

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Ecología microbiana de minas de cobre de
seis diferentes regiones geográficas**

QUE PRESENTA EL ALUMNA

Guadalupe Ortiz López

Matrícula 2153027922

ASESORES

Interno: Dra. María del Carmen Monroy Dosta (28906), Departamento
El Hombre y su Ambiente UAM



Externo: Dra. Luz de María Bretón Deval, Instituto de Biotecnología UNAM



Ciudad de México a

16 de junio de 2021

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue comparar la estructura de las comunidades microbianas en minas de cobre de diferentes regiones geográficas a partir de datos preexistentes, con la finalidad de encontrar patrones en su composición, y generar nuevo conocimiento sobre los grupos microbianos más eficientes para ser utilizados en estudios posteriores de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados en México. Los metagenomas de seis minas de cobre se obtuvieron del Sequence Read Archive (SRA) del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). A través del procesamiento bioinformático con Qiime2 se realizó la asignación taxonómica de los metagenomas y con los resultados obtenidos y haciendo uso del software R se determinó la abundancia relativa, la diversidad y se realizaron los análisis estadísticos multivariados, por último, se utilizó PICRUST2 para predecir funciones metabólicas.

Los resultados muestran que la mina de Reino Unido es donde se encuentra presente el mayor número de clases. Las *Gammaproteobacterias*, *Actinobacterias* y *Alphaproteobacterias* son las clases más abundantes en todas las minas y cuentan con géneros que poseen características metabólicas relacionadas con la oxidación o reducción de metales. Las predicciones funcionales sugieren la presencia de genes relacionados con la reducción de metales pesados como cobre y mercurio. Los resultados obtenidos pueden favorecer la comprensión de la composición y funciones de las comunidades bacterianas en minas de cobre, identificando aquellas que por su actividad metabólica pudieran ser cultivadas y aprovechadas en diversas partes del mundo y de manera particular en México.

Palabras claves: bioinformática, metagenomas, biorremediación, comunidades microbianas

1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
2.1 La minería	4
2.2 Depósitos de cobre	6
2.3 Producción de cobre	7
2.4 Impacto ecológico de la minería	8
2.4.1 Impacto ecológico de la minería de cobre	9
2.5 Biodisponibilidad de metales en minas	10
2.6 Ciclos biogeoquímicos	11
2.7 Comunidades microbianas	13
2.8 Funciones metabólicas	14
2.8.1 Funciones metabólicas más relevantes en minas	15
2.8.2 Enzimas relacionadas con la remoción de metales	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos particulares	18
4. METODOLOGÍA	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
5.1 Calidad de las secuencias y su influencia en los análisis bioinformáticos de asignación taxonómica	20
5.2 Diversidad en las comunidades microbianas presentes en las minas de cobre	22
5.3 Parámetros físicos y químicos de las minas	27
5.4 Análisis estadísticos multivariados en las minas de cobre	28
5.5 Las funciones metabólicas presentes en los minas de cobre	30
6. CONCLUSIONES	32
7. REFERENCIAS	34

1. INTRODUCCIÓN

La industria minera es una de las principales actividades económicas a nivel mundial, pues es una importante fuente de ingresos para los países en vías de desarrollo, que son ricos en recursos naturales y se dedican a la explotación y exportación de materia prima mineral; por otra parte, los países industrializados aprovechan esta materia prima y la transforman para su explotación (Miquel y Cano, 2013).

Extraer materias primas minerales tiene como consecuencia la contaminación y la modificación del entorno, por lo que las actividades relacionadas con la industria minera se consideran de alto impacto en el ambiente (Quiñones, 2017).

Los residuos del proceso de extracción que se acumulan en la intemperie generan aguas ácidas de drenaje como consecuencia del contacto de estos residuos con agua y oxígeno atmosférico (Aduvire, 2006). Las aguas ácidas se caracterizan por tener valores de pH muy bajos, un elevado contenido de metales pesados y otros elementos tóxicos disueltos como plomo, zinc, cobalto y hierro. A pesar de que este es un proceso que ocurre de forma natural, la actividad minera promueve la presencia de minerales expuestos que quedan a disposición de las bacterias de distribución natural (Akcil y Koldas, 2006).

Las comunidades microbianas de las zonas mineras presentan una composición, diversidad y dinámica muy particular, que varía dependiendo de las características físicas y químicas del ambiente en el que se encuentran y a la capacidad de los diferentes organismos para acumular, neutralizar u óxido-reducir los metales pesados presentes en el ambiente (Rodrigues *et al.*, 2014).

La presencia de altas concentraciones de metales inhibe el crecimiento de la mayoría de los géneros bacterianos y disminuyen la concentración de proteínas en sus células (Hussein y Joo, 2013). Sin embargo, géneros como *Thiobacillus*, *Thauera*, *Klebsiell*, *Acidimicrobiia*, *Leptospirillum*, *Acidithrix*, *Acidithiobacillu* y

Sulfobacillus tienen la capacidad de vivir exitosamente en medios ricos en metales y tienen las estrategias metabólicas para emplearlos, excretarlos o neutralizarlos.

La presencia de ciertas funciones en una comunidad microbiana puede ser un indicador del estado de un sistema, es por esto que el estudio de las comunidades microbianas presentes en las minas nos permite inferir sobre las funciones de las poblaciones que las conforman, permitiendo la evaluación del sistema y el análisis de características metabólicas de interés para un futuro aprovechamiento industrial en el campo de la biorremediación.

Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo comparar la estructura de las comunidades microbianas de minas de cobre de diferentes regiones geográficas a partir de datos preexistentes, con la finalidad de encontrar patrones en su composición y generar nuevo conocimiento que será aplicado en estudios posteriores de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados en México.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 La minería

La minería es una actividad económica que consiste en la exploración, explotación y aprovechamiento selectivo de minerales y otros elementos, como gas natural, de yacimientos (INEGI, 2010).

El aprovechamiento y comercio de las materias primas minerales por la industria minera tiene un gran impacto en la economía global. Esencialmente la explotación y exportación de materias primas minerales se da en países en vías de desarrollo, como China, Chile y México, y algunos países industrializados que son ricos en

recursos naturales, como Canadá, por otra parte, los países que más consumen materias primas minerales son los países más industrializados, como Japón y la Unión Europea (Miquel y Cano, 2013).

En minería los depósitos son acumulaciones minerales de interés para su uso y aprovechamiento, es decir que sea valioso y sea requerido por el mercado. Para que un depósito sea considerado un yacimiento debe contar con ciertas características (SGM, 2017).

Se considera yacimiento minero a un punto de la corteza terrestre donde se concentran y acumulan elementos debido a diversos procesos geológicos (ígneo, sedimentario o metamórfico), esto permite que, por su cantidad, calidad y condiciones la explotación sea rentable (Oyarzun *et al.*, 2010). Estos yacimientos se pueden dividir en líquidos, gaseosos y sólidos; en el caso de las minas de metales se presentan en forma sólida.

2.1.1 La minería en México

La industria minero-metalúrgica ha tenido un importante impacto en el desarrollo económico de México, según el INEGI en 2018 contribuyó con el 2.4% del Producto Interno Bruto nacional. A nivel mundial México se ubica entre los 10 principales productores de 16 diferentes minerales: plata, bismuto, fluorita, celestita, wollastonita, cadmio, molibdeno, plomo, zinc, diatomita, sal, barita, grafito, yeso, oro y cobre (Secretaría de Economía, 2021).

La inversión en la industria minera suele venir de empresas con capital extranjero. Para el 2015 se reportaron 267 empresas extranjeras, en su mayoría de Canadá, que eran propietarias de 927 proyectos mineros, el 68% en etapa de exploración; el 64.2% de estos proyectos son para la extracción de oro y plata, un 14.2% de sustancias polimetálicas y el 12.8% de cobre (Bastidas-Orrego *et. al.*, 2018).

2.2 Depósitos de cobre

El cobre es un elemento químico metálico, de color rojo pardo y brillante. Se explota para su uso en múltiples industrias, debido a su alta conductividad eléctrica, gran resistencia a la corrosión, estabilidad química, plasticidad, tiene propiedades bactericidas y capacidad para formar aleaciones con gran cantidad de metales. Es un tipo de polimetalo que se extrae de minas de cobre, cobre-molibdeno y cobre-níquel (Vassallo, 2008).

Dependiendo del tipo de formación que tienen los yacimientos estos se asocian a diferentes grupos de rocas, por lo que existen distintos tipos de depósito de cobre, los cuales se conocen como menas. El cobre suele relacionarse con magmas basálticos y graníticos; bajo condiciones exógenas hay concentraciones de cobre en las zonas de enriquecimiento supergénico producidas por menas de sulfuros y en zonas sedimentarias terrígenas lagunares-deltaicas y cercanas a las costas de las cuencas marinas (Vassallo, 2008).

Los sistemas de tipo pórfido cuprífero representan la principal fuente de cobre conocida, estos se relacionan con la presencia de abundante magmatismo. A pesar de esto este tipo de yacimiento no son exclusivos de alguna región de la Tierra en particular (Valencia-Moreno et. al, 2006).

Se conocen más de 170 minerales de cobre, pero con significado económico solo 17, cobre nativo, calcopirita CuFeS_2 , bornita Cu_5FeS_4 , cubanita CuFe_2S_3 , calcosina Cu_2S , covellita CuS , tennantita $3\text{Cu}_2\text{SAs}_2\text{S}_3$ (Vassallo, 2008).

2.3 Producción de cobre

Las reservas de cobre mundial son de: 345 millones de toneladas -exploradas y 465 millones de toneladas -generales. Las menas ricas contienen Cu con una ley de 3 a 2.5 %, las marginales de 2.5 a 1 % y las pobres de menos de 0.5 %. Los grandes pórfidos cupríferos se explotan con leyes de menos de 0.5 % de cobre (Vassallo, 2008).

En 2018, se produjeron alrededor de 21 millones de toneladas métricas de cobre en todo el mundo, lo que supone un ligero aumento respecto al año anterior. Existen diversos productores de cobre alrededor del mundo entre los cuales destacan Australia, EE.UU., China, Perú y Chile (Figura 1). Siendo este último el mayor productor a nivel mundial al contar con una de las minas de cobre más grandes en cuanto a productividad. La mina Escondida en Chile tiene una capacidad de producción de aproximadamente 1,4 millones de toneladas métricas (Sevilla, 2019).

