

ECOLOGÍA MICROBIANA DE MINAS DE COBRE DE SEIS DIFERENTES REGIONES GEOGRÁFICAS

Microbial ecology in copper mines from six different geographical regions

Guadalupe ORTÍZ-LÓPEZ^{1*} y Luz BRETÓN-DEVAL^{2*}

¹ Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

² Cátedras-Conacyt, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.

*Autora para correspondencia: bretondeval@gmail.com

(Recibido: febrero 2021; aceptado: agosto 2021)

Palabras clave: bioinformática, amplicones, biorremediación, comunidades microbianas, minas

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue comparar la estructura de las comunidades microbianas de minas de cobre de diferentes regiones geográficas con la finalidad de encontrar patrones en la composición de las comunidades y dilucidar su potencial metabólico. Los amplicones de las minas localizadas en Brasil, Canadá, China, Portugal, Reino Unido y Bulgaria se obtuvieron del Sequence Read Archive (SRA) del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). El estudio bioinformático para la repartición taxonómica se realizó con la plataforma Qiime2. Se determinaron la abundancia relativa, la diversidad y su correlación con parámetros físicos y químicos usando R Studio. Posteriormente, se realizó la predicción funcional con PICRUST2. Los resultados muestran que la mina de Reino Unido es donde se presenta el mayor número de clases y la mina de Bulgaria es la menos diversa. Gammaproteobacteria, Actinobacteria y Alphaproteobacteria son las clases más abundantes en todas las minas y cuentan con géneros que poseen características metabólicas relacionadas con la oxidación o reducción de metales. Las predicciones funcionales sugieren la presencia de genes relacionados con la reducción de metales pesados como cobre y mercurio. Las minas de cobre de diferentes regiones presentan un patrón similar de clases encontradas a pesar de que existen diferencias puntuales de clases bacterianas que atribuimos a la presión de las condiciones físicas y químicas.

Key words: bioinformatics, metagenomes, bioremediation, microbial communities, mines

ABSTRACT

The main intention of this work was to compare the structure of the microbial communities in copper mines from different geographical regions to find patterns in their composition and generate new knowledge from pre-existing data. The 16S amplicons from the six copper mines were obtained from the Sequence Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website. The taxonomic assignment of the 16S amplicons was carried out through bioinformatic processing with Qiime2 and relative abundance, diversity and multivariate statistical analyses were performed using R software. Finally, PICRUSt2 was used to predict metabolic functions. The results indicate that the UK mine presents the largest number of classes. Gammaproteobacteria, Actinobacteria, and Alphaproteobacteria are the most abundant classes in all mines. All have genera that possess metabolic characteristics related to the oxidation or reduction of metals. Functional predictions suggest the presence of genes related to the reduction of heavy metals such as copper and mercury. The results obtained can enhance the understanding of the composition and functions of the bacterial communities in copper mines, allowing the future use of some metabolic characteristics of these communities.

INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento químico metálico, de color rojo pardo y brillante. Se explota para su uso en múltiples industrias debido a su alta conductividad eléctrica, gran resistencia a la corrosión, estabilidad química, plasticidad, propiedades bactericidas y capacidad para formar aleaciones con gran cantidad de metales (Vassallo 2008, Jiang et al. 2021). En 2018, la industria minera produjo alrededor de 21 millones de toneladas métricas de cobre en todo el mundo, producidas principalmente por Australia, EUA., China, Perú y Chile (Sevilla 2019). La industria minera es una de las más contaminantes del ambiente; genera el desplazamiento de miles de toneladas de suelo, provoca la sedimentación y la disminución de caudal en los ríos, así como la liberación y migración de metales pesados al ecosistema (Quiñones 2017, Murakami et al. 2020). Los residuos del proceso de extracción que se acumulan en la intemperie generan aguas ácidas de drenaje como consecuencia del contacto de estos residuos con el agua y el oxígeno atmosférico (Aduvire 2006). Las aguas ácidas de drenaje se caracterizan por tener valores de pH muy bajos, un elevado contenido de metales pesados y otros elementos tóxicos disueltos como plomo, zinc, cobalto y hierro (Akcil y Koldas 2006, Henne et al. 2020). A pesar de que éste es un proceso que ocurre de forma natural, la actividad minera promueve la presencia de minerales expuestos que quedan a disposición de las bacterias de distribución natural que aceleran estos procesos oxidativos (Akcil y Koldas 2006). Las comunidades microbianas de las zonas mineras presentan una composición, diversidad

y dinámica muy particulares, que varían dependiendo de las características físicas y químicas del ambiente en el que se encuentran y de la capacidad de los diferentes organismos para acumular, neutralizar u oxidorreducir los metales pesados presentes en el ambiente (Rodrigues et al. 2014, Palanivel et al. 2020, Yuan et al. 2021). La presencia de altas concentraciones de metales inhibe el crecimiento de la mayoría de los géneros bacterianos y disminuye la concentración de proteínas en sus células (Hussein y Joo 2013).

El cobre en altas concentraciones resulta tóxico para los microorganismos, por lo que algunas especies como *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans* han generado sistemas de resistencia ante la presencia de este metal (Vullo 2003). Uno de estos sistemas es transmitido por plásmidos que codifican para PcoA, una proteína multicobre oxidasa responsable de la oxidación de Cu(I) en el espacio periplasmático. El segundo sistema es la bomba de flujo ATPasa CopA, la cual arroja los iones de cobre al exterior. El último de los sistemas más común es el Cus (sistema de flujo de cobre con detección de cobre) perteneciente a la familia de división celular de nodulación de resistencia (RND) responsable de la exportación de metales pesados (HME-RND) que codifica especialmente para la proteína CusA (Rehan y Alsohim, 2019). Otros microorganismos que tienen la capacidad de vivir exitosamente en medios ricos en metales y tienen las estrategias metabólicas para emplearlos, excretarlos o neutralizarlos son los géneros *Thauera*, *Klebsiella*, *Acidimicrobiia*, *Leptospirillum*, *Acidithrix*, *Acidithiobacillus* y *Sulfobacillus* (Vullo 2003, Narayanan et al. 2020). La actividad microbiana en el suelo juega un papel importante en

los ciclos biogeoquímicos. Dependiendo del metal un microorganismo puede realizar dos posibles transformaciones: 1) lixiviación microbiana, la cual permite la movilización de un metal de su fase sólida inicial a una fase acuosa, 2) inmovilización del metal, es decir el paso de la fase acuosa inicial a una sólida (Vullo 2003). En el caso del cobre, su ciclo consiste en una serie de reacciones químicas (Redox) que le permiten integrarse al suelo por medio de la mineralización y desmineralización (Smith et al. 2007).

El estudio de las comunidades microbianas de los sitios mineros de cobre nos permitirá conocer si existe una constante en los géneros encontrados y la influencia de los factores físicos y químicos en las distintas regiones donde están situadas las minas. Este análisis se hará empleando amplicones de la región ribosomal 16S, la cual es una herramienta eficaz para dilucidar la taxonomía de cada una de las minas (Valenzuela-González et al. 2015). Adicionalmente analizaremos la predicción de las funciones metabólicas, para conocer el estado del sistema y su potencial metabólico (Zamora et al. 2012). Por lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo comparar la estructura de las comunidades microbianas de minas de cobre de diferentes regiones geográficas con la finalidad de encontrar patrones en la composición

de las comunidades microbianas y dilucidar su potencial metabólico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

Para realizar el trabajo se seleccionaron los amplicones 16S de seis minas de cobre localizadas en Brasil (-6.410380, -50.051937), Canadá (48.591154, -81.605020), China (30.900278, 117.830556), Portugal (37.668889, -7.493889), Reino Unido (53.386940, -4.344440) y Bulgaria (43.390861, 22.895472) (**Fig. 1**). Esta información se obtuvo del Sequence Read Archive (SRA) del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) dentro del apartado BioProjects, donde las consultas son públicas y cuentan con los siguientes claves: PRJNA354598, PRJEB33459, PRJEB27237, PRJNA483071, PRJNA472343 y PRJEB23187 para Brasil, Canadá, Bulgaria, China, Portugal y Reino Unido, respectivamente. El método para seleccionar las muestras que participaron en este estudio se basó en la metodología PRISMA (Sarkis-Onofre et al. 2021) empleando las siguientes palabras clave en el NCBI: copper mine, mine tailings, metagenome



Fig. 1. Mapa de las minas de cobre a las cuales pertenecen los metagenomas utilizados para el estudio.

and copper mine amplicon. El criterio de inclusión fue que: 1) el metal preponderante fuera cobre, 2) el estudio contara con amplicones. El criterio de exclusión estuvo basado en la calidad y profundidad de las muestras.

Se encontraron 10 bioproyectos relacionados con minas de cobre, pero al final nos quedamos con los seis declarados por la calidad que presentaban (**Cuadro I**).

Procesamiento bioinformático

Se verificó la calidad de los amplicones 16S seleccionados con FASTQC y posteriormente se realizó el procesamiento bioinformático de los mismos empleando el programa Qiime2 Core 2019.10 (Bolyen et al. 2019). Con este paquete de análisis de microbiomas se detectó qué código de barras pertenece a qué secuencia de 16S para ordenarlas y filtrarlas. Posteriormente se identificaron las variantes de secuencia de amplicón (ASVs) con el complemento DADA2 y se llevó a cabo la asignación taxonómica en BLAST.

Procesamiento estadístico

Con la información obtenida del procesamiento bioinformático y haciendo uso del software R-3.6.3 (R Core Team 2020) y su librería Phyloseq (McMurdie y Holmes 2013) se determinó la abundancia relativa y la diversidad alfa de las muestras con sus respectivos gráficos. Además, se realizaron análisis estadísticos multivariados como el análisis de componentes principales (ACP), haciendo uso de la librería FactoMineR (Lê et al. 2008) y el análisis de correspondencia canónica (ACC) utilizando la librería Vegan (Oksanen et al. 2019). Los datos físicos y químicos de las minas fueron recolectados de los estudios individuales de cada mina y recomendamos revisarlos a profundidad para conocer sus detalles metodológicos (Aguinaga et al. 2018, Dimitrova et al. 2016, Pakostova et al. 2020, Ettamimi et al. 2019, Rodrigues et al. 2014, Li et al. 2019).

Se estimó el índice de diversidad Shannon-Wiener, el cual incorpora en un sólo valor la riqueza específica y la equitabilidad. Es un índice basado en la

CUADRO I. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOPROYECTOS SELECCIONADOS.

Lugar	Nombre de la mina	Bioproyecto	Origen de la muestra
China	Jinsha River	PRJNA544886	
Brasil	Sossego	PRJNA354598	Drenaje de la mina
Brasil	Salobo	PRJNA354598	
		PRJNA312132	
China	Mina de cobre Dexin		
Canadá	Kam kotia	PRJEB33459	Relaves mineros
		PRJNA483071	
China	Mina Yangshanchong		Relaves mineros
	Chiprovska Ogosta		
Bulgaria	Cuenca del río	PRJEB27237	Relaves mineros
		PRJNA544886	
China	Jinsha River		
		PRJNA472343	
Portugal	São Domingos		Drenaje de la mina
Reino Unido	Anglesey	PRJEB23187	Drenaje de la mina

teoría de la información que en un contexto ecológico mide qué especie pertenecerá a un individuo elegido al azar de una muestra de S especies y N individuos. Su valor va de 0.5 a 5, normalmente, donde valores inferiores a 2 representan bajas diversidades y superiores a 3 son valores altos en diversidad de especies. Para cuantificar el componente de equitabilidad de la diversidad se usó el índice de Pielou, cuyo valor va de 0 a 1, donde 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes. Adicionalmente se determinó el índice de Chao1, el cual no asume un tipo particular de distribución.

