | 1.8184    | 50.1270          | 50.1134        | 50.0000              | 52.0000              | 7.50             | 0.00             | 0.1882          |
| 17              | 1.8184    | 50.1270          | 50.1134        | 50.0000              | 52.0000              | 7.50             | 0.00             | 0.1882          |
| 18              | 1.6936    | 54.1095          | 54.0899        | 53.8000              | 54.6000              | 34.97            | 0.00             | 0.4458          |

### P1 capa exterior.NJC - Jose



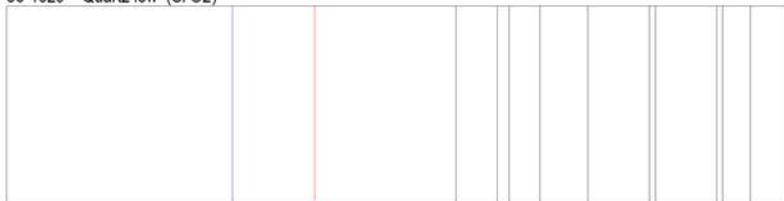
26- 911 Illite-2M#1 (( K , H3 O ) Al2 Si3 Al O10 ( O H )2)



7- 76 Clinoclore, ferroan (( Mg2.8 Fe1.7 Al1.2 ) ( Si2.8 Al1.2 ) O10 ( O H )8)

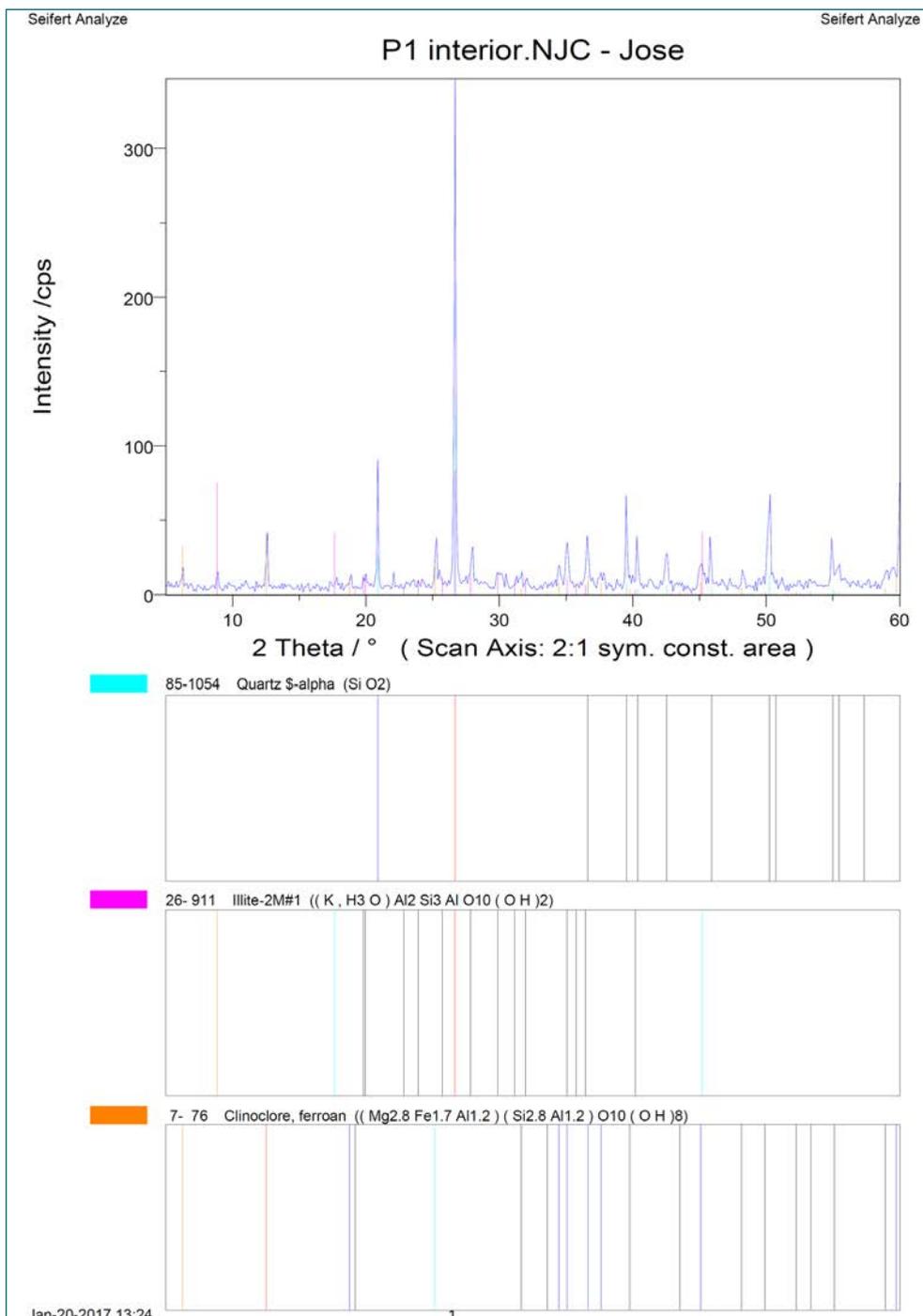


86-1629 Quartz low (Si O2)



| Seifert Analyze       | Search/Match Report  | Seifert Analyze |
|-----------------------|--|-----------------|
| Job:                  | P1 capa exterior.NJC - Jose  |                 |
| Scan Axis:            | 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s  |                 |
| Radiation:            | Cu = 0.15405980nm  |                 |
| Database:             | PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2  |                 |
|                       | Number of PDF phases : 124564  |                 |
| Results:              |  |                 |
| Peaks:                | 35 matched: 33   |                 |
| Phases:               | 75 accepted: 4   |                 |
|                       |  26- 911 Illite-2M#1 FOM=1.264 SOM=6.336        |                 |
|                       |  86-1629 Quartz low FOM=0.130 SOM=2.078         |                 |
|                       |  7- 76 Clinoclore, ferroan FOM=0.925 SOM=10.288 |                 |
|                       |  80-1094 Albite low FOM=1.667 SOM=9.927         |                 |
| Settings:             |  |                 |
| Method:               | 3 Strongest Lines  |                 |
| Deleted Phases:       | used   |                 |
| Long Search           |  |                 |
| Error Window:         | 0.1° *(1+sin(Theta))   |                 |
| Theta Shift:          | 0.000°   |                 |
| Max Proposals:        | 500  |                 |
| rel. Intensity Level: | 60%  |                 |
| Intensity Threshold:  | 0%   |                 |
| Database:             | Set 1-49 with Subfile selection  |                 |
|                       | Mineral File   |                 |
| Jan-20-2017 13:25     | 2  |                 |

| No | d_Fit(A1) | $\angle_{\text{Parab}}$ | $\angle_{\text{COG}}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM   |
|----|-----------|-------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------|
| 1  | 14.1504   | 6.2411                  | 6.2656                | 6.0000               | 6.4000               | 13.29            | 0.00             | 0.3942 |
| 2  | 9.9580    | 8.8731                  | 8.9131                | 8.7000               | 9.0000               | 12.49            | 0.00             | 0.2248 |
| 3  | 7.0554    | 12.5360                 | 12.5377               | 12.4000              | 12.7000              | 26.25            | 0.00             | 0.2537 |
| 4  | 4.2497    | 20.8862                 | 20.9119               | 20.7000              | 21.0000              | 42.80            | 0.00             | 0.1767 |
| 5  | 4.0261    | 22.0606                 | 22.1080               | 21.1000              | 22.3000              | 9.66             | 0.00             | 1.1052 |
| 6  | 3.6649    | 24.2658                 | 24.3167               | 23.7000              | 24.5000              | 13.25            | 0.00             | 0.7076 |
| 7  | 3.5279    | 25.2236                 | 25.2492               | 25.1000              | 25.4000              | 31.41            | 0.00             | 0.2507 |
| 8  | 3.3377    | 26.6866                 | 26.7089               | 26.5000              | 26.9000              | 61.55            | 0.00             | 0.2144 |
| 9  | 3.3377    | 26.6866                 | 26.7089               | 26.5000              | 26.9000              | 61.55            | 0.00             | 0.2144 |
| 10 | 3.3377    | 26.6866                 | 26.7089               | 26.5000              | 26.9000              | 123.09           | 0.00             | 0.2144 |
| 11 | 3.2531    | 27.3943                 | 27.4440               | 27.3000              | 27.6000              | 11.85            | 0.00             | 0.2690 |
| 12 | 3.1939    | 27.9118                 | 27.9539               | 27.6000              | 28.1000              | 17.04            | 0.00             | 0.2757 |
| 13 | 3.1939    | 27.9118                 | 27.9539               | 27.6000              | 28.1000              | 17.04            | 0.00             | 0.2757 |
| 14 | 3.0805    | 28.9614                 | 29.0211               | 28.7000              | 29.2000              | 14.76            | 0.00             | 0.3697 |
| 15 | 2.9761    | 30.0015                 | 29.9967               | 29.8000              | 30.4000              | 7.51             | 0.00             | 0.7922 |
| 16 | 2.9761    | 30.0015                 | 29.9967               | 29.8000              | 30.4000              | 7.51             | 0.00             | 0.7922 |
| 17 | 2.5552    | 35.0906                 | 35.1087               | 34.8000              | 35.3000              | 7.28             | 0.00             | 0.3506 |
| 18 | 2.5552    | 35.0906                 | 35.1087               | 34.8000              | 35.3000              | 7.28             | 0.00             | 0.3506 |
| 19 | 2.5552    | 35.0906                 | 35.1087               | 34.8000              | 35.3000              | 14.56            | 0.00             | 0.3506 |
| 20 | 2.4538    | 36.5921                 | 36.5637               | 36.4000              | 36.9000              | 3.35             | 0.00             | 0.3687 |
| 21 | 2.4538    | 36.5921                 | 36.5637               | 36.4000              | 36.9000              | 3.35             | 0.00             | 0.3687 |
| 22 | 2.4538    | 36.5921                 | 36.5637               | 36.4000              | 36.9000              | 13.40            | 0.00             | 0.3687 |
| 23 | 2.2788    | 39.5131                 | 39.5149               | 39.3000              | 39.7000              | 17.92            | 0.00             | 0.2538 |
| 24 | 2.2788    | 39.5131                 | 39.5149               | 39.3000              | 39.7000              | 17.92            | 0.00             | 0.2538 |
| 25 | 2.2355    | 40.3120                 | 40.3200               | 40.2000              | 40.5000              | 12.39            | 0.00             | 0.2352 |
| 26 | 2.2355    | 40.3120                 | 40.3200               | 40.2000              | 40.5000              | 12.39            | 0.00             | 0.2352 |
| 27 | 2.1255    | 42.4954                 | 42.5094               | 42.3000              | 42.7000              | 14.60            | 0.00             | 0.3272 |
| 28 | 2.1255    | 42.4954                 | 42.5094               | 42.3000              | 42.7000              | 14.60            | 0.00             | 0.3272 |
| 29 | 1.9797    | 45.7974                 | 45.8148               | 45.1000              | 46.0000              | 14.55            | 0.00             | 0.3158 |
| 30 | 1.9797    | 45.7974                 | 45.8148               | 45.1000              | 46.0000              | 14.55            | 0.00             | 0.3158 |
| 31 | 1.8143    | 50.2458                 | 50.1138               | 50.0000              | 50.2000              | 22.16            | 0.00             | 0.4489 |
| 32 | 1.8143    | 50.2458                 | 50.1138               | 50.0000              | 50.2000              | 22.16            | 0.00             | 0.4489 |
| 33 | 1.6706    | 54.9160                 | 54.9156               | 54.7000              | 55.2000              | 13.22            | 0.00             | 0.3226 |
| 34 | 1.6706    | 54.9160                 | 54.9156               | 54.7000              | 55.2000              | 13.22            | 0.00             | 0.3226 |
| 35 | 1.6585    | 55.3500                 | 55.3109               | 55.1000              | 56.0000              | 15.63            | 0.00             | 1.3950 |