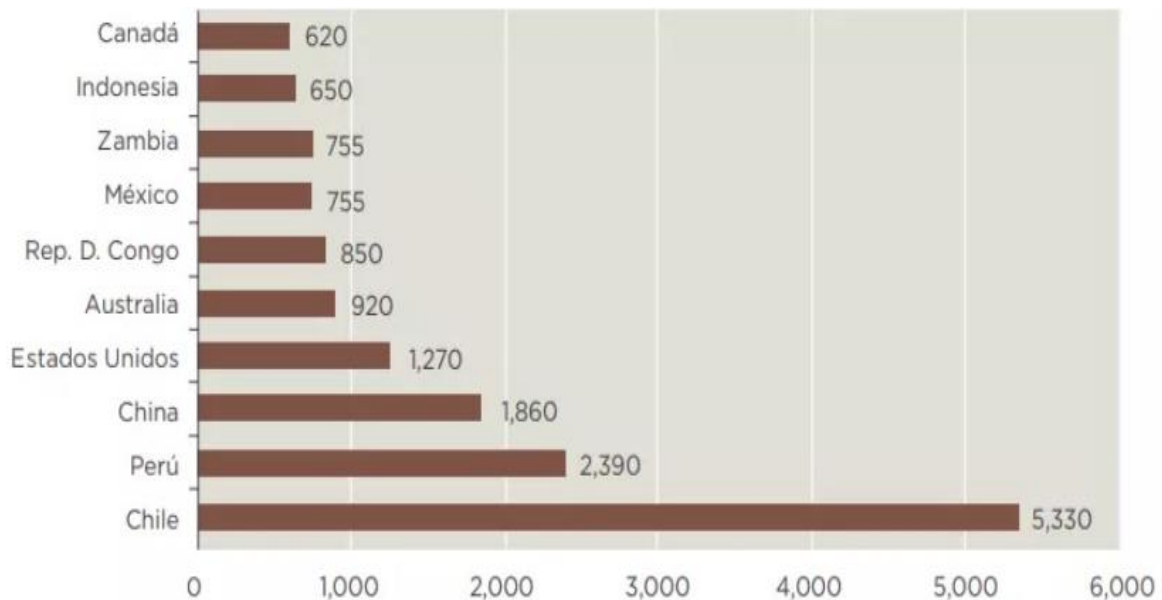


Figura 1. Gráfica que muestra los principales productores de cobre a nivel mundial (International Copper Study Group, 2017).

2.4 Impacto ecológico de la minería

Los principales problemas de la minería son los que atañen al medio ambiente y la salud, pues algunos de los elementos que se extraen son tóxicos y muchos de los procesos para su extracción contaminan el ambiente (Miquel y Cano, 2013).

La industria minera es una de las que más contaminan el medio ambiente y depende del tipo de minería el impacto ecológico que genera. En primera instancia el desplazamiento de miles de toneladas de tierra provoca sedimentación en los ríos y vulnerabilidad a erosión eólica e hídrica; la salinización, secamiento y escasez de agua por las enormes cantidades de agua dulce que requiere el proceso de extracción; la liberación y migración de metales pesados en el ecosistema; además de la generación de aguas de drenaje ácido (Quiñones, 2017).

La extracción de minerales metálicos es la que tiene mayor impacto sobre el ambiente, pues los residuos de este proceso se acumulan en jales mineros donde quedan expuestos a la intemperie. Los sulfuros presentes en los residuos, al entrar en contacto con el oxígeno atmosférico y el agua forman aguas ácidas de drenaje, caracterizadas por tener valores de pH muy bajos, un elevado contenido de metales pesados y otros elementos tóxicos disueltos como plomo, zinc, cobalto y hierro (Akçil y Koldas, 2006). Un ejemplo de esto es la pirita, la cual se oxida liberando sulfatos, hierro y otros elementos tóxicos como cadmio, cobalto, arsénico y plomo (Grande *et al.*, 2010).

2.4.1 Impacto ecológico de la minería en México

La industria minera en México tiene un impacto ambiental negativo que se han presentado principalmente en las etapas de explotación. Esta dinámica ha traído como consecuencia el incremento de los conflictos entre las empresas mineras y

las comunidades donde se ubican los proyectos, ya sea que estén en etapa de exploración o explotación (Bastidas-Orrego et. al, 2018).

Las estrategias gubernamentales en México parten de una visión correctiva del daño ambiental y no preventiva, lo que significa que no se encaminan a evitar los daños ambientales, sino a asegurar que quienes los provocan realicen medidas de mitigación (FUNDAR, 2002). Los efectos de la minería en diversas regiones de México tienen un impacto diverso como lo son la destrucción de áreas de cultivo, la sobreexplotación de acuíferos, contaminación de agua, cráteres, cerros artificiales de desechos sólidos y sustancias tóxicas expuestas en la superficie del suelo, efectos de difícil mitigación y que dificulta que las comunidades permanezcan con los medios de vida tradicionales (Guzmán-López, 2016).

2.4.2 Impacto ecológico de la minería de cobre

La industria minera genera enormes cantidades de desechos sólidos y ocupa grandes cantidades de tierra, para poder producir una tonelada de cobre es necesario procesar 497 toneladas de materiales sólidos, entre los cuales se encuentra tierra fértil, vegetación y subsuelo sin cobre (Zorrilla, 2013).

Para producir una tonelada de cobre puro se requiere decenas de miles de litros de agua. Tan solo en la mina de cobre El Mirador, en Zamora Chinchipe, se prevé utilizan cerca de 12 millones de litros por día solo para explotar y concentrar el equivalente a 200 toneladas cobre. Sin contar los miles de galones que son desviados a los ríos de las zonas cercanas para evitar inundaciones en las minas (Zorrilla, 2013).

Para poder explotar, procesar y transportar los minerales, la industria minera utiliza miles de millones de galones de hidrocarburos anualmente, la producción de una tonelada de cobre puro genera no menos de 5000 kilogramos de dióxido de carbono. Además, es una de las industrias que utiliza más energía eléctrica,

aproximadamente consume 10% de la electricidad generada a nivel mundial y en algunos casos, como Chile, se aproxima al 50% de la energía producida en todo el país (Zorrilla, 2013).

2.5 Biodisponibilidad de metales en minas

La biodisponibilidad se refiere a la proporción de un elemento que está disponible para los organismos vivos y se define como la relación entre la concentración del elemento en el medio ambiente terrestre y el nivel del mismo en el organismo (Naidu *et al.*, 2008).

La biodisponibilidad de un metal pesado es la fracción del mismo que se encuentra disponible para las plantas, aunque la capacidad de absorción de estas no tiene relación con la concentración del mismo (Paredes-Delgado, 2012). La biodisponibilidad varía dependiendo de las propiedades químicas del suelo, como el pH, contenido y tipo de arcilla, la presencia de materia orgánica, óxidos de Fe, Al y Mn, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico, cationes y aniones solubles. Además, su incorporación a la cadena trófica dependerá del tipo de metal pesado (Rodríguez-Pacheco, 2011).

Desde el punto de vista ecológico la fracción biodisponible de contaminantes en el suelo es la más importante, pues estos contaminantes causan toxicidad para los organismos vivos y afectan su capacidad para alimentarse en esta fracción (Zhang y Young, 2006).

Los suelos de zonas mineras suelen presentar un elevado nivel de contaminación por metales pesados, incluso varios años después del abandono de la explotación minera esto en parte por la baja biodisponibilidad de los metales en los suelos contaminados (Kidd y Monterroso, 2003).

2.6 Ciclos biogeoquímicos

Todos los nutrientes fluyen de los componentes no vivos del ecosistema a los vivos como parte de diversos procesos biológicos y no biológicos en lo que se conoce como ciclos biogeoquímicos. Existen dos tipos de ciclo biogeoquímico, que dependen de la fuente principal de entrada de los nutrientes al ecosistema y que se divide en gaseosos y sedimentarios. Los ciclos gaseosos tienen como fuente principal de nutrientes la atmósfera y los océanos, los principales tipos de ciclo gaseoso son los del carbono, nitrógeno y oxígeno (Smith *et al.*, 2007).

En los ciclos sedimentarios el reservorio principal son el suelo, las rocas y los minerales. Los elementos minerales que los seres vivos requieren provienen de fuentes inorgánicas, disponibles en las sales disueltas del agua y el suelo. Existen muchos tipos diferentes de ciclos sedimentarios, un ejemplo es el ciclo mineral, el cual varía de un elemento a otro, pero todos consisten en dos fases: la fase rocosa y la fase de solución salina (Figura 2) (Smith *et al.*, 2007).

La minería incrementa la concentración de metales pesados en el suelo, que según su forma de asociación pueden solubilizarse durante las modificaciones fisicoquímicas estacionales. Las variaciones ambientales como los cambios en el pH y el potencial Redox permiten que los metales presentes en el suelo sean liberados a la columna de agua, de esta forma los metales acumulados en el suelo se reducen lentamente mediante la lixiviación, el consumo por las plantas, la erosión y la deflación (Rosas-Rodríguez, 2005).

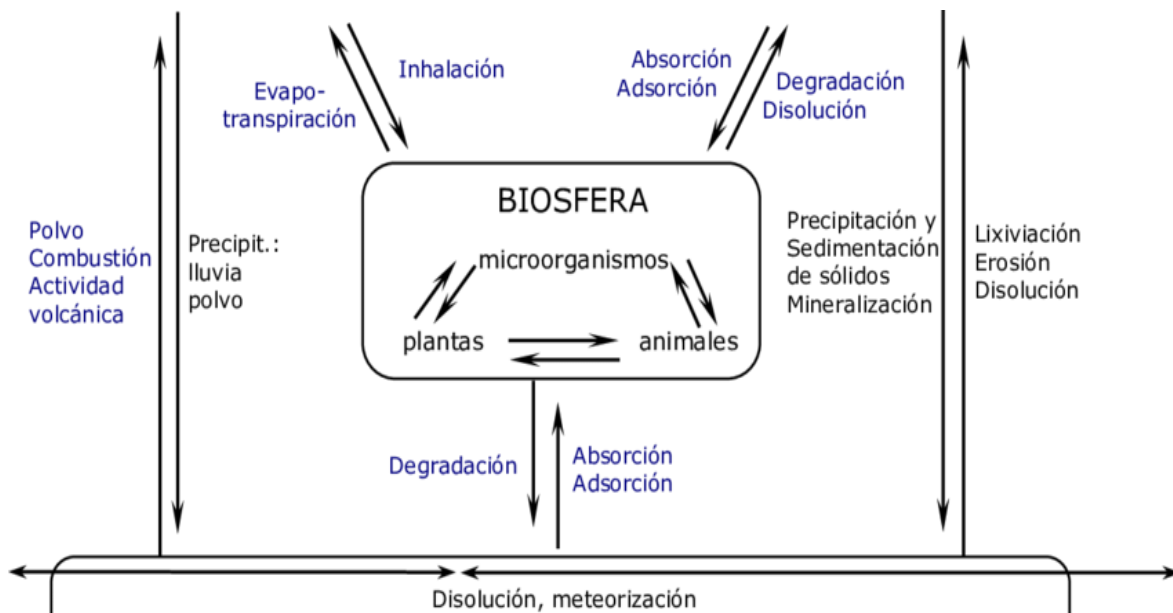


Figura 2. Diagrama del ciclo biogeoquímico general de los metales pesados. Tomado de *Contaminación de sedimentos del río Anoaia por metales pesados (Barcelona-España)* (p. 78), Rosas-Rodríguez, 2005.

La actividad microbiana en el suelo juega un papel importante en los ciclos biogeoquímicos, dependiendo del tipo de metal un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles; la lixiviación microbiana, que permite la movilización de un metal de su fase sólida inicial a una fase acuosa y por otra parte la inmovilización del metal, es decir el paso de la fase acuosa inicial a una sólida (Vullo, 2003).

En el caso del cobre, su ciclo consiste en una serie de reacciones químicas (Redox) que le permiten integrarse al suelo por medio de la mineralización y desmineralización. El cobre se asocia a la arcilla y materia orgánica, quedando de esta forma disponible para el aprovechamiento de algunos organismos (Smith *et al.*, 2007).

Un ejemplo de la acción microbiana en los ciclos biogeoquímicos es la biolixiviación, el proceso mediante el cual los metales presentes en los minerales son extraídos de su fase acuosa (Figura 3). Este método se usa en la minería para obtener Cu por

la oxidación del Cu_2S (calcocita) a CuSO_4 por acción de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans* (Vullo, 2003).

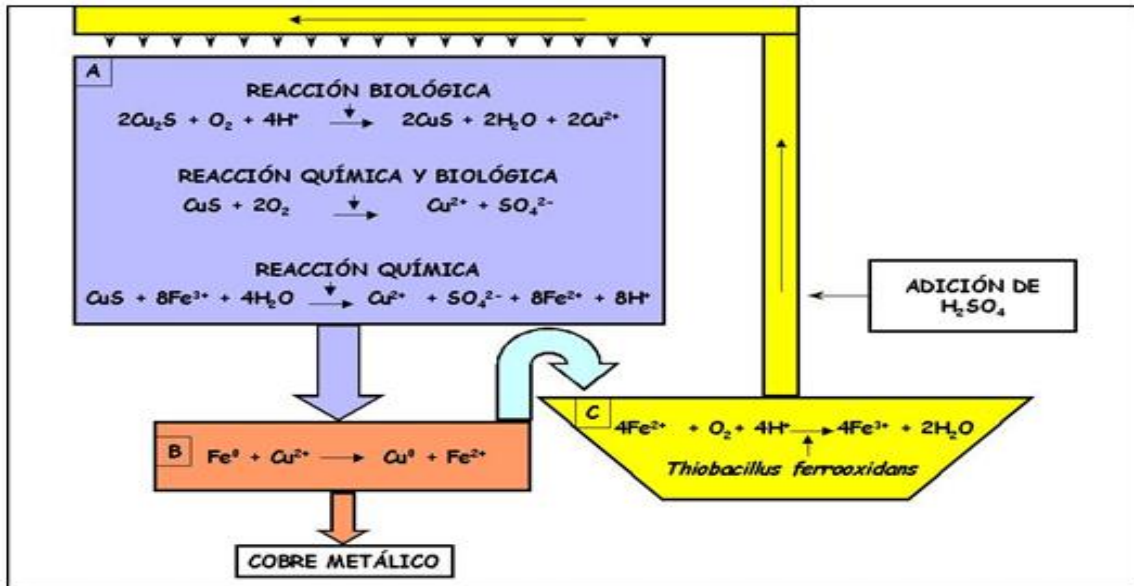


Figura 3. Diagrama del proceso de biolixiviación aplicado a la minería de cobre. A: solubilización del mineral; B: obtención de Cu metálico y C: Recuperación y recirculación del Fe^{3+} . Tomado de *Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente* (p. 97), Vullo, 2003.

2.7 Comunidades microbianas

Las comunidades microbianas consisten en poblaciones de varias especies; que interactúan entre sí desarrollando múltiples actividades funcionales al interior de la comunidad (Díaz-Ruiz y Wachter-Rodarte, 2003). En términos de ecología microbiana, la abundancia y distribución de las especies, pueden ser usadas para describir la estructura de la comunidad en función de las concentraciones y variabilidad de factores físicos, químicos y biológicos.

La importancia del estudio de las comunidades bacterianas recae en el conocimiento de la diversidad biológica global y su relación con los ciclos biogeoquímicos que tienen lugar en el planeta (López y Zaballos, 2005), pues los

microorganismos son capaces de aprovechar los nutrientes y elementos presentes en el suelo. Además, se encargan de reciclar los nutrientes regulando la disponibilidad de los mismos para otros organismos, como las plantas, que constituyen la base de la cadena alimentaria (Guerrero y Berlanga, 2005).

Existen diversos microorganismos capaces de modificar las especies iónicas metálicas; por ejemplo, algunas *Alfaproteobacterias* favorecen la movilización y disponibilidad de metales pesados para su acumulación en plantas metalófitas. Por otro lado, algunas de las especies bacterianas que juegan un papel importante en la asimilación de metales son: *Burkholderia pickettii*, *Burkholderia solanacearum*, *Alcaligenes eutrophus*, *Arthrobacter ramosus* y *Arthrobacter aurescens*, así como taxones de los géneros *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Comamonas* y *Agrobacterium* (González-Chávez, 2005).

2.8 Funciones metabólicas

Son procesos biológicos esenciales que permiten la obtención y almacenamiento de energía, formar y degradar moléculas y formar estructuras bioquímicas complejas (Varela y Grotiuz, 2008).

Conocer las funciones metabólicas es esencial para entender la actividad biológica de los distintos grupos bacterianos, pues además de participar en el flujo de energía y carbón (Junco-Díaz y Rodríguez-Pérez, 2001), también facilitan la supervivencia bajo condiciones extraordinarias al proveer a los microorganismos de capacidades funcionales y estrategias ante los contaminantes del medio ambiente en el que se desarrollan (Ridderberg y Jacobs, 2019).

Estas características metabólicas específicas de un microorganismo constituyen el principal criterio para determinar su papel ecológico, su responsabilidad en los ciclos biogeoquímicos y su utilidad en los procesos industriales (Ye y Doak, 2009).

2.8.1 Funciones metabólicas más relevantes en minas

Los ambientes modificados por la minería suelen presentar altas concentraciones de sustancias tóxicas, como lo son los metales pesados, estas alteran el metabolismo celular bloqueando moléculas fundamentales. Es por este motivo que los diferentes grupos bacterianos han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir ante la acción tóxica de los metales pesados presentes en el ambiente (Gutiérrez *et al.*, 2019).

La reducción de sulfato es un proceso biológico realizado de forma natural por microorganismos reductores de sulfato. Las bacterias sulfato reductoras son microorganismos anaerobios obligados, los cuales usan como aceptor final de electrones el sulfato (Lens y Kuenen, 2001) y oxidan productos y subproductos de la fermentación para producir ácido sulfhídrico H_2S y bicarbonato. Este procedimiento logra remover el sulfato y la acidez del medio, además de generar precipitados insolubles como producto de la reacción entre el ácido sulfhídrico H_2S y los metales catiónicos (Pérez *et al.*, 2017).

En los ambientes contaminados, como los son las minas, se pueden encontrar altas concentraciones de metales tóxicos para los organismos. La presencia de metales pesados inhibe el crecimiento bacteriano y disminuyen la concentración de proteínas en las células bacterianas (Hussein y Joo, 2013), es por esto que los diferentes grupos bacterianos utilizan técnicas que permiten la remoción de metales del medio.

El cobre en altas concentraciones resulta tóxico para los microorganismos, es por esto que algunos grupos bacterianos han generado sistemas de resistencia ante la presencia de este metal. Uno de estos sistemas es transmitido por plásmidos que codifican para PcoA, una proteína multicobre oxidasa responsable de la oxidación de $Cu(I)$ en el espacio periplasmático; el segundo sistema es la bomba de flujo

ATPasa CopA, la cual arroja los iones de cobre al exterior; el último de los sistemas más común es el Cus (sistema de flujo de cobre con detección de cobre) perteneciente a la familia de división celular de nodulación de resistencia (RND) responsable de la exportación de metales pesados (HME-RND) que codifica especialmente para la proteína CusA (Rehan y Alsohim, 2019).

En algunos casos las bacterias evitan la toxicidad del plomo al precipitarlo como una sal de fosfatos. El plomo ingresa a las células a través de transportadores de Fe^{2+} y Ca^{2+} , por lo que los sistemas de resistencia más comunes se basan en el flujo de salida, como las bombas quimiosmóticas y las ATPasas tipo P, las cuales remueven iones del citoplasma y también se utilizan en la resistencia al cadmio en conjunto con los transportadores CBA, que exportan los iones periplásmicos al exterior de la célula (Rehan y Alsohim, 2019).

Cerca del 20% de los grupos bacterianos poseen selenoproteínas, las cuales se encargan de desintoxicar y remover iones libres de selenio del citoplasma. El selenio también puede ser reducido por acción enzimática, usando tiorredoxina y su reductasa (TrxA y TrxB) u otras reductasas de oxianión (Rehan y Alsohim, 2019).

2.8.2 Enzimas relacionadas con la remoción de metales

La actividad enzimática regula las funciones biológicas de los microorganismos, por esto la presencia o ausencia de ciertas enzimas indica las interacciones entre las comunidades microbianas y su ambiente (Kharchenko *et al.*, 2013).

Las bacterias utilizan funciones que les permite resistir la toxicidad de los metales pesados. Uno de estas funciones es el bloqueo de metales tóxicos por medio de oligopéptidos como el tripéptido glutatión GSH (Gutiérrez *et al.*, 2019).

Por otro lado, las metalo enzimas son las encargadas de dirigir a los factores involucrados en la catálisis, incluido el tráfico de metales. Estas poseen una alta

selectividad de metales, utilizando exclusivamente un solo elemento de metal para las reacciones dedicadas. Sin embargo, con mayor frecuencia de lo esperado, numerosas metalo enzimas muestran la promiscuidad del metal al emplear más de un elemento metálico (Eom y Song, 2019).

Las monooxigenasas del citocromo P450 son una gran superfamilia de proteínas que se sabe que catalizan la oxigenación de una amplia variedad de fármacos lipofílicos, compuestos endógenos y agentes ambientales (Ding et al., 2018).