Procesamiento bioinformático del potencial funcional

El software PICRUST2 v2.3.0-b (Douglas 2020) se empleó para realizar predicciones de las funciones metabólicas con base en los marcadores filogenéticos, con la finalidad de detectar aquellas funciones de mayor relevancia en el procesamiento de contaminantes en el suelo de mina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diversidad de las muestras se estimó utilizando el índice de Shannon-Weaver ($H'e$), el cual mostró una diversidad significativa en las seis minas, siendo la mina de Reino Unido la que mayor diversidad presentó con un valor de 5.4 (Fig. 2). La comunidad

con menor diversidad fue la mina de Bulgaria con 2.2. Según Magurran (1988) la mayoría de los estudios ecológicos presentan valores del índice de Shannon-Weaver ($H'e$) de 1.5 a 3.5 y raramente pasan de 4.5 en presencia de diversidades muy altas. También se calculó el índice de Chao1, que estima la cantidad de especies esperadas en relación con el número de especies únicas en la comunidad (Kim et al. 2017), haciendo evidente la diferencia de diversidad entre minas. Los resultados son congruentes con lo encontrado empleando el índice Shannon-Weaver. Las minas de Portugal y Reino Unido poseen una mayor diversidad con valores de 432 y 849, respectivamente (Fig. 2). Las minas de Brasil y Canadá presentaron una diversidad similar con valores de 61 y 65, respectivamente, mientras que la mina de Bulgaria presentó una menor diversidad con un valor de 12.

El comportamiento de los dos índices en las muestras fue similar. En ambos casos la mina de Reino Unido fue la más diversa y la de Bulgaria la menos diversa. Sin embargo, al comparar el índice de Shannon con el de Chao se pudo observar la diferencia de diversidad entre las distintas muestras, especialmente al comparar las minas de Portugal y Reino Unido con la de Bulgaria y China cuyas diversidades fueron significativamente menores (Fig. 2).

El índice de Pielou indicó, en general, una alta equidad de distribución de microorganismos en las muestras. Los valores más altos fueron para las minas

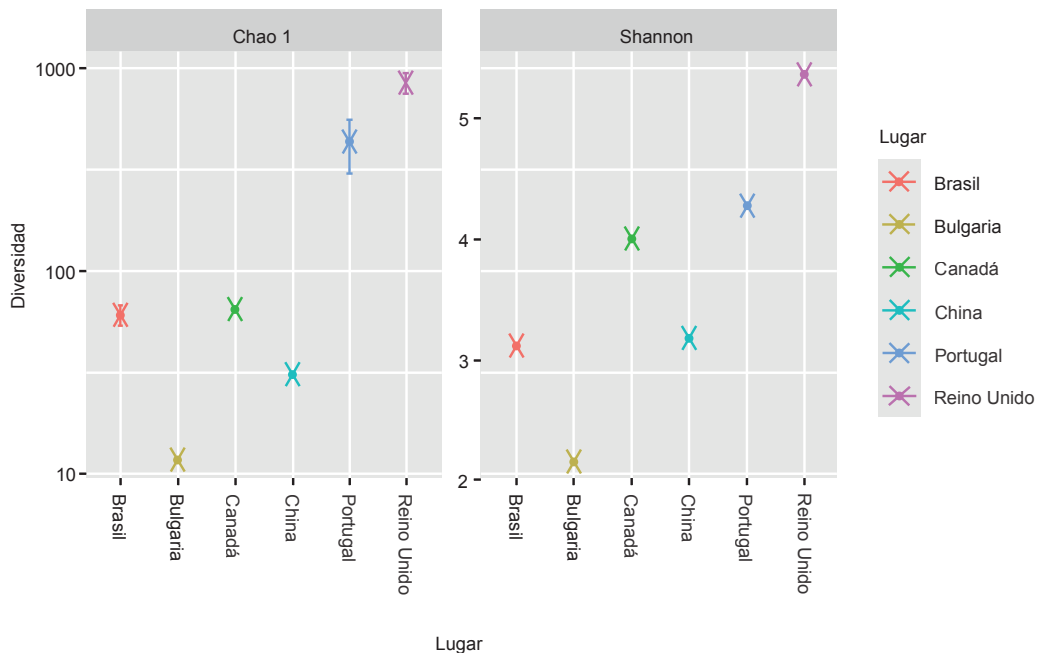


Fig. 2. Comparación entre el índice de diversidad de Shannon y el de Chao 1 en las seis minas de cobre.

de Canadá y China con 0.93 y 0.96, respectivamente, seguidos por las minas de Portugal y Reino Unido con un valor de 0.92 en ambas. Las comunidades que presentaron una menor equidad en la abundancia de clases fueron las correspondientes a las minas de Brasil y Bulgaria con valores de 0.79 y 0.87, respectivamente. Estos valores indican la presencia de algunas clases predominantes en las muestras, como Nitrososphaeria, Gemmatimonadetes y Gammaproteobacteria en Brasil y Alphaproteobacteria y Gammaproteobacteria en la mina de Bulgaria.

En las seis minas se calculó la abundancia relativa al nivel de clases bacterianas y se observó que en casi todas las muestras la clase Gammaproteobacteria se encontró presente con abundancias por encima del 19 %. Sólo la muestra de Brasil presentó una abundancia del 6.1 % (Fig. 3). La abundancia de esta clase es común en minas y su presencia se relaciona

con la oxidación de amoníaco a nitritos y de nitritos a nitratos (Mori et al. 2019).

