

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**“DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN
SEDIMENTOS DE LAGUNAS Y TURBERA DE LA CUENCA MILLUNI
CORDILLERA REAL, LA PAZ-BOLIVIA”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

ELABORADO POR: SONIA ISELA SACACA CUELLAR

La Paz - Bolivia

- 2006 -

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT
CARRERA DE BIOQUÍMICA**



**“DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN
SEDIMENTOS DE LAGUNAS Y TURBERA DE LA CUENCA MILLUNI
CORDILLERA REAL, LA PAZ-BOLIVIA”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

ELABORADO POR: SONIA ISELA SACACA CUELLAR

**TUTORES: VOLGA IÑIGUEZ ROJAS Ph.D.
MARC ROULET Ph.D.
ROLANDO SANCHEZ MONTAÑO Ms.c.**

La Paz - Bolivia

- 2006 -

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	OBJETIVOS	4
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	4
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
4.	FUNDAMENTO TEORICO	5
4.1.	CONTAMINACIÓN MINERA.....	5
4.1.1.	COLAS DE DESMONTE.....	6
4.1.2.	PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS COLAS DE DESMONTE.....	6
4.1.3.	FORMACIÓN DE LOS DRENAJES MINEROS ÁCIDOS.....	7
4.1.4.	CONSECUENCIA DE LA CONTAMINACIÓN POR DRENAJES MINEROS ÁCIDOS EN EL MEDIO AMBIENTE.....	11
4.1.5.	CONTAMINACION MINERA EN BOLIVIA.....	13
4.2.	ROL DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS Y OTRAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN DESECHOS MINEROS.....	15
4.2.1.	CARACTERISTICAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (BSR).....	21
4.3.	DIVERSIDAD MICROBIANA EN AMBIENTES MINEROS.....	26
4.4.	TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS DENTRO DE AMBIENTES MINEROS	29
5.	METODOLOGÍA	31
5.1.	AREA DE ESTUDIO.....	31
5.1.1.	LAGUNA PATA KHOTA (PK).....	33
5.1.2.	LAGUNA JANKHO KHOTA (JK).....	33
5.1.3.	LAGUNA VENTANANI (V).....	33
5.1.4.	DESECHO MINERO MILLUNI CHICO (MCH).....	34
5.1.5.	LAGUNA MILLUNI GRANDE (MG).....	34
5.2.	COLECTA DE LAS MUESTRAS.....	35
5.3.	MEDICIONES FÍSICO-QUÍMICAS (Eh y pH).....	36
5.4.	CEPAS CONTROL.....	36
5.5.	EXTRACCIÓN DE DNA DE SEDIMENTOS.....	37
5.6.	PURIFICACIÓN DE DNA DE SEDIMENTOS.....	37
5.7.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S DNAr Y SUBGRUPOS ESPECÍFICOS DE BSR POR PCR Y NESTED-PCR.....	38
5.8.	ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE LOS SUBGRUPOS DE BSR.....	39
6.	RESULTADOS	41
6.1.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS EN LOS SEDIMENTOS Y TURBERA DE LA CUENCA MILLUNI.....	41
6.2.	PERFILES DEL POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCION (Eh) EN LA CUENCA MILLUNI.....	42
6.3.	PERFILES DE pH EN LA CUENCA MILLUNI.....	45
6.4.	PERFILES DE DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	

		47
6.5.	DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR EN EL SEDIMENTO Y TURBERA.....	49
6.6.	DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE SUBGRUPOS BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	52
6.7.	PORCENTAJE TOTAL DE SUBGRUPOS DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	54
6.8.	DISTRIBUCIÓN TOTAL DE BSR DENTRO LA CUENCA MILLUNI.....	55
7.	DISCUSIONES	56
7.1.	PRIMER SISTEMA: LAGUNAS PATA KHOTA Y JANKHO KHOTA.....	56
7.2.	SEGUNDO SISTEMA LAGUNA VENTANANI.....	60
7.3.	TERCER SISTEMA DESECHO MINERO MILLUNI CHICO Y LAGUNA MILLUNI GRANDE.....	62
7.4.	CUARTO SISTEMA TURBERA SALIDA MILLUNI GRANDE TMGS.....	64
7.5.	INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS DE LA CUENCA MILLUNI SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS SUBGRUPOS DE BSR.....	66
8.	CONCLUSIONES	69
9.	RECOMENDACIONES	71
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
11.	ANEXOS	82

**TABLA DE CONTENIDOS
(FIGURAS)**

FIGURA 1. MECANISMO DE REDUCCIÓN DE ÓXIDOS INSOLUBLES DE Fe⁺³ MEDIANTE DOS VÍAS.....	18
FIGURA 2. ESQUEMA DE LA REDUCCIÓN ASIMILATORIA Y DESASIMILATORIA DEL SULFATO.....	22
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA CADENA RESPIRATORIA DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN <i>DESULFOVIBRIO</i>, CON HIDRÓGENO O COMPUESTOS ORGÁNICOS COMO FUENTE DE ENERGÍA Y SULFATO COMO ÚLTIMO ACEPTOR TERMINAL DE ELECTRONES.....	23
FIGURA 4. TURBERA MILLUNI GRANDE SALIDA (TMGS).....	31
FIGURA 5. MAPA CUENCA MILLUNI Y LAGUNAS DE ESTUDIO.....	32
FIGURA 6. ESQUEMA DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	41
FIGURA 7. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LAGUNA PATA KHOTA.....	43
FIGURA 8. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LAGUNA JANKHO KHOTA.....	43
FIGURA 9. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LAGUNA VENTANANI.....	44
FIGURA 10. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN DESECHO MINERO MILLUNI CHICO.....	46
FIGURA 11. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LAGUNA MILLUNI GRANDE.....	46
FIGURA 12. PERFILES DE Eh, pH Y DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN TURBERA MILLUNI GRANDE SALIDA.....	48
FIGURA 13. DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS EN LOS SEDIMENTOS Y TURBERA.....	51
FIGURA 14. DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE SUBGRUPOS DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	53
FIGURA 15. PORCENTAJE TOTAL DE SUBGRUPOS DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	54
FIGURA 16. PORCENTAJE DE DISTRIBUCIÓN TOTAL DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI.....	55

**TABLA DE CONTENIDOS
(TABLAS)**

TABLA 1. MICROORGANISMOS PROCARIOTAS ACIDÓFILOS	28
TABLA 2. ALTURA DE LOS SEDIMENTOS.....	35
TABLA 3. CEPAS CONTROL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS.....	40
TABLA 4. SECUENCIAS DE CEBADORES UTILIZADOS EN LA REACCIÓN DE PCR PARA IDENTIFICAR A LOS SUB-GRUPOS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS.....	40
TABLA 5. VALORES FÍSICO-QUÍMICOS Y CARACTERÍSTICAS DE LAS LAGUNAS Y TURBERA DE LA CUENCA MILLUNI.....	41
TABLA 6. CORRELACIONES DE Eh y pH CON LA DISTRIBUCIÓN DE BSR.....	50

DEDICATORIA

A DIOSITO A QUIEN DEBO TODO LO QUE SOY Y
CUANTO TENGO, GRACIAS SEÑOR POR TU AYUDA
Y FORTALEZA DURANTE
ESTOS ULTIMOS AÑOS.

A LA MEMORIA DE MI SOBRINO ORLANDO HEBER (PACHITO)
A QUIEN EN VIDA NO SUPIMOS COMPRENDER
Y AHORA QUE NO ESTA, RECIEN LO HACEMOS,
QUE DIOSITO LO TENGA A SU LADO POR LA ETERNIDAD,
HASTA QUE VOLVAMOS A VERNOS.

A MIS PAPITOS CLEMENTE SACACA Y
SOFIA CUELLAR VELARDE A MI HERMANITA
CLAUDIA MÓNICA, POR EL APOYO, LA
EDUCACIÓN Y LOS PRINCIPIOS QUE ME INCULCARON
PRINCIPALMENTE POR EL AMOR INCONDICIONAL
QUE SIEMPRE ME OFRECIERON.

A MIS SOBRINITOS POR QUE VINIERON
A LLENAR UN VACIO EN MI VIDA
CON SUS ALEGRÍAS Y OCURRENCIAS
MARIELITA, JHEFERSON(JEFECHITO),
EDSON Y MILENKITA.

A MIS AMIGOS QUIENES OCUPAN
UN SITIO IMPORTANTE EN MI CORAZÓN
CUYA AMISTAD ES INVALUABLE Y TENGO
LA FORTUNA DE TENERLOS A MI LADO,
DANIELA ARTEAGA (DANI), KARINA SALAZAR (KARI),
SUSY FUENTES, RUDDY LUNA-BARRON,
CARLA ROMERO, SILVIA ZAMBRANA
Y OSCAR CONDORI ALEGRIA.

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES DRA. VOLGA IÑIGUEZ DE QUIEN RECIBI LA FORMACIÓN EN EL CAMPO DE LA INVESTIGACIÓN, POR SUS APORTES VALIOSOS EN LA ELABORACIÓN DE ESTE MANUSCRITO, POR SUS SINCERAS CRITICAS, DR. MARC ROULET POR LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR ESTE TRABAJO, POR SUS CONCEJOS, SU AMISTAD Y SU CONFIANZA, A MI DOC. ROLANDO SÁNCHEZ POR SU FE CIEGA EN MI, GRACIAS DOC. POR SUS PALABRAS DE ALIENTO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES Y SUS OBSERVACIONES EN ESTE TRABAJO.

AL TRIBUNAL REVISOR DR. ENRIQUE TERRAZAS, DRA. TERESA ALVAREZ Y DRA. RAQUEL CALDERON, POR SUS OBSERVACIONES Y SU VALORACIÓN DEL TRABAJO.

AL PERSONAL Y ESTUDIANTES DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA, POR LOS MOMENTOS VIVIDOS, POR LAS EXPERIENCIAS COMPARTIDAS, POR LAS TRAVESURAS HECHAS: A JULITA, CHARITO, ROSALIA, SHIRLEY, PEPE, ALVARITO, SAMANTA, ING. COCO, BEATRIZ, MARIA CRISTINA, JUCAS, LIC. NATA, FRANCO, DON NATALIO.

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PARA EL DESARROLLO (IRD), POR LA COLABORACIÓN EN LA IMPRESIÓN Y EMPASTADO DE ESTE MANUSCRITO.

1. RESUMEN

Las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) juegan un rol importante en la mitigación de los drenajes mineros ácidos, producto de la actividad minera, reduciendo el sulfato a sulfuro de hidrógeno que se combina con los metales pesados formando precipitados de sulfuros metálicos. De esta manera las BSR contribuyen tanto a reducir la acidez del medio como la concentración de metales pesados, por lo que es importante su estudio, en ambientes contaminados por la minería.

La Cuenca Milluni, localizada al norte de la ciudad de La Paz, presenta altos niveles de contaminación por desechos mineros, como resultado de la explotación minera realizada hace 50 años. En el presente estudio, se evaluó la distribución de los subgrupos de BSR en perfiles sedimentarios de lagunas Pata Khota, Jankho Khota, Ventanani, Milluni Grande, desecho minero Milluni Chico y turbera, se evidenció la presencia de BSR con distribución espacial definida, con diferentes condiciones físico-químicas, empleando métodos moleculares en base al análisis del gen 16S DNAr y su amplificación mediante Nested-PCR. Se observaron sedimentos con valores de Eh oxidante-reductor (PK y MG), Eh reductor (JK y TMGS), Eh oxidante (V) y Eh con alternancia oxidante-reductor (MCH). Así mismo las BSR están presentes en sedimentos con pH ácido (V, MG y MCH), ligeramente ácido (JK y TMGS) y básico-ácido (PK). La distribución horizontal de BSR fue de 83%-66% PK, 66%-16% JK, 16-32% V, 50-16% MG-MCH y <50-66% TMGS, se estimó una distribución total de BSR entre 32% PK, 52% JK, 17% V y MG, 29% MCH y 23% TMGS. La distribución de DSV y DCC fue mayor en relación a DBB, DFM y DSB los cuales no se encontraron en ambientes oxidantes (V).

Las variables características físico-químicas y la ubicación de las lagunas con respecto a la mina, condicionarían a la distribución y adaptación de las BSR dentro de sistemas heterogéneos, lo que las proyectaría como herramientas para emplearlas en procesos de biorremediación de aguas contaminadas por drenajes mineros ácidos y metales pesados.

Palabras Claves: Lagunas Pata Khota (PK), Jankho Khota (JK), Ventanani (V), Milluni Grande (MG) y desecho minero Milluni Chico (MCH), *Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfobulbus* (DBB), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), Potencial de óxido-reducción (Eh), pH.

ABSTRACT

The anaerobic sulfate-reducing bacteria (SRB) may play an important role in acid mine drainage mitigation, lowering sulfate concentrations originating from Acid Mine Drainage (AMD), producing local alkalinity and promoting metal sulfides precipitation. The present study was carried out to determine the presence of SRB in Pata Khota, Jankho Khota, Ventanani, Milluni Grande and Milluni Chico, of the Milluni basin located in the Altiplano highlands north from La Paz city. The Milluni region has accumulated mining waste as a result of unregulated heavy-metal mining in the past century. SRB subgroups distribution along a deep profile in sediments and wetlands samples of different physicochemical conditions was analyzed by PCR and nested-PCR of 16S DNAr. Results evidenced presence of SRB with defined spatial distribution in all lakes tested, representing a wide range of physico-chemical conditions of Eh (+350 to -330 mV) and of pH (10 to 2.5). The overall SRB distribution ranged from 32% for PK, 52% for JK, 17% for V and MG, 29% for MCH and 23% for TMGS. The SRB horizontal distribution was 83% - 66% (PK), 66%-16% (JK), 16-32% (V), 50-16% (MG-MCH) and <50-66% (TMGS). The more abundant subgroups were DSV and DCC while DBB, DFM and DSB were not found in oxic environments. The variable physico-chemical conditions and lakes location to the mine may have conditioned distribution and adaptation of SRB projecting them as a potential tool for bioremediation in this region.

Keywords: Lakes Pata Khota (PK), Jankho Khota (JK), Ventanani (V), Milluni Grande (MG) and AMD Milluni Chico (MCH), wetland TMGS, *Desulfovibrio* (DSV), *Desulfococcus* (DCC), *Desulfobulbus* (DBB), *Desulfotomaculum* (DFM), *Desulfobacter* (DSB), Potential of oxid-reduction (Eh), pH.

2. INTRODUCCIÓN

En Bolivia poco se conoce sobre las comunidades bacterianas en ambientes de stress como los contaminados por desechos mineros, sin embargo, se considera importante su estudio por el potencial de biorremediación que tienen para reducir la acidez y la concentración de metales pesados disueltos.

Nuestro país se caracteriza por una larga tradición en la explotación de minerales beneficiada por leyes parcializadas, donde se favorecía esta actividad de forma permisiva desde el contexto ecológico. Como consecuencia de ello se tienen serios perjuicios para el medio ambiente, un claro ejemplo es el problema de contaminación que arrastra desde hace 50 años la región de Milluni, que se encuentra ubicada en la Cordillera Real, al norte de la ciudad de La Paz y que abastece de agua potable a las ciudades de La Paz y El Alto (Ríos *et al.*, 1985; Apaza *et al.*, 1989 y Meneses *et al.*, 1997).

Esta región se caracteriza por presentar una cuenca que recibe el mismo nombre y se encuentra constituida por cinco lagunas Pata Khota (PK), Jankho Khota (JK), Ventanani (V), Milluni Grande (MG), desecho minero Milluni Chico (MCH), de las cuales las dos últimas presentan evidente contaminación directa por desechos mineros, debido al inadecuado depósito de las colas de desmonte presentando altos contenidos de sulfuros metálicos asociados a la pirita (FeS_2) (Raffaillac *et al.*, 2002 y Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005). Este compuesto es susceptible de oxidarse en contacto con el aire y el agua, generando drenajes ácidos con valores de pH entre 1 a 3 y elevada concentración de metales pesados disueltos (Pb, Cu, Zn, Sn, Fe, Cd, As, Sb, Co) (Nordstrom *et al.*, 1999 y Fortín *et al.*, 2002). Los metales pesados en elevadas concentraciones son tóxicos, provocando un deterioro en el medio ambiente, ocasionando la muerte del ecosistema acuático, degradación de la calidad de agua, de la cadena de alimentos, contaminación de los suelos y la bioacumulación poniendo en riesgo la flora y fauna local, lo que representa un daño a la comunidad (Guía Ambiental de Presas de Colas, 2001).

Dentro los desechos mineros existe la presencia de bacterias autotróficas que se destacan por la producción de acidez, biooxidación de metales y la disolución de estos (Natarajan *et al.*, 2005 y Fortín *et al.*, 2005) y bacterias heterótrofas, como las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), que reducen el sulfato (SO_4^{2-}) en condiciones anaerobias hasta H_2S , que se combina con los metales pesados, los mismos que precipitan como sales de sulfuro (Luptakova *et al.*, 2005 y Lloyd *et al.*, 2001).

Mediante este mecanismo las BSR cumplen dos funciones importantes en ambientes acuáticos afectados por desechos mineros, reducen la acidez de las aguas mediante la formación de bicarbonato que surge de la oxidación de compuestos orgánicos y precipitan los metales pesados disueltos (García *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2000 y Natarajan *et al.*, 2005). Las BSR se encuentran constituidas en seis subgrupos denominados: *Desulfotomaculum (DFM)*, *Desulfobulbus (DBB)*, *Desulfobacter (DSB)*, *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina (DCC)*, *Desulfovibrio-Desulfomicrobium (DSV)* y *Desulfobacterium (DBM)* (Castro *et al.*, 1999 y Daly *et al.*, 2000).

El estudio de bacterias del medio ambiente en cultivos ocasiona una serie de dificultades, tales como proporcionarles un ambiente anaerobio y los requerimientos nutricionales similares a su nicho ecológico, se estima que se logra aislar menos del 0.1% a 1% del total de bacterias presentes en muestras de sedimentos (Staley *et al.*, 1997). Debido a estos problemas se recurre al empleo de métodos moleculares que permiten analizar la composición, distribución y diversidad de las comunidades bacterianas mediante el análisis de los ácidos nucleicos, empleando marcadores como el 16S DNAr, presentes en muestras ambientales (agua, sedimento, material biológico, etc) (Daly *et al.*, 2000; Luna-Barrón *et al.*, 2004; Achá *et al.*, 2004 y Sánchez *et al.*, 2005).

En esta investigación se desea evaluar la distribución de los subgrupos de BSR asociada a la presencia y/o ausencia de contaminación por desechos mineros y a las condiciones físico-químicas imperantes en cada una de las lagunas y turbera, mediante el empleo de técnicas independientes de cultivo, para obtener una estimación sobre la distribución de los subgrupos de BSR dentro la Cuenca Milluni.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

Determinar la distribución de los subgrupos de Bacterias Sulfato Reductoras y las características físico-químicas presentes en sedimentos de las lagunas Pata Khota, Jankho Khota, Ventanani, Milluni Grande, desecho minero Milluni Chico y turbera, que forman parte de la Cuenca Milluni.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Establecer las características físico-químicas de los sedimentos de las lagunas y turbera de la Cuenca Milluni en función a su ubicación con la mina.

Estimar el porcentaje de distribución horizontal y vertical de BSR dentro de sedimentos y turba con Eh oxidante y reductor, así mismo en presencia de pH alcalino y ácido.

Estimar la distribución de subgrupos de BSR dentro de ambientes afectados directa (MCH, MG y TMGS) e indirectamente (PK, JK y V) por la contaminación minera.

4. FUNDAMENTO TEORICO:

4.1. CONTAMINACIÓN MINERA:

La minería es una de las actividades de mayor ingreso en el mundo, incluso es una de las que se encarga de sostener la economía de varios países, sin embargo esta actividad ha generado varios problemas al medio ambiente, una consecuencia directa de la explotación minera es la formación de desechos ricos en sulfuros y metales pesados, no existiendo una forma de reducirlo o emplearlo. Esto motiva a muchos investigadores a buscar alternativas para remediar los problemas de contaminación que se presentan en diferentes países por consecuencia de la actividad minera, tal es el caso de la mina Richmond en California, que se encuentra localizada en la ciudad de Shasta, esta zona está rodeada de varias compañías mineras que explotan plata, oro, cobre, hierro, zinc y pirita minerales que fueron extrayéndose desde 1860, esta mina es una de las mas grandes productoras de cobre en el estado de California y es uno de los mayores productores de aguas ácidas del mundo, en 1980 las aguas de río Sacramento contenían 300 toneladas por año de cobre, cadmio y zinc disueltos, como consecuencia de la contaminación por desechos mineros (Nordstrom *et al.*,1999).

Algo similar acontece en la mina Nickel Rim, en Ontario Canadá que presenta depósitos de colas desde 1953, presentando un 98% de *pirita* (FeS_2), *calcopirita* (CuFeS_2), *marcasita* (Fe_2S) y altas concentraciones de Fe^{+2} y sulfatos en los sedimentos de las colas. Esto ha ocasionado la muerte del ecosistema acuático, la perdida de abrevaderos naturales y de muchos peces de importancia económica y nutricional (Benner *et al.*, 1999).

Las exploraciones y operaciones mineras han dejado a su paso muchos depósitos de colas de desmonte y pulpas, las cuales son la principal fuente de contaminación y degradación del medio ambiente (Guía Ambiental de Presas de Colas, 2001).

4.1.1. COLAS DE DESMONTE:

Las colas de desmonte están compuestas por residuos sólidos provenientes de los procesos minero metalúrgicos, son partículas de arena gruesa o arenas finas y lamas que se producen durante los métodos de concentración del mineral, las colas son descargadas por canaletas o tuberías formando pulpas o lodos (Reglamento Ambiental para Actividades Mineras, título V Artículo 32), que se originan durante el proceso de extracción, mediante excavaciones subterráneas o de superficie donde el mineral es triturado y molido a un tamaño fino. Durante este proceso de molienda se añade agua y en la mayoría de los casos también se adiciona una pequeña cantidad de reactivos químicos para facilitar la separación y recuperación de los minerales económicos. Las colas conjuntamente con el agua utilizada en el proceso forman una pulpa de baja densidad con flujo libre. En muchos casos la pulpa es espesada mediante un proceso de eliminación de agua hasta obtener una consistencia de modo que pueda ser transportada económicamente a una presa de colas. Por lo general, la pulpa de colas es bombeada o conducida por gravedad hacia una presa con contenido de sólidos en agua que varían entre 30% a 50% (Guía Ambiental de Presas de Colas, 2001).

4.1.2. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LAS COLAS DE DESMONTE:

El tamaño de las partículas y el contenido químico son aspectos importantes de las características de colas de desmonte, que son predeterminadas por la naturaleza de la mina, la molienda y el proceso de extracción del mineral de interés. No obstante de que los tamaños de partículas se asemejan a arenas y limos naturales, el contenido químico de ellas es generalmente dañino al ambiente. Una de las principales preocupaciones ambientales respecto a las características químicas de las colas es el potencial del material para oxidarse y volverse ácido. Por lo general las colas de desmonte presentan elevadas cantidades de minerales sulfurados como por ejemplo *pirita* (FeS_2) (Guía Ambiental de Presas de Colas, 2001).

Dentro los desechos mineros el sulfuro al exponerse al oxígeno, agua y la acción de los microorganismos ocasiona la producción de drenajes mineros ácidos (DMA) con el consiguiente detrimento del ambiente que es consecuencia de la disolución de la *pirita* (FeS_2).

4.1.3. FORMACIÓN DE LOS DRENAJES MINEROS ÀCIDOS:

La formación de drenaje ácido como proceso natural, puede ocurrir en roca masiva y yacimientos minerales, pero el desarrollo del proceso es generalmente lento. Por el contrario, la formación de drenaje ácido en el desmante de mina generalmente se desarrolla rápidamente y puede ocurrir en pocos meses. Así mismo los botaderos de desmante, mineral de baja ley y pilas de acumulación de mineral debido a su gran volumen se constituyen fuentes importantes de drenajes ácidos. A pesar que el volumen de las colas es generalmente menor que el desmante, estas son una fuente potencialmente significativa de drenaje ácido con un tamaño de partículas mas fino y gran área superficial, que aumenta la reactividad de las colas. Otras fuentes de drenaje ácido asociadas con la minería incluyen minas abandonadas, galerías, cuadros, chimeneas y cortes en superficie (Christensen *et al.*, 1996 y Guía Ambiental de Presas de colas, 2001).

El drenaje ácido es producido por la oxidación de los minerales de sulfuro de hierro más conocido como *pirita* (FeS_2), además existen otros minerales sulfurados más susceptibles a meteorizarse tales como la *marcasita* (sulfuro natural de hierro FeS_2) y *pirrotina* (SFe). Estos drenajes se caracterizan por tener alta acidez (pH 2-5), alta concentración de metales pesados y de sulfatos disueltos (Edwards *et al.*, 1999).

La disminución de pH por la formación de ácido sulfúrico incrementa la solubilidad de metales pesados en el agua. Este proceso acelera la movilización de contaminantes inorgánicos los cuales pueden causar severos problemas ambientales si son descargados a cuerpos de aguas.

La oxidación de la *pirita* es un proceso complejo la cual necesita dos aceptores de electrones como el O_2 y el Fe^{+3} , esta oxidación acontece cuando este mineral y otros sulfuros son expuestos al aire y al agua dando lugar a una reacción iniciadora (ecuación 1) que comienza con la oxidación del sulfuro (S^{-2}) hasta SO_4^{-2} que otorga las condiciones ácidas, en las cuales el Fe^{+2} proveniente de la *pirita* se encuentra estable en estas condiciones (Nordstrom *et al.*, 1999).



El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre. La presencia de oxígeno y pH neutro condiciona que el Fe^{+2} sea rápidamente oxidado a Fe^{+3} , el cual precipita como óxidos e hidróxidos de Fe^{+3} ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) insolubles (ecuación 2). Dentro de similares condiciones pero a pH ácido los microorganismos pueden oxidar el Fe^{+2} a Fe^{+3} y obtener energía a partir de esta reacción, ya que la oxidación de Fe^{+2} es lenta en ambientes ácidos.



El Fe^{+3} en ambientes ácidos no precipita como óxidos o hidróxidos sino que forma un complejo de sulfato mineral llamado *jarosita* ($\text{HFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) el cual precipita. Las IRB utilizan la reducción del Fe^{+3} para obtener energía, el Fe^{+3} es soluble a pH ácido y por si solo es un fuerte oxidante que puede reaccionar de forma espontánea con la *pirita* para oxidarla y producir iones Fe^{+2} y SO_4^{-2} (ecuación 3) (Madigan *et al.*, 1999).



En ambientes naturales los óxidos de hierro se encontrarían como minerales de *ferrihidrita* ($\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), *geotita* ($\text{FeO}(\text{OH})$), *lepidocrocita* ($\text{FeO}(\text{OH})$), *hematita* (Fe_2O_3) y *magnetita* (Fe_3O_4) acumulados dentro de los sedimentos, jugando un rol importante en la adhesión de metales pesados y nutrientes, se piensa que la formación de óxidos de hierro podría ser resultado de procesos bióticos y abióticos en la naturaleza. El óxido de hierro biogénico se encontraría en asociación con los microorganismos y las características físico-químicas del medio se presentarían similares a su contra parte abiótica (Yozhida *et al.*, 2006).

Los óxidos de hierro formados dentro las células bacterianas son denominados minerales intracelulares biogénicos, así mismo se ha visto partículas de óxidos de hierro extracelular cercanos a paredes celulares y exopolímeros bacterianos que son denominados como óxidos de hierro biogénico extracelular, los óxidos mas comunes de este tipo incluyen *hematita*, *magnetita*, así como oxihidróxidos entre los que se tiene a la *geotita*, *lepidocrocita*, *akaganeita* y óxidos amorfos como *ferrihidrita* y *lepidocrocita*, dentro de áreas ricas en hierro estas últimas se encontrarían asociadas con bacterias neutrófilas hierro oxidadoras. La oxidación de hierro reducido provee energía para muchas bacterias litoautotróficas, las cuales lo precipitan como óxidos de hierro biogénico. Así mismo, dentro de ambientes anòxicos la *ferryhidrita* y la *magnetita* surgen como resultado de la capacidad bacteriana de acoplar la oxidación de Fe^{+2} a la reducción de nitrato (Fortín *et al.*, 2005).

La *magnetita* es producto de la reducción del hierro por bacterias hierro reductoras desasimilatorias (IRB) dentro de ambientes anaerobios. La actividad de bacterias fotoautótrofas que usan el Fe^{+2} como un donador de electrones durante la fotosíntesis anoxigénica produce *ferrihidrita* la cual transforma más cristales de óxidos de hierro como ser *geotita* y *lepidocrocita*. En ambientes afectados por la actividad minera donde el hierro es abundante, los óxidos de hierro amorfo se encuentran incrustados en las células bacterianas. Los óxidos *akaganeita* y *ferrihidrita* se encontraron sobre la superficie de exopolímeros bacterianos dentro de aguas de mina, esto indicaría que los exopolímeros actuarían como superficies para la nucleación de óxidos de hierro. Las reacciones bióticas responsables de la formación de óxidos de hierro biogénico incluyen la oxidación microbiana de Fe^{+2} a Fe^{+3} por un amplio rango de microorganismos dentro de condiciones óxicas y anòxicas y en ambientes con pH neutro y ácido (Fortín *et al.*, 2005).

La composición de los sedimentos en la Cuenca Milluni, muestra una composición mineralógica principalmente de origen litológico, cuenca arriba sectores de Pata Khota y Jankho Khota sus sedimentos se caracterizaron principalmente por minerales de silicato. Dentro del sector minero, presentaron minerales terciarios como ser Fe-oxihidróxidos y sulfatos amorfos como *geothita* y *jarosita*, los cuales se creen que sean producto de la intensa lixiviación. Los sedimentos de la parte baja de la cuenca, sector Milluni Grande fueron muy ricos en Fe-oxihidróxidos los mismos que presentaron una compleja mezcla constituida

principalmente de Fe-oxihidróxidos y minerales de silicato, los cuales se encuentran completamente sobrepuestos, estos minerales constituyen el fondo de los sedimentos de la laguna Milluni Grande (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005).

