

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y PROPIEDADES ECOLÓGICAS DE BACTERIAS TERMORRESISTENTES AISLADAS DE DESECHOS MINEROS

Phenotypic characterization and ecological properties of heat-resistant bacteria isolated from mine tailings

Alejandra VELASCO-LÓPEZ, Elizabeth CASTILLO-VILLANUEVA,
Maricela ARTEAGA-MEJÍA y Jorge VALDIVIA-ANISTRO*

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus II, Batalla 5 de Mayo s/n esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, 09230 Ciudad de México, México.

*Autor para correspondencia: jorge.valdivia@zaragoza.unam.mx

(Recibido: agosto de 2024; aceptado: febrero de 2025)

Palabras clave: bacteriología, choque térmico, relave.

RESUMEN

Los relaves mineros contienen desechos con una composición química susceptible a la oxidación. La oxidación de estos desechos genera condiciones que alcanzan el umbral de extremosidad ambiental. Estas condiciones extremas limitan el desarrollo de la vida. Sin embargo, las bacterias se han adaptado a las condiciones de ambientes extremos. El objetivo de este estudio fue aislar bacterias termorresistentes de desechos mineros para describir características fenotípicas y propiedades ecológicas que vislumbren su adaptación a las condiciones extremas de estos contaminantes. El sustrato asociado a la rizosfera tuvo la mayor abundancia y el lixiviado fue la muestra con mayor diversidad de bacterias termorresistentes. Se describió una dominancia de bacilos grampositivos, principalmente en el lixiviado. Todos los aislados presentaron protección ante el estrés oxidativo y la mayoría no utiliza el oxígeno como aceptor de electrones en la respiración. Las bacterias termorresistentes mostraron evidencias de un crecimiento acidófilo. A pesar de haber sido seleccionadas por choque térmico, solo el 34 % produce biofilm. El 69 % de los aislados creció en un medio con fósforo inorgánico, pero no mostró evidencias de solubilización. Estos aislados tuvieron cambios fenotípicos considerables en la morfología de sus colonias. La correlación entre las características fenotípicas y las propiedades ecológicas de las bacterias termorresistentes reveló similitudes adaptativas que comparten entre grupos de aislados. Estas correlaciones deben ser confirmadas desde una perspectiva filogenética. Este estudio contribuye a la descripción de la adaptabilidad a sitios extremófilos de origen antrópico con la intención de identificar bacterias para uso potencial en la biorremediación de sitios mineros.

Key words: bacteriology, heat shock, tailing dam.

ABSTRACT

Mine tailings contain waste with a chemical composition that is susceptible to oxidation. The oxidation of these wastes creates conditions that reach the threshold of environmental extremes. These extreme conditions limit the development of life. However, bacteria have adapted to extreme environmental conditions. The aim of this study was

to isolate heat-resistant bacteria from mining wastes and describe their phenotypic characteristics and ecological properties, providing insight into their adaptation to the extreme conditions of these pollutants. The rhizosphere-associated substrate had the highest abundance, and the leachate was the sample with the highest diversity of thermoresistant bacteria. The dominance of Gram-positive bacilli was described, mainly in the leachate. All isolates showed protection against oxidative stress, and most of them did not use oxygen as an electron acceptor in respiration. The thermoresistant bacteria showed evidence of acidophilic growth. Despite being selected by heat shock, only 34% of the samples produced biofilm. Sixty-nine per cent of the isolates grew on medium containing inorganic phosphorus but showed no evidence of solubilization. These isolates showed significant phenotypic changes in the morphology of their colonies. Correlations between phenotypic characteristics and ecological properties of heat-resistant bacteria revealed adaptive similarities shared by groups of isolates. These correlations need to be confirmed from a phylogenetic perspective. This study contributes to the description of adaptability to extremophilic sites of anthropogenic origin, aiming to identify bacteria for potential use in the bioremediation of mining sites.

INTRODUCCIÓN

Los parámetros ambientales tienen variaciones significativas dependiendo de la ubicación del ecosistema (Strayer et al. 2003, Helmuth et al. 2010). Algunos sitios tienen parámetros físicos y químicos que alcanzan niveles extremos, los cuales condicionan el desarrollo de la vida (Parrilli et al. 2021, Salazar-Ardiles et al. 2022). Los parámetros utilizados para definir las condiciones ambientales extremas son: limitación de nutrientes, pH, presión, radiación, salinidad, temperatura e, inclusive, la presencia de sustancias contaminantes (Merino et al. 2019, Gallo et al. 2021). Los organismos que habitan sitios con condiciones extremas tienen diversas adaptaciones bioquímicas y ecológicas, las cuales han sido descritas en diversos microorganismos (Sayed et al. 2020, Ando et al. 2021). En particular, las bacterias pueden habitar cualquier sitio con condiciones ambientales extremas y son denominadas extremófilas (von Hegner 2020, Shu y Huang 2022). La adaptabilidad de las bacterias extremófilas ha sido considerada por la astrobiología para ampliar la exploración de sitios extraterrestres en el Sistema Solar (Cavicchioli 2002, Carré et al. 2022). El aislamiento y caracterización de bacterias extremófilas han generado avances en áreas como la biología molecular y la medicina (Raddadi et al. 2015, Coker 2016, Rawat et al. 2024). Pero en los últimos años se ha analizado el potencial de los extremófilos para la biorremediación de sitios contaminados con compuestos xenobióticos y metales pesados (Shukla y Singh 2020, Chia et al. 2024, Sun et al. 2024).

Los parámetros físicos y químicos que definen los hábitats extremos no solo están presentes en

ambientes naturales (Bonan y Doney 2018). Sitios contaminados o con impacto antrópico han impuesto nuevas condiciones de estrés para el establecimiento y desarrollo de la vida (Häder y Barnes 2019). Los sitios contaminados pueden tener varios parámetros que alcanzan el umbral de ambientes extremos (Cedergreen et al. 2013, Menezes-Oliveira et al. 2013, Liu et al. 2014). Por ejemplo, los desechos mineros tienen varias condiciones extremas, como limitación de nutrientes, variaciones extremas en la capacidad de amortiguación (pH), concentraciones altas de sustancias tóxicas (metales pesados y metaloides), exposición prolongada a radiación ultravioleta (UV) y desecación (García-Balboa et al. 2013, Olías y Nieto 2015, Johnson y Aguilera 2019).

Los desechos mineros son una mezcla de rocas trituradas y residuos metalúrgicos (Kossoff et al. 2014, Hu et al. 2016). Químicamente, pueden contener fracciones minerales con diversos metales y metaloides, como arsénico (As), cobre (Cu), cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb) y zinc (Zn) (Lindsay et al. 2015, Azizi et al. 2022). Estos desechos son almacenados a la intemperie, propiciando su oxidación por la acción del medio ambiente y la actividad bacteriana (Elberling et al. 2000, Lu y Wang 2012). Esta oxidación induce la formación de lixiviados extremadamente ácidos ($\text{pH} \leq 4.0$) que tienen un contenido limitado de oxígeno, con potencial redox alto y temperatura variable (Dold 2014, Simate y Ndlovu 2014, Queiroz et al. 2022). Como consecuencia, se produce la liberación de los metales y metaloides contenidos que, aun en bajas concentraciones (< 10 ppm), representan un riesgo ambiental y de salud pública (Sojka et al. 2022, Sun et al. 2024). Finalmente, como estos desechos están expuestos

a la incidencia de la radiación solar, van perdiendo humedad hasta llegar a su desecación (Qin et al. 2019, Yuan et al. 2021a). La interacción de estas condiciones de estrés y la nula disponibilidad de nutrientes limita el establecimiento de animales y plantas en los desechos mineros (Kossoff et al. 2014, Queiroz et al. 2022). Sin embargo, diversos grupos bacterianos tienen la capacidad de adaptarse a las condiciones extremas de estos desechos y pueden aprovechar sus componentes químicos como recursos metabólicos (Hallberg 2010, Munyai et al. 2021). Los principales grupos de extremófilos que habitan en estos desechos son bacterias oxidantes de sulfuro (S^{2-}) y hierro (Fe) como *Alicyclobacillus disulfidooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans* (Baker y Banfield 2003, Cowan et al. 2015); bacterias acidófilas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Ferrimicrobium acidiphilum* (Hedrich y Schippers 2021, Yi et al. 2021); bacterias metalófilas como *Burkholderia cenocepacia* y *Ralstonia metallidurans* (Wakelin et al. 2012, Parades-Aguilar et al. 2024); bacterias termófilas como *Leptospirillum thermoferrooxidans* (Marhual et al. 2008), e inclusive halófilos como *Alicyclobacillus* sp. SO9 y *Thioclava pacifica* (Opara et al. 2023, Huynh et al. 2024). Por lo anterior, el análisis de la diversidad bacteriana en sitios contaminados por la minería puede ser un punto de referencia para identificar nuevas estrategias de sobrevivencia a condiciones extremas y hasta de nuevos grupos taxonómicos (Zhang et al. 2021, Sajjad et al. 2024).