Según la abundancia relativa por clases bacterianas, en la muestra de Brasil las clases más abundantes fueron Nitrososphaeria con una abundancia del 23 %, seguida por Gemmatimonadetes con el 10 % y Deltaproteobacteria con 5 %. En la mina de Bulgaria hay una abundancia del 9 % en la clase AD3 y del 7 % en Alphaproteobacteria. En la mina de Reino Unido la clase Alphaproteobacteria obtuvo una abundancia del 9 % para Acidimicrobiia y del 6 % para Bacteroidia y Clostridia. Las clases más abundantes en la mina de China fueron Actinobacteria con una abundancia del 37 %, Bacteroidia con 18 % y Acidimicrobiia con 9 %. En el caso de Portugal las clases más abundantes fueron Bacteroidia con 28 %, Alphaproteobacteria con 16 %, Actinobacteria con 5 % y Deltaproteobacteria con 6 %. Por último, la mina de Canadá tuvo una

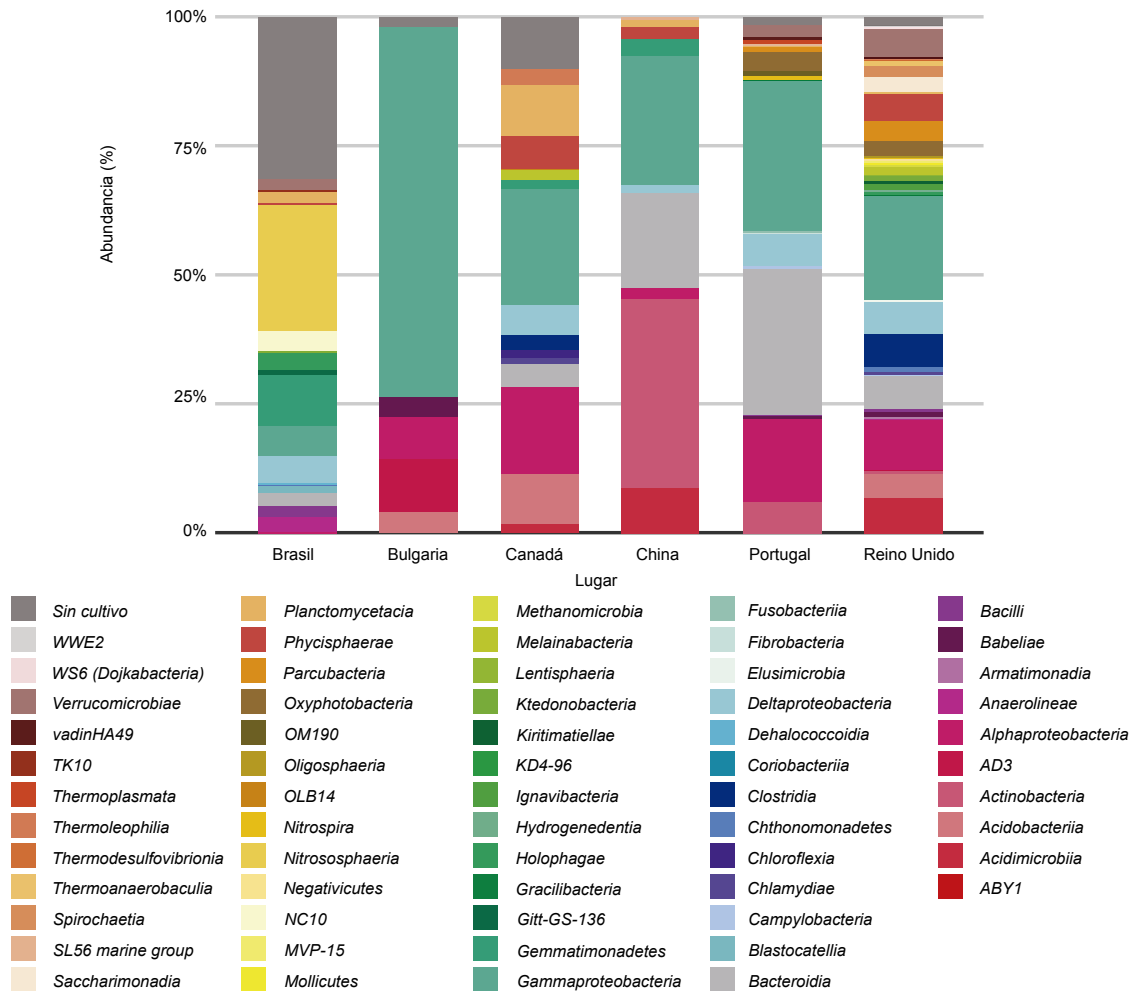


Fig. 3. Abundancia relativa de las clases bacterianas presentes en cada mina de cobre.

abundancia del 17 % en la clase Alphaproteobacteria y las clases Planctomycetes y Acidobacteriia tuvieron una abundancia de 10 % cada una (Fig. 3).

Bacteroidia suele ser una clase abundante en minas y otros ambientes, aunque hay poca información sobre su papel y resistencia en ambientes oxidados (Mesa et al. 2017). La clase Alphaproteobacteria participa en el ciclo del nitrógeno y su presencia en suelos contaminados por metales pesados suele ser mayor (Sandaa et al. 2001). La presencia de la clase Actinobacteria puede deberse a la alta disponibilidad de nutrientes. Dentro de esta clase se encuentra un grupo de bacterias oxidante de hierro como *Ferrimicrobium acidiphilum* y *Acidimicrobium ferrooxidans*, que son capaces de oxidar el ion ferroso (Fe²⁺) (Rodrigues et al. 2014).