La formación de algunos óxidos de hierro ocurre como resultado de reacciones pasivas donde las condiciones químicas *in situ* favorecen la precipitación de los minerales sobre superficies biológicas, como ser paredes celulares bacterianas y material extracelular, estas reacciones son consideradas pasivas por que los microorganismos no obtienen energía del proceso de oxidación y nucleación, simplemente actúan como superficies. Los cambios del pH por efecto de la actividad metabólica microbiana y la producción de ciertos exudados pueden favorecer la formación de óxidos de hierro biótico (Fortín *et al.*, 2005 y Gadd *et al.*, 2004).

El proceso de tratamiento de drenajes mineros ácidos (DMA) se basa en la neutralización química y precipitación de hidróxidos metálicos, la desventaja de este tratamiento químico incluye el alto costo de los reactivos químicos, ineficiente remoción del sulfato y producción abundante de lodos activos (Glombitza *et al.*, 2000).

La precipitación de sulfuros metálicos ha demostrado tener mejores beneficios obteniéndose bajas concentraciones de metales en los efluentes. Se han desarrollado alternativas biológicas para el tratamiento de DMA, con la aplicación de la reducción de sulfato como el proceso dominante para el tratamiento de aguas ácidas, este proceso se encuentra basado en la producción biológica de sulfuro de hidrógeno y la neutralización del agua mediante el bicarbonato (HCO_3^-) que es producido durante el metabolismo microbiano (Kaksonen *et al.*, 2006 y Groudeva *et al.*, 2000).

4.1.4. CONSECUENCIA DE LA CONTAMINACIÓN POR DRENAJES MINEROS ÁCIDOS EN EL MEDIO AMBIENTE:

Los drenajes ácidos proporcionan las condiciones para que los metales pesados se disuelvan más fácilmente, entre estos metales destacan el cobre, hierro, aluminio, plomo, arsénico, cadmio, zinc, estaño, cobalto etc., que generalmente se encuentran en poca concentración.

Metales como el Fe, Mn, Cu, Zn etc., denominados elementos esenciales intervienen en procesos fisiológicos de diferentes organismos pero pueden ser tóxicos en elevadas concentraciones. Existen otros elementos denominados no esenciales como Pb, Cd, Hg etc., que son generalmente tóxicos. Los metales pesados están presentes habitualmente en la corteza terrestre, la explotación minera de zonas donde existen elevadas concentraciones de metales o de ciertos elementos químicos contribuye al aumento de la transferencia de estos metales al ambiente (Christensen *et al.*, 1996; Lyew *et al.*, 2000 y García *et al.*, 2001).

Los resultados de la contaminación por metales pesados pueden distinguirse por la presencia de suelo erosionado, pérdida de la cobertura vegetal y pérdida de la micro biota del suelo. El rol que juegan los microorganismos en la formación del suelo, establecimiento de plantas y transformación de la materia orgánica, constituye la base del ecosistema terrestre. La alteración del normal funcionamiento y la composición de las comunidades microbianas del suelo, provoca una disminución en la estabilidad ecológica. Los microorganismos de los suelos son por lo general muy sensibles a los cambios en el ambiente, lo que ocasiona la degradación de la comunidad microbiana seguida de una severa alteración del ecosistema (Mummey *et al.*, 2002).

El efecto de la contaminación por metales pesados puede afectar al ser humano, la acumulación en los tejidos causa riesgos en la formación de cáncer, alteraciones de los riñones, inhibición de algunas enzimas fundamentales en los procesos fisiológicos, daño pulmonar, afecciones al sistema nervioso central. Estos daños se presentan cuando los metales pesados son ingeridos de forma accidental mediante el agua o por medio de alimentos contaminados. La contaminación con Pb (plomo) afecta la síntesis de hemoglobina, al sistema nervioso central y periférico, produce el síndrome de Fanconi y Saturnismo, este mineral se deposita en el esqueleto óseo y tejidos. El Cd (cadmio) afecta al aparato digestivo, riñones,

huesos e inhibe algunos procesos enzimáticos. El Co (cobalto) produce diarrea, disminución de la presión sanguínea, disfunción hepática y renal. El Ni (níquel) inhibe la liberación de insulina, produce disnea, edema pulmonar, dermatitis y cáncer.

El impacto severo de la contaminación relacionada a la minería es alarmante se han reportado en varias regiones los efectos de dicha contaminación en el río Puyango en Ecuador, las colas de desmonte contienen altas concentraciones de cianuro, mercurio y otros metaloides (As). Las altas concentraciones de cianuro debido a su alta toxicidad en el río Calera devastaron la fauna de invertebrados por debajo de los 160 Kilómetros del distrito minero (Appleton *et al.*, 2000). Algo similar acontece en el río Amarillo en la misma región, donde la contaminación es mucho mayor no solo por cianuro, también por metales, la erosión de los colas y el uso de aguas en el proceso de molienda, en conjunto producen un efecto letal en la biota, causando una reducción notable en la biodiversidad acuática. Los pescadores de esta región reportan que disminuyó el número y tamaño de los peces. Antes de la actividad minera esta región contaba con 65 especies separadas de peces, actualmente el número es muy bajo (Tarras-Wahlberg *et al.*, 2001).

4.1.5. CONTAMINACIÓN MINERA EN BOLIVIA:

En Bolivia, los minerales han sido tradicionalmente explotados desde la época de la colonia, constituyendo el único referente internacional de la economía boliviana, particularmente de la zona occidental como Potosí, Oruro y La Paz que destacaron con importantes centros mineros como Huanuni, Llallagua, Siglo XX, Tipuani, Milluni y otros de la antigua minería nacionalizada. Bolivia fue el primer productor mundial de plata durante la colonia y el segundo productor mundial de estaño a mediados del siglo XX. Esta actividad ha generado varios problemas al medio ambiente una consecuencia directa de la explotación minera fue la formación de desechos mineros. En el pasado las exploraciones y operaciones mineras han ocasionado serios impactos al ambiente con efectos adversos tales como la erosión de los suelos y la contaminación de las aguas, en ese tiempo no se contaba con una legislación minera y ambiental previsoras, a causa de una larga demora gubernamental, es en 1997 que se aprobó la reglamentación ambiental para las actividades mineras. Antes de esta reglamentación las empresas mineras tenían el derecho de utilizar las aguas superficiales y subterráneas sin ningún cuidado (Guía Ambiental de Presas de Cola, 2001).

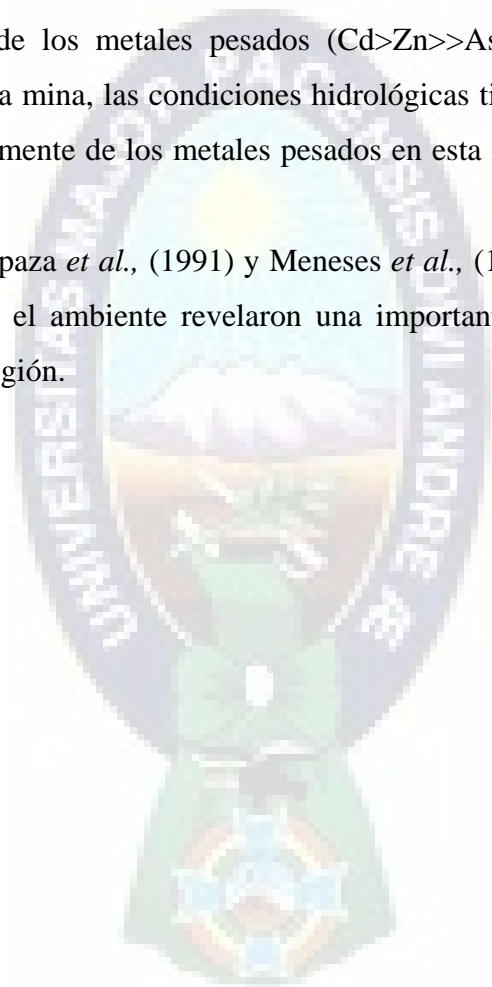
En La Paz una de las regiones de explotación de minerales, se encuentra ubicada en el valle de Milluni, la principal mina que se encontró en este lugar se llamaba “La Fabulosa”, que fue propiedad de COMSUR desde 1940 hasta los años 90, esta mina explotaba minerales de estaño empleando 500 mineros y la escuela del pueblo contaba con 400 alumnos. Durante más de 50 años se fue extrayendo el estaño que se encontraba contenido en el filón de la formación Catavi (Ríos *et al.*, 1985).

La empresa COMSUR tenía instalado un ingenio para rescatar el mineral, en su proceso de concentración la planta utilizaba aguas provenientes de los deshielos, los métodos utilizados para la recuperación del mineral fueron la concentración gravimétrica donde las rocas son trituradas y molidas separando la *casiterita* por su elevado peso, en esta etapa se utilizaba abundante agua, posteriormente se utilizó la concentración por flotación en este paso empleaban reactivos químicos que variaban las propiedades físicas de las partículas logrando separarlas del mineral, en este proceso también se empleaba agua. La planta explotaba mensualmente 9000 toneladas de mineral bruto dejando en su proceso de concentración

desechos minerales secos (colas de desmonte) y húmedos (pulpas) constituyendo el problema mas serio de contaminación en esta región, actualmente la mina se encuentra cerrada y el pueblo abandonado (Apaza *et al.*, 1991 y Raffailac *et al.*, 2002).

En la Cuenca Milluni, las concentraciones altas de los metales pesados exceden los valores normales para el consumo humano según la WHO (World Health Organization). Las condiciones muy ácidas resultado de la oxidación de sulfuros dentro los desechos mineros favorecen la disolución de los metales pesados (Cd>Zn>>As>>Cu-Ni>Pb>Sn) dentro las aguas corriente abajo de la mina, las condiciones hidrológicas tienen una alta influencia en el comportamiento principalmente de los metales pesados en esta región (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Apaza *et al.*, (1991) y Meneses *et al.*, (1997) sobre la influencia de la contaminación minera en el ambiente revelaron una importante alteración de la biota y la calidad del agua en esta región.



4.2. ROL DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS Y OTRAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN DESECHOS MINEROS:

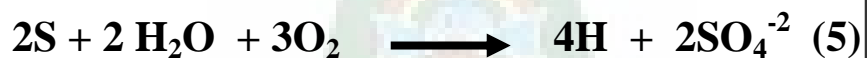
En los desechos mineros es importante la asociación de las BSR con otras comunidades bacterianas como las bacterias sulfuro oxidadoras (SOB), hierro oxidadoras (IOB) y hierro reductoras (IRB) que proveen iones sulfato a las BSR para su utilización en la respiración anaeróbica.

Entre los microorganismos que destacan en la oxidación de Fe^{+2} y H_2S se encuentran *Acidithiobacillus ferrooxidans* (comunmente llamado *Thiobacillus ferrooxidans*), *T. thioparus*, *A. Thiooxidans*, *Acidiphilium acidophilus*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Acidanus brierleyi*, que juegan un rol importante en la formación de DMA por su habilidad de oxidar ambos compuestos reducidos de hierro y azufre. Entre otros quimiolitótrofos que son importantes dentro los DMA se destacan igualmente los géneros *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y los poco frecuentes *Acidomicrobium*, que presentan especies donde la mayoría de ellos oxidan el Fe^{+2} , estos microorganismos son importantes contribuidores a la porción oxidativa del sulfuro terrestre y participan en los ciclos geoquímicos del Fe (Bond *et al.*, 2000a y Elberling *et al.*, 1999).

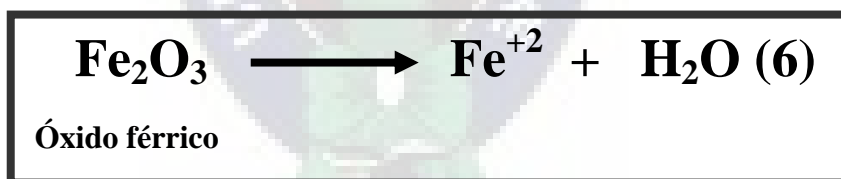
Las IOB y SOB habitan en ambientes extremadamente ácidos por esa razón se las considera acidófilas estrictas, en estos ambientes las IOB se encargan de oxidar el hierro ferroso (Fe^{+2}) a hierro férrico (Fe^{+3}), en ambientes ácidos la oxidación del Fe^{+2} es lenta y requiere la intervención bacteriana, en cambio el Fe^{+3} se encuentra soluble dentro de estas condiciones, las SOB se encargan de proporcionar un ambiente ácido mediante la oxidación del H_2S a SO_4^{-2} (ecuación 4). Ambas comunidades pueden oxidar tanto el Fe^{+2} como el H_2S (Rogers *et al.*, 2003).

Las SOB e IOB ambas predominan más en zonas con activa oxidación de minerales sulfurados como la *pirita*, se estima que la oxidación bacteriana es mayor a la oxidación abiótica. La oxidación de la *pirita* se encuentra limitada por el acceso del Fe^{+3} dentro de valores de pH menores a 3. La oxidación inorgánica de Fe^{+2} es lenta y los organismos acidófilos pueden mediar la producción de hierro férrico (Fe^{+3}) y conservar energía a partir de este proceso (ecuación 4) (Bond *et al.*, 2000b).

No es sorprendente que la oxidación de *pirita* se encuentre incrementado en presencia de especies de bacterias hierro-oxidadoras como *Leptospirillum ferrooxidans* que aceleran la producción ácida y la solubilización de los metales en el ambiente por la oxidación de Fe^{+2} . *Acidithiobacillus ferrooxidans* podría oxidar compuestos de sulfuro reducido por esa razón este tipo de bacteria son denominadas bacterias sulfuro oxidadoras (SOB) (ecuación 5) pero también pueden oxidar Fe^{+2} , este paso se realiza en colaboración con las IOB (Bayard *et al.*, 2006).



El acceso a los elementos traza puede ser altamente dependiente de los procesos de oxidoreducción de especies de hierro, la contribución de un grupo de bacterias denominadas hierro reductoras (IRB) en el ciclo geoquímico del hierro permite la reducción microbiana de Fe^{+3} a Fe^{+2} . Las consideraciones termodinámicas indican que la oxidación de compuestos orgánicos y la participación de Fe^{+3} como aceptor terminal de electrones podría generar más energía que el empleo de compuestos como SO_4^{-2} o CO_2 . Las IRB pueden competir con las BSR y las metanógenas por limitados donadores de electrones. En sedimentos de agua dulce el Fe^{+3} está presente como hidróxidos y óxidos férricos insolubles, la reducción del Fe^{+3} podría ser una estrategia competitiva de respiración, así las IRB pueden ser responsables indirectas para la movilización de elementos trazas dentro de suelos, rocas y sedimentos ricos en óxidos de hierro cuya reducción conduce a la producción de hierro ferroso. La reducción bacteriana de Fe^{+3} puede conducir a su solubilización, que constituye un importante proceso geoquímico (ecuación 6) (Cummings *et al.*, 1999; Lloyd *et al.*, 2003; Haveman *et al.*, 2001 y Madigan *et al.*, 1999).



El mecanismo de reducción del Fe^{+3} puede estar dado por dos vías mediante las cuales la célula bacteriana se encuentra adherida al óxido férrico, de donde transfiere electrones del Fe^{+3} al compuesto orgánico presente en el medio, otro mecanismo es mediante lanzadera de electrones al medio extracelular los cuales interactúan con los óxidos de Fe^{+3} y promueven su reducción (Fig. 1). Entre los microorganismos que obtienen energía para su desarrollo mediante la reducción de Fe^{+3} se tiene a *Shewanella oneidensis*, *Geobacter metallireducens*, *Geobacter sulfurreducens*, *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa* y *Pelobacter* (Lloyd *et al.*, 2003).

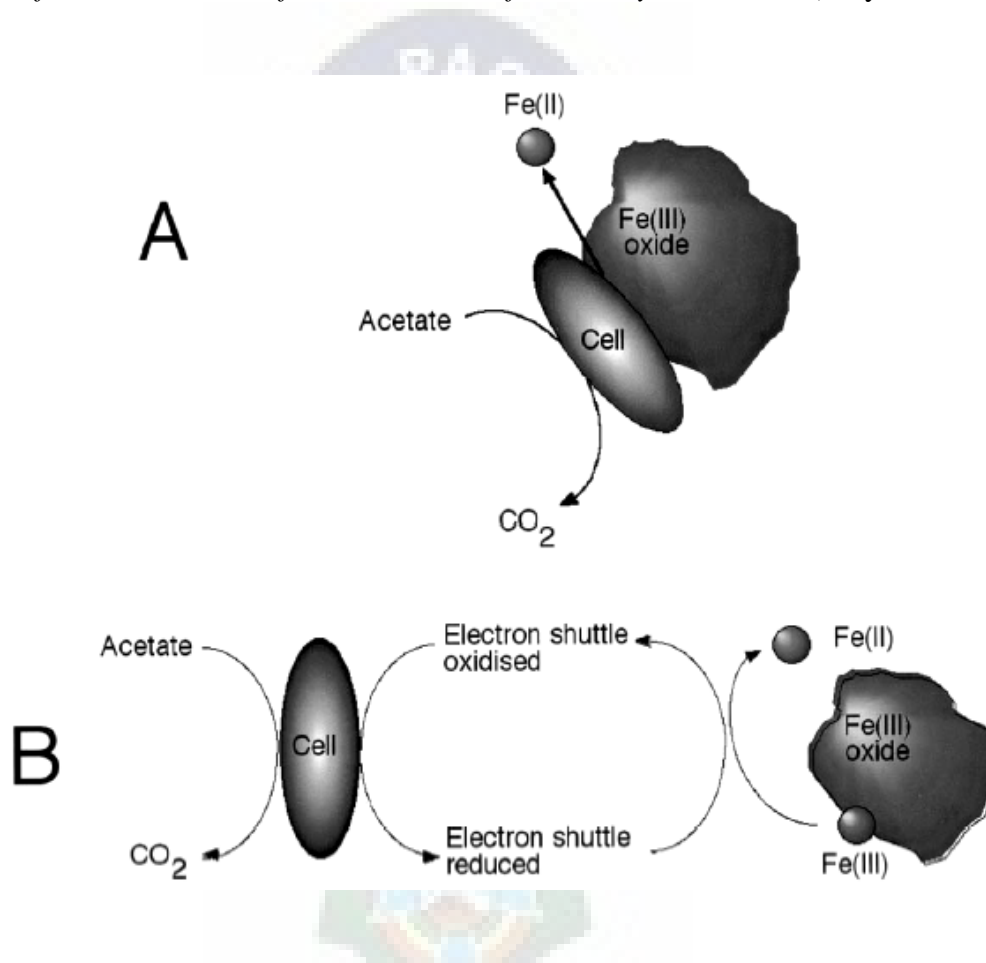
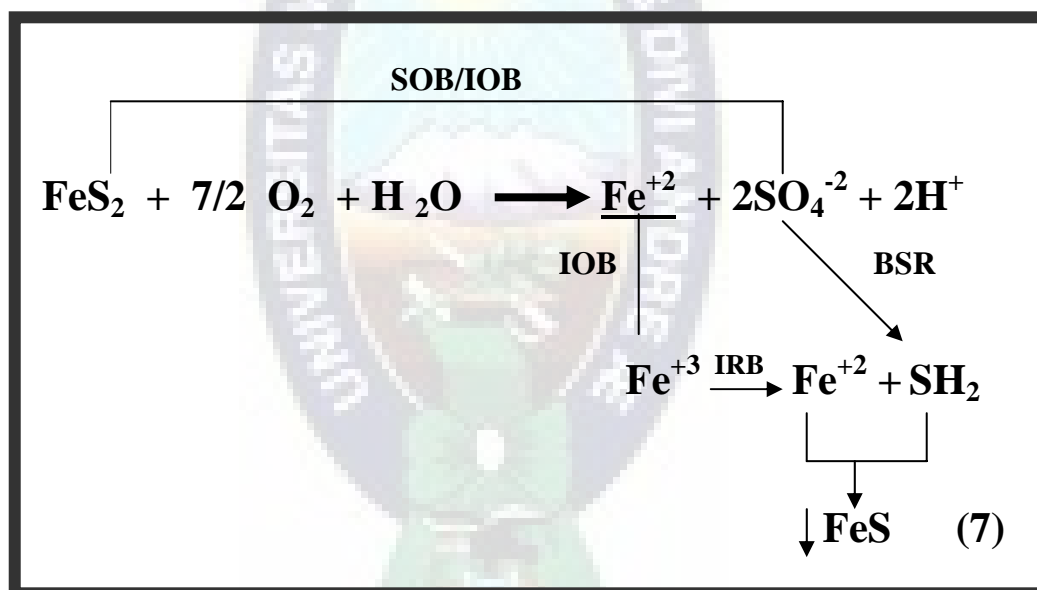


Figura 1. Mecanismo de la reducción de óxidos insolubles de Fe^{+3} mediante dos vías:
A= Contacto directo con la superficie de la célula.
B= Mediante lanzadera de electrones al nivel extracelular
(Lloyd *et al.*, 2003).

Las interacciones que existen entre SOB, IOB, IRB y las BSR se resumen en la ecuación 7, el SO_4^{-2} producido por las SOB e IOB proporcionan las condiciones ácidas por un proceso de oxidación biológica (Gubert *et al.*, 2004), donde el Fe^{+2} es oxidado hasta Fe^{+3} el cual posteriormente es reducido por acción de las IRB hasta Fe^{+2} . Las BSR por la reducción de SO_4^{-2} da lugar a la formación de H_2S que se combina con el Fe^{+2} y lo precipita como sulfuro ferroso (FeS) insoluble (Benner *et al.*, 1999). Para los organismos heterótrofos como las BSR si no existiera este tipo de colaboración en estos ambientes extremos donde existe ausencia de materia orgánica sería imposible tolerar estas condiciones (Brierley *et al.*, 1997 y Rogers *et al.*, 2003).

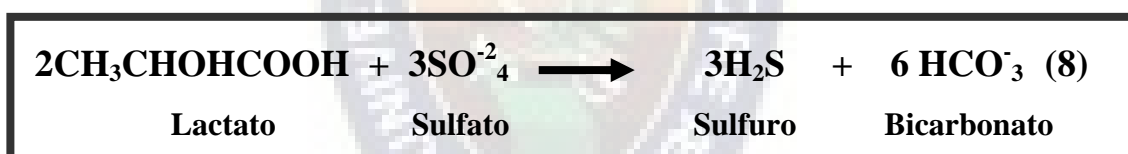


Numerosos metales son tóxicos para las BSR, las elevadas concentraciones de metales pesados pueden desactivar enzimas al reaccionar con grupos funcionales, competir con cofactores esenciales y desnaturalizar proteínas. La habilidad de estas bacterias de inmobilizar metales pesados depende de la concentración del metal en solución, el cual puede causar una reducción dentro de la actividad metabólica o puede ser tóxico para la bacteria causándole la muerte, es importante conocer el efecto inhibitorio de los metales sobre las BSR para utilizar estos microorganismos dentro de procesos de tratamiento en la reducción de metales, se cree que la concentración tóxica de metales en las BSR se encuentra en un rango mayor a 100 ppm (Cabrera *et al.*, 2005).

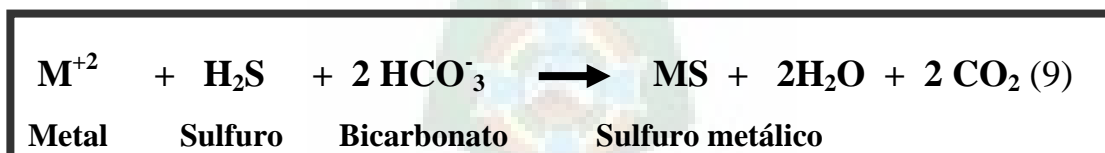
Las bacterias sulfato reductoras son el único grupo de procariotas con la habilidad de conservar energía por la reducción desasimilatoria de SO_4^{2-} a H_2S , dentro de ambientes anóxicos. Algunos BSR, como por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans*, pueden acoplar la oxidación de H_2 o simples ácidos orgánicos con la reducción de metales; las BSR pueden conservar energía a lo largo de la reducción del metal y son capaces de crecer con metales como por ejemplo Cr^{+6} , Mn^{+4} , Fe^{+3} y U^{+6} como aceptores terminales de electrones (Lloyd *et al.*, 2000).

Es necesario destacar que mientras las BSR reducen el SO_4^{2-} , al mismo tiempo pueden llevar a cabo la oxidación de los electrones que provienen de las fuentes de carbono como por ejemplo lactato; por medio de esta reacción de oxido-reducción es posible, producir bicarbonato (HCO_3^-) neutralizando de esta manera la acidez del medio (Bhagat *et al.*, 2004; Gadd *et al.*, 2004; Elliott *et al.*, 1998; Christensen *et al.*, 1996 y Cohen *et al.*, 2004).

La reacción química de este proceso es la siguiente (ecuación 8):



Esta ecuación (9) general describe la reacción entre el sulfuro de hidrógeno y los iones metálicos removidos.



Con estas reacciones se evidencia el papel importante que juegan las BSR en procesos de biorremediación de drenajes provenientes de minas, empleándolas en biorreactores para la precipitación de metales pesados provenientes de la contaminación minera, así como en la generación de alcalinidad y restauración del pH a valores más neutros (Elliott *et al.*, 1998; Benner *et al.*, 1999; Lyew *et al.*, 2000 y Foucher *et al.*, 2001).

4.2.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (BSR):

Las BSR son un grupo de bacterias que habitan dentro de condiciones estrictamente anaerobias son microorganismos heterótrofos, que se caracterizan por utilizar el sulfato que es la forma más oxidada del azufre, el cual se constituye como uno de los aniones mayoritarios del agua del mar y es usado como último aceptor de electrones dentro de la respiración anaeróbica. Sin embargo, algunas especies de BSR como por ejemplo *Desulfovibrio aerotolerans* y *Desulfovibrio vulgaris* pueden tolerar la presencia de oxígeno, aunque esto ocasione la inhibición de algunas enzimas oxígeno sensibles como la encargada de activar al sulfato para que ingrese dentro de la célula, así como generar cambios en las proteínas como consecuencia de las condiciones oxidativas (Fournier *et al.*, 2005). Para evitar este tipo de efectos las BSR han desarrollado mecanismos de defensa como la presencia de catalasa y superóxido dismutasa dependiente de NADH, las cuales tienen la función de eliminar los radicales libres que surgen de la reducción incompleta del oxígeno (Mogensen *et al.*, 2005).

El producto final de la reducción del sulfato (SO_4^{2-}) por las BSR es el sulfuro de hidrógeno (H_2S) que es uno de los mayores estados del azufre en la naturaleza dentro de sistemas acuáticos. Las BSR son el único grupo de procariontes con la habilidad común de conservar energía por la reducción desasimilatoria del sulfato a sulfuro de hidrógeno dentro de ambientes anóxicos (Chang *et al.*, 2005).

Es importante distinguir la reducción asimilatoria y desasimilatoria del SO_4^{2-} , en la primera el sulfuro de hidrógeno formado se convierte inmediatamente en azufre orgánico, el cual es utilizado para la biosíntesis de aminoácidos. En cambio en el proceso de desasimilación, el H_2S formado es eliminado al exterior en forma de gas (Fig. 2).



Figura 2. Esquema de la reducción asimilatoria y desasimilatoria del Sulfato

La reducción de SO_4^{2-} a H_2S , da como resultado la reducción de ocho electrones, que ocurren mediante fases intermedias (ecuación 10). Debido a la disposición especial en la membrana de los componentes del sistema de transporte de electrones, cuando los átomos de H_2 se oxidan, los protones permanecen (H^+) fuera, mientras que los electrones se transfieren a través de la membrana, esto crea un gradiente o fuerza motriz de protones que puede ser usada por las BSR para la síntesis de ATP dentro del citoplasma, en cambio los electrones son usados para la reducción de la enzima adenosina fosfosulfato (APS) y el sulfito (Fig. 3) (Madigan *et al.*, 1999).

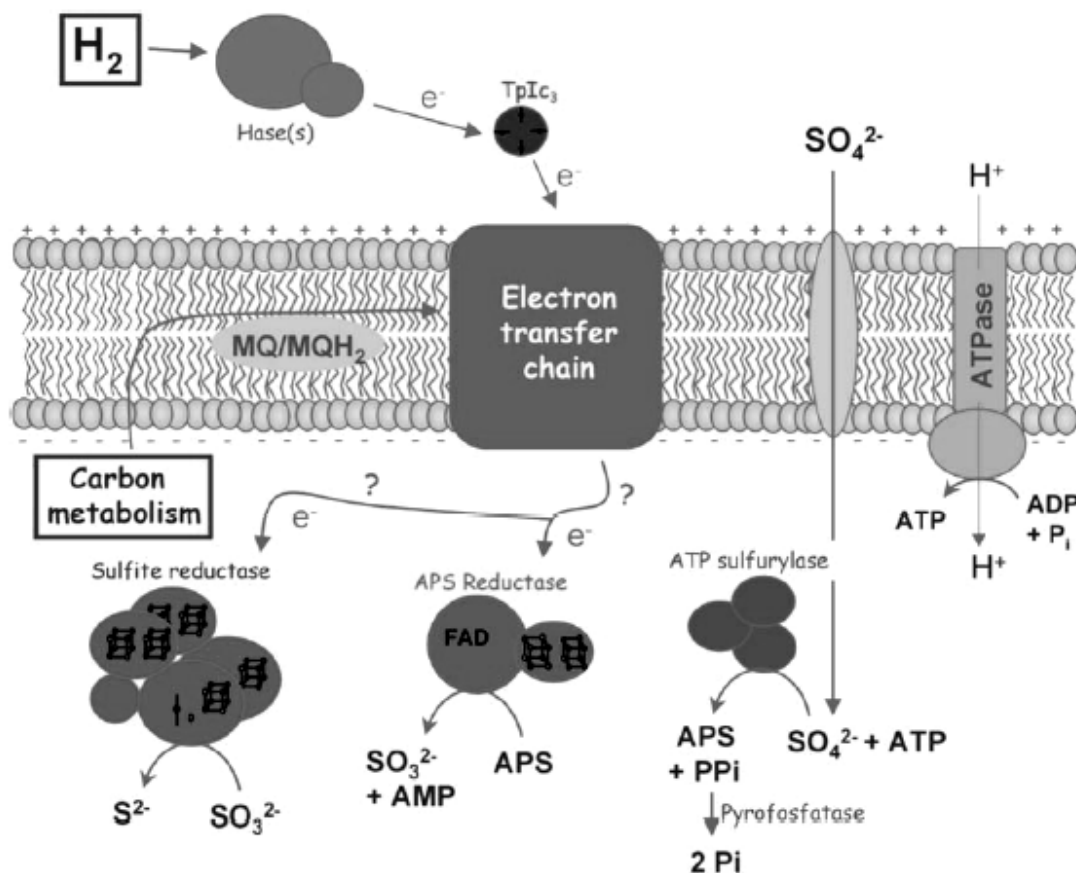
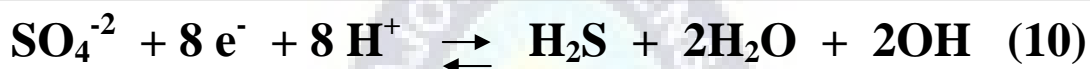


Figura 3. Representación esquemática de la cadena respiratoria de transferencia de electrones en *Desulfovibrio*, con hidrógeno o compuestos orgánicos como fuente de energía y sulfato como último receptor terminal de electrones (Matías *et al.*, 2004).

El sulfato es un compuesto muy estable con un bajo potencial redox y tiene que ser activado antes de su reducción. Antes de ser transportado dentro la célula, el sulfato reacciona con el ATP para formar adenosina fosfosulfato (APS), una reacción que es catalizada por la ATP sulfurilasa. El APS es el primer aceptor de electrones para la cadena respiratoria y es reducido por la APS reductasa a sulfito, el cual es subsecuentemente reducido por la sulfito reductasa desasimilatoria, el sulfito es probablemente reducido directamente a sulfuro dentro de una reducción de seis electrones. Los componentes de la cadena de transporte de electrones que se encuentran asociados con la conservación de energía, no fueron identificados. La reductasa terminal de las BSR se encuentra localizado en el citoplasma y no esta directamente involucrada en la generación del potencial electroquímico de transmembrana para la generación de ATP (Matías *et al.*, 2005).

Cuando las bacterias sulfato reductoras crecen con H_2/SO_4^{-2} , crecen quimiolitotróficamente, en estas condiciones algunas especies pueden incluso crecer autotróficamente usando CO_2 como única fuente de carbono. Sin embargo, la mayor parte de las bacterias sulfato reductoras son quimioorganótrofas y usan varios compuestos orgánicos como donadores de electrones como ser ácidos grasos volátiles (acetato, propionato, butirato), lactato, piruvato, malato (Gong *et al.*, 1997) o productos fermentativos como etanol y metanol, así mismo las BSR son incapaces de utilizar polímeros como la celulosa y hemicelulosa como fuentes alternativas de carbono. La influencia de la materia orgánica sobre la reducción de sulfato es determinante dentro los sistemas naturales especialmente para el tratamiento de drenajes mineros ácidos (Pallud *et al.*, 2005 y Zagury *et al.*, 2006).

Algunas BSR pueden acoplar la oxidación del hidrógeno o simples ácidos orgánicos con la reducción de metales en lugar del sulfato, en estudios efectuados por Lloyd *et al.*, (2000) y Sani *et al.*, (2004), se pudo determinar que *Desulfotomaculum reducens* fue la única especie de BSR que pudo conservar energía por la reducción de metales. Este microorganismo fue aislado a partir de sedimentos contaminados con metales pesados y mostró capacidad de desarrollar en presencia de Cr^{+6} , Mn^{+4} , Fe^{+3} y U^{+6} como aceptores de electrones. La reducción del metal da lugar a la precipitación con su menor valencia. Esta capacidad microbiana se ha propuesto como una alternativa para el tratamiento de aguas contaminadas con metales

pesados y radionucleidos. La enzimología de la reducción de metales por las BSR es escasamente comprendida, pero se sabe que la reducción de Cr^{+6} y U^{+6} por *Desulfovibrio vulgaris* requiere una hidrogenasa para la generación de electrones que son transportados por el citocromo *c3*.

La ecología microbiana de ambientes contaminados por la minería ha demostrado una considerable diversidad metabólica dentro de poblaciones bacterianas. Muchas de estas bacterias catalizan específicamente reacciones de oxidación-reducción que alteran la movilidad de metales pesados. La geoquímica de estos ambientes sugiere que pueda existir una compleja comunidad microbiana. Las colas de desmonte contienen altas cantidades de hidróxidos de hierro y manganeso, algunos microorganismos utilizan estos compuestos como aceptores terminales de electrones en su proceso respiratorio. Estos organismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y juegan el mayor rol dentro del ciclo mineral dentro de ambientes acuáticos y sedimentarios. La reducción de sulfato a sulfuro por las BSR es un proceso anaeróbico que puede afectar el transporte de metales, la producción de sulfuro durante la sulfato reducción puede rápidamente reaccionar con metales solubles para inmovilizarlos en forma de sulfuros metálicos insolubles (Weilinga *et al.*, 1999).

4.3. DIVERSIDAD MICROBIANA EN AMBIENTES MINEROS:

El análisis de las comunidades microbianas que habitan sitios mineros de extrema acidez muestra que existen una amplia diversidad de microorganismos heterotróficos y autotróficos cuyas identidades y funciones son aún desconocidas (Brierley *et al.*, 1997). Los factores ambientales, físico-químicos, geoquímicos, el acceso a donadores y aceptores de electrones, la elevada concentración de metales pesados, constituyen los factores primarios que cambian la composición de las comunidades microbianas en estos ambientes (Bond *et al.*, 2000a).

Dentro la oxidación química y microbiana de Fe^{+2} a Fe^{+3} y la formación de óxidos que depende del pH y la concentración de oxígeno se encuentran involucradas grupos de *Gallionella* y *Leptothrix* que son los microorganismos mas observados en asociación con óxidos de hierro biogénico dentro de ambientes con pH neutro, estas son consideradas bacterias microaerófilas las cuales compiten con la oxidación abiótica del Fe^{+2} dentro la naturaleza (Fortín *et al.*, 2005).

Otros microorganismos que presentaron capacidad de catalizar la oxidación de sulfuros metálicos son *Metallosphaera sp.*, *Sulfolobus sp.* y *Acidianus sp.*, que pueden oxidar iones de Fe^{+2} y reducir compuestos de sulfuro. También se evidenciaron la presencia de bacterias mesofilas acidófilas y acidófilas moderadas entre estas se encuentran los grupos *Thiobacillus intermedius*, *T. novellus*, *T. neopolitanus*. Así mismo se observó la presencia de microorganismos quimioorganótrofos, amonio y nitrito oxidadores, así como bacterias reductoras de nitrato y manganeso (Mn^{+4}). La diversidad de microorganismos en estos ambientes es muy amplia, observándose que muchos de ellos tienen la capacidad de realizar la oxido-reducción de Fe^{+2} y H_2S (ver tabla 1) (Schippers *et al.*, 1996, Ledin *et al.*, 1996 y Johnson *et al.*, 2003).

Dentro de los microorganismos que se encargan de reducir el Fe^{+3} acoplado a la oxidación de la materia orgánica, se ha visto que algunas bacterias reducen el Fe^{+3} por un proceso natural y en otras es un proceso inducido. Entre las especies que destacan en la reducción de Fe^{+3} se tienen: *Geobacter sp.* (anaerobia estricta), *Pantoea agglomerans*, *Shewanella sp.* (anaerobia facultativa) y *Aeromonas sp.* (Scala *et al.*, 2006 y Haveman *et al.*, 2001).

En las colas de desmonte las metanógenas son inhibidas por los metales pesados y la acidez del medio, sin embargo se ha visto que pueden desarrollarse en cultivos en presencia de elevadas concentraciones de metales junto con bacterias sulfato reductoras, actuando ambas en un proceso simbiótico (Mori *et al.*, 2000).

Si bien se conoce una diversidad de procariotas dentro de los DMA, existen otros grupos denominados OTU cuya traducción del inglés es unidades operativas taxonómicas (operational taxonomic units), que comprenden a bacterias de las cuales se desconoce su relación filogenética (Bohannon *et al.*, 2003).

Así en ambientes de DMA (Okabyashi *et al.*, 2005) en un estudio realizado mediante el análisis del gen 16S RNAr respecto a las poblaciones microbianas se identificó dentro de un grupo de 284 clones, 133 OTU, que presentaron agrupaciones con los géneros *Verrucomicrobia*, *Chloribi*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae* y *Beta-Proteobacteria*.

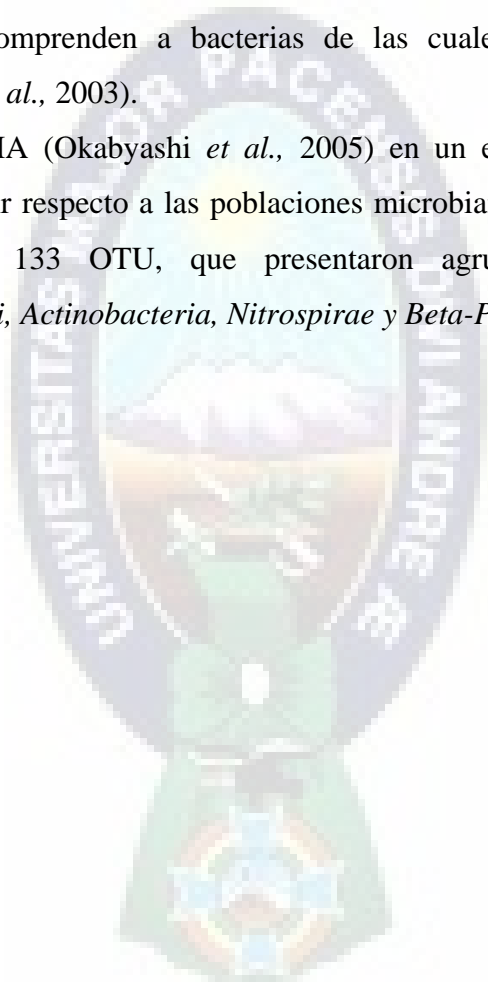


Tabla 1. Microorganismos Procariotas Àcidofilos
Coadaptado de Johnson *et al.*, 2003

Microorganismos Àcidofilos	Características térmicas*	Afiliación filogenética
<u>1. Hierro-oxidadores</u>		
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	mesófilo	<i>Nitrospira</i>
<i>L. ferriphilum</i>	mesófilo	<i>Nitrospira</i>
<i>L. thermoferrooxidans</i>	moderado	<i>Nitrospira</i>
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	mesófilo	<i>B-Proteobacteria</i>
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	mesófilo	<i>Actinobacteria</i>
<i>Ferroplana acidiphilum</i>	mesófilo	<i>Thermoplasmales</i>
<i>Fp. Acidarmanus</i>	mesófilo	<i>Thermoplasmales</i>
<u>2. Sulfuro-oxidadores</u>		
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	mesófilo	<i>B/Delta Proteobacteria</i>
<i>At. Caldus</i>	moderado	<i>B/ Delta Proteobacteria</i>
<i>Thiomonas cuprina</i>	mesófilo	<i>B- Prioteobacteria</i>
<i>Hydrogenobacter acidophilus</i>	moderado	<i>Aquificales**</i>
<i>Metallosphaera spp.</i>	extremo	<i>Sulfolobales</i>
<i>Sulfolobus spp.</i>	extremo	<i>Sulfolobales</i>
<u>3. Hierro-sulfuro-oxidadores</u>		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	mesófilo	<i>B/ Delta Proteobacteria</i>
<i>Acidianus spp.</i>	extremo	<i>Sulfolobales</i>
<i>Sulfolobus metallicus</i>	extremo	<i>Sulfolobales</i>
<u>4. Hierro-reductores</u>		
<i>Acidiphilium spp.</i>	mesófilo	<i>Alfa-Proteobacteria</i>
<u>5. Hierro –oxidadores/reductores</u>		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	mesófilo	<i>Actinobacteria</i>
<u>6. Hierro-oxidadores/reductores y sulfuro oxidadores</u>		
<i>Sulfobacillus spp.</i>	mesófilo y moderado	<i>Firmicutes</i>

*Mesófilos (temperatura optima < 40°C), moderado termófilo (temperatura optima 40- 60°C), extremo termófilo (temperatura optima >60°C).

** Habilidad de oxidar minerales por la producción de ácido sulfúrico.

4.4. TÉCNICAS MOLECULARES EMPLEADAS PARA EL ESTUDIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS DENTRO DE AMBIENTES MINEROS:

La aplicación de métodos de biología molecular para investigar la presencia y distribución de bacterias dentro del ambiente tiene la ventaja de proveer directa información sobre la estructura de las comunidades presentes (Daly *et al.* 2000).

La información de la secuencia del DNA obtenida a partir de muestras de suelo contribuye a nuestra visión sobre la diversidad bacteriana dentro de ambientes contaminados, pero estos métodos de extracción de DNA y el empleo del PCR que utilizan sondas específicas para identificar diversidad microbiana en estos ambientes, no son métodos cuantitativos (Paul *et al.*, 2005; Weinbauer *et al.*, 2001; Rossello-Mora *et al.*, 2000).

Para cuantificar las poblaciones de BSR en desechos mineros se recurre al empleo del 16S RNAr por su alto rango de secuencias conservadas y el análisis de la secuencias de la sulfito reductasa desasimilatoria para obtener evidencia de la diversidad y distribución de microorganismos relacionados con la sulfato reducción en estos ambientes (Nakagawa *et al.*, 2002).

El método de Electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización (DGGE) permite analizar comunidades bacterianas en diferentes ambientes, permite separar los fragmentos de DNA de un mismo tamaño pero de diferente secuencia, este método no solo permite la identificación de las bacterias, sino también la cuantificación relativa de los mismos, los perfiles pueden ser utilizados en métodos estadísticos, frecuencias y proporciones relativas. Dentro del estudio de BSR esta técnica es muy utilizada con el gen *dsrB*, que ayuda a revelar una amplia diversidad genética de diferentes sub-grupos, géneros y especies de BSR que participan en la precipitación de metales pesados *in situ* (Geets *et al.*, 2005).

Asi mismo la hibridización fluorescente *in situ* se utilizó para evaluar la abundancia y distribución de bacterias acidófilas, archeas y eucarias dentro de un ambiente de DMA en función a la geoquímica y condiciones ambientales (Edwards *et al.*, 1999; Purdy *et al.*, 1997 y Zheng *et al.*, 1996).

Siguiendo la secuencia del gen del 16S RNAr, pueden construirse árboles filogenéticos que muestren la composición en especies de la comunidad microbiana. La aplicación de estos métodos al análisis de las comunidades microbianas ha dado resultados interesantes dentro de ambientes contaminados por la actividad minera (Nakagawa *et al.*, 2002), actualmente se está empleando la técnica del T-RFLP, para comparar la diversidad y estructuras de comunidades microbianas dentro de una variedad de sitios naturales (Scala *et al.*, 2006).

Estos métodos proporcionan información sobre la distribución *in situ* y la actividad de múltiples grupos microbianos obtenidos en una pequeña cantidad de muestra, estas técnicas pueden aplicarse para el estudio de comunidades dentro de sedimentos donde diferentes especies se encuentran presentes y la composición química y microbiológica de las poblaciones pueden cambiar en escalas de milímetros o centímetros (MacGregor *et al.* 2001).



5. METODOLOGÍA:

5.1. ÁREA DE ESTUDIO:

El estudio que se ha realizado, está enmarcado dentro del complejo fluvio lacustre en un valle glaciar de la Cordillera Real de la zona de Milluni, representado por una serie de cinco lagunas (Fig. 5). La Cuenca Milluni se encuentra ubicada a 30 Km. de la ciudad de La Paz al Norte de la provincia Murillo, cantón Achocalla. En la carta geográfica del Instituto Geográfico Militar se encuentra de $16^{\circ}08'$ a $16^{\circ}10'$ latitud sur y de $68^{\circ}17'$ a $68^{\circ}21'$ longitud oeste, situada entre 4500 y 4700 metros sobre el nivel del mar, el fondo del valle tiene una extensión de 1 Km. aproximadamente, tiene varias lagunas de morrenas, más o menos acondicionadas (Apaza Chávez *et al.*, 1991; Raffaillac *et al.*, 2002).

Las cinco lagunas de la Cuenca Milluni se encuentran ubicadas a las faldas del glaciar del Huayna Potosí, encontrándose en dirección de Norte a Sur las lagunas Pata Khota (PK), Jankho Khota (JK), Milluni Chico (MCH) y Milluni Grande (MG). Presenta una laguna ubicada en la parte Este que abastece de agua a la cuenca representado por la laguna Ventanani (V) (Fig. 5).

Esta región se caracterizó por la presencia de vegetación constituida por turberas en los sitios húmedos, en este estudio se evaluó la turbera ubicada a la salida de la represa de Milluni Grande que se encuentra a 4479 m.s.n.m. denominada Turbera Milluni Grande Salida (TMGS) (Fig. 4).



Figura 4. Turbera Milluni Grande salida (TMGS)

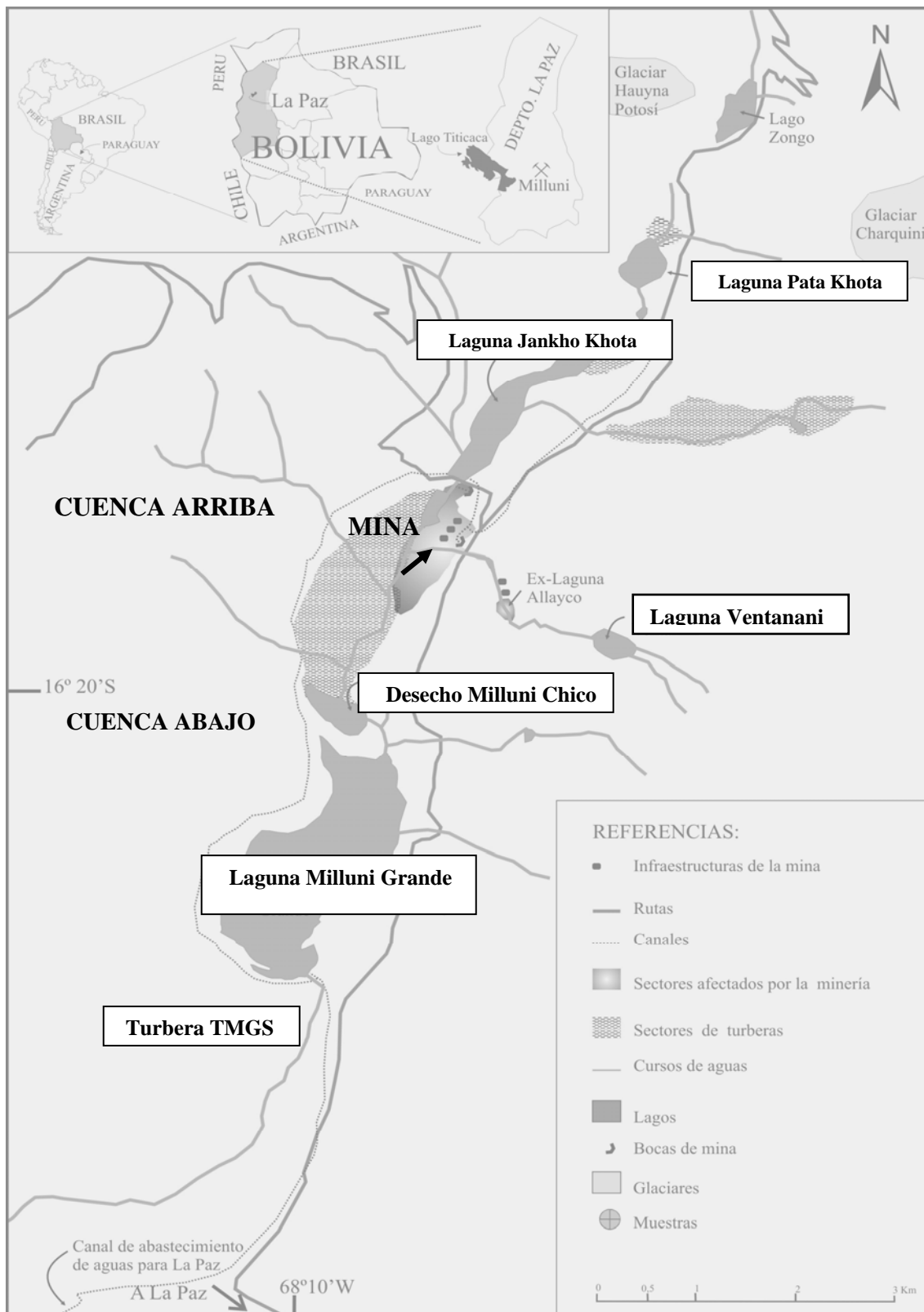


Figura 5. Mapa Cuenca Milluni y lagunas de estudio.
(Coadaptado de Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005)

5.1.1. LAGUNA PATA KHOTA (PK):

Se encuentra a 4665 metros sobre el nivel del mar entre S16.29753 O68.13273, presenta una forma circular con una superficie de 17 hectáreas con una profundidad máxima de 11 metros, sus principales fuentes de agua provienen del deshielo del glaciar Huayna Potosí situado al noroeste, el agua de la laguna es cristalina y tiene un pH dentro de la neutralidad no está afectada por la contaminación, su temperatura fluctúa entre 12.6 y 3.2°C (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2003).

5.1.2. LAGUNA JANKHO KHOTA (JK):

Al descender del valle se encuentra la laguna Jankho Khota a una altitud de 4600 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), entre S16.31551, O68.14337, presenta una forma oblonga con una superficie de 1,8 Km., esta laguna es bastante larga y su profundidad máxima es de 9 metros; las fuentes de agua de esta laguna son variables, los cursos de agua que la alimentan varían frecuentemente según la estación del año y las condiciones climáticas, reciben afluentes de la laguna Pata Khota y presenta una similar temperatura a la laguna Pata Khota que se encuentra situada más arriba, el pH varía entre 7.4 – 6.6 (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2003). Esta laguna se encuentra parcialmente contaminada, debido a un afluente de la mina que desemboca en la parte sur donde existe un canal lateral denominado “by pass”, que fue construido por la empresa de agua potable SAMAPA, el objetivo de este canal es transportar agua sin contaminación hacia la salida del sistema Milluni donde llega a mezclarse con las aguas de la laguna Milluni Grande (Apaza *et al.*, 1991 y Raffailac *et al.*, 2002).

5.1.3. LAGUNA VENTANANI (V):

Se encuentra a 4780 m.s.n.m., es una pequeña laguna de forma circular, con una superficie menor a 17 hectáreas, con una profundidad mayor a 17 m., las fuentes de agua que alimentan esta laguna provienen del glaciar Charquini. A diferencia de las lagunas Pata Khota y Jankho Khota, esta laguna no presenta vegetación; tiene un pH estable durante todo el año de 4.9, no presenta contaminación por la actividad minera. Su temperatura fluctúa entre 13°C-20,7°C (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2003).

5.1.4. DESECHO MINERO MILLUNI CHICO (MCH):

Esta situada a 4585 m.s.n.m. presenta una forma triangular con una superficie mayor a 20 metros, que presenta una enorme cantidad de desechos mineros que se encuentran depositados en este sector, provenientes de la mina Milluni, los desechos se encuentran dispersos sobre una superficie de 4 Km. de largo, convirtiéndose en un sedimentador artificial y su capacidad de embalse es despreciable, en este sector se encuentran también, depositados los minerales de explotación como ser: Casiterita (SnO_2), Siderita ($\text{FeCO}_3\text{H}_2\text{O}$), Pirita (FeS_2), Blenda ((Zn Fe)S), Cuarzo (SiO_4), Arsenopirita (Fe AsS), Marcasita, Pyrrotita (FeS), Galena (PbS), Wolframita (MnFeZnWO_4), Etanita ($\text{Cu}_2\text{FeSnS}_4$), Hematina ($\text{FeO}_2\text{H}_2\text{O}$), Apatita (CaPSiO_4), Calcopirita (sulfuro de Cu-Fe), Esfalerita (sulfuro de Zn) (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2003).

Este sitio es una fuente importante de producción de drenajes ácidos presenta un pH ácido entre 2.8-2.4, la principal fuente de agua del sector de Milluni Chico proviene de la Laguna Jankho Khota y Ventanani la cual atraviesa el sector minero de Allaico y llega a la mina con un pH de 4.6 y 3.8. El desecho minero MCH en época de lluvia se encuentra totalmente cubierta de agua formando una pequeña laguna, es la época en la cual la producción de drenajes ácidos es mayor, en cambio en invierno (época seca) se encuentra seca constituyéndose en un desecho de colas de desmonte (Meneses *et al.*, 1997).

5.1.5. LAGUNA MILLUNI GRANDE (MG):

Se encuentra a la salida del valle de Milluni a $16^\circ 21' \text{ S}$ - $68^\circ 10' \text{ W}$, ubicada a 4565 m.s.n.m., con una superficie de 237 hectáreas con una profundidad máxima de 8,6 metros. La laguna recibe los desechos sedimentarios principalmente de la laguna Milluni Chico, sus otras fuentes de agua provienen de la rivera izquierda del valle, los cursos de agua se encuentran en contacto con muchas actividades mineras pequeñas que explotan artesanalmente la casiterita (SnO_2), esta laguna se alimenta por un curso de agua permanente que nace en la laguna Churuimani, las otras fuentes de agua permanentes son de origen subterráneo.

El pH del agua oscila entre 3 y 2.7 su temperatura entre 10.2 y 4.9°C el color del agua es rojo-anaranjado. Esta laguna presenta en la parte norte un sector por donde ingresan los desechos provenientes de la mina Milluni (Raffaillac *et al.*, 2002 y Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2003).

5.2. COLECTA DE LAS MUESTRAS:

Se realizó la colecta de muestras en el mes de Agosto del 2003, cada punto de muestreo fue tomado manualmente con un saca testigos de 1.20 m., equipado con tubos de policarbonato, las muestras fueron recuperadas cada centímetro para establecer un perfil sedimentario de cada laguna (PK, JK, V, MCH, MG) y de la turbera (TMGS).

La manipulación de las muestras fue realizada con material de plástico, previamente lavado con ácido clorhídrico al 10% y agua Milli-Q, este proceso fue necesario para el análisis geoquímico y fueron irradiados con luz UV para el análisis molecular.

Para la toma de la muestra, fue necesario buscar sitios con poca profundidad, para obtener una muestra representativa, la altura de los perfiles sedimentarios varía en cada punto (Tabla 1), las muestras fueron inmediatamente refrigeradas a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Tabla 2. Altura de los sedimentos.

Laguna	Altura cm.
PK	52.5
JK	61
V	46
MCH	71.5
MG	51
TMGS	128

PK= laguna Pata Khota

JK = laguna Jankho Khota, V= laguna Ventanani, MCH =Desecho minero Milluni Chico

MG = laguna Milluni grande; TMGS = Turbera Milluni Grande salida.

5.3. MEDICIONES FÍSICO-QUÍMICAS (pH y Eh):

Los perfiles de Eh fueron medidos directamente en los sedimentos dentro del tubo por intervalos de 1 cm., gracias al uso de pequeños orificios. Las mediciones de Eh se realizaron mediante microsondas de platino con un electrodo de referencia (Ag/AgCl₂) y un Eh-metro “Consort”, calibrado con una solución patrón de + 220 mV.

Cada sub-muestra de 1 cm. de espesor fue colectado en tubos de plástico cónicos y estériles, posteriormente se realizó la medición de pH con un pH –metro calibrado con soluciones estándar (pH 4 y pH 7). Finalmente las muestras fueron congeladas a -15°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

5.4. CEPAS CONTROL:

Las cepas control utilizadas como controles positivos en el presente trabajo corresponden a los seis sub-grupos filogenéticos de las BSR, que fueron gentilmente donadas por el Dr. Richard Devereux, investigador de la ASM-U.S.A. (Tabla 3).

La reconstitución y conservación de las cepas control fueron realizadas como parte de la tesis de licenciatura del Lic. Darío Achá Cordero (2004).

5.5. EXTRACCIÓN DE DNA EN SEDIMENTOS Y TURBERA:

500 mg. de sedimento fueron pesados y posteriormente mezclados con 810 uL de Solución de lisis (100mM Tris-HCl (pH 8.0) ,100 mM Na₂EDTA (pH 8.0), 100 mM de fosfato de sodio (pH 8.0), 1.5 mM de NaCl y 2% de Bromuro de Hexadecil-trimetil amonio (CTAB)) y 6 uL de proteinasa K (10 mg/ml) en tubos de 1,5 ml. La mezcla fue agitada en forma horizontalmente a 225 rpm por 40 min., agregándose después 1800 uL de SDS al 10% con posterior incubación a 65°C por 2 horas con suaves inversiones cada 15 minutos, luego los tubos fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min., recuperándose el sobrenadante (aprox. 600 uL). Al precipitado residual se agregaron 408 ul de Solución de lisis y 60 ul de SDS (10%), incubándose la mezcla a 65°C por 10 min., se recuperó el sobrenadante después de una centrifugación como se indicó mas adelante. Ambos sobrenadantes fueron mezclados con cloroformo-alcohol Isoamílico, seguidos de una centrifugación a máxima velocidad (14000 rpm) por 5 minutos. Se adicionó al sobrenadante Isopropanol (0.8 volúmenes) y Acetato de sodio (0.3 M) dejándolo reposar verticalmente por 1 hora. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a una máxima velocidad por 20 min., desechándose por inversión el sobrenadante. Al precipitado se le agrego etanol al 70%, con una posterior centrifugación a máxima velocidad por 10 min., el precipitado obtenido fue disuelto en agua destilada a 4°C por 15 horas (Zhou *et al.*, 1996).