También existen compuestos liberados por los microorganismos, como los ligandos, estos ayudan a mantener en solución al metal hierro, cuando estos ligandos reaccionan con un ion metálico se forma un quelato. Los quelatos fabricados por microorganismos son conocidos como sideróforos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

Como ya se mencionó la contaminación por metales pesados en México es un problema que va en aumento debido a la actividad antrópica, específicamente la minería. Los metales contaminantes más importantes en México, dada su toxicidad y abundancia son: mercurio, arsénico, plomo y cromo. Entre los sitios más afectados por las altas concentraciones de metales pesados en suelos se encuentran los estados de Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí. Una alternativa para contribuir a la solución de este problema, es el uso de microorganismos que están presentes naturalmente en las minas (Eom y Song, 2019). La detección y tipificación de microorganismos de ambientes mineros, macro o microscópicamente mediante su cultivo con medios selectivos requiere de varios días y en algunos casos su identificación llega solo a nivel de género, mientras que la biología molecular ha demostrado ser una herramienta poderosa, que ha logrado expandir nuestro conocimiento de la diversidad microbiana y su fisiología. Por lo que han tenido una valiosa aplicación en la tipificación de consorcios bacterianos de la industria minera, los grupos fisiológicos bacterianos más importantes, los genes que les permite hacer una mejor oxidación de los metales y con ello obtener cepas para su aplicación en las zonas contaminadas por la minería. En este estudio se utilizaron cepas bacterianas asociadas a minas de diferentes regiones geográficas que por

tenerlas ya disponibles facilita su estudio y su aplicación en diversas partes del mundo, como lo es México.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Comparar la estructura y funciones de las comunidades microbianas en seis minas de cobre de diferentes regiones geográficas a partir de datos preexistentes con la finalidad de encontrar patrones en la composición de las comunidades, a través de diversas técnicas de procesamiento bioinformático y generar nuevo conocimiento que será aplicado en estudios posteriores de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados en México.

3.2 Objetivos particulares

- Conocer a través del procesamiento bioinformático la diversidad de las comunidades microbianas presentes en minas de cobre geográficamente diversas.
- Analizar estadísticamente la relación entre los grupos que integran la comunidad microbiana y las correlaciones que se pueden establecer con los factores ambientales.
- Conocer a través del procesamiento bioinformático las funciones metabólicas de las comunidades microbiana encontradas en las minas de cobre estudiadas.

- Generar conocimiento aplicable a estudios de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados en México.

4. METODOLOGÍA

Para realizar el trabajo se seleccionaron los metagenomas de seis minas de cobre localizadas en Brasil (-6.410380, -50.051937), Canadá (48.591154, -81.605020), China (30.900278, 117.830556), Portugal (37.668889, -7.493889), Reino Unido (53.386940, -4.344440) y Bulgaria (43.390861, 22.895472) (Figura 1), esta información se obtuvo del Sequence Read Archive (SRA) del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) dentro del apartado de BioProjects, donde los metagenomas se encuentran públicos.



Figura 4. Mapa de las minas de cobre a las cuales pertenecen los metagenomas utilizados para el estudio.

Se verificó la calidad de los metagenomas seleccionados y posteriormente se realizó el procesamiento bioinformático de los mismos empleando el programa Qiime2 Core 2019.10 (Bolyen *et al.*, 2019). Este paquete de análisis de microbiomas permitió filtrar las secuencias de 16s, así como identificar las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) y llevar a cabo la asignación taxonómica.

Con la información obtenida del procesamiento bioinformático y haciendo uso del software R-3.6.3 (R Core Team, 2020) se determinó la abundancia relativa y la alfa-diversidad de las muestras con sus respectivos gráficos, utilizando el paquete phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). Además, se realizaron análisis estadísticos multivariados como el Análisis de Componentes Principales (ACP), haciendo uso del paquete FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) y el Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) utilizando el paquete vegan (Oksanen, *et al.*, 2019).

También se hizo uso del software PICRUST2 v2.3.0-b (Douglas, 2015) para realizar predicciones de las funciones metabólicas en base a los marcadores filogenéticos, con la finalidad de detectar aquellas funciones de mayor relevancia en el procesamiento de contaminantes en el suelo de mina.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Calidad de las secuencias y su influencia en los análisis bioinformáticos de asignación taxonómica

De acuerdo a la calidad de las secuencias, los fragmentos de ADN tienen un promedio de 280 pares de bases (Tabla 1). Además, se puede observar que la cantidad total de datos secuenciados por muestra no afecta al número de Unidades Taxonómicas Observadas (OTU) (Figura 5).

Tabla 1. Calidad de las secuencias seleccionadas

Nombre de la mina	Tamaño fragmentos (forward)	Tamaño fragmentos (reverse)	No. secuencias	Nivel de calidad	No quiméricas	% Final
Canadá	251 pb	251 pb	16944	> 20	5686	33.56
China	287 pb	300 pb	173842	> 20	1413	0.81
Brasil	301 pb	301 pb	141765	> 20	9681	6.83
Bulgaria	288 pb	300 pb	41193	> 20	1859	4.51
Reino Unido	300 pb	NA	1402565	> 20	252211	17.98
Portugal	251 pb	Na	82600	> 20	24798	30.02

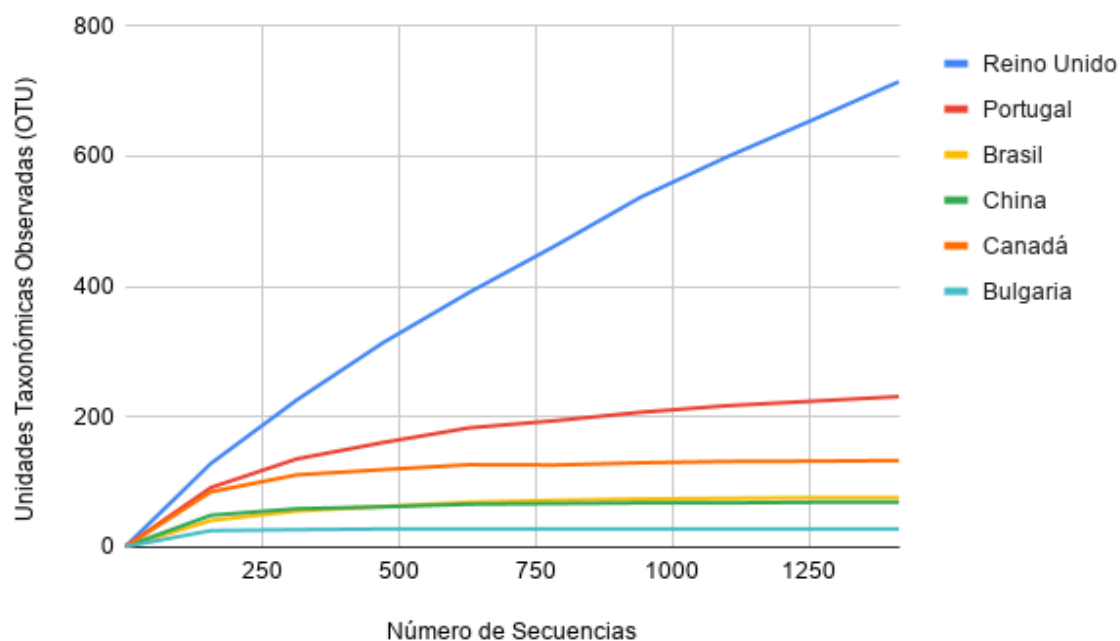


Figura 5. Relación entre el número de secuencias utilizadas y las Unidades Taxonómicas Observadas.

5.2 Diversidad en las comunidades microbianas presentes en las minas de cobre

La diversidad de las muestras se estimó utilizando el índice de Shannon-Weaver (H'_e), el cual mostró una diversidad significativa en las seis minas, siendo la mina de Reino Unido la que mayor diversidad presentó con un valor de 5.4 (Figura 6). La comunidad con menor diversidad fue Bulgaria con 2.2. Según Magurran (1988) en varios estudios ecológicos los valores del índice de Shannon (H'_e) van de 1.5 a 3.5 y raramente pasan de 4.5 en presencia de diversidades muy altas.

También se calculó el índice de Chao 1, que estima la cantidad de especies en una comunidad (Kim *et al.*, 2017), haciendo evidente la diferencia de diversidad entre minas. Las minas de Brasil y Canadá presentaron una diversidad similar con valores de 61 y 65 respectivamente, mientras que la mina de Bulgaria presentó una menor diversidad con un valor de 12 seguido de China con 31. Por otro lado, las minas de Portugal y Reino Unido poseen una mayor diversidad con valores de 432 y 849 respectivamente (Figura 6).

El comportamiento de los dos índices en las muestras fue similar, en ambos casos la mina de Reino Unido fue la más diversa y la de Bulgaria la menos diversa. Sin embargo, al comparar el índice de Shannon con el de Chao se pudo observar la diferencia de diversidad entre las distintas muestras, especialmente al comparar las minas de Portugal y Reino Unido con la de Bulgaria y China cuyas diversidades fueron significativamente menores (Figura 6).

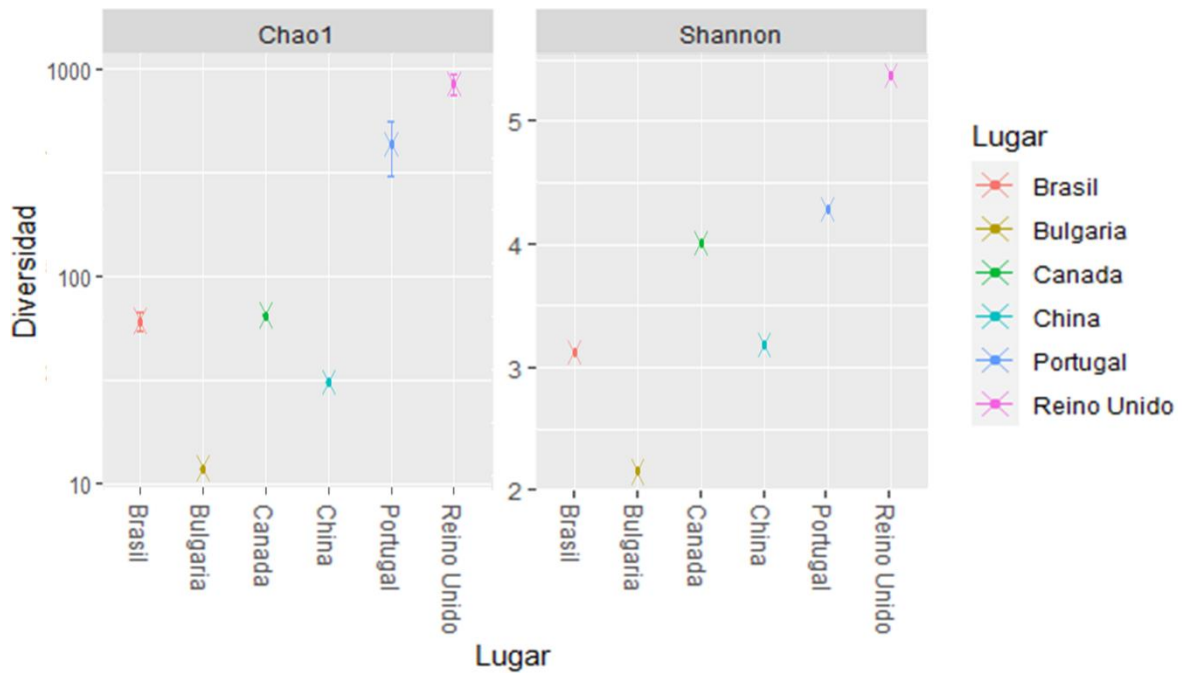


Figura 6. Comparación del índice de diversidad de Shannon y Chao en las seis minas de cobre.