La amplia distribución de sitios mineros y el nulo tratamiento de los desechos que generan representan una problemática que puede ser potenciada por el cambio climático (Labonté-Raymond et al. 2020, Lin et al. 2022, Trottier et al. 2023). Sin embargo, estos desechos pueden albergar grupos bacterianos extremófilos que representan una fuente biotecnológica para diseñar estrategias de biorremediación (Giovanella et al. 2020, Schultz y Rosado 2020, Cowan et al. 2024). En los desechos mineros se han aislado bacterias acidófilas y metalofílicas que, por la simultaneidad de las dos condiciones extremas, se denominan acidometalófilas (Xie et al. 2010, Zhang et al. 2021, Bedaprana et al. 2023, Roy et al. 2023). Generalmente, las bacterias aisladas de sitios mineros son moderadamente termófilas porque pueden desarrollarse aeróbicamente hasta los 55 °C (la temperatura óptima es de 45 °C) (Marhual et al. 2008, Vardanyan et al. 2019). De esta forma, el objetivo del presente estudio fue aislar bacterias de desechos mineros (sustrato y lixiviados) capaces de tolerar un choque térmico superior a su temperatura máxima de crecimiento y describir las propiedades

fenotípicas y ecológicas que expliquen su capacidad de adaptación a las condiciones extremas impuestas por sitios afectados por actividades antrópicas, como los relaves.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio y colecta de las muestras

El relave minero "El Fraile" se encuentra en el municipio de Taxco de Alarcón en el estado de Guerrero, México. Fue generado por la extracción de plata (Ag) y contiene $\sim 5 \times 10^6$ toneladas de desechos mineros con diferente grado de oxidación, con evidencia de formación de lixiviados y con concentraciones altas de metales y metaloides (en mg/kg: As = 1324 ± 846 ; Cu = 225 ± 98 ; cadmio (Cd) = 39.5 ± 55.6 ; manganeso (Mn) = 940 ± 1534 ; Pb = 3677 ± 1481 ; Zn = 3118 ± 3329 ; hierro (Fe) = 5.5 ± 1.6 %) (Talavera-Mendoza et al. 2016, Dótor-Almazán et al. 2017). Las muestras de desechos mineros fueron recolectadas el 24 de noviembre de 2023, un mes después del arribo a tierra del huracán Otis al estado de Guerrero. Por esta razón, los desechos se encontraban húmedos y en diferentes áreas del relave se observó la formación de lixiviados (**Fig. 1a, b**). Se recolectaron muestras superficiales (0-15 cm de profundidad) de desechos sólidos con diferente grado de oxidación (sustrato oxidado asociado a la rizosfera de una planta colonizadora y sustrato reducido con precipitación de sales) y una muestra de lixiviado blanquecino (**Fig. 1c**). Las muestras de sustrato fueron almacenadas en tubo estéril tipo Falcón y se cubrieron con papel aluminio, mientras que la muestra de lixiviado fue almacenada en un frasco de vidrio color ámbar. Todas las muestras fueron conservadas a 4 °C para ser transportadas al laboratorio.

Propiedades químicas de las muestras recolectadas para el aislamiento de las bacterias termorresistentes

Las muestras de sustrato y lixiviado fueron caracterizadas químicamente. Los parámetros analizados fueron: pH, conductividad eléctrica y potencial redox (Eh). Los métodos utilizados se encuentran descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT 2002).

Procesamiento de las muestras para el aislamiento y cuantificación de las bacterias termorresistentes

A cada una de las muestras se le aplicó el método de diluciones seriadas (de 1/10 hasta 1/1000) utilizando solución salina estéril (cloruro de sodio [NaCl], 0.85 % p/v) (Reynolds 2005). Cada dilución fue

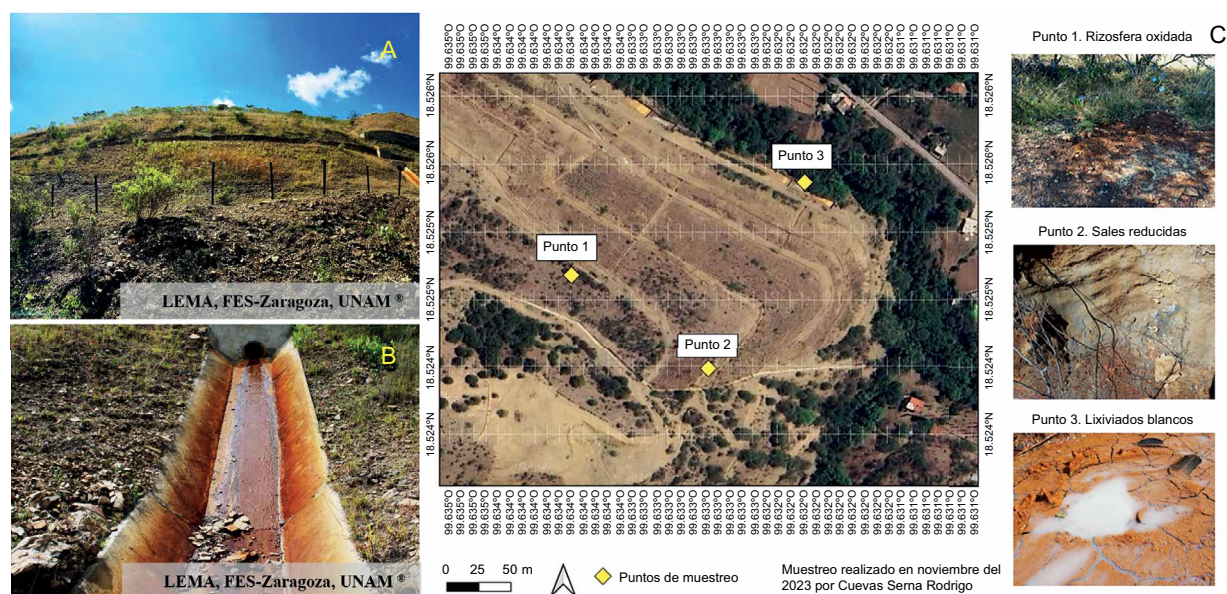


Fig. 1. Relave minero “El Fraile” y ubicación de los sitios de muestreo. (a) Desechos mineros hidratados por efecto de las lluvias generadas por el huracán Otis. (b) Canal de captación de lixiviados. (c) Puntos de muestreo: 1. Sustrato oxidado asociado a una planta colonizadora del relave, 2. Sustrato reducido con precipitación de sales y 3. Lixiviados blancos acumulados en la base del relave. (LEMA: Laboratorio de Estequiometría y Microbiología Ambiental; FES: Facultad de Estudios Superiores; UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.)

sometida a dos choques térmicos: 80 °C por 10 min y 90 °C por un min. Este choque térmico es utilizado para el aislamiento de bacterias formadoras de endosporas y/o termorresistentes (Madigan et al. 2019). De cada dilución se sembraron 100 μ L por extensión en cajas Petri con agar soya tripticaseína (TSA; MCD Lab) cuya composición por litro es: 15 g de agar bacteriológico, 5 g de NaCl, 15 g de peptona de caseína y 5 g de peptona de soya. Lo anterior se realizó por triplicado. Las cajas de Petri inoculadas fueron incubadas a 30 °C por 24 h. Las colonias bacterianas desarrolladas fueron cuantificadas para estimar el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

Caracterización fenotípica de las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros

Clasificación de las bacterias termorresistentes por morfología colonial

La descripción de la morfología colonial es un criterio indispensable para realizar la identificación de las bacterias (Brekwell et al. 2007). Las colonias bacterianas fueron descritas y clasificadas considerando caracteres morfológicos como color, elevación, forma y margen. La combinación de estos criterios fenotípicos permite clasificar a las bacterias en morfotipos, cada uno de los cuales representará un tipo distinto de bacteria termorresistente.