Job: P1 interior.NJC - Jose  
Scan Axis: 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s  
Radiation: Cu = 0.15405980nm  
Database: PDF2 Release 1999 in directory c:\users\public\rayflex\pdf2  
Number of PDF phases : 124564

## Results:

Peaks: 27 matched: 24

Phases: 91 accepted: 3

 7- 76 Clinoclore, ferroan FOM=1.504 SOM=6.514  
 85-1054 Quartz  $\beta$ -alpha FOM=0.102 SOM=2.393  
 26- 911 Illite-2M#1 FOM=0.964 SOM=13.391

## Settings:

Method: 3 Strongest Lines

Deleted Phases: used

Long Search

Error Window:  $0.1^\circ \cdot (1 + \sin(\Theta))$ Theta Shift:  $0.000^\circ$ 

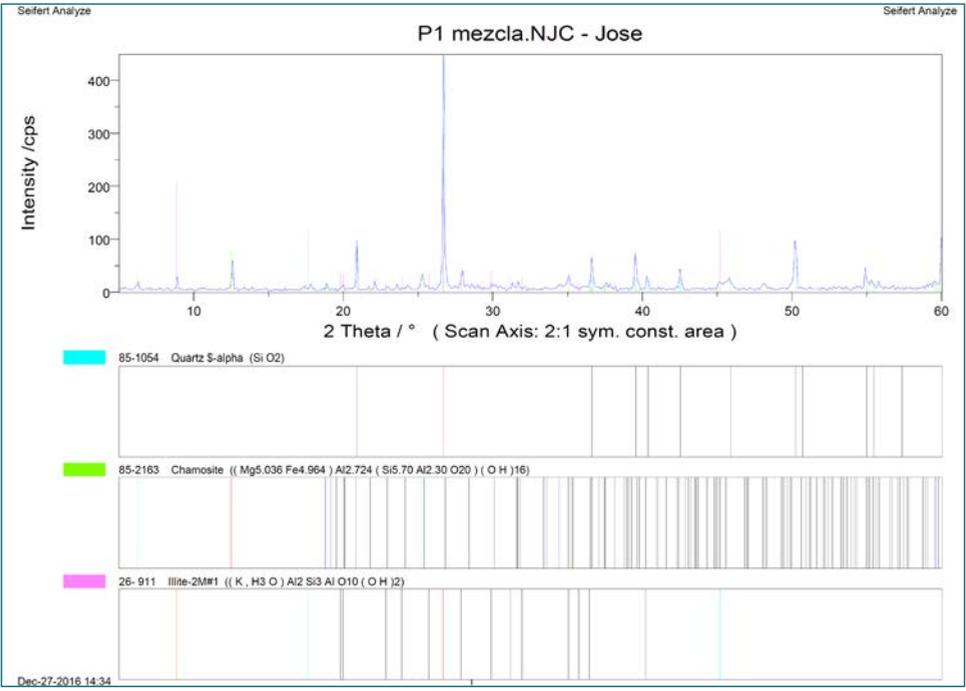
Max Proposals: 500

rel. Intensity Level: 60%

Intensity Threshold: 0%

Database: Set 1-49 with Subfile selection  
Mineral File

| Seifert Analyze |           |                  |                |                      |                      |                  |                  | Seifert Analyze |
|-----------------|-----------|------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|
| No              | d_Fit(A1) | $\angle_{Parab}$ | $\angle_{COG}$ | Limit <sub>Low</sub> | Limit <sub>Upp</sub> | I <sub>Net</sub> | I <sub>Bgr</sub> | FWHM            |
| 1               | 9.9416    | 8.8878           | 8.9205         | 8.7000               | 9.0000               | 12.53            | 0.00             | 0.2599          |
| 2               | 7.0267    | 12.5873          | 12.6088        | 12.4000              | 12.7000              | 28.61            | 0.00             | 0.2236          |
| 3               | 4.4638    | 19.8740          | 20.0093        | 19.7000              | 20.3000              | 11.48            | 0.00             | 0.6024          |
| 4               | 4.2483    | 20.8935          | 20.9122        | 20.8000              | 21.0000              | 52.37            | 0.00             | 0.1689          |
| 5               | 4.0163    | 22.1147          | 22.1122        | 22.0000              | 22.2000              | 10.10            | 0.00             | 0.1697          |
| 6               | 3.5180    | 25.2956          | 25.2980        | 25.1000              | 25.4000              | 29.91            | 0.00             | 0.2565          |
| 7               | 3.3369    | 26.6936          | 26.7111        | 26.5000              | 26.9000              | 57.07            | 0.00             | 0.1918          |
| 8               | 3.3369    | 26.6936          | 26.7111        | 26.5000              | 26.9000              | 114.13           | 0.00             | 0.1918          |
| 9               | 3.1879    | 27.9657          | 27.9817        | 27.6000              | 28.1000              | 26.21            | 0.00             | 0.3714          |
| 10              | 2.9791    | 29.9700          | 29.9975        | 29.7000              | 30.4000              | 15.46            | 0.00             | 0.6340          |
| 11              | 2.9330    | 30.4521          | 30.5162        | 30.4000              | 30.7000              | 10.21            | 0.00             | 0.3119          |
| 12              | 2.5969    | 34.5092          | 34.4730        | 34.3000              | 34.8000              | 18.75            | 0.00             | 0.3971          |
| 13              | 2.5555    | 35.0866          | 35.0900        | 34.8000              | 35.3000              | 16.39            | 0.00             | 0.3283          |
| 14              | 2.5555    | 35.0866          | 35.0900        | 34.8000              | 35.3000              | 16.39            | 0.00             | 0.3283          |
| 15              | 2.4529    | 36.6053          | 36.6155        | 36.4000              | 36.8000              | 8.33             | 0.00             | 0.3126          |
| 16              | 2.4529    | 36.6053          | 36.6155        | 36.4000              | 36.8000              | 16.65            | 0.00             | 0.3126          |
| 17              | 2.3903    | 37.6000          | 37.6135        | 37.3000              | 38.0000              | 15.00            | 0.00             | 0.6000          |
| 18              | 2.2788    | 39.5129          | 39.5145        | 39.4000              | 39.7000              | 44.85            | 0.00             | 0.2156          |
| 19              | 2.2351    | 40.3188          | 40.3173        | 40.2000              | 40.5000              | 14.47            | 0.00             | 0.2565          |
| 20              | 2.2351    | 40.3188          | 40.3173        | 40.2000              | 40.5000              | 14.47            | 0.00             | 0.2565          |
| 21              | 2.1246    | 42.5142          | 42.5515        | 42.3000              | 42.7000              | 26.47            | 0.00             | 0.3149          |
| 22              | 2.0074    | 45.1300          | 45.1403        | 44.8000              | 45.5000              | 9.81             | 0.00             | 0.5938          |
| 23              | 2.0074    | 45.1300          | 45.1403        | 44.8000              | 45.5000              | 9.81             | 0.00             | 0.5938          |
| 24              | 1.9793    | 45.8077          | 45.8165        | 45.7000              | 46.0000              | 27.41            | 0.00             | 0.2395          |
| 25              | 1.8845    | 48.2525          | 48.2415        | 48.1000              | 48.5000              | 13.85            | 0.00             | 0.4142          |
| 26              | 1.8148    | 50.2308          | 50.2757        | 49.9000              | 50.4000              | 53.62            | 0.00             | 0.3365          |
| 27              | 1.6703    | 54.9249          | 54.9177        | 54.8000              | 55.1000              | 29.45            | 0.00             | 0.2728          |



| Seifert Analyze       | Search/Match Report   | Seifert Analyze |
|-----------------------|---|-----------------|
| Job:                  | P1 mezcla.NJC - Jose  |                 |
| Scan Axis:            | 2:1 sym. const. area 5.000° ... 60.000°;0.100° 2.0s           |                 |
| Radiation:            | Cu = 0.15405980nm   |                 |
| Database:             | PDF2 Release 1999 in directory c:\power diffraction file\pdf2 |                 |
|                       | Number of PDF phases : 124564                                 |                 |
| Results:              |   |                 |
| Peaks:                | 33 matched: 30  |                 |
| Phases:               | 117 accepted: 3   |                 |
|                       | 85-1054 Quartz S-alpha FOM=0.174 SOM=1.780                    |                 |
|                       | 28-911 Illite-2M#1 FOM=1.267 SOM=7.132                        |                 |
|                       | 85-2163 Chamosite FOM=1.614 SOM=5.777                         |                 |
| Settings:             |   |                 |
| Method:               | 2 Strongest Lines   |                 |
| Deleted Phases:       | not used  |                 |
| Long Search:          |   |                 |
| Error Window:         | 0.1° *(1+sin(Theta))  |                 |
| Theta Shift:          | 0.000°  |                 |
| Max Proposals:        | 500   |                 |
| rel. Intensity Level: | 60%   |                 |
| Intensity Threshold:  | 0%  |                 |
| Database:             | Set 1-49 with Subfile selection                               |                 |
|                       | Mineral File  |                 |
|                       | Zeolites  |                 |

Dic-27-2016 14:34

2

Seifert Analyze

Seifert Analyze

| No | d_FR(A1) | $\angle_{\text{para}}$ | $\angle_{\text{COO}}$ | Limit <sub>Lee</sub> | Limit <sub>Typ</sub> | $l_{\text{Lee}}$ | $l_{\text{Typ}}$ | FWRM   |
|----|----------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------|
| 1  | 14.0325  | 6.2935                 | 6.3072                | 6.0000               | 6.4000               | 14.47            | 0.00             | 0.3651 |
| 2  | 9.9281   | 8.8998                 | 8.9121                | 8.8000               | 9.0000               | 25.13            | 0.00             | 0.1559 |
| 3  | 7.0207   | 12.5981                | 12.6108               | 12.4000              | 12.7000              | 53.92            | 0.00             | 0.1493 |
| 4  | 4.9799   | 17.7968                | 17.8153               | 17.7000              | 18.0000              | 11.64            | 0.00             | 0.3653 |
| 5  | 4.6971   | 18.8777                | 18.9136               | 18.8000              | 19.0000              | 11.22            | 0.00             | 0.2093 |
| 6  | 4.2469   | 20.9004                | 20.9122               | 20.8000              | 21.0000              | 46.97            | 0.00             | 0.1146 |
| 7  | 4.2469   | 20.9004                | 20.9122               | 20.8000              | 21.0000              | 46.97            | 0.00             | 0.1146 |
| 8  | 4.0178   | 22.1067                | 22.1132               | 22.0000              | 22.2000              | 19.48            | 0.00             | 0.1576 |
| 9  | 3.5183   | 25.2935                | 25.3199               | 25.1000              | 25.5000              | 28.59            | 0.00             | 0.2942 |
| 10 | 3.3361   | 26.7000                | 26.7127               | 26.5000              | 26.9000              | 219.27           | 0.00             | 0.1195 |
| 11 | 3.3361   | 26.7000                | 26.7127               | 26.5000              | 26.9000              | 219.27           | 0.00             | 0.1195 |
| 12 | 3.1852   | 27.9899                | 28.0145               | 27.7000              | 28.1000              | 36.82            | 0.00             | 0.2492 |
| 13 | 2.5560   | 35.0802                | 35.1131               | 34.7000              | 35.4000              | 13.30            | 0.00             | 0.4613 |
| 14 | 2.5560   | 35.0802                | 35.1131               | 34.7000              | 35.4000              | 13.30            | 0.00             | 0.4613 |
| 15 | 2.4532   | 36.5999                | 36.6145               | 36.4000              | 36.8000              | 29.69            | 0.00             | 0.1912 |
| 16 | 2.4532   | 36.5999                | 36.6145               | 36.4000              | 36.8000              | 29.69            | 0.00             | 0.1912 |
| 17 | 2.3919   | 37.5733                | 37.5860               | 37.3000              | 37.7000              | 15.97            | 0.00             | 0.3728 |
| 18 | 2.2790   | 39.5100                | 39.5195               | 39.4000              | 39.7000              | 32.01            | 0.00             | 0.2216 |
| 19 | 2.2790   | 39.5100                | 39.5195               | 39.4000              | 39.7000              | 32.01            | 0.00             | 0.2216 |
| 20 | 2.2352   | 40.3165                | 40.3165               | 40.2000              | 40.5000              | 5.88             | 0.00             | 0.2589 |
| 21 | 2.2352   | 40.3165                | 40.3165               | 40.2000              | 40.5000              | 5.88             | 0.00             | 0.2589 |
| 22 | 2.2352   | 40.3165                | 40.3165               | 40.2000              | 40.5000              | 11.75            | 0.00             | 0.2589 |
| 23 | 2.1252   | 42.5027                | 42.5157               | 42.4000              | 42.7000              | 20.70            | 0.00             | 0.1799 |
| 24 | 2.1252   | 42.5027                | 42.5157               | 42.4000              | 42.7000              | 20.70            | 0.00             | 0.1799 |
| 25 | 2.0074   | 45.1304                | 45.1731               | 43.1000              | 45.2000              | 9.50             | 0.00             | 0.7433 |
| 26 | 2.0074   | 45.1304                | 45.1731               | 43.1000              | 45.2000              | 9.50             | 0.00             | 0.7433 |
| 27 | 1.9804   | 45.7792                | 45.8086               | 45.0000              | 46.1000              | 24.39            | 0.00             | 1.0491 |
| 28 | 1.8158   | 50.2038                | 50.2165               | 50.0000              | 50.4000              | 90.04            | 0.00             | 0.2260 |
| 29 | 1.6710   | 54.8997                | 54.9145               | 54.8000              | 55.2000              | 19.56            | 0.00             | 0.2332 |
| 30 | 1.6710   | 54.8997                | 54.9145               | 54.8000              | 55.2000              | 19.56            | 0.00             | 0.2332 |
| 31 | 1.6594   | 55.3169                | 55.3026               | 55.2000              | 55.6000              | 11.50            | 0.00             | 0.4262 |
| 32 | 1.6594   | 55.3169                | 55.3026               | 55.2000              | 55.6000              | 11.50            | 0.00             | 0.4262 |
| 33 | 1.6457   | 55.8175                | 55.8135               | 55.6000              | 56.1000              | 15.48            | 0.00             | 0.4754 |

Dec-27-2016 14:34

3

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: Capa1(4ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, April 11, 2018 12:54:25

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\New folder\CristinaMP\_Semillas(abril18),DanielCasa,JoseCapa,Solidot

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP.mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\Capa1(4ml).036

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 234.400

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 4.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 9609053.000     | 8097984   |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration    | Intensity  | Intensity Comment |
|---------|------------------|------------|-------------------|
| H       |                  |            | Not Measured      |
| He      |                  |            | Not Measured      |
| Li      | 72365.254        | 61632      |                   |
| Be      | 2406.863         | 637        |                   |
| B       | 0.000            | 0          |                   |
| C       | 5036.919         | 3823       |                   |
| N       | 1131805.787      | 7458       |                   |
| O       |                  |            | Not Measured      |
| F       |                  | 27872      |                   |
| Ne      |                  | 280        |                   |
| Na      | 9405110.633      | 8533894    |                   |
| Mg      | 238016.698       | 244081     |                   |
| Al      | 51274962.211     | 12788131   |                   |
| Si      | 189462930.124    | 83978657   |                   |
| P       | 104212.769       | 12980      |                   |
| S       | 3678208.176      | 617728     |                   |
| Cl      | 72836346.198     | 1253025    |                   |
| Ar      | 659834098173.255 | 34304804   |                   |
| K       | 28896131.509     | 33104115   |                   |
| Ca      | 103076.354       | 232201     |                   |
| Sc      | 3852.188         | 12527      |                   |
| Ti      | 3928021.077      | 16682744   |                   |
| V       | 159043.732       | 956198     |                   |
| Cr      | 81251.728        | 759865     |                   |
| Mn      | 99917.411        | 550504     |                   |
| Fe      | 124203053.242    | 1135500670 |                   |
| Co      | 2470.701         | 40141      |                   |
| Ni      | 0.000            | 0          |                   |
| Cu      | 46053.687        | 792431     |                   |
| Zn      | 36911.363        | 191363     |                   |
| Ga      | 23568.661        | 153608     |                   |
| Ge      | 3035.055         | 12519      |                   |
| As      | 49192.783        | 41578      |                   |