La detección del DNA total se efectuó por electroforesis con solución tampón TBE 0.5X en geles de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio. La visualización del DNA se realizó en un transiluminador de luz UV (ultra violeta) (anexos).

5.6. PURIFICACIÓN DEL DNA DE SEDIMENTOS Y TURBERA:

Se probaron dos sistemas para la purificación de los ácidos nucleicos en los sedimentos, el primero consistía en el empleo del Kit comercial de extracción y purificación UltraClean Soil DNA (MoBio Inc.) y el segundo mediante columnas que fueron elaboradas con Sefarosa como resina. El DNA purificado en las eluciones fue evaluado por electroforesis en geles de agarosa al 1% con 0.5 ug/ml de bromuro de etidio con solución tampón TBE 0.5X y visualizados en un transiluminador de luz UV.

5.7. AMPLIFICACIÓN DEL 16S DNAr Y SUBGRUPOS ESPECÍFICOS DE BSR POR PCR Y NESTED-PCR:

Los cebadores de BSR utilizados en la amplificación por PCR del gen 16S DNAr fueron FD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y RP2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT) obtenidos del trabajo de Weisburg *et al.*, (1991). La amplificación fue realizada en un termociclador (modelo TD 7500, Hybaid, USA), bajo el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 1 min., 30 ciclos de 94°C por 1 min., 50-65°C por 1 min., y 72 °C por 1 min., seguida de una extensión final a 72°C por 5 min. La composición de la solución de reacción por tubo, fue de 20 uL de volumen, los componentes del Master Mix fueron: 1.7 uL de agua tridestilada, 2 ul de tampón PCR 10X (Promega), 2 ul de MgCl₂ 10X, 2 ul de cada cebador (5 pmol/ul), 0.4 ul dNTPs (10 mM de cada uno), 0.5 ul (10 ug/ul peso/volumen) de BSA, 0.05 U/uL (para DNAr 16S) y 0.02 U/ul (para los subgrupos de SRB) de Taq Polimerasa (Promega) y finalmente DNA (2-20 ng). La amplificación de los productos esperados se analizó por electroforesis con buffer TBE 0.5X en geles de agarosa 0.8%-1.5% en presencia de bromuro de etidio y posterior visualización, el peso molecular se determinó comparando con el marcador pGem. El producto de la amplificación del gen 16S DNAr generando fue de 1504 pb (anexos).

Se utilizó Nested-PCR para la identificación de los sub-grupos de BSR sobre el amplificado del gen 16S DNAr; se utilizaron cebadores específicos para cada sub-grupo de BSRs: sub-grupo 1 *Desulfotomaculum* (DFM); sub-grupo 2 *Desulfobulbus* (DBB); sub-grupo 3 *Desulfobacterium* (DBM); sub-grupo 4 *Desulfobacter* (DSB); sub-grupo 5 *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (DCC-DNM-DSS) y sub-grupo 6 *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (DSV-DMB) (Tabla 4) (Daly *et al.*, 2000).

5.8. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN VERTICAL Y HORIZONTAL DE LOS SUBGRUPOS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS:

Para el análisis de la distribución de los subgrupos de BSR dentro de los perfiles sedimentarios y turbera, fue necesario realizar la evaluación de forma espacial, efectuando un análisis en sentido horizontal, que fue realizado en función a los estratos de 1cm., que nos permitió evaluar la distribución de BSR contrastando con los factores físico-químicos presentes a ese nivel. En cambio el análisis vertical, fue realizado en función a la profundidad de los perfiles sedimentarios y turba.

Las fórmulas utilizadas fueron las siguientes:

Análisis de la distribución Horizontal de BSR:

$$\% \text{ Horizontal de BSR} = \frac{(*M1^+ + M2^+ + M3^+ + \dots nM^+)}{\text{Número total de grupos de BSR (6)}} \times 100$$

Análisis de la distribución vertical de los sub-grupos de BSR:

$$\% \text{ Vertical de sub-grupos de BSR} = \frac{(*M1^+ + M2^+ + M3^+ + \dots nM^+)}{\text{Número total de muestras analizadas}} \times 100$$

* Representan las muestras positivas dentro del perfil sedimentario

Se utilizó el coeficiente de correlación *Pearson*, para observar las posibles correlaciones de los valores físico-químicos sobre la distribución de BSR en cada uno de los sistemas (Luna-Barrón *et al.*, 2004).

Tabla 3. Cepas control de bacterias sulfato reductoras.

Especie	Grupo
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	1
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	2
<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	3
<i>Desulfobacter curvatus</i>	4
<i>Desulfococcus multivorans</i>	5
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> 27774	6

Tabla 4. Secuencias de cebadores utilizados en la reacción del PCR para identificar a los sub-grupos de Bacterias Sulfato Reductoras.

Primers	Sitio blanco*	Secuencia 5'-3' **	Especificidad	Temp. Alineación °C	Tamaño del Producto (bp)
DFM140	140-158	TAGMCGGGATAACRSYKG	GRUPO 1	58	700
DFM842	842-823	ATACCCSCWWCWCCTAGCAC			
DBB121	121-142	CGCGTAGATAACCTGTCYTCATG	GRUPO 2	66	1120
DBB1237	1237-1215	GTAGKACGTGTGTAGCCCTGGTC			
DBM169	169-183	CTAATRCCGGATRAAGTCAG	GRUPO 3	64	840
DBM1006	1006-986	ATTCTCARGATGTCAAGTCTG			
DSB127	127-148	GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG	GRUPO 4	60	1150
DSB1273	1273-1252	CYYYYYGCRAGTCGSTGCCCT			
DCC305	305-327	GATCAGCCACACTGGRACCTGACA	GRUPO 5	65	860
DCC1165	1165-1144	GGGCGAGTATCTTYAGAGTYC			
DSV230	230-248	GRGYCYGCGTYCATTAGC	GRUPO 6	61	610
DSV838	838-818	SYCCGRCACTAGYRTYCATC			

* Las posiciones están en función de DNAr 16S de *E. coli* (aprox.1504 pb).

**Ambigüedad: R(G o A); Y (C o T); K (G o T);M(A o C);S(G o C);W (A o T)

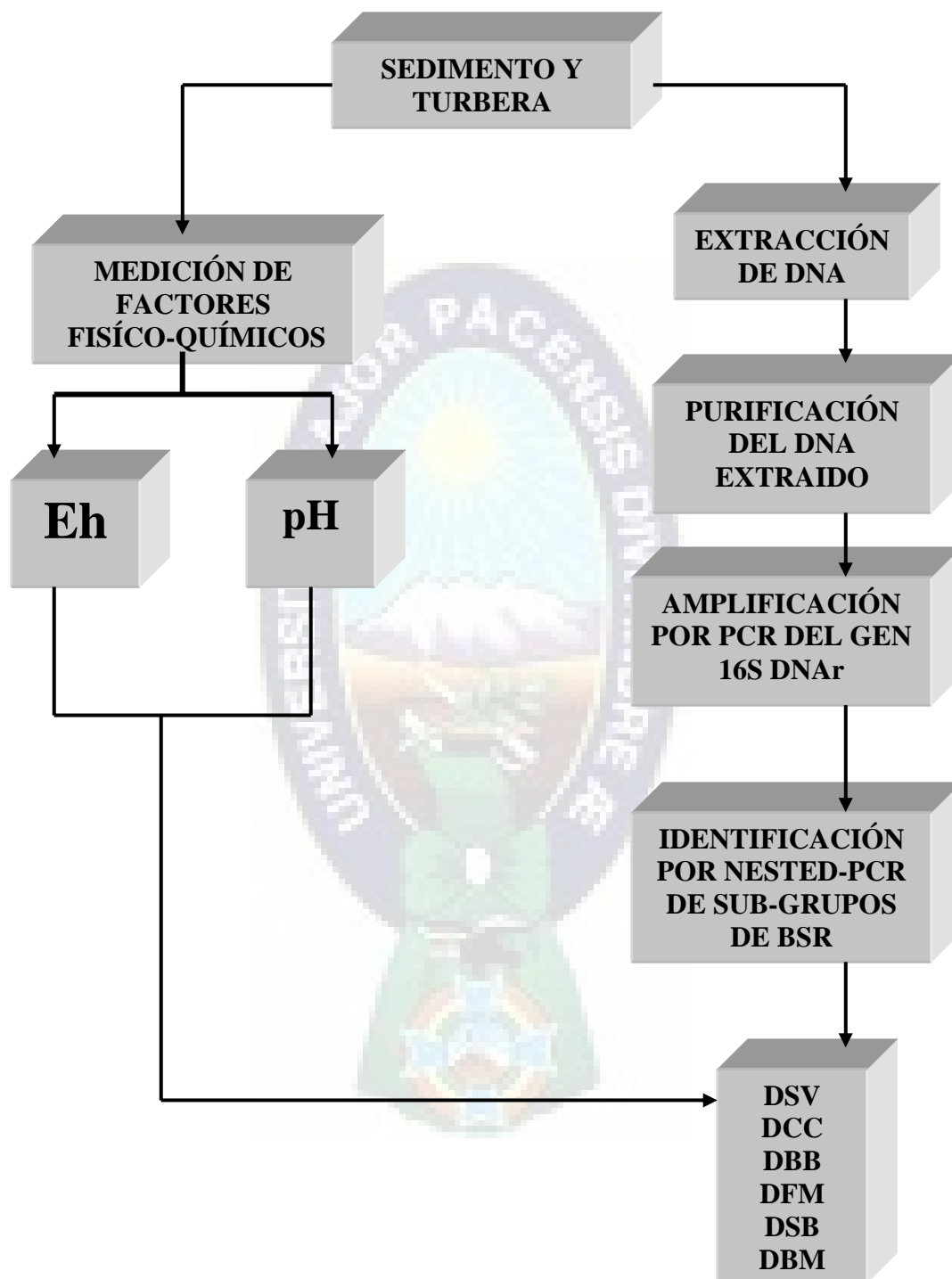


Figura 6. Esquema de la Metodología de Trabajo.

6. RESULTADOS:

6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS EN LOS SEDIMENTOS Y TURBERA DE LA CUENCA MILLUNI:

En base al análisis de los factores físico químicos y las características de cada sedimento y turbera, obtenidos en el sitio de estudio, se distinguieron cuatro sistemas que difieren en valores de Eh, pH, presencia de vegetación y tipo de sedimento (Tabla. 4), por lo que constituyen diferentes ambientes, los cuales se encontraron comprendidos por:

- Primer Sistema: Constituido por los sedimentos de lagunas ubicadas en la zona alta de la cuenca lagunas Pata Khota (PK) y Jankho Khota (JK), con presencia de vegetación acuática en el fondo de la laguna.
- Segundo Sistema: Constituido por los sedimentos de la laguna Ventanani (V), ubicada al este de la cuenca, dentro de una zona con mineralización, sin presencia de vegetación, cuyo sedimento se caracterizo por la presencia de óxidos precipitados.
- Tercer Sistema: Constituido por los sedimentos del Desecho minero Milluni Chico (MCH) y laguna Milluni Grande (MG), ubicadas en la zona de minería, corriente abajo sin presencia de vegetación.
- Cuarto Sistema: Constituido por una turbera ubicada a la salida de la laguna Milluni Grande (TMGS) que se caracteriza por presentar grandes acumulaciones de restos vegetales que se descomponen lentamente, formando una gruesa capa de suelo orgánico.

Tabla 5. Valores Físico-Químicos y Características de las Lagunas y turbera de la Cuenca Milluni.

Laguna	pH min.	pH máx.	Eh min.	Eh máx.	Vegetación	Testigo
PK	5.8	10	-121	+370	SI	Sedimento
JK	6.2	6.7	-330	+51	SI	Sedimento
V	4.24	5.7	+335	+629	NO	Sed. Mineralizado
MCH	2.1	4.9	-124	+407	NO	Desecho minero
MG	2.5	5.9	-190	+376	NO	Sedimento/desecho
TMGS	4.5	6.3	-17	-310	Abundante	Turba

PK = laguna Pata Khota, JK = laguna Jankho Khota, V= laguna Ventanani, MCH= Desecho minero Milluni Chico, MG= laguna Milluni Grande, TMGS= Turbera Milluni Grande salida.

6.2. PERFILES DEL POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN (Eh) CUENCA MILLUNI:

El primer sistema presento un comportamiento de Eh muy diferente entre ambas lagunas es así que la laguna PK presento en general un Eh oxidante-reductor en un rango de +370 a -121 mV, con valores de Eh oxidante en la superficie (+370 a +31 mV) hasta los 28cm., que fueron cambiando a partir de los 30 cm., a un Eh reductor (-6 a -121mV), el cual se mantuvo constante hasta la parte mas profunda del sedimento (entre 33 a 50 cm.) (Fig. 7-A).

La laguna JK presento en general un Eh entre +51 a -330 mV, el Eh fue oxidante en la superficie (entre 1 a 2 cm.), cambiando luego a un Eh reductor, con ligeros cambios que se dieron a nivel de todo el perfil sedimentario, en especial en la parte central (entre 15 a 45 cm.) donde se aprecia un incremento en los valores de Eh (-185 a -331mV), llegando a estabilizarse en la parte mas profunda del sedimento (47 a 60 cm.) (Fig. 8-A).

Dentro del segundo sistema, la laguna V presento un sedimento con valores de Eh entre +335 a +629 mV, el Eh fue muy oxidante a nivel de todo el sedimento, presentando ligeras variaciones localizadas en la zona central (entre 10 a 33 cm.) (Fig. 9-A).

El desecho minero Milluni Chico (MCH), presentó un sedimento con alternancia de Eh de oxidante a reductor y viceversa, con valores entre + 407 a -124 mV, los valores de Eh se presentaron oxidantes en la superficie (entre 1 a 15 cm.) y en la parte central del sedimento (entre 35 a 45 cm.), las regiones que presentaron valores de Eh reductor se localizaron en la parte central (entre 16 a 30 cm.) y en la parte profunda del sedimento, (entre 47 a 70 cm.) (Fig. 10-A).

Laguna MG constituida por un Eh oxidante-reductor, con valores que se encontraron entre +376 a -190 mV, donde el Eh se presento oxidante hasta los 20 cm., con una transición hacia un Eh reductor con la profundidad, similar a la laguna PK (Fig. 11-A).

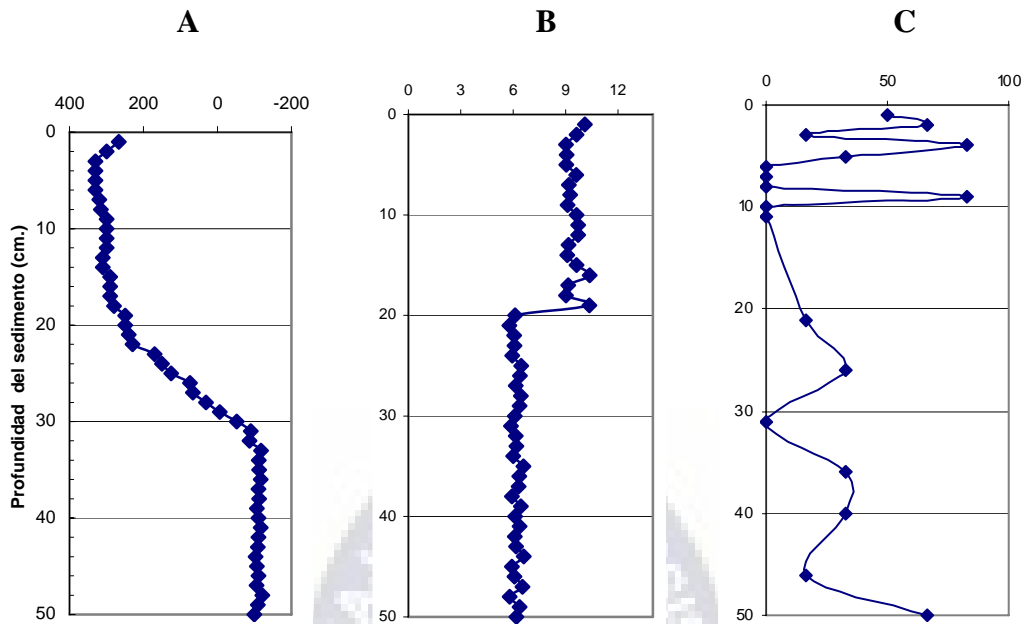


Figura 7. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras en Laguna Pata Khota.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH
C = % Distribución horizontal de BSR.

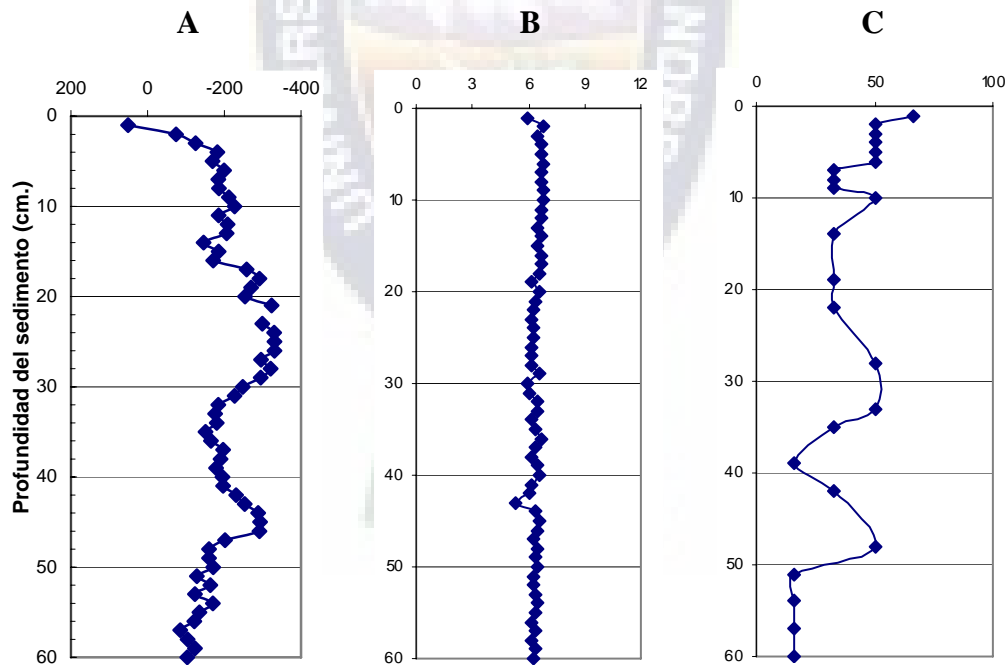


Figura 8. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras en Laguna Jankho Khota.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH
C = % Distribución horizontal de BSR.

La Turbera TMGS, presento un Eh reductor cuyos valores se encontraron entre -17 a -310 mV, con cambios en la parte central del sedimento (entre 30 a 40 cm., y entre 50 a 70 cm.), presentándose un Eh mas estable en la parte profunda (entre 75 a 100cm.) (Fig.12-A).

En conjunto, las características físico-químicas de los sedimentos encontrados en la Cuenca Milluni, dentro de los cuatro sistemas, representaron cuatro tipos de perfiles sedimentarios los cuales en función a los valores de Eh se agruparon de la siguiente manera:

- Sedimentos con valores de Eh oxidante-reductor (laguna PK y laguna MG).
- Sedimento con valores de Eh reductores (Laguna JK y la turbera TMGS).
- Sedimentos con valores de Eh oxidante (laguna V).
- Sedimento con valores de Eh que presentaron alternancia oxidante-reductor (desecho minero MCH).

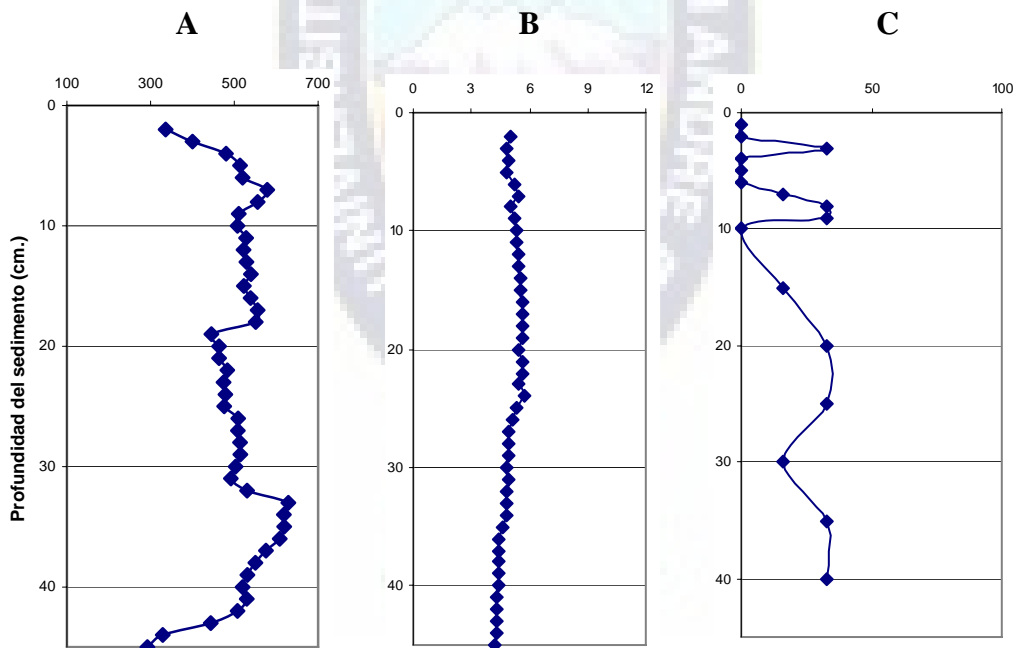


Figura 9. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras en Laguna Ventanani.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH,
C = % Distribución horizontal de BSR.

6.3. PERFILES DE pH CUENCA MILLUNI:

Dentro del primer sistema la laguna PK presento valores de pH que estuvieron entre 10 a 5.8, con un sedimento con alternancia básico-ácido, presentando en la superficie (1 a 10 cm.) un pH alcalino (9-10), que fue disminuyendo en función a la profundidad (20 a 50 cm.) presentando valores ligeramente ácidos (pH 5-6) (Fig. 7-B).

Los valores de pH en la laguna JK se presentaron entre 6.2 a 6.7, con características ligeramente ácidas, se observo un pH constante con ligeros cambios, presentando valores dentro la neutralidad (Fig. 8-B).

En el segundo sistema, la laguna (V) presento un sedimento con características ácidas, con valores de pH entre 5.7 a 4.24 (Fig. 9-B).

En cambio en el tercer sistema, el desecho minero MCH, presento un pH muy ácido entre 2.1 a 4.9, presentándose mas ácido en la superficie con cambios graduales en función a la profundidad (Fig.10-B). Así mismo, la laguna MG presento valores de pH entre 2.5 a 5.9, con valores ácidos en la superficie que posteriormente fueron incrementando en la parte mas profunda (entre 20 a 45 cm.) (Fig. 11-B).

En el cuarto sistema, la turbera TMGS, presento un pH ácido de 4.5 a 6.3, que se mantuvo relativamente constante a lo largo de todo el perfil sedimentario (Fig. 12-B).

En relación a los valores de pH, la Cuenca Milluni presento tres grupos de perfiles sedimentarios los cuales se encontraron comprendidos por:

- Sedimento con pH ácido constituido por la laguna V, laguna MG y el desecho minero MCH.
- Sedimento con pH ligeramente ácido, constituido por la laguna JK y la turbera TMGS.
- Sedimento con pH básico-ácido constituido por la laguna PK.

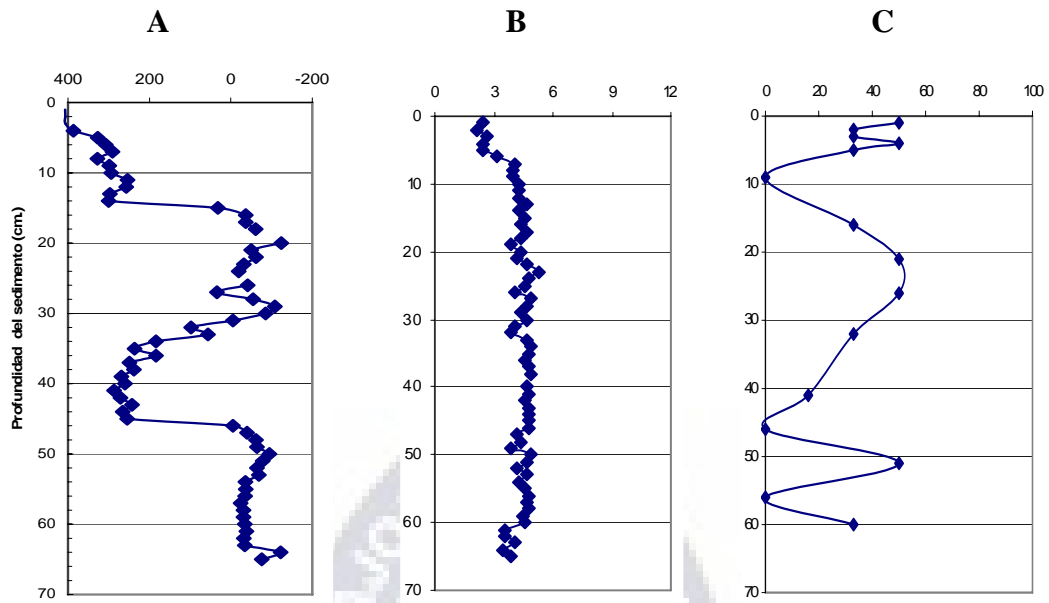


Figura 10. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras en desecho minero Milluni Chico.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH;
C = % Distribución horizontal de BSR.

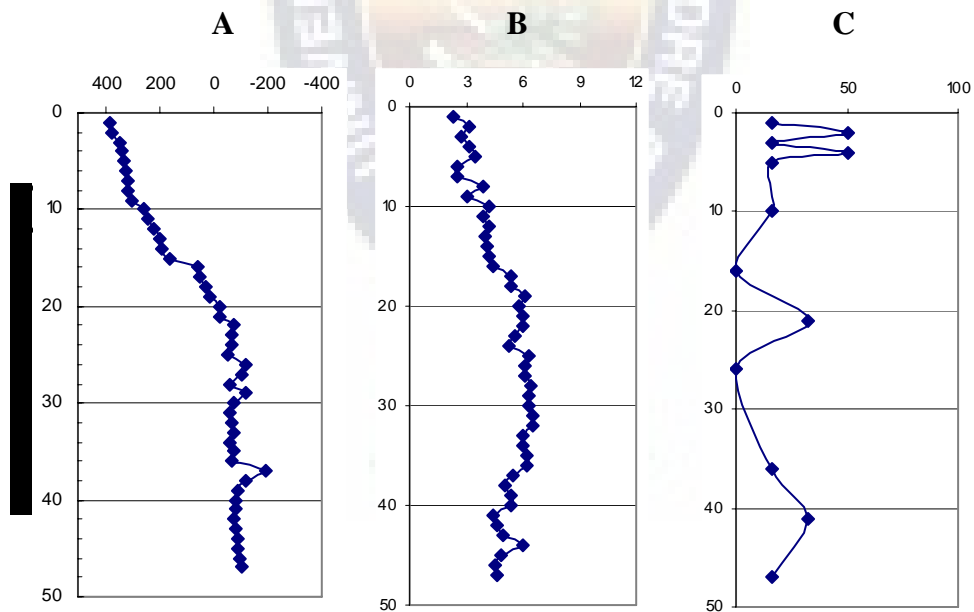


Figura 11. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras en Laguna Milluni Grande.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH,
C = % Distribución horizontal de BSR.

6.4. PERFILES DE DISTRIBUCIÓN HORIZONTAL DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS CUENCA MILLUNI:

En el primer sistema, la distribución horizontal de BSR dentro la laguna PK fue mayor en los primeros 10 cm. alcanzando hasta un 83%, que fue disminuyendo a mayor profundidad alcanzando un 66% (entre los 50 cm.) (Fig.7-C). En la laguna JK, la distribución horizontal de BSR se presentó a nivel de todo el perfil sedimentario predominando en los primeros 10 cm. (hasta un 66%) y disminuyendo (en un 16%) en la parte profunda (50 a 60 cm.) (Fig. 8-C).

En cambio en el segundo sistema (laguna V), la distribución horizontal de BSR, mostró mas predominación en la parte central del sedimento, manteniéndose invariable con la profundidad, pero con un menor porcentaje de distribución entre 16 a 32%, en relación a las lagunas PK y JK (Fig. 9-C).

Dentro del tercer sistema, la distribución horizontal de BSR en el desecho minero MCH, fue mayor en la superficie y en la parte central del sedimento (50%) (entre 2 a 30 cm.), disminuyendo (hasta un 33%) con la profundidad (60cm.) (Fig. 10-C).

Por otra parte en la laguna MG, la distribución horizontal de BSR, fue mayor (alcanzando un 50%) en la superficie (entre 1 a 5cm.) y disminuyó (16%) con la profundidad (entre 40 a 50cm.) (Fig. 11-C).

En el cuarto sistema, la distribución horizontal de BSR dentro la turbera TMGS, mostró un incremento en relación con la profundidad (50% a 66%) (Fig. 12-C).