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

Durante la identificación taxonómica se detectaron tres clases pertenecientes al reino Archaea, con

estos datos y con la abundancia relativa de cada clase se generó un árbol filogenético (Fig. 4). El gráfico muestra que la clase Methanomicrobia fue encontrada en la mina de Reino Unido con una baja abundancia; mientras que la clase Thermoplasmata se encontró en la mina de Portugal; y Nitrososphaeria, que se encontró en la mina de Brasil, presentó la mayor abundancia entre las tres clases.

De acuerdo con Kim et al. (2017), la presencia de cobre puede inhibir a las arqueas metanogénicas, por lo que su presencia muestra un proceso de resistencia a la toxicidad del cobre. Por otro lado, la clase Thermoplasmata suele estar presente en suelos contaminados por metales, jugando un papel clave en la supervivencia de otras formas de vida en sistemas contaminados por metales pesados (Li et al. 2017).

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

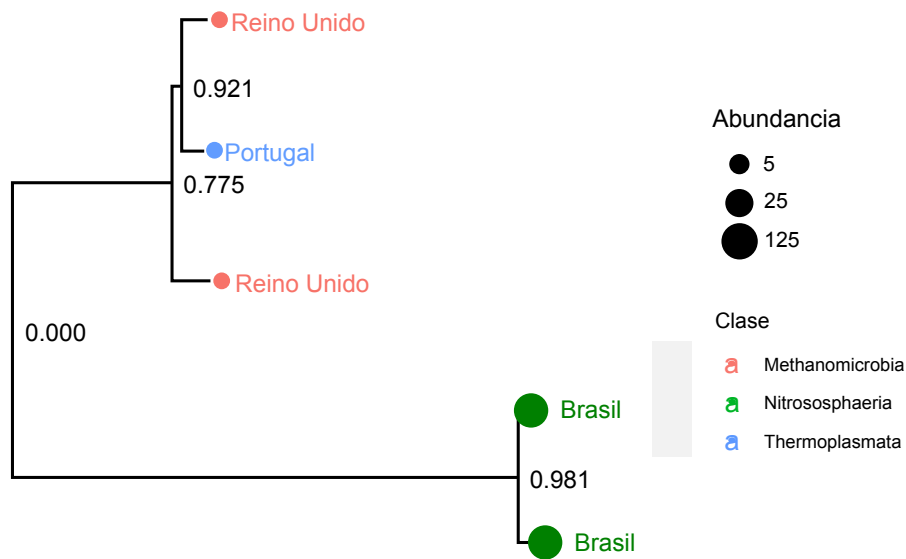


Fig. 4. Árbol filogenético de las clases pertenecientes al reino Archaea.

el pH fue de 7.3. Los valores de pH entre 7.1 y 7.5 se pueden relacionar con la presencia de carbonatos en la muestra. Según Simmler et al. (2019) se han registrado estos valores en esta zona minera de Bulgaria. Las variaciones de pH del suelo pueden explicar la composición de la comunidad microbiana en un área de muestreo, pues suele fungir como un filtro que selecciona a los organismos con preferencia a determinado tipo de pH (Martiny et al. 2015, Chu et al. 2010).

Para observar tendencias generales primero se realizó el análisis exploratorio de componentes principales (**Fig. 5**), el cual demostró que las minas de Canadá, China, Bulgaria, Portugal y Reino Unido poseen una composición similar en sus comunidades microbianas, mientras que la mina en Brasil guarda una disimilitud menor con el resto de las minas debido principalmente a su abundancia de la clase Nitrososphaeria. La clase Bacteroidia se encontró correlacionada con las minas

CUADRO II. PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS PRESENTES EN LAS MINAS DE COBRE SELECCIONADAS.

Nombre de mina	pH	Cu (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Zn (mg/kg)	As (mg/kg)	Fe (mg/kg)	SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	T (°C)	P (mm)
Canadá	5.5	25.5	-	0.95	18	1760	8459	17.9	398
China	3.2	1950	27.6	205.4	63.3	133460	13320	16.4	1269
Brasil	67	4920	7.4	35	-	41215	-	26	1766
Bulgaria	7.3	350	850	450	0.25	0.1	-	10.3	581
Reino Unido	5.7	543	149	71.4	495	599	2747	9.5	914
Portugal	5.4	21.6	-	46	-	155039	1174.8	17.1	505

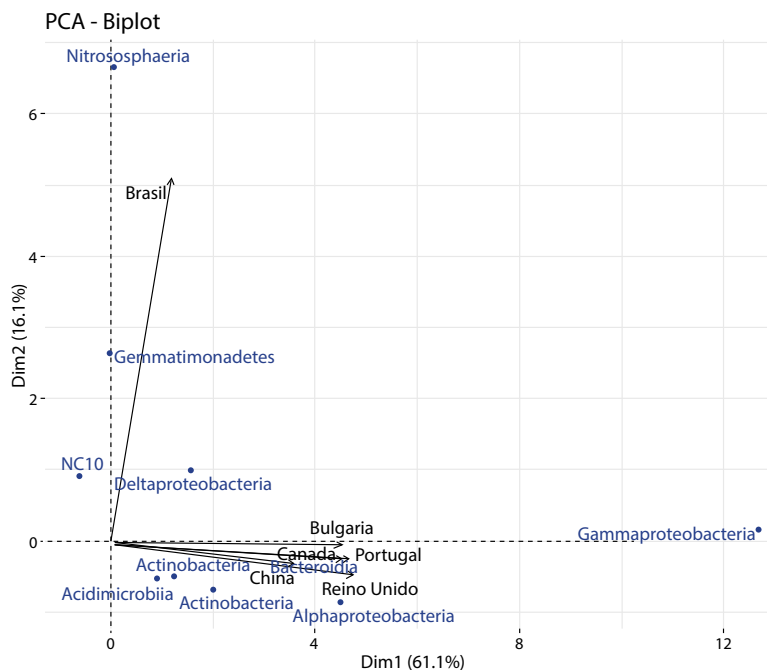


Fig. 5. Análisis de componentes principales de las clases bacterianas presentes en las seis minas de cobre.

de Bulgaria, China, Canadá y Portugal, mientras que la clase Alphaproteobacteria se correlaciona fuertemente con la mina de Reino Unido.

El análisis de correspondencia canónica reveló una correlación entre algunas de las clases microbianas y los factores físicos, químicos y ambientales, como es el caso del arsénico (As), y la abundancia de la clase Acidobacteriia en las minas de Canadá y Reino Unido. Esto es debido a que esta clase tiene el potencial metabólico para vivir en ambientes ricos en As (Rodriguez et al. 2014).

También se pudo observar que las variables hierro (Fe) y cobre (Cu) influyen en la composición de las comunidades microbianas en las minas de China, Portugal y Brasil (Fig. 6), lo que puede relacionarse con las concentraciones de estos elementos como contaminantes en estos sistemas, mientras que la correlación del plomo (Pb) con la mina de Bulgaria se debe sus altas concentraciones en esta mina.

Existe evidencia de la presencia de algunas rutas metabólicas relacionadas con la reducción de metales en las minas de cobre, como la reducción de nitrato VI, la súper vía de oxidación de azufre y la supervía de biosíntesis de L-metionina por sulfhidrilación. Esta última describe la oxidación de azufre por la arquea *Acidianus ambivalens* (Zimmermann et al. 1999).

Otras rutas presentes en las minas antes mencionadas fueron la ruta de la desnitrificación, metanogénesis de acetato y por último la ruta de la metanogénesis mediante hidrógeno molecular (H₂)

a dióxido de carbono (CO₂). La presencia de estas rutas se corroboró mediante las predicciones funcionales realizadas con PICRUST2. Las predicciones demostraron la existencia de genes que codifican para enzimas relacionadas con la reducción de nitrato, la metanogénesis y la reducción de sulfato (Cuadro III). También se encontraron enzimas que ayudan a la resistencia al cobre como las oxidasas multicobre, al mercurio como las mercurio reductasas y de enzimas de almacenamiento, como el complejo de ferretina de almacenamiento de hierro. La oxidasa multicobre es una fenoloxidasas y ferroxidasas estimulada por cobre que participa en la homeostasis de cobre durante la aerobiosis (Outten et al. 2001). Por otro lado, la enzima mercurio (II) reductasa es clave en la desintoxicación de mercurio catalizando la reducción del ion tóxico de mercurio (Hg²⁺) a su forma elemental (Hg⁰) (Schottel 1978).

CONCLUSIONES

Se concluye que la mina con la comunidad microbiana más diversa fue la localizada en Reino Unido, a pesar de que las clases presentes en dicha mina fueron poco abundantes. Una de las clases bacterianas más abundantes en las seis minas fue Gammaproteobacteria. Se identificaron genes que codifican para enzimas que ayudan a la resistencia a metales pesados como las multicobre oxidasas y mercurio reductasas, además de la presencia de

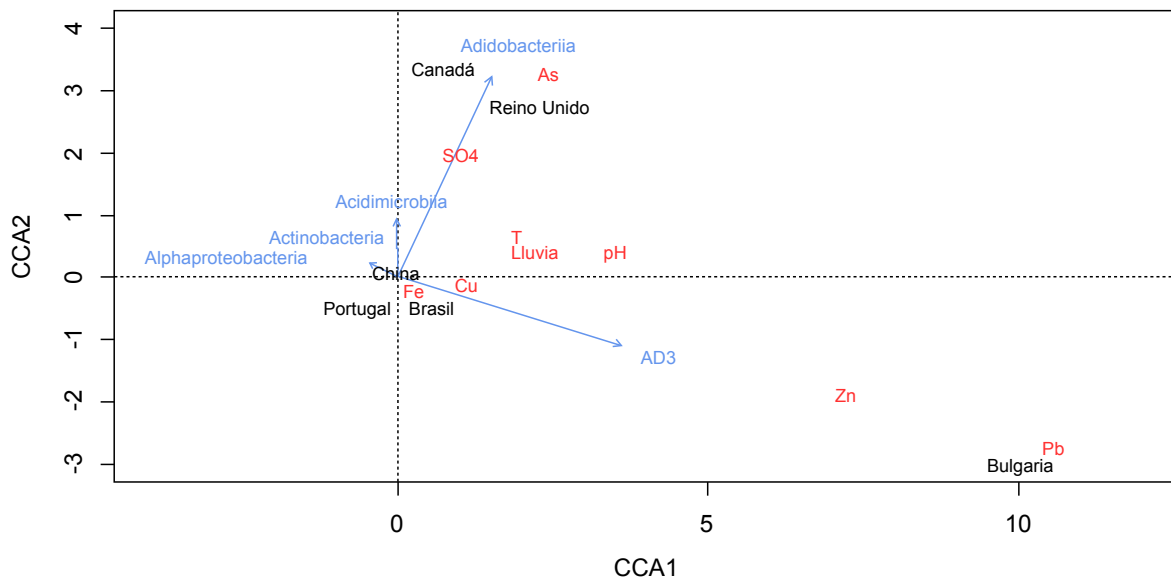


Fig. 6. Análisis de correspondencia canónica de las comunidades bacterianas presentes en las seis minas de cobre y parámetros ambientales.

CUADRO III. PREDICCIONES FUNCIONALES DE LAS ENZIMAS PRESENTES EN LAS MINAS DE COBRE SELECCIONADAS.

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

rutas metabólicas relacionadas con los ciclos bio-geoquímicos de azufre, carbono y nitrógeno en las comunidades microbianas de las minas de Canadá, China, Bulgaria y Brasil.

AGRADECIMIENTOS

LBD agradece a CONACYT y al programa Cátedras-CONACYT por el apoyo 285.

REFERENCIAS

- Aduvire O. (2006). Drenaje ácido de mina, generación y tratamiento. Instituto Geológico y Minero de España, Dirección de Recursos Minerales y Geoambiente. Madrid, España. 136 pp.
- Aguinaga O.E., McMahon A., White K.N., Dean A.P. y Pittman J.K. (2018). Microbial community shifts in response to acid mine drainage pollution within a natural wetland ecosystem. *Front. Microbiol.* 9, 1445. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01445>
- Akcil A. y Koldas S. (2006). Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *J. Clean. Prod.* 14, 1139-1145. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.006>
- Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R., Bokulich N.A., Abnet C.C., Al-Ghalith G.A., Alexander H., Alm E.J., Arumugam M., Asnicar F., Bai Y., Bisanz J.E., Bittinger K., Brejnrod, Brislawn C.J., Brown C.T., Callahan B.J., Caraballo-Rodríguez A.M., John Chase J., Emily K. Cope E.K., Da Silva R., Diener C., Dorrestein P.C., Douglas G.M., Durall D.M., Duvallet C., Estaki M., Jennifer Fouquier J., Gauglitz J.M., Gibbons S.M., Gibson D.L., Gonzalez A., Gorlick K., Guo J., Hillmann B., Holmes S., Holste H., Huttenhower C., Huttley G.A., Janssen S, Jarmusch A.K., Jiang L., Kaehler B.D., Kang K.B., Keefe C.R., Keim P., Kelley S.T., Knights D., Koester I., Kosciolk T., Kreps J., Langille M.G.I., Lee J., Ruth Ley R., Yong-Xin Liu Y., Loftfield E., Lozupone C., Maher M., Marotz

- C., Martin B.D., McDonald D., McIver L.J., Melnik A.V., Metcalf J.L., Morgan S.C., Morton J.T., Naimey A.T., Navas-Molina J.A., Nothias L.F., Orchanian S.B., Pearson T., Peoples S.L., Petras D., Preuss M.L., Pruesse E. L.B., Rivers A., Robeson II M.S., Rosenthal P., Segata N., Shaffer M., Shiffer A., Sinha R.z, Song S.J., Spear J.R., Swafford A.D., Thompson L.R., Torres P.J., Trinh P., Tripathi A., Turnbaugh P.J., Ul-Hasan S., Justin J. J. van der Hooft, Vargas F., Vázquez-Baeza Y., Vogtmann E., Von zHippel M., Walters W., Wan Y., Wang M., Warren J., Weber K.C., Williamson C.H.D., Willis A.D., Xu Z.Z., Zaneveld J.R., Zhang Y., Zhu Q., Knight R. y Caporaso J.G. (2019). Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 1091. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0252-6>
- Chu H., Fierer N., Lauber C.L., Caporaso J.G., Knight R. y Grogan P. (2010). Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.* 12, 2998-3006. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02277.x>
- Dimitrova D., Velitchkova N., Mladenova V., Kotsev T. y Antonov, D. (2016). Heavy metal and metalloids mobilisation and rates of contamination of water, soil, and bottom sediments in the Chiprovtsi mining district, Northwestern Bulgaria. *Geol. Balc.* 45, 47-63. <https://doi.org/10.52321/GeolBalc.45.0.47>
- Douglas G.M., Maffei V.J., Zaneveld J., Yurgel S.N., Brown J.R., Taylor C.M., Huttenhower C. y Langille M.G.I. (2020). PICRUSt2: An improved and customizable approach for metagenome inference. <https://doi.org/10.1101/672295> 14/01/2020
- Ettamimi S., Carlier J.D., Cox C.J., Elamine Y., Hammani K., Ghazal H. y Costa M.C. (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, 821-834. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01136-1>
- Henne A., Hamilton J., Craw D., Paterson D., y Southam, G. (2020). The influence of metal mobility on resource potential in circumneutral pH iron-rich copper mine waste rocks. *J. Geochem. Explor.* 219, 106632. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2020.106632>
- Hussein K.A. y Joo J.H. (2013). Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 2288-2296. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1764>
- Jiang X., Liu W., Xu H., Cui X., Li J., Chen J. y Zheng B. (2021). Characterizations of heavy metal contamination, microbial community, and resistance genes in a tailing of the largest copper mine in China. *Environ. Pollut.* 280, 116947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116947>
- Kim B., Shin J., Guevarra R.B., Lee J.H., Kim D.W., Seol K.H. e Isaacson R.E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Lê S., Josse J. y Husson F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1-18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Li X., Meng D., Li J., Yin H., Liu H., Liu X. y Yan M. (2017). Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environ. Pollut.* 231, 908-917. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.057>
- Li Y., Wu Z., Dong X., Xu Z., Zhang Q., Su H., Jia Z. y Sun, Q. (2019). Pyrite oxidization accelerates bacterial carbon sequestration in copper mine tailings, Biogeosciences. 16, 573-t583. <https://doi.org/10.5194/bg-16-573-2019>
- Magurran A.E. (1988). Ecological diversity and its measurement. Princeton University press. Nueva Jersey, EUA. 181 pp.
- Martiny J.B.H., Jones S.E., Lennon J.T. y Martiny A.C. (2015). Microbiomes in light of traits: a phylogenetic perspective. *Science.* 350, 649-659. <https://doi.org/10.1126/science.aac9323>
- McMurdie P.J. y Holmes S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE.* 8, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Mesa V., Gallego J.L., González-Gil R., Lauga B., Sánchez J., Méndez-García C. y Peláez A.I. (2017). Bacterial, archaeal, and eukaryotic diversity across distinct microhabitats in an acid mine drainage. *Front. Microbiol.* 8, 1756. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01756>
- Mori J.F., Chen L.X., Jessen G.L., Rudderham S.B., McBeth J.M., Lindsay M.B. y Warren L.A. (2019). Putative mixotrophic nitrifying-denitrifying Gammaproteobacteria implicated in nitrogen cycling within the ammonia/oxygen transition zone of an oil sands pit lake. *Front. Microbiol.* 10, 2435. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02435>
- Murakami S., Takasu T., Islam K., Yamasue E. y Adachi T. (2020). Ecological footprint and total material requirement as environmental indicators of mining activities: Case studies of copper mines. *Environ. Sustain. Indic.* 8, 100082. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2020.100082>
- Narayanan M., Devarajan N., He Z., Kandasamy S., Ashokkumar V., Raja R. y Carvalho I.S. (2020). Assessment of microbial diversity and enumeration of metal tolerant autochthonous bacteria from tailings of magnesite and bauxite mines. *Mater. Today.* 33, 4391-4401. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.652>
- Oksanen J.F., Blanchet G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlenn D., Minchin P.R., Hara R.B., Simpson G.L.,

- Solymos P., Stevens M.H.H., Szoecs E. y Wagner H. (2019). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. [en línea]. <https://rdrr.io/cran/vegan/>
- Outten F.W., Huffman D.L., Hale J.A. y O'Halloran T.V. (2001). The independent cue and cus Systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 30670-30677. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104122200>
- Pakostova E., Schmall A.J., Holland S.P., White H., Ptacek C.J. y Blowes D.W. (2020). Performance of a geosynthetic-clay-liner cover system at a Cu/Zn mine tailings impoundment. *Appl. Environ. Microb.* 86(8) e02846-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02846-19>
- Palanivel T.M., Sivakumar N., Al-Ansari A. y Victor R. (2020). Bioremediation of copper by active cells of *Pseudomonas stutzeri* LA3 isolated from an abandoned copper mine soil. *J. Environ. Manage.* 253, 109706. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109706>
- Quiñones M. (2017). Impacto ambiental de la minería. [en línea]. <https://www.eadic.com/impacto-ambiental-de-la-mineria/> 05/02/2020
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing [en línea]. <https://www.R-project.org/> 06/04/2020
- Rehan M. y Alsohim A.S. (2019). Bioremediation of Heavy Metals. En: *Environmental chemistry and recent pollution control approaches*. (H.N. Saldarriaga, M.A.T. Murillo, R. Farooq, R. Dongre y S. Riaz, Eds.). IntechOpen, Londres, Reino Unido, pp. 145-160. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88339>
- Rodrigues V.D., Torres T.T. y Ottoboni L.M. (2014). Bacterial diversity assessment in soil of an active Brazilian copper mine using high-throughput sequencing of 16S rDNA amplicons. *A. Van. Leeuw. J. Microb.* 106, 879-890. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0257-6>
- Sarkis-Onofre R., Catalá-López F., Aromataris E. y Lockwood C. (2021). How to properly use the PRISMA Statement. *Syst. Rev.* 10(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01671-z>
- Sandaa R.A., Torsvik V. y Enger O. (2001). Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil. Biol. Biochem.* 33, 287-295. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00139-5)
- Schottel J.L. (1978). The mercuric and organomercurial detoxifying enzymes from a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 4341-4349. [en línea]. <https://doi.org/10.1007/BF00194147>
- Sevilla B. (2019). Principales minas de cobre a nivel mundial 2019 [en línea]. <https://es.statista.com/estadisticas/635359/paises-lideres-en-la-produccion-de-cobre-a-nivel-mundial/> 09/01/2020.
- Simmler M., Christl I. y Kretzschmar R. (2019). Effect of extreme metal (loid) concentrations on prokaryotic community structure in floodplain soils contaminated with mine waste. *Appl. Soil. Ecol.* 144, 182-195. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.07.022>
- Smith R.L., Smith T.M., Román R.S. y Sánchez C.C. (2007). *Ecología*. 6ta ed. Pearson Educación. Madrid, España. 682 pp.
- Valenzuela-González F., Casillas-Hernández R., Villalpando E., Vargas-Albores F. y Harris C. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Cienc. Mar.* 41, 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Vassallo L.F. (2008). *Yacimientos minerales metálicos*. 4ta ed. Centro de Geociencias, UNAM. Querétaro, México. 138 pp.
- Vullo D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Quim. Viva.* 2, 93-104. [en línea]. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86320303.pdf> 24/01/2020.
- Yuan Q., Wang P., Wang C., Chen J., Wang X., y Liu S. (2021). Indicator species and co-occurrence pattern of sediment bacterial community in relation to alkaline copper mine drainage contamination. *Ecol. Indic.* 120, 106884. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106884>
- Zamora A., Malaver N. y Ramos J. (2012). Análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biol. Venez.* 32, 57-86 [en línea]. https://www.researchgate.net/publication/272492530_ANALISIS_FUNCIONAL_DE_MICROORGANISMOS_UN_ESTIMADOR_DE_DIVERSIDAD_Y_ESTRUCTURA_COMUNITARIA 24/01/2020.
- Zimmermann P., Laska S. y Kletzin A. (1999). Two modes of sulfite oxidation in the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Acidianus ambivalens*. *Arch. Microbiol.* 172, 76-82. <https://doi.org/10.1007/s002030050743>