Report Date/Time: Thursday, April 12, 2018 09:21:21

Page 1

Sample ID: Capa1(4ml)

|    |            |          |
|----|------------|----------|
| Se | 521.676    | 400      |
| Br | 0.000      | 0        |
| Kr | 0.000      | 0        |
| Rb | 77923.377  | 701341   |
| Sr | 16205.436  | 166818   |
| Y  | 217.167    | 3710     |
| Zr | 178915.003 | 3098582  |
| Nb | 17730.316  | 384093   |
| Mo | 1314.165   | 36223    |
| Ru | 0.070      | 3        |
| Rh | 0.000      | 0        |
| Pd | 0.569      | 20       |
| Ag | 1049.824   | 35708    |
| Cd | 0.000      | 0        |
| In | 74.676     | 2151     |
| Sn | 4336.390   | 115625   |
| Sb | 5465.458   | 56535    |
| Te | 21.995     | 123      |
| I  | 22689.979  | 40090    |
| Xe | 0.000      | 0        |
| Cs | 4992.743   | 169131   |
| Ba | 320261.504 | 13158576 |
| La | 402.767    | 24232    |
| Ce | 1105.922   | 78871    |
| Pr | 144.428    | 10009    |
| Nd | 557.979    | 38257    |
| Sm | 125.564    | 9316     |
| Eu | 38.456     | 3006     |
| Gd | 92.785     | 9661     |
| Tb | 17.212     | 1793     |
| Dy | 77.441     | 8140     |
| Ho | 20.596     | 2359     |
| Er | 59.457     | 6628     |
| Tm | 14.470     | 1854     |
| Yb | 79.197     | 9939     |
| Lu | 17.215     | 1689     |
| Hf | 4594.262   | 401575   |
| Ta | 1829.910   | 138742   |
| W  | 3675.221   | 239969   |
| Re | 2.485      | 172      |
| Os | 0.000      | 0        |
| Ir | 0.000      | 0        |
| Pt | 15.850     | 609      |
| Au | 0.040      | 1        |
| Hg | 0.000      | 0        |
| Tl | 800.618    | 66858    |
| Pb | 52753.981  | 4369149  |
| Bi | 706.336    | 45320    |
| Th | 869.135    | 76263    |
| U  | 8401.528   | 173480   |

### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Thursday, April 12, 2018 09:21:21

Page 2

Sample ID: Capa1(4ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: Capa4(4ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, April 11, 2018 12:58:36

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\New folder\CristinaMP\_Semillas(abril18), DanielCasa, JoseCapa, Solidot

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP.mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\Capa4(4ml).037

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 244.400

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 4.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 9609053.000     | 7538871   |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration     | Intensity | Intensity Comment |
|---------|-------------------|-----------|-------------------|
| H       |                   |           | Not Measured      |
| He      |                   |           | Not Measured      |
| Li      | 111775.422        | 99258     |                   |
| Be      | 2774.645          | 765       |                   |
| B       | 0.000             | 0         |                   |
| C       | 0.000             | 0         |                   |
| N       | 2053010.190       | 14106     |                   |
| O       |                   |           | Not Measured      |
| F       |                   | 46256     |                   |
| Ne      |                   | 257       |                   |
| Na      | 10697127.867      | 10120317  |                   |
| Mg      | 575593.626        | 615439    |                   |
| Al      | 76265600.891      | 19832343  |                   |
| Si      | 183997923.415     | 85035680  |                   |
| P       | 123780.232        | 16074     |                   |
| S       | 6047800.160       | 1059014   |                   |
| Cl      | 53623419.731      | 961855    |                   |
| Ar      | 1244653048809.526 | 67470213  |                   |
| K       | 35016365.726      | 41827022  |                   |
| Ca      | 127653.829        | 299835    |                   |
| Sc      | 6972.110          | 23639     |                   |
| Ti      | 3996426.352       | 17697385  |                   |
| V       | 173508.284        | 1087665   |                   |
| Cr      | 86616.006         | 844590    |                   |
| Mn      | 79865.786         | 458800    |                   |
| Fe      | 97097672.636      | 925566308 |                   |
| Co      | 5387.034          | 91255     |                   |
| Ni      | 0.000             | 0         |                   |
| Cu      | 44871.132         | 805022    |                   |
| Zn      | 78864.267         | 426306    |                   |
| Ga      | 21933.436         | 149049    |                   |
| Ge      | 2646.322          | 11381     |                   |
| As      | 149077.160        | 131374    |                   |

Report Date/Time: Thursday, April 12, 2018 09:12:10

Page 1

Sample ID: Capa4(4ml)

|    |            |          |
|----|------------|----------|
| Se | 1708.737   | 1364     |
| Br | 0.000      | 0        |
| Kr | 0.000      | 0        |
| Rb | 79321.837  | 744385   |
| Sr | 17886.258  | 191975   |
| Y  | 273.563    | 4873     |
| Zr | 185264.290 | 3345427  |
| Nb | 17783.514  | 401681   |
| Mo | 5163.138   | 148385   |
| Ru | 0.000      | 0        |
| Rh | 0.000      | 0        |
| Pd | 2.776      | 98       |
| Ag | 183.054    | 6492     |
| Cd | 16.832     | 392      |
| In | 55.265     | 1660     |
| Sn | 4385.829   | 121932   |
| Sb | 4967.964   | 53581    |
| Te | 657.463    | 3805     |
| I  | 15566.603  | 28677    |
| Xe | 16.478     | 9        |
| Cs | 3179.380   | 112298   |
| Ba | 279338.375 | 11966809 |
| La | 609.298    | 38221    |
| Ce | 1911.955   | 142172   |
| Pr | 226.290    | 16351    |
| Nd | 912.414    | 65227    |
| Sm | 194.034    | 15009    |
| Eu | 47.713     | 3889     |
| Gd | 140.700    | 15275    |
| Tb | 17.460     | 1896     |
| Dy | 118.033    | 12936    |
| Ho | 23.548     | 2812     |
| Er | 85.556     | 9944     |
| Tm | 14.918     | 1993     |
| Yb | 129.588    | 16957    |
| Lu | 19.242     | 1969     |
| Hf | 4877.020   | 444477   |
| Ta | 1923.028   | 152023   |
| W  | 3864.619   | 263100   |
| Re | 5.477      | 395      |
| Os | 0.000      | 0        |
| Ir | 1.675      | 100      |
| Pt | 19.743     | 791      |
| Au | 0.000      | 0        |
| Hg | 0.000      | 0        |
| Tl | 891.630    | 77635    |
| Pb | 33210.296  | 2867860  |
| Bi | 391.777    | 26210    |
| Th | 1883.158   | 172288   |
| U  | 3462.144   | 74539    |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Thursday, April 12, 2018 09:12:10

Page 2

Sample ID: Capa4(4ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: 3A-lz-lz(3ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 11:10:20  
 Sample Description:  
 Solution Type: Sample  
 Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\RTJose(septiembre18)yMiriamAgua.sam  
 Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP(+Silicio(fallo)).mth  
 Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\3A-lz-lz(3ml).090  
 Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp  
 Initial Sample Quantity (mg): 234.000  
 Sample Prep Volume (mL): 100.00  
 Aliquot Volume (mL): 3.00  
 Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 232783.000      | 256281    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration | Intensity | Intensity Comment |
|---------|---------------|-----------|-------------------|
| H       |               |           | Not Measured      |
| He      |               |           | Not Measured      |
| Li      | 9469.247      | 4850      |                   |
| Be      | 174.345       | 37        |                   |
| B       | 6333.626      | 460       |                   |
| C       | 346545.364    | 4458      |                   |
| N       | 112921828.857 | 11488     |                   |
| O       |               |           | Not Measured      |
| F       |               | 0         |                   |
| Ne      |               | 0         |                   |
| Na      | 790610.711    | 749521    |                   |
| Mg      | 71898.444     | 39045     |                   |
| Al      | 11395558.296  | 2529965   |                   |
| Si      | 1688842.848   | 36752599  |                   |
| P       | 549.782       | 1797      |                   |
| S       | 0.000         | 0         |                   |
| Cl      | 0.000         | 0         |                   |
| Ar      | 0.000         | 0         |                   |
| K       | 5562101.825   | 3383176   |                   |
| Ca      | 93533.145     | 114793    |                   |
| Sc      | 1606.117      | 2987      |                   |
| Ti      | 388074.762    | 990462    |                   |
| V       | 20534.043     | 76158     |                   |
| Cr      | 7030.445      | 40378     |                   |
| Mn      | 53245.189     | 162935    |                   |
| Fe      | 56660731.280  | 301567013 |                   |
| Co      | 1712.760      | 17033     |                   |
| Ni      | 0.000         | 0         |                   |
| Cu      | 40665.128     | 413160    |                   |
| Zn      | 17362.069     | 57413     |                   |
| Ga      | 9743.948      | 32918     |                   |
| Ge      | 1183.746      | 2795      |                   |
| As      | 248314.827    | 127088    |                   |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:09  
 Page 1  
 Sample ID: 3A-lz-lz(3ml)

|    |            |          |
|----|------------|----------|
| Se | 2124.185   | 888      |
| Br | 0.000      | 0        |
| Kr | 0.000      | 0        |
| Rb | 12740.573  | 54126    |
| Sr | 11032.281  | 52989    |
| Y  | 1981.144   | 16471    |
| Zr | 228440.582 | 2000808  |
| Nb | 5376.874   | 60564    |
| Mo | 23116.528  | 339214   |
| Ru | 0.435      | 8        |
| Rh | 0.000      | 0        |
| Pd | 6.424      | 109      |
| Ag | 6057.146   | 101667   |
| Cd | 0.000      | 0        |
| In | 178.415    | 2582     |
| Sn | 16573.953  | 218233   |
| Sb | 21846.448  | 109668   |
| Te | 835.890    | 2215     |
| I  | 318011.520 | 256137   |
| Xe | 0.000      | 0        |
| Cs | 681.514    | 10244    |
| Ba | 656425.258 | 12122247 |
| La | 718.397    | 19224    |
| Ce | 1402.101   | 44605    |
| Pr | 129.771    | 3914     |
| Nd | 584.568    | 18188    |
| Sm | 137.017    | 4936     |
| Eu | 23.949     | 856      |
| Gd | 223.375    | 11160    |
| Tb | 24.711     | 1186     |
| Dy | 386.903    | 17230    |
| Ho | 66.540     | 3472     |
| Er | 299.514    | 15687    |
| Tm | 32.960     | 1910     |
| Yb | 369.998    | 22281    |
| Lu | 41.145     | 1844     |
| Hf | 6948.692   | 284340   |
| Ta | 623.266    | 22698    |
| W  | 6303.219   | 202973   |
| Re | 0.680      | 24       |
| Os | 0.000      | 0        |
| Ir | 0.000      | 0        |
| Pt | 19.341     | 411      |
| Au | 192.397    | 1542     |
| Hg | 1165.448   | 10254    |
| Tl | 7083.768   | 359902   |
| Pb | 293651.743 | 14493230 |
| Bi | 9717.104   | 378826   |
| Th | 238.530    | 9574     |
| U  | 10676.293  | 94440    |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:09