Dentro los cuatro sistemas se presento un perfil de distribución horizontal de BSR, que mostró una fuerte variación principalmente en la superficie hasta los 10 cm. y fue cambiando a una forma más regular en la parte profunda del sedimento.

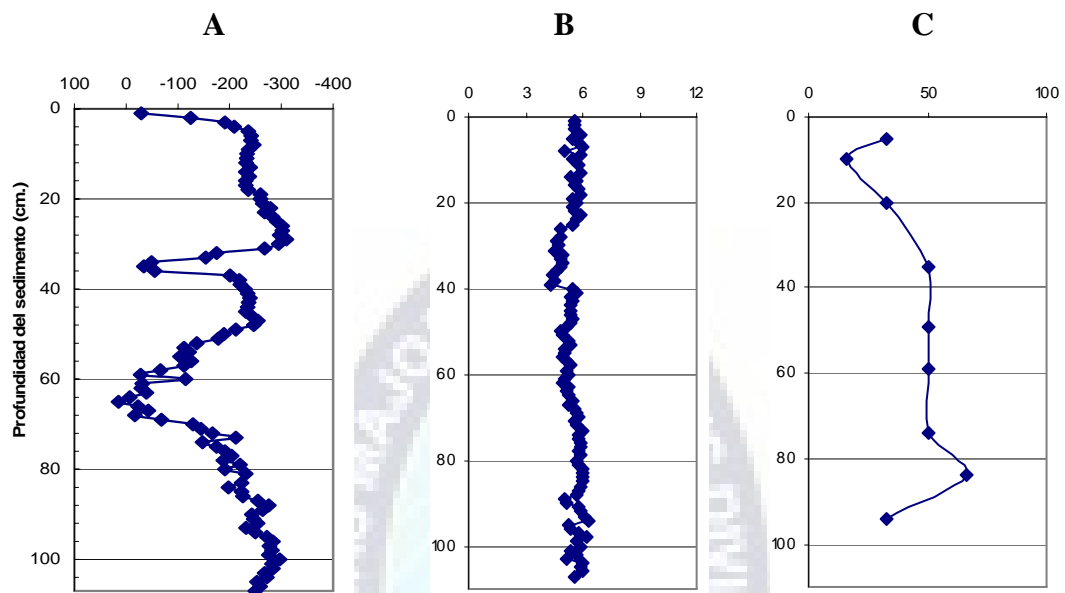


Figura 12. Perfiles de Eh, pH y distribución horizontal de Bacterias Sulfato Reductoras Turbera Milluni Grande Salada.

A = Eh (potencial de oxido-reducción); B = pH,
C = % Distribución horizontal de BSR.

6.5. DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR EN LOS SEDIMENTOS Y TURBERA:

Los subgrupos de BSR en los sedimentos de las lagunas y turbera de la cuenca fueron asociados en tres grupos que presentaron la siguiente distribución:

- Primer grupo constituido por PK y TMGS, presentaron a los subgrupos DSV, DCC, DBB, DFM y DSB, distribuidos desde la superficie (entre 1 a 10 cm.) hasta los 94cm.(TMGS) (Fig. 13 A y F) dentro de sedimentos orgánicos con Eh oxidante-reductor y pH alcalino a ligeramente ácido (Fig. 7 y 12).
- Segundo grupo constituido por JK, MCH y MG, presentaron similares subgrupos de BSR al anterior, a diferencia del subgrupo DSB. Las BSR fueron identificadas hasta una profundidad de 60cm. (JK) (Fig. 13 B, D y E), dentro de sedimentos orgánicos con Eh reductor y pH ligeramente ácido (JK) y sedimentos contaminados, con un Eh oxidante-reductor (MCH y MG) y con pH ácido extremo.
- Tercer grupo constituido por V, a diferencia con las anteriores lagunas y turbera, V presentó dos subgrupos de BSR, DSV y DCC hasta una profundidad de 45 cm., dentro de un sedimento mineralizado por la presencia de óxidos (Fig.13 C), con un Eh muy oxidante y pH ácido.

En los tres grupos se observó que la distribución de BSR se localizó en la superficie del sedimento (ambiente aerobio) y en la parte mas profunda (ambiente anaerobio) dentro de variables condiciones físico-químicas (Fig. 13).

Se analizó con el coeficiente Pearson (r) las posibles correlaciones existentes entre el Eh y pH con la distribución de BSR en los sedimentos y turbera, cuyos valores se muestran en la tabla 6.

Se observó que existiría una correlación entre el Eh/BSR en JK, MCH, MG y TMGS, esta última presentaría una correlación relativamente mayor ($r = 0.48$) en comparación a las otros sedimentos.

En relación al pH y la distribución de BSR (pH/BSR), los sedimentos de PK, JK y V presentarían una menor correlación con los valores de pH con respecto a los del Eh, destacándose V por presentar una mayor correlación ($r = 0.12$) en contraste con las otras lagunas.

Destacar que en los sedimentos de MCH y MG y la turbera TMGS, la correlación de Ph/BSR no presentarían una relación directa sobre la distribución de las BSR.

Tabla 6. Correlaciones de Eh y pH con la distribución de BSR.

Sitio analizado	Coeficiente Pearson (r) Eh / BSR	Coeficiente Pearson (r) pH/BSR
PK	-0.024	0.024
JK	0.15	0.044
V	0.41	0.12
MCH	0.022	-0.31
MG	0.42	-0.26
TMGS	0.48	-0.11

PK = Pata Khota, JK = Jankho Khota, V = Ventanani,
MCH = Milluni Chico, MG = Milluni Grande, TMGS = Turbera salida Milluni Grande.

A

Prof. f.	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
21					
26					
31					
36					
40					
46					
50					

B

Prof. f.	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
14					
19					
22					
28					
33					
35					
39					
42					
48					
51					
54					
57					
60					

C

Prof	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
15					
20					
25					
30					
35					
40					
45					

D

Prof.	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
1					
2					
3					
4					
5					
9					
16					
21					
26					
32					
41					
46					
51					
56					
60					

E

Prof	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
1					
2					
3					
4					
5					
10					
16					
21					
26					
36					
41					
47					

F

Prof	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB
5					
10					
20					
35					
49					
59					
74					
84					
94					

Figura 13. Distribución de subgrupos de bacterias sulfato reductoras en los sedimentos y turbera

A = Pata Khota (PK); B = Jankho Khota (JK); C = Ventanani (V);
D = Milluni Chico (MCH); E = Milluni Grande (MG); F = Turbera salida Milluni (TMGS).

6.6. PORCENTAJE DE DISTRIBUCIÓN VERTICAL DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI:

La distribución vertical de los subgrupos de BSR fue realizado en función a la profundidad del perfil sedimentario, mostrando variaciones que posiblemente se encontraron influenciadas por las condiciones y ubicación que presentaron cada una de las lagunas y la turbera.

Los subgrupos DSV y DCC fueron los mas predominantes dentro de las cuatro sistemas que presento esta región.

En cambio DBB y DFM fueron identificados en sedimentos con Eh variable y pH ácidos que presentaron MCH y MG, sin embargo no fueron identificados en ambientes con Eh oxidante (laguna V). El subgrupo DSB se restringió a sedimentos que presentaron materia orgánica vegetal (PK y TMGS).

Dentro de las lagunas ubicadas Cuenca arriba se observó una amplia distribución de BSR, similar comportamiento se observó en las lagunas ubicadas Cuenca abajo a pesar de presentar una directa contaminación por desechos mineros (Fig. 14).

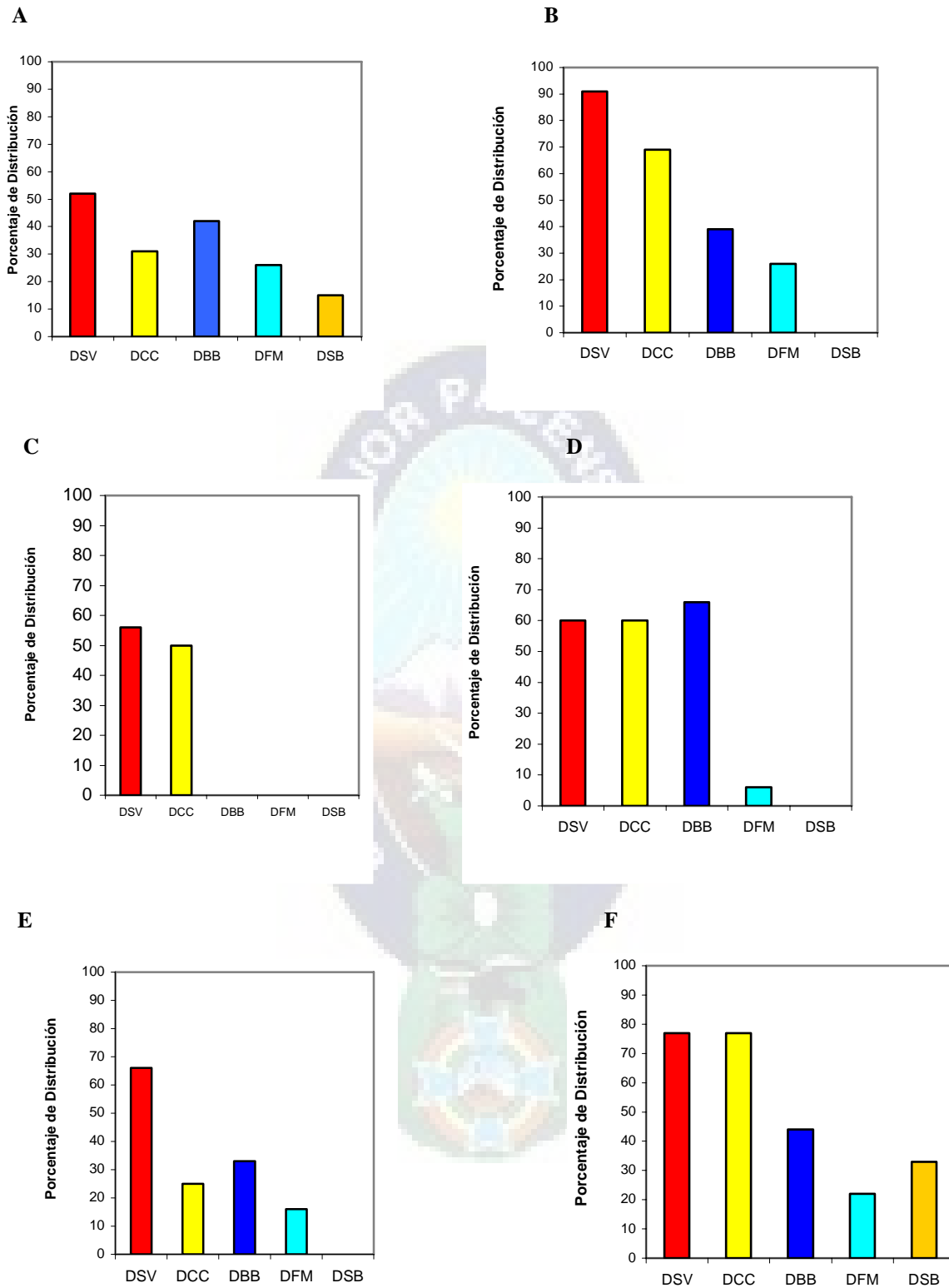


Figura 14. Porcentaje de distribución vertical de subgrupos de BSR Cuenca Milluni.

A=Pata Khota (PK); B = Jankho Khota (JK); C = Ventanani (V); D = Milluni Chico (MCH);
 E = Milluni Grande (MG); F = Turbera Milluni Grande Salida (TMGS), DSV = *Desulfovibrio*;
 DCC = *Desulfococcus*; DBB = *Desulfobulbus*; DFM = *Desulfotomaculum*; DSB = *Desulfobacter*.

6.7. PORCENTAJE TOTAL DE SUBGRUPOS DE BSR EN LA CUENCA MILLUNI:

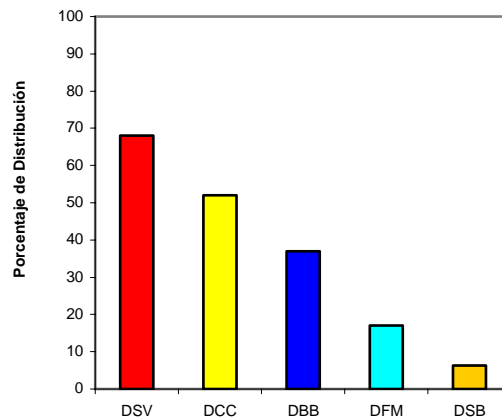


Figura 15. Porcentaje total de subgrupos de BSR en la Cuenca Milluni.

DSV = *Desulfovibrio*; DCC = *Desulfococcus*; DBB = *Desulfobulbus*; DFM = *Desulfotomaculum*;
DSB = *Desulfobacter*.

Los subgrupos que predominaron en los sedimentos y turbera de los cuatro sistemas de la Cuenca Milluni son DSV, DCC y DBB, en una proporción del 68%, 52% y 37% respectivamente, se constituyeron como los subgrupos mayoritarios en toda la cuenca dentro de ambientes muy heterogéneos con influencia directa e indirecta por los desechos mineros.

En cambio el subgrupo DFM se encontró en un 17% en menor proporción en relación a los anteriores subgrupos, a excepción de DSB que se encontró en un 6.3%, fue el subgrupo mas minoritario en la región de estudio (Fig. 15).

6.8. DISTRIBUCIÓN TOTAL DE BSR DENTRO LA CUENCA MILLUNI:

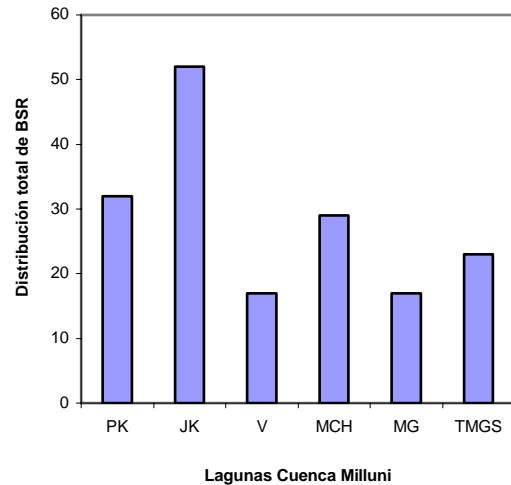


Figura 16. Porcentaje de Distribución total de BSR Cuenca Milluni.

PK = Pata Khota, JK = Jankho Khota, V = Ventanani,
MCH = Milluni Chico, MG = Milluni Grande, TMGS = Turbera salida Milluni Grande.

En relación a la distribución total de BSR con la ubicación de las lagunas y la turbera se tiene:

- Las lagunas ubicadas cuenca arriba (PK, JK y V), se observó una mayor distribución en JK del 52%, seguida de PK con un 32%. En contraste con V donde el porcentaje de BSR fue mucho menor, alcanzando un valor del 17%.

-Las Lagunas y turbera ubicadas cuenca abajo (MCH, MG y TMGS) con una influencia directa por los desechos mineros, presentaron una distribución que se encontró entre 29% MCH y 17% MG, por último la turbera TMGS presentó una distribución del 23%.

Las lagunas V y MG presentaron características sedimentarias diferentes, pero similares condiciones ácidas, ambas lagunas presentaron el menor porcentaje de distribución de BSR en toda la cuenca (Fig. 16).

7. DISCUSIONES:

En el presente estudio se analizaron las características físico-químicas y distribución de BSR en muestras a lo largo de perfiles sedimentarios y de turbera de cuatro sistemas constituidos por lagunas de la Cuenca Milluni que comprenden por una parte a las localizadas cuenca arriba (PK y JK) donde no existiría contaminación minera directa, lagunas ubicadas cuenca abajo productoras de drenajes ácido (MCH y MG) que representarían las zonas de mayor contaminación minera, la laguna V no conectada con las lagunas mencionadas, pero sin embargo presenta condiciones extremas por encontrarse en un sitio mineralizado y la turbera TMGS ubicada a la salida de la laguna MG, rica en materia vegetal orgánica, de retención de agua ácida y metales pesados.

Si bien, estas lagunas se encuentran conectadas por afluentes de aguas que reciben de la laguna PK y del nevado del Huayna Potosí, hasta reunirse en la laguna MG, se pudo observar que los parámetros físico-químicos presentaron una fuerte variación que estuvo influenciada probablemente por el grado de contaminación arrastrado por estos efluentes incidiendo sobre la distribución de los subgrupos de BSR y viceversa dentro de estos sistemas.

7.1. PRIMER SISTEMA: LAGUNAS PATA KHOTA Y JANKHO KHOTA

El primer sistema comprendido por las lagunas naturales PK y JK debido a su ubicación no presentaría una evidente contaminación por la actividad minera ya que se encuentran por encima de la mina de Milluni (cuenca arriba). La laguna PK se caracterizó por presentar un Eh oxidante hasta los 28 cm. de profundidad que podría estar influenciado por la presencia de plantas acuáticas en el sedimento a este nivel, ocasionando la entrada de oxígeno que afectaría sobre la zona de transición del Eh en la parte más profunda del perfil sedimentario. Con respecto al pH alcalino encontrado en la laguna PK, hasta los 20 cm. de profundidad, Salvarredy-Aranguren y sus colaboradores (2004), señalan que a la entrada del sistema de la laguna PK, el agua se presenta ligeramente más alcalina en invierno, siendo más rica en bicarbonato en esta época ($128\text{-}319\mu\text{mol.L}^{-1}$ de bicarbonato), que se debería a una mayor concentración de elementos en el agua por la reducción de los caudales durante esta estación invernal seca. En verano el deshielo del glaciar del Huayna Potosí y el incremento de precipitaciones pluviales diluye la concentración de las aguas y disminuye ligeramente la alcalinidad.

Es importante resaltar que dentro de esta laguna PK se pudo observar el mayor porcentaje de distribución horizontal de BSR (83%) hasta los primeros 10 cm. de profundidad bajo un pH alcalino, Eh oxidante y en presencia de plantas acuáticas. Según Russell *et al.*, (2003) y Boshoff *et al.*, (2004a-b), las BSR se podrían encontrar con fuentes de carbono accesibles producidas por productos eliminados por las raíces de las plantas acuáticas, las cuales constituirían un sistema natural sustentable de fuente de carbono para el desarrollo de BSR y otras comunidades de bacterias. Así, en ambientes naturales con raíces de plantas acuáticas existiría una competencia de las bacterias sulfato reductoras con otras bacterias (Nitrato reductoras, Clostridia y Metanogenas) por los donadores de electrones comunes como ser compuestos orgánicos fermentables (butirato, propionato y acetato) presentándose interacciones de cooperación y competencia. Similares comportamientos podrían ocurrir no solo en la rizosfera de plantas sino también en otros ambientes (Scheid *et al.*, 2004).

Otros autores (Sass *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1999 y Matías *et al.*, 2004) señalan que dentro de ambientes naturales de aguas dulces a pH 8-9, las BSR habitarían en asociación con *Cyanobacterias*, donde ambas se encontrarían jugando un papel importante en el incremento del pH y la precipitación de carbonatos de magnesio que podría estar ligado a su metabolismo. Así mismo las BSR dentro de sedimentos óxicos podrían realizar la reducción de sulfato, debido a la presencia de proteínas oxígeno-tolerantes (superóxido dismutasa, catalasa y NADH oxidasa). Por otra parte, dentro de condiciones de laboratorio las BSR y otras bacterias anaerobias se desarrollan dentro de ambientes alcalinos (pH =11) y oxidantes en presencia de fuentes de carbono (O'Flaherty *et al.*, 1998 y Sasaki *et al.*, 2001), estos reportes evidenciarían que las BSR podrían sobrevivir dentro de ambientes con Eh positivo (oxidantes) y pH alcalino.

Es posible que las BSR de la laguna PK se encontrarían jugando un papel importante influyendo quizás sobre los valores del Eh y pH. Las BSR al reducir el sulfato, al mismo tiempo podrían oxidar los compuestos orgánicos presentes, lo que indicaría una alta actividad metabólica en los primeros 10 cm., por el fácil acceso a las fuentes de carbono, que daría como resultado una elevada producción de bicarbonato que podría acentuar la alcalinidad del medio en este estrato.

En contraste, en la laguna JK no se observaron raíces de plantas acuáticas en el sedimento, prevaleciendo un Eh reductor desde los 2 cm. y pH ácido. Según Salvarredy-Aranguren *et al.*, (2004), esta laguna se presentaría mas ácida que la anterior debido a un cambio litológico en el área, que se encontraría reflejado en una mayor concentración de sulfato en el agua (126-1540 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) y a una disminución en la concentración de bicarbonato.

Según Barton *et al.*, (1995) dentro de ambientes de agua dulce la concentración de sulfato es usualmente baja con rangos entre $1.05^{-3} \mu\text{mol.L}^{-1}$ (equivalente a 10 a 200 nmoles. L^{-1}), valores mil veces menores a lo que presento la laguna JK. En esta laguna el sulfato no se encontraría influyendo sobre la distribución de BSR ya que ellas podrían habitar dentro de ambientes con elevadas concentraciones de sulfato como se observo en ambientes marinos.

Esta laguna presentó en el perfil sedimentario restos de materia orgánica y no así plantas acuáticas como las que se encontraron en PK, las cuales se encontrarían disminuidas desde la región de la laguna PK hasta el desecho minero MCH (Apaza *et al.*, 1989-1991). Las condiciones climáticas que presentó esta región de alta montaña, con vientos fuertes y formación de oleajes, facilitaría que residuos contaminantes provenientes de la mina se difundan con la consiguiente expansión en la superficie de la laguna, que afectaría la reducción de la vegetación en este sector, que puede ser producto principalmente del cambio litológico imperante en la zona. Aunque un aumento de sustancias nocivas en el suelo es posible por contaminantes provenientes de la mina transportados eolicamente o transportados por los cursos de agua provenientes de la mina, especialmente en el sector sur (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005).

Bajo estas condiciones con Eh reductor apropiadas para estas bacterias anaerobias y pH ácido, cercano a la neutralidad. Esta laguna se caracterizo también por presentar una parcial contaminación, que posiblemente influiría sobre el porcentaje de distribución horizontal de BSR a lo largo de los 10 cm. de profundidad, donde se observó un 66%, que fue menor en comparación a la laguna PK. Si bien esta laguna contaría con un acceso a fuentes de carbono de origen vegetal en menor proporción en relación con la laguna PK, las BSR probablemente se encontrarían utilizando compuestos inorgánicos presentes, como donadores de electrones. Según Londry *et al.*, (2003) dentro de ambientes naturales las BSR podrían comportarse como autótrofos, mixótrofos o heterótrofos esto dependería del grupo de BSR que utilice una de estas formas de metabolismo durante su desarrollo y del acceso a las fuentes de carbono.

Es posible que dentro de esta laguna pueda existir un equilibrio entre la reducción de sulfato (SO_2^{-4}) y la precipitación de compuestos inorgánicos (metales pesados), que se encontraría asociado a la formación de sulfuro de hidrógeno (H_2S), el cual en elevadas cantidades llegaría a ser tóxico para las bacterias, para evitar esto el H_2S se combinaría con los compuestos inorgánicos formando sales de sulfuro, las cuales precipitarían reduciendo de esta manera la toxicidad de este compuesto (H_2S) (Bhattacharya *et al.*, 1995 y Chang *et al.*, 2005).

7.2. SEGUNDO SISTEMA LAGUNA VENTANANI:

El segundo sistema constituido por la laguna V se encontró ubicada dentro una zona con mineralización, las condiciones físico-químicas de este sistema se caracterizaron por la presencia de un Eh oxidante y pH ácido (5 - 4.24), el Eh en comparación a la laguna PK, no se encontró influenciado por la presencia de raíces de plantas acuáticas si no mas bien por la mineralogía del sitio de ubicación, en relación al pH esta laguna se caracteriza por conserva un bajo contenido de alcalinidad, pese a no estar colindante a la mina. Según Salvarredy-Aranguren *et al.* (2004), a diferencia de los sectores de MCH y MG, dentro la laguna V, los metales en solución no sobrepasarían los límites de potabilidad para el consumo humano, en razón que la acidez no es extrema (4-5). Este ambiente es fuertemente oxidado por la presencia de agua rica en oxígeno proveniente de los cauces que alimentan la laguna.

Así mismo el relieve muy escarpado que presenta provoca que el agua se mezcle con el aire fácilmente, lo que causaría la oxidación de la piritita generando sulfatos y hierro. Sin embargo este proceso sería limitado a este intervalo de pH 4-5, donde el Fe precipita rápidamente en forma de *Goetita* (óxido de hierro) o *Schwertmanita* (otro hidróxido sulfatado de hierro). Esta región es una clásica área de yacimiento de “sombrero de hierro”, donde solamente los silicatos y la precipitación de hidróxidos de hierro producirían una atenuación de la acidificación. El “sombrero de hierro” se caracterizaría por ser un yacimiento de óxidos de hierro que protegería en profundidad una zona rica en sulfuros y en metales pesados los cuales se encontrarían combinados con estos óxidos, si el área hubiera sufrido mayor alteración este se habría transformado en una fuente de drenaje ácido extremo como el de Milluni Chico colocando a descubierto los metales trazas que se encuentran combinados con los óxidos de hierro (entre estos As, Pb, Cd) (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2004-2005).

Fortín *et al.*, (2005), señala que la presencia de óxidos de hierro (*geotita*, *hematita* y otros oxyhidróxidos) en el ambiente se debería a una estrecha asociación con la actividad metabólica de bacterias ácidofilas y neutrófilas hierro oxidadoras, las cuales promoverían la oxidación del Fe^{+2} a Fe^{+3} , como óxidos de hierro biogénico que precipitarían cercanos o sobre las células bacterianas. Este proceso se encontraría influenciado por las condiciones físico-químicas del ambiente.

Si bien la geología de la laguna V es importante también lo son las condiciones de altitud, la temperatura y la diversidad biótica. Así mismo, la zona no presenta cambios antrópicos lo que permite que los procesos naturales se encuentren en relativo equilibrio. En la laguna V se observó el menor porcentaje de distribución de BSR (32%) en los primeros 10 cm., en relación a las otras lagunas estudiadas. Esto podría estar asociado con los elevados valores de Eh oxidante (>350 mV), la ausencia de materia orgánica vegetal, la acidez y la concentración de metales, que en conjunto condicionarían un ambiente desfavorable para las BSR.

Dentro de estos ambientes oxidantes-ácidos podría existir una cooperación entre las poblaciones de BSR con bacterias sulfuro (SOB) y hierro oxidadoras (IOB), donde las SOB e IOB se encontrarían utilizando el sulfuro producido por las poblaciones de BSR que les serviría como donador de electrones. Esta relación simbiótica se complementaría a través del consumo de oxígeno efectuado por parte de las bacterias oxidadoras, que condicionarían un micro ambiente anaerobio favorable (Benner *et al.*, 1999). En la laguna V las SOB, IOB y las BSR se encontrarían interaccionando proporcionándose compuestos inorgánicos oxidados (SO_4) y reducidos (SH_2 y Fe^{+3}) necesarios para su desarrollo litotrófico. Si bien este sistema no presenta desarrollo de materia vegetal, las BSR obtendrían fuentes alternativas de carbono por la descomposición microbiana a diferencia con los otros sistemas.

7.3. TERCER SISTEMA DESECHO MINERO MILLUNI CHICO Y LAGUNA MILLUNI GRANDE:

El desecho minero MCH del tercer sistema, presentó características típicas de un depósito de colas de desmonte (pH ácido), lo que ocasiona que la geoquímica de este sitio sea diferente a las lagunas ubicadas cuenca arriba (PK, JK, V) presentando valores de Eh oxidante-reductor muy variables. El desecho minero MCH presentó sedimentos que por sus características químicas son susceptibles de oxidarse en contacto con el oxígeno atmosférico y con el agua que reciben. Convirtiéndose en una potencial fuente de producción de drenaje ácido con elevadas concentraciones de metales pesados disueltos, debido a la extrema acidez que presenta.

MCH se encuentra conectado hidrológicamente con la laguna MG, de esta forma los sedimentos contaminados de MCH son depositados en esta laguna (MG) convirtiéndose en un sedimentador natural, lo que conlleva a la ausencia de vegetación acuática.

En comparación con MCH la laguna MG presentó un Eh menos variable, que se comporta de forma similar a la laguna PK (oxidante-reductor), sin embargo cuenta con un pH ácido similar al desecho minero (MCH). El desecho minero MCH y la laguna MG presentaron similares características (Eh oxidante y pH ácido) a nivel de los 10 cm, presentando un menor porcentaje de distribución horizontal de BSR, en contraste con las lagunas ubicadas cuenca arriba (PK y JK), lo que reflejaría el efecto de las condiciones físico-químicas sobre el desarrollo de las BSR, que estaría en relación a la cantidad de mineral y al efecto del pH extremo en este sistema.

En los primeros 10 cm. de profundidad, dentro los ambientes oxidantes – ácidos del desecho minero MCH, lagunas MG y V existiría una disminución de fuentes de carbono accesibles para las BSR, la oxidación de iones metálicos podría ser utilizada a baja concentración en calidad de donadores de electrones. Sin embargo a elevadas concentraciones metálicas podrían resultar tóxicas para las bacterias (Cabrera *et al.*, 2005). Los sedimentos que describen estas características son desfavorables para la vida microbiana, particularmente para bacterias heterótrofas y para el desarrollo de plantas acuáticas, ya que existe una disminución de carbono y nitrógeno constituyendo un ambiente extremo (Héry *et al.*, 2004).