El índice de Pielou indicó, en general, una alta equidad de distribución de microorganismos en las muestras. Los valores más altos fueron de las minas de Canadá y China con 0.93 y 0.96 respectivamente, seguidos por las minas de Portugal y Reino Unido con un valor de 0.92 en ambas. Las comunidades que presentaron una menor equidad en la abundancia de clases fueron las correspondientes a las minas de Brasil y Bulgaria con valores de 0.79 y 0.87 respectivamente (Figura 7). Estos valores indican la presencia de algunas clases predominantes en las muestras, como *Nitrososphaeria*, *Gemmatimonadetes* y *Gammaproteobacteria* en Brasil y *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* en la mina de Bulgaria.

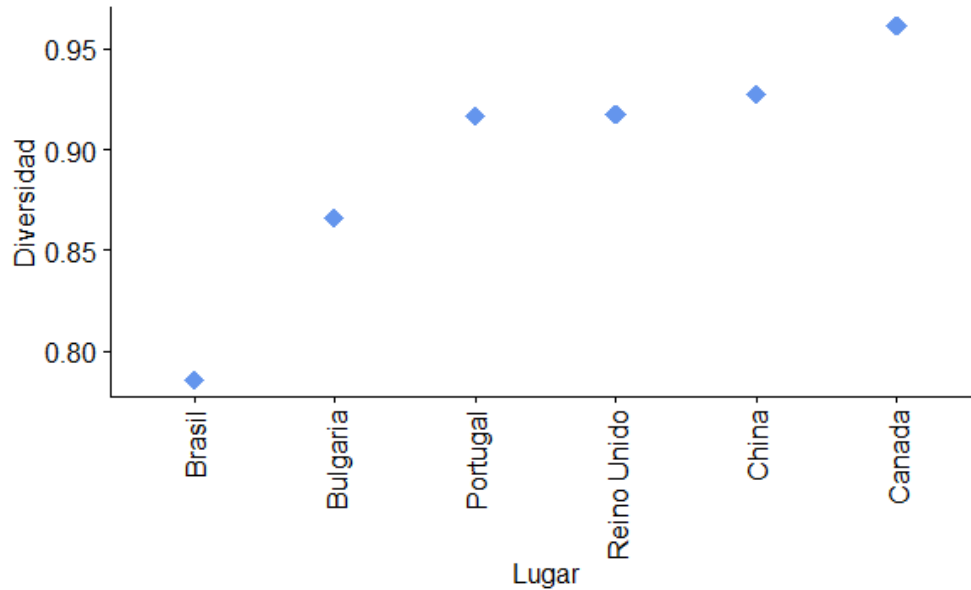


Figura 7. Representación de los valores del índice de equidad de Pielou para las diferentes minas.

En las seis minas se calculó la abundancia relativa al nivel de clases bacterianas y se observó que en casi todas las muestras la clase *Gammaproteobacteria* se encontró presente con abundancias por encima del 19% y solo la muestra de Brasil presentó una abundancia del 6.1% (Figura 8). La abundancia de esta clase es común en minas y su presencia se relaciona con la oxidación de amoníaco a nitritos y de nitritos a nitratos (Mori *et al.*, 2019).

Según la abundancia relativa por clases bacterianas, en la muestra de Brasil las clases más abundantes fueron *Nitrososphaeria* con una abundancia del 23.4%, seguido por *Gemmatimonadetes* con el 9.9% y *Deltaproteobacteria* con 5.2%. En la mina de Bulgaria hay una abundancia de 9.4% en la clase *AD3* y 7.2% de *Alphaproteobacteria*; en la mina de Reino Unido la clase *Alphaproteobacteria* obtuvo una abundancia de 9.3%, *Acidimicrobiia* 6.4% y 6.3% para *Bacteroidia* y *Clostridia*. Las clases más abundantes en la mina de China fueron *Actinobacteria* con una abundancia de 36.5%, *Bacteroidia* con 18.3% y *Acidimicrobiia* con 8.7%. En el caso de Portugal las clases más abundantes fueron *Bacteroidia* con 28.1%, *Alphaproteobacteria* 16.1%, *Actinobacteria* 5.9% y *Deltaproteobacteria* 5.7%; y por

último la mina de Canadá tuvo una abundancia de 16.9% en la clase *Alphaproteobacteria* y las clases *Planctomycetes* y *Acidobacteriia* con una abundancia de 10% cada una (Figura 8).

Bacteroidia suele ser una clase abundante en minas y otros ambientes, aunque hay poca información sobre su papel y resistencia en ambientes oxidados (Mesa *et al.*, 2017). Las *Alphaproteobacterias* también participan en el ciclo del nitrógeno y su presencia en suelos contaminados por metales pesados suele ser mayor (Sandaa *et al.*, 2001). La presencia de *Actinobacterias* puede deberse a la alta disponibilidad de nutrientes, dentro de esta clase se encuentra un grupo de bacterias oxidante de hierro como *Ferrimicrobium acidiphilum* y *Acidimicrobium ferrooxidans*, que son capaces de oxidar Fe^{2+} (Rodrigues *et al.*, 2014).

Las clases bacterianas que se encontraron presentes en solo una de las minas y con abundancias significativas se pueden considerar específicas del hábitat, tal es el caso de *Nitrososphaeria*, *Blastocatellia* y *NC10* en la mina de Brasil; *Chloroflexia* en Canadá; y en Portugal *Thermoplasmata* y la clase *OM190*. La muestra de Reino Unido tuvo una mayor presencia de clases con aparición solo en esta mina, como lo son *Kiritimatiellae*, *Methanomicrobia*, *MVP-15*, *Saccharimonadia*, *Spirochaetia* y *Thermoanaerobaculia*, aunque muchas de estas especies presentaron bajas abundancias.

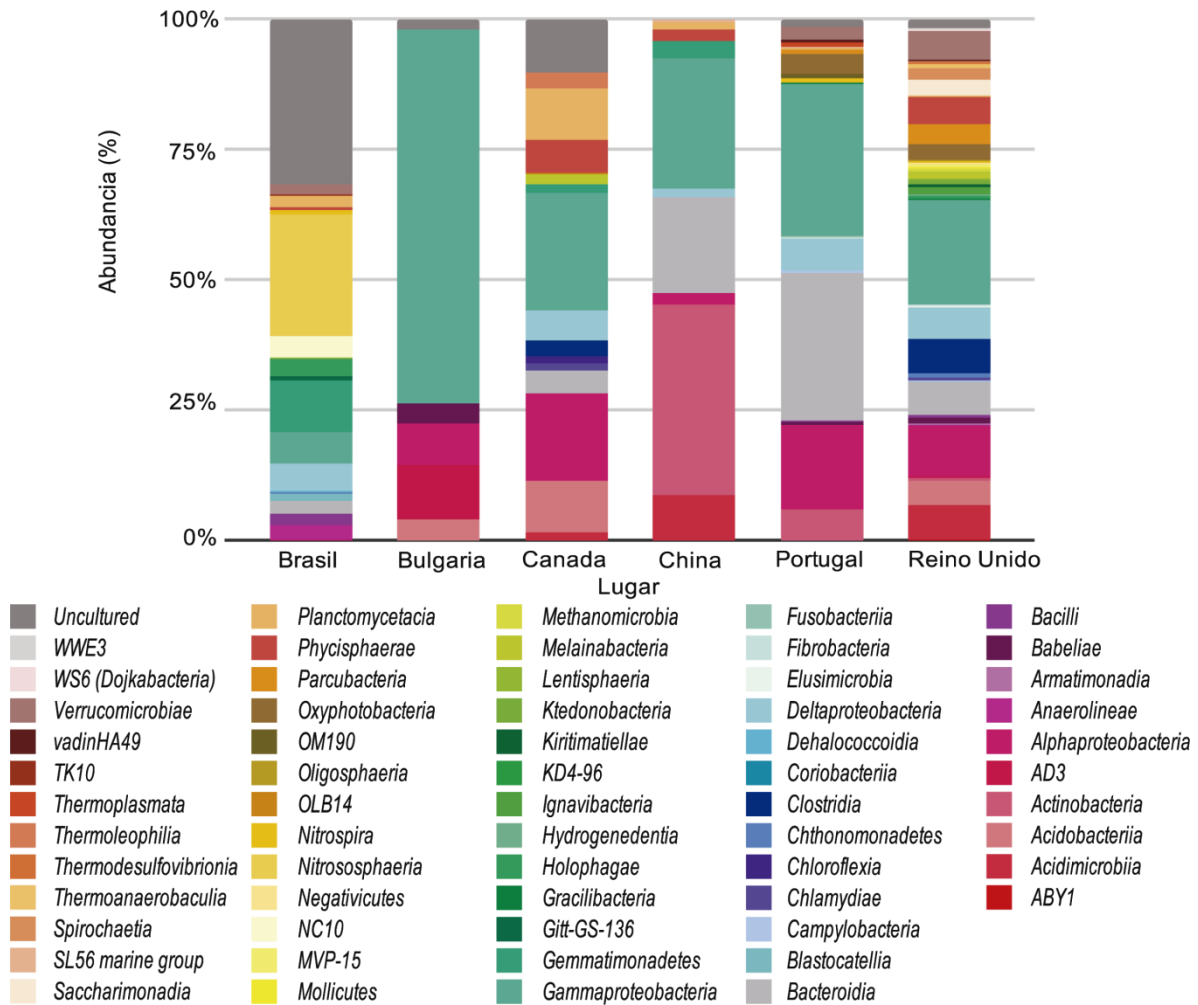


Figura 8. Abundancia relativa de las clases bacterianas presentes en cada mina de cobre.