Page 2

Sample ID: 3A-lz-lz(3ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: BERR1(3ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 11:18:41

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\RTJose(septiembre18)yMiriamAgua.sam

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP(+Silicio(fallo)).mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\BERR1(3ml).092

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 225.800

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 3.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 232783.000      | 272902    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration | Intensity  | Intensity Comment |
|---------|---------------|------------|-------------------|
| H       |               |            | Not Measured      |
| He      |               |            | Not Measured      |
| Li      | 28407.888     | 14040      |                   |
| Be      | 768.821       | 156        |                   |
| B       | 34585.806     | 2419       |                   |
| C       | 0.000         | 0          |                   |
| N       | 121713062.659 | 11949      |                   |
| O       |               |            | Not Measured      |
| F       |               | 0          |                   |
| Ne      |               | 0          |                   |
| Na      | 1826879.673   | 1671241    |                   |
| Mg      | 316449.714    | 165828     |                   |
| Al      | 8564810.632   | 1834868    |                   |
| Si      | 482345.331    | 10128963   |                   |
| P       | 3661.463      | 11544      |                   |
| S       | 420716.256    | 1057478    |                   |
| Cl      | 0.000         | 0          |                   |
| Ar      | 0.000         | 0          |                   |
| K       | 9470315.263   | 5558507    |                   |
| Ca      | 215011.194    | 254634     |                   |
| Sc      | 1616.918      | 2902       |                   |
| Ti      | 1185415.551   | 2919449    |                   |
| V       | 67663.332     | 242160     |                   |
| Cr      | 41034.643     | 227416     |                   |
| Mn      | 197817.433    | 584124     |                   |
| Fe      | 228645868.944 | 1174283878 |                   |
| Co      | 16234.250     | 155785     |                   |
| Ni      | 0.000         | 0          |                   |
| Cu      | 678628.957    | 6653281    |                   |
| Zn      | 676342.516    | 2158140    |                   |
| Ga      | 11238.549     | 36637      |                   |
| Ge      | 2878.725      | 6559       |                   |
| As      | 5244792.148   | 2590217    |                   |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:12

Page 1

Sample ID: BERR1(3ml)

|    |             |           |
|----|-------------|-----------|
| Se | 41717.141   | 16811     |
| Br | 2828.614    | 377       |
| Kr | 0.000       | 0         |
| Rb | 21063.377   | 86348     |
| Sr | 22278.282   | 103254    |
| Y  | 237.205     | 1903      |
| Zr | 119655.493  | 1011283   |
| Nb | 7702.929    | 83723     |
| Mo | 33473.125   | 473975    |
| Ru | 1.331       | 24        |
| Rh | 0.000       | 0         |
| Pd | 4.689       | 77        |
| Ag | 89021.100   | 1441824   |
| Cd | 2528.679    | 27874     |
| In | 2602.208    | 36338     |
| Sn | 278435.219  | 3537731   |
| Sb | 860512.859  | 4168326   |
| Te | 261.161     | 668       |
| I  | 70854.341   | 55069     |
| Xe | 0.000       | 0         |
| Cs | 2147.678    | 31151     |
| Ba | 2004397.518 | 35718217  |
| La | 288.994     | 7463      |
| Ce | 773.347     | 23741     |
| Pr | 63.526      | 1849      |
| Nd | 339.487     | 10193     |
| Sm | 83.961      | 2919      |
| Eu | 35.452      | 1222      |
| Gd | 40.133      | 1935      |
| Tb | 0.000       | 0         |
| Dy | 45.050      | 1936      |
| Ho | 0.000       | 0         |
| Er | 25.933      | 1311      |
| Tm | 0.000       | 0         |
| Yb | 43.186      | 2510      |
| Lu | 0.000       | 0         |
| Hf | 3156.954    | 124656    |
| Ta | 796.396     | 27986     |
| W  | 6527.207    | 202820    |
| Re | 56.944      | 1924      |
| Os | 0.000       | 0         |
| Ir | 0.000       | 0         |
| Pt | 12.210      | 251       |
| Au | 1335.669    | 10330     |
| Hg | 37460.473   | 318036    |
| Tl | 25194.386   | 1235182   |
| Pb | 9242319.078 | 440171204 |
| Bi | 190367.052  | 7161471   |
| Th | 0.000       | 0         |
| U  | 11839.645   | 101061    |

### TotalQuant Equations

|         |                |
|---------|----------------|
| Analyte | Equation       |
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:12

Page 2

Sample ID: BERR1(3ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: BERR2(3ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 11:22:52

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\RTJose(septiembre18)yMiriamAgua.sam

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP(+Silicio(fallo)).mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\BERR2(3ml).093

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 259.000

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 3.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 232783.000      | 271955    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration | Intensity  | Intensity Comment |
|---------|---------------|------------|-------------------|
| H       |               |            | Not Measured      |
| He      |               |            | Not Measured      |
| Li      | 20009.612     | 11344      |                   |
| Be      | 635.991       | 148        |                   |
| B       | 25679.637     | 2061       |                   |
| C       | 420163.249    | 5982       |                   |
| N       | 0.000         | 0          |                   |
| O       |               |            | Not Measured      |
| F       |               | 0          |                   |
| Ne      |               | 0          |                   |
| Na      | 1505778.139   | 1580032    |                   |
| Mg      | 323471.627    | 194431     |                   |
| Al      | 10102509.179  | 2482516    |                   |
| Si      | 430378.071    | 10366517   |                   |
| P       | 2226.841      | 8053       |                   |
| S       | 338190.462    | 975032     |                   |
| Cl      | 0.000         | 0          |                   |
| Ar      | 0.000         | 0          |                   |
| K       | 7306336.834   | 4918914    |                   |
| Ca      | 287796.119    | 390945     |                   |
| Sc      | 1867.351      | 3844       |                   |
| Ti      | 831004.663    | 2347522    |                   |
| V       | 55895.825     | 229459     |                   |
| Cr      | 29071.288     | 184804     |                   |
| Mn      | 142730.195    | 483429     |                   |
| Fe      | 205282689.755 | 1209310699 |                   |
| Co      | 12511.387     | 137713     |                   |
| Ni      | 0.000         | 0          |                   |
| Cu      | 508495.222    | 5718291    |                   |
| Zn      | 473521.242    | 1733118    |                   |
| Ga      | 8258.989      | 30882      |                   |
| Ge      | 2204.311      | 5761       |                   |
| As      | 3798125.717   | 2151558    |                   |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:14

Page 1

Sample ID: BERR2(3ml)

|    |             |           |
|----|-------------|-----------|
| Se | 31619.463   | 14615     |
| Br | 4034.525    | 617       |
| Kr | 0.000       | 0         |
| Rb | 19748.098   | 92859     |
| Sr | 21771.423   | 115741    |
| Y  | 441.954     | 4067      |
| Zr | 90121.297   | 873662    |
| Nb | 5731.980    | 71461     |
| Mo | 25392.916   | 412427    |
| Ru | 0.000       | 0         |
| Rh | 0.000       | 0         |
| Pd | 6.153       | 116       |
| Ag | 60494.175   | 1123851   |
| Cd | 1797.910    | 22733     |
| In | 1866.247    | 29893     |
| Sn | 185694.679  | 2706300   |
| Sb | 629145.116  | 3495674   |
| Te | 210.330     | 617       |
| I  | 65744.288   | 58610     |
| Xe | 0.000       | 0         |
| Cs | 1542.944    | 25670     |
| Ba | 1654040.725 | 33808659  |
| La | 977.869     | 28963     |
| Ce | 2613.413    | 92022     |
| Pr | 296.688     | 9904      |
| Nd | 1343.868    | 46279     |
| Sm | 295.617     | 11788     |
| Eu | 61.981      | 2451      |
| Gd | 191.150     | 10570     |
| Tb | 3.671       | 195       |
| Dy | 133.619     | 6587      |
| Ho | 4.640       | 268       |
| Er | 70.432      | 4083      |
| Tm | 0.000       | 0         |
| Yb | 105.301     | 7019      |
| Lu | 0.000       | 0         |
| Hf | 2167.409    | 98166     |
| Ta | 607.586     | 24491     |
| W  | 4695.121    | 167343    |
| Re | 36.114      | 1400      |
| Os | 0.000       | 0         |
| Ir | 0.074       | 3         |
| Pt | 8.888       | 209       |
| Au | 883.843     | 7841      |
| Hg | 25379.131   | 247147    |
| Tl | 17908.003   | 1007048   |
| Pb | 6496289.612 | 354880286 |
| Bi | 129878.650  | 5604334   |
| Th | 0.000       | 0         |
| U  | 0.000       | 0         |

### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:14

Page 2

Sample ID: BERR2(3ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: BERR3(3ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 11:27:04

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\RTJose(septiembre18)yMiriamAgua.sam

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP(+Silicio(fallo)).mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\BERR3(3ml).094

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 235.900

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 3.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 232783.000      | 254547    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration | Intensity  | Intensity Comment |
|---------|---------------|------------|-------------------|
| H       |               |            | Not Measured      |
| He      |               |            | Not Measured      |
| Li      | 16625.210     | 8584       |                   |
| Be      | 541.607       | 115        |                   |
| B       | 23952.594     | 1751       |                   |
| C       | 965987.421    | 12526      |                   |
| N       | 0.000         | 0          |                   |
| O       |               |            | Not Measured      |
| F       |               | 0          |                   |
| Ne      |               | 0          |                   |
| Na      | 1310636.833   | 1252609    |                   |
| Mg      | 245081.386    | 134174     |                   |
| Al      | 9049587.788   | 2025442    |                   |
| Si      | 363684.413    | 7978764    |                   |
| P       | 2018.810      | 6650       |                   |
| S       | 306808.736    | 805663     |                   |
| Cl      | 0.000         | 0          |                   |
| Ar      | 0.000         | 0          |                   |
| K       | 6501394.619   | 3986615    |                   |
| Ca      | 223237.055    | 276201     |                   |
| Sc      | 1186.535      | 2225       |                   |
| Ti      | 706612.117    | 1818090    |                   |
| V       | 48012.962     | 179520     |                   |
| Cr      | 23788.357     | 137733     |                   |
| Mn      | 131897.639    | 406895     |                   |
| Fe      | 213660847.353 | 1146406630 |                   |
| Co      | 12345.245     | 123765     |                   |
| Ni      | 0.000         | 0          |                   |
| Cu      | 441978.794    | 4526984    |                   |
| Zn      | 434906.726    | 1449817    |                   |
| Ga      | 7113.942      | 24228      |                   |
| Ge      | 1824.954      | 4344       |                   |
| As      | 3277570.024   | 1691079    |                   |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:16

Page 1

Sample ID: BERR3(3ml)

|    |             |           |
|----|-------------|-----------|
| Se | 28457.892   | 11981     |
| Br | 2277.760    | 318       |
| Kr | 0.000       | 0         |
| Rb | 20077.617   | 85988     |
| Sr | 20642.828   | 99954     |
| Y  | 645.241     | 5408      |
| Zr | 76479.766   | 675291    |
| Nb | 4736.121    | 53779     |
| Mo | 22149.643   | 327665    |
| Ru | 0.000       | 0         |
| Rh | 0.000       | 0         |
| Pd | 5.614       | 96        |
| Ag | 51275.327   | 867625    |
| Cd | 1261.825    | 14532     |
| In | 2110.182    | 30785     |
| Sn | 158605.318  | 2105341   |
| Sb | 512801.194  | 2595119   |
| Te | 182.149     | 487       |
| I  | 71937.951   | 58412     |
| Xe | 0.000       | 0         |
| Cs | 1448.876    | 21956     |
| Ba | 1677316.635 | 31226620  |
| La | 1099.283    | 29656     |
| Ce | 3014.011    | 96663     |
| Pr | 319.098     | 9702      |
| Nd | 1294.666    | 40609     |
| Sm | 321.182     | 11665     |
| Eu | 64.941      | 2339      |
| Gd | 178.613     | 8996      |
| Tb | 0.585       | 29        |
| Dy | 155.003     | 6959      |
| Ho | 7.414       | 390       |
| Er | 92.789      | 4900      |
| Tm | 0.000       | 0         |
| Yb | 127.331     | 7730      |
| Lu | 1.677       | 76        |
| Hf | 1960.781    | 80887     |
| Ta | 521.567     | 19148     |
| W  | 4387.025    | 142416    |
| Re | 45.626      | 1611      |
| Os | 0.000       | 0         |
| Ir | 0.000       | 0         |
| Pt | 6.682       | 144       |
| Au | 762.261     | 6159      |
| Hg | 22052.759   | 195601    |
| Tl | 18104.844   | 927312    |
| Pb | 6048176.205 | 300932510 |
| Bi | 113099.064  | 4445017   |
| Th | 0.000       | 0         |
| U  | 2998.561    | 26740     |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:16

Page 2

Sample ID: BERR3(3ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: N-Berrocal(3ml)**

Sample Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 11:01:59

Sample Description:

Solution Type: Sample

Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\RTJose(septiembre18)yMiriamAgua.sam

Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP(+Silicio(fallo)).mth

Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet>TotalQuant Analysis\N-Berrocal(3ml).088

Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant.rsp

Initial Sample Quantity (mg): 244.400

Sample Prep Volume (mL): 100.00

Aliquot Volume (mL): 3.00

Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 232783.000      | 216602    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration | Intensity  | Intensity Comment |
|---------|---------------|------------|-------------------|
| H       |               |            | Not Measured      |
| He      |               |            | Not Measured      |
| Li      | 1086.571      | 582        |                   |
| Be      | 453.554       | 100        |                   |
| B       | 175.535       | 14         |                   |
| C       | 134226.823    | 1804       |                   |
| N       | 0.000         | 0          |                   |
| O       |               |            | Not Measured      |
| F       |               | 0          |                   |
| Ne      |               | 0          |                   |
| Na      | 682424.299    | 675711     |                   |
| Mg      | 77717.775     | 44081      |                   |
| Al      | 3794748.859   | 879929     |                   |
| Si      | 217685.826    | 4947825    |                   |
| P       | 4743.359      | 16187      |                   |
| S       | 0.000         | 0          |                   |
| Cl      | 0.000         | 0          |                   |
| Ar      | 0.000         | 0          |                   |
| K       | 1365917.803   | 867752     |                   |
| Ca      | 206503.636    | 264704     |                   |
| Sc      | 1145.739      | 2226       |                   |
| Ti      | 329296.664    | 877799     |                   |
| V       | 59670.817     | 231147     |                   |
| Cr      | 21205.743     | 127204     |                   |
| Mn      | 196763.904    | 628874     |                   |
| Fe      | 505078391.496 | 2807668256 |                   |
| Co      | 1067.404      | 11087      |                   |
| Ni      | 0.000         | 0          |                   |
| Cu      | 361808.121    | 3839362    |                   |
| Zn      | 94540.290     | 326518     |                   |
| Ga      | 10739.367     | 37893      |                   |
| Ge      | 3446.844      | 8501       |                   |
| As      | 13142788.999  | 7025424    |                   |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:05

Page 1

Sample ID: N-Berrocal(3ml)

|    |              |            |
|----|--------------|------------|
| Se | 151722.631   | 66175      |
| Br | 320.971      | 47         |
| Kr | 0.000        | 0          |
| Rb | 4965.477     | 22033      |
| Sr | 33449.471    | 167800     |
| Y  | 2521.556     | 21896      |
| Zr | 44155.431    | 403926     |
| Nb | 2220.611     | 26124      |
| Mo | 50363.691    | 771887     |
| Ru | 0.038        | 1          |
| Rh | 0.000        | 0          |
| Pd | 15.919       | 283        |
| Ag | 84877.913    | 1487960    |
| Cd | 0.000        | 0          |
| In | 2503.327     | 37837      |
| Sn | 124149.484   | 1707352    |
| Sb | 1069662.390  | 5608261    |
| Te | 156.409      | 433        |
| I  | 157934.561   | 132860     |
| Xe | 0.000        | 0          |
| Cs | 67.593       | 1062       |
| Ba | 2665603.459  | 51413683   |
| La | 5937.506     | 165947     |
| Ce | 9528.996     | 316616     |
| Pr | 843.295      | 26564      |
| Nd | 2496.266     | 81119      |
| Sm | 334.052      | 12569      |
| Eu | 146.564      | 5468       |
| Gd | 353.862      | 18464      |
| Tb | 50.492       | 2530       |
| Dy | 419.903      | 19531      |
| Ho | 84.162       | 4586       |
| Er | 296.690      | 16229      |
| Tm | 44.040       | 2666       |
| Yb | 393.175      | 24729      |
| Lu | 61.705       | 2888       |
| Hf | 1128.681     | 48239      |
| Ta | 206.938      | 7871       |
| W  | 22114.750    | 743776     |
| Re | 0.852        | 32         |
| Os | 0.363        | 14         |
| Ir | 0.837        | 27         |
| Pt | 6.979        | 155        |
| Au | 5014.295     | 41972      |
| Hg | 7769.930     | 71400      |
| Tl | 6677.369     | 354332     |
| Pb | 21887825.583 | 1128289515 |
| Bi | 641737.595   | 26130346   |
| Th | 1047.985     | 43931      |
| U  | 4285.678     | 39595      |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Wednesday, October 03, 2018 12:36:05

Page 2

Sample ID: N-Berroc(3ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: P1copaExt(4ml)**