Dentro de estos ambientes, con evidente contaminación minera y escasez de fuentes de carbono, se presentaría una interacción entre comunidades de bacterias hierro oxidadoras (IOB), sulfuro oxidadoras (SOB), hierro (IRB) y sulfato reductoras controladas por la geoquímica de los sitios de colas de desmonte. Cummings *et al.*, (1999) y Wielinga *et al.*, (1999) sostienen que existe una compleja ecología microbiana en los ambientes heterogéneos que serían responsables indirectos de la movilización de metales trazas dentro de suelos y sedimentos ricos en hierro en ambientes altamente ácidos, donde los sedimentos y colas de mina retienen trazas de metales ricos en pirita (FeS_2), cuya oxidación da como resultado la presencia de Fe^{+3} , por las bacterias oxidadoras de hierro; a su vez la reducción de Fe^{+3} es un importante proceso que incrementa su disponibilidad. Las IRB oxidan los compuestos orgánicos usando el Fe^{+3} como aceptor terminal de electrones. Así mismo pueden oxidar compuestos como el sulfato y CO_2 . Principalmente las SOB se convertirían en sustrato orgánico para las BSR y estas a su vez les proporcionarían sulfuro de hidrógeno (Chappell *et al.*, 2002, Fortín *et al.*, 1996-2000). Así el hidrógeno es utilizado como donador de electrones para la reducción biológica de sulfato dentro de desechos mineros donde las fuentes de carbono son prácticamente escasas (Foucher *et al.*, 2001). Dentro de los ambientes mineros existiría una diversidad de BSR, IRB, SOB e IOB (Bond *et al.*, 2000; Santelli *et al.*, 2001).

Otros autores mencionan (Rajendran *et al.*, 1997; Pett-Ridge *et al.*, 2005) que las condiciones ambientales y las fluctuaciones del potencial de óxido-reducción ejercen una fuerte selectividad sobre la composición de las comunidades bacterianas y esto promueve una plasticidad metabólica, lo que hace que las poblaciones de bacterias adquieran un mecanismo de tolerancia fisiológica dentro de desfavorables periodos redóx. La heterogeneidad geoquímica en sedimentos ácidos, presenta zonas con actividad de hierro y sulfato reducción, predominando la reducción de hierro dentro de la zona ácida y superficial del sedimento y la reducción de sulfato en la parte profunda que estaría asociado a la distribución observada de BSR a profundidades mayores a 10 cm. (Kusel *et al.*, 2001). La presencia de BSR en este ambiente de extrema acidez, implica una versatilidad metabólica y una adaptabilidad natural a las condiciones extremas, probablemente gracias a su capacidad de formar biofilmes para protegerse de condiciones de extrema acidez y Eh oxidante.

7.4. CUARTO SISTEMA TURBERA SALIDA MILLUNI GRANDE TMGS:

El cuarto sistema constituido por la turbera TMGS, presenta algunas características físico-químicas similares con la laguna JK, Eh reductor y pH ácido. Sin embargo la turbera se encuentra constituida mayormente por material orgánico producido por la acumulación y crecimiento de la planta que presentó un 50% de carbono que fue mayor en relación a la laguna MG (0.5%) (Salvarredy-Aranguren *et al.*, 2005).

La distribución horizontal de BSR fue relativamente la mas homogénea (<50-60%), entre los 20 – 94 cm. que estaría asociada a la concentración de materia orgánica que fue mayor en relación a los otros sistemas. La presencia de productos orgánicos eliminados por las plantas que harían posible la adaptación de las BSR a este ambiente donde además existiría la presencia de metales disueltos. Esto indicaría que las BSR dentro de ambientes ácidos podrían desarrollarse si tienen a disposición fuentes orgánicas. Este proceso podría estar asociado a la mayor distribución de BSR en la parte mas profunda de la turbera, que se constituye como un depósito orgánico, es posible que dentro este sistema las BSR se encuentren precipitando los metales pesados en mayor proporción a los otros sistemas.

En resumen en los sistemas estudiados, las BSR pueden habitar en ambientes extremos (altamente oxidantes y ácidos) posiblemente dentro de biofilmes, lo que explicaría la presencia de este grupo de bacterias en el segundo (laguna V) y tercer sistema (desecho MCH y laguna MG). Así mismo, pueden encontrarse en la superficie de los sedimentos que presentaron un Eh oxidante (laguna V, laguna PK, desecho MCH y laguna MG) se pudo observar que existen grupos de BSR que son oxígeno tolerantes y que algunas asociaciones de BSR (DSV-DCC) podrían tener una limitada capacidad de respirar oxígeno. En los cuatro sistemas que presento la cuenca, se observo hacia la parte más profunda de los sedimentos a partir de los 10 cm. una disminución de la distribución de BSR a excepción de la laguna V y turbera TMGS que presentaron un incremento relativo.

En base al análisis del coeficiente de correlación *Pearson* (r) entre las características físico-químicas (Eh y pH) con la distribución de BSR en los cuatro sistemas estudiados se pudo observar que no existiría una correlación significativa de los valores de Eh y pH sobre las BSR, lo que indicaría que estos factores físico-químicos son importantes para evaluarlos pero existirían otros factores externos (presencia de óxidos, metales pesados, % de carbono, concentración de SO_4^{-2} y SH_2) que se encontrarían influyendo sobre la distribución de BSR en los sedimentos y turbera de la Cuenca Milluni.

En conclusión, las BSR pueden encontrarse dentro de ambientes con diferentes condiciones físico-químicas entre: Eh oxidante-reductor con pH alcalino (laguna PK), Eh reductor con pH ligeramente ácido (laguna JK y turbera TMGS), Eh oxidantes con pH ácido (laguna V), Eh con alternancia oxidante-reductor con pH ácido (desecho minero MCH y laguna MG), en presencia y/o ausencia de materia vegetal y metales pesados disueltos (V, MCH, MG), lo que reflejarían su capacidad de adaptación a ambientes muy diversos, condiciones físico-químicas muy variables y extremas.

7.5. INFLUENCIA DE LOS SISTEMAS DE LA CUENCA MILLUNI SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS SUBGRUPOS DE BSR:

La distribución total de BSR en la Cuenca Milluni se encontró influenciada principalmente por el tamaño del sedimento y el número de muestras analizadas por esta razón en este estudio se da solamente una estimación sobre la distribución de BSR.

El primer sistema ubicado corriente arriba de la cuenca presentó un porcentaje de distribución de BSR entre 32-52%, dentro de un ambiente con poca contaminación y que no es característico de drenaje ácido de mina. En cambio en las lagunas ubicadas corriente abajo (MCH y MG) las cuales presentaron ausencia de materia orgánica y contaminación directa por la actividad minera, representativos de los sistemas de drenajes mineros ácidos, la distribución de BSR se encontró disminuido alcanzando un porcentaje del 17-29%, en cambio en la turbera TMGS se presentó un 23%.

Dentro la distribución de los subgrupos de BSR en los cuatro sistemas de la Cuenca Milluni, se observó que DSV y DCC se encontrarían en mayor proporción. Esto podría deberse que estos subgrupos mostraron una mayor adaptabilidad a las condiciones existentes tanto en zonas aerobias y anaerobias, así como dentro de ambientes básicos y ácidos, localizándose en la superficie (desde los 1 cm.) y en la parte más profunda del sedimento y turbera (hasta los 94 cm., TMGS).

DBB tercer subgrupo en mayor proporción encontrado en la cuenca a excepción de la laguna V, este subgrupo presentó una mayor distribución vertical en el desecho minero MCH, en contraste con DSV-DCC, tolerando ambientes ácidos con Eh variable, pero sin embargo no fue observado en ambientes muy oxidantes (laguna V). Otros autores indican (Li *et al.*, 1998) que DBB en ambientes de agua dulce se encontraría predominando entre 0-6cm. en la superficie del sedimento, en cambio en este estudio se lo encontró hasta los 94 cm (en la turbera TMGS) de profundidad.

Los subgrupos DFM y DSB, fueron los que se encontraron en menor proporción en las lagunas estudiadas, DFM se encontró predominando en la superficie y en la parte profunda del sedimento hasta los 50cm., en cambio el subgrupo DSB se encontró presente en la laguna PK y la turbera TMGS (en la parte central del sedimento entre los 2 a 36 cm. de profundidad). Ambos subgrupos de BSR se presentaron susceptibles a las transiciones de los factores físico-químicos y las condiciones que les proporcionaron cada uno de los sistemas, particularmente DSB el cual fue identificado sólo en sistemas que presentaron desarrollo de materia vegetal.

Otros autores mencionan (Fournier *et al.*, 2002-2004-2005; Fareleira *et al.*, 1994) que los subgrupos de BSR no tendrían similar comportamiento ante la presencia de oxígeno, así se observó que DSB y DBM se encontrarían restringidos a las profundidades de los sedimentos, en contraste con el grupo DCC que fue encontrado predominando dentro zonas óxicas junto a DSV, esta distribución sugiere que ambos subgrupos contienen proteínas oxígeno tolerantes con capacidad de eliminar el oxígeno y reducirlo, lo que jugaría un rol ecológico importante dentro de la zona de transición de un ambiente óxico a anóxico (oxiclina), esto protegería a estas bacterias y otros anaerobios obligados de los efectos tóxicos del oxígeno y crearía un óptimo ambiente redox. Dentro de ambientes aerobios existiría una asociación sintrófica de las BSR con *Cyanobacterias* las cuales pueden adaptarse a condiciones óxicas y anóxicas, este tipo de asociación puede ocurrir en hábitat naturales donde las BSR se encontrarían expuestas al oxígeno (Sigalevich *et al.*, 2000).

La distribución de los grupos de BSR que fueron identificados en este estudio, proporcionan una información cualitativa de la diversidad de esta comunidad en estas lagunas y turbera en regiones de altura, es necesario indicar que se necesitan realizar pruebas cuantitativas más sensibles (análisis del 16S rRNA, FISH, DGGE) en estos ambientes, que puedan proveer una información más aproximada del comportamiento de las BSR, presentes en los sedimentos y turbera. Finalmente, el grupo DBM no fue identificado en los sistemas evaluados dentro la Cuenca Milluni.

Este es el primer trabajo que demuestra la presencia de BSR por métodos moleculares en ecosistemas andinos de stress asociados a la contaminación minera en Bolivia.

El estudio de la distribución de BSR en lagunas de altura (> 4000 m.s.n.m.), que se encuentran afectadas por la actividad minera, provee información que podría utilizarse en un futuro como base para realizar estudios de caracterización de los subgrupos de BSR, respecto a su capacidad de precipitar metales pesados como: cobre, cadmio, zinc, plomo, arsénico, mercurio, etc., dentro de condiciones adecuadas (Eh, pH) y presencia de diferentes fuentes de carbono. Así mismo será necesario evaluar la asociación de BSR con comunidades involucradas en la formación de drenajes ácidos.



8. CONCLUSIONES

Este estudio realizado en sedimentos de lagunas y turbera de la Cuenca Milluni, con diferente ubicación con respecto a la mina, se evaluaron cuatro sistemas que fueron caracterizados en cuanto a las variables condiciones físico-químicas, distribución horizontal y vertical de subgrupos de BSR.

Se observó la presencia de BSR en todas las lagunas y turbera de la Cuenca Milluni en diferentes estratos, dentro de diferentes condiciones de Eh y pH afectadas de forma directa e indirecta por la contaminación minera.

En función las variaciones de Eh y pH estos se presentaron heterogéneos en los sistemas ubicados en la zona de minería. Las características físico-químicas de los sedimentos y turbera no mostraron una correlación significativa con la distribución de BSR.

El porcentaje de distribución horizontal de BSR fue mayor (83-66%) en los sistemas ubicados cuenca arriba, un menor porcentaje se observó en los sistemas cuenca abajo (50-32%). La distribución vertical de BSR dentro los sedimentos y turbera se localizó en la superficie y la parte profunda de los perfiles analizados.

El porcentaje de distribución vertical de los subgrupos de BSR fue mayor en los sistemas que no presentaron contaminación minera evidente (32-52%) con una mayor diversidad de subgrupos de BSR (DSV, DCC, DBB, DFM y DSB).

En sistemas que se encontraron afectados por los desechos mineros se presentó una menor distribución (17-29%) pero con una diversidad relativamente considerable mostrando cuatro subgrupos de BSR (DSV, DCC, DBB y DFM).

En la turbera se presentó una distribución intermedia (23%) con la presencia de cinco subgrupos (similares al primer sistema), finalmente el segundo sistema presentó una distribución del 17% con una menor diversidad de subgrupos de BSR (DSV y DCC).

Las variables condiciones de Eh, pH, ausencia de materia vegetal y contaminación por desechos mineros que predisponen ambientes extremos, en conjunto podrían influir sobre la distribución de BSR.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión general de la distribución de los subgrupos de BSR en las lagunas y turbera de la Cuenca Milluni, pero se necesitan realizar pruebas cuantitativas para evaluar el rol que cumplen estos microorganismos en estos ecosistemas andinos y en la precipitación de metales pesados.

En este estudio se observó dentro de los cuatro sistemas que las BSR podrían adaptarse a las condiciones de su ambiente de forma natural, si tienen acceso a fuentes de carbono esto las ayudaría a soportar las condiciones de acidez extrema y promovería la precipitación de metales pesados. La adaptación de las BSR a estas variables condiciones las proyectaría para emplearlas en un futuro en procesos de biorremediación en la región de Milluni.



9. RECOMENDACIONES

- Para completar la información proporcionada en esta investigación se necesita realizar estudios sobre la geoquímica de los sedimentos y evaluar su efecto sobre la distribución de los subgrupos de BSR.
- Es necesario emplear métodos cuantitativos para determinar la actividad microbiana de las BSR en asociación con microorganismos autótrofos en la superficie y en la parte profunda del perfil sedimentario.
- Así mismo, es necesario evaluar la asociación de BSR con comunidades bacterianas, dentro los desechos mineros Milluni Chico, lagunas MG y Ventanani, para comprender el rol que cumplen dentro los drenajes ácidos, la oxidación de hierro y la precipitación de metales pesados.
- Realizar estudios de filogenia para la identificación de nuevas especies de BSR en los sistemas que presentaron condiciones extremas (lagunas V, MG y desecho MCH).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achá Cordero Darío, Iñiguez R. Volga y Roulet Marc. (2004). Bacterias sulfato reductoras asociadas a la raíz de macrofitas de una laguna de la llanura de inundación del río Beni, La Granja. Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés, FCPN, Carrera de Biología.

Apaza C. Roberto. (1991). Incidencia de una contaminación por efluentes mineros sobre la fauna béntica en un complejo fluvio-lacustre alto andino. Milluni, La Paz – Bolivia. Tesis de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Puras y Naturales. Carrera de Biología. Pág. 133.

Apaza C. Roberto (1989). Sensibilidad de los organismos bénticos a la contaminación por efluentes mineros: Caso laguna Milluni, Tesina, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Departamento de Biología, Universidad Mayor de San Andrés, 61 Pág.

Appleton J.D., Williams T.M., Orbea H. and Carrasco M. (2000). Fluvial contamination associated with artisanal gold mining in the Ponce Enriquez, Portovelo-Zaruma and Nambija areas, Ecuador. *Water, Air, and Soil Pollution*, 131, p. 19-39.

Barton Larry L. (1995). Sulfate Reducing Bacteria. Vol. 8, p.1 – 133.

Bhattacharya S.K., Uberoi V. and Dronamraju M.M. (1995). Interaction between acetate fed sulfate reducers and methanogens. *Water Research*, Vol. 30, N° 10, p. 2239-2246.

Bayard Remy, Chatain Vincent, Gachet Celine, Troadeo Armelle, Gourdon Remy. (2006). Mobilisation of arsenic from a mining soil in batch slurry experiments under bio-oxidative conditions. *Water Research* 40, p. 1240-1248.

Benner S.G., Gould W.D., Blowes D.W. (1999). Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. *Chemical Geology*. 169, p. 435 –448.

Bhagat Mamta, Burgess Joanna E., Antunes Paula A.M., Whiteley Chrisa G., Duncan John R. (2004). Precipitation of mixed metal residues from Waste Water utilising biogenic sulphide. *Minerals Engineering*. 17, p.925-932.

Bohannon B.J.M., and Hughes J. (2003) New approaches to analyzing microbial biodiversity data. *Current opinion in Microbiology*, 6, 282-287.

Bond Philip L., Druschel Greg K. and Banfield Jillian F. (2000A). Comparison of acid drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, N°11, p. 4962-4971.

Bond Philip L., Smriga Steven P. and Banfield Jillian F. (2000B). Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, N° 9, p.3842-3849.

Boshoff G., Duncan J., Rose P.D. (2004a). Tannery effluent as a carbon source for biological sulphate reduction. *Water Research*. 38, p.2651-2658.

- Boshoff G., Duncan J., Rose P. D. (2004b). The use of micro-algal biomass as a carbon source for biological sulphate reducing systems. *Water Research*. 38, p.2659-2666.
- Brierley Corale L. and Brierley James A. (1997). *Microbiology for the Metal Mining Industry. Manual of Environmental Microbiology*. p. 830-839.
- Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M., Ábalos A., Cantero D. (2005). Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *Journal of Hazardous Materials*. p.1-7.
- Castro Hector F., Norris Williams H., Ogram Andrew. (1999). Phylogeny of sulphate reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 31, p.1-9.
- Chang Yu-Jie, Chang Yi-Tang and Chen His-Jien. (2005). A method for controlling hydrogen sulfide in water by adding solid phase oxygen. *Bioresource Technology*, p. 1-16.
- Chappell D.A., Craw D. (2002). Geological analogue for circumneutral pH mine tailings: implications for long-term storage, Macraes Mine, Otago, New Zealand. *Applied Geochemistry*. 17, p.1105-1114.
- Christensen Bjorn, Laake Morten, Lien Torleiv. (1996). Treatment of acid water by sulfate reducing bacteria; results from a bench scale experiment. *Water Research*. Vol. 30, N° 7, p.1617-1624.
- Cohen Ronald R. H. (2004). Use of microbes for cost reduction of metal removal from metals and mining industry waste streams. *Journal of Cleaner Production*, p.1-12.
- Cummings David E., March Anthony W., Bostick Benjamin, Spring Stefan, Caccavo Frank, Fendorf Scott and Rosenzweig Frank R. (1999). Evidence for Microbial Fe (III) Reduction in Anoxic, Mining-Impacted Lake Sediments (Lake Coeur d'Alene, Idaho). *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No.1, p.154-162.
- Daly Kristian, Sharp R. and McCarthy A. (2000). Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic sub groups of sulphate-reducing bacteria. *Microbiology Ecol*. 146, p.1693-1705.
- Edwards Katrina J., Gihring Thomas M. and Banfield F. Jillian. (1999). Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Applied and Environmental Microbiology*. p.3627-3632.
- Elberling Bo, Schippers Axel, Sand Wolfgang. (1999). Bacterial and chemical oxidation of pyrite mine tailings at low temperatures. *Journal of Contaminant Hydrology*. 41, p.225-238.
- Elliott Phillip, Ragusa Santo and Catcheside David. (1998). Growth of sulphate reducing bacteria under acidic conditions in an Upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Water Research*. Vol. 32, No. 12, p. 3724-330.

Fareleira Paula, Santos Bruno S., Antonio Celia, Moradas-Ferreira Pedro, LeGall Jean, Xavier Antonio V. and Santos Helena.(1994). Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*.

Fortin D., Davis B. and Beveridge T.J.(1996) Role of *Thiobacillus* and sulfate reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. FEMS Microbiology Ecology. 21, p.11-24.

Fortin Danielle, Roy Michael, Rioux Jean-Philippe and Thibault Pierre-Jean. (2000). Occurrence of sulfate –reducing bacteria under a wide range of physico-chemical conditions in Au and Cu-Zn mine tailings. FEMS Microbiology Ecology. 33, p.197-208.

Fortin Danielle, Rioux J.P. and Roy M. (2002). Geochemistry of iron and sulfur in the zone of microbial sulfate reduction in mine tailings. Water, Air and Soil Pollution: Focus 2; p.37-56.

Fortin Danielle and Langley Sean.(2005). Formation and occurrence of biogenic iron- rich minerals. Earth Science Reviews. 72, p.1-19.

Foucher S., Battaglia-Brunet F., Ignatiadis I. and Morin D. (2001). Treatment by sulfate-reducing bacteria of Chessy acid-mine drainage and metals recovery. Chemical Engineering Science. 56, p.1639-1645.

Fournier Marjorie, Dermoun Z., Durand Marie –Claire and Dolla Alain.(2004). A new function of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (Fe)Hydrogenase in the protection against oxidative stress. Journal Biology Chemical, 279, p.1785-1793.

Fournier Marjorie, Corinne Aubert, Zorah Dermoun, Marie-Claire Durand, Danielle Moinier and Alain Dolla.(2005). Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis. Biochimie. 88, p.85-94.

Fournier Marjorie, Zhang Yi, Wildschut Janine D., Dolla Alain, Voordouw Johanna K., Schriemer David C. and Voordouw Gerrit. (2002). Function of Oxygen resistance proteins in the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Journal of Bacteriology. Vol. 185, N°1, p. 71-79.

Gadd M. Geoffrey. (2004).Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. Geoderma. 122, p.109-119.

Garcia C., Moreno D.A., Ballester A., Blazques M.L. and Gonzales F.(2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. Minerals Engineering. Vol. 14, No 9, p.997-1008.

Geets Joke, Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., Lelic D., and Vanbroekhoven K. (2005). Dsr-B gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. Journal of Microbiological Methods, p. 1-12.

Gibert Oriol, Joan de Pablo, Cortina Jose Luis and Ayora Carlos (2004). Chemical characterisation of natural organic substrates for biological mitigation of acid mine drainage. Water Research. 38, p.4186-4196.

Glombitza F. (2000). Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Management*. 21, p.197-203.

Gong Changrui and Hollander David J.(1997) Differential contribution of bacteria to sedimentary organic matter in oxic and anoxic environments Santa Monica Basin, California. Pergamon, Vol.26, N° 9/10, p. 545-563.

Groudeva V.I., Groudev S.N. and Doycheva A.S. (2000A). Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *Mineral Processing*. 62, p.293-299.

Groudev S.N., Spasova I.I. and Georgiev P.S. (2000B). In situ bioremediation of soils contaminated with radioactive elements and toxic heavy metals. *International Journal of Mineral Processing*. 62, p.301-308.

Guía Ambiental de Presas de Colas, Knight Piesold Consultores S.A.. Septiembre 2001, p.132.

Haveman Shelley A., Pederson Karsten. (2001).Microbially mediated redox processes in natural analogues for radioactive waste: contaminant. *Hidrology* 55, p. 161-174.

Héry Marina, Aude Herrera, Timothy M. Vogel, Philippe Normand and Elizabeth Navarro. (2004). Effect of carbon and nitrogen input on the bacterial community structure of Neicaledonian nickel mine spoils. *FEMS Microbiology Ecology*. 51, p.333-340.

Johnson B.D., and Hallberg K.B. (2003) The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154, 466-473.

Kaksonen A. H., Plumb J.J., Robertson W. J.,Riekkola-Vanhanen M., Franzman P.D., and Puhakka J.A.(2006). The performance kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidised-bed treatment of acidic metal and sulfate-containing waste water. *Hidrometallurgy*, p. 1-10.

Kusel Kirsten, Roth Ursula, Trinkwalter Tanja and Peiffer Stefan. (2001). Effect of pH on the anaerobic microbial cycling of sulfur in mining-impacted freshwater lake sediments. *Environmental and Experimental Botany*, 46, p.213-223.

Ledin M., Pederson K.(1996).The environmental impact of mine wastes – roles of microorganism and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews* 41, p. 67-108.

Li Jian-hua, Purdy Kevin J., Takii Susumu, Hayashi Hidetake.(1998). Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiology Ecology*. 28, p.31- 39.

Lloyd Jonathan R.(2003). Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiology* N° 27, 411-425.

Lloyd J.R., Mabbett A. N., Williams D. R. and Macaskie L.E. (2001). Metal reduction by sulphate reducing bacteria: physiological diversity and metal specificity. *Hydrometallurgy*, 59, p.327-337.

- Lloyd J.R., Mabbett A.N., Williams D.R., Macaskie L.E.(2000). Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: physiological diversity and metal specificity. *Hidrometallurgy* 59, p. 327-337.
- Londry K.L., Jahnke L.L., and Des Marais D.J.(2003). Stable carbon Isotope ratios of lipid biomarkers of sulfate-reducing bacteria.
- Luna-Barrón Ruddy, Iñiguez R. Volga & Roulet Marc. (2004). Perfil preliminar de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de laguna "La Granja" (Beni-Bolivia). Tesis para optar al grado de licenciatura en Biología, Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB) e Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD).
- Luptakova Alena and Kusnierova Maria (2004). Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB. *Hidrometallurgy* 77, p. 97-102.
- Lyew Darwin and Sheppard John. (2000). Use of conductivity to monitor the treatment of acid mine drainage by sulphate –reducing bacteria. *Water Research*, Vol. 35 No 8, p.2081-2086.
- Madigan, Martinko y Barker (1999). Brock, *Biología de los microorganismos*. Ed. Prentice Hall, 8va ed. USA, p. 162-165, 573-575, 757-764.
- Matias Pedro M., Pereira Ines A.C., Soares Claudio M. and Carrondo Maria Armenia. (2005). Sulphate respiration from hydrogen in *Desulfovibrio* bacteria: a structural biology overview. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 89, p.292-329.
- Mc Gregor Barbara, Moser Duane, Baker Brett, alm Elizabeth, and Stahl David. (2001). Seasonal and spatial variability in Lake Michigan sediment small- subunit rRNA concentrations. *Applied and environmental microbiology*, Vol.67, N°9, p.3908-3922.
- Meneses Quisbert R.I.(1997). Estudio de la vegetación en la zona minera de Milluni, Provincia de Murillo, Departamento de La Paz, Tesis para optar al grado de Licenciatura en Biología, FCPN, Universidad Mayor de San Andrés, 107 p.
- Minz Dror, Jodi L. Flax, Stefan J. Green, Gerard Muyzer, Yehuda Cohen, Michael Wagner, Bruce E. Rittmann, and David A. Stahl.(1999). Diversity of sulfate- reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *American Society for Microbiology*. p.4666-4671.
- Mogensen Gitte Lind, Kjeldsen Kasper Urup, Ingvorsen Kjeld. (2005). *Desulfovibrio aerotolerans sp.nov.*, an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe* 11, p. 339-349.
- Mori Koji, Hatsu Masahiro, Kimura Rumiko, and Takamizawa Kazuhiro (2000). Effect of heavy metals on the growth of a methanogen in pure culture and coculture with a sulfate-reducing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol.90, N°3, p. 260-265.
- Mummey Daniel L., Stahl Peter D. and Buyer S. Jeffrey. (2002). Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology* 21, p.251-259.

Nakagawa Tatsunori, Sato Shinya, Yamamoto Yoko, Fukui Nakagawa Tatsunori, Hanada Satoshi, Maruyama Akihiko, Marumo Katsumi, Urabe Tetsuro and Fukui Manabu.(2002). Distribution and diversity of thermophilic sulfate reducing bacteria within a Cu-Pb-Zn mine (Toyoha, Japan). *FEMS Microbiology Ecology*. 41, p.199-209.

Natarajan K. A., S. Subramanian and Jean-Jacques Braun. (2005). Environmental impact of metal mining-biotechnological aspects of water pollution and remediation-an Indian experience. *Journal of Geochemical Exploration*. 88, p.45-48.

Nordstrom Kirk and Alpers Charles. (1999). Negative pH, efflorescent mineralogy and consequences for environmental restoration at the Iron Mountain superfund site, California. *Geology Mineralogy and human welfare*, Vol. 96, p.3455-3462.

O'Flaherty Vincent, Mahony Therese, O'Kenedy Ronan and Colleran Emer. (1998). Effect of pH on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry*. Vol.33, N°8, p.555-569.

Okabyashi A., Wakai S., Kanao T., Sugio T., and Kamimura K. (2005) Diversity of 16S Ribosomal DNA defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, N 6, 644-652.

Pallud Celine and Cappellen Philippe Van (2005). Kinetics of microbial sulfate reduction in estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70, p.1148-1162.

Paul Debarati, Pandey Gunjan, Pandey Janmejay and Jain Rakesh K.(2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 23, p.135-142.

Purdy J. Kevin, Nedwell David B., Embley Martin T. and Takii Susumi. (1997). Use of 16S rRNA –targeted probes to investigate the occurrence and selection of sulfate –reducing bacterias in response to nutrient to sediment slurry microcosms from a Japanese estuary. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, p.221-234.

Pett-Ridge J. and Firestone M.K.(2005).Redox fluctuation structures microbial communities in a wet tropical soil. Abstract.

Raffaillac Etienne. (2002). Estudio in situ de la contaminación minera de la Cuenca Milluni.

Rajendran Narasimmalu, Matsuda Osanu, Rajendran Rajam and Urushigawa Yoshikuni.(1996).Comparative description of microbial community structure in surface sediments of eutrophic bays.*Marine Pollution Bulletin*, Vol. 34, N°1, p.26-33.

Reglamento Ambiental para Actividades Mineras, U.P.S. Editorial s.r.l., Impreso en Bolivia, primera edición Abril 2004, 141 Pág.

Ríos C. G. (1985). Estudio de la contaminación ambiental por las descargas mineras de COMSUR en la Represa de Milluni, Tesis de grado de Ingeniería, Universidad Mayor de San Andrés, 120 p.

Rogers Steve, Fitzpatrick Rob, Lamontagne Sebastien and Hicks Warren.(2003). Application of functional molecular biology technologies to the study of biology processes in sulfidic environments. *Advances in regolith*, 360-363.

Rosselló-Mora Ramon, Amann Rudolf (2000). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, p. 39-67.

Russell R.A., Holden P.J., Wilde K.L. and Neilan B.A.(2003). Demonstration of the use of scenedesmus and carteria biomass to drive bacterial sulfate reduction by *Desulfovibrio* alcoholovorans isolated from an artificial wetland. *Hidrometallurgy*. 71, p.227-234.

Scala David J.,Hacherl E.L., Cowan R.,Young L.Y. and Kosson David S.(2006). Characterization of Fe (III)-reducing enrichment cultures and isolation of Fe(III)-reducing bacteria from the Savannah River site, South Carolina. *Research in Microbiology*, p. 1-12.