Durante la identificación taxonómica se detectaron tres clases pertenecientes al dominio *Archaea*, con estos datos y con la abundancia relativa de cada clase se generó un árbol filogenético (Figura 9). El gráfico muestra que la clase *Methanomicrobia* fue encontrada en la mina de Reino Unido con una baja abundancia; mientras que la clase *Thermoplasmata* se encontró en la mina de Portugal; y *Nitrososphaeria*, que se encontró en la mina de Brasil presentó, la mayor abundancia entre las tres clases.

De acuerdo con Kim *et al.*, (2017) la presencia de cobre puede inhibir a las arqueas metanogénicas, por lo que su presencia muestra un proceso de resistencia a la

toxicidad del cobre. Por otro lado, la clase *Thermoplasmata* suele estar presente en suelos contaminados por metales, jugando un papel clave en la supervivencia de otras formas de vida en sistemas contaminados por metales pesados (Li *et al.*, 2017).

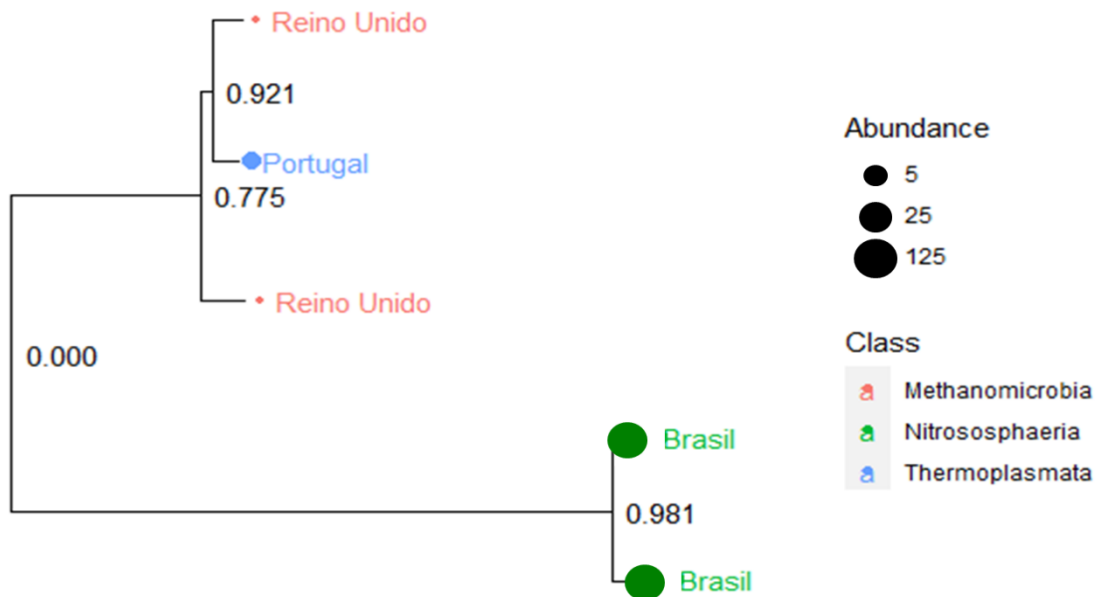


Figura 9. Árbol filogenético de las clases bacterianas pertenecientes al grupo *Archaea*.

5.3 Parámetros físicos y químicos de las minas

Los parámetros fisicoquímicos únicos de cada sitio pueden influenciar a las comunidades microbianas. Las muestras provienen de jales mineros, suelo de mina o del drenaje de las minas, en regiones donde la precipitación media anual es significativa. La temperatura media anual es de 26°C en Brasil, 17.9 °C en Canadá, 17.1°C para Portugal, 16.4 °C China, 10.3 °C Bulgaria y 9.5 °C en Reino Unido. Adicionalmente algunos sitios son ricos en plomo, arsénico y sulfatos y en general todos los sitios tienen cobre, zinc y hierro. El pH de las minas tiende a ser ácido, siendo el valor más ácido 2.6 en la mina de Canadá (Tabla 2), solo en el caso de la mina de Bulgaria el pH fue de 7.3. Los valores de pH entre 7.1 y 7.5 se pueden

relacionar con la presencia de carbonatos en la muestra, según Simmler *et al.* (2019) se han registrado estos valores en esta zona minera de Bulgaria. Las variaciones de pH del suelo pueden explicar la composición de la comunidad microbiana en un área de muestreo, pues suele fungir como un filtro que selecciona a los organismos con preferencia a determinado tipo de pH (Martiny *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2010).

Tabla 2. Parámetros físicos y químicos presentes en las minas de cobre seleccionadas.

Nombre de mina	pH	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	As (mg/kg)	Fe (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	T (°C)	P (mm)	Muestra
Canadá	5.5	25.5	-	0.95	18	1760	8450	17.9	398	Jales mineros
China	3.2	1950	27.6	205.4	63.3	133460	13320	16.4	1269	Jales mineros
Brasil	6.7	4920	7.4	35	-	41215	-	26	1766	Suelo de mina
Bulgaria	7.3	350	850	450	0.25	0.1	-	10.3	581	Suelo de mina/ Drenaje de mina
Reino Unido	5.7	543	149	71.4	495	599	2747	9.5	914	Suelo de mina/ Drenaje de mina
Portugal	5.4	21.6	-	46	-	155039	1174.8	17.1	505	Suelo de mina/ Drenaje de mina

5.4 Análisis estadísticos multivariados en las minas de cobre

Para observar tendencias generales primero se realizó el análisis exploratorio de Componentes Principales (Figura 10), el cual demostró que las minas de Canadá, China, Bulgaria, Portugal y Reino Unido poseen una composición similar en sus comunidades bacterianas, mientras que la mina en Brasil guarda una disimilitud menor con el resto de las minas y se agrupa con la clase *Nitrososphaeria*. La clase

Bacteroidia se encontró correlacionada con las minas de Bulgaria, China, Canadá y Portugal, mientras que la clase *Alphaproteobacteria* se correlaciona con la mina en Reino Unido. *Acidimicrobiia*, *Actinobacteria* y *Acidobacteriia* se correlacionan entre ellas, mientras la clase *Gammaproteobacteria* se encuentra más distante del resto de las clases bacterianas.

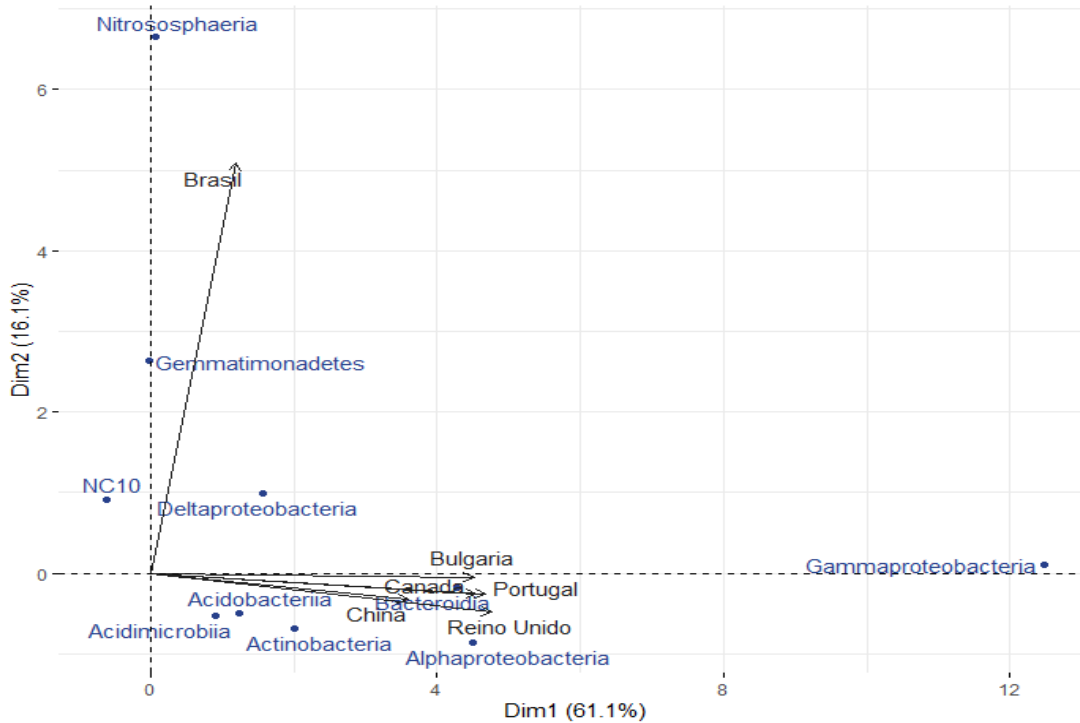


Figura 10. Análisis de Componentes Principales de las clases bacterianas presentes en las seis minas de cobre.

El Análisis de Correspondencia Canónica reveló una correlación entre algunas de las clases bacterianas y los factores físico-químicos y ambientales, como es el caso del arsénico (As), la clase *Acidobacteriia* y las minas de Canadá y Reino Unido.

También se pudo observar que las variables hierro (Fe) y cobre (Cu) influyen en la composición de las comunidades microbianas en las minas de China, Portugal y Brasil (Figura 11), lo que puede relacionarse con las concentraciones de estos elementos como contaminantes en estos sistemas. Mientras que la correlación del plomo (Pb) con la mina de Bulgaria se debe sus altas concentraciones en esta mina.

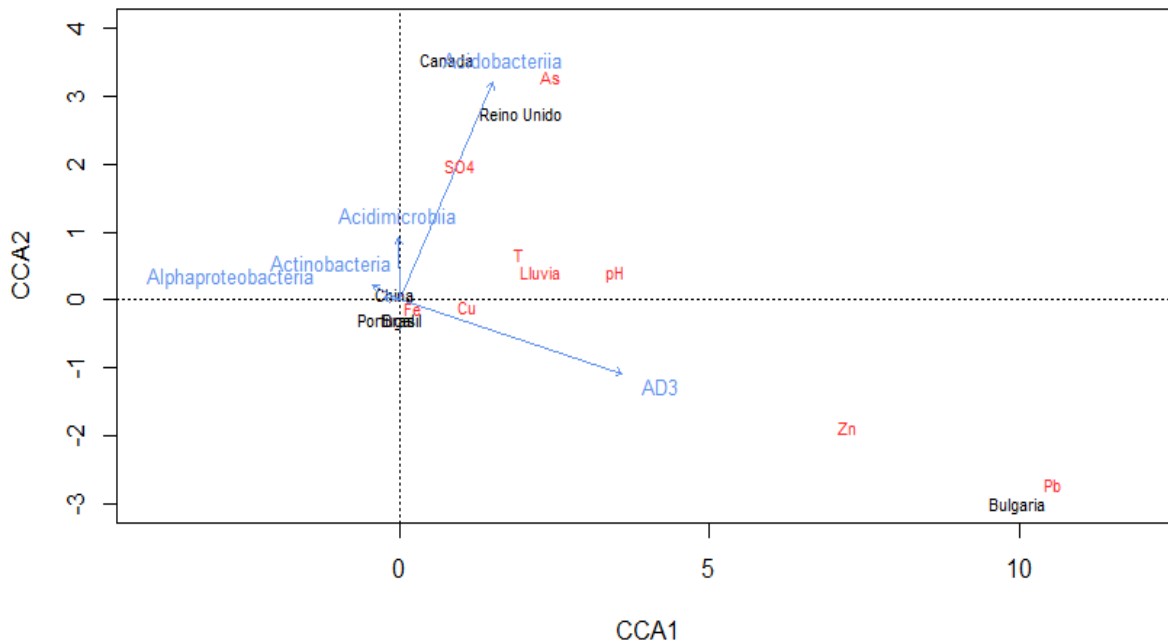


Figura 12. Análisis de Correspondencia Canónica de las comunidades bacterianas presentes en las seis minas de cobre y sus parámetros ambientales.

5.5 Las funciones metabólicas presentes en las minas de cobre

Existe evidencia de la presencia de algunas rutas metabólicas relacionadas con la reducción de metales en las minas de cobre, como la reducción de nitrato VI, la súper vía de oxidación de azufre y la súper vía de biosíntesis de L-metionina por sulfhidrilación, esta última describe la oxidación de azufre por la archaea *Acidianus ambivalens* (Zimmermann *et al.*, 1999). Otras rutas presentes en algunas de las minas antes mencionadas fueron la ruta de la desnitrificación, la metanogénesis de acetato y por último la ruta de la metanogénesis de H₂ a CO₂.

La presencia de estas rutas se corroboró mediante las predicciones funcionales realizadas con PICRUST2, estas demostraron la existencia de genes que codifican para enzimas relacionadas con la reducción de nitrato, la metanogénesis y la sulfato reducción (Tabla 3).

También se encontraron enzimas que ayudan a la resistencia al cobre como las multicobre oxidasas, al mercurio como mercurio reductasas y enzimas de almacenamiento, como el complejo de ferretina de almacenamiento de hierro. La multicobre oxidasa es una fenoloxidasa y ferroxidasa estimulada por cobre que participa en la homeostasis de cobre durante la aerobiosis (Outten *et al.*, 2001). Por otro lado, la enzima mercurio (II) reductasa es clave en la desintoxicación de mercurio catalizando la reducción del ion toxico Hg^{2+} al ion metálico Hg^0 (Schottel, 1978).

El interés en los géneros bacterianos con la capacidad metabólica para procesar metales, recae en su importancia dentro de proyectos relacionados con la remediación de suelos contaminados. Se sabe que para 2015 México contaba con más de 900 proyectos mineros entre exploración y extracción (Bastidas-Orrego *et al.*, 2018). Por consiguiente, la contaminación de recursos acuáticos y terrestres por la actividad minera intensiva en México requiere proyectos de mitigación y recuperación de las zonas aledañas, entre ellas las que se ven afectadas por los grandes volúmenes de desechos y la contaminación de suelos destinados a la producción agrícola (Guzmán-López, 2016).

Tabla 2. Predicciones funcionales de las enzimas presentes en las minas de cobre seleccionadas

Número de EC	Enzima	Número de EC	Enzima
EC:1.12.98.1	Metilen-H4MPT deshidrogenasa formadora de H ₂	EC:1.8.4.8	Fosfoadenosina fosfosulfato reductasa
EC:1.13.11.55	Azufre oxigenasa reductasa	EC:1.8.5.2	Oxidasa multicopper
EC:1.16.1.1	Mercurio (II) reductasa	EC:1.8.99.2	Adenililsulfato reductasa
EC:1.16.3.1	Subunidad β del complejo acetil-CoA descarboxilasa / sintasa	EC:2.1.1.245	Tiosulfato: quinona oxidoreductasa subunidad grande
EC:1.16.3.2	Complejo de almacenamiento de hierro ferritina	EC:2.1.1.86	Metil-H4MPT: coenzima M metiltransferasa
EC:1.2.7.4	Dímero de subunidad α de monóxido de carbono deshidrogenasa / acetil-CoA sintasa	EC:2.3.1.101	Componente $\gamma\delta$ del complejo acetil-CoA descarboxilasa / sintasa
EC:1.5.98.2	Metilen-H4MPT reductasa dependiente de F420	EC:2.3.1.169	Formilmetanofurano: H4MPT formiltransferasa
EC:1.7.2.1	Nitrito reductasa	EC:2.3.1.8	Fosfotransacetilasa
EC:1.7.2.4	Óxido nitroso reductasa	EC:2.5.1.47	Cisteína sintasa
EC:1.7.2.5	Reductasa de óxido nítrico	EC:2.5.1.49	O-acetilhomoserina sulfhidrilasa
EC:1.7.7.1	Ferredoxina - nitrito reductasa (asimilatoria)	EC:2.7.1.25	Adenililsulfato quinasa
EC:1.7.7.2	Ferredoxina - nitrato reductasa	EC:2.7.7.4	Sulfato adenililtransferasa
EC:1.8.1.2	Sulfito reductasa asimilatoria	EC:2.8.1.1	Tiosulfato sulfurtransferasa
EC:1.8.2.1	Sulfito deshidrogenasa	EC:3.5.4.27	Metenil-H4MPT ciclohidrolasa

6. CONCLUSIONES

Se concluye que la mina con comunidad microbiana de mayor diversidad fue la localizada en Reino Unido, a pesar de que las clases presentes en dicha mina fueron poco abundantes. Una de las clases bacterianas más abundantes en las seis minas fue *Gammaproteobacteria*. Se identificaron genes que codifican para enzimas que ayudan a la resistencia a metales pesados como las multicobre oxidasas y mercurio reductasas, además de la presencia de rutas metabólicas relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del azufre, carbono y nitrógeno en las comunidades microbianas de las minas de Canadá, China, Bulgaria y Brasil. Dentro de las comunidades antes mencionadas Acidimicrobiia, Actinobacteria y Acidobacteriia que resultaron asociadas metabólicamente con el Fe y Cu, mercurio y plomo. Así como como a la reducción de nitrato VI, la súper vía de oxidación de

azufre y la súper vía de biosíntesis de L-metionina por sulfhidrilación, la metanogénesis de acetato y por último la ruta de la metanogénesis de H₂ a CO₂, pueden ser eficientes en la remediación de suelos contaminados por metales pesados en México, ya que el estudio demostró su habilidad enzimática para la oxidación de diversos elementos contaminantes que existen en nuestro país y que gracias a este estudio y a su disponibilidad pueden ser aplicadas de forma específica y de manera inmediata.

Por último, las pruebas moleculares son una excelente herramienta para la identificación de la actividad metabólica y enzimática bacteriana, que permite ampliar el conocimiento de la función ecológica que llevan a cabo muchos microorganismos y la respuesta que presentan a las variaciones ambientales, sobre todo de elementos que son muy contaminantes en los ecosistemas y que el aprovechamiento de estos microorganismos puede ser en disminución del impacto ambiental actual en México.

7. REFERENCIAS

- Aduvire, O. 2006. Drenaje ácido de mina, generación y tratamiento. *Instituto Geológico y Minero de España, Dirección de Recursos Minerales y Geoambiente*. Madrid, España. 136 p.
- Aguado-Santacruz, G., B Moreno-Gómez, M. Jimenez y E. Betzaida. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 9-21.
- Akcil, A. y S. Koldas. 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of cleaner production* 14(12-13): 1139-1145.
- Bastidas-Orrego L. M., B. Ramírez-Valverde, A. Cesín-Vargas, J. P. Juárez-Sánchez, D. Martínez-Carrera y H. Vaquera-Huerta. 2018. Conflictos socioambientales y minería a cielo abierto en la Sierra Norte de Puebla, México. *Textual: análisis del medio rural latinoamericano* 72: 35-65.
- Bolyen, E., J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E. K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J. M. Gauglitz, S. M. Gibbons, D. L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G. A. Huttley, S. Janssen, A. K. Jarmusch, L. Jiang, B. D. Kaehler, K. B. Kang, C. R. Keefe, P. Keim, S. T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J. Kreps, M. G. I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y. X. Liu, E. Lofffield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B. D. Martin, D. McDonald, L. J. McIver, A. V. Melnik, J. L. Metcalf, S. C. Morgan, J. T. Morton, A. T. Naimey, J. A. Navas-Molina, L. F. Nothias, S. B. Orchanian, T. Pearson, S. L. Peoples, D. Petras, M. L. Preuss, E. Priesse, L. B. Rasmussen , A. Rivers, M. S. Robeson, P.

- Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S. J. Song, J. R. Spear, A. D. Swafford, L. R. Thompson, P. J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P. J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J. J. J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K. C. Weber, C. H. D. Williamson, A. D. Willis, Z. Z. Xu, J. R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, y J. G. Caporaso. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* 37: 852–857. Disponible en línea en: <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Chu H., Fierer N., Lauber C.L., Caporaso J.G., Knight R., Grogan P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environmental microbiology*, 12(11): 2998-3006.
- Díaz-Ruíz, G. y C. Wachter-Rodarte. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 45: 30-40.
- Ding, X., L. Li, L. S. Van Winkle y Q. Y. Zhang. 2018. Biochemical function of the respiratory tract: metabolism of xenobiotics. *Respiratory Toxicology. Elsevier Inc.* 15: 171-193.
- Douglas, G. M., V. J. Maffei, J. Zaneveld, S. N. Yurgel, J. R. Brown, C. M. Taylor, C. Huttenhower y M. G. I. Langille. 2019. PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory. Disponible en línea en: <https://doi.org/10.1101/672295>
- Eom, H. y W. J. Song. 2019. Emergence of metal selectivity and promiscuity in metalloenzymes. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(4), 517-531.
- FUNDAR. 2002. Minería, comunidades y medio ambiente Investigaciones sobre el impacto de la inversión canadiense en México Disponible en línea en: <https://www.fundar.org.mx/mexico/pdf/mineria.pdf>

- González-Chávez, M. D. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23(1): 29-37.
- Grande-Gil, J. A., T. Gómez, M. L. de la Torre-Sánchez, T. Valente, C. M. Barranco-Molina, V. Domínguez y J. Graiño-Blanco. 2010. Drenaje ácido de mina y metales disueltos: del impacto ambiental al patrimonio minero. Aplicación al caso de mina herrerías en la faja pirítica ibérica. Patrimonio geológico y minero. *En: Una apuesta por el desarrollo local sostenible*. Universidad de Huelva, pp. 87-98.
- Guerrero, R. y M. Berlanga. 2005. Microbios en la niebla: descubriendo el papel de los microbios en la biosfera. *Ecosistemas*. 14(2): 3-10.
- Gutiérrez, J. C., P. Francisco, F. Amaro, S. Díaz y A. Martín-Gonzalez. 2019. *Chapter 22 - Structural and Functional Diversity of Microbial Metallothionein Genes*. En: *Microbial Diversity in the Genomic Era*, pp. 387-407.
- Hussein K. A. y J. H. Joo. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *African Journal of Microbiology Research* 7(20): 2288-2296.
- INEGI. La minería en México. 2010. Disponible en línea en: <http://cuentame.inegi.org.mx/economia/secundario/mineria/default.aspx?tema=E#>. (consultado el 5 de febrero del 2020).
- International Copper Study Group. 2017. Ranking de principales productores de cobre a nivel mundial (miles de toneladas) Disponible en línea en: <http://outletminero.org/los-10-mayores-productores-de-cobre-del-mundo-2/> consultado el 9 de enero del 2020).
- Junco-Díaz, R. A. y C. M. Rodríguez-Pérez. 2001. Metabolismo microbiano. En: Llop-Hernández, A., A. M. Váldez-Dapena y J. L. Zuazo-Silva. *Microbiología y Parasitología Médicas 1era ed.* Editorial Ciencias Médicas, pp.37-44.