Sample Date/Time: Monday, March 05, 2018 16:21:32  
 Sample Description:  
 Solution Type: Sample  
 Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\New folder\AguaSalmueraAtacamaRT.Jose.TQ(5.3.18).sam  
 Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP.mth  
 Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet\Danie\TQ2018\P1copaExt(4ml).035  
 Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant---.rsp  
 Initial Sample Quantity (mg): 349.700  
 Sample Prep Volume (mL): 100.00  
 Aliquot Volume (mL): 4.00  
 Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 930093.000      | 843391    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration   | Intensity | Intensity Comment |
|---------|-----------------|-----------|-------------------|
| H       |                 |           | Not Measured      |
| He      |                 |           | Not Measured      |
| Li      | 77374.547       | 111065    |                   |
| Be      | 1458.127        | 741       |                   |
| B       | 138558.315      | 41453     |                   |
| C       | 0.000           | 0         |                   |
| N       | 0.000           | 0         |                   |
| O       |                 |           | Not Measured      |
| F       |                 | 0         |                   |
| Ne      |                 | 0         |                   |
| Na      | 9197899.973     | 31745650  |                   |
| Mg      | 49325.858       | 74956     |                   |
| Al      | 10759530.900    | 7743893   |                   |
| Si      | 130168452.331   | 147375966 |                   |
| P       | 84324.896       | 25844     |                   |
| S       | 729633.977      | 294464    |                   |
| Cl      | 0.000           | 0         |                   |
| Ar      | 85770703800.445 | 10350166  |                   |
| K       | 6816136.537     | 17875682  |                   |
| Ca      | 165530.165      | 594885    |                   |
| Sc      | 2475.798        | 13233     |                   |
| Ti      | 3114419.670     | 24319899  |                   |
| V       | 87743.166       | 927918    |                   |
| Cr      | 66594.185       | 1064689   |                   |
| Mn      | 292577.007      | 2573249   |                   |
| Fe      | 58476838.641    | 876751069 |                   |
| Co      | 8925.079        | 244566    |                   |
| Ni      | 32245.642       | 792071    |                   |
| Cu      | 47207.207       | 1348649   |                   |
| Zn      | 95243.884       | 726995    |                   |
| Ga      | 15732.375       | 154878    |                   |
| Ge      | 3167.353        | 19875     |                   |
| As      | 185996.908      | 238130    |                   |

Report Date/Time: Tuesday, March 06, 2018 11:20:13  
 Page 1  
 Sample ID: P1copaExt(4ml)

|    |            |          |
|----|------------|----------|
| Se | 986.485    | 1007     |
| Br | 0.000      | 0        |
| Kr | 0.000      | 0        |
| Rb | 3482.307   | 44844    |
| Sr | 10435.186  | 151141   |
| Y  | 61.786     | 1422     |
| Zr | 235734.558 | 6209804  |
| Nb | 15942.154  | 540318   |
| Mo | 1488.948   | 63682    |
| Ru | 0.417      | 23       |
| Rh | 0.000      | 0        |
| Pd | 1.141      | 58       |
| Ag | 485.897    | 24617    |
| Cd | 31.613     | 904      |
| In | 142.340    | 5351     |
| Sn | 4933.128   | 170456   |
| Sb | 10986.849  | 141498   |
| Te | 29.344     | 187      |
| I  | 0.000      | 0        |
| Xe | 0.000      | 0        |
| Cs | 1367.633   | 57681    |
| Ba | 126986.168 | 6499513  |
| La | 24.269     | 1759     |
| Ce | 109.928    | 9617     |
| Pr | 13.045     | 1086     |
| Nd | 19.601     | 1651     |
| Sm | 12.314     | 1060     |
| Eu | 10.159     | 986      |
| Gd | 13.025     | 1686     |
| Tb | 7.729      | 984      |
| Dy | 18.135     | 2281     |
| Ho | 8.863      | 1261     |
| Er | 16.087     | 2135     |
| Tm | 7.770      | 1160     |
| Yb | 25.517     | 3960     |
| Lu | 8.218      | 983      |
| Hf | 6080.935   | 660298   |
| Ta | 1699.042   | 163275   |
| W  | 4680.658   | 395481   |
| Re | 1.768      | 162      |
| Os | 0.000      | 0        |
| Ir | 0.072      | 6        |
| Pt | 18.428     | 1003     |
| Au | 0.000      | 0        |
| Hg | 88.943     | 1980     |
| Tl | 984.218    | 125694   |
| Pb | 213361.800 | 26261523 |
| Bi | 2020.430   | 191306   |
| Th | 111.323    | 14153    |
| U  | 3567.867   | 120665   |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Tuesday, March 06, 2018 11:20:13

Page 2

Sample ID: P1copaExt(4ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: P1int(4ml)**

Sample Date/Time: Thursday, March 15, 2018 13:08:41  
 Sample Description:  
 Solution Type: Sample  
 Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\New folder\Plantas(febrero\14.3.18)Combustibles,TQ.sam  
 Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA\TotalQuant.MP.mth  
 Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet\Danie\TQ2018\P1int(4ml).048  
 Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant----.rsp  
 Initial Sample Quantity (mg): 348.200  
 Sample Prep Volume (mL): 100.00  
 Aliquot Volume (mL): 4.00  
 Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 1428058.000     | 1191098   |

**Report Concentration Unit: ppb**

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration    | Intensity | Intensity Comment |
|---------|------------------|-----------|-------------------|
| H       |                  |           | Not Measured      |
| He      |                  |           | Not Measured      |
| Li      | 76826.738        | 142072    |                   |
| Be      | 1329.887         | 704       |                   |
| B       | 92900.459        | 27890     |                   |
| C       | 0.000            | 0         |                   |
| N       | 33188823.294     | 42352     |                   |
| O       |                  |           | Not Measured      |
| F       |                  | 0         |                   |
| Ne      |                  | 0         |                   |
| Na      | 1710703.339      | 22752924  |                   |
| Mg      | 315872.578       | 377938    |                   |
| Al      | 3943267.049      | 5362659   |                   |
| Si      | 63195007.707     | 113715476 |                   |
| P       | 34825.163        | 15178     |                   |
| S       | 0.000            | 0         |                   |
| Cl      | 4726757.218      | 224977    |                   |
| Ar      | 135781475113.381 | 17549087  |                   |
| K       | 6449362.416      | 16561256  |                   |
| Ca      | 16838.258        | 44812     |                   |
| Sc      | 2510.684         | 10290     |                   |
| Ti      | 3409496.272      | 20011451  |                   |
| V       | 90565.699        | 779894    |                   |
| Cr      | 71045.333        | 950530    |                   |
| Mn      | 174746.807       | 1401584   |                   |
| Fe      | 50632357.707     | 682715911 |                   |
| Co      | 9758.558         | 239796    |                   |
| Ni      | 34440.695        | 737496    |                   |
| Cu      | 23960.463        | 629762    |                   |
| Zn      | 100955.907       | 725016    |                   |
| Ga      | 16105.162        | 148173    |                   |
| Ge      | 3391.932         | 19769     |                   |
| As      | 75066.283        | 86833     |                   |

Report Date/Time: Monday, March 19, 2018 11:23:39  
 Page 1  
**Sample ID: P1int(4ml)**

|    |           |         |
|----|-----------|---------|
| Se | 485.853   | 514     |
| Br | 602.249   | 236     |
| Kr | 0.000     | 0       |
| Rb | 4839.821  | 70964   |
| Sr | 3615.440  | 59725   |
| Y  | 108.041   | 2795    |
| Zr | 5.848     | 6094427 |
| Nb | 0.548     | 534705  |
| Mo | 462.654   | 21806   |
| Ru | 0.000     | 0       |
| Rh | 0.000     | 0       |
| Pd | 209.768   | 10250   |
| Ag | 241.212   | 11309   |
| Cd | 15.872    | 570     |
| In | 64.026    | 2965    |
| Sn | 2916.731  | 122517  |
| Sb | 1835.610  | 28352   |
| Te | 49.956    | 372     |
| I  | 218.965   | 655     |
| Xe | 0.000     | 0       |
| Cs | 377.280   | 20554   |
| Ba | 86392.555 | 4937560 |
| La | 177.109   | 12556   |
| Ce | 1186.447  | 107742  |
| Pr | 99.258    | 8937    |
| Nd | 103.956   | 9512    |
| Sm | 60.573    | 6289    |
| Eu | 53.283    | 5469    |
| Gd | 54.897    | 7071    |
| Tb | 37.976    | 4948    |
| Dy | 39.188    | 5115    |
| Ho | 29.427    | 4064    |
| Er | 32.278    | 4342    |
| Tm | 29.220    | 4286    |
| Yb | 36.627    | 5441    |
| Lu | 31.985    | 3608    |
| Hf | 5864.687  | 590590  |
| Ta | 1746.064  | 152930  |
| W  | 2786.345  | 210834  |
| Re | 3.714     | 299     |
| Os | 0.000     | 0       |
| Ir | 0.000     | 0       |
| Pt | 15.238    | 691     |
| Au | 0.000     | 0       |
| Hg | 31.443    | 562     |
| Tl | 437.861   | 44025   |
| Pb | 8966.648  | 883611  |
| Bi | 263.419   | 21322   |
| Th | 305.522   | 35769   |
| U  | 676.413   | 35057   |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Tl      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Monday, March 19, 2018 11:23:39

Page 2

Sample ID: P1int(4ml)

**TotalQuant - Summary Report.MpazMartinRedondo**

**Sample ID: P1mezcla(4ml)**

Sample Date/Time: Monday, March 05, 2018 16:26:08  
 Sample Description:  
 Solution Type: Sample  
 Sample File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Sample\New folder\AguaSalmueraAtacamaRT.Jose.TQ(5.3.18).sam  
 Method File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\Method\INTA>TotalQuant.MP.mth  
 Dataset File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\DataSet\Danie\TQ2018\P1mezcla(4ml).036  
 Response File: C:\Users\Public\Documents\PerkinElmer Syngistix\ICPMS\System\totalquant---.rsp  
 Initial Sample Quantity (mg): 330.900  
 Sample Prep Volume (mL): 100.00  
 Aliquot Volume (mL): 4.00  
 Diluted to Volume (mL): 10.00