Salvarredy-Aranguren Matias M.(2003), Rappaport pour l'IRD, Laboratoire de Mécanismes et Transferts en Géologie, Toulouse, France.

Salvarredy-Aranguren Matias M., Probst Anne and Roulet Marc. (2004), Milluni valley contamination by mining activities: source and mobilization of metals (Altiplano, Cordillera Real, Bolivia). Laboratoire de Mécanismes et Transferts en Géologie, Toulouse, France.

Salvarredy-Aranguren Matias M., Probst Anne, Roulet Marc and Isaure Marie- Pierre. (2005). Lithology and hydrology control of surface water metal contamination by mining wastes (Milluni Valley, Cordillera Real, Bolivia). Laboratoire de Mécanismes et Transferts en Géologie, Toulouse, France, p.1-50.

Sánchez A. Samanta R., Volga Iñiguez R. & Marc Roulet. (2005). Distribución vertical de bacterias sulfato reductoras y de metilmercurio en sedimentos de llanuras de inundación Beni-Bolivia. Tesis para optar al grado de Master en Ciencias, Universidad Mayor de San Andrés, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología e Instituto de Investigaciones para el Desarrollo (IRD).

Sani R.K., Peyton B.M., Amonette J.E. and Geesey G.G.(2004).Reduction of uranium(VI) under sulphate-reducing conditions in the presence of Fe(III)-(hydr)oxides. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, Vol.68, N°12, p.2639-2648.

Santelli Cara M., Welch Susan A., Westrich Henry R. and Banfield Jillian F.(2001).The effect of Fe-oxidizing bacteria on Fe-silicate mineral dissolution. *Chemical Geology*, 180, p. 99-115.

Sasaki Takayuki, Kauri Tiit, Kudo Akira. (2001).Effect of pH and temperature on the sorption of Np and Pa to mixed anaerobic bacteria. *Applied Radiation and Isotopes*, 55, p. 427-431.

Sass Henrik, Cypionka Heribert and Babenzien Hans-Dietrich. (1997).Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiology Ecology*, 22, p.245-255.

Scheid Daniel, Stubner Stephan and Conrad Ralf.(2004).Identification of rice root associated nitrate ,sulphate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. FEMS Microbiology Ecology, 50, p.101-110.

Schippers A., Rege Von H. and Sand W.(1996).Impact of microbial diversity and sulfur chemistry on safeguarding sulfidic mine waste. Minerals Engineering, Vol.9, N°10, p.1069-1079.

Sigalevich Pavel, Baev Mark V., Teske Andreas and Cohen Yehuda (2000). Sulfate reduction and possible aerobic metabolism of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* in a chemostat coculture with *Marinobacter* sp. Strain MB under exposure to increasing oxygen concentrations. Abstract.

Staley James T., Castenholz Richard W., Colwell Rita R., Holt John G., Kane Matthew D., Pace Norman R., Salyers Abigail A., Tiedje James M.(1997). The Microbial World: Foundation of the biosphere .American Society for Microbiology, p. 1-18.

Tarras-Wahlberg N.H., Flachier A., Lane S.N., Sangfors O. (2001). Environmental impacts and metal exposure of aquatic ecosystems in rivers contaminated by small scale gold mining: the Puyango River basin, Southern Ecuador. The Science of the total environment 278, p.239-261.

Weinbauer Markus, Fritz Ingo , Wenderoth Dirk and Hofle Manfred. (2001).Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses Applied and environmental microbiology vol. 68 ,No 3 , 1082-1087.

Wielinga Bruce, Lucy Juliette, Moore Johnnie and Gannon James.(1999). Microbiology and geochemical characterization of fluviually deposited sulfidic mine tailings. Applied and environmental microbiology, Vol. 65, N° 4, p.1548-1555.

Wright David T.(1999). The role of sulphate-reducing bacteria and Cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, south Australia. Sedimentary Geology, 126, p.147-157.

Yozhida Hidekasu, Yamamoto Kashi, Yogo Setsuo, Murakami Yuki.(2006), An analogue of matrix diffusion enhanced by biogenic redox reaction in fractured sedimentary rock.Journal of Geochemical Exploration; p. 134-142.

Zhou Jizhong, Bruns Mary Ann and Tiedje M. James. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. Applied and environmental microbiology, vol. 62 , No 2; p. 316-322.

Zagury Gerald J., Kulnieks Viktors I. And Neculita Carmen M.(2006). Characterization and reactivity assessment of organic substrates for sulphate- reducing bacteria in acid mine drainage treatment. Chemosphere, p. 1-11.

ANEXOS



**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
LAGUNA PATA KHOTA EPOCA DE LLUVIA 2003 – 2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	%H.
0.5	+	+		+		5.64	-30	33%
1.0	+			+		5.63	-89	16%
1.5	+					5.85	-60	16%
2.0	+	+	+	+		3.79	-83	66%
2.5	+	+		+		5.14	-99	50%
3.0	+	+		+		5.50	-104	50%
3.5	+					5.59	-121	16%
4.0	+					4.80	-137	16%
4.5						5.00	-135	0%
5.0						4.80	-109	0%
5.5	+	+	+	+		3.25	-68	66%
6.0	+	+				5.20	-85	33%
6.5	+	+				5.25	-71	33%
7.0	+					3.43	-64	16%
7.5	+	+	+			5.52	-52	50%
8.0	+	+				5.29	-55	33%
8.5						3.29	-55	0%
9.0						5.18	-55	0%
9.5		+				2.64	-55	16%

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
LAGUNA PATA KHOTA EPOCA SECA 2003 – 2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	% H.
1	+	+		+		10	+267	50%
2	+		+	+	+	9.62	+300	66%
3	+					9.02	+330	16%
4	+	+	+	+	+	9.06	+330	83%
5	+	+				9.04	+330	33%
6						9.6	+330	0%
7						9.18	+320	0%
8						9.26	+315	0%
9	+	+	+	+	+	9.12	+300	83%
10						9.63	+300	0%
11						9.72	+300	0%
21			+			5.79	+240	16%
26	+	+				6.38	+74	33%
31						5.87	-90	0%
36	+	+	+			6.35	-117	33%
40	+	+	+			6.11	-111	33%
46			+			6.04	-111	16%
50	+	+	+	+		6.19	-100	66%

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
LAGUNA JHANKO KHOTA EPOCA SECA 2003 – 2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	%H
1	+	+	+	+		5.9	+51	66%
2	+	+		+		6.76	-74	50%
3	+	+		+		6.49	-125	50%
4	+	+		+		6.73	-182	50%
5	+	+		+		6.68	-169	50%
6	+	+		+		6.76	-198	50%
7	+	+				6.68	-184	33%
8	+	+				6.69	-186	33%
9	+	+				6.7	-212	33%
10	+	+	+			6.7	-227	50%
14	+		+			6.64	-146	33%
19	+	+				6.21	-270	33%
22	+	+				6.24	-299	33%
28	+	+	+			6.05	-295	50%
33	+	+	+			6.4	-180	50%
35	+	+				6.7	-165	33%
39	+					6.5	-195	16%
42	+		+			6.0	-253	33%
48	+	+	+			6.4	-160	50%
51	+					6.3	-163	16%
54	+					6.5	-135	16%
57			+			6.3	-104	16%
60			+			6.2	-103	16%

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
LAGUNA VENTANANI EPOCA SECA 2003 – 2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	%H
1						-	-	-
2						5.5	336	0%
3	+	+				4.82	400	33%
4						4.88	480	0%
5						4.23	514	0%
6						5.2	520	0%
7	+	+				5.41	579	16%
8	+	+				5.05	556	33%
9	+	+				5.18	511	33%
10						5.36	508	0%
15		+				5.57	523	16%
20	+	+				5.46	463	33%
25	+	+				5.34	475.5	33%
30	+					4.82	502.9	16%
35	+	+				4.59	619	33%
40	+	+				4.39	519.6	33%
45						4.24	292.6	

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
DESECHO MINERO MILLUNI CHICO EPOCA SECA 2003 – 2004**

Prof. (cm)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	%H
1	+	+	+			2.4	+407	50%
2	+	+				2.14	+406	33%
3	+		+			2.62	+406	33%
4	+	+	+			2.45	+387	50%
5		+	+			2.48	+327	33%
9						3.95	+299	0%
16	+		+			4.3	-37	33%
21	+	+	+			4.14	-50	50%
26	+	+	+			4.09	-41	50%
32		+	+	+		3.83	+98	33%
41	+					4.6	+287	16%
46						4.22	-5	0%
51	+	+	+			4.21	-78	50%
56						4.06	-35	0%
60		+	+			3.61	-34	33%

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
LAGUNA MILLUNI GRANDE EPOCA SECA 2003-2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	% H
1	+	+				2.5	+376	16%
2	+		+	+		2.9	+347	50%
3	+					2.5	+337	16%
4	+	+	+			3.43	+330	50%
5	+					3.40	+324	16%
10			+			3.31	+240	16%
16						4.01	+47	0%
21	+			+		5.7	-76	33%
26						4.8	-104	0%
36	+					5.08	-190	16%
41		+	+			4.42	-78	33%
47	+					4.67	-89	16%

**DISTRIBUCIÓN DE SUBGRUPOS DE BSR CUENCA MILLUNI
TURBERA SALIDA MILLUNI GRANDE EPOCA SECA 2003-2004**

Prof. (cm.)	DSV	DCC	DBB	DFM	DSB	pH	Eh (mV)	%H
5			+		+	5.46	-236	33%
10		+				5.51	-234	16%
20	+	+				5.73	-260	33%
35	+	+		+		4.87	-34	50%
49	+	+		+		5.18	-212	50%
59	+		+		+	5.16	-28	50%
74	+	+	+			5.77	-148	50%
84	+	+	+		+	5.95	-198	66%
94	+	+				6.31	-250	33%

CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO LAGUNA PATA KHOTA

El tamaño del perfil es de 53.5 cm., presenta mucha vegetación en la interfase agua-sedimento que corresponde a plantas acuáticas.

Prof. (cm.)	Eh (mV)	pH	T°	Cod. tubo	Características
1	+267	10.10	7.2	87D	Plantas acuáticas de color verde con raíces, el sedimento color marrón claro muy líquido con raíces de las plantas introducidas en el.
2	+300	9.62	7.7	84c	Es muy líquido de color marrón claro, con características similares al anterior.
3	+330	9.02	8.2	60D	Es mas sedimento es menos líquido presenta raíces mas firmes dentro del sedimento.
4	+330	9.06	7.5	58D	Marrón claro casi beis, presenta raíces de algas es mas arcilloso y húmedo.
5	+330	9.04	8.1	83D	Similar al anterior.
6	+330	9.6	8.0	68D	Es mas compacto, poco húmedo mas arcilloso presenta raíces de plantas acuáticas.
7	+320	9.18	6.1	65D	Sigue la presencia de raíces, es mas denso compacto, húmedo, arcilloso y presenta un color beis claro.
8	+315	9.26	5.8	59D	Continua la presencia de raíces, el sedimento es de color marrón claro, es húmedo poco arcilloso
9	+300	9.12	5.7	101D	Color marrón mas oscuro es muy cohesivo con raíces y restos de plantas.
10	+300	9.63	6.2	67D	Es similar al anterior continua la presencia de raíces.
11	+300	9.72	6.2	81D	Muy cohesivo a este nivel continua la presencia de raíces.
12	+300	9.71	6.2	74D	Presenta un color marrón es cohesivo, arcilloso poco húmedo.
13	+310	9.16	7.1	84D	Similar al anterior.
14	+370	9.09	5.4	86D	Es muy cohesivo a este nivel, con raíces de plantas.
15	+290	9.62	6.1	100C	Es mas compacto con similares características al anterior.
16	+290	10.37	3.8	78D	Similar al anterior.
17	+290	9.15	3.0	92C	Es mas compacto de color marrón claro, con presencia de materia vegetal y raíces es muy cohesivo.
18	+280	9.02	4.6	82C	Es arcilloso poco húmedo similares características al anterior, continúan a este nivel las raíces.
19	+250	10.36	4.3	100D	Presenta tonos ocres es marrón claro es mas compacto es muy cohesivo continua las raíces es mas seco a este nivel.
20	+250	6.11	8	92D	Presenta raíces, es húmedo es cohesivo, arcilloso.
21	+240	5.79	7.6	61D	Menos raíces en comparación a los anteriores color marrón claro con tonos ocres es mas compacto.
22	+230	6.05	7.7	86C	Presenta pocos tonos ocres con similares características al anterior.
23	+170	6.08	8.8	54D	Es muy compacto y cohesivo, continua la presencia de raíces de color marrón oscuro es posible la presencia de limo es menos húmedo.
24	+150	5.95	5.4	94D	Con presencia de raíces menos húmedo por tanto mas compacto, menos cohesivo es mas evidente la presencia de limo.
25	+125	6.46	5.3	90D	Es seco a este nivel existen algunas raíces, presenta color marrón oscuro.
26	+74	6.38	9.5	96C	Es marrón oscuro con tonos ocres con algunos restos vegetales es mas compacto y menos húmedo.
27	+66	6.15	7.0	93C	Tonos marrones oscuros y plomos con restos vegetales menos húmedo, mas compacto y arcilloso.
28	+31	6.44	8.6	89C	Color castaño oscuro a plomo es denso y compacto muy limoso poco cohesivo, existe a este nivel bioturbacion.
29	-6	6.36	4.8	62D	Color marrón oscuro, color ocre muy compacto mucha bioturbacion a este nivel existe oxidación.
30	-52	6.09	3.5	69D	Muy denso, arcilloso, marrón oscuro es muy compacto menos húmedo.
31	-90	5.87	6.2	97D	No existe a este nivel raíces, mucha bioturbacion presenta color gris medio

					con tonos ocres alrededor de la bioturbacion es muy compacto y arcilloso es cohesivo y seco.
32	-87	6.14	6.5	99C	Idéntico al anterior
33	-118	6.18	6.9	75D	Muy cohesivo, menor grado de bioturbacion color gris oscuro poco oxidado muy seco es muy denso y arcilloso.
34	-112	6.00	6.8	55D	Color gris medio oscuro, cohesivo, compacto muy poco húmedo menos bioturbacion a este nivel.
35	-113	6.58	8.2	57D	Compacto color gris, menos húmedo, muy poca bioturbacion.
36	-117	6.35	3.4	64D	Menos materia vegetal, con similares características al anterior.
37	-111	6.32	10	88C	De color gris, con poca bioturbacion muy cohesivo algo húmedo y arcilloso.
38	-113	5.93	8.4	88D	Color gris mas húmedo cohesivo arcilloso, no existe materia vegetal.
39	-107	6.45	11	95D	Compacto, cohesivo arcilloso menos húmedo de color gris oscuro, poca materia vegetal.
40	-111	6.11	8.1	83C	Restos de materia vegetal es poco húmedo nivel mas de turba de color gris oscuro.
41	-117	6.36	6.3	81C	Restos de materia vegetal , es de color gris oscuro no muy compacto es muy cohesivo menos húmedo es arcilloso.
42	-111	6.10	8.2	82D	Es de color gris oscuro, mas compacto cohesivo, con materia vegetal es menos húmedo y arcilloso.
43	-109	6.17	7.0	73D	Gris oscuro muy compacto y seco, es arcilloso.
44	-103	6.60	9.2	93D	Algo de materia vegetal , gris oscuro muy compacto arcilloso, cohesivo y menos húmedo.
45	-107	5.93	4.7	96D	Existe bioturbacion muy compacto, cohesivo escasa humedad arcilloso de color gris oscuro.
46	-111	6.07	7.1	97C	Bastante seco, similar al anterior.
47	-106	6.54	9.0	70D	Similar al anterior.
48	-121	5.80	7.7	91D	Con presencia de restos de materia vegetal muy compacto, menos húmedo de color gris oscuro 1/5 parte se perdió.
49	-109	6.37	10.6	77D	Con restos de materia vegetal muy denso de color gris oscuro mas seco muy compacto y arcilloso.
50	-100	6.19	7.0	56D	Con materia vegetal, de color gris oscuro muy compacto es arcilloso, es seco.

CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO LAGUNA JANKHO KHOTA

Prof. (cm.)	Eh (mV)	pH	T°	Cod. tubo	Características
1	+51	5.99	1.8	72	Color mostaza compacto.
2	-74	6.76	16.3	56	Color mostaza compacto.
3	-125	6.49	2.9	74	Color mostaza, menos compacto, con agua.
4	-182	6.73	15.0	62	Color mostaza café, estructura gelatinosa
5	-169	6.68	15.4	50	Similar al anterior.
6	-198	6.76	17.9	39	Similar al anterior.
7	-184	6.68	12.7	34	Color mostaza y plomo inconsistente.
8	-186	6.69	12.2	29	Color mostaza y plomo, mas compacto.
9	-212	6.79	12.5	40	Color verde oscuro, mas compacto con agua.
10	-227	6.79	13.3	60	Similar al anterior.
11	-185	6.74	16.2	85	Mas oscuro casi negro compacto arena fina.
12	-208	6.74	14.5	64	Similar al anterior.
13	-206	6.49	4.6	28	Similar al anterior.
14	-146	6.64	14.0	57	Verde oscuro compacto mas oscuro.
15	-185	6.53	4.5	68	Color gris oscuro compacto con arena fina.
16	-171	6.65	12.8	69	Color gris oscuro negro con presencia de grava media.
17	-258	6.66	19.0	93	Color negro gris arcilloso.
18	-292	6.63	11.7	32	Presencia de materia vegetal color negro gris.
19	-270	6.21	14.7	51	Color negro gris poco compacto, mucha materia vegetal descompuesta.
20	-254	6.57	13.8	66	Similar al anterior.
21	-323	6.36	5.6	55	Color plomo oscuro, compacto con materia vegetal.
22	-299	6.24	13.5	67	Color plomo oscuro, compacto arcilloso y con turba.
23	-330	6.21	2.2	61	Similar al anterior.
24	-331	6.25	1.5	38	Color plomo oscuro muy compacto, arcilloso poca materia vegetal.
25	-331	6.27	3.3	45	Color negro verdusco, con materia orgánica arcilloso.
26	-296	6.14	13.5	41	Color negro arcilloso, compacto mucha materia vegetal.
27	-321	6.16	2.1	53	Color negro similar al anterior.
28	-295	6.05	0.9	30	Color negro, muy compacto con mucha materia vegetal.
29	-248	6.62	2.3	48	Color negro con mucha materia vegetal descompuesta menos arcilloso.
30	-230	5.99	1.0	52	Color negro menos arcillosos es mas materia vegetal.
31	-184	6.10	4.1	82	Con materia orgánica arcilloso, color negro es compacto.
32	-176	6.51	11.7	73	Similar al anterior.
33	-180	6.49	10.5	43	Similar al anterior.
34	-151	6.11	3.1	80	Similar al anterior.
35	-165	6.70	10.0	90	Poca materia vegetal, color gris, facción gruesa.
36	-197	6.66	9.6	99	Colores marrones, gris negrusco mezcla de arcilla con grava poca materia vegetal.
37	-190	6.35	10.7	58	Muy poca arcilla arena gruesa color castaño marrón.
38	-178	6.15	3.1	27	Color marrón oscuro poca arcilla arenoso.
39	-195	6.52	9.4	31	Similar al anterior.
40	-197	6.54	10.0	97	Arenoso con arcilla.
41	-231	6.15	8.7	33	Similar al anterior.
42	-253	6.00	10.13	36	Color gris muy compacto arcilloso en la matriz arenisca fina.
43	-288	5.32	2.1	100	Similar al anterior.
44	-293	6.38	10.3	88	Similar al anterior.
45	-292	6.60	9.6	70	Mas arcilloso.
46	-202	6.46	8.3	26	Muy compacto mezcla limo y arcilla mas arena fina.
47	-160	6.31	9.5	49	Color gris oscuro arcilloso limo.
48	-160	6.44	4.3	71	Con materia orgánica arcillosos compacto color marrón oscuro.

49	-171	6.40	7.9	46	Mas compacto con materia vegetal.
50	-128	6.46	11.2	83	Marrón oscuro y materia vegetal.
51	-163	6.31	9.0	84	Marrón oscuro, casi negro mas materia vegetal muy compacto.
52	-123	6.27	7.5	75	Marrón oscuro mas arcillosos, menos materia vegetal.
53	-170	6.36	8.4	92	Marrón claro mas arcillosos menos materia vegetal.
54	-135	6.52	7.2	95	Presenta grava en medio de la arcilla mas arenoso.
55	-122	6.35	7.5	63	Marrón claro con arcilla muy compacto.
56	-85	6.12	6.7	81	Color castaño a marrón con materia vegetal y bastante arcilloso.
57	-104	6.33	6.3	54	Castaño a gris muy arcilloso.
58	-123	6.21	4.4	96	Color gris y arcilloso.
59	-103	6.38	4.8	91	Color castaño, muy arcilloso.
60	-	6.29	4	87	Color castaño oscuro muy compacto.
61	-	6.27	2.8	16	Color castaño arena fina y limo.

CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO LAGUNA VENTANANI

No presenta pulgones en el agua el sedimento describe un color ladrillo anaranjado, el tamaño del perfil obtenido fue de 46.1 cm.

Prof. (cm.)	Eh (mV)	pH	T°	Cod. tubo	Características
1	335	-	-	116b	Gravas color marrón claro
2	336	5.05	12.7	122b	Similar al anterior
3	400	4.82	13.3	115b	Color marrón oscuro y negro con presencia de óxidos puros.
4	480	4.88	16.7	128b	Color marrón oscuro, muchos óxidos muy arenoso.
5	514	4.23	11.7	112b	Muy compacto marrón oscuro, tiene grava y óxidos.
6	520	5.2	11.7	131b	Con grava y arena gruesa, con óxidos de Fe compacto, carente de agua color marrón oscuro.
7	579	5.41	13.8	130b	Muy compacto quizás óxidos de hierro marrón oscuro
8	556	5.05	12.7	124b	Similar al anterior.
9	511	5.18	9.7	97b	Color marrón sigue compacto,
10	508	5.36	12.2	120b	Sedimento negro medular
11	528	5.37	13.2	93b	Color negro marrón.
12	522	5.96	13	121b	Grava color marrón oscuro.
13	529	5.48	14.4	127b	Con grava color marrón negro.
14	540	5.55	12	111b	Marrón oscuro compacto.
15	523	5.57	11	106b	Marrón oscuro compacto.
16	539	5.6	13.2	129b	Similar al anterior.
17	556	5.63	14.6	118b	Similar al anterior.
18	551	5.6	13.2	110b	Castaño oscuro muy compacto.
19	445	5.61	20.4	132b	Color marrón oscuro a negro es muy compacto.
20	463	5.46	20.7	71b	Color marrón y negro en forma distribuida es muy compacto.
21	463.5	5.62	20.6	119b	Similar al anterior.
22	483.5	5.59	20.7	87b	Color castaño oscuro y negro con aspecto granuloso y presenta principios de concreciones de hierro y manganeso que pueden generar minerales.
23	474	5.41	20.4	102b	Presenta la forma de un pastel de color marrón claro es muy denso y compacto.
24	478.3	5.75	20.2	92b	Color negro muy compacto seco, nada de agua con crecimiento de minerales en forma vertical.
25	475.6	5.34	21.4	103b	Grado de compactación grande, color negro a marrón oscuro y se presenta aglutinado es muy difícil cortar tiene grava.
26	509.5	5.15	21.4	123b	Es muy compacto, color mas negro poco marrón.

27	508.5	4.96	20.8	113b	Color negro y marrón en el centro muy compacto.
28	513.4	4.88	20.9	133b	Color negro compacto y muy denso.
29	514.4	4.89	20.9	134b	Es mas marrón casi ladrillo existen algunos tonos negros muy compacto.
30	502.9	4.82	20.7	114b	La mitad de color negro y la otra color castaño es muy compacto y arcilloso.
31	491.3	4.90	20.8	108b	Colores mas heterogéneos muy compacto.
32	530.9	4.80	20.9	126b	Color negro muy compacto se rompe en bloques.
33	629.2	4.78	21	88b	Es muy compacto tiene color negro.
34	618.3	4.80	20.7	91b	Color negro muy compacto.
35	619	4.59	21	105b	Es muy negro seco, compacto, arenos con presencia de bioturbacion.
36	608.4	4.44	21.1	100b	Color negro castaño oscuro, con bioturbacion mas arcillosos que los anteriores y es mas húmedo.
37	575.6	4.43	21.1	83b	Es mas húmedo de color marrón con granulometría fina y se cree que tenga hidróxidos que producen disminución del agua.
38	550.6	4.45	21	94b	Color marrón claro muy húmedo arcilloso y compacto,
39	531.0	4.39	20.8	80b	Color marrón ladrillo, es arcilloso. Con arena fina de color castaño claro con tonalidad ocre es muy cohesivo y húmedo.
40	519.6	4.39	21	109b	Es similar al anterior, mucho mas seco es arcilloso con fragmentos de arena fina de color marrón claro a oscuro.
41	529.7	4.32	20.7	96b	Es mucho mas compacto, de color castaño claro, presenta arena.
42	507.4	4.31	20.7	73b	Es marrón de claro es mucho mas compacto presenta arena fina mezclada con arcilla es seco y menos denso.
43	443.2	4.31	20.8	77b	Marrón claro a anaranjado muy compacto y denso.
44	328.9	4.27	20.4	117b	Es anaranjado es denso muy compacto y es arcilloso con arena.
45	292.6	4.24	21	67b	Color anaranjado muy compacto y arcilloso.

CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO DESECHO MINERO MILLUNI CHICO

La toma del perfil sedimentario fue realizado en el sector próximo al dique de colas, se observaron muchas sales precipitadas, el testigo media 71.5 cm.

Prof. (cm.)	Eh (mV)	pH	T°	Cod. tubo	Características
1	+407	2.47	17.6	39M	Abundante parte líquida, color gris oscuro mezclado con sedimento
2	+406	2.14	18.2	3M	Muy líquido, gelatinoso, color gris oscuro se perdió un 10%
3	+406	2.62	17.5	25M	Mas compacto color marrón claro, con presencia de costras de color verde, húmedo arcilloso.
4	+387	2.45	18.1	38M	Mas compacto, color gris medio a claro con presencia de costras, mas seco húmedo, muy difícil de cortar se perdió un 5%.
5	+327	2.48	18.0	20M	Es mas compacto muy denso muchas costras de color verde claro, difícil de cortar se perdió un 10%
6	+307	3.20	18.0	15M	Es muy parecido al anterior con costras mezcladas con arcilla, muy compacta y plástica de color gris oscuro a negro.
7	+291	4.02	17.5	37M	Muy compacto, plástico arcilloso de color marrón a gris muy denso difícil de cortar.
8	+328	3.94	17.4	28M	Muy compacto, con pelos, color gris oscuro seco y arcilloso.
9	+299	3.95	18.1	16M	Similar al anterior.
10	+294	4.29	18.8	18M	Muy arcillosos, estructura plástica de color gris oscuro, poco húmedo.
11	+254	4.23	17.4	41M	Muy similar al anterior.
12	+257	4.32	17.6	31M	Similar al anterior de color gris oscuro a negro
13	+297	4.66	17.8	47M	Similar al anterior
14	+300	4.23	18.9	46M	Menos húmedo de color gris oscuro a claro, menos plástico.