- Kharchenko, U. V., I. A. Beleneva, Y. L. Kovalchuk y L. T. M. Hiep. 2013. Enzymatic indication of heavy metal toxicity to marine heterotrophic bacteria. *Russian Journal of Marine Biology*, 39(4), 287-294.
- Kidd, P. S. y C. Monterroso. 2003. Biodisponibilidad de metales en suelos de mina: cambios inducidos por el crecimiento de *Alyssum serpylli-folium* ssp. *Lusitanicum*. *Edafología*, 10(1): 33-52.
- Kim, B. R., J. Shin, R. Guevarra, J. H. Lee, D. W. Kim, K. H. Seol, R. E. Isaacson. 2017. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J Microbiol Biotechnol* 27(12): 2089-2093.
- Lê, S., J. Josse y F. Husson. 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*. 25(1): 1-18.
- Lens P. N. L. y J. G. Kuenen. 2001. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology* 44: 57-66.
- Li X., D. Meng, J. Li, H. Yin, H. Liu, X. Liu, M Yan. 2017. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environmental Pollution* 231 : 908-917.
- López-Guzmán F. 2016. Impactos ambientales causados por megaproyectos de minería a cielo abierto en el estado de Zacatecas, México. *Revista de geografía agrícola* 57: 7-26.
- López, L. A. y M. Zaballo. 2005. Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos. *Ecosistemas*. 14(2): 30-40.
- Magurran A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton university press, New Jersey. 181 p.
- Martiny J. B. H., S. E. Jones, J. T. Lennon y A. C Martiny. 2015. Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science* 350(6261): 649-659.

- McMurdie, P. J. y S. Holmes. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*. 8(4): e61217.
- Mesa V., J. L. Gallego, R. González-Gil, B. Lauga, J. Sánchez, C. Méndez-García, A. I. Peláez. 2017. Bacterial, archaeal, and eukaryotic diversity across distinct microhabitats in an acid mine drainage. *Frontiers in microbiology* 8: 1756 p.
- Miquel, C. C. y A. C. i Cano. 2013. *Yacimientos minerales: los tesoros de la Tierra*. Fondo de Cultura Económica, México. 232 p.
- Mori J. F., L. X. Chen, G. L. Jessen, S. B. Rudderham, J. M. McBeth, M. B. Lindsay, L. A. Warren. 2019. Putative mixotrophic nitrifying-denitrifying Gammaproteobacteria implicated in nitrogen cycling within the ammonia/oxygen transition zone of an oil sands pit lake. *Frontiers in microbiology* 10: 1-12.
- Naidu, R., K. T. Semple, M. Megharaj, A. L. Juhasz, N. S. Bolan, S. K. Gupta, B. E. Clothier y R. Schulin. 2008. Bioavailability: definition, assessment and implications for riskassessment. Chapter 3. *In: Hartemink, A. E., A. B. McBratney y R. Naidu (eds.). Chemicalbioavailability in terrestrial environments*. Elsevier, pp. 39-51.
- Oksanen, J. F., G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs y H. Wagner. 2019. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. Disponible en línea en: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Outten F. W., D. L. Huffman, J. A. Hale, T. V. O'Halloran. 2001. The independent cue and cusSystems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33): 30670-30677.

- Oyarzun, R., P. Higuera y J. A. López-García. 2010. Yacimientos Minerales, Minería y Producción de Metales: de la Naturaleza al Consumidor Y una breve “historia” geológica de San Quintín. *Un Documento GEMM / Proyecto de Innovación 123*, Universidad Complutense de Madrid. También disponible en la [página web: https://www.aulados.net/GEMM/Documentos/San_Quintin_Innova/Yacimientos_Minerales_Historia_SQ.pdf](https://www.aulados.net/GEMM/Documentos/San_Quintin_Innova/Yacimientos_Minerales_Historia_SQ.pdf)
- Paredes-Delgado, H. T. 2012. Geodisponibilidad y biodisponibilidad de metales pesados en la actividad minera. *El Ingeniero de Minas. Revista del capítulo de Ingeniería de minas* 81: 20-33. También disponible en la página web: <https://es.calameo.com/read/0015968956668f0b8998a>
- Pérez, N., A. Schwarz y H. Urrutia. 2017. Tratamiento del drenaje ácido de minas: estudio de reducción de sulfato en mezclas orgánicas. *Tecnol. cienc. Agua* 8(1): 53-64.
- Quiñones, M. 2017. Impacto ambiental de la minería. Disponible en línea en: <https://www.eadic.com/impacto-ambiental-de-la-mineria/> (consultado el 5 de febrero del 2020).
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en línea en: <https://www.R-project.org/>.
- Rehan, M. y A. S. Alshim. 2019. Bioremediation of Heavy Metals. En: *Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches*. IntechOpen. Disponible en línea en: <https://www.intechopen.com/books/environmental-chemistry-and-recent-pollution-control-approaches/bioremediation-of-heavy-metals>
- Ridderberg, W. y J. Jacobs. 2019. Discovering the functional potential of microbial communities through whole metagenome shotgun sequencing analysis A

metagenomic survey of Antarctic desert soil microbiomes with CLC Microbial Genomics Module. QIAGEN Bioinformatics. Aarhus, Denmark.

Rodríguez-Pacheco, R. L. 2011. Geodisponibilidad y biodisponibilidad de metales en residuos mineros, aguas, suelos, sedimentos y peces. Evaluación y análisis de riesgo para el medioambiente. Zona de Calingasta. Provincia de San Juan. República de Argentina. DOI: 10.13140/RG.2.2.11146.16321. También disponible en la página web: https://www.researchgate.net/publication/281445672_Geodisponibilidad_y_biodisponibilidad_de_metales_en_residuos_mineros_aguas_suelos_sedimentos_y_peces_Evaluacion_y_analisis_de_riesgo_para_el_medioambiente_Zona_de_Calingasta_Provincia_de_San_Juan_Repu

Rodrigues, V. D., T. T. Torres y L. M. Ottoboni. 2014. Bacterial diversity assessment in soil of an active Brazilian copper mine using high-throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *Antonie van Leeuwenhoek* 106(5): 879-890.

Rosas-Rodríguez, H. 2005. Contaminación de sedimentos del río Anioia por metales pesados (Barcelona-España). *Revista Investigación & Desarrollo*. 1(5): 103-116.

Saleem, F., Azim, M. K., Mustafa, A., Kori, J. A., & Hussain, M. S. 2019. Metagenomic profiling of fresh water lakes at different altitudes in Pakistan. *Ecological Informatics*, 51, 73-81.

Sandaa R. A., V. Torsvik y O. Enger. 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biol. Biochem*, 33(3): 287-295.

Schottel J. L. 1978. The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 253(12): 4341-4349.

- Secretaría de Economía. (2021). Minería. Disponible en línea en: <https://www.gob.mx/se/acciones-y-programas/mineria>
- Servicio Geológico Mexicano. 2017. Yacimientos minerales. Disponible en línea en: https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Yacimientos-minerales.html
- Sevilla, B. 2019. Principales minas de cobre a nivel mundial 2019. Disponible en línea en: <https://es.statista.com/estadisticas/635359/paises-lideres-en-la-produccion-de-cobre-a-nivel-mundial/> (consultado el 9 de enero del 2020).
- Smith, R. L., T. M. Smith, R. S. Román y C. C. Sánchez. 2007. Ecología. 6ta ed. Pearson Educación. Madrid, España. 682 p.
- Simmler M., I. Christl y R. Kretzschmar. 2019. Effect of extreme metal (loid) concentrations on prokaryotic community structure in floodplain soils contaminated with mine waste. *Applied Soil Ecology*, 144: 182-195.
- Valencia-Moreno, M., L. Ochoa-Landín, B. Noguez-Alcántara, J. Ruiz y E. Pérez-Segura. 2006. Características metalogenéticas de los depósitos de tipo pórfido cuprífero en México y su situación en el contexto mundial. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 58(1): 1-26.
- Varela, G. y G. Grotiuz. 2006. Fisiología y metabolismo bacteriano. En: *Temas de Bacteriología y Virología Médica 2da ed.* Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene. Uruguay, pp. 43-58.
- Vassallo, L. F. 2008. *Yacimientos Minerales Metálicos*. 4ta ed. Centro de Geociencias, UNAM. Querétaro: México. 138 p.
- Vullo, D. L. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3): 93-104.
- Ye, Y. y T. G. Doak. 2009. A parsimony approach to biological pathway reconstruction/inference for genomes and metagenomes. *PLoS Comput Biol*.

5(8): e1000465. Disponible en línea en: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000465> (consultado el 29 de junio del 2020).

Zhang, H. y S. D. Young. 2006. Characterizing the availability of metals in contaminated soils. II: II. The soil solution. *Soil Use and Management*. 21: 459-467.

Zimmermann P., Laska S., Kletzin A. 1999. Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Archives of microbiology*, 172(2): 76-82.

Zorrilla, C. 2013. La minería de cobre y sus impactos en Ecuador. Disponible en línea en: <https://www.salvalaselva.org/noticias/5066/la-mineria-de-cobre-y-sus-impactos-en-el-ecuador> (consultado el 9 de febrero del 2020).