**TotalQuant External Standards**

Torch Z Position (mm): 0.00

**TotalQuant Internal Standards**

| Analyte | Blank Intensity | Intensity |
|---------|-----------------|-----------|
| Rh      | 930093.000      | 793830    |

Report Concentration Unit: ppb

**Analyte Intensities**

| Analyte | Concentration     | Intensity | Intensity Comment |
|---------|-------------------|-----------|-------------------|
| H       |                   |           | Not Measured      |
| He      |                   |           | Not Measured      |
| Li      | 73065.785         | 99242     |                   |
| Be      | 1387.146          | 667       |                   |
| B       | 223134.449        | 63167     |                   |
| C       | 0.000             | 0         |                   |
| N       | 0.000             | 0         |                   |
| O       |                   |           | Not Measured      |
| F       |                   | 0         |                   |
| Ne      |                   | 0         |                   |
| Na      | 6191834.865       | 20221625  |                   |
| Mg      | 1327801.544       | 1909246   |                   |
| Al      | 18404677.841      | 12534163  |                   |
| Si      | 130903988.887     | 140240980 |                   |
| P       | 76404.101         | 22157     |                   |
| S       | 192990.727        | 73700     |                   |
| Cl      | 0.000             | 0         |                   |
| Ar      | 1007235541736.976 | 115011295 |                   |
| K       | 10175957.963      | 25252291  |                   |
| Ca      | 57191.838         | 194488    |                   |
| Sc      | 4162.859          | 21054     |                   |
| Ti      | 3031453.770       | 22399417  |                   |
| V       | 82461.752         | 825182    |                   |
| Cr      | 72504.277         | 1096860   |                   |
| Mn      | 278523.329        | 2317951   |                   |
| Fe      | 57224521.655      | 811849868 |                   |
| Co      | 8866.882          | 229909    |                   |
| Ni      | 27368.382         | 636126    |                   |
| Cu      | 32526.910         | 879295    |                   |
| Zn      | 93143.160         | 672739    |                   |
| Ga      | 16716.533         | 155719    |                   |
| Ge      | 3125.766          | 18559     |                   |
| As      | 123393.564        | 149486    |                   |

Report Date/Time: Tuesday, March 06, 2018 11:20:14  
 Page 1  
 Sample ID: P1mezcla(4ml)

|    |            |         |
|----|------------|---------|
| Se | 277.858    | 269     |
| Br | 0.000      | 0       |
| Kr | 0.000      | 0       |
| Rb | 13953.142  | 170023  |
| Sr | 4564.054   | 62551   |
| Y  | 74.792     | 1628    |
| Zr | 218918.715 | 5456808 |
| Nb | 15516.617  | 497623  |
| Mo | 745.576    | 30174   |
| Ru | 0.000      | 0       |
| Rh | 0.000      | 0       |
| Pd | 0.915      | 44      |
| Ag | 149.441    | 7165    |
| Cd | 22.135     | 599     |
| In | 96.032     | 3416    |
| Sn | 3993.377   | 130567  |
| Sb | 5522.451   | 67299   |
| Te | 47.535     | 286     |
| I  | 0.000      | 0       |
| Xe | 0.000      | 0       |
| Cs | 310.637    | 12397   |
| Ba | 65106.634  | 3153195 |
| La | 79.307     | 5437    |
| Ce | 2326.296   | 192565  |
| Pr | 23.156     | 1824    |
| Nd | 87.246     | 6950    |
| Sm | 24.041     | 1958    |
| Eu | 6.437      | 591     |
| Gd | 22.376     | 2741    |
| Tb | 3.105      | 374     |
| Dy | 19.751     | 2351    |
| Ho | 3.257      | 439     |
| Er | 11.310     | 1420    |
| Tm | 1.827      | 258     |
| Yb | 16.864     | 2477    |
| Lu | 2.699      | 306     |
| Hf | 5793.653   | 595283  |
| Ta | 1733.347   | 157616  |
| W  | 2970.347   | 237480  |
| Re | 3.675      | 318     |
| Os | 0.000      | 0       |
| Ir | 0.096      | 8       |
| Pt | 16.002     | 824     |
| Au | 0.000      | 0       |
| Hg | 12.762     | 269     |
| Tl | 620.271    | 74956   |
| Pb | 72755.216  | 8473611 |
| Bi | 927.607    | 83110   |
| Th | 386.729    | 46523   |
| U  | 6423.221   | 205554  |

#### TotalQuant Equations

| Analyte | Equation       |
|---------|----------------|
| Ca      | 740.74*mass 43 |
| Ti      | 13.44*mass 47  |
| Se      | 11.455*mass 82 |
| Fe      | 47.17*mass 57  |

Report Date/Time: Tuesday, March 06, 2018 11:20:14

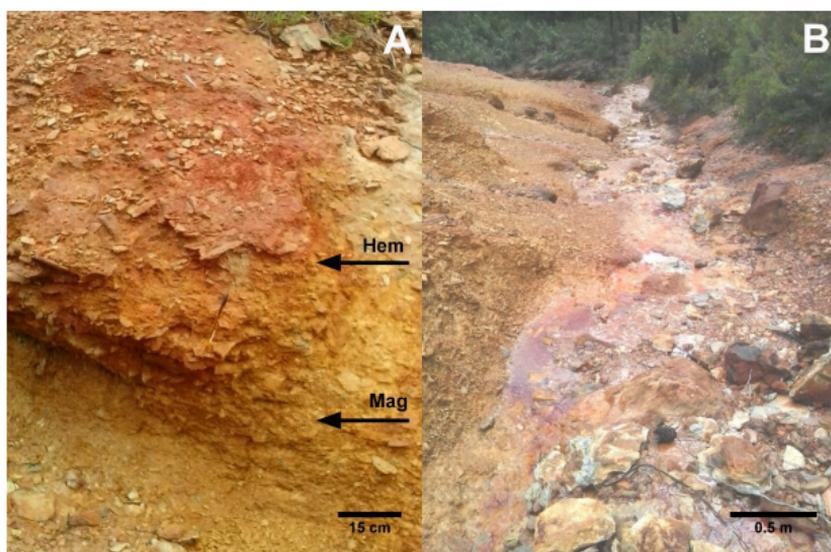
Page 2

Sample ID: P1mezcia(4ml)

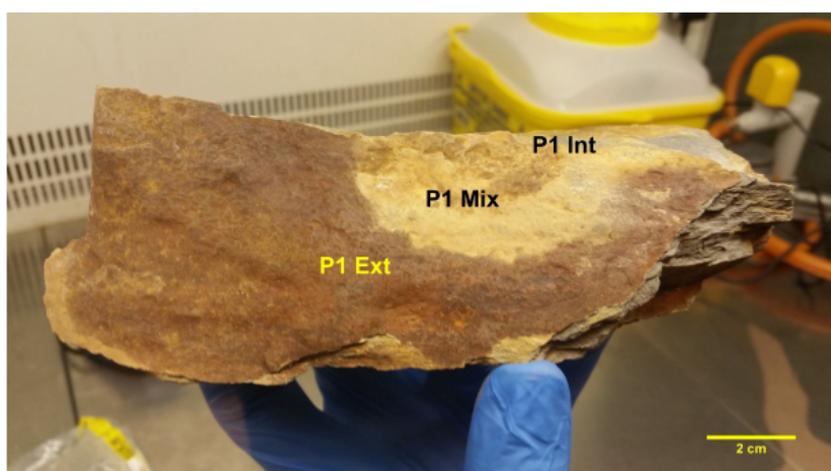




Imagen contraportada: Ubicación aproximada de la zona de muestreo en Berrocal. A la derecha, puede observarse el cauce del río y, a la izquierda, las rocas depositadas en los márgenes de éste erosionadas por la acción del río. Imagen cortesía de Felipe Gómez. ■



Muestreo en la zona del Origen. A) Unidad litoestratigráfica (Hem y Mag); B) Alrededores del área en la que se ubica la unidad litoestratigráfica. ■



Muestra P1 recogida en Berrocal. En la imagen se indica de donde proceden las tres muestras obtenidas del procesado de P1. n



Río Tinto, situado en la provincia de Huelva (Andalucía), es un ambiente natural ácido extremo debido a la actividad microbiana bajo su superficie, en la Faja Ibérica Pirítica (IPB), y este ambiente es considerado un excelente análogo geoquímico y mineralógico de Marte.

Uno de los nichos microbianos menos estudiados en este sistema y, de manera general en la ecología microbiana, es el de los revestimientos minerales enriquecidos en hierro. Su interés radica en varios aspectos: por un lado su carácter altamente oxidativo, con el desarrollo de ciclos biogeoquímicos a pequeña escala, sus condiciones poliextremas para la vida microbiana y la biodiversidad presente, lo que lo convierte en un microambiente

de gran interés para la búsqueda de biomarcadores en Astrobiología.

En este trabajo se ha caracterizado, mediante la implementación de diferentes técnicas de ecología microbiana, los microorganismos presentes en revestimientos de roca localizados en diferentes ubicaciones de la cuenca del Río Tinto con diferentes características fisicoquímicas.

El lector puede observar que los resultados obtenidos parecen indicar que la actividad de las comunidades microbianas está relacionada con la diversidad presente, el consumo de materia orgánica para su desarrollo y la biodisponibilidad de N en cada sistema particular estudiado.



EXCELENCIA  
MARÍA  
DE MAEZTU



INSTITUTO  
NACIONAL  
DE TÉCNICA  
AEROSPAZIAL

ISBN: 978-84-9091-518-9



9 788490 915189