15	+32	4.59	17.4	75M	Muy plástica, similar al anterior muy compacta gris oscuro a medio.
16	-37	4.39	18.4	11M	Similar al anterior.
17	-37	4.65	17.5	45M	Similar al anterior.
18	-61	4.33	18.2	29M	Muy compacto, bastante seco, presenta cristales metálicos, gris oscuro plástico, entre brillosos y opaco.
19	+75	3.90	17.8	7M	Un sector muy seco, cargado de partículas metálicas constituido por limo y arcilla, es compacto poco húmedo, el sector seco de color gris a gris anaranjado se perdió un 15%.
20	-124	4.36	18.3	1M	Muy compacto estructura plástica similar al anterior un sector seco quizás con arena fina muy seca que se quiebra.
21	-50	4.14	18.8	23M	Poca humedad, similar al anterior nivel mayormente arenoso, muy compacto 5% se pierde muy difícil de cortar.
22	-62	4.69	17.7	6M	Muy seco y compacto, color gris oscuro muy difícil de cortar estructura arenosa.
23	-32	5.32	19	9M	Muy plástica intercalación de arena fina y arcilla en la base, la arena presenta brillo metálico, muy seco.
24	-19	4.75	18.0	61M	Mas arena fina muy compacta se perdió un 5% con presencia de arcilla color gris a castaño.
25	+240	4.57	17.0	24M	Mucha arena fina con sulfuros en pequeños tamaños color marrón metálico, puede ser pirita oxidada.
26	-41	4.09	17.4	59M	50% arcilla y arena muy compacto, color mas oscuro mas plástica con arena de similar estructuras al anterior es una arena fina seca poco húmeda muy plástica.
27	+34	4.86	17.3	8M	Mas arcilla color gris medio a oscuro cohesiva compacta presenta humedad.
28	-55	4.71	17.7	57M	100% arcilla muy compacto color gris oscuro a gris marrón con olor a combustible.
29	-108	4.41	16.8	53M	Limo, arcilla, arena en un 70% es un nivel no muy arenoso, color gris a castaño, compacto olor fuerte a combustible.
30	-85	4.72	18.1	49M	Presencia de costras de oxido color verde en la arena fina, es muy friable se deshace se compacta presencia de pelos.
31	-5	4.11	17.1	54M	20% de arcilla el resto arena compacta muy friable no hay costras, muy difícil de cortar se desgrana, es dura color gris oscuro, se perdió un 18%.
32	+98	3.83	18.5	14M	50% arcilla idéntico al anterior es mas opaca.
33	+56	4.65	18.3	58M	100% arcilla, opaca olor a combustible.
34	+184	4.85	17.5	44M	Muy compacto 100% arcilla similar al anterior.
35	+237	4.78	17.7	13M	Similar al anterior, bastante húmedo muy plástica y cohesiva con olor a combustible.
36	+184	4.59	18.0	51M	100% arena, muy húmeda plástica.
37	+249	4.76	17.9	63M	Similar al anterior.
38	+238	4.85	17.1	21M	Color gris medio a claro, plástica cohesiva es mas liquida.
39	+269	4.68	18.4	12M	Muy fuerte con olor a combustible, es mas brillante, mucha humedad, muy plástica es pastosa muy fina no hay limo.
40	+260	4.81	17.6	2M	Olor muy fuerte a combustible, es muy liquida, compacto muy plástica color gris mas oscuro, es mas brillante.
41	+287	4.62	17.8	52M	Mas seca que el anterior pero presenta la misma característica que el anterior es muy plástica.
42	+271	4.74	18.1	72M	Es muy liquida, muy plástica, muy brillante, color gris oscuro, olor muy fuerte estructura arcillosa.
43	+243	4.82	17.7	35M	20% arena fina, color gris oscuro, el resto es arcilla con presencia de arena fina y limo, menos agua olor a combustible.
44	+266	4.79	17.6	22M	Muy compacto en la parte inferior, existe arena es difícil de manejar de color gris oscuro muy plástico.
45	+255	4.77	17.2	60M	Arcilla 60% en la superficie y en la base arena, es de color marrón con brillo metálico es plástico cohesivo olor a combustible.
46	-5	4.22	18.3	19M	60% arena, 40% arcilla que se encuentra en la parte inferior es compacta con presencia de limo, la arena se de color marrón medio a oscuro, presenta mucha materia metálica.
47	-40	4.35	17.1	10M	90% arena es cristalino arcillosa, es muy compacto color marrón de color

					grisáceo a claro, es seco con un grado de humedad y presencia de metales con brillo, la matriz de la arena es arcillosa con pelos de animales y olor a combustible.
48	-62	3.86	17.1	4M	Idéntico al anterior, es arena fina con, materia arcillosa, se rompe en bloque no es friable.
49	-64	4.90	17.1	62M	20% de arcilla el resto es arena de color gris claro, es plástica arena muy compacta que el anterior, en la arena presencia de óxidos rojos.
50	-95	4.71	18.3	13b	Presenta costras de óxidos con una mezcla de 60% arena, 10-20% óxidos el resto arcilla, con presencia de óxidos de color rojo amarronado, ocre es muy compacto con pelos de animal es seco se perdió un 5%.
51	-78	4.21	19.0	70M	Similar al anterior presenta un 70% de arcilla muy elástica arena intercalada con óxidos, con matriz arcillosa no friable es seca y compacta con olor a combustible.
52	-64	4.68	17.4	64M	50% arcilla, 50% arena con óxidos aumenta la proporción de arcilla, la arena es compacta difícil de cortar.
53	-69	4.32	18.1	67M	Arcilloso, brillosos, plástico, bastante húmedo, con presencia de una capa de óxidos intercalados es muy cohesiva, de color gris oscuro, con olor a combustible.
54	-36	4.60	17.8	71M	Similar al anterior con niveles de oxido.
55	-37	4.78	17.5	73M	Es arcilloso, muy plástico, no hay óxidos, olor fuerte a combustible.
56	-35	4.06	18.5	66M	Base color marrón medio a rojizo son óxidos del 10-20% de la muestra presenta arena y arcilla.
57	-24	4.82	17.7	33M	70% de limo y arena, 30% arcilla, hay sectores oxidados en forma de motas en color gris oscuro, es plástico muy compacto y algo seco, hacia la base se vuelve arenoso.
58	-31	4.51	18.1	55M	Mas arcillosos.
59	-31	4.58	18.1	42M	Mas oxido y arena.
60	-34	3.61	18.4	69M	Estratificación planar claramente con arena fina a media tiene muchos óxidos.
61	-38	3.57	18.4	26M	Con óxidos, arenoso medio.
62	-32	4.06	19.2	48M	Arenoso con óxidos, es seco y gris.
63	-34	3.50	18.3	34M	Arena fina con óxidos muy compacto.
64	-122	3.89	18.5	30M	Similar al anterior.
65	-76	4.56	17.7	36M	Color grisáceo muy compacto.

CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO LAGUNA MILLUNI GRANDE

Prof. cm.	Eh mV	pH	T°	Cod. Tubo	Características
1	376	2.58	15	101b	Muy liquido con materia en suspensión color anaranjado ocre.
2	347	2.94	10.2	86b	Se compacta el sedimento, es muy blando, gelatinosos mas agua de color naranja ocre.
3	337	2.57	18.3	65b	Mas compacto, continua con material de suspensión se perdió 10-15% de la muestra, es menos liquido que el primero, es materia gelatinoso de color naranja ocre.
4	330	3.43	16.1	79b	Compacto arcillosos, pequeñas gravas o nódulos, muy húmedo color ocre naranja.
5	324	3.40	4.8	90b	Compacto aspecto nodular, color naranja mas claro poco húmedo.
6	315	2.82	15.9	68b	Parecido al anterior es mas compacto y concreto, son óxidos genera bloques, de color naranja es húmedo, se perdió ¼ de la muestra.
7	314	3.34	11.6	89b	Similar al anterior, con óxidos aspecto terracota, se parte en bloques existe la posibilidad de pequeñas piedras cubiertas por óxidos que no sea producto de la precipitación.
8	301	3.36	6.0	7b	Muy compacto, poco liquido arcillosos con oxido ferrico.
9	257	3.28	9.6	26b	Arcillosos, cohesivo compacto, húmedo colores marrón claro a naranja ocre.

10	240	3.31	7.2	34b	Muy cohesivo, arcillosos es mas compacto que el anterior de color marrón claro, ocre naranja con pequeñas estratificaciones en los sedimentos es húmedo.
11	220	3.35	9.6	17b	Arriba de color naranja ocre, abajo gris claro a verdoso es muy compacto, arcillosos y presenta cristales de oxido, el color gris presenta una estructura mas cohesiva y arcillosa.
12	195	5.32	1	9b	Alternancia ocre naranja menos gris verdoso, compacto menos arcillosos, húmedo, compacto, podría existir grava o precipitados de oxido es difícil distinguir.
13	187	3.46	14.4	11b	Color gris oscuro verde arcillosos a limoso, cohesivo, no hay alternancia de color pero existe una pequeña porción de color ocre es compacto, húmedo.
14	159	4.00	17.6	25b	Muy blando, con agua se llega al limite de la arena, es muy arcillosos pero también posee limo, color gris verdoso, con pocos tonos ocres naranja, arena fina de la base.
15	55	3.98	18.1	14b	Mucha agua, mezcla con arena fina, arcilla, limo color gris claro a oscuro, mínimo de materia orgánica, compacto y no cohesivo, es mas limo arcillosos que arena fina algunos niveles con poco de óxidos, mucho agua.
16	47	4.01	18.2	20b	Agua, muy compacto gris oscuro a medio sin tonalidades ocres, nivel con mínima materia orgánica es arena fina y un poco de limo.
17	27	4.12	18.5	16b	Muy compacto, estratificación es arena fina, es limosa y no arcillosa y denso, es poco húmedo, casi seco, de color gris, con cantidad mínima de materia orgánica.
18	13	4.59	18.1	32b	Muy compacto, arena fina, poco húmeda gris oscura a verdosa.
19	-26	5.69	15.8	23b	Colores marrones, gris oscuro verde muy arenoso, muy compacto poco húmedo, muy compacto, parece que existiera estratificación, al fondo de color gris oscuro, en la superficie gris claro se perdió 10%.
20	-21	5.62	16.9	6b	Es gris mas oscuro y con brillos dado por micas, es muy compacto, arena fina a media seca, muy compacta, puede tener estratificación planar, con presencia de arena gruesa se perdió 10%.
21	-76	5.70	18.9	12b	Similar al anterior, es arenoso, es mas grueso y mayor oxidación, nódulos en la estratificación planar entrecruzada arenas gruesas, se perdió 5%.
22	-66	4.88	19.5	5b	80% de arena gruesa, puede ser sulfuro un mineral con brillo metálico son compactos, arenas gruesas sabulíticas, marrones claro con gránulos gruesos de cuarzo bien seco.
23	-70	4.79	19.1	18b	Idéntico al anterior, es mas denso.
24	-50	4.51	18	10b	Granulometría un poco mas gruesa, es compacto y es friable, estratificación con mayor concentración del metal
25	-121	4.41	18.8	2b	Niveles friables, estratificación planar, seco, compacto, mucho mineral, arena sabulítica, colores erices oscuros con marrones, muy friables, color castaño zona de oxidación no hay mucho cuarzo como en los niveles anteriores.
26	-104	4.81	18.9	31b	Tiene grava, parecido al anterior, pero mas grueso, estratificación entrecruzada es seco.
27	-57	4.86	20.1	27b	Estructura arcillosa con retención de liquido que la hace muy plástica y dificulta el corte.
28	-122	5.15	13.9	8b	Arcilla comprimida distribuida irregularmente, es húmedo, de color gris oscuro, cohesivo sin olor muy plástico.
29	-79	5.17	15.0	76c	Arcilloso plástico, consistencia gelatinosa, algunas zonas de oxidación de color castaño, es húmedo, no hay gravas, ni arena, es muy denso, gris oscuro.
30	-63	5.15	19.8	4b	Es arcillosos, color castaño grisáceo a gris oscuro, poca arena, muy compacto, no muy húmedo con material limoso, es plástico hacia la base un poco de limo y arena fina.

31	-69	5.69	11.0	3b	Arena fina con arcilla , zonas oxidadas de color marrón, bastante seca a diferencia de la anterior color gris medio a oscuro con matriz plástica.
32	-78	4.66	20.2	19b	Mas arcillosos, zonas oxidadas colores marrones, muy compacto, limo arcillosos, es húmedo plástico.
33	-60	5.06	19.4	21b	Muy compacto, mas seco que el anterior alternancia de color marrón arriba y abajo de color gris, con arena fina y arcilla.
34	-73	4.84	19.7	1b	Muy compacto, arena fina a media de color gris verdoso no se observa estratificación, mucho mineral con brillo metálico es friable.
35	-70	6	13.3	43b	Arenoso fino a medio muy seco, muy compacto con intercalación de arcilla, plástico.
36	-190	5.08	15.6	87c	Nivel arcilla, es plástica húmeda, gris oscuro a negro, muy compacto, plástico difícil de cortar.
37	-117	5.43	3.4	76b	100% arcilla, plástica con humedad, de color gris oscuro y estructura densa.
38	-92	5.06	14	15b	Máximo de compresión, muy plástico.
39	-85	5.35	7.1	29b	Muy líquido, poco compacto color gris oscuro plástico, si es cohesiva, con tonos marrones claros que le otorgan una tonalidad verde con estructura arcillosa.
40	-82	5.37	0.6	98b	Muy plástico, arcillosos, con alternancia de color que es mas por la zona de oxidación que de estratificación, es mas compacta.
41	-78	4.42	1.2	78	Es compacto, 50% arcilla, 50% arena fina que se incrementa en la base, de color castaño en la superficie, de color gris en la base compacto y seco.
42	-83	4.62	6.5	42	Alternancia, arriba arena gris, medio estructura arcillosa, de color marrón claro, es plástica con mas arcilla, en el fondo estructura arcilla limosa.
43	-89	4.95	5.9	89	Presento una capa de arcilla, color gris, marrón gris, compacto, húmedo la capa de arcilla de la base es muy plástica de color marrón claro, en la superficie sectores de color ocre con presencia de óxidos.
44	-89	5.95	5.2	79	Arcilloso, muy compacto, con tonalidades ocre, oxidación muy plástica algo cohesiva.
45	-97	4.89	10.7	65	Arcillosos, superficie de color marrón oxidado, de color gris oscuro, mas húmedo, cohesiva, con presencia de grietas de desecación es plástica.
46	-105	4.53	10.0	44	Muy arcilloso, color gris en la superficie y la base de color castaño, húmedo, cohesivo, presenta grietas de desecación.
47	-89	4.67	10.7	18	Es similar al anterior pero no presenta óxidos.

**CARACTERÍSTICAS DEL PERFIL SEDIMENTARIO TURBERA SALIDA LAGUNA
MILLUNI GRANDE**

Prof. cm.	Eh mV	pH	T°	Cod. Tubo	Características
1	-29	5.63	17.9	59T	100% materia vegetal, cubierta vegetal de la turba, difícil de cortar, esponjoso, húmedo.
2	-125	5.63	16.6	66T	Superficie irregular idéntico al anterior
3	-191	5.58	17.1	55T	100% fibra vegetal en descomposición de color verde marrón muy pestilente y fétido.
4	-209	5.90	16.8	73T	Idéntico al anterior.
5	-236	5.46	17.0	79T	Idéntico al anterior.
6	-242	5.79	17.1	75T	Idéntico al anterior.
7	-241	5.96	18.8	53T	Idéntico al anterior.
8	-247	5.04	20	81T	Idéntico al anterior.
9	-237	5.90	17.3	51T	Idéntico al anterior.
10	-234	5.51	18.1	64T	Idéntico al anterior.
11	-233	5.76	16.1	56T	Verde oscuro compacto menos húmedo, fétido 100% materia vegetal.
12	-232	4.45	15.6	72T	Idéntico al anterior.
13	-243	5.90	17.8	62T	Idéntico al anterior.
14	-131	5.40	18.6	74T	Idéntico al anterior.
15	-238	5.72	16.7	63T	Idéntico al anterior.
16	-231	5.54	18.5	69T	Idéntico al anterior.
17	-231	5.81	17.6	76T	Idéntico al anterior.
18	-230	5.92	17.6	65T	Idéntico al anterior.
19	-260	5.50	17.1	57T	Idéntico al anterior.
20	-260	5.73	17.4	58T	Idéntico al anterior.
21	-264	5.52	16.8	60T	Idéntico al anterior.
22	-279	5.60	15.1	61T	Idéntico al anterior.
23	-268	5.85	18	71T	Idéntico al anterior.
24	-283	5.70	16	70T	Idéntico al anterior.
25	-291	5.45	15.1	52T	Idéntico al anterior, pero mas seca.
26	-302	4.85	17.1	80T	Verde oscuro a marrón, muy compacto muchas raíces muy fétido.
27	-302	3.53	17.6	68T	Idéntico al anterior.
28	-297	4.85	20.5	91T	Idéntico al anterior.
29	-310	4.58	19.4	95T	Idéntico al anterior.
30	-295	4.78	17.7	92T	Idéntico al anterior.
31	-268	4.56	17.9	109T	Idéntico al anterior.
32	-175	4.92	19.9	89T	Idéntico al anterior.
33	-154	4.82	17.6	94T	Idéntico al anterior.
34	-49	4.94	18.1	90T	Idéntico al anterior.
35	-34	4.87	20.1	98T	Idéntico al anterior.
36	-55	4.63	19.4	84T	Idéntico al anterior.
37	-201	4.45	18.5	105T	Idéntico al anterior.
38	-219	4.55	18.4	83T	Idéntico al anterior.
39	-221	4.36	18.3	85T	Idéntico al anterior.
40	-230	5.50	16.1	108T	Superficie irregular, color marrón medio, muy blando y pestilente.
41	-235	5.68	15.4	103T	Marrón oscuro, denso pestilente 100% materia vegetal.
42	-239	5.35	14.7	27M	Similar al anterior.
43	-237	5.44	16.9	17M	Idéntico al anterior.
44	-235	5.32	14.3	50M	Idéntico al anterior.

45	-231	5.38	14.3	74M	Idéntico al anterior.
46	-243	5.40	14.4	5M	Idéntico al anterior.
47	-255	5.47	13.6	68M	Idéntico al anterior.
48	-247	5.35	15.1	40M	Idéntico al anterior.
49	-212	5.18	14.5	43M	Marrón oscuro, muy húmedo 90% materia vegetal, 10% limo poco compacto.
50	-189	4.82	14.3	32M	Idéntico al anterior.
51	-178	4.94	13.5	65M	Idéntico al anterior.
52	-137	5.27	14.4	56M	Idéntico al anterior.
53	-112	5.32	14.3	17T	Idéntico al anterior.
54	-122	5.01	14.3	15T	Idéntico al anterior.
55	-104	5.06	15.2	20T	Idéntico al anterior.
56	-126	4.96	15.3	27T	Idéntico al anterior.
57	-112	5.16	15.8	29T	Idéntico al anterior.
58	-66	5.34	16.1	10T	Idéntico al anterior.
59	-28	5.16	16.5	5T	Idéntico al anterior.
60	-115	5.31	15.3	1T	Idéntico al anterior.
61	-31	5.05	13.8	33T	Idéntico al anterior.
62	-29	4.93	17.4	24T	Idéntico al anterior.
63	-39	5.26	15.6	2T	Idéntico al anterior.
64	-7	5.15	15.3	3T	Idéntico al anterior.
65	+15	5.25	13.5	11T	Idéntico al anterior.
66	-23	5.51	15.0	18T	Idéntico al anterior.
67	-43	5.22	13.8	21T	Idéntico al anterior.
68	-17	5.63	14.7	4T	Idéntico al anterior.
69	-68	5.69	13.5	14T	Idéntico al anterior.
70	-129	5.76	15.2	30T	Idéntico al anterior.
71	-145	5.54	14.2	13T	Idéntico al anterior.
72	-167	5.70	14.3	25T	Idéntico al anterior.
73	-212	6.00	16.1	12T	Idéntico al anterior.
74	-143	5.77	13.7	34T	Negro marrón, 90% materia vegetal y 10% arcilla, húmedo compacto pestilente.
75	-175	5.82	16.6	23T	Marrón oscuro muy compacto, húmedo algo denso, poco pestilente, raíces reconocibles.
76	-191	5.89	15.1	48T	Idéntico al anterior.
77	-204	5.92	15.1	42T	Idéntico al anterior.
78	-188	5.77	15	45T	Idéntico al anterior.
79	-220	5.89	15	36T	Idéntico al anterior.
80	-191	5.69	15.9	50T	Idéntico al anterior.
81	-231	5.78	14.8	22T	Idéntico al anterior.
82	-127	5.96	16.1	8T	Idéntico al anterior.
83	-223	5.96	16.5	49T	Idéntico al anterior.
84	-198	5.95	17	26T	Idéntico al anterior.
85	-223	5.96	16.6	16T	Idéntico al anterior.
86	-226	5.89	15.3	44T	Idéntico al anterior.
87	-255	5.81	15.4	39T	Idéntico al anterior.
88	-276	5.70	16.3	43T	Idéntico al anterior.
89	-264	5.02	14.5	35T	Idéntico al anterior.
90	-243	5.19	16	6T	Idéntico al anterior.
91	-247	5.82	14.3	38T	Idéntico al anterior.
92	-254	5.92	14.8	7T	Idéntico al anterior.
93	-232	6.06	16.6	37T	De color gris medio a castaño oscuro, 60% arcilla, muy plástico, cohesivo húmedo, poco olor muy compacto.
94	-250	6.31	14.7	41T	Idéntico al anterior.

95	-272	5.28	16.4	28T	Idéntico al anterior.
96	-284	5.36	15.1	19T	Idéntico al anterior.
97	-277	5.84	14.4	40T	Idéntico al anterior.
98	-282	6.24	15.2	48T	50% arcilla y 50% materia vegetal.
99	-276	5.69	15.4	32T	50% materia vegetal, raíces no identificables, 50% arcilla, compacto, húmedo, denso muy pestilente.
100	-297	5.92	16.8	31T	Idéntico al anterior.
101	-282	5.38	15.2	47T	Idéntico al anterior.
102	-284	5.68	13.6	9T	Idéntico al anterior.
103	-268	5.11	16.1	78T	Idéntico al anterior.
104	-272	6.00	13.6	67T	Idéntico al anterior.
105	-253	5.90	16.5	54T	Idéntico al anterior.
106	-259	6.04	14.5	82T	Idéntico al anterior.
107	-250	5.59	12.8	77T	Idéntico al anterior.



CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS DEL DNA EXTRAÍDO DE BACTERIAS EN SEDIMENTO

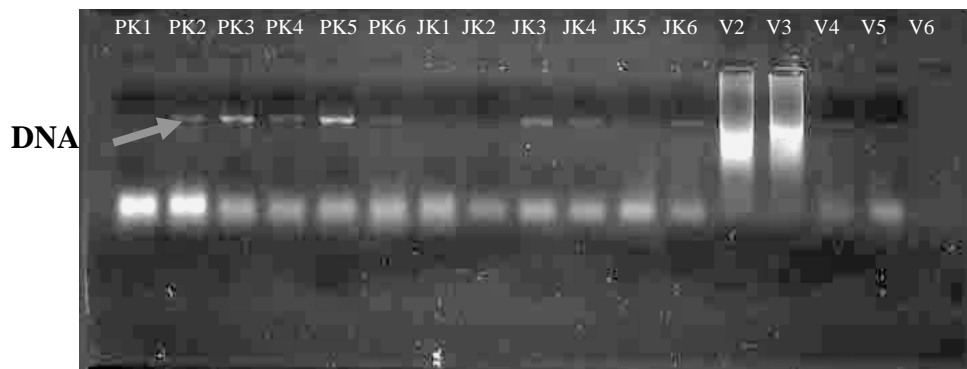


Figura 1. DNA extraído por el método de Zhou *et al.*, 1996, empleando lisis enzimática y química

PK = laguna Pata Khota, JK= laguna Jankho khota, V= laguna Ventanani

PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S DNAr EMPLEANDO LOS PRIMERS FD1 Y RP2

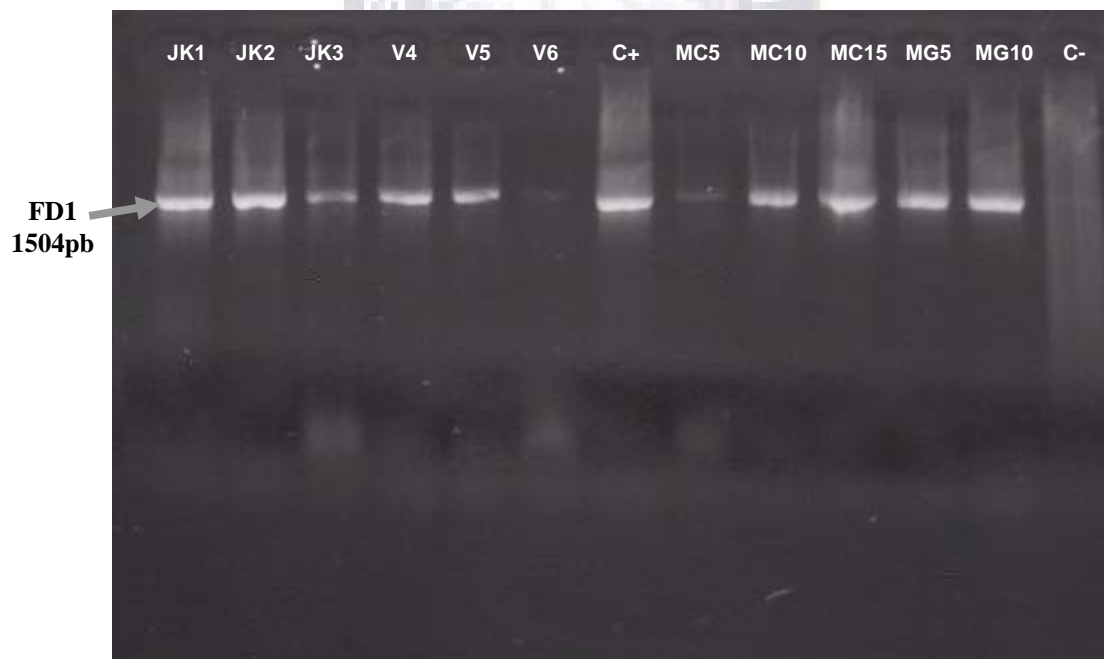


Figura 2. Producto de la amplificación por PCR del gen 16S DNAr

JK = laguna Jankho Khota, V = laguna Ventanani,

MC =desecho minero Milluni Chico, MG = laguna Milluni Grande
1,2,3,10,15,etc. = indican la profundidad en el sedimento.

C+ =Control positivo constituido por la cepa *Desulfovibrio desulfuricans*27774

C - = constituido por el Master Mix sin DNA.

IDENTIFICACIÓN DE LOS SUBGRUPOS DE BSR MEDIANTE NESTED-PCR

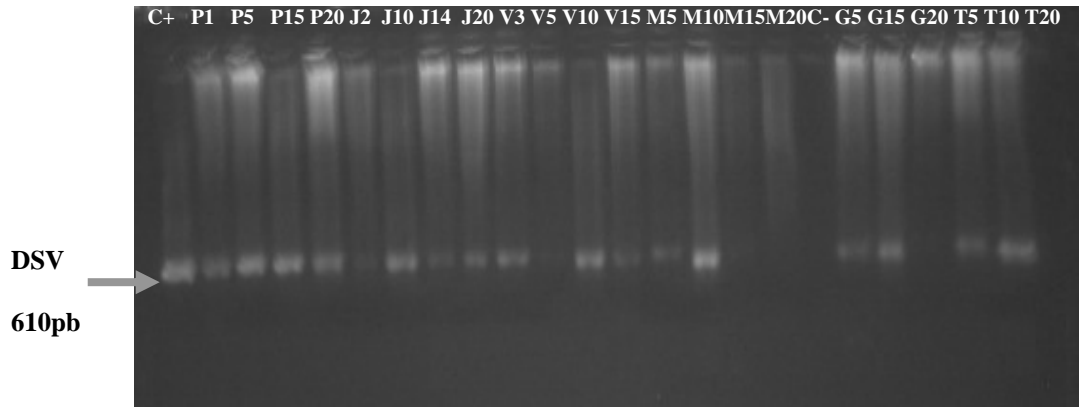


Figura 3. Subgrupo *Desulfovibrio* (DSV), amplificado mediante Nested-PCR

C (+)= *Desulfovibrio desulfuricans*27774, C(-)= DNA de *E. coli*, P=laguna Pata Khota,
J= laguna Jankho Khota, V=laguna Ventanani, M= desecho Milluni Chico,
G =Milluni Grande y T=Turbera TMGS

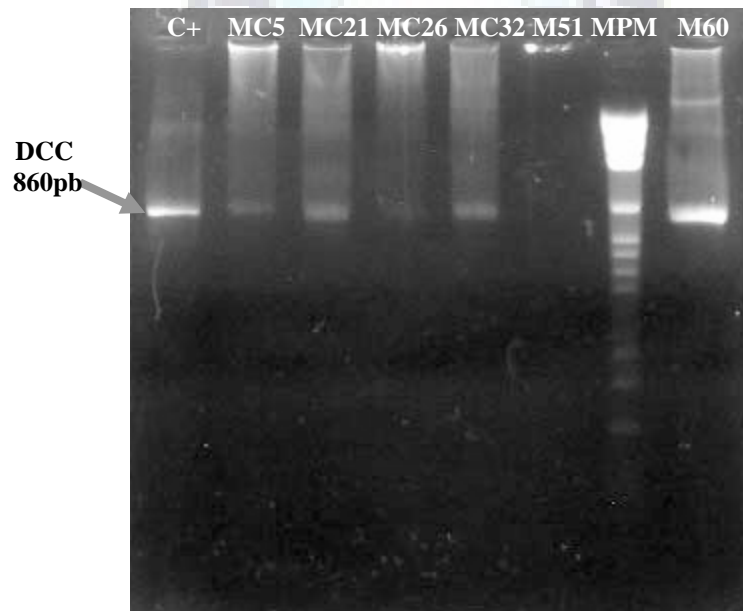
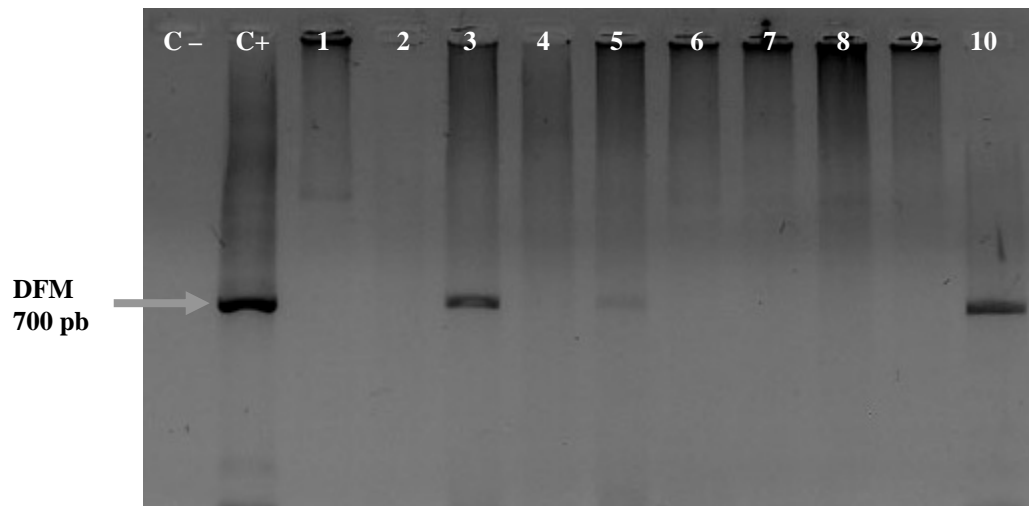


Figura 4. Subgrupo *Desulfococcus* (DCC), amplificado mediante Nested-PCR

Desecho minero Milluni Chico

C+ =*Desulfococcus multivorans*, MPM= marcador de peso molecular pGEM.



**Figura 5. Subgrupo *Desulfotomaculum* (DFM), amplificado mediante Nested-PCR
Laguna Pata Khota**

C(+)=*Desulfotomaculum nigrificans*, C(-) = DNA de *E. coli*