



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



**TESIS**

**DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE DE AGUA  
Y SEDIMENTO EN EL DRENAJE ÁCIDO DE LA MINA MICHICULLAY-  
CAJAMARCA, 2021**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**BACH. MARICELA CHÁVEZ HUINGO**

**ASESOR:**

**Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO**

**CO-ASESOR:**

**M. Cs. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ**

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2023**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria -1Q -115- Av. Atahualpa N° 1050-Cajamarca -

☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

## CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE DE AGUA Y SEDIMENTO EN EL DRENAJE ÁCIDO DE LA MINA MICHICUILLAY - CAJAMARCA, 2021**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **MARICELA CHÁVEZ HUINGO**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 13% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesor al Docente **Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto**, Co-Asesor **M.Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz**.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 23 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
*Dr. Martha Vicenta Abanto Villar*  
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COPYRIGHT©  
**MARICELA CHÁVEZ HUINGO**  
Todos los derechos reservados

## FICHA CATALOGRÁFICA

Chávez, M. 2023. **Diversidad bacteriana cultivable y no cultivable de agua y sedimento en el drenaje ácido de la mina Michiquillay-Cajamarca, 2021**/Maricela

Chávez Huingo.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: M. Sc. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC

2024

**DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE DE AGUA  
Y SEDIMENTO EN EL DRENAJE ÁCIDO DE LA MINA MICHQUILLAY-  
CAJAMARCA, 2021**


**AUTORA:** Bach. Maricela Chávez Huingo

**ASESOR:** Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

**CO-ASESOR:** M. Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo  
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por lo siguientes jurados

**JURADO EVALUADOR**



.....  
PRESIDENTE

M. Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



.....  
SECRETARIO (A)

M. Cs. Luis Felipe Valdez Nuñez



.....  
VOCAL

M. Cs. William Soriano Castillo

Cajamarca, 2023 – Perú



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1030

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 11:15 am del 01 de Agosto del 2023, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1D-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Diversidad Bacteriana cultivable y no cultivable de agua y sedimento en el Drenaje aéreo de una Merchiquilla - Cajamarca 2021

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Maricela Chávez Huínga

Siendo las 12:10 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: Aprobada por unanimidad, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas, se encuentra Apto para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	<u>Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos</u>	
Secretario(a):	<u>Luis Felipe Valdez Muñoz</u>	
Vocal:	<u>William Soriano Castillo</u>	
Accesitaria:		
Asesor (a):	<u>Marco Antonio Rivera Jaunto</u>	
Asesor (a):		

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

**A:**

Mi abuela:  
Elena Sánchez Llanos

“En el momento oportuno, Yo,  
el señor, lo haré realidad”

**Isaías 60:22**



## **Agradecimientos**

A mi familia, por inculcarme el respeto, la perseverancia, la humildad, la responsabilidad y la fe; y por su cariño y apoyo constante.

A mis asesores, el Dr. Marco A. Rivera Jacinto y el Mg. Sc. Omar Daniel Pairazamán Quiroz, por sus consejos, observaciones y apoyo constante durante el desarrollo de esta investigación.

A mi mentora, la Dra. Martha S. Calderón Ríos, por su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

FINALMENTE, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica y al Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (CONCYTEC-PROCIENCIA), que en el marco de la convocatoria del concurso “Becas de Mentoría María Reiche” que Co-financió la presente investigación mediante el contrato N° 017-2021-PROCIENCIA.

## Tabla de contenido

Título.....	xiv
Resumen.....	xv
Abstract.....	xvi
CAPÍTULO I.....	17
INTRODUCCIÓN.....	17
CAPÍTULO II.....	19
MARCO TEÓRICO.....	19
2.1    Antecedentes de la investigación.....	19
2.2    Bases teóricas.....	22
2.2.1    Ambientes extremos y organismos que pueden habitarlos.....	22
2.2.2    Acidófilos.....	23
2.2.3    Drenajes ácidos de minas (DAM).....	24
2.2.4    Diversidad filogenética.....	28
2.2.5    Diversidad microbiana.....	29
2.2.6.    Métodos de estudio de la diversidad bacteriana.....	31
2.2.7.    Importancia biotecnológica de la diversidad bacteriana de los DAM.....	35
CAPÍTULO III.....	36
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	36
3.1    Nivel de investigación.....	36
3.2    Tipo y diseño de estudio.....	36

3.3	Marco muestral.....	36
3.4	Zona de estudio .....	36
3.5	Colección de la muestra .....	37
3.6	Análisis químico de las muestras.....	38
3.7	Metodología para el estudio de las bacterias dependientes de cultivo.....	39
3.8	Metodología independiente de cultivo .....	44
CAPÍTULO IV .....		49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		49
4.1	Propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua y sedimento.....	49
4.2	Metodología dependiente de cultivo .....	50
4.3	Metodología independiente de cultivo .....	64
CAPÍTULO V.....		79
CONCLUSIONES .....		79
RECOMENDACIONES.....		80
LISTA DE REFERENCIAS .....		81
APÉNDICES .....		95

## **Lista de abreviaciones**

**DAM** : Drenaje ácido de mina

**ASV** : Variante de secuencia de amplicón

**NGS** : Secuenciamiento de segunda generación

## **Glosario**

**Metabarcoding:** Este se enfoca en la caracterización de comunidades a partir de una muestra ambiental, dicha caracterización se realiza a través del uso de un conjunto de cebadores que se amplifican entre especies para examinar una región específica del ADN, conduciendo a una lectura de secuencias o “código de barras” (Acharya-Patel, Allison y Helbing, 2023).

**Secuenciación de segunda generación (NGS):** Denominada también secuenciación de alto rendimiento, secuenciación masiva paralela o profunda, es una tecnología de secuenciación de ADN. Existen varias plataformas NGS, todas realizan la secuenciación de millones de fragmentos de ADN en paralelo, se puede utilizar para secuenciar genomas completos o limitarse a áreas específicas de interés (Behjati y Tarpey, 2013).

**Secuenciación de amplicón:** Herramienta ventajosa que permite la obtención de reads de una sola región genómica, está basada en PCR, puede utilizar como objetivo varias regiones genómicas, sin embargo, el más popular es el gen 16S ARNr, usado para generar un perfil comunitario mediante un flujo de trabajo de análisis de datos (Kameoka *et al.*, 2021).

**Variante de secuencia de amplicón (ASV):** alternativa a las unidades taxonómicas operativas (OTU) para analizar comunidades microbianas, reflejar un nivel más refinado de taxonomía, ya que no agrupan secuencias en función de un umbral basado en la distancia (Schloss, 2021).

**DIVERSIDAD BACTERIANA CULTIVABLE Y NO CULTIVABLE DE AGUA  
Y SEDIMENTO EN EL DRENAJE ÁCIDO DE LA MINA MICHQUILLAY-  
CAJAMARCA, 2021**

## **Resumen**

El objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad de las comunidades bacterianas cultivables y no cultivables que habitan el drenaje ácido de la mina Michiquillay-Cajamarca. Para ello se colectaron muestras de agua y sedimento de las afueras de la bocamina del drenaje ácido, mismas que fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca en donde se llevó a cabo su procesamiento y análisis. Se aplicó una metodología dependiente de cultivo y una independiente de cultivo. En el primer caso, diluciones seriadas de las muestras de agua y sedimento fueron inoculadas en medios sólidos nutritivos y en el medio líquido 9K-Fe de enriquecimiento selectivo; una vez obtenidos los aislamientos se procedió con la caracterización fenotípica, luego se procedió con la extracción de ADN bacteriano, y la amplificación del gen 16S ARNr mediante la técnica de PCR, los productos obtenidos fueron enviados a secuenciar a MacroGen. Para el caso de la metodología independiente de cultivo se realizó la extracción de ADN total directo de las muestras, tanto para agua como para sedimento, el ADN fue enviado a MacroGen para el secuenciamiento de las regiones V3-V4 del gen 16S ARNr mediante la plataforma Illumina. Las secuencias obtenidas fueron procesadas y analizadas usando los paquetes DADA2 y Phyloseq en el software R. En ambos casos, la comunidad bacteriana estuvo representada por los filums Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria. El enriquecimiento en medio 9K-Fe permitió el aislamiento de bacterias del género *Acidithiobacillus* a partir de la muestra de sedimento, los medios nutritivos evidenciaron la presencia de los géneros *Bacillus*, *Sporosarcinas*, *Staphylococcus*, entre otros. Así mismo, los resultados obtenidos del análisis del amplicón 16S ARNr mostraron una baja diversidad bacteriana en el drenaje ácido de la mina Michiquillay.

**Palabras clave:** DAM, bacterias acidófilas, Metabarcodig, diversidad bacteriana

## **Abstract**

The aim of this research was to determine the diversity of culturable and unculturable bacterial communities that inhabit the acid drainage of the Michiquillay-Cajamarca mine. For this, samples of water and sediment were collected from the outskirts of the acid drainage mine entrance, which were transferred to the Microbiology laboratory of the National University of Cajamarca where they were processed and analyzed. A culture-dependent and a culture-independent methodology were applied. In the first case, serial dilutions of the water and sediment samples were inoculated in solid nutrient media and in the 9K-Fe liquid medium for selective enrichment; Once the isolates were obtained, the phenotypic characterization was carried out, then the bacterial DNA extraction was carried out, and the 16S rRNA gene was amplified using the PCR technique. The products obtained were sent to Macrogen for sequencing. In the case of the independent culture methodology, the direct total DNA extraction of the samples was carried out, both for water and for sediment, the DNA was sent to Macrogen for the sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene using the platform illumina. The obtained sequences were processed and analyzed using the DADA2 and Phyloseq packages in the R software. In both cases, the bacterial community was represented by the phyla Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria. The enrichment in 9K-Fe medium allowed the isolation of bacteria of the genus *Acidithiobacillus* from the sediment sample, the nutrient media evidenced the presence of the genera *Bacillus*, *Sporosarcinas*, and *Staphylococcus*, among others. Likewise, the results obtained from the analysis of the 16S rRNA amplicon showed a low bacterial diversity in the acid drainage of the Michiquillay mine.

**Key words:** AMD, acidophilic bacteria, metabarcoding, bacterial diversity



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Un gran número de microorganismos sobreviven y prosperan en ambientes con características extremas únicas que ofrecen una gran oportunidad para el estudio de la composición, función y evolución de las comunidades microbianas extremófilas, es decir, organismos que pueden vivir y prosperar en condiciones desafiantes. Entre estos ambientes se encuentran los drenajes ácidos de minas (DAM), en su mayoría causados por actividades antropogénicas como la minería que dan como resultado un ambiente que no solo presenta características ácidas, sino que también incluye altas concentraciones de metales pesados, convirtiéndose de esa manera en un nicho ecológico singular que alberga comunidades microbianas complejas por lo que es considerado como un modelo único para estudios de ecología microbiana (D. Barrie, 1998; Gupta, Sarkar y Sar, 2019).

En los últimos años el interés por estudiar las comunidades microbianas en los DAM ha aumentado entre los investigadores, lo que ha ido de la mano con los avances tecnológicos de biología molecular y las nuevas herramientas de secuenciación de alto nivel de rendimiento que en conjunto permiten el descubrimiento de nuevos linajes que expanden el conocimiento sobre la diversidad y distribución de los microorganismos (Méndez *et al.*, 2015). No obstante, en el Perú, esta diversidad y los estudios en ecología microbiana en general no han recibido la debida atención, por lo que existen vacíos en el conocimiento de las poblaciones microbianas que habitan distintos hábitats extremos del territorio peruano, así como los efectos que tiene sobre

las diversas formas de explotación de suelo, como las relacionadas a la actividad minera, origen de la aparición de los DAM.

Las investigaciones en esta área se basan en dos métodos fundamentales; los dependientes del cultivo y los independientes de cultivo, en conjunto permiten una mejor visión de la diversidad bacteriana, así como la obtención de aislamientos que pueden ser estudiados con el fin de evaluar su potencial biotecnológico (Dong *et al.*, 2022). En la región de Cajamarca, existe una gran cantidad de DAM (Castillo *et al.*, 2021), que constituyen un reservorio importante de diversidad bacteriana y microbiana en general, uno de estos DAM se encuentra en la Mina Michiquillay de la cual hasta el momento no se han reportado informes centrados en las comunidades bacterianas que allí habitan, en ese sentido, la presente investigación evaluó la diversidad bacteriana mediante el uso de las dos metodologías, evidenciando una diversidad baja pero con mucho potencial biotecnológico por descubrir, lo que representa una fuente enorme de conocimiento e investigaciones por realizar.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

En la actualidad existen diversos estudios enfocados en diversidad microbiana de drenaje ácidos de minas alrededor del mundo. En el año 2019, Bomberg y cols. caracterizaron las comunidades bacterianas del agua (pH 1.4-2.3) de tres puntos de muestreo diferentes en el DAM de la mina Pyhäsalmi, Finlandia, usando secuenciación de amplicones dirigidos a las regiones variables V3-V4 del gen ADNr 16S, cultivos de enriquecimiento y qPCR dirigidos al gen ARNr 16S. Sus análisis en QIIME y R hallaron entre 63-114 géneros bacterianos, en donde *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus* fueron los principales géneros presentes tanto en la secuenciación de amplicones como en los enriquecimientos.

En ese mismo año, Lukhele y cols. (2019), caracterizaron la diversidad de las comunidades bacterianas del agua (pH 2.33-2.93) y sedimentos (pH 3.07-3.35) de una presa de DAM utilizando secuenciación de amplicones dirigidos a las regiones V1-V3 del gen ARNr 16S, realizaron un análisis de las similitudes y diferencias entre las comunidades bacterianas de ambas muestras mediante QIIME, revelando a *Acidiphilium* spp como el más abundantes tanto en el agua como en el sedimento, y entre los componentes de la comunidad menos comunes se encontraron los géneros *Acidibacillus*, *Acidibacter*, *Acidobacterium*, *Acidothermus*, *Legionella*, *Metallibacterium* y *Mycobacterium*, concluyendo que, aunque los taxones se comparten entre las comunidades de sedimentos y agua, los índices de diversidad alfa indican una mayor riqueza de especie en los sedimentos.

Por otro lado, Liang y cols., (2019), en China, utilizando secuenciación de amplicones dirigidos a la región V4-V5 del gen ARNr 16S analizaron la diversidad microbiana procariota en muestras agua ácida (pH: 2.52, 2.25, 1.94 y 5.07) y sedimento (pH:1.89, 2.18, 2.37) en el área minera Menzi, Provincia de Yunnan; el análisis utilizado fue una clasificación taxonómica mediante OTU (Unidades taxonómicas operativas) y ASV (Variantes de secuencia de amplicón) ambos revelaron una diversidad rica en bacterias hierro-acidófilas, bacterias oxidantes de azufre y bacterias heterótrofas acidófilas. Los investigadores concluyen que todavía hay muchos grupos microbianos sin clasificar y sin cultivar, y que si bien es cierto su metabolismo fisiológico y funciones ambientales pueden analizarse mediante datos de secuenciación de alto rendimiento, no se debe dejar de lado la búsqueda de cepas, ya que los cultivos ayudan a conocer la interacción microbiana y su impacto en la estructura de la comunidad.

De igual manera, en el año 2019, Ettamimi y cols., estudiaron las comunidades procariotas de cinco cuerpos de agua contaminados por el drenaje ácido de una mina, estos presentaron rangos de pH de 2.25 hasta 6.65. Las comunidades bacterianas fueron estudiadas utilizando un enfoque meta-taxonómico con secuenciación dirigida a la región V4 del gen ARNr 16S; sus estudios revelan gran abundancia de OTUs relacionadas con los géneros acidófilos como *Metallibacterium*, *Acidibacter*, *Leptospirillum*, y la familia Acidobacteriaceae en los sitios más contaminados y con pH más bajos. Además, reportan la presencia de los filos *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, y *Actinobacteria* entre otras, en los sitios menos contaminados y con pH más altos; concluyendo que existe una correlación demostrable entre el nivel de acidez y la diversidad de comunidades procariotas, lo que confirmaría su potencial como biomarcadores de contaminación por drenaje ácido de minas.

Mientras tanto en el Perú, uno de los reportes recientes sobre comunidades microbianas en drenajes ácidos de mina fue realizado por Valdez-Nuñez et al., en el año (2022), en el que se estudió la composición bacteriana de muestras de agua (pH de 2.3 a 5.4) y sedimento (pH de 5.8 a 6.5) de túneles mineros de Hualgayoc-Cajamarca, mediante secuenciación del amplicon 16S ARNr específicamente la región bacteriana V4, y a partir del cual revelaron la presencia de filums característicos en este tipo de ambientes, entre ellos *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae*, *Cloroflexi*, *Acidobacteria*, *Firmicures*, *Bacteroidetes* y *Verrumicrobia* en ambas muestras, y a nivel de género se mostraron secuencias afiliadas a *Leptospirillum*, *Acidiphilium*, *Isosphaera*, *Pseudomonas*; los mismos que variaron según el tipo de muestra.

Por último, Liza Trujillo, en el año 2019 caracterizó la comunidad microbiana de las pozas de sedimentación (pH: 1.99 – 2.38), zonas de infiltración (pH: 2.02 hasta 2.38), y una quebrada natural adyacente a las pozas de sedimentación (pH: 2.95), presente en el drenaje ácido de una mina de oro, secuenciando la región V4 del gen ADNr 16S mediante la plataforma Illumina, procesándolas y analizándolas en el software QIIME; sus resultados indican que la comunidad microbiana estuvo representada principalmente por los géneros *Metallibacterium*, *Leptospirillum*, *Acidiphilium*, *Acidibacillus* y *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Ferroplasma*, *Thermoplasma*, *Ferrimicrobium*, *Ferrithrix*, concluyendo que los microorganismos relacionados a la oxidación de compuestos de minerales de sulfuro son predominantes.

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Ambientes extremos y organismos que pueden habitarlos**

A inicios del siglo XXI se empezó a conocer de la existencia de ambientes extremos en la Tierra y la detección de organismos que prosperan en estos ambientes, a los cuales se le llamó extremófilos, descubrimientos que no solo han dado pase a una nueva disciplina de investigación que en los últimos años tiene ya varias revisiones publicadas, sino que también le ha dado vitalidad a la industria biotecnológica (Rothschild y Mancinelli, 2001).

Los ambientes extremos son hábitats con parámetros ambientales que sobrepasan los rangos óptimos para el desarrollo de la vida humana, por ejemplo, temperaturas muy bajas (de -2 a 20 °C) o demasiado altas (de 55 a 121 °C), pH en extremo ácidos (< 4.0) o básicos (> 8.0), concentraciones elevadas de sal (de 2 a 5 M de NaCl), entre otras condiciones; sin embargo, el término es relativo ya que lo que es extremo para un organismo puede no serlo para otro (Ramírez, Serrano y Sandoval, 2006); los organismos que tienen la habilidad de crecer bajo estas condiciones son llamados por definición extremófilos, en los que se incluye tanto a organismos eucariotas como a bacterias y arqueas procariotas, y se clasifican dentro de las siguientes categorías: psicrófilos, termófilos, termotolerantes, halófilos, halotolerantes, acidófilos, acido tolerantes, metalófilos, metal tolerantes, entre otros; algunos de estos organismos incluso tienen la capacidad de tolerar más de una condición extrema (Gómez, 2011; Salwan y Sharma, 2019).

### 2.2.2 Acidófilos

Los organismos acidófilos presentan características aerobias o aerobias facultativos, quimiolitótrofos hasta heterótrofos; sin embargo, la más relevante es su capacidad para sobrevivir en entornos naturales o artificiales en los que el pH se encuentra por debajo de 7 (Salwan y Sharma, 2019; Johnson y Quatrini, 2020). Una de las definiciones que ha ganado una gran aceptación sobre lo que constituye un acidófilo es la formulada por Johnson (2007), quién caracterizó a los acidófilos en diferentes niveles, denominando extremos, a los organismos que tiene un pH de crecimiento óptimo menor o igual a 3; moderados a aquellos con pH óptimo de 3 a 5, aunque algunas de estas también pueden crecer en un pH <3; además, están menciona también a las especies ácido tolerantes como aquellas que tienen un pH optimo mayor a 5, aunque igualmente pueden crecer en pH menores a este.

Entre estos organismos se encuentran bacterias que pertenecen a la clase  $\alpha$ -proteobacterias,  $\beta$ -proteobacterias y  $\gamma$ -proteobacterias y arqueas como *Acidianus*, *Ferroplasma*, *Picrophilus* y *Sulfoplasmarenar* entre otros, además de organismos eucariotas, hongos y algas (Salwan y Sharma, 2019); y se han adaptado a estos ambientes manteniendo su pH celular, un mecanismo de homeostasis que aún no se conoce bien, pero se sabe que en las bacterias uno de los factores principales que contribuye a esta adaptación es la impermeabilidad de la membrana, la cual controla la entrada de protones dentro de la célula (Tyson *et al.*, 2004). Entre otras capacidades, como la degradación de ácidos orgánicos por disociación de protones y la síntesis de chaperonas que protegen las proteínas y el ADN (Salvador y Gonzalez, 2017).

Los entornos ácidos en los que habitan este tipo de microorganismos puede ser generada por procesos naturales como los que ocurren en las regiones volcánicas y

marinas o manantiales de azufre ácido, y por actividades antropogénicas, principalmente mineras, causantes de la formación de drenajes ácidos de mina (DAM) (Salwan y Sharma, 2019).

### **2.2.3 Drenajes ácidos de minas (DAM)**

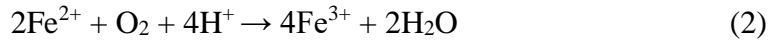
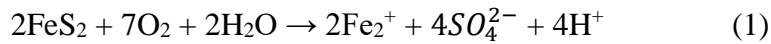
Los DAM son entornos ácidos relacionados con la actividad minera, y se producen a cuando los minerales de sulfuro que se encuentran en lo profundo de la tierra son expuestos al agua y al oxígeno, ocasionando la oxidación de estos minerales, la formación de ácido sulfúrico y la liberación de iones metálicos y sulfatos; además, en estos procesos también actúan microorganismos como las bacterias oxidantes de hierro que mediante la oxidación microbiana de sulfuros metálicos aceleran los procesos de acidificación y oxidación de sulfuros (Akcil y Koldas, 2006).

El pH de los DAM comúnmente puede encontrarse entre 2 a 5 aunque eso se determinaría en función de las propiedades fisicoquímicas o la etapa de formación de los drenajes ácido (Baker y Banfield, 2003; K A Natarajan, 2018). El hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) serían los principales cationes disueltos, mientras que los sulfatos y el bicarbonato los aniones más comunes, además, directamente relacionado con los DAM están los minerales, el mineral de sulfuro que predomina en la mayoría de las rocas es la pirita ( $\text{FeS}_2$ ); sin embargo, existen otros minerales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y la galena ( $\text{PbS}$ ) que pueden estar asociadas a elementos como Au, Ag, Cu, Zn y Pb (Baker y Banfield, 2003).

La generación de los DAM se puede resumir en un conjunto de cuatro reacciones químicas, utilizando pirita ( $\text{FeS}_2$ ) como mineral de sulfuro modelo y a partir de las



cuales se puede deducir la producción de grandes cantidades de ácido sulfúrico que reduce el pH y promueve la disolución de metales (Kuyucak, 2002):



Las duras condiciones que caracterizan a los DAM hacen imposible la formación de vida para organismos no tolerantes la acidez; sin embargo, se ha demostrado la presencia de una gran diversidad de microorganismos distribuidos en los tres dominios de la vida, bacterias, arqueas y eucariotas, quienes tienen las características fisiológicas y metabólicas necesarias para sobrevivir en este ambiente hostil; incluso, algunos de estos microorganismos son los que convierten a los DAM en un entorno único debido a que la acidez surge del metabolismo microbiano *in situ* (Lukhele, 2019). Estas características de los DAM, los convierten en sistemas de baja complejidad que ofrecen la oportunidad de analizar la ecología y evolución de los conjuntos microbianos naturales, es por ello que son considerados como modelos ideales para el estudio de la diversidad microbiana y sus procesos metabólicos (L.-X. Chen *et al.*, 2016).

#### **2.2.4. Diversidad bacteriana en drenajes ácidos de minas**

En cualquier sistema DAM se puede encontrar muchos nichos microbianos, con distintas variaciones de temperatura, fuerza iónica y pH que condicionan el medio para la supervivencia de diversas comunidades bacterianas con distintas características (L. xing Chen *et al.*, 2016). Las comunidades que habitan el agua y sedimento de los DAM pertenecen principalmente a los filos *Proteobacteria*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Acidobacteria* (L.-X. Chen *et al.*, 2016). A

continuación, se describe algunas características de estos filos y los géneros más estudiados dentro de estos:

### **2.2.3.1 Filum *Proteobacteria***

Entre los géneros más comunes que pertenecen a este filo se encuentra *Acidithiobacillus*, el cual agrupa bacterias acidófilas con crecimiento mesófilo óptimo en pH entre 2 y 3, poseen un metabolismo quimiolitotrófico a través del cual oxidan  $Fe^{2+}$  y compuestos de azufre como las especies *At. ferrooxidans*, *At. ferridurans* y *At. ferrivorans*, o solo compuestos de azufre como *At. caldus*, *At. thiooxidans* y *At. albertensis* en condiciones anóxicas (L.-X. Chen *et al.*, 2016).

Una de las especies más estudiadas del género *Acidithiobacillus* es *At. ferrooxidans*, bacteria descubierta en 1947 en entornos afectados por minas, los análisis microscópicos muestran bacilos Gram negativos, no formadoras de esporas, de 0.4  $\mu$  de ancho por 0.8-1.0  $\mu$  de largo y colonias rojo-marrón en medio sólido; se le relaciona con la aceleración de la disolución oxidativa de los minerales sulfurados, lo que genera las aguas de drenaje ácidas y ricas en metales pesado, además, se le conoce también porque facilita la recuperación de metales básicos y preciosos de los lixiviados minerales (Hinkle y Colmer, 1947; Wakao *et al.*, 1991; Quatrini y Johnson, 2019).

### **2.2.3.2 Filum *Nitrospirae***

Dentro de este filo, el género más relevante que se sabe que habita los DAM es *Leptospirillum*, una bacteria oxidante de hierro ferroso acidofílica, obligatoriamente aeróbica y quimiolitotrófica, aislada en aguas de mina, crecen a temperaturas óptimas de entre 26 °C a 40 °C, es incapaz de oxidar azufre, y por sí sola no puede atacar sulfuros minerales, es decir, necesita de otros microorganismos, como *At.*

*ferrooxidans* o *At. thiooxidans* (Markosyan, 1972; Sand *et al.*, 1992; K.A. Natarajan, 2018).

Dentro de las especies más estudiados del género *Leptospitillum* se encuentra a las bacterias *L. ferrooxidans* y *L. ferriphilum*, ambas son morfológicamente muy diversas y se caracterizan por ser bacilos curvos helicoidales, específicamente la especie *L. ferriphilum* son vibrios espirilos con un diámetro de 0.3 – 0.6 µm y 0.9 – 3.5 µm de longitud, con un extremo redondeado y otro alargado ahusado (Tzvetkova, Selenska-Pobell y Groudeva, 2002; Panyushkina *et al.*, 2018).

### **2.2.3.3 Filum *Actinobacteria***

Bacterias heterotróficas oxidantes de hierro, entre los que se encuentran a los géneros *Ferrimicrobium* y *Acidimicrobium*. Estas bacterias comúnmente prosperan en estos ambientes; en el caso de *Ferrimicrobium acidiphilum* puede eliminar el carbono orgánico disuelto, inhibiendo a los autótrofos que coexisten en el mismo hábitat, permitiéndose de esta manera su desarrollo (Bacelar y Johnson, 1999; Bond, Druschel y Banfield, 2000).

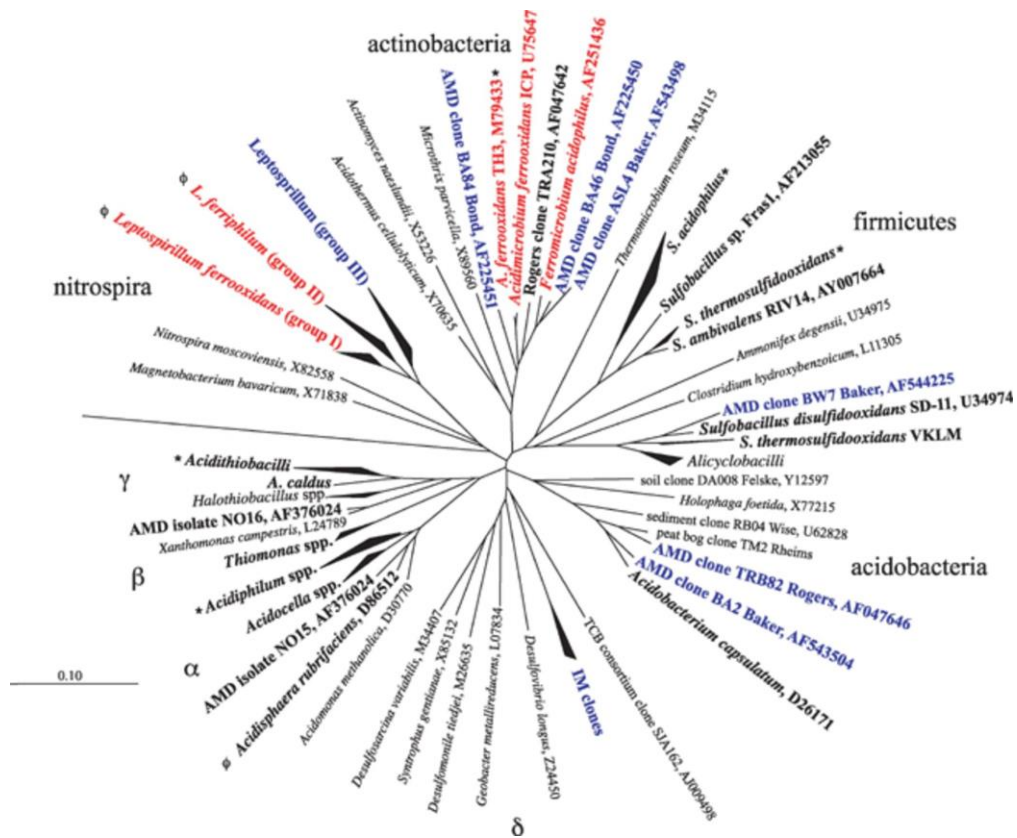
Entre otros filum de bacterias que se pueden encontrar en ambientes relativamente ácidos están las *Acidobacteriota* y dentro de este el género más común presente en los DAM es el mesófilo heterótrofo obligado *Acidobacterium* (Ward *et al.*, 2009). Por otra parte, es muy común también la presencia de las bacterias reductoras de sulfato (SRB), organismos quimioorganotróficos o quimiolitotróficos que utilizan sulfato como aceptor de electrones terminales y constituyen un grupo fisiológicamente único de microorganismos que acoplan el transporte anaeróbico de electrones a la síntesis

de ATP, estas pueden pertenecer a los filum ya mencionados, aunque son asociados mayormente a *Deltaproteobacteria* (Méndez *et al.*, 2015).

#### **2.2.4 Diversidad filogenética**

La filogenética es el estudio de las relaciones evolutivas, basándose en secuencias de ADN hasta proteínas, dichas relaciones evolutivas se pueden describir a través de la filogenia molecular mediante el análisis filogenético, el cual está diseñado para producir información significativa sobre la organización en las comunidades microbianas, y se usan con el fin de crear diferentes tipos de árboles filogenéticos y su función en la evaluación de la diversidad microbiana. Los árboles pueden representar estimaciones entre familias multigénicas denominados árbol de genes, o estimaciones entre un solo gen de muchos taxones, llamado árbol de especie. En ambos, todas sus partes representan relaciones evolutivas y un patrón histórico de ascendencia, divergencia y descendencia (Waikagul y Thaenkham, 2014).

En los ecosistemas DAM se encuentran muchos nichos microbianos, en donde habitan comunidades compuestas por diferentes organismos, los cuales están restringidos a miembros de unas pocas especies (Figura 1).



**Figura 1.** Filogenia de genes de ARNr 16S de sitios DAM (Baker y Banfield, 2003).

### 2.2.5 Diversidad microbiana

La diversidad biológica detalla el número y la variedad de organismos que habitan un ecosistema, y puede describirse en términos de genes, especies y ecológica, que corresponden a los tres niveles fundamentales de la organización biológica (Magurran, 2004). La diversidad microbiana como tal, comprende el estudio de la variedad observada dentro de un determinado grupo, ya sean bacterias, arqueas, hongos, y virus, y en la actualidad es una prioridad ecológica debido a que permite una mejor comprensión de diversidad de las comunidades microbianas, es decir, la cantidad de especies y su abundancia relativa (Vitorino y Bessa, 2018). Las estimaciones de la diversidad permiten simplificar de alguna manera los datos ecológicos mediante análisis posteriores y se puede utilizar en diferentes contextos; la diversidad existente dentro de una muestra, denominado como diversidad alfa; y la estimación de la composición y abundancia de

especies o géneros comparando más de dos muestras o grupos a lo que se denomina diversidad beta (Feranchuk *et al.*, 2018). Para el caso de la presente investigación se hará uso de la estimación de diversidad alfa, debido a que se estudian una muestra de agua y una muestra de sedimento, ambas de un solo lugar de muestreo.

### 2.2.5.1. Índices de diversidad alfa

Esta es una medida de diversidad dentro de una sola comunidad, proporciona una descripción cuantitativa del número de especies o géneros en un conjunto de datos, generalmente se caracteriza usando el número total de especies (riqueza), la abundancia relativa de las especies (uniformidad) o índices que combinan estas dos dimensiones. Es así que, para la medición de la diversidad alfa cualitativa o riqueza basado en especies se puede utilizar índices no paramétricos como Chao 1, ACE (Estimador de cobertura basado en abundancia) y la rarefacción; por otro lado, para medir la diversidad alfa cuantitativa basado en especies se usa el índice de Shannon y el índice de Simpson (Cuadro 1) (Lozupone y Knight, 2008).

**Cuadro 1.** Parámetros o índices de diversidad usados en el estudio de diversidad microbiana.

Índice de diversidad/Parámetros	Descripción	Fórmula
<b>Índice de Shannon (H)</b>	Estimador de riqueza de especies y uniformidad de especies; da más peso a la riqueza de especies.	$H = \sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$
<b>Índice de Simpson's (D)</b>	Estimador de riqueza de especies y uniformidad de especies: da mayor peso a la uniformidad de especies	$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$

<b>Chao1</b>	Estimador de riqueza de especies basado en abundancia.	$S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{F_1(F_1 - 1)}{2(F_2 + 1)}$
--------------	--	---

En donde: S: número de OTUs , $p_j$ : la proporción de la comunidad representada por OTUs ,  $F_1$  y  $F_2$ : recuento de singletons y doubletons, respectivamente, y  $S_{obs}$ , es el número de especies observadas. Fuente: (Kim *et al.*, 2017).

### 2.2.6. Métodos de estudio de la diversidad bacteriana

Para evaluar la diversidad microbiana existen dos enfoques considerados fundamentales: los métodos dependientes de cultivo y los independientes de cultivo, si bien es cierto, los estudios enfocados en diversidad bacteriana en DAM, en su mayoría han trabajado a través de cultivos y técnicas moleculares tradicionales, en los últimos años con el mejoramiento las diferentes técnicas moleculares de alto rendimiento se ha podido apreciar mucho mejor el potencial microbiano de estos ambientes a través de su estructura genómica (L.-X. Chen *et al.*, 2016).

#### 2.2.6.1. Método dependiente de cultivo

Un enfoque cultivable proporciona información sobre la diversidad microbiana a baja escala, y comprende el cultivo en laboratorio y la caracterización de sus propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas utilizando técnicas clásicas, a partir de las cuales se infiere el papel que desempeña un microorganismo en un hábitat en particular. Sin embargo, el hecho de que la fracción microbiana cultivable sea < 1% del total de organismos procariontes realmente presentes en el medio ambiente (Hugenholtz, 2002) sumado a la incapacidad de muchos microbios para crecer en condiciones de laboratorio hacen que este enfoque sea sesgado. Además, las características culturales y morfológicas no proporcionan una clasificación procarionte completa; no obstante, es fundamental potenciar y mejorar la capacidad de cultivo de microorganismos no cultivables para una mejor comprensión de sus procesos

fisiológicos, que tiene aplicaciones en diversos campos biotecnológicos (Giovannoni y Stingl, 2005; Srivastava *et al.*, 2019).

Para la evaluación de la diversidad microbiana y los rasgos funcionales dependientes de cultivo se requiere de cultivos puros de los microorganismos aislados y se puede realizar usando métodos convencionales bioquímicos y herramientas moleculares para el análisis total o una parte específica del ADN extraído, por ejemplo, mediante el análisis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de algunos genes. Lo que proporciona una pista inicial sobre el perfil fisiológico del organismo, perfil nutricional que dependen mayormente de las condiciones ambientales y de hábitat del que ha sido aislado (Srivastava *et al.*, 2019).

En cuanto a los marcadores moleculares, estos son fragmentos de una secuencia de ADN asociada con un genoma, y se usan en la identificación de una secuencia en particular para descifrar relaciones filogenéticas, potenciando el conocimiento de la diversidad, abundancia y funciones de los microorganismos. Estos marcadores deben estar presentes en todas las especies bacterianas, deben tener carácter distinguible entre especie bacterianas, así como un fácil y apropiado diseño (Nazir *et al.*, 2019). Para la presente investigación se utilizó el marcador molecular bacteriano del gen ARNr 16S.

El ARNr 16S es el componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas y esta codificado por el gen ARNr 16S (también conocido como ADNr 16S), con aproximadamente 1500 nucleótidos de largo y compuesto por 9 regiones variables altamente conservadas. Características como su función esencial, ubicuidad y



propiedades evolutivas han permitido su uso como marcador molecular en estudios sobre diversidad y ecología bacteriana. Para la comparación de las secuencias obtenidas de gen ARNr 16S se han utilizado ampliamente las secuencias que se encuentra en NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) con el fin de obtener relaciones taxonómicas entre las cepas bacterianas, para lo cual se considera una similitud de 97% para ser incluidas como parte de una especie (Johnson y Hallberg, 2007; Nazir *et al.*, 2019).

#### **2.2.6.2.Método independiente de cultivo**

Los avances en las herramientas de biología molecular han ido permitiendo el análisis de comunidades microbianas sin la necesidad de aislar y cultivar células microbianas individuales para comprender la diversidad taxonómica funcional de un ecosistema. Para una evaluación de la diversidad mediante este tipo de técnicas se debe tener en cuenta entonces las técnicas de extracción de ADN metagenómico, procesamiento para secuenciación y las diversas herramientas bioinformáticas para procesar las lecturas de secuenciación, con la finalidad de caracterización de la presencia, abundancia y relación evolutiva de los organismos presentes en una comunidad microbiana (Johnson y Hallberg, 2007; Srivastava *et al.*, 2019).

Con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación rápida y la disminución de sus costes, las técnicas moleculares de alto rendimiento desempeñan un papel importante como alternativa para descubrir la diversidad microbiana y las funciones asociadas, entre estas técnicas se encuentran enfoques basados en secuencias, en donde los genes se identifican utilizando secuenciación de próxima generación (NGS) o de alto

rendimiento que en conjunto con herramientas bioinformáticas analizan los datos obtenidos (Srivastava *et al.*, 2019).

La secuenciación del amplicón del gen ARNr 16S, denominado también como metabarcoding se utiliza para estimar la diversidad microbiana, ya sea para identificar y clasificar cultivos puros aislados, como para la estimación de la diversidad bacteriana en muestras ambientales sin cultivo mediante un enfoque metagenómico, su principio se basa en la secuenciación de regiones hipervariables de marcadores filogenéticos específicos o genes funcionales secuenciados. Para esto, primero se extrae el ADN, se amplifica, se secuencian y luego la identificación de las secuencias generadas se basa en la similitud con las secuencias del gen ARNr 16S de referencia disponibles en bases de datos públicas (Gupta *et al.*, 2019).

La determinación de la abundancia relativa de todas las bacterias de las muestras y la secuenciación paralela de cientos de muestras forman parte de las ventajas del uso de esta herramienta, por otro lado, se puede decir también que su principal fortaleza es el análisis de alta resolución de la diversidad y estructura microbiana, además de una posible predicción de la función comunitaria y costo bajo (Gupta *et al.*, 2019; Lukhele *et al.*, 2019).

El análisis de las secuencias de amplicón permite determinar el origen taxonómico de los organismos que se encuentran en determinado ambiente para lo cual en la actualidad se cuenta con dos enfoques de agrupamiento, las unidades taxonómicas operativas (OTU) (Kozich *et al.*, 2013), y las variantes de secuencias exactas o de amplicón (ASV), este último se basa en la predicción y corrección de errores de

secuenciación antes de formar los grupos denominados ASV (Glassman y Martiny, 2018).

No obstante, si bien estos enfoques moleculares son útiles para comprender las comunidades microbianas sin depender de técnicas de cultivo, no siempre son capaces de proporcionar información sobre la fisiología de microorganismos desconocidos. Por lo que es recomendable el uso combinado de herramientas biomoleculares y técnicas de cultivo, ya que esto no solo proporcionará información sobre la diversidad de microorganismos en las muestras que se analizan, sino que también da como resultado el aislamiento de bacterias que luego pueden ser sometidas a más estudios en el laboratorio (Johnson y Hallberg, 2007).

#### **2.2.7. Importancia biotecnológica de la diversidad bacteriana de los DAM**

La importancia biotecnológica de este tipo de estudios radica en las aplicaciones que se pueden dar a las bacterias que habitan en ambientes DAM, dentro de estas aplicaciones se puede mencionar a la biolixiviación que aprovecha la capacidad de estas bacterias para solubilizar los minerales para su uso en la extracción de minerales de la industria minera. Por otro lado, al ser considerados los DAM como contaminantes ambientales, se puede aprovechar también a las bacterias que aquí habitan para optimizar procesos de biorremediación, siendo estas las dos aplicaciones más relevantes, sin embargo, se conoce también de la aplicación de estas bacterias en biofiltración, biofertilizantes, biosensores y como agentes de control biológico, entre otros (Salwan y Sharma, 2019).

## CAPÍTULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1 Nivel de investigación

Descriptivo

#### 3.2 Tipo y diseño de estudio

Tipo básico, organizado mediante un diseño transversal

#### 3.3 Marco muestral

Bacterias que habitan agua y sedimento del drenaje ácido de la mina Michiquillay, Cajamarca. Para el caso específico de bacterias cultivables lo constituyen todas las bacterias capaces de crecer en medio de cultivo en condiciones aeróbicas.

##### 3.3.1 Material biológico

Muestras de agua y sedimento colectadas del drenaje ácido de la mina Michiquillay, Cajamarca.

##### 3.3.2 Unidad de estudio

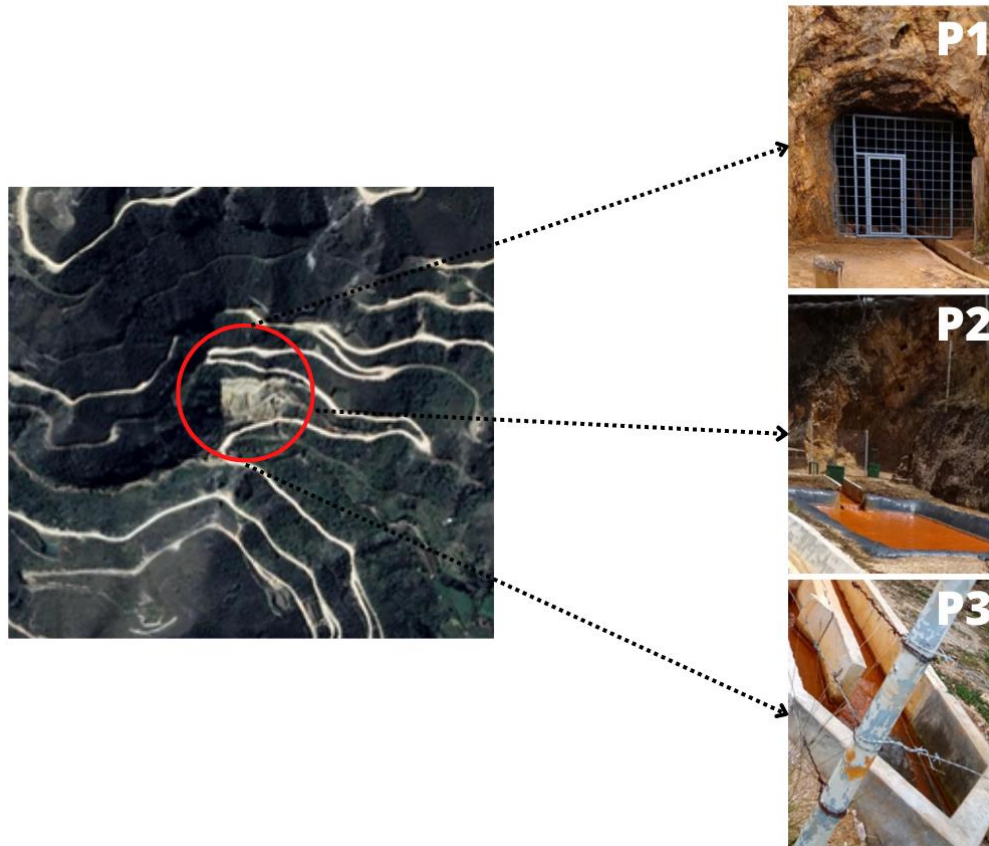
El presente trabajo cuenta con dos tipos de unidades de estudio.

- Bacterias cultivables provenientes de las muestras de agua y suelo obtenidas del drenaje ácido de la mina Michiquillay.
- ADN genómico total obtenido de las muestras de agua y suelo colectadas del drenaje ácido de la mina Michiquillay.

#### 3.4 Zona de estudio

La mina Michiquillay se encuentra situado en el distrito de la Encañada, provincia de Cajamarca, a una altitud promedio de 3000 msnm, ubicada en las coordenadas 7°02'24.2''S y 78° 19' 28.5'' W. Es un yacimiento rico en minerales como cobre, oro, plata y molibdeno, su actividad minera comenzó a inicios de 1960 y desde aquel año, los estudios de exploración geológica, minera y metalúrgica han

generado varios pasivos ambientales entre los cuales se encuentra un drenaje ácido asociado a una bocamina con una profundidad de aproximadamente 3 km, de la que fluye agua ácido de manera constante (OEFA, 2012), a partir del cual se colectaron las muestras de este trabajo.



**Figura 2.** Yacimiento minero Michiquillay. Puntos de muestreo; P1: Entrada a socavón, P2: Poza de sedimentación, P3: salida de agua hacia el río.

### 3.5 Colección de la muestra

Las muestras estuvieron constituidas por agua y sedimento colectadas de 3 puntos (Figura 2) del drenaje ácido fuera del socavón, el cual se encuentra cerrado por presentar riesgo de derrumbe. Para el estudio de la diversidad bacteriana cultivable se colectó muestras de los tres puntos señalados en la Figura 2. El agua se colectó en frascos de vidrio estériles de 250 ml hasta la tercera parte de su volumen, luego fueron selladas y etiquetadas. El sedimento se colectó empleando jeringas estériles

de 60 ml cortadas en su parte anterior, estas fueron introducidas en el sedimento hasta aproximadamente 3 cm en el caso de los puntos 1 y 3, y 10 cm en el caso del punto 2, para obtener las muestras, luego las jeringas fueron etiquetadas y se colocaron en bolsas ziploc de primer uso con cierre hermético.

Para el estudio de la diversidad bacteriana no cultivable se colectaron muestras de agua y sedimento por duplicado en el punto 2 (Figura 2). Las muestras de agua se recolectaron en frascos de vidrio estériles de 1 L. Las muestras de sedimento fueron colectadas con la ayuda de jeringas cortadas de 60 ml introduciéndolas hasta aproximadamente unos 10 cm debajo de la superficie, luego fueron colocadas en bolsas ziploc de primer uso. Todas las muestras fueron transportadas en cadena de frío hasta el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca. El tiempo estimado del transporte de las muestras fue de 1 hora y 30 minutos.

En cada punto de muestreo se determinó la temperatura y pH utilizando un potenciómetro calibrado. Las muestras fueron etiquetadas según el tipo de muestra y el punto de muestreo: AP1, AP2, AP3 para las muestras de agua y SP1, SP2, SP3 para las muestras de sedimento.

### **3.6 Análisis químico de las muestras**

Se colectaron una muestra adicional de agua (1 litro) y sedimento (1 kg) para la determinación de metales totales (Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn). El pH del sedimento se obtuvo a partir del agua intersticial según lo descrito en USEPA (1995, 2004). El análisis de metales totales fue realizado mediante un espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas agilent MP-

AES4210 y estuvo a cargo de Laboratorio de Suelos, Aguas y Foliare – LABSAF Baños del Inca.

### **3.7 Metodología para el estudio de las bacterias dependientes de cultivo**

#### **3.7.1 Aislamiento bacteriano**

Se utilizaron dos enfoques, el método de siembra directa en medios sólidos nutritivos para bacterias heterótrofas mesófilas y el método de enriquecimiento líquido en medio selectivo para bacteria acidófilas quimiolitotrofas. En el método directo se utilizó 4 medios diferentes que fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Medio TSA, Medio Luria Bertani, Agar Manitol salado y Medio Cetrimide) en los que se inoculó mediante la técnica de diseminación en placa 25 µl de cada una de las muestras de agua sin diluir; complementariamente se hicieron diluciones de hasta  $10^{-3}$  en agua acidificada (pH 4.0) y se inoculó de la misma forma como se describió anteriormente en todos los medios.

Para el caso de las muestras de sedimento se inocularon tres diluciones (de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ); la primera se obtuvo a partir de suspender 1 g de sedimento en 9 ml de agua acidificada (pH 4.0) y agitar manualmente hasta su homogenización completa, a partir de ella se obtuvieron las diluciones restantes. Alícuotas de 25 µl de cada dilución fueron inoculadas en los medios mediante la técnica de diseminación en placa. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C hasta evidenciar crecimiento o por un tiempo máximo de 5 días. Las colonias bacterianas que presentaron características macroscópicas de morfología, tamaño o pigmentación distinta se re-aislaron en agar nutritivo hasta por tres veces, para obtener cultivos puros.

Para el método de enriquecimiento se utilizó el medio 9K-Fe líquido, cuya composición fue la siguiente ( $\text{g.L}^{-1}$ ): 2g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.5g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0.5g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1g de  $\text{KCl}$ ; 0.01g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; y 8g de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , ajustado a pH 2.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de acuerdo con el protocolo original (Yates y Holmes, 1987). De cada muestra de agua se inoculó 10 ml en su respectivo frasco con 100 mL de medio de enriquecimiento, y para el caso de las muestras de sedimento se incorporó 10 gramos de cada muestra en su respectivo frasco con 100 mL de medio de enriquecimiento, homogenizando manualmente. Todos los frascos se incubaron en agitación constante a 170 rpm a temperatura ambiente hasta la oxidación del  $\text{Fe}^+$  que se evidenció mediante el cambio de color del medio (de verde claro a naranja) producto de la actividad y crecimiento microbiano (11 a 15 días). Después de este tiempo se obtuvo 25  $\mu\text{l}$  de cada frasco y se sembró por la técnica de diseminación en placas con medio 9K-Fe sólido (pH 2.5); las placas fueron incubadas a 28 °C por 7 días, las colonias se re-aislaron y purificaron hasta la obtención de cultivos puros. La pureza de los cultivos se comprobó mediante coloración Gram de colonias completamente aisladas.

Cada uno de los cultivos puros se criopreservaron a -86 °C en medio BHI con 20% glicerol para el caso de las bacterias heterótrofas, y en medio líquido 9K-Fe con 20% de glicerol para las bacterias acidófilas. Además, se conservaron réplicas en viales con agar nutritivo para bacterias heterótrofas y medio 9k-Fe líquido para bacterias acidófilas, en refrigeración a 4 °C, con el fin de usarlos en los análisis posteriores.



### **3.7.2 Caracterización microbiológica y bioquímica**

Todas las bacterias heterótrofas mesófilas obtenidas fueron reactivadas en agar nutritivo a 37 °C por 24 h, con el fin de caracterizarlas fenotípicamente mediante la evaluación de las características de crecimiento, de la morfología bacteriana y de su comportamiento frente a la tinción de Gram (Gram positivos o Gram negativos).

Paralelamente, se realizó una serie de pruebas bioquímicas en medios diferenciales como TSI, LIA, Agar Citrato de Simmons, Agar SIM y el caldo MR-VP (Rojo de metilo y Voges-Proskauer), lo cual permitió evaluar capacidades bacterianas como la fermentación de azúcares, descarboxilación de lisina, utilización del citrato como única fuente de carbono, la evidencia de movilidad, la producción de indol, entre otras. También se realizaron pruebas de fermentación de manitol y de crecimiento a 7.5 % de concentración de sal en el medio Agar Manitol salado, y de producción de citocromooxidasa y de catalasa. Para el caso de bacterias que con morfología cocoide se les realizó prueba de coagulasa, prueba de producción de hemolisina en agar sangre; y de reducción del telurito de potasio y actividad lecitinásica en agar Baird Parker.

Para el caso de las bacterias acidófilas (que se aislaron en agar 9K-Fe) sólo se realizó coloración Gram, debido a que este tipo de bacterias no crecen en los medios utilizados para la caracterización de heterótrofos.

### **3.7.3 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de bacterias heterótrofas no acidófilas se realizó a partir de una suspensión de dos a tres colonias en 200 µl de agua grado molecular en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 8 000 rpm por 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se procedió con la extracción usando el kit comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen®) según las indicaciones del proveedor.

Para el caso de las bacterias acidófilas el ADN fue extraído según lo descrito por Pairazamán-Quiroz *et al.*, (2019), con algunas modificaciones, de la siguiente manera: a partir de cultivos de 7 días en 250 ml de medio 9K-Fe se obtuvo la biomasa bacteriana mediante un sistema de filtración al vacío utilizando filtros de 0.22 µm de diámetro de poro. A continuación, el filtro con las bacterias se colocó en un tubo falcón estéril de 15 ml para ser lavado con 10 ml de agua libre de nucleasas acidificada (pH: 2.5) usando un vortex horizontal a 1500 rpm por 15 min; posteriormente, se realizó una centrifugación a 400 rpm por 1 min con el fin de precipitar restos del medio y se repartió el sobrenadante en 10 microtubos tipo Eppendorf de 1.5 ml para luego centrifugar a 5 000 rpm por 10 minutos; los pellets obtenidos se juntaron en un nuevo tubo Eppendorf para luego proceder con la extracción de ADN utilizando el kit comercial PureLink Genomic DNA (Invitrogen™) según las indicaciones del proveedor.

### **3.7.4 Amplificación del gen 16S ARNr**

La amplificación del gen 16S ARNr se realizó mediante una PCR convencional en un termociclador S1000™ Biorad, utilizando los cebadores universales 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3') y 1492R (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC

TT-3'); para ello se preparó un master mix de PCR a partir del Kit 2X PCR Taq MasterMix (abm<sup>®</sup>) siguiendo las indicaciones del fabricante. La composición de cada reacción fue: 12.5 µl de 2X PCR Taq MasterMix, 0.5 µl del forward 10 uM, 0.5 µl del reverse 10 µM, 0.7 µl de ADN templado y se completó hasta 25 µl con agua grado molecular. La amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de termociclado: inició con la activación de la polimerasa a 94°C por 3 min, seguido de 33 ciclos de desnaturalización del templado a 94°C por 30 s, hibridación de los iniciadores a 54°C por 30 s, y extensión a 72°C por 1.5 min. Finalmente, una extensión final a 70°C por 5 min.

La visualización de los productos de PCR se realizó en un sistema de electroforesis horizontal (EasyCast<sup>™</sup>, Thermo Scientific) usando la metodología descrita por Sambrook y Russel (2001). Para ello se preparó 50 mL de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5x y 5 µl de colorante SYBR-Safe (Invitrogen<sup>™</sup>) para teñir el gen de interés, la mezcla fue adicionada al molde de electroforesis horizontal para obtener el gel. El gel se colocó en la cubeta de electroforesis horizontal y se procedió a cargar los productos; para ello se mezcló 5 µl de cada producto de PCR con 1 µl de buffer de carga y se inoculó en el carril respectivo del gel. El corrido electroforético fue a 100 V durante 30 minutos. Las bandas generadas fueron observadas en un transiluminador de luz UV (Major Science, USA).

### **3.7.5 Secuenciación del gen 16S ARNr e identificación filogenética**

Los productos de gen 16S ARNr amplificados fueron enviados a Macrogen (Corea del Sur), en donde se realizó una secuenciación bidireccional mediante el método de Sanger (Sanger, Nicklen y Coulson, 1997). Una vez obtenidas las secuencias

nucleotídicas los cromatogramas se visualizaron en el programa Chromas y se editaron utilizando el programa Aliview 1.27 (Larsson, 2014). Las secuencias editadas se alinearon localmente con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank-NCBI utilizando la herramienta BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Seguidamente se procedió a la construcción de árboles filogenéticos, para ello se creó un archivo multifasta con las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias de las especies más cercanas (99% de similitud) recuperadas de la base de datos GenBank-NCBI. La inferencia filogenética se realizó empleando el programa MEGA 10.2 (Kumar *et al.*, 2018) y el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987).

### **3.7.6 Índices de diversidad alfa**

El cálculo de los índices de biodiversidad de Chao1, Shannon y el índice de Simpson se llevó a cabo en el software PAST v4.09 (Hammer, Harper y Ryan, 2001).

## **3.8 Metodología independiente de cultivo**

### **3.8.1 Procesamiento de muestras**

En el laboratorio el sedimento fue dividido en muestras pequeñas que fueron depositadas en tubos Eppendorf de 2 mL, y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras de agua fueron filtradas utilizando filtros de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro con un sistema de filtración al vacío, los filtros se almacenaron a -20 °C hasta realizar la extracción de ADN.

### 3.8.2 Pre-tratamiento de muestras de sedimento

La muestra de sedimento pasó en primer lugar por un pre-tratamiento químico con el fin de eliminar materiales húmicos y metales pesados que pudieran interferir con el procedimiento de extracción de ADN. El pre-tratamiento consistió en pesar 0.5 g de sedimento en tubos Eppendorf (sub muestras por triplicado), a los que se les agregó 1.5 ml de solución de pre-tratamiento (0,1 mM de EDTA; 0,1 mM de Tris-HCl (pH 8); 1,5 mM de NaCl; 0,1 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.1 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Los tubos fueron colocados en un baño maría a 65 °C por 15 min con vortex cada 2 minutos. Luego se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, el sedimento fue nuevamente re-suspendido en 1.5 mL de solución de pretratamiento y luego de un vortex se centrifugó nuevamente, este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces hasta que el sobrenadante fue claro, finalmente se eliminó el sobrenadante (Fang *et al.*, 2015).

El paso siguiente consistió en un proceso de lavado de cada submuestra, para ello se hizo uso de un matraz de 100 mL que contenía 70 mL de solución buffer de lavado (300 mM de NaCl, 2.9 mM de KCl, 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.7 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) según lo descrito por Zeng *et al.*, (2008), y perlas de vidrio de 0.5 mm en el cual las submuestras fueron agitadas constantemente mediante un vortex vertical a 450 rpm durante 15 minutos.

Posteriormente, se realizó un proceso secuencial de filtración empleando filtros de membrana (Serrana y Watanabe, 2022) como se describe a continuación, cada submuestra lavada fue filtrada en primer lugar a través de un filtro de papel con un tamaño de poro de 12 µM, seguido de una filtración por un filtro medio con un

tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{M}$  y finalmente a través de un filtro colector de 0.22  $\mu\text{M}$ . Los filtros colectores fueron cortados y colocados en un Eppendorf estéril de 2 mL para el siguiente procedimiento.

### **3.8.3 Extracción de ADN metagenómico**

El ADN metagenómico se extrajo de los filtros obtenidos a partir de las muestras de agua y sedimento pre-tratadas; la extracción se realizó de acuerdo al protocolo modificado por Solomon et al. (2016) de la siguiente manera; los filtros fueron suspendidos en 900  $\mu\text{L}$  de tampón de extracción [Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, (pH 8,0), fosfato de sodio 100 mM (pH 8,0) y NaCl 1,5 M], al que se añadió 50  $\mu\text{L}$  de CTAB al 10 %, 50  $\mu\text{L}$  de SDS al 20 % y 10  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K, para luego ser incubado a 55 °C durante 2 h con vortex constantes cada 15 min, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 g durante 1 min, se retiró el sobrenadante a un nuevo Eppendorf de 1.5 mL al que se le agregó un volumen igual de cloroformo:alcohol-isoamílico (24:1 v/v), luego de un breve vortex se centrifugó a 16000 g durante 10 min, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le agregó 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol, la mezcla fue incubada durante una noche a 4 °C, una vez pasado este tiempo se centrifugó a 20 000 g durante 20 minutos, el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70% (v/v) dos veces, finalmente el ADN fue resuspendido en 50  $\mu\text{L}$  de agua grado molecular. El ADN de la muestra de sedimento obtenido de los tres filtros de colección, fue concentrado en un nuevo Eppendorf. La preservación se realizó a -20 °C. La concentración y calidad del ADN fue medido en un NanoDrop (NanoDrop 2000<sup>TM</sup>, ThermoScientific).

### **3.8.4 Secuenciamiento del Amplicón 16S ARNr**

El ADN total extraído de ambas muestras (agua y sedimento, por separado) se enviaron a Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciamiento mediante NGS. La preparación de las librerías para la región bacteriana V3-V4 del gen 16S ARNr se hizo a través de PCR utilizando los siguientes cebadores predeterminados: Bakt\_341F-CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt\_805R-GACTACHVGGGTATCTAATCC. El secuenciamiento del amplicón 16S ARNr se realizó mediante el uso de la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq 300bp.

### **3.8.5 Análisis bioinformático y de diversidad**

Los reads obtenidos a partir de la secuenciación de cada muestra se analizaron a través del paquete de código abierto DADA2 v.1.12 (Callahan *et al.*, 2016) en el software R v.4.2.2 en el entorno del programa RStudio v.4.2.2. El análisis inició con un pre-procesamiento de los reads; es decir, la revisión y control de calidad, se trabajó con reads que mostraron una calidad mayor a 30, se realizó también el recorte de los cebadores utilizando la función “*FilterAndTrim*”. Este paquete también permitió la inferencia de los grupos de secuencias idénticas; es decir, variantes de secuencia de amplicón (ASV) para luego realizar la asignación taxonómica con la función “*assignTaxonomy*” en donde se comparó las secuencias de los ASV obtenidos a partir de las muestras de agua y sedimento con la base de datos SILVA v.138.1 (Quast *et al.*, 2013) identificándose hasta el nivel de género.

La estimación de la diversidad alfa se realizó utilizando los índices de Chao1, el índice de Shannon y el índice de Simpson (Lemos *et al.*, 2011), para lo cual se hizo uso las funciones “*plot-richness*” y “*estimate\_richness*” del paquete phyloseq (McMurdie y Holmes, 2013). Además, se usó el paquete ggplot2 v3.4.0 (Hadley, 2016) para la elaboración de gráficos de abundancia relativa.



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Propiedades fisicoquímicas de las muestras de agua y sedimento

Las muestras de agua y sedimento del área de muestreo presentan en promedio temperaturas y pH similares, la temperatura fue de 12 °C mientras que el pH de la muestra de agua fue de 5,6 siendo mayor al de la muestra de sedimento, que fue de 4,7. En lo que se refiere a los metales disueltos, en ambas muestras se observó como el elemento más abundante al Fe; además, el sedimento presentó mayor cantidad de los metales Al, Cu, Ca, K, Mg y otros elementos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Concentraciones de metales pesados en las muestras de agua y sedimento

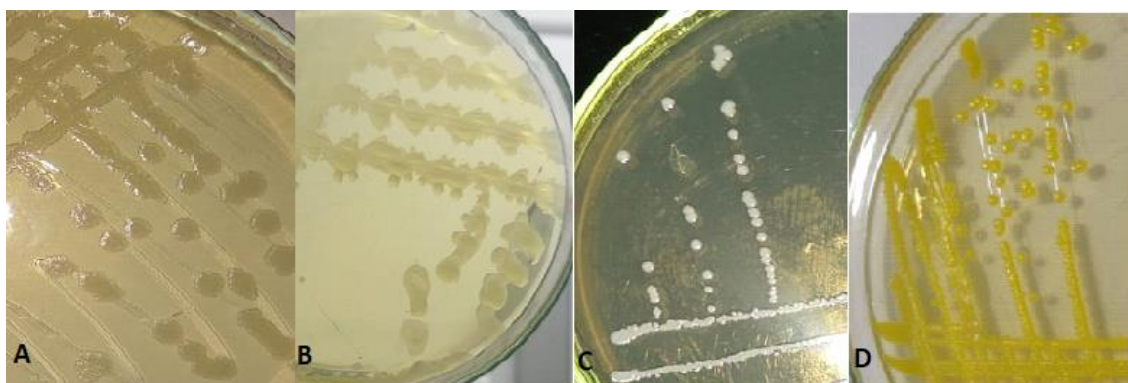
<b>Metal pesado</b>	<b>Agua (mg/kg)</b>	<b>Sedimento (mg/kg)</b>
<b>Aluminio (Al)</b>	0,7	14979,9
<b>Arsénico (As)</b>	<0,005	23,6
<b>Calcio (Ca)</b>	5,7	805,7
<b>Cadmio (Cd)</b>	<0,005	5,1
<b>Cromo (Cr)</b>	<0,005	1,5
<b>Cobre (Cu)</b>	1,1	1819,3
<b>Hierro (Fe)</b>	9,0	368291,8
<b>Potasio (K)</b>	1,7	566,7
<b>Magnesio (Mg)</b>	2,2	508,9
<b>Manganeso (Mn)</b>	0,1	15,9
<b>Sodio (Na)</b>	2,1	109,8
<b>Zinc (Zn)</b>	<0,005	52,2

## 4.2 Metodología dependiente de cultivo

### 4.2.1 Aislamiento, caracterización microbiológica y bioquímica

Las estrategias de cultivo permitieron obtener un total de 41 aislamientos a partir de ambos tipos de muestra. Del total de aislamientos, el 92% (n=38) se obtuvieron de la siembra en placa con los medios de cultivo nutritivos a pH 7, mientras que el 8% (n=3) se obtuvieron con la técnica de enriquecimiento en medio líquido 9K-Fe a pH 2,5.

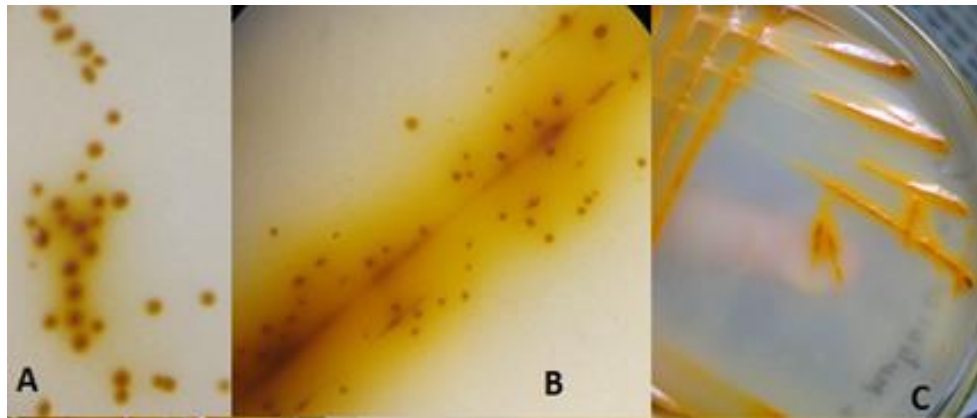
En la caracterización microbiológica se observó una variada diversidad fenotípica de las colonias, las cuales presentaron desde formas irregulares hasta filamentosas, con bordes enteros hasta rizoides, con tamaños menores a 1 mm (puntiformes) hasta mayores a 3 mm (grandes), con elevaciones desde convexas a planas, de aspecto liso la mayoría y algunas rugosas, algunas con consistencia suave y otras mucosas, y solo algunas pigmentadas; algunas de ellas se muestran en las figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Colonias bacterianas luego de 24 horas de incubación a 37 °C. A. A7, muestra colonias grandes, B. A1, muestra colonias grandes de aspecto mucoso; C, A16: muestra colonias medianas circulares, de color blanco; D. A18, muestra colonias circulares medianas, convexas, con pigmento amarillo y textura suave.

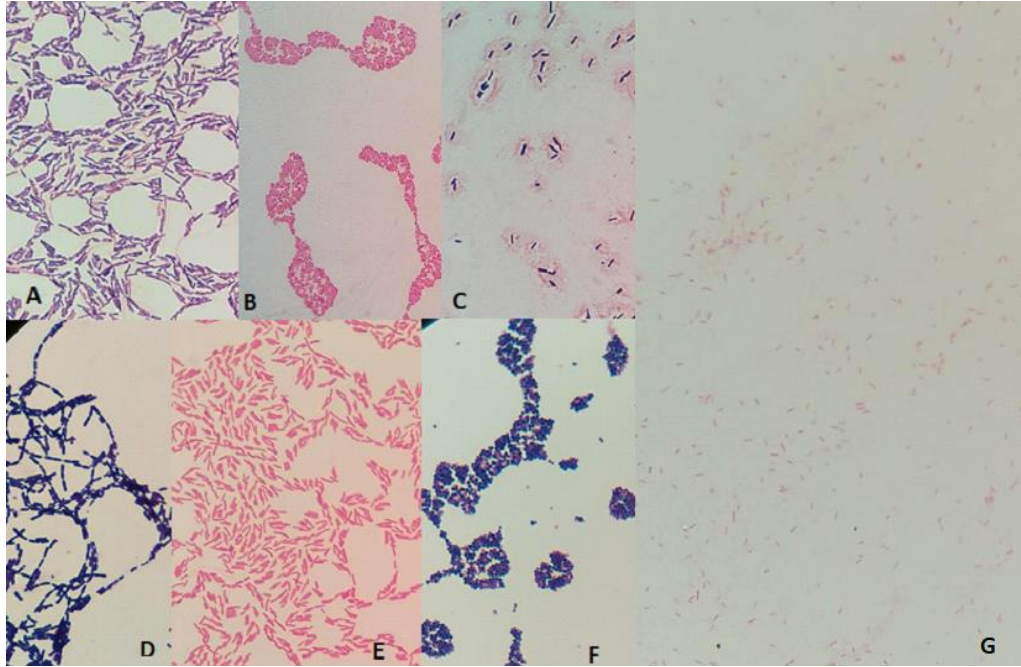
La figura 4 muestra el crecimiento típico de bacterias acidófilas en medio sólido 9K-Fe, donde se aprecia una coloración naranja producto de la oxidación de hierro; las

colonias en este caso se caracterizaron por presentar un tamaño muy pequeño no visibles a la vista por lo que se usó un estereoscopio para una mejor caracterización, a través del cual se observaron colonias circulares, convexas, con pigmentación entre naranja y marrón y de aspecto suave.



**Figura 4.** Colonias bacterianas acidófilas oxidantes de hierro obtenidas en medio sólido 9K-Fe luego de aproximadamente 15 días de incubación a 28 °C.

En cuanto a la morfología celular bacteriana, se encontraron principalmente bacilos y cocos, y en menor cantidad cocobacilos y estreptobacilos. Respecto a la tinción Gram, la mayoría de los aislados (66%) se clasificaron como Gram positivos, mientras que los restantes (34 %) fueron Gram negativos, en este último grupo se encontraron las bacterias acidófilas (Figura 5).



**Figura 5.** Observación microscópica a 1000x a partir de tinción Gram. A. **A7**, bacilos - Gram positivos, empalizados grandes; B. **A5**, cocobacilos - Gram negativos agrupados; C. **S54**, bacilos - Gram positivos, D. **A15**, estreptobacilos - Gram positivos con espora central, E. **A58**, bacilos - Gram negativos empalizados; F. **A13**, cocos Gram - positivos agrupados. G. **S64**, bacilos pequeños - Gram negativos, característico de bacterias acidófilas.

A continuación, en la tabla 2 se describen los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los aislamientos que presentaron una morfología celular cocal según el tipo de muestra del que fueron aisladas. En general todos los aislados bacterianos hidrolizaron la lecitinásica y redujeron el telurito en el medio Baird Parker, además revelaron ser positivos para catalasa, fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa, así como un resultado negativo para el uso de citrato de sodio como única fuente de carbono; asimismo, demostraron capacidad de crecer a una concentración de 7.5 % de NaCl al ser sembradas en el medio manitol salado, a excepción del aislamiento A18. En ese mismo medio adicionalmente se evaluó la capacidad de fermentar manitol para el cual los aislamientos A14, A16, A17, A26 y A28 resultaron ser positivos.

**Tabla 2.** Caracterización morfológicas y bioquímicas de aislamientos con morfología cocacea.

Características	Agua								Sedimento			
	A13	A14	A16	A17	A18	A23	A26	A30	S28	S29	S35	S36
Tinción Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Disposición de cocos	r	r	r	r	t	r	r	r	r	r	r	r
Crecimiento a 35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a 7.5 % (w/v) NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de lactosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de sacarosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Movilidad en medio semisólido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prueba Rojo de Metilo	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+
Prueba Voges Prokauer	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Descarboxilación de Lisina	-	SC	SC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Actividad Lecitinásica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de Telurito de potasio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación de manitol	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Coagulasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de hemólisis	-	α	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Positivo; -: Negativo; SC: Sin crecimiento; RM: Prueba de rojo de metilo; VP: Prueba de Voges-Proskauer; L<sup>+</sup>: Lisina positivo; α: Hemólisis alfa; r: racimos; t: tétradas.

De igual manera se realizó la caracterización bioquímica de las bacterias que presentaron morfología celular bacilar (Tabla 3). De los aislamientos obtenidos de las muestras de agua, cuatro de ellos fueron caracterizados como Gram negativos; los aislamientos A2 y A8 fueron bacilos, la primera positiva para oxidasa, catalasa y con

capacidad de fermentar glucosa, además de usar el citrato de sodio como fuente única de carbono; por su parte, el aislamiento A8 presentó una reacción positiva para catalasa, fermentación de glucosa, utilización de citrato, así como para la prueba MR-VP, esto indicaría que se tratarían de dos aislamientos diferentes. En cuanto a los aislamientos A5 y A42 presentaron una morfología celular en forma de cocobacilos y sus características bioquímicas revelaron reacciones positivas para catalasa y fermentación de glucosa, su parecido a nivel bioquímico y fenotípico indicarían la posibilidad de tratarse de una misma especie.

Posteriormente, nueve aislamientos también de las muestras de agua fueron caracterizadas como bacilos Gram positivos, todas presentaron capacidad de movilidad en el medio SIM, además de una reacción positiva para catalasa y fermentación de glucosa. Por su parte los aislamiento A21, A25 y A58 presentaron además la capacidad de fermentar lactosa y sacarosa, no obstante se diferencian debido a que los aislamientos A25 y A58 no presentaron crecimiento en medio manitol salado, a comparación del aislamiento A21 que además mostró la capacidad de fermentar manitol, característica que compartió con los aislamientos A7, A20, A38, A41 y A50, su crecimiento en este medio reveló también la capacidad que tienen de crecer a una concentración de 7.5 % de NaCl, característica compartida también con la cepa A1. En cuanto a la utilización del citrato como única fuente de carbono, solo el aislamiento A20 reveló esa característica. Dentro de este grupo también se encontró el aislamiento A15 la cual se diferenció de las demás por presentar una morfología celular en forma de estreptobacilo con espora central.

Además, una de las características reveladas a nivel de tinción Gram fue la variabilidad que presentaron algunos aislamientos; es decir, según el medio de cultivo

y/o el tiempo de crecimiento se observan como Gram negativas o Gram positivas, este tipo de bacterias son denominadas Gram variables, y los aislamientos A27, A6 y A19 de las muestras de agua presentaron esta singular característica. Bioquímicamente, el primero reveló ser positiva para catalasa, fermentación de glucosa y movilidad en medio SIM, y las dos últimas mostraron resultados bioquímicos muy similares entre ellas, siendo positivas para las pruebas de oxidasa, catalasa y fermentación de glucosa, y resultado negativo en las pruebas restantes.

Por otro lado, a partir de las muestras de sedimento se obtuvieron siete aislamientos, de los cuales el S4, S9, S12, S53, S62 y S54 fueron Gram positivos y el S3 se mostró como un Gram variable, todos a excepción de este último revelaron movilidad en el medio SIM. El aislado S9 mostró diferencias al compararse con las otras seis, no presentó crecimiento en los medios TSI y LIA en los cuales se observa la capacidad de las bacterias para fermentar azúcares, lo que indicaría ser una especie diferente de las demás. En cuanto al aislamiento S3, presenta características similares a los aislamientos A6 y A19 de las muestras de agua, lo mismo sucede entre los aislamientos S12, A25 y A58, indicando que los dos tipos de muestra compartirían algunas especies.

Este primer análisis de caracterización metabólica y fenotípica realizado a los aislamientos obtenidos nos permite observar desde ya cierta diversidad entre las bacterias que podrían estar habitando las aguas y sedimentos del ambiente extremo aquí estudiado.

**Tabla 3.** Caracterización morfológica y bioquímica de aislamientos que presentaron morfología bacilar.

Características	Agua																Sedimento									
	A2	A5	A8	A42	A1	A6	A7	A15	A19	A20	A21	A25	A38	A41	A50	A58	S27	S3	S4	S9	S12	S53	S62	S54		
Tinción Gram	-	-	-	-	+	v	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	v	v	+	+	+	+	+	+		
Morfología celular	b	cb	b	cb	b	b	b	sb	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b		
Crecimiento a 35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Crecimiento a 7.5 % (w/v) NaCl	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+		
Oxidasa	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-			
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	SC	+	+	+	+		
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	SC	+	+	-	+		
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	SC	+	+	-	-		
Citrato	+	-	+	-	-	-	SC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Movilidad en medio semisólido	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
Prueba Rojo de Metilo	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+		
Prueba Voges Prokauer	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+		
Descarboxilación de Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	SC	-	-	-	-		
Fermentación de manitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+		

+: Positivo; -: Negativo; SC: Sin crecimiento; b: bacilos; cb: cocobacilos; sb: estreptobacilos; v: Gram variable; c: central



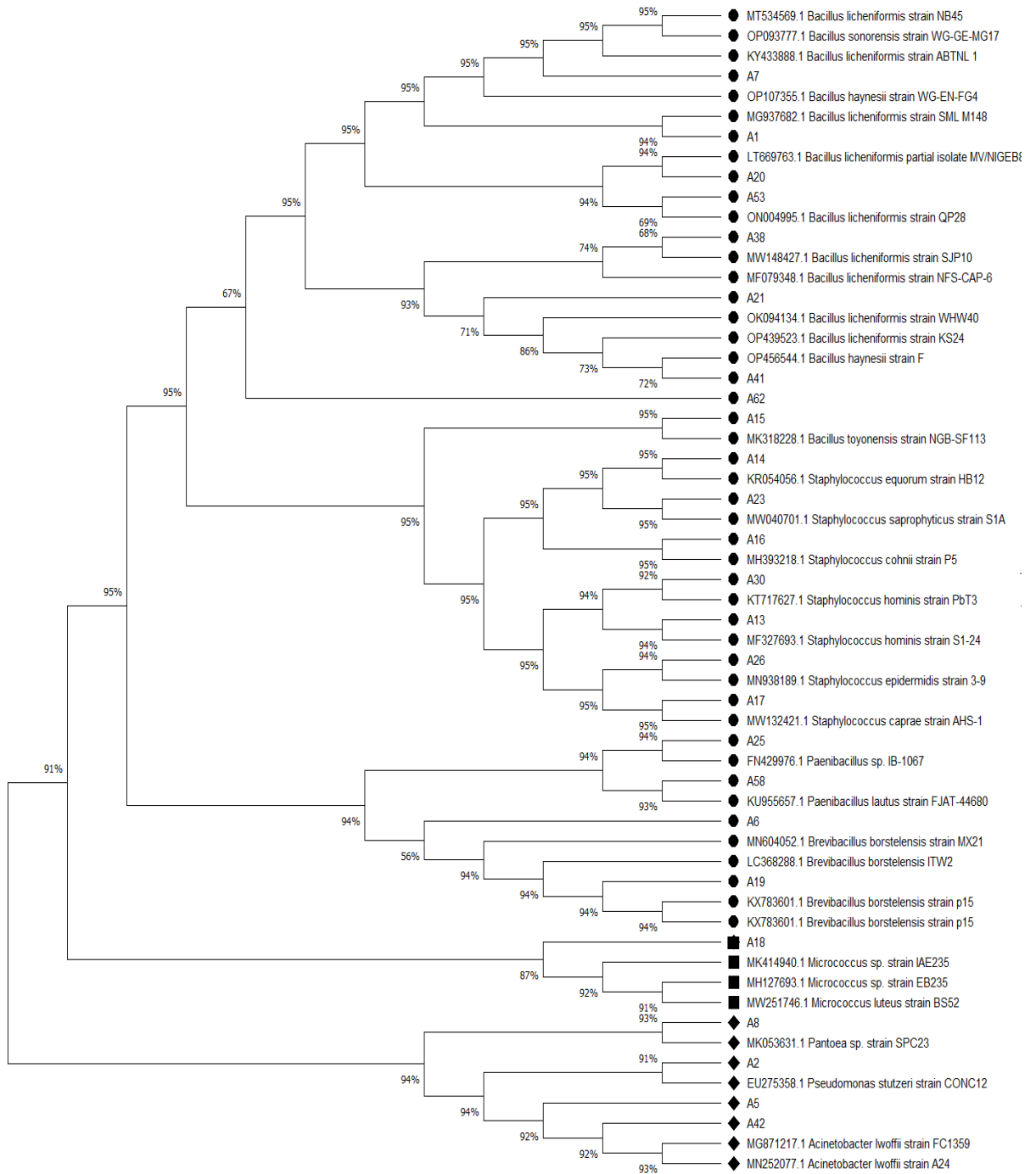
#### 4.2.2 Identificación molecular y análisis filogenético

En la tabla 4 se observan los resultados del análisis BLASTn de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de agua, en el programa se comparó las secuencias de cada aislamiento con las secuencias almacenadas en la base de datos del NCBI (GenBank). Los 25 aislamientos identificados se distribuyeron en 3 diferentes filos: *Firmicutes* (80 %), *Proteobacteria* (4 %) y *Actinobacterias* (16 %), y se agruparon en 8 géneros diferentes: *Bacillus* (n=9), *Pseudomonas* (n=1), *Acinetobacter* (n=2), *Brevibacillus* (n=2), *Pantoea* (n=1), *Staphylococcus* (n=7), *Micrococcus* (n=1), y *Paenibacillus* (n=2).

La figura 6 presenta las relaciones filogenéticas de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de agua con una serie de secuencias representativas descargadas del GenBank con las que se construyó un árbol filogenético. El análisis filogenético mostró al filum *Firmicutes* como el más representativo con 20 aislamientos pertenecientes a las especies *Bacillus licheniformis*, *Bacillus haynesii*, *Bacillus toyonensis*, de la familia *Bacillaceae*; las especies *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus caprae* pertenecientes a la familia *Staphylococcaceae*; y a *Paenibacillus sp*, *Paenibacillus lautus* y *Brevibacillus bortelensis* pertenecientes a la familia *Paenibacilaceae*. El segundo filum más abundante fue *Proteobacteria*, que incluyó a las especies *Pantoea sp* correspondiente a la familia *Enterobacteraceae*, *Pseudomona stutzeri* correspondiente a la familia *Pseudomonadaceae* y *Acinetobacter iwoffii* correspondiente a la familia *Moraxellaceae*. Además, se encontró un aislamiento perteneciente al filum *Actinobacteria*, la cual fue identificada como *Micrococcus sp* de la familia *Micrococcaceae*.

**Tabla 4.** Identificación de los aislamientos bacterianos a partir de muestras de agua basado en el porcentaje de identidad de las secuencias 16S-ARNr en el programa BLAST.

Código de Aislamiento	Familia	Organismo más cercano	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura (%)	Número de acceso Genbank
A1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.93	100	MG937682.1
A2	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	100	EU275358.1
A5	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	99.12	100	MG871217.1
A6	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus bortelensis</i>	99.51	99	MN604052.1
A7	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.44	100	KY433888.1
A8	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pantoea sp.</i>	99.72	100	MK053631.1
A13	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	99.65	99	MF327693.1
A14	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	99.58	100	KR054056.1
A15	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus toyonensis</i>	100	100	MK318228.1
A16	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>	99.86	99	MH393218.1
A17	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus caprae</i>	99.51	99	MW132421.1
A18	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	100	100	MW251746.1
A19	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus bortelensis</i>	99.93	100	KX783601.1
A20	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.87	100	LT669763.1
A21	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	MT534569.1
A23	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99.79	100	MW040701.1
A25	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	99.79	100	FN429976.1
A26	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.93	100	MN938189.1
A30	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	99.85	100	KT717627.1
A28	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.90	100	OK094134.1
A41	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus haynesii</i>	100	100	OP456544.1
A42	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter iwoffii</i>	99.71	100	MN252077.1
A53	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.81	100	ON004995.1
A58	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus lautus</i>	99.86	100	KU955657.1
A62	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	OP439523.1



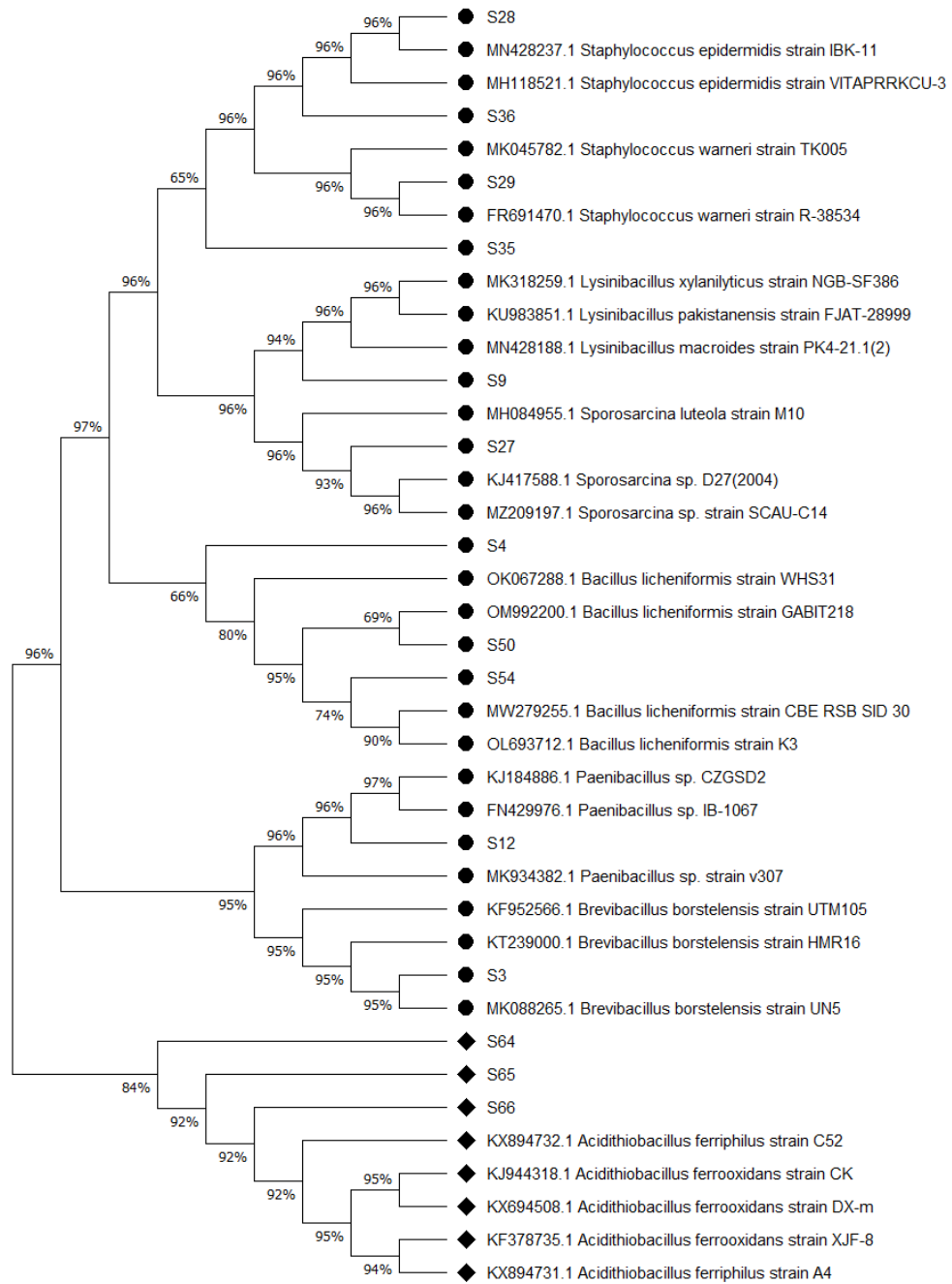
**Figura 6.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S ARNr de los aislamientos obtenidos de las muestras de agua. Se utilizó el método estadístico Neiborg-Joining del software MEGA-X con 1000 réplicas bootstrap. Filum: ●Firmicutes, ■Actinobacteria, ◆Proteobacteria.

La Tabla 5 muestra la identidad de 14 aislamientos obtenidos a partir de las muestras de sedimento que se distribuyeron en 2 filum: *Firmicutes* (78.5 %) y *Proteobacteria* (21.5 %), representados por 8 géneros diferentes: *Bacillus* (n=3), *Lysinibacillus* (n=1), *Brevibacillus* (n=1), *Staphylococcus* (n=4), *Sporosarcina* (n=1), *Paenibacillus* (n=1) y *Acidithiobacillus* (n=3).

**Tabla 5.** Afiliaciones taxonómicas de aislamientos bacterianos a partir de muestras de sedimento.

Código de aislamiento	Familia	Organismo más cercano	Porcentaje de identidad (%)	Cobertura (%)	Número de acceso GenBank
S3	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Brevibacillus bortelensis</i>	100	98.8	KT239000.1
S4	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	MT640331.1
S9	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus macroides</i>	100	100	MN428188.1
S12	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus sp</i>	100	99.72	KJ184886.1
S27	<i>Planococcaceae</i>	<i>Sporosarcina aquimarina</i>	100	99.33	KT922020.1
S28	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99.65	MG937601.1
S29	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	100	99.30	FR691470.1
S35	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	100	MT613456.1
S36	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99.79	MK015803.1
S50	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	100	OM967176.1
S54	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	99.90	MT640331.1
S64	<i>Acidithiobacillaceae</i>	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>	100	100	KX894732.1
S65	<i>Acidithiobacillaceae</i>	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	100	99.93	KX694508.1
S66	<i>Acidithiobacillaceae</i>	<i>Acidithiobacillus ferriphilus</i>	100	99.93	KX894731.1

La figura 7 presenta las relaciones filogenéticas de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de sedimento con una serie de secuencias obtenidas de la base de datos del Gen Bank con las que se construyó el árbol filogenético. El análisis mostró igualmente al filum *Firmicutes* como el más representativo con 11 aislamientos pertenecientes a las especies *Bacillus licheniformis* de la familia *Bacillaceae*, las especies *Staphylococcus warneri* y *Staphylococcus epidermidis* pertenecientes a la familia *Staphylococcaceae*; *Paenibacillus sp*, *Paenibacillus lautus* y *Brevibacillus bortelensis* pertenecientes a la familia *Paenibacilaceae*. El segundo filum presente fue *Proteobacteria*, que incluyó bacterias de la familia *Acidithiobacillaceae*: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrifillum*.

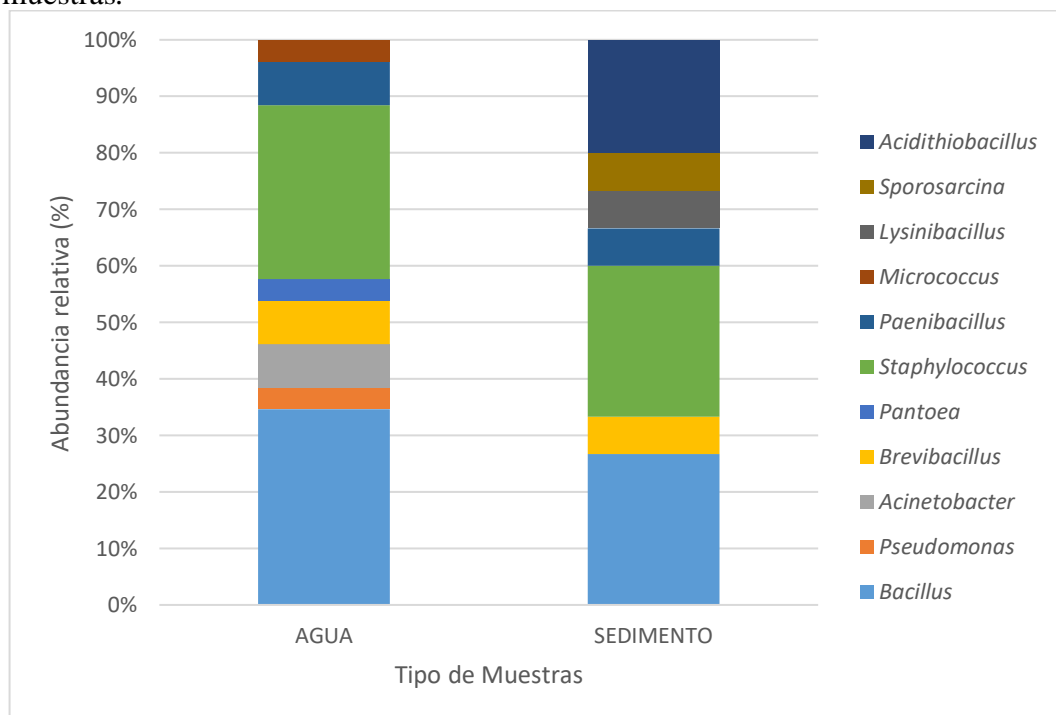


**Figura 7.** Árbol filogenético construido con las secuencias del gen 16S ARNr de los aislamientos obtenidos de las muestras de sedimento. Se utilizó el método estadístico Neiborg-Joining del software MEGA-X con 1000 réplicas bootstrap. Filum: ●Firmicutes, ◆Proteobacteria.

A partir de la identificación con el software BLAST se calcularon las abundancias relativas de los géneros bacterianos obtenidos. Las abundancias relativas del género *Bacillus* fueron de 35 % en agua y 27 % en sedimento; en segundo lugar, se encontró

al género *Staphylococcus* con 31 % en agua y 37 % en sedimento. En tercer lugar, estuvo el género *Acidithiobacillus* con un 20 %, aislado a partir de las muestras de sedimento, pero no de las muestras de agua. Otros géneros identificados con menor abundancia relativa en las muestras de agua fueron *Brevibacillus*, *Paenibacillus* y *Acinetobacter*, con 8 %, y con 4 % los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Micrococcus*. En las muestras de sedimento, los géneros *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, y *Sporosarcina*. tuvieron abundancias relativas menores (7 % cada uno) (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Abundancia relativa de los géneros bacterianos obtenidos según el tipo de muestras.



#### 4.2.3 Índices de diversidad alfa para bacterias cultivables

Los dos tipos de muestra mostraron diferentes especies bacteriana, un mayor número de aislamientos se encontró en las muestras de agua en comparación con las de sedimento. La tabla 6 muestra los índices de diversidad alfa para ambos tipos de muestras; el índice de Chao1 muestra una mayor riqueza de especies en las muestras

de agua en comparación con las muestras de sedimento, de igual manera, el índice de Shannon evidencia una mayor diversidad en las muestras de agua. Por otro lado, el índice de Simpson revela una baja distribución equitativa en ambas muestras, es decir, existe dominancia de especies.

**Tabla 6.** Medidas de diversidad alfa de bacterias cultivables según el tipo de muestra

<b>Muestra</b>	<b>Chao1</b>	<b>Shannon</b>	<b>Simpson</b>
Agua	26.58	2.809	0.9231
Sedimento	19.71	2.637	0.9524

### **4.3 Metodología independiente de cultivo**

#### **4.3.1 Diversidad de la comunidad bacteriana**

El secuenciamiento del amplicón 16S ARNr produjo un promedio de 76 605 reads en la muestra de agua y 201 745 reads en la muestra de sedimento. Luego de filtrar las lecturas de baja calidad y formar los contigs se obtuvieron 61 640 secuencias para la muestra de agua y 137 451 secuencias para la muestra de sedimento. En conjunto se identificaron un total de 796 ASV (Amplicon Sequence Variant, variantes únicas por amplicón), registrando en la muestra de agua una menor cantidad de ASV (156) en comparación con los 654 ASV de la muestra de sedimento.

Estos resultados mencionados son un indicativo inicial de la existencia de una mayor riqueza de géneros en el sedimento en comparación con la comunidad bacteriana del agua y se refleja en los índices de diversidad alfa obtenidos (Tabla 7, Gráfico 2). En la muestra de sedimento la riqueza (índice de Chao1) presentó un valor de 654 en comparación con el índice de 156 en la muestra de agua. De igual forma, el valor

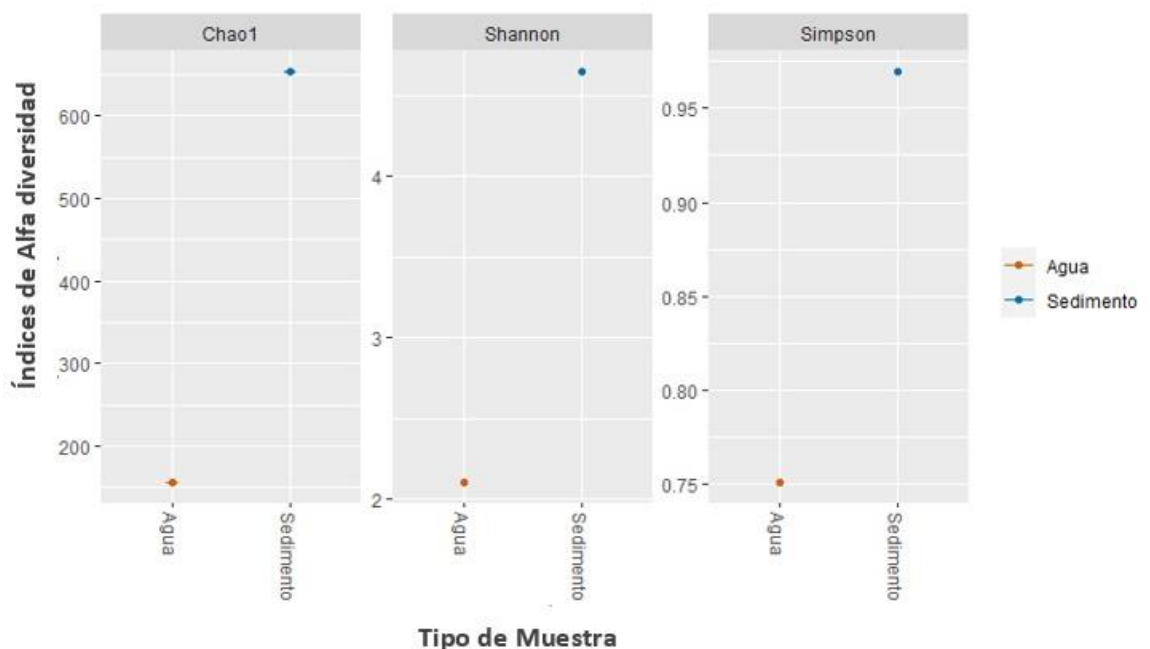


obtenido en el índice de diversidad de Shannon fue 4.65 en las muestras de sedimento, lo que indica una mayor diversidad. Por otro lado, el índice de uniformidad de Simpson fue 0.97 para la muestra de sedimento en comparación con el 0.75 en el agua, apuntando a una mayor dominancia en el primero comparado con la muestra de agua.

**Tabla 7.** Índices de diversidad alfa para muestras de agua y sedimento.

Muestra	Número de secuencias	Chao1	Shannon	Simpson
Agua	61 640	156	2.10	0.75
Sedimento	137 451	654	4.65	0.97

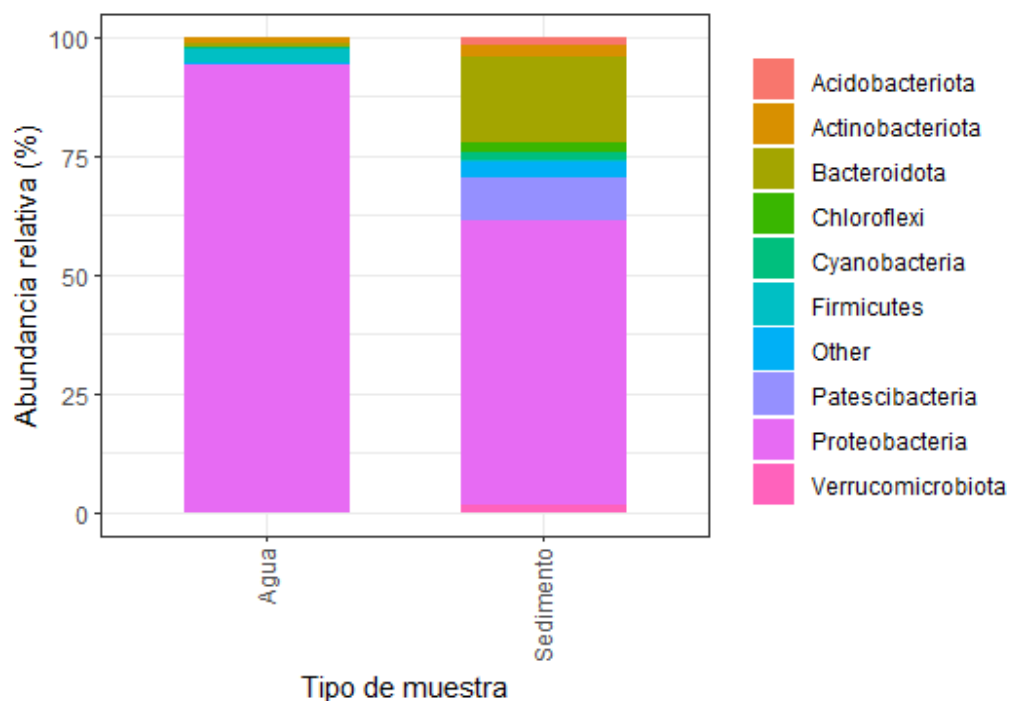
**Gráfico 2.** Índices de diversidad alfa según el tipo de muestra



La composición de la comunidad bacteriana en ambas muestras se anotó en 25 filum, 63 clases y 155 géneros bacterianos, y los principales grupos microbianos que presentaron una frecuencia mayor o igual al 1 % se muestran a través de un gráfico de columnas apiladas. A nivel de filum (Gráfico 3), el filum *Proteobacteria* (94.3 %) dominó en la muestra de agua, seguido de *Firmicutes* (3.15 %) y *Actinobacteria* (1.41

); también se registró el filum *Bacteroidota* (0.78 %), *Cyanobacteria* (0.05 %), *Spirochaetes* (0.07 %), *Fusobacteria* (0.08 %), entre otros filios con una abundancia baja menor al 1 %. En cuanto al sedimento, de igual manera este se encontró dominado por el filum *Proteobacteria* (59.9 %) representando la mayor abundancia, seguido de *Bacteroidota* (17.9 %), *Patescibacteria* (8.7 %), *Actinobacteria* (2.5 %), *Chloroflexi* (2.03 %), *Cyanobacteria* (1.82 %), *Verrucomicrobiota* (1.65 %) y *Acidobacteria* (1.5 %), además se registró también el filum *Firmicutes* con una abundancia baja de 0.5 %, de igual manera detectaron los filios *Planctomycetota* (0.9 %), *Bdellovibrionota* (0.42 %), así como, a *Nitrospirota* (0.28 %) y *Spiroarchaetes* (0.25 %).

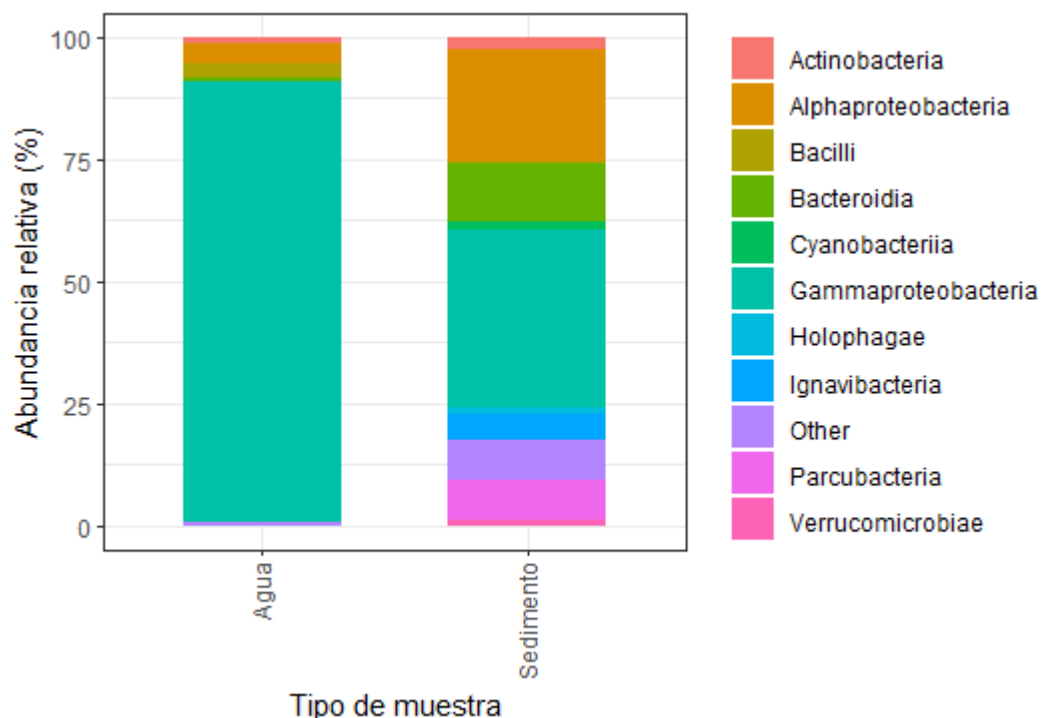
**Gráfico 3.** Abundancia relativa por filum en agua y sedimento del drenaje ácido de mina



A nivel de clases, la muestra de agua presentó mayor abundancia de *Gammaproteobacteria* (90 %), seguido de *Alphaproteobacteria* (4 %), *Bacilli* (2.9 %) y *Actinobacteria* (1.4 %); con abundancias relativas más baja se reportó a *Bacteroidia*

(0.8 %), *Leptospirae* (0.07 %), *Cyanobacteriia* (0.05 %), entre otros. Así mismo, en la muestra de sedimento, las clases *Gammaproteobacteria* (36.7 %) y *Alphaproteobacteria* (23.2 %) presentaron mayor abundancia, seguidas de *Bacteroidia* (11.9 %), *Parcubacteria* (8.25 %), *Ignavibacteria* (5.6 %), *Actinobacteria* (2.33 %), *Cyanobacteriia* (1.27 %), *Holophagae* (1.07 %) y *Verricomicrobiae* (1.20 %), además se encontró otras clases con abundancia menor al 1 %, entre ellas estuvieron *Planctomycetes* (0.8 %), *Bacilli* (0.45 %), *Acidobacteriae* (0.4 %), *Leptospirae* (0.2 %), *Nitrospira* (0.18 %), y otros (Gráfico 4).

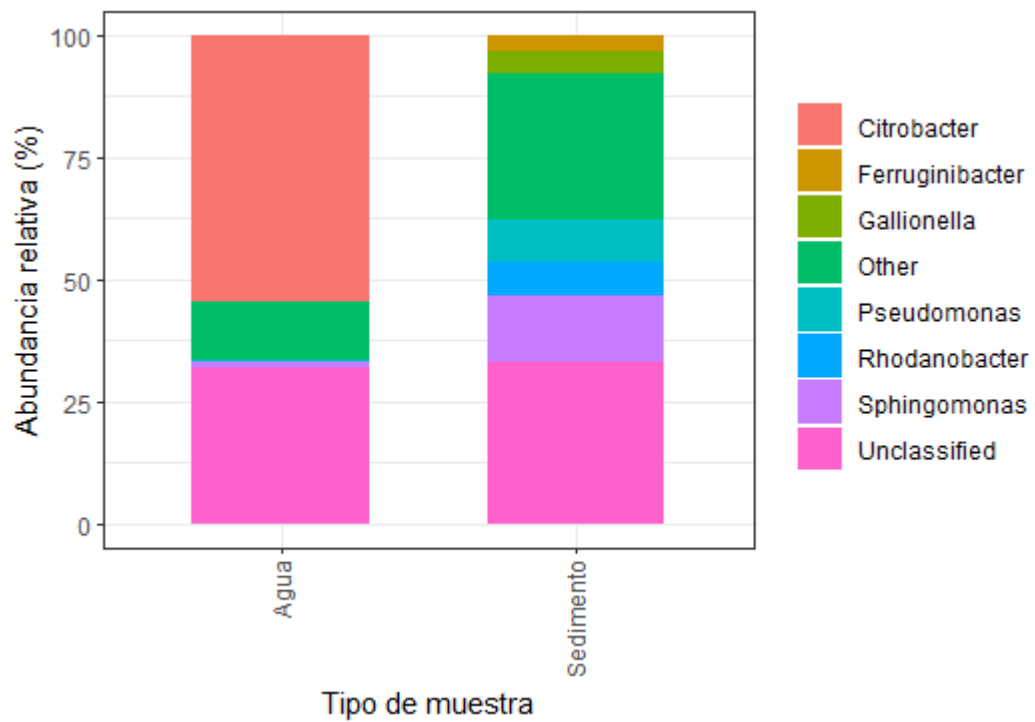
**Gráfico 4.** Abundancia relativa a nivel de clases en agua y sedimento de drenaje ácido de mina.



A nivel de género (Gráfico 5) la muestra de agua reveló mayor abundancia relativa del género *Citrobacter* (54.6%), seguido de *Sphingomonas* (1.4%), *Enterobacter* (1.3%), *Staphylococcus* (1.27%) y *Ralstonia* (1.01%), además hubo otros géneros con

una abundancia relativa menor a 1, entre los que resaltan el género *Gallionella* (0.01%) y *Acidovorax* (0.04%). Los géneros con mayor abundancia en la muestra de sedimento fueron *Sphingomonas* (13.4%), seguido de *Pseudomonas* (8.4%), *Rhodanabacter* (7.14%), *Gallionella* (4.8%), *Ferruginibacter* (3.1%); además, se evidenció la presencia de los géneros *Leptospirillum* (0,035%), y *Acidithiobacillus* (0.028%).

**Gráfico 5.** Abundancia relativa a nivel de género en agua y sedimento de drenaje ácido de mina.



## **DISCUSIÓN:**

El análisis de metales pesados reveló la presencia de concentraciones altas de Fe y Cu en ambos tipo de muestra (Tabla 1), esto se relaciona principalmente con la meteorización de minerales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y pirita ( $\text{FeS}_2$ ) que forman parte de todo yacimiento minero (OEFA, 2019), y que debido al contacto con el agua y oxígeno tienden a oxidarse liberando iones metálicos y una serie de sulfatos de las rocas, así como la producción de ácido sulfúrico que conduce a la disminución del pH del ambiente influenciado (Akcil y Koldas, 2006). Así mismo, en ambas muestras se detectó la presencia de metales del grupo II y metales de transición, como el Al, Mg, Mn, Cd, Cr, Zn los cuales son cationes disueltos que normalmente dominan los DAM (Skousen *et al.*, 1998).

Los resultados del análisis químico evidencian una mayor concentración de metales pesados en las muestras de sedimento en comparación con la muestra de agua; en ambas, el hierro es el metal con mayor presencia; sin embargo, el sedimento mostró un mayor contenido de hierro (368291,2 mg/kg) con respecto al agua (9,0 mg/kg), lo que concuerda con la presencia de compuestos como la jarosita, producto de la oxidación del hierro y como reacción secundaria de la meteorización impulsada por comunidades microbiana complejas, que se evidencian por el color naranja característico en los sedimentos de DAM (Figura 2, P2) (Norlund, Baron y Warren, 2010). Estos compuestos actúan también como adsorbentes de metales tóxicos como el arsénico y son considerados como fuentes potenciales de generación de ácido, incluso en su proceso de generación se pueden formar cationes metálicos como el potasio, metales traza y otros contaminantes (Xie *et al.*, 2018); lo que explicaría la mayor concentración de metales en el sedimento.

Las altas concentraciones de Ca en ambas muestras, se debería a la existencia de piedras calizas compuestas principalmente por carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) (OEFA, 2019). Los carbonatos como el  $\text{CaCO}_3$ , que normalmente se encuentran en las rocas expuestas, funcionan como neutralizadores de ácido; es decir, contrarrestan la acidez provocada por la mineralización de los sulfuros (Skousen *et al.*, 2017), lo que puede relacionarse con los niveles de acidez que presentaron las muestras de agua (pH=5,7) y sedimento (pH=4,6), considerados como ligeramente ácido y ácido, respectivamente (Quatrini y Johnson, 2018; Skousen, Ziemkiewicz y McDonald, 2019). Lo que explicaría la mayor abundancia de heterótrofos tolerantes a los ácidos en ambos tipos de muestras (Guthrie, Cherry y Singleton, 1978).

La disponibilidad de todos estos metales, principalmente del hierro, el grado de pH, la temperatura y el oxígeno, así como el nitrógeno, los fosfatos disponibles y la concentración de sustratos orgánicos en los DAM pueden hacer la diferencia en estos ecosistemas particulares modificando de alguna manera la estructura de las comunidades microbianas (Rogers y Wilson, 1966; Kuang *et al.*, 2013). Diversos estudios han reportado la presencia de microorganismos, principalmente de tipo acidófilo, entre los que también están bacterias heterótrofas, y quimiolitótrofos oxidantes de hierro que pueden sobrevivir en ambientes oxigenados y que con su actividad bioquímica aumentan los efectos del DAM debido a que aumentan la acidez, y disuelve las rocas liberando los compuestos metálicos que caracterizan estos ambientes (Guthrie, Cherry y Singleton, 1978; Bacelar y Johnson, 1999).

El uso del método dependiente de cultivo en los diferentes medios reveló una diversidad inesperada de bacterias tanto en el agua como en el sedimento. El mayor número de aislamientos fue obtenido en medios nutritivos, debido principalmente al tipo y concentración de nutrientes que favorecen el crecimiento de ciertos géneros bacterianos con metabolismo heterótrofo. Como se observa en las Tablas 4 y 5, resultado del análisis molecular de ambos tipos de muestras, se evidencia mayor cantidad de bacterias heterótrofas en las muestras de agua debido probablemente a que en el agua habría una mayor disponibilidad de nutrientes orgánico que favorecen su crecimiento (Barrie Johnson y Hallberg, 2008).

Las bacterias heterótrofas presentes en estos ecosistemas se encargan de crear un ambiente propicio para el crecimiento de las bacterias oxidantes de hierro, ya que cumplen la función de remover los componentes orgánicos que podrían ser tóxicos para los oxidantes de hierro, en nuestro estudio por ejemplo, se encontró heterótrofos de los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* en buena proporción, las cuales dependen del carbono que se origina de productos originados de las lisis de los acidófilos quimilitótrofos, creando de esta manera una interacción biológica de mutualismo entre acidófilos quimiolitotróficos y heterótrofos (D. Barrie, 1998; Bacelar y Johnson, 1999).

El agua y el sedimento se encontraron dominados por el filum *Firmicutes*, entre ellos *Bacillus* y *Staphylococcus* (Figura 6 y 7), de forma similar a lo reportado por Xiaoqi et al., (2017) quienes realizaron un estudio de comunidades microbianas en ambientes con presencia de metales pesados; e indican el ligero predominio de este filum en presencia de metales pesados contaminantes evidencia la fácil adaptabilidad que

tienen los *Firmicutes* en este tipo de ambientes. El filum *Proteobacteria* se mostró como el segundo más abundante, entre ellos estuvieron aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Pantoea* y *Acinetobacter* (Figura 6 y 7), lo que concuerda con otras investigaciones en las que se explica que el predominio de bacterias pertenecientes a este filum constituye una respuesta a la contaminación por metales pesados, atribuida a su capacidad de adsorción (Haferburg y Kothe, 2010), siendo señalados como la comunidad bacteriana cultivable más abundante en suelos con presencia de metales como el Cd (Xiaoqi *et al.*, 2017; Bravo *et al.*, 2018).

Por otro lado, en la muestra de agua se observó también la presencia del filum *Actinobacteria*, el cual agrupa a géneros bacterianos como *Micrococcus* (Figura 6) los cuales habitan en ecosistemas ácidos y se caracterizan por su capacidad para adaptarse a un pH incluso menor de 3 y a temperatura bajas (Sánchez-Andrea *et al.*, 2011). Nuestros resultados concuerdan también con lo reportado por Li *et al.*, (2017) quienes realizaron un estudio de diversidad de bacterias cultivables en muestras obtenidas de una mina en la cual los *Firmicutes* constituyeron el filum más abundante, seguido igualmente de los filum *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

En cuanto a los géneros bacterianos encontrados en esta investigación (Tablas 4 y 5) se encontraron *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, y *Brevibacillus*, en ambos tipos de muestra; en el sedimento además aparecieron los géneros: *Lysinibacillus*, y *Sporosarcina*. También se identificó a los géneros *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Micrococcus* en el agua. Hallazgos similares fueron reportados en varios estudios sobre DAM, donde *Bacillus*, *Sarcina*, *Pseudomonas* y *Brevibacillus* fueron aislados a partir de efluentes con pH de 4.6 a 6.5 (Guthrie, Cherry y Singleton,



1978); *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, fueron aislados de muestras de agua y sedimento (Aransiola, Olusola y Fagade, 2021) y de un efluente ácido de DAM con concentraciones elevadas de Cd, Co, Pb, Cr, Zn, Cu y Mn (Funmi y Abiodun, 2021).

Zhang et al., (2007) encontraron que la bacteria Gram negativa *Acinetobacter sp.* hallada en un relave minero podría tener la habilidad de tolerar el Cd. Así mismo, los géneros *Micrococcus*. y *Pantoea*. fueron aislados de agua de DAM en medios suplementados con metales pesados (Zondo, Maphutha y Kondiah, 2012); y el género *Lysinibacillus*, fue aislado de una mina de manganeso por Barboza et al., (2015) quienes explican además que esta bacteria podría presentar mecanismos enzimáticos que le permitirían sobrevivir en ambientes con concentraciones altas de metales pesados y que usaría esos mecanismos para aumentar el pH de su medio y así disminuir la concentración de  $Mn^{2+}$  mediante oxidación química y adsorción. *Lysinibacillus* también ha sido hallada en un DAM de carbón (Park et al., 2012) y en un área activa de explotación minera de oro, en ese estudio se resalta sus capacidad de adsorción (Bustos, Ibarra y Dussán, 2018).

El género *Sporosarcina* al igual que en este estudio ha sido encontrado en muestras de agua y sedimento de una mina de cobre por Kang et al., (2016) quienes resaltan la capacidad de esta bacteria para la remoción de Cu. Huang et al., (2021) también reportaron a esta bacteria anaerobia facultativa en suelo contaminado con Cr, la cual fue identificada como *Sporosarcina saromensis* con capacidad reductora de  $Cr^{4+}$ . Este género bacteriano también ha sido aislado de suelo contaminado con Arsénico (As), y se ha evaluado su capacidad de remediar suelos con  $As^{3+}$  mediante la precipitación de calcita de manera eficiente (Achal et al., 2012).

Con respecto al género *Pseudomonas*, aunque solo lo hemos encontrado en las muestras de agua, este se describe en gran parte de los estudios en ambientes contaminados debido a que esta bacteria tiene una enorme capacidad de adaptación a estos ambientes pudiendo degradar diversos contaminantes, entre ellos los metales pesados, gracias a sus proteínas de unión a metales intracelulares y a una gran cantidad de bombas de expulsión (Muneer *et al.*, 2016). Estas capacidades en *Pseudomonas* también se relacionan con algunos mecanismos de desintoxicación, formación de complejos de exopolisacáridos, reducción de metales e incluso el uso de estos como aceptores terminales de electrones (Haferburg y Kothe, 2010). Así mismo se ha estudiado su potencial para la recuperación de metales (Ai *et al.*, 2020), de igual manera este hallazgo se relaciona con lo informado por Low *et al.*, (2020) quienes presentaron los datos genómicos de bacterias aisladas del drenaje ácidos de una mina de cobre, los cuales pertenecieron al género *Pseudomonas*.

Si bien es cierto, los aislamientos obtenidos en esta investigación son en gran parte heterótrofos, los DAM se caracterizan en realidad por la presencia de microorganismos quimiolitotrófos (Chen *et al.*, 2022). En ese sentido, el cultivo en el medio líquido selectivo 9K-Fe realizado en ese estudio permitió el aislamiento e identificación de bacterias del género *Acidithiobacillus* (Tabla 5) a partir de la muestra de sedimento. La identificación filogenética permitió relacionar estos aislamientos con especies como *Acidithiobacillus ferriphilus* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El género *Acidithiobacillus* se caracteriza por ser Gram negativo y de metabolismo quimiolitótrofo; es decir, usa al  $Fe^+$  como último aceptor de electrones, y ha sido

frecuentemente reportado en diferentes ambientes asociados a DAM (Valdés *et al.*, 2008; Sánchez-Andrea *et al.*, 2011; Abanto *et al.*, 2013).

Las especies *Acidithiobacillus ferriphilus* catalizan la oxidación disimilatoria de hierro ferroso, y la disolución oxidativa de pirita de manera aeróbicas, así también se encontraron cepas bacterianas catalizadoras de reducción disimilatoria de hierro férrico en condiciones anóxicas a través del azufre reducido como donante de electrones (Falagán y Barrie Johnson, 2016). Por otro lado, *At. ferrooxidans* es una especie bacteriana conocida por utilizar la energía de la oxidación de minerales que contienen hierro y azufre para promover su desarrollo, puede prosperar a un pH menor a 2 y tiene la capacidad de fijar nitrógeno y carbono de la atmósfera (Valdés *et al.*, 2008), los estudios realizados sobre esta especie resaltan su importante participación en biominería como miembro de consorcios microbianos (Rawlings, 2002).

En cuanto a los resultados provenientes del análisis con el método independiente de cultivo, específicamente el secuenciamiento del amplicón 16S ARNr, permitieron un análisis con mucha mayor profundidad de las diversas comunidades microbianas, tanto en el agua como dentro del sedimento del DAM. La diversidad de géneros en el agua del DAM (Gráfico 5), contuvo una mayor abundancia relativa de *Citrobacter*, género bacteriano caracterizado como mixótrofo por su capacidad de reducir sulfato mediante mecanismos tanto autótrofos como heterótrofos, además, este género es capaz de formar sulfuro de cobre y precipitar metales pesados (Yan *et al.*, 2018). De acuerdo con algunas investigaciones, *Citrobacter* puede ser incluso considerado como una alternativa frente a las SRB (Bacterias reductoras de sulfato) debido a que estas bacterias son reductoras de sulfato facultativas frente a las SRB que son

anaerobias casi estrictas (Qiu *et al.*, 2009).

Otro género detectado en el análisis de las secuencias 16S fue *Sphingomonas*, reportada en ambientes ácidos como los sedimentos del Río Tinto (Huelva, España), entre otras (Johnson *et al.*, 2001; Méndez *et al.*, 2015) y ha sido relacionada con la producción de iones sulfato y la capacidad de reducción del pH del medio que habitan (Hassanshahian *et al.*, 2019). También se obtuvieron secuencias relacionadas al género *Gallionella*, una proteobacteria que tiene la capacidad de oxidar el hierro en condiciones microóxicas o anóxicas (Fabisch *et al.*, 2013); así mismo, se obtuvo secuencias relacionadas con el género *Acidovorax* una bacteria oxidante de hierro y reductora de nitratos (Hohmann *et al.*, 2011). Además, también se detectó la presencia de bacterias heterótrofas como *Staphylococcus* y *Enterobacter* de la cual se ha reportado una especie denominada *Enterobacter cloacae* NZS capaz de oxidar el  $\text{Fe}^{2+}$  en medio 9K a pH bajo (Mazalan *et al.*, 2020).

En las muestras de agua no se encontraron secuencias relacionadas con los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* en comparación con el sedimento, aunque en este último se hicieron presentes con una abundancia relativa muy baja ( $<1$ ) por lo que no aparecen en los gráficos que presentamos (Gráfico 5). Estas bacterias tienen una relación muy estrecha con la formación de los DAM debido al metabolismo quimiolitotrófico oxidante de hierro que presentan y a que generalmente se encuentran juntas (Baker y Banfield, 2003). Los géneros con mayor abundancia relacionado a esta muestra fueron *Sphingomonas* y *Pseudomonas*, la primera se encontró también en la muestra de agua y el segundo género también fue hallada en el método dependiente de cultivo, ambas han sido encontradas con frecuencia en

DAM y son potencialmente útiles, en cultivos mixtos, para procesos biorremediadores (Putri, Ratnaningsih y Rinanti, 2021). También se detectaron los géneros *Gallionella* y *Ferruginibacter*, este último pertenece al filum Bacteroidetes y ha sido reportada también en una zona minera de carbón (García-Moyano *et al.*, 2015), así como en sedimento de agua dulce de donde fueron aisladas (Lim, Baek y Lee, 2009).

El sedimento también reveló la presencia de secuencias relacionadas a género bacterianos no cultivados, entre ellos, el género BSV13, del filum Bacteroidota y han sido relacionadas con ambientes contaminados con petróleo (Castillo Rogel, 2019) y en ríos expuestos a diversas fuentes de contaminación (Adedire *et al.*, 2022). También se presentó secuencias relacionadas al género GOUTA6 perteneciente al filo Proteobacteria, y de la familia Nitrosomonadaceae, reportadas como bacterias nitrificantes; es decir, asociadas a la oxidación microbiana del amoníaco a nitrato, mediante metabolismo quimiolitotróficas y fotolitotróficas (Podlesnaya *et al.*, 2020). Así mismo, también se evidenció la presencia de los géneros denominados como C1-B045, RBG-1649-21, Blyi10, IS-44, la mayoría identificados mediante técnicas de secuenciación NGS (Cui *et al.*, 2022).

Con respecto a la diversidad, tanto el método dependiente como el independiente de cultivo mostraron una baja diversidad alfa; sin embargo, el método dependiente de cultivo mostró una mayor riqueza en el agua con respecto al sedimento, en comparación con el método independiente que evidenció una mayor riqueza en el sedimento con respecto al agua, debido a la presencia de bacterias acidófilas oxidantes de hierro así como bacterias heterótrofas acidófilas que presentan con diversas capacidades metabólicas aeróbicas, anaeróbicas, entre otros aún no revelados. Estos

resultados concuerdan con lo descrito por Liang *et al.*, (2019), quienes reportan una diversidad baja en pozos de agua ácida de mina debido a factores ambientales como el pH. Y con lo encontrado por Valdez-Nuñez *et al.*, (2022) quienes también reportan una baja diversidad alfa en muestras de agua y sedimento de DAM.

La baja diversidad es característica de ecosistemas asociados a DAM y han sido descritos en múltiples estudios (Méndez-García *et al.*, 2014; Méndez *et al.*, 2015), la explicación a ello es atribuida por la mayoría de estudios principalmente a las condiciones extremas del ambiente, entre ellas el pH bajo y la alta concentración de metales, es decir, las condiciones ambientales afectan las interacciones directas e indirectas entre las comunidades microbianas, por lo que estas dependen directamente de los patrones biogeográficos del medio ambiente; sin embargo, es preciso resaltar que aunque esta diversidad se muestre baja, la cantidad de especies microbianas descritas en este tipo de ecosistemas es considerable (Teng *et al.*, 2017).

A partir de lo mencionado, los drenajes ácidos de minas albergan una variedad de bacterias que ya sea en conjunto o de forma individual representa un gran potencial biotecnológico, dadas las diversas capacidades mostradas y discutidas anteriormente para varios de los géneros bacterianos que hemos encontrado. Por lo tanto, estos ambientes son una oportunidad para llevar estudios no solo en bacterias, sino también en otros organismos, permitiendo en un futuro el desarrollo y la mejora de industrias que hoy en día causan problemas de nivel ambiental y social.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- Se logró caracterizar microbiológicamente 41 aislamientos bacterianos a partir de las muestras de agua y sedimento obtenidas del drenaje ácido de la mina Michiquillay-Cajamarca.
- El análisis del gen 16S ARNr permitió la identificación molecular de todos los aislamientos obtenidos por el método dependiente de cultivo, mostrando la presencia de tres filums dominantes Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria, representados por los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Acidithiobacillus*, *Lysinibacillus* y *Sporosarcina*.
- El análisis de las secuencias del amplicón 16S ARNr de ADN total de las muestras, en el método independiente de cultivo, evidenció una mayor riqueza de géneros bacterianos en la muestra de sedimento en comparación con la de agua.
- Con ambos métodos, la diversidad alfa de las comunidades bacterianas que habitan el drenaje ácido de la mina Michiquillay fue baja, tanto en agua como en sedimento.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda continuar con las investigaciones relacionadas a microorganismos que habitan los drenajes ácidos de minas debido al gran potencial biotecnológico ambiental que estos microorganismos pueden presentar.
- Se debe evaluar la resistencia de los aislamientos acidófilos y metalófilos a diferentes concentraciones de metales pesados a fin de seleccionar un pool de microorganismos potencialmente útiles en biorremediación de DAM.
- Se debe evaluar las capacidades biolixiviadoras de los aislamientos provenientes de los DAM a fin de obtener cepas que puedan ser útiles en biominería.



## LISTA DE REFERENCIAS

- Abanto, M. *et al.* (2013) 'Molecular identification of iron oxidizing bacteria isolated from acid mine drainages in Peru', *Advanced Materials Research*, 825, pp. 84–87. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.825.84.
- Achal, V. *et al.* (2012) 'Biomining based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*', *Journal of Hazardous Materials*, 201–202, pp. 178–184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.067>.
- Acharya-Patel, N., Allison, M. J. and Helbing, C. C. (2023) 'Chapter 5 - Environmental DNA: Revolutionizing ecological assessments with genomics', in Lopez-Correa, C. and Suarez-Gonzalez, A. B. T.-G. and the G. B. (eds) *Translational and Applied Genomics*. Academic Press, pp. 103–124. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91601-1.00004-3>.
- Adedire, D. E. *et al.* (2022) 'Microbiome Diversity Analysis of the Bacterial Community in Idah River, Kogi State, Nigeria', *Advances in Microbiology*, 12(05), pp. 343–362. doi: 10.4236/aim.2022.125025.
- Ai, C. *et al.* (2020) 'Recovery of metals from acid mine drainage by bioelectrochemical system inoculated with a novel exoelectrogen, *Pseudomonas* sp. E8', *Microorganisms*, 8(1). doi: 10.3390/microorganisms8010041.
- Akcil, A. and Koldas, S. (2006) 'Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies', *Journal of Cleaner Production*, 14(12-13 SPEC. ISS.), pp. 1139–1145. doi: 10.1016/j.jclepro.2004.09.006.
- Altschul, S. *et al.* (1997) 'A simple sequence repeat-based linkage map of Barley', *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389–3402. doi: 10.1093/genetics/156.4.1997.
- Aransiola, M. N., Olusola, B. O. and Fagade, O. E. (2021) 'Heavy Metal and Sulfate Tolerance Bacteria Isolated from the Mine Drainage and Sediment of Igun, Osun State, Nigeria', *Academia.Edu*, 15(3), pp. 36–55. doi: 10.9790/2402-1503013655.
- Bacelar, P. and Johnson, D. B. (1999) 'Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures', *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(2),

pp. 585–590.

Baker, B. J. and Banfield, J. F. (2003) ‘Microbial communities in acid mine drainage’, *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), pp. 139–152. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00028-X.

Barboza, N. R. *et al.* (2015) ‘Indirect manganese removal by *Stenotrophomonas* sp. and *Lysinibacillus* SP. isolated from Brazilian mine water’, *BioMed Research International*, 2015, pp. 18–20. doi: 10.1155/2015/925972.

Barrie Johnson, D. and Hallberg, K. B. (2008) *Carbon, Iron and Sulfur Metabolism in Acidophilic Micro-Organisms, Advances in Microbial Physiology*. Elsevier Masson SAS. doi: 10.1016/S0065-2911(08)00003-9.

Behjati, S. and Tarpey, P. S. (2013) ‘What is next generation sequencing?’, *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition*, 98(6), pp. 236–238. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340.

Bomberg, M. *et al.* (2019) ‘High Diversity in Iron Cycling Microbial Communities in Acidic, Iron-Rich Water of the Pyhäsalmi Mine, Finland’, *Geofluids*, 2019. doi: 10.1155/2019/7401304.

Bond, P. L., Druschel, G. K. and Banfield, J. F. (2000) ‘Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems’, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), pp. 4962–4971. doi: 10.1128/AEM.66.11.4962-4971.2000.

Bravo, D. *et al.* (2018) ‘Cadmium and cadmium-tolerant soil bacteria in cacao crops from northeastern Colombia.’, *Journal of applied microbiology*, 124(5), pp. 1175–1194. doi: 10.1111/jam.13698.

Bustos, M. C., Ibarra, H. and Dussán, J. (2018) ‘The golden activity of *Lysinibacillus sphaericus*: New insights on gold accumulation and possible nanoparticles biosynthesis’, *Materials*, 11(9). doi: 10.3390/ma11091587.

Callahan, B. J. *et al.* (2016) ‘DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data’, *Nature Methods*, 13(7), pp. 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.

Castillo, L. *et al.* (2021) ‘Pasivos ambientales mineros en el Perú’, *Contraloría General de la República del Perú (CGR)*, I, p. 52. Available at: [https://doc.contraloria.gob.pe/estudios-especiales/documento\\_trabajo/2021/PAM\\_FINAL\\_25-08-21.pdf](https://doc.contraloria.gob.pe/estudios-especiales/documento_trabajo/2021/PAM_FINAL_25-08-21.pdf).

Castillo Rogel, R. T. (2019) *Caracterización de la comunidad bacteriana de una zona contaminada con petróleo, mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo en Nieva-Amazonas 2016*, Universidad Nacional de Piura / UNP. Available at: <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1724>.

Chen, L.-X. *et al.* (2016) ‘Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems’, *Current Opinion in Biotechnology*, 38, pp. 150–158. doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.013.

Chen, L. xing *et al.* (2016) ‘Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems’, *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 150–158. doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.013.

Chen, Z. *et al.* (2022) ‘Indicator species drive the key ecological functions of microbiota in a river impacted by acid mine drainage generated by rare earth elements mining in South China’, *Environmental Microbiology*, 24(2), pp. 919–937. doi: 10.1111/1462-2920.15501.

Cui, Z. *et al.* (2022) ‘Occurrence and distribution of cyclic-alkane-consuming psychrophilic bacteria in the Yellow Sea and East China Sea’, *Journal of Hazardous Materials*, 427, p. 128129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128129>.

D. Barrie, J. (1998) ‘Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms’, *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), pp. 307–317. doi: 10.1111/j.1574-6941.1998.tb00547.x.

Dong, H. *et al.* (2022) ‘Culture-dependent and culture-independent methods reveal microbe-clay mineral interactions by dissimilatory iron-reducing bacteria in an integral oilfield’, *Science of The Total Environment*, 840, p. 156577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156577>.

Ettamimi, S. *et al.* (2019) ‘A meta-taxonomic investigation of the prokaryotic diversity of water bodies impacted by acid mine drainage from the São Domingos mine in southern

Portugal', *Extremophiles*, 23(6), pp. 821–834. doi: 10.1007/s00792-019-01136-1.

Fabisch, M. *et al.* (2013) 'Surprising abundance of Gallionella-related iron oxidizers in creek sediments at pH 4.4 or at high heavy metal concentrations', *Frontiers in Microbiology*, 4(DEC), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmicb.2013.00390.

Falagán, C. and Barrie Johnson, D. (2016) 'Acidithiobacillus ferriphilus sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), pp. 206–211. doi: 10.1099/ijsem.0.000698.

Fang, Y. *et al.* (2015) 'Modified pretreatment method for total microbial DNA extraction from contaminated river sediment', *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 9(3), pp. 444–452. doi: 10.1007/s11783-014-0679-4.

Feranchuk, S. *et al.* (2018) 'Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits', *Research in Microbiology*, 169(4), pp. 254–261. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.03.004>.

Funmi, A. and Abiodun, F. (2021) 'Microbiological and chemical evaluation of acid mine drainage from mining sites in Southwestern, Nigeria', *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 15(2), pp. 158–165. doi: 10.30574/gscbps.2021.15.2.0137.

García-Moyano, A. *et al.* (2015) 'Novel and Unexpected Microbial Diversity in Acid Mine Drainage in Svalbard (78° N), Revealed by Culture-Independent Approaches.', *Microorganisms*, 3(4), pp. 667–694. doi: 10.3390/microorganisms3040667.

Giovannoni, S. J. and Stingl, U. (2005) 'Molecular diversity and ecology of microbial plankton', *Nature*, 437(7057), pp. 343–348. doi: 10.1038/nature04158.

Glassman, S. I. and Martiny, J. B. H. (2018) 'Broad-scale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units.', *mSphere*, 3(4). doi: 10.1128/mSphere.00148-18.

Gómez, F. (2011) 'Extreme Environment', in *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 570–572. doi: 10.1007/978-3-642-11274-4\_566.

Gupta, A., Sarkar, J. and Sar, P. (2019) *Understanding the Structure and Function of*

*Extreme Microbiome Through Genomics: Scope and Challenges, Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00033-2.

Gupta, S. *et al.* (2019) ‘Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing’, *Communications Biology*, 2(1), pp. 1–7. doi: 10.1038/s42003-019-0540-1.

Guthrie, R. K., Cherry, D. S. and Singleton, F. L. (1978) ‘Responses of heterotrophic bacterial populations to pH changes in coal ash effluent.’, *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 14(4), pp. 803–808. doi: 10.1111/j.1752-1688.1978.tb05580.x.

Hadley, W. (2016) *ggplot2: Gráficos elegantes para el análisis de datos*. Edited by S.-V. N. York. Available at: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Haferburg, G. and Kothe, E. (2010) ‘Metallogenomics: Lessons for metalliferous soil remediation’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(4), pp. 1271–1280. doi: 10.1007/s00253-010-2695-z.

Hammer, O., Harper, D. A. . and Ryan, P. D. (2001) ‘PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis’, *Paleontol Electron*, 4(1), p. 9.

Hassanshahian, M. *et al.* (2019) ‘Characterization of heterotrophic iron and sulfur-oxidizing bacteria from acid mine drainage in Sarcheshmeh copper mine Iran’, *Desalination and Water Treatment*, 147(January), pp. 264–272. doi: 10.5004/dwt.2019.23723.

Hinkle, M. E. and Colmer, A. R. (1947) ‘The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report’, *Science*, 106, pp. 253–256.

Hohmann, C. *et al.* (2011) ‘Molecular-level modes of As binding to Fe(III) (oxyhydr)oxides precipitated by the anaerobic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1’, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(17), pp. 4699–4712. doi: 10.1016/j.gca.2011.02.044.

Huang, Y. *et al.* (2021) ‘Bioreduction performances and mechanisms of Cr(VI) by *Sporosarcina saromensis* W5, a novel Cr(VI)-reducing facultative anaerobic bacteria’,

*Journal of Hazardous Materials*, 413, p. 125411. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125411>.

Hugenholtz, P. (2002) 'Exploring prokaryotic diversity in the genomic era', *Genome Biology*, 3(2), pp. 1–8. doi: 10.1186/gb-2002-3-2-reviews0003.

Johnson, D. (2007) 'Physiology and Ecology of Acidophilic Microorganisms', *Physiology and biochemistry of extremophiles*, pp. 257–270. doi: 10.1128/9781555815813.ch20.

Johnson, D. B. *et al.* (2001) 'Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine.', *Environmental microbiology*, 3(10), pp. 630–637. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00234.x.

Johnson, D. B. and Hallberg, K. B. (2007) 'Techniques for detecting and identifying acidophilic mineral-oxidizing microorganisms', *Biomining*, pp. 237–261. doi: 10.1007/978-3-540-34911-2\_12.

Johnson, D. B. and Quatrini, R. (2020) 'Acidophile Microbiology in Space and Time', *Current Issues in Molecular Biology*, 39, pp. 63–76. doi: <https://doi.org/10.21775/cimb.039.063>.

Kameoka, S. *et al.* (2021) 'Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1-V2 and V3-V4 primer sets.', *BMC genomics*, 22(1), p. 527. doi: 10.1186/s12864-021-07746-4.

Kang, C. H. *et al.* (2016) 'Biosequestration of copper by bacteria isolated from an abandoned mine by using microbially induced calcite precipitation', *Journal of General and Applied Microbiology*, 62(4), pp. 206–212. doi: 10.2323/jgam.2016.03.001.

Kim, B. R. *et al.* (2017) 'Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), pp. 2089–2093. doi: 10.4014/jmb.1709.09027.

Kozich, J. J. *et al.* (2013) 'Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing

platform.’, *Applied and environmental microbiology*, 79(17), pp. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.

Kuang, J. L. *et al.* (2013) ‘Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage’, *ISME Journal*, 7(5), pp. 1038–1050. doi: 10.1038/ismej.2012.139.

Kumar, S. *et al.* (2018) ‘MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms’, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Kuyucak, N. (2002) ‘Role of Microorganisms in Mining: Generation of Acid Rock Drainage and its Mitigation and Treatment’, *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 2(3), pp. 179–196. Available at: <https://pdfs.semanticscholar.org/4898/183d93f0516cda37ae1dbea917eb06a7b477.pdf>.

Larsson, A. (2014) ‘AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets’, *Bioinformatics*, 30(22), pp. 3276–3278. doi: 10.1093/bioinformatics/btu531.

Lemos, L. N. *et al.* (2011) ‘Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era’, *Journal of Microbiological Methods*, 86(1), pp. 42–51. doi: 10.1016/j.mimet.2011.03.014.

Li, M. *et al.* (2017) ‘Bacterial Diversity in Linglong Gold Mine, China’, *Geomicrobiology Journal*, 34(3), pp. 267–273. doi: 10.1080/01490451.2016.1186763.

Liang, Z. *et al.* (2019) ‘Microbial community structure and function in acid mine drainage from Mengzi, Yunnan Province’, *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 35(11), pp. 2035–2049. doi: 10.13345/j.cjb.190506.

Lim, J. H., Baek, S. H. and Lee, S. T. (2009) ‘*Ferruginibacter alkalilentus* gen. nov., sp. nov. and *ferruginibacter lapsinanis* sp. nov., novel members of the family “chitinophagaceae” in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), pp. 2394–2399. doi: 10.1099/ijs.0.009480-0.

Liza Trujillo, V. E. (2019) *Análisis metagenómico de las comunidades microbianas de*

*drenajes ácidos de mina e identificación de genes y proteínas de un consorcio de bacterias reductoras de sulfato con potencial biorremediador*. Universidad Nacional de Tumbes.

Low, Y. Y. *et al.* (2020) ‘Genomic data of two *Bacillus* and two *Pseudomonas* strains isolated from the acid mine drainage site at Mamut Copper Mine, Ranau, Malaysia’, *Data in Brief*, 33, p. 106486. doi: 10.1016/j.dib.2020.106486.

Lozupone, C. A. and Knight, R. (2008) ‘Species divergence and the measurement of microbial diversity’, *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), pp. 557–578. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00111.x.

Lukhele, T. (2019) ‘Acid Mine Drainage as Habitats for Distinct Microbiomes: Current Knowledge in the Era of Molecular and Omic Technologies’, *Current Microbiology*, 77(4), pp. 657–674. doi: 10.1007/s00284-019-01771-z.

Lukhele, T. *et al.* (2019) ‘Diversity and functional profile of bacterial communities at Lancaster acid mine drainage dam, South Africa as revealed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing analysis’, *Extremophiles*, 23(6), pp. 719–734. doi: 10.1007/s00792-019-01130-7.

Magurran, A. E. (2004) *Measuring Biological Diversity.pdf*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Science Ltd.

Markosyan, E. . (1972) ‘A new iron-oxidizing bacterium, *Leptospirillum ferrooxidans* gen. Et sp. Nov.’, *Biol. Zh. Arm.*, 25, p. 26.

Mazalan, N. Z. S. *et al.* (2020) ‘Isolation and characterization of an acid and metal tolerant *Enterobacter cloacae* NZS strain from former mining lake in Selangor, Malaysia’, *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s43088-020-00051-1.

McMurdie, P. J. and Holmes, S. (2013) ‘Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data’, *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061217.

Méndez-García, C. *et al.* (2014) ‘Microbial stratification in low pH oxic and suboxic



macroscopic growths along an acid mine drainage’, *The ISME Journal*, 8(6), pp. 1259–1274. doi: 10.1038/ismej.2013.242.

Méndez, C. *et al.* (2015) ‘Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats’, *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2015.00475.

Muneer, B. *et al.* (2016) ‘Isolation, identification and cadmium processing of pseudomonas aeruginosa (EP-Cd1) isolated from soil contaminated with electroplating industrial wastewater’, *Pakistan Journal of Zoology*, 48(5), pp. 1495–1501.

Natarajan, K A (2018) ‘Chapter 13 - Microbial Aspects of Acid Mine Drainage—Mining Environmental Pollution and Control’, in Natarajan, K. A. B. T.-B. of M. (ed.) *Biotechnology of Metals*. Amsterdam: Elsevier, pp. 395–432. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804022-5.00013-X>.

Natarajan, K.A. (2018) ‘Microbiological Aspects of Leaching Microorganisms’, in *Biotechnology of Metals*. Elsevier, pp. 29–47. doi: 10.1016/b978-0-12-804022-5.00003-7.

Nazir, R. *et al.* (2019) *Exploring bacterial diversity: From cell to sequence*, *Freshwater Microbiology: Perspectives of Bacterial Dynamics in Lake Ecosystems*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-817495-1.00007-4.

Norlund, K. L. I., Baron, C. and Warren, L. A. (2010) ‘Jarosite formation by an AMD sulphide-oxidizing environmental enrichment: Implications for biomarkers on Mars’, *Chemical Geology*, 275(3), pp. 235–242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2010.05.014>.

OEFA (2012) *Reporte público del informe N°759-2012-OEFA/DS*.

OEFA (2019) *Informe n° 00278-2019-OEFA/DEAM-STEAC*. Lima-Perú. Available at: [https://repositorio.oefa.gob.pe/bitstream/handle/20.500.12788/171/INFORME N 00278-2019-OEFA-DEAM-STEAC\\_3.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.oefa.gob.pe/bitstream/handle/20.500.12788/171/INFORME%20N%2000278-2019-OEFA-DEAM-STEAC_3.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

Pairazamán-quiros, O. D. *et al.* (2019) ‘Extreme resistance to copper by a microbial consortium formed from *Sulfobacillus* spp., and *Acidithiobacillus ferrooxidans*’, *Revista*

*de Investigación Científica REBIOL*, (February), p. 13.

Panyushkina, A. E. *et al.* (2018) 'Physiological and morphological characteristics of acidophilic bacteria *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus thiooxidans*, members of a Chemolithotrophic microbial consortium', *Microbiology (Russian Federation)*, 87(3), pp. 326–338. doi: 10.1134/S0026261718030086.

Park, H. B. *et al.* (2012) 'Spirobacillenes A and B, Unusual Spiro-cyclopentenones from *Lysinibacillus fusiformis* KMC003', *Organic Letters*, 14(19), pp. 5002–5005. doi: 10.1021/ol302115z.

Podlesnaya, G. V. *et al.* (2020) 'Diversity of nitrifying bacteria in microbial communities from water and epilithic biofilms of the Lake Baikal littoral zone', *Limnology and Freshwater Biology*, (4), pp. 1008–1010. doi: 10.31951/2658-3518-2020-a-4-1008.

Putri, A. N., Ratnaningsih, R. and Rinanti, A. (2021) 'Acid mine drainage removal by mixed bacteria culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brevibacterium* sp.', *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1098(5), p. 052072. doi: 10.1088/1757-899x/1098/5/052072.

Qiu, R. *et al.* (2009) 'Sulfate reduction and copper precipitation by a *Citrobacter* sp. isolated from a mining area', *Journal of Hazardous Materials*, 164(2), pp. 1310–1315. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.039>.

Quast, C. *et al.* (2013) 'The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools', *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. 590–596. doi: 10.1093/nar/gks1219.

Quatrini, R. and Johnson, D. B. (2018) 'Microbiomes in extremely acidic environments: functionalities and interactions that allow survival and growth of prokaryotes at low pH', *Current Opinion in Microbiology*, 43, pp. 139–147. doi: 10.1016/j.mib.2018.01.011.

Quatrini, R. and Johnson, D. B. (2019) '*Acidithiobacillus ferrooxidans*', *Trends in Microbiology*, 27(3), pp. 282–283. doi: 10.1016/j.tim.2018.11.009.

Ramírez, N., Serrano, J. A. and Sandoval, H. (2006) 'Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México', *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*,

37(3), pp. 56–71.

Rawlings, D. E. (2002) ‘Heavy metal mining using microbes’, *Annual Review of Microbiology*, pp. 65–91. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.161052.

Rogers, T. O. and Wilson, H. A. (1966) ‘pH as a Selecting Mechanism of the Microbial Flora in Wastewater-Polluted Acid Mine Drainage’, *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 38(6), pp. 990–995. Available at: <http://www.jstor.org/stable/25035574>.

Rothschild, L. J. and Mancinelli, R. L. (2001) ‘Life in extreme environments’, *Nature*, 409(FEBRUARY), pp. 1092–1101. doi: 10.1038/npg.els.0000391.

De Sá, P. H. C. G. *et al.* (2018) ‘Next-generation sequencing and data analysis: Strategies, tools, pipelines and protocols’, *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*, 1, pp. 191–207. doi: 10.1016/B978-0-12-804659-3.00011-7.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) ‘The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.’, *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Salvador, V. M. and Gonzalez, J. E. (2017) ‘Acidophiles: Diversity and Mechanisms of adaptación to acidic enviroments’, in Stan-Lotter, H. and Fendrihan, S. (eds) *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*. 2nd edn, pp. 227–251. doi: 10.1007/978-3-319-48327-6.

Salwan, R. and Sharma, V. (2019) *Physiological and Biotechnological Aspects od Extremophiles*, Elsevier.

Sambrook, J. and Russel, D, W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Third, Cold Spring Harboc Laboratory Press. Third.

Sánchez-Andrea, I. *et al.* (2011) ‘Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content.’, *Applied and environmental microbiology*, 77(17), pp. 6085–6093. doi: 10.1128/AEM.00654-11.

Sand, W. *et al.* (1992) ‘Evaluation of Leptospirillum ferrooxidans for leaching’, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), pp. 85–92.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1997) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 74(12), pp. 59S-76S. doi: 10.1097/00006250-199004001-00013.
- Schloss, P. D. (2021) 'Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters', *mSphere*, 6(4), pp. e00191-21. doi: 10.1128/mSphere.00191-21.
- Serrana, J. M. and Watanabe, K. (2022) 'Sediment-associated microbial community profiling: sample pre-processing through sequential membrane filtration for 16S rRNA amplicon sequencing', *BMC Microbiology*, 22(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12866-022-02441-0.
- Skousen, J. *et al.* (1998) 'Handbook of technologies for avoidance and remediation of acid mine drainage', *National Mine Land Reclamation Center, Morgantown*, pp. 1–140. Available at: <https://www.osmre.gov/resources/library/ghm/hbtechavoid.pdf>.
- Skousen, J. *et al.* (2017) 'Review of Passive Systems for Acid Mine Drainage Treatment', *Mine Water and the Environment*, 36(1), pp. 133–153. doi: 10.1007/s10230-016-0417-1.
- Skousen, J. G., Ziemkiewicz, P. F. and McDonald, L. M. (2019) 'Acid mine drainage formation, control and treatment: Approaches and strategies', *The Extractive Industries and Society*, 6(1), pp. 241–249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exis.2018.09.008>.
- Solomon, S. *et al.* (2016) 'High-quality metagenomic DNA from marine sediment samples for genomic studies through a preprocessing approach', *3 Biotech*, 6(2), pp. 1–5. doi: 10.1007/s13205-016-0482-y.
- Srivastava, N. *et al.* (2019) 'Analyzing Functional Microbial Diversity: An Overview of Techniques. An Overview of Techniques.', in *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Elsevier Inc., pp. 79–102. doi: 10.1016/B978-0-12-814849-5.00006-X.
- Teng, W. *et al.* (2017) 'Microbial diversity and community assembly across environmental gradients in acid mine drainage', *Minerals*, 7(6). doi: 10.3390/min7060106.
- Tyson, G. W. *et al.* (2004) 'Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment', *Nature*, 428(6978), pp. 37–43. doi:

10.1038/nature02340.

Tzvetkova, T., Selenska-Pobell, S. and Groudeva, V. (2002) 'Recovery and characterization of leptospirillum ferrooxidans/leptospirillum ferriphilum and acidithiobacillus ferrooxidans natural isolates from uranium mining waste piles', *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 16(1), pp. 111–117. doi: 10.1080/13102818.2002.10819164.

USEPA (1995) 'QA/QC Guidance for Sampling and Analysis of Sediments, Water, and Tissues for Dredged Material Evaluations', p. 131.

USEPA (2004) 'Method 9045D: Soil and Waste pH, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods', (November), p. 55. Available at: <http://eprints.uanl.mx/5481/1/1020149995.PDF>.

Valdés, J. *et al.* (2008) 'Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: From genome sequence to industrial applications', *BMC Genomics*, 9, pp. 1–24. doi: 10.1186/1471-2164-9-597.

Valdez-Nuñez, L. F. *et al.* (2022) 'Microbial Communities in Peruvian Acid Mine Drainages: Low-Abundance Sulfate-Reducing Bacteria With High Metabolic Activity', *Geomicrobiology Journal*, 39(10), pp. 867–883. doi: 10.1080/01490451.2022.2087808.

Vitorino, L. C. and Bessa, L. A. (2018) 'Microbial diversity: The gap between the estimated and the known', *Diversity*, 10(2). doi: 10.3390/D10020046.

Waikagul, J. and Thaenkham, U. (2014) 'Methods of Molecular Study', *Approaches to Research on the Systematics of Fish-Borne Trematodes*, pp. 77–90. doi: 10.1016/b978-0-12-407720-1.00006-6.

Wakao, N. *et al.* (1991) 'Morphological, Physiological, and chemotaxonomical characteristics of iron-and sulfur-oxidizing bacteria isolated from acid mine drainage waters', *Journal of General and Applied Microbiology*, 37(1), pp. 35–48. doi: 10.2323/jgam.37.35.

Ward, N. L. *et al.* (2009) 'Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils', *Applied and Environmental*

*Microbiology*, 75(7), pp. 2046–2056. doi: 10.1128/AEM.02294-08.

Xiaoqi, L. *et al.* (2017) ‘Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination’, *Environmental Pollution*, 231, pp. 908–917. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>.

Xie, Y. *et al.* (2018) ‘Mineralogical characteristics of sediments and heavy metal mobilization along a river watershed affected by acid mine drainage’, *PLoS ONE*, 13(1), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0190010.

Yan, J. *et al.* (2018) ‘Carbon metabolism and sulfate respiration by a non-conventional *Citrobacter freundii* strain SR10 with potential application in removal of metals and metalloids’, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 133, pp. 238–246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.05.010>.

Yates, J. R. and Holmes, D. S. (1987) ‘Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*’, *Journal of Bacteriology*, 169(5), pp. 1861–1870. doi: 10.1128/jb.169.5.1861-1870.1987.

Zeng, L. *et al.* (2008) ‘An effective method of DNA extraction for bioleaching bacteria from acid mine drainage’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), pp. 881–888. doi: 10.1007/s00253-008-1491-5.

Zhang, H.-B. *et al.* (2007) ‘Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium.’, *Microbial ecology*, 54(4), pp. 705–712. doi: 10.1007/s00248-007-9229-y.

Zondo, N., Maphutha, T. and Kondiah, K. (2012) ‘A culture-dependent investigation of heavy-metal resistant bacteria in acidic mine drainage with the potential for bioremediation.’, in *WISA Biennial Conference 2012*.

## **APÉNDICES**

### Apéndice 1. Enriquecimiento de las muestras de sedimento

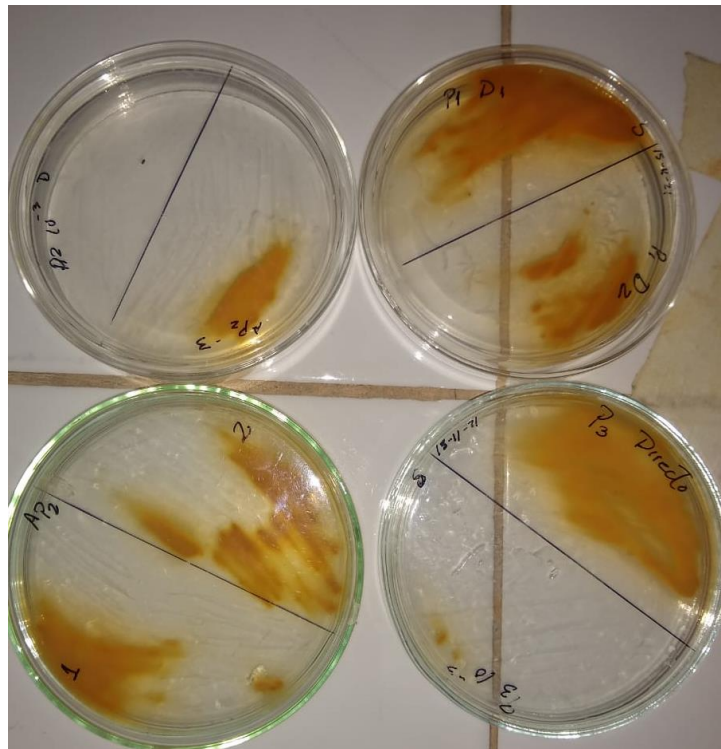


### Apéndice 2. Enriquecimiento de las muestras de agua





**Apéndice 3.** Crecimiento de bacterias oxidante de hierro en medio sólido 9K-Fe.



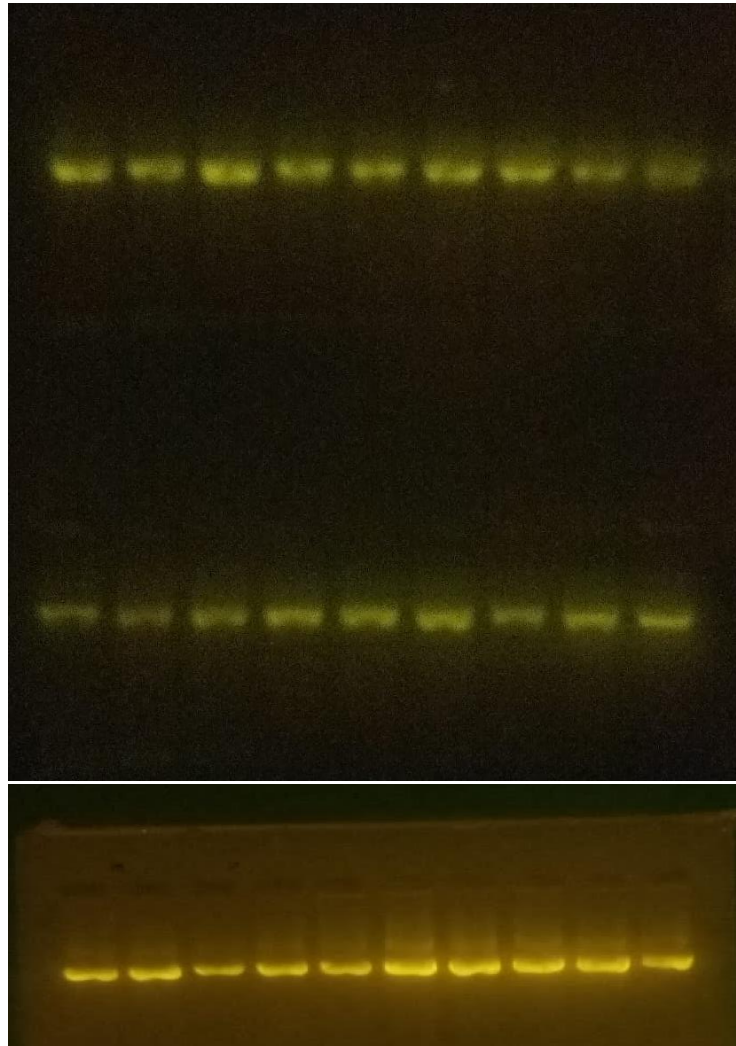
**Apéndice 4.** Medición del pH del agua



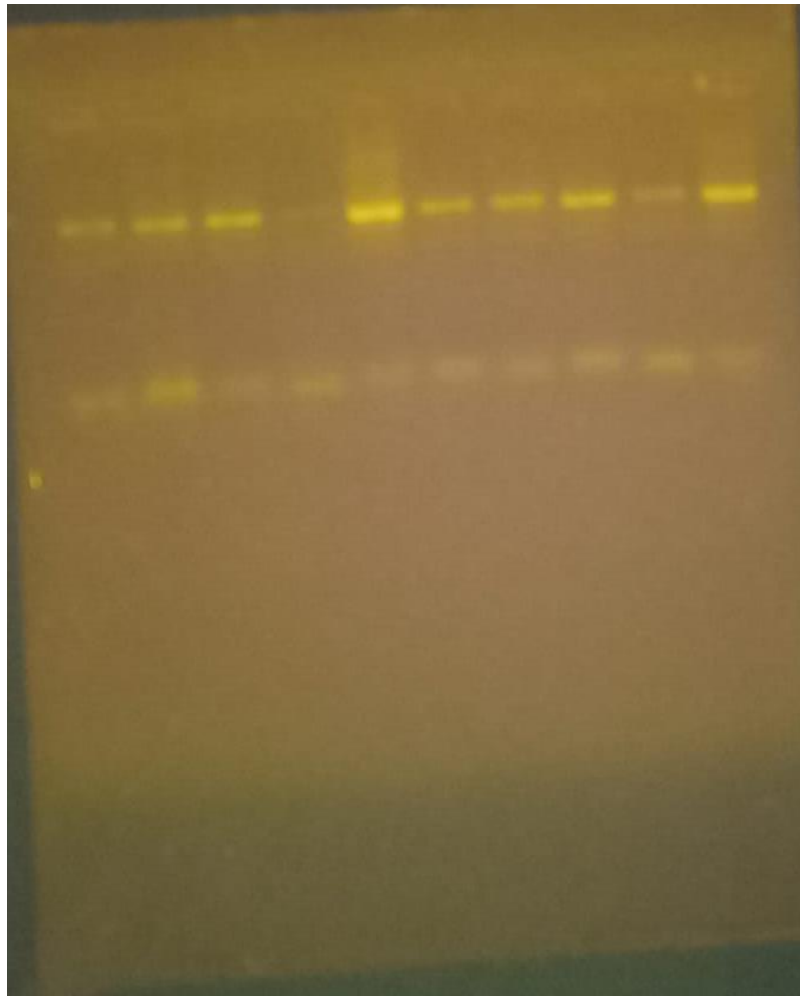
**Apéndice 5. Muestreo de los sedimentos en el drenaje ácido de la mina**



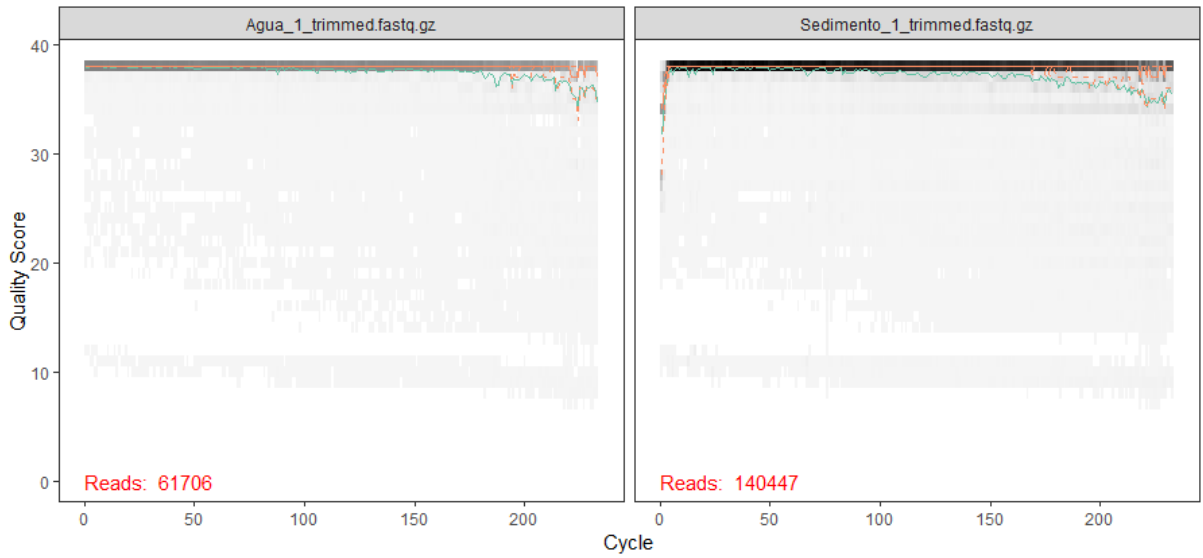
**Apéndice 6.** Amplificación de las secuencias del gen 16S ARNr a partir del ADN de bacterias aisladas



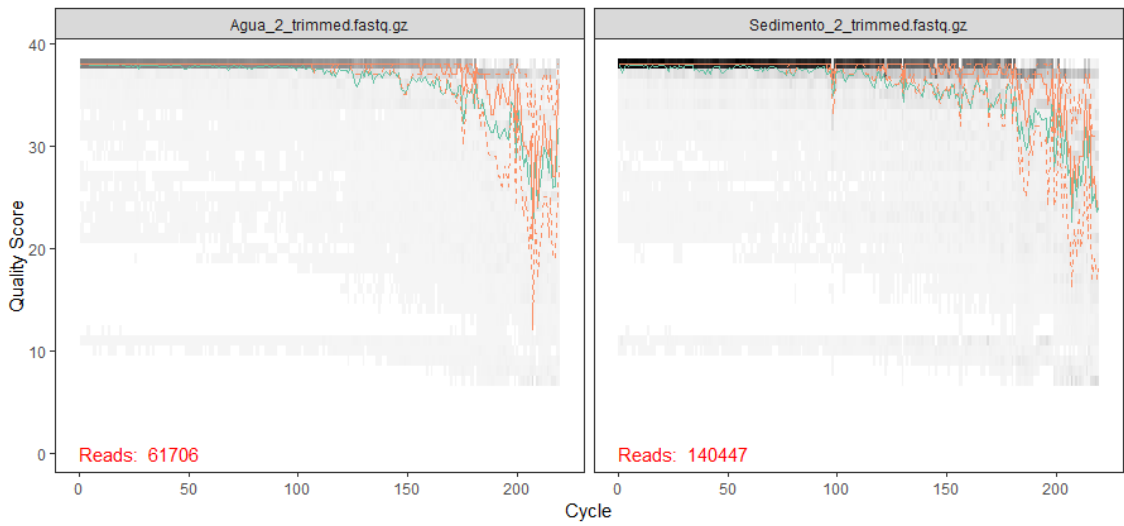
**Apéndice 7.** Amplificación del gen 16S ARNr a partir de ADN total.



**Apéndice 8.** Calidad de los reads forward de ambas muestras obtenidos luego de la filtración



**Apéndice 9.** Calidad de los reads reverse de ambas muestras obtenidos luego de la filtración



## Apéndice 10. ASVs obtenido luego del procesamiento de datos de Amplicon 16S ARNr

	Kingdom	Phylum	Class	Order	Family	Genus
ASV_1	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Citrobacter
ASV_2	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	NA
ASV_3	Bacteria	Proteobacteri	Alphaproteobacter	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas
ASV_4	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	Citrobacter
ASV_5	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Enterobacterales	Enterobacteriaceae	NA
ASV_6	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter
ASV_7	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
ASV_8	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Burkholderiales	Gallionellaceae	Gallionella
ASV_9	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Ferruginibacter
ASV_10	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	NA
ASV_11	Bacteria	Patescibacter	Parcubacteria	NA	NA	NA
ASV_12	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	LD-RB-34	NA
ASV_13	Bacteria	Patescibacter	Parcubacteria	Candidatus Nomura	NA	NA
ASV_14	Bacteria	Proteobacteri	Alphaproteobacter	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Paracoccus
ASV_15	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia
ASV_16	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	SJA-28	NA	NA
ASV_17	Bacteria	Bacteroidota	Ignavibacteria	Ignavibacteriales	SR-FBR-L83	NA
ASV_18	Bacteria	Proteobacteri	Alphaproteobacter	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Mesorhizobium
ASV_19	Bacteria	Proteobacteri	Alphaproteobacter	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	Methylocystis
ASV_20	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Enterobacterales	Alteromonadaceae	Rheinheimera
ASV_21	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Burkholderiales	Comamonadaceae	NA
ASV_22	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Sporichthyaceae	Candidatus Planktophila
ASV_23	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	Sediminibacterium
ASV_24	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Burkholderiales	Comamonadaceae	Pelomonas
ASV_25	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
ASV_26	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
ASV_27	Bacteria	Proteobacteri	Gammaproteobact	Xanthomonadales	Rhodanobacteraceae	Rhodanobacter

ASV_616	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Ferrovaceae	Ferrovum
ASV_617	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Sideroxydans
ASV_618	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA	NA	NA
ASV_619	Bacteria	Myxococcota	Myxococcia	Myxococcales	NA	NA
ASV_620	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Gallionellaceae	Gallionella
ASV_621	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Alicyclobacillales	Alicyclobacillaceae	Acidibacillus
ASV_622	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Thermomonas
ASV_623	Bacteria	Planctomycetota	Planctomycetes	Gemmatales	Gemmataceae	Gemmata
ASV_624	Bacteria	Acidobacteriota	Acidobacteriae	Acidobacteriales	NA	NA
ASV_625	Bacteria	Patescibacteria	Parcubacteria	Candidatus Kaiserbacter	NA	NA
ASV_626	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Alloprevotella
ASV_627	Bacteria	Planctomycetota	Planctomycetes	NA	NA	NA
ASV_628	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Cytophagales	Microscillaceae	Hassallia
ASV_629	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
ASV_630	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	NA	NA	NA
ASV_631	Bacteria	Patescibacteria	Parcubacteria	NA	NA	NA
ASV_632	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Unknown Family	Acidibacter
ASV_633	Bacteria	Nitrospirota	Leptospirillia	Leptospirillales	Leptospirillaceae	Leptospirillum
ASV_634	Bacteria	Chloroflexi	NA	NA	NA	NA
ASV_635	Bacteria	Patescibacteria	Parcubacteria	NA	NA	NA
ASV_636	Bacteria	Actinobacteriota	Actinobacteria	Propionibacteriales	Nocardioideaceae	Nocardioides
ASV_637	Bacteria	Actinobacteriota	Thermoleophilia	Gaiellales	NA	NA
ASV_638	Bacteria	Cyanobacteria	Cyanobacteriia	Cyanobacteriales	Nostocaceae	Scytonema UTEX 2349
ASV_639	Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	NA	NA	NA
ASV_640	Bacteria	Gemmatimonadota	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	NA
ASV_641	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	NA	NA	NA
ASV_642	Bacteria	Bacteroidota	Bacteroidia	Sphingobacteriales	NA	NA

## Apéndice 11. Pipeline del análisis bioinformático para datos de metabarcoding