Los morfotipos descritos fueron purificados para la generación de cultivos axénicos, los cuales fueron almacenados en medio TSA con glicerol al 30 % para la creación de un cepario.

Composición de la pared y morfología celular de las bacterias termorresistentes

La tinción de Gram es fundamental para la caracterización fenotípica de las bacterias (Smith y Hussey 2005). Esta técnica se fundamenta en la composición de la pared celular bacteriana. Las bacterias grampositivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano (90 % de la pared celular) y se tiñen de color azul/púrpura, en tanto que las bacterias gramnegativas tienen un mayor contenido de lípidos y una capa delgada de peptidoglicano (10 % de la pared celular); estas se tiñen de color rosa/rojo. Además, la técnica permite identificar la morfología de las células bacterianas, las cuales pueden tener forma de coco, bacilo o espiral.

Propiedades ecológicas de las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros

Resistencia al estrés oxidativo y actividad de la enzima oxidasa

Se analizó la capacidad para evitar el daño oxidativo de las bacterias termorresistentes a través de la prueba de catalasa (Reiner 2010). Esta prueba fue

diseñada para detectar la actividad de la enzima catalasa en presencia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Cuando la catalasa entra en contacto con este, se genera una efervescencia que indica su descomposición en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2). Por lo tanto, se lleva a cabo su detoxificación celular.

La prueba de la oxidasa es un análisis bioquímico que ayuda a detectar la presencia de la enzima citocromo *c* oxidasa, la cual participa en la transferencia de electrones durante la etapa final de la respiración aerobia bacteriana (Shields y Cathcart 2010). En esta etapa de la respiración se lleva a cabo la oxidación de la enzima y se reduce el oxígeno para la formación de H_2O . En el laboratorio, la oxidación de la enzima se realiza con el reactivo de Kovács (solución de dihidrocloruro de tetrametil-p-fenilendiamina en H_2O al 1.0 %). La prueba se realizó con biomasa bacteriana que tuviera < 24 h de crecimiento. La biomasa fue extendida en un pedazo de papel de filtro estéril y se le agregaron dos gotas del reactivo de Kovács. Las bacterias son positivas cuando la biomasa cambia a color púrpura en < 90 s.

Fermentación de manitol y prueba de citrato

Para confirmar el crecimiento acidófilo de las bacterias termorresistentes se analizó su capacidad para fermentar manitol debido a que la producción de ácido se lleva a cabo durante su metabolización (Shields y Tsang 2006). Esta prueba se realizó con agar de sal y manitol (ASM). El contenido de NaCl (7.5 %) del medio ayuda a la selección de bacterias que toleran la presión osmótica generada por la sal. El ASM es suplementado con el indicador rojo fenol ($\text{pH} = 7.8$). Cuando el pH del medio es > 8.4, tiene un color rosa; si el pH del medio está entre 6.9 y 8.4, el color es rojo; y si el pH es < 6.9, tiene un color amarillo. Al fermentarse el manitol, se producen ácidos que disminuirán el pH del medio circundante a la colonia bacteriana, cambiando el color de rojo a amarillo.

Para confirmar los resultados anteriores, se probó la capacidad de utilizar citrato como fuente de carbono y de energía (MacWilliams 2009). La prueba se realizó con el medio citrato de Simmons, que contiene citrato sódico deshidratado y azul de bromotimol como indicador de pH . La metabolización del citrato requiere oxígeno y se genera el incremento de pH del medio, induciendo un cambio de color de verde ($\text{pH} = 7.0$) a azul ($\text{pH} > 8.1$), de manera que si las bacterias termorresistentes de los desechos mineros son acidófilas estrictas, no tendrán la capacidad de metabolizar el citrato.

Liberación y aprovechamiento de fósforo inorgánico

Debido a la limitación de nutrientes que caracteriza a los desechos mineros, se realizó la prueba de solubilización de fósforo con el medio Pikovskaya, cuya composición por litro es: 20 g de agar bacteriológico, 0.2 g de cloruro de potasio (KCl), 0.5 g de extracto de levadura, 5 g de fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 10 g de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0.2 g de NaCl , 0.5 g de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.002 g de sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 0.002 g de sulfato de magnesio monohidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y 0.1 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) (Nautiyal 1999). Los aislados fueron sembrados en cajas de Petri con medio Pikovskaya y se incubaron a 28 °C por siete días. Transcurrido dicho periodo, se evaluó la formación de un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana, el cual indica la capacidad de liberar y aprovechar el fósforo del medio (Wang et al. 2023).

Formación de biofilm

El biofilm, que es una estrategia para tolerar condiciones de estrés impuestas por los desechos mineros, se determinó por ensayo de formación en placas de microtitulación (O'Toole 2011). El procedimiento consistió en cultivar cada aislado bacteriano en caldo de soya tripticaseína (TSB, MCD Lab) por 12 h. A partir de este cultivo se realizó una dilución 1/100 en caldo de cultivo fresco. Se inocularon 100 μL de las diluciones en los pozos de la placa de microtitulación. La placa fue incubada a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se eliminó el caldo de cultivo dando vuelta a la placa y golpeando sobre una superficie cubierta con toallas de papel. Las células que no formaron biofilm fueron eliminadas al sumergir la placa en un recipiente con agua destilada estéril que se agitó al menos diez veces. Se eliminó la fase acuosa y se repitió el proceso dos veces más. La placa se dejó escurriendo por 1 h. Para teñir el biofilm se agregaron, en cada pozo, 125 μL de una solución de cristal violeta en H_2O al 0.1 %. La placa con cristal violeta se mantuvo a temperatura ambiente por 15 min. Transcurrido este tiempo, la placa se sumergió en agua destilada estéril y se agitó vigorosamente para eliminar el cristal violeta. Para eliminar los residuos acuosos se volteó la placa y se la dejó escurrir sobre toallas de papel. La placa se dejó secar por 12 h y después se procedió a tomar las fotografías del biofilm, el cual se distinguió por la formación de una película teñida de color morado. Cuando la película se forma en la parte superior del pozo (interfase aire-líquido) significa que la bacteria tiene movimiento;

en cambio, cuando se establece en la base del pozo, la bacteria se clasifica como inmóvil.

Agrupamiento jerárquico de las bacterias termorresistentes a partir de su caracterización fenotípica y propiedades ecológicas

Con los resultados se construyó una matriz para identificar las similitudes fenotípicas y ecológicas entre las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros. Para este análisis se utilizó el método de agrupación jerárquica aglomerativa simple (UPGMA [por su sigla en inglés] o método de grupos de pares no ponderados con media aritmética) (Moulton et al. 2018). Este agrupamiento se realizó con el programa Estadística Paleontológica (PAST, por su sigla en inglés; Hammer et al. 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades químicas de los desechos mineros utilizados para el aislamiento de las bacterias termorresistentes

Los relaves de Taxco contienen sulfuros minerales que producen lixiviados ricos en ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Talavera-Mendoza et al. 2016). El **cuadro I** muestra las propiedades químicas de los desechos mineros analizados en el presente estudio. De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, el pH del sustrato asociado a la rizosfera (Riz, pH = 3.5) y del sustrato reducido (Rd, pH = 1.6) fueron *fuertemente ácidos*, en tanto que el lixiviado fue *neutro* (Lxb, pH = 6.6). Estudios previos en este relave han descrito la misma heterogeneidad del pH en los residuos mineros que contiene (Corrales-Pérez y Romero 2013, Montero-Sánchez 2019).

La conductividad eléctrica (CE) en los relaves es alta en los puntos con menor pH debido a la abundancia de iones hidrógeno (H^+) y sulfato (SO_4^{2-}) (Tycholiz et al. 2016). La muestra de sustrato reducido (Rd) tuvo la mayor CE (1750 mS/m), similar a lo

reportado en desechos mineros con valores similares de pH y potencial redox (Eh) (Yurkevich et al. 2017).

Cuando los desechos mineros son generados, tienen una coloración gris-verdosa debido a que se encuentran químicamente reducidos o con una alta proporción de sulfuros (Romero et al. 2007). Posteriormente, los desechos empiezan a oxidarse por la humedad del ambiente (intemperismo químico) y, en consecuencia, se forman los lixiviados (Dold 2014). Los desechos mineros oxidados y los lixiviados se caracterizan por tener una coloración rojiza por la alta concentración del ion hierro (III) (Fe^{3+}) (Florence et al. 2016). Además del color rojo, los lixiviados pueden tener tonalidades entre azules y blancas debido a la presencia de precipitados minerales (Tycholiz et al. 2016), lo que podría explicar el pH neutro del lixiviado blanquecino.

Cuantificación de las bacterias termorresistentes

Las condiciones extremas de los desechos mineros no impiden el establecimiento y desarrollo bacterianos. Estudios de metagenómica han descrito diversos grupos bacterianos que habitan en desechos mineros, como Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicute, Nitrospira y Proteobacteria (Teng et al. 2017, Munyai et al. 2021, Sajjad et al. 2024). En estos grupos se encuentran bacterias extremófilas, como acidófilas oxidantes de Fe y S (Edwards et al. 2000, Falagán y Johnson 2016), halófilas (Opara et al. 2023, Huynh et al. 2024), metalófilas (Fashola et al. 2020) y termófilas (Rouchalová et al. 2024). Para aprovechar el potencial adaptativo y biotecnológico de la diversidad bacteriana establecida en los desechos mineros, las bacterias deben ser cultivadas para su estudio en laboratorio (Fashola et al. 2020, Maureira et al. 2024, Parades-Aguilar et al. 2024).

Investigaciones previas han descrito las características fenotípicas, las propiedades ecológicas y el potencial de acumulación de metales pesados de bacterias aisladas de “El Fraile” (Toribio-Jiménez et al. 2014, Herrera-Quiterio et al. 2020, Santana-

CUADRO I. PROPIEDADES QUÍMICAS DE LOS DESECHOS MINEROS RECOLECTADOS DEL RELAVE “EL FRAILE”.

	Punto 1. Sustrato oxidado de rizosfera	Punto 2. Sustrato reducido con sales	Punto 3. Lixiviado blanquecino
pH	3.5	1.6	6.6
Conductividad eléctrica (mS/m)	260	1,750	200
Potencial redox (mV)	411	508	334

Flores et al. 2020, Toledo-Hernández et al. 2023). Estos estudios no reportaron en UFC la abundancia bacteriana que fue aislada. En el presente estudio, la muestra del sustrato asociado a rizosfera (Riz) tuvo la mayor abundancia de células viables (80 000 UFC/g), seguida de la muestra de lixiviado (Lxb: 4,232 UFC/mL) y el sustrato reducido (Rd: 1667 UFC/g). Generalmente, la abundancia bacteriana en desechos mineros se encuentra en 10^2 a 10^6 UFC (Diaby et al. 2007, Zhang et al. 2007, Abrosimova et al. 2023). Por lo anterior, las UFC de las bacterias termorresistentes aisladas de “El Fraile” se encuentran dentro de lo reportado en otros sitios mineros.

El sistema radicular de las plantas genera condiciones que permiten el establecimiento de una mayor diversidad bacteriana (Pantigoso et al. 2022). La presencia de vegetación en relaves mineros es importante para su biorremediación (Huang et al. 2012, Pérez et al. 2021). Gómez-Bernal et al. (2010) publicaron un listado de plantas que colonizan al relave “El Fraile”, lo que fue considerado como una evidencia de sucesión ecológica. La vegetación asociada a relaves mineros disminuye la toxicidad de los desechos al absorber los metales/metaloideos que contienen e incrementar la disponibilidad de nutrientes, lo que aumenta la abundancia bacteriana (Dhal y Sar 2014, Salas-Luévano et al. 2017, Cruzado-Tafur et al. 2021). Lo anterior explica por qué la mayor abundancia bacteriana fue cuantificada en la muestra de sustrato asociado a la rizosfera (Riz, 80 000 UFC / g).

Morfología colonial de las bacterias termorresistentes

Las características fenotípicas de la colonia bacteriana permiten hacer una clasificación rápida de la diversidad cultivable (Shapiro 1995, Martínez-Calvo et al. 2022). De acuerdo con las propiedades fenotípicas de las colonias bacterianas termorresistentes de “El Fraile”, el lixiviado (Lxb) tuvo la mayor diversidad de morfotipos (18), en tanto que el sustrato asociado a rizosfera (Rz) y el sustrato con precipitación de sales (Rd) tuvieron seis y cinco morfotipos, respectivamente (**Fig. 2**). Además, se observó que la diversidad de morfotipos no está correlacionada con la abundancia bacteriana. Los lixiviados (Lxb) tuvieron la mayor diversidad de morfotipos (18) pero una abundancia celular baja (4232 UFC/mL). Estos resultados contrastan con lo reportado anteriormente en los desechos de “El Fraile” porque los lixiviados han tenido la menor diversidad de morfotipos bacterianos (Toribio-Jiménez et al. 2014, Herrera-Quiterio et al. 2020).

Podría considerarse que el pH del lixiviado influyó en el incremento de la diversidad de morfotipos bacterianos. En este estudio, el lixiviado (Lxb) tuvo un pH de 6.6 (neutro, NOM-021-SEMARNAT-2000), anteriormente se habían reportado ≤ 5.5 en lixiviados del mismo relave (Santana-Flores et al. 2020). Sin embargo, en lixiviados con mayor acidez (pH = 2.92) se reportó un número similar de morfotipos bacterianos a los descritos en el presente estudio (Auld et al. 2013).

Debido a que la morfología colonial está correlacionada con la especie bacteriana (Oleskin et al. 2000, Cho et al. 2007), se podría considerar que el lixiviado analizado contiene un mayor número de presuntivas especies, sin embargo, estos resultados deben ser confirmados con su identificación genética.

Características celulares de las bacterias termorresistentes

La morfología celular en bacterias tiene tres formas básicas (coco, bacilo y espiral) que son utilizadas para su descripción y clasificación (Badieyan et al. 2018). En el presente estudio, el 76 % de los aislados bacterianos termorresistentes son células con forma de bacilo, 14 % son estreptobacilos y 10 % son cocos.

De acuerdo con las propiedades de su pared celular, se ha observado una dominancia de bacterias grampositivas en relaves mineros (Ndeddy-Aka y Babalola 2017, Sánchez-Castro et al. 2017, Fashola et al. 2020). En el presente estudio, el 72% fueron grampositivas y el 28 % fueron gramnegativas (**Fig. 2**). En el sustrato asociado a la rizosfera (Riz) y en el lixiviado (Lxb) hubo 50 % de bacterias grampositivas y gramnegativas, respectivamente, mientras que en el sustrato reducido hubo una dominancia de bacterias grampositivas (80 %). En muestras de sustrato y lixiviado de “El Fraile”, Toribio-Jiménez et al. (2014) reportaron que solo fueron aisladas bacterias gramnegativas con forma de bacilo. Posteriormente, en este mismo relave, se reportó la misma heterogeneidad celular y la dominancia de bacterias grampositivas descrita en el presente estudio (Herrera-Quiterio et al. 2020, Santana-Flores et al. 2020).

En desechos mineros es común observar cambios en la composición de las comunidades bacterianas debido a la fluctuación temporal de sus propiedades químicas y de los factores de estrés (Liu et al. 2014, Wu et al. 2022). Lo anterior explicaría los cambios en las propiedades celulares de las bacterias que habitan los desechos mineros de “El Fraile”. Además, las bacterias grampositivas y gramnegativas tienen diferentes ventajas adaptativas ante el estrés generado por los metales pesados y metaloideos de los

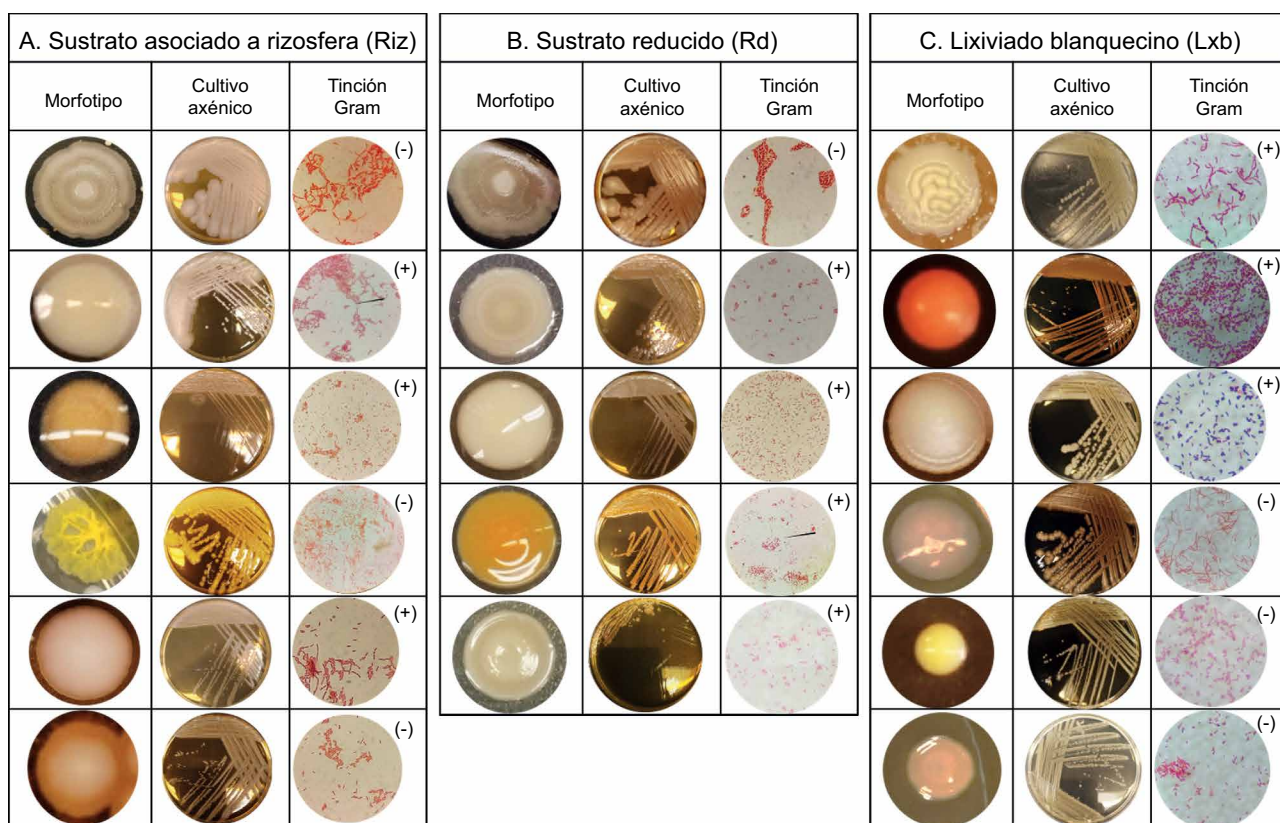


Fig. 2. Morfotipos coloniales y características celulares de las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros. Morfotipos descritos en las bacterias aisladas de: (a) sustrato asociado a la rizosfera (Riz), (b) sustrato reducido (Rd) y (c) lixiviado blanquecino (Lxb). Purificación de los aislados bacterianos para la producción de cultivos axénicos. Tinción de Gram y morfología celular: bacterias grampositivas (+) en color azul/púrpura y bacterias gramnegativas (-) en color rosa/rojo.

desechos mineros (Abou-Shanab et al. 2007, Zhang et al. 2007). Esta correlación debe ser analizada con mayor detenimiento en estudios posteriores.

Propiedades ecológicas de las bacterias termorresistentes

El desempeño ecológico de un individuo o población depende de su capacidad adaptativa en respuesta a condiciones de estrés y cambios ambientales (Sato y Kaneko 2020). Las bacterias de vida libre tienen la capacidad metabólica de aprovechar diferentes formas de nutrientes, lo que les permite establecer diferentes interacciones ecológicas (Bajic y Sánchez 2020, Fahimipour y Gross 2020). Por lo tanto, estrategias ecológicas vinculadas con su potencial metabólico y caracteres funcionales ayudan a comprender cómo los microorganismos pueden adaptarse a condiciones extremas y fluctuantes (Moreno y Rojo 2023, Treseder 2023).

La descomposición química de relaves sulfurados con concentraciones elevadas de Fe produce niveles

elevados de estrés oxidativo (Li et al. 2016, Gabriel et al. 2020). La catalasa es una enzima que protege a la célula bacteriana del estrés oxidativo (Yuan et al. 2021). Bacterias con diferentes propiedades morfológicas y celulares utilizan esta estrategia de protección cuando habitan desechos mineros oxidados (Boughattas et al. 2017, Gu et al. 2019). En el presente estudio, todas las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros de “El Fraile” fueron positivas a la catalasa. Estos resultados coinciden con lo reportado en otras bacterias aisladas del mismo relave (Toribio-Jiménez et al. 2014).

La citocromo *c* oxidasa es una enzima que finaliza la cadena respiratoria en animales, bacterias y plantas (Hederstedt 2022). De las bacterias termorresistentes que fueron analizadas en este estudio, solo dos fueron positivas a la prueba de oxidasa. El 27 % de las bacterias analizadas por Toribio-Hernández et al. (2014) en “El Fraile” fueron positivas a la oxidasa. Al parecer, en este relave, la abundancia de bacterias con esta enzima ha ido disminuyendo con el paso del

tiempo. Las bacterias negativas a la oxidasa pueden tener proteínas homólogas a esta enzima (Dunn 2023). Las bacterias aisladas de desechos mineros utilizan estas oxidasas para metabolizar los metales/metaloides que contienen (Miranda-Carrasco et al. 2018, Wu et al. 2018). De lo anterior surge el interés de analizar si las bacterias termorresistentes aisladas de “El Fraile” presentan oxidasas que participan en el metabolismo de metales/metaloides.

El manitol es una fuente de carbono utilizada por los microorganismos (Nguyen et al. 2019). La metabolización del manitol es variable en bacterias extremófilas (Zhang et al. 2021). De hecho, es más común que sea sintetizado como un sistema de protección ante estrés osmótico y oxidativo (Wisselink et al. 2002). En este estudio, el 14 % de las bacterias termorresistentes metabolizan manitol (**Fig. 3a**). La limitación en el aprovechamiento del manitol puede deberse a que lo sintetizan para su protección. La oxidación de los desechos mineros no impide la precipitación de sales (Šimonovičová et al. 2017, Lin et al. 2021). En relaves adyacentes a “El Fraile” se ha observado la precipitación de sales similares a las recolectadas en el presente estudio (Pi-Puig et al. 2020), por lo que estas bacterias termorresistentes

podrían tener propiedades acidófilas/halófilas por la síntesis de manitol (Corbett y Watkin 2023).

La prueba de citrato describe la capacidad bacteriana de crecer aeróbicamente con citrato como fuente de carbono y, en consecuencia, aumentar el pH del medio (Krieg y Padgett 2011). Ninguna de las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos de “El Fraile” pudo metabolizar el citrato. Los reportes sobre la metabolización de citrato en bacterias extremófilas son limitados. Especies del género *Acidiphilum* aisladas de lixiviados prefieren citrato sobre otras fuentes de carbono (Wichlacz et al. 1986). Sin embargo, otros acidófilos no pueden metabolizarlo (*Bacillus acidocaldarius*; Oshima et al. 1977). *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria abundante en relaves mineros sulfurados y su capacidad oxidativa está siendo aprovechada en procesos de biolixiviación (Rouchalová et al. 2024). Experimentalmente se ha observado que cuando el medio de crecimiento de *A. ferrooxidans* contiene citrato, el pH se incrementa y su crecimiento es inhibido (Li et al. 2014), lo que sugiere que las bacterias termorresistentes aisladas de “El Fraile” son acidófilas.

El biofilm es una estrategia adaptativa que protege a las bacterias de agentes antimicrobianos, metales pesados, cambios osmóticos, deshidratación y radiación (Lianou y Koutsoumanis 2012). Además, el biofilm representa una alternativa eficiente para la eliminación de contaminantes a través de procesos de absorción, inmovilización y degradación (Mishra et al. 2022). Hidrocarburos, metales y pesticidas pueden ser transformados por la actividad metabólica de bacterias formadoras de biofilm (Biswal y Malik 2022). Generalmente, las bacterias establecidas en desechos mineros son productoras de biofilm (Golby et al. 2014, Barral-Fraga et al. 2018). A pesar de su importancia ecológica, solo el 34 % de las bacterias termorresistentes de “El Fraile” son productoras de biofilm (**Fig. 3b**). Por la ubicación del biofilm en la microplaca, las bacterias termorresistentes no tienen movimiento (O’Toole 2011). García-Gutiérrez (2022) reporta 100 % de producción de biofilm en bacterias oxidantes del azufre aisladas de un relave cercano a “El Fraile”. En bacterias aisladas de desechos mineros en Serbia, la producción del biofilm fue variable y dependió del medio de cultivo utilizado para desarrollar la prueba (Radojević et al. 2024). Por lo anterior, deberá evaluarse la producción de biofilm en las bacterias termorresistentes de “El Fraile” en otras condiciones experimentales.

Las bacterias tienen la capacidad de solubilizar formas inorgánicas de fósforo para su aprovecha-

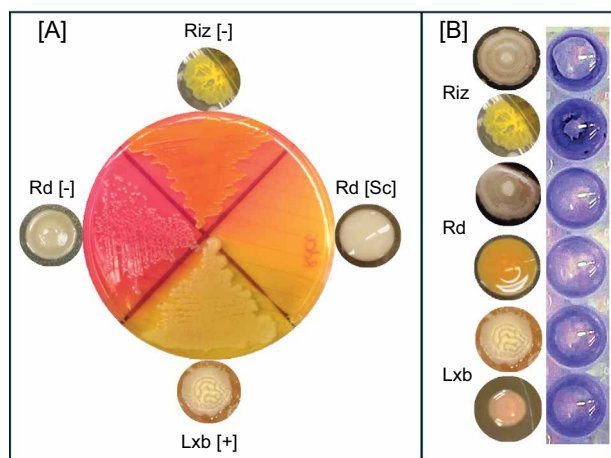


Fig. 3. Propiedades ecológicas de las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros. (a) Fermentación de manitol: prueba positiva en color amarillo (bacteria aislada de lixiviado, Lxb), pruebas negativas en color rojo de bacterias aisladas de sustrato asociado a la rizosfera (Riz) y de sustrato reducido (Rd) y prueba sin crecimiento (SC) (bacteria aislada de sustrato reducido, Rd). (b) Formación de biofilm en aislados procedentes de los tres tipos de muestra. La formación de biofilm ocurrió en la base de los pozos, por lo que son bacterias sin movimiento. La cepa de color amarillo presentó una formación alta de biofilm, mientras que el resto de las cepas tiene producción intermedia.

miento celular (Wang et al. 2023). Esta capacidad de solubilización de fósforo es común en diferentes grupos bacterianos (Kalayu 2019). La prueba de solubilización de fósforo en medio Pikovskaya se evalúa con la formación de un halo en la periferia del área del crecimiento de la colonia bacteriana (Khan et al. 2013). En este estudio, el 69 % de las bacterias termorresistentes aisladas de “El Fraile” creció en el medio Pikovskaya, pero no se observó la formación del halo de solubilización. Solo se describieron cambios significativos en la morfología de las colonias (Fig. 4). Si las bacterias pierden la capacidad de solubilizar fósforo, no habría formación de biomasa (Tariq et al. 2022). Es posible que la actividad de la fosfatasa sea inhibida por la secreción de ácidos orgánicos, los cuales afectan la morfología de las colonias bacterianas (Tarigan et al. 2023). En este sentido, las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros de “El Fraile” tienen la capacidad de disminuir el pH del medio, por lo que podrían

estar produciendo ácidos orgánicos que inhibirían la actividad de la fosfatasa y generarían los cambios morfológicos observados en sus colonias.

Análisis jerárquico de similitud de las bacterias termorresistentes

Considerando los resultados obtenidos a partir de la caracterización fenotípica y las propiedades ecológicas, se realizó un análisis jerárquico de similitud entre las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros de “El Fraile” (Fig. 5). El dendrograma mostró la formación de cinco clados con aislados bacterianos que comparten las mismas propiedades fenotípicas (resaltados en color). De los cinco clados, dos están conformados por bacterias que fueron aisladas de diferentes tipos de muestra: el clado azul tiene dos aislados de sustrato asociado a la rizosfera y un aislado de lixiviado y el clado púrpura tiene tres aislados de sustrato reducido y dos aislados de lixiviado. Las bacterias de estos dos clados tienen

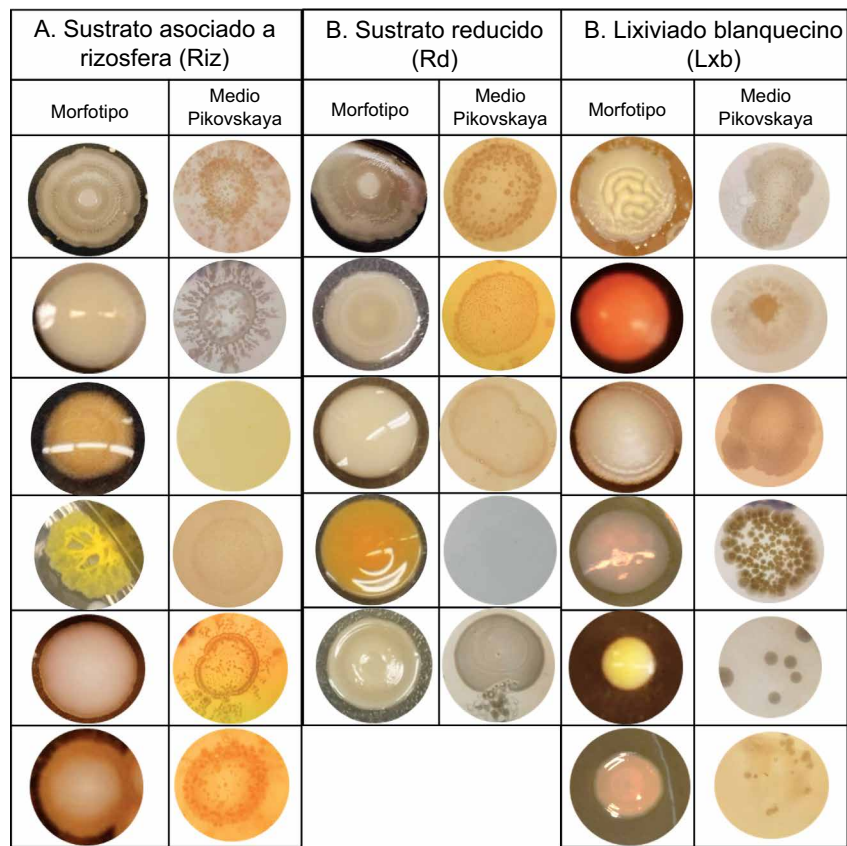


Fig. 4. Prueba de solubilización de fósforo inorgánico. Las bacterias termorresistentes no generaron el halo transparente que indica la solubilidad de fósforo, pero se generaron cambios en la morfología y propiedades fenotípicas de sus colonias.

la misma morfología y composición celular (bacilos grampositivos) y las mismas propiedades ecológicas. Todas las colonias bacterianas del clado azul tienen una pigmentación rosa clara y una producción intermedia de biofilm. Los aislados bacterianos del clado púrpura no producen biofilm y sus colonias tienen pigmentación blanca.

Los tres clados restantes se caracterizan por tener bacterias aisladas del mismo tipo de muestra: dos clados conformados por bacterias aisladas de lixiviados (verde y rosa) y un clado formado por bacterias aisladas de sustrato asociado a la rizosfera (amarillo claro). Los aislados bacterianos del clado verde son bacilos grampositivos que no metabolizan manitol, no crecieron en medio Pikovskaya y no producen biofilm. La pigmentación de las colonias de este clado es diferente en cada bacteria. Los dos aislados bacterianos del clado rosa son estreptobacilos grampositivos que metabolizan manitol y crecen en medio Pikovskaya, pero no producen biofilm. La pigmentación de la colonia de ambos aislados es blanca con forma irregular y pliegues en la parte superior. El clado amarillo claro tiene dos bacterias aisladas del sustrato de rizosfera que no metabolizan manitol, crecen en medio Pikovskaya y tuvieron una producción intermedia de biofilm. Estos aislados bacterianos tienen diferente morfología y pigmentación colonial.

Existen tres clados formados por dos aislados bacterianos (líneas continuas en color en la **Fig. 5**). El clado con la línea naranja tiene un aislado obtenido de cada tipo de muestra de sustrato. Ambos son cocos que se diferencian en que uno produce biofilm y sus colonias son de diferente color (rosa y naranja). Los dos clados restantes (líneas en negro y rojo) tienen en común una bacteria aislada de lixiviado, en tanto que la segunda bacteria proviene de una muestra diferente de sustrato. Ambos son bacilos gramnegativos, pero el clado con línea negra tiene un aislado bacteriano positivo a oxidasa (LxbYm). El clado con línea roja se diferencia en que es un aislado que no produce biofilm (LxbAHC). Las morfologías y colores de estos clados son diferentes en cada aislado bacteriano.

Por su ubicación, el aislado LxbBe es el ancestro del clado de color verde. Comparten las mismas propiedades fenotípicas, pero estas bacterias tienen una formación intermedia de biofilm y todas provienen del lixiviado. El aislado LxbACh es gramnegativo, no produce biofilm y es positivo a oxidasa. El aislado LxbAO es el ancestro del clado con línea de color naranja. La diferencia sobresaliente es que estas bacterias son estreptobacilos y las otras tienen forma

de cocos. El aislado LxbGM comparte las mismas propiedades fenotípicas, ecológicas y pigmentación colonial del clado púrpura, pero el aislado LxbGM metaboliza manitol y su colonia tiene superficie lisa y convexa, mientras que las colonias del clado púrpura tienen pliegues en la superficie. El aislado LxbNaR es el ancestro del clado púrpura y de la bacteria LxbGM, la cual tiene forma celular de coco y su colonia es circular, convexa y con pigmentación naranja.

El aislado LxbBC es una de las dos bacterias termorresistentes que metabolizan manitol y es la única que tiene una producción alta de biofilm en comparación con los clados adyacentes (azul, amarillo claro y púrpura). Finalmente, sobresale el aislado LxbSC porque es el ancestro común de todas las bacterias y clados mencionados anteriormente. La colonia de este aislado tiene una pigmentación rosa claro y en su interior se observan gránulos blancos, tiene forma de estreptobacilo, crece en medio Pikovskaya y produce biofilm.

El método de agrupación jerárquica de propiedades fenotípicas es una herramienta que sigue siendo utilizada para establecer relaciones de similitud entre individuos (de Vriendt et al. 2016). A pesar de que el método logra identificar diferencias significativas que establecerían una relación taxonómica, estos resultados deben ser complementados con la identificación genética a través del análisis del gen de ARNr 16S (Hou et al. 2009, Urbanavičiūtė et al. 2023). Los resultados obtenidos con las bacterias termorresistentes aisladas de los desechos mineros de “El Fraile” mostraron que su agrupamiento está determinado por sus propiedades ecológicas, mientras que el tipo de muestra influye en la morfología y pigmentación colonial. Por esta razón, el agrupamiento jerárquico a partir de características fenotípicas y propiedades ecológicas es útil para establecer relaciones funcionales entre diferentes aislados sin importar su identidad genética (Mahdhi et al. 2008, Belhadj et al. 2014).

El impacto antrópico produce diversas presiones selectivas, las cuales establecen una directriz que puede ser utilizada para hacer predicciones sobre las respuestas adaptativas en bacterias (Lennon et al. 2024). En el presente estudio, las bacterias termorresistentes mostraron respuestas adaptativas a nivel fenotípico y ecológico que describen parte de los mecanismos que utilizan para tolerar las condiciones de estrés de los desechos mineros. Es importante evaluar la adecuación biológica de las bacterias termorresistentes para determinar si el relave minero está produciendo una evolución fenotípica/ecológica influenciada por las condiciones fluctuantes y de estrés que presenta (Sæther y Engen 2015, Sato y Kaneko 2020).

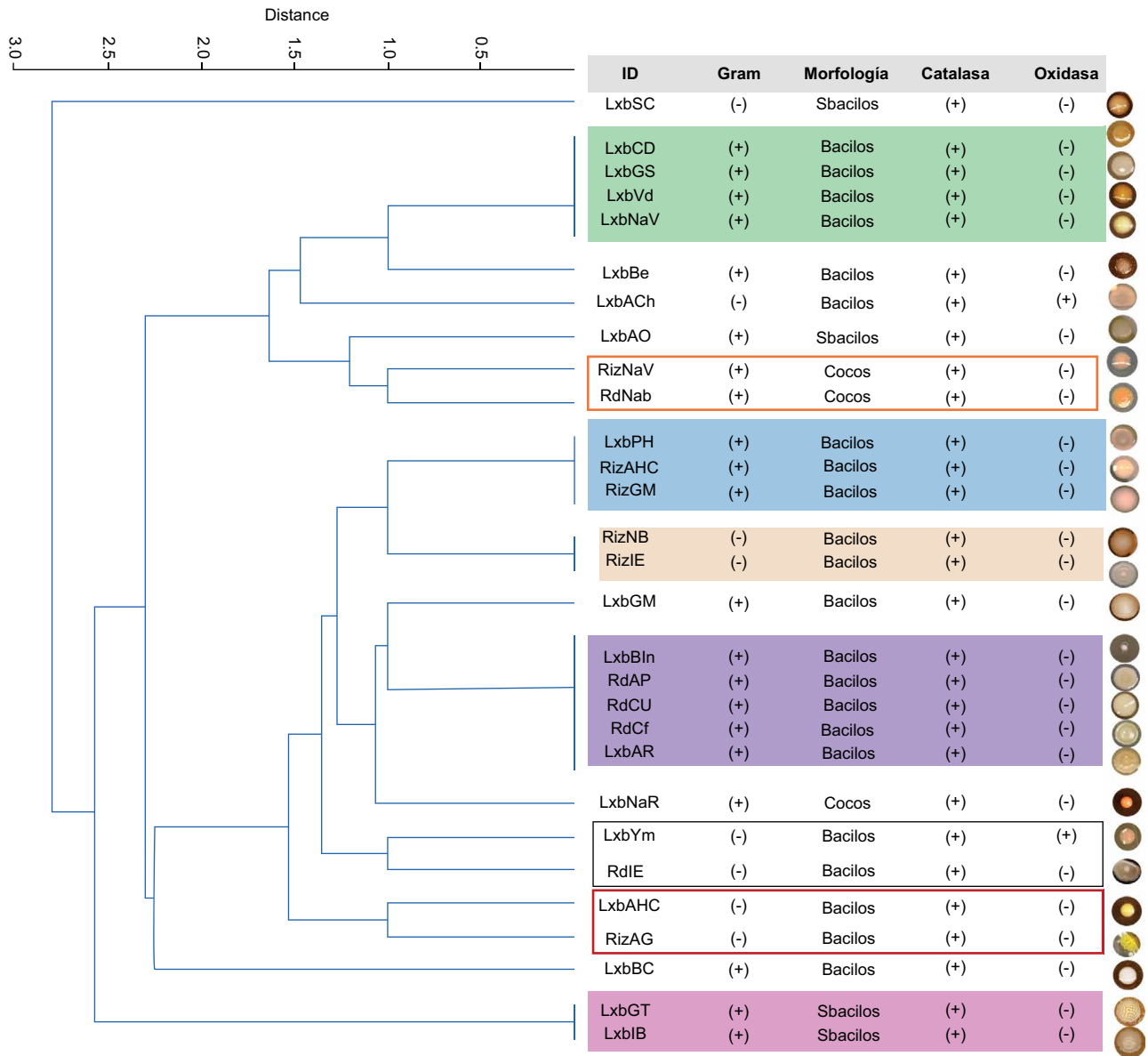


Fig. 5. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con la similitud en las características fenotípicas y propiedades ecológicas de bacterianas termorresistentes aisladas de los desechos mineros de “El Fraile”. (Lxb: lixiviado blanquecino, Riz: sustrato asociado a la rizosfera, Rd: sustrato reducido, Sbacilos: estreptobacilos, +: prueba positiva, -: prueba negativa.)

CONCLUSIÓN

La oxidación de los relaves mineros induce la formación de condiciones extremas en los desechos que contienen. Los desechos mineros del relave “El Fraile” siguen teniendo el potencial de generar condiciones de acidez extrema, por lo que se esperaría una dominancia de bacterias acidófilas. En el presente estudio, se logró el aislamiento de bacterias con la capacidad de tolerar un choque térmico superior a la temperatura media de crecimiento. La abundancia y diversidad de

las bacterias termorresistentes fueron independientes del tipo de muestra. Los valores cuantificados están dentro de lo descrito en otros relaves mineros. El sustrato asociado a la rizosfera fue la muestra con la mayor abundancia y, contrario a lo reportado en estudios previos, el lixiviado tuvo la mayor diversidad. Lo anterior refleja la importancia de la sucesión ecológica para los relaves mineros. Las muestras de sustrato tienen una distribución equitativa respecto a la composición de la pared celular de las bacterias termorresistentes, mientras que los lixiviados mostraron una

dominancia de grampositivas. Algunas ventajas están vinculadas con la composición de la pared celular. Esta correlación debe ser analizada para profundizar en la adaptabilidad de las bacterias a los desechos mineros. Ecológicamente, las bacterias termorresistentes mostraron evidencias de ser acidófilas y de tener protección ante el estrés oxidativo. Además, estas bacterias tienen la capacidad de formar biofilm, el cual les ayudaría a protegerse de las condiciones adversas generadas durante la descomposición del relave. A pesar de mostrar crecimiento en el medio Pikovskaya, no se pudo demostrar que las bacterias termorresistentes pudieran solubilizar fósforo. Es importante analizar si tienen la capacidad de solubilizar otras formas inorgánicas que se encuentran en mayor abundancia en el relave, como los metales/metaloideos. A partir de las características fenotípicas y las propiedades ecológicas se establecieron correlaciones de similitud entre las bacterias termorresistentes. Sin embargo, es fundamental realizar la identificación genética de estas bacterias para confirmar si esta correlación se vincula con su filogenia. Finalmente, se deben analizar otras propiedades genéticas y metabólicas para establecer si estas bacterias son poliextremófilas, debido a que se desenvuelven en condiciones de estrés que se manifiestan simultáneamente.

AGRADECIMIENTOS

A la carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por el apoyo brindado para realizar el trabajo de campo. Esta investigación es producto del servicio social de Gabriela Alejandra Velasco López en el programa Ecología de los microorganismos involucrados en los ciclos biogeoquímicos (clave 2023-12/48-4104) y del proyecto FESZ-RP-16/111-63. Este trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Estequiometría y Microbiología Ambiental de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), FES-Zaragoza, UNAM.

REFERENCIAS

- Abou-Shanab R.A., van Berkum P. y Angle J.S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68 (2), 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.051>
- Abrosimova N., Bortnikova S., Edelev A., Chernukhin V., Reutsky A., Abrosimov N. y Gundyrev I. (2023). Geochemical and microbiological composition of soils and tailings surrounding the Komsomolsk tailings, Kemerovo region, Russia. *Bacteria* 2 (3), 116-128. <https://doi.org/10.3390/bacteria2030009>
- Ando N., Barquera B., Bartlett D.H., Boyd E., Burnim A.A., Byer A.S., Colman D., Gillilan R.E., Gruebele M., Makhatazde G., Royer C.A., Shock E., Wand A.J. y Watkins M.B. (2021). The molecular basis for life in extreme environments. *Annual Review of Biophysics* 50, 343-372. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-100120-072804>
- Auld R.R., Myre M., Mykytczuk N.C., Leduc L.G. y Merritt T.J. (2013). Characterization of the microbial acid mine drainage microbial community using culturing and direct sequencing techniques. *Journal of Microbiological Methods* 93 (2), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.023>
- Azizi M., Faz A., Zornoza R., Martínez-Martínez S., Shahrokh V. y Acosta J.A. (2022). Environmental pollution and depth distribution of metal(loid)s and rare earth elements in mine tailing. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 10 (3), 107526. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107526>
- Badieyan S., Dilmaghani-Marand A., Hajipour M.J., Ameri A., Razzaghi M.R., Rafii-Tabar H., Mahmoudi M. y Sasanpour P. (2018). Detection and discrimination of bacterial colonies with Mueller matrix imaging. *Scientific Reports* 8 (1), 10815. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29059-5>
- Bajic D. y Sánchez A. (2020). The ecology and evolution of microbial metabolic strategies. *Current Opinion in Biotechnology* 62, 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.003>
- Baker B.J. y Banfield J.F. (2003). Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology* 44 (2), 139-152. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00028-X)
- Barral-Fraga L., Martiñá-Prieto D., Barral M.T., Morin S. y Guasch H. (2018). Mutual interaction between arsenic and biofilm in a mining impacted river. *Science of The Total Environment* 636, 985-998. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.287>
- Bedaprana R., Chakraborty R., Choudhury N., Ghosh A., Chakraborty R., Ghosh J. y Mitra A.K. (2023). Metagenomic analysis of acid mine drainage, presence of acidometallophiles, and their possible role in biomining. En: *Biohydrometallurgical processes: Metal recovery and remediation* (Dey S., Ed.). CRC Press, Boca Raton, EUA, 1-16. <https://doi.org/10.1201/9781003451457>
- Belhadj H., Harzallah D., Bouamra D., Khenouf S., Dahamna S. y Ghabbane M. (2014). Phenotypic and

- genotypic characterization of some lactic acid bacteria isolated from bee pollen: A preliminary study. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 33 (1), 11-23. <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.11>
- Biswal T. y Malik J.A. (2022). Chapter 11 - Role of biofilms in bioremediation. En: *Microbes and microbial biotechnology for green remediation* (Malik J.A., Ed.). Elsevier, Ámsterdam, Holanda, 205-225. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-02986-5>
- Bonan G.B. y Doney S.C. (2018). Climate, ecosystems, and planetary futures: The challenge to predict life in Earth system models. *Science* 359, eaam8328. <https://doi.org/10.1126/science.aam8328>
- Boughattas I., Hattab S., Boussetta H., Banni M. y Navarro E. (2017). Impact of heavy metal contamination on oxidative stress of *Eisenia andrei* and bacterial community structure in Tunisian mine soil. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 18083-18095. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9449-8>
- Breakwell D., Woolverton C., MacDonald B., Smith K. y Robison R. (2007). Colony morphology protocol. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Colony-Morphology-Protocol/10/03/2025>
- Cavicchioli R. (2002). Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology* 2 (3), 281-292. <https://doi.org/10.1089/153110702762027862>
- Carré L., Zaccai G., Delfosse X., Girard E. y Franzetti B. (2022). Relevance of Earth-bound extremophiles in the search for extraterrestrial life. *Astrobiology* 22 (3), 322-367. <https://doi.org/10.1089/ast.2021.0033>
- Cedergreen N., Nørhøve N.J., Nielsen K., Johansson H.K., Marcussen H., Svendsen C. y Spurgeon D.J. (2013). Low temperatures enhance the toxicity of copper and cadmium to *Enchytraeus crypticus* through different mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (10), 2274-2283. <https://doi.org/10.1002/etc.2274>
- Chia X.K., Hadibarata T., Jusoh M.N.H., Sutiknowati L.I., Tan I.S. y Foo H.Ch.Y. (2024). Role of extremophiles in biodegradation of emerging pollutants. *Topics in Catalysis* (2024). <https://doi.org/10.1007/s11244-024-01919-7>
- Cho H., Jönsson H., Campbell K., Melke P., Williams J.W., Jedynek B., Stevens A.M., Groisman A. y Levchenko A. (2007). Self-organization in high-density bacterial colonies: Efficient crowd control. *PLoS Biology* 5 (11), e302. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050302>
- Coker J.A. (2016). Extremophiles and biotechnology: Current uses and prospects. *F1000 Research* 5 (F1000 Faculty Rev), 396. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7432.1>
- Corbett M.K. y Watkin E.L.J. (2023). Bioprospecting for and the applications of halophilic acidophiles in bioleaching operations. *Microbiology Australia* 44 (1), 45-48. <https://doi.org/10.1071/MA23011>
- Corrales-Pérez D. y Romero M.F. (2013). Evaluación de la peligrosidad de jales de zonas mineras de Nicaragua y México y alternativas de solución. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 65 (3), 427-446.
- Cowan D.A., Ramond J.B., Makhalyane T.P. y De Maayer P. (2015). Metagenomics of extreme environments. *Current Opinion in Microbiology* 25, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.005>
- Cowan D.A., Albers S.V., Antranikian G., Atomi H., Averhoff B., Basen M., Driessen A.J. M., Jebbar M., Kelman Z., Kerou M., Littlechild J., Müller V., Schönheit P., Siebers B. y Vorgias K. (2024). Extremophiles in a changing world. *Extremophiles* 28 (2), 26. <https://doi.org/10.1007/s00792-024-01341-7>
- Cruzado-Tafur E., Bierla K., Torró L. y Szpunar J. (2021). Accumulation of As, Ag, Cd, Cu, Pb, and Zn by native plants growing in soils contaminated by mining environmental liabilities in the Peruvian Andes. *Plants* 10 (2), 241. <https://doi.org/10.3390/plants10020241>
- De Vriendt L., Lemay M.A., Jean M., Renaut S., Pellerin S., Joly S., Belzile F. y Poulin M. (2016). Population isolation shapes plant genetics, phenotype and germination in naturally patchy ecosystems. *Journal of Plant Ecology* 10 (4), 649-659. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtw071>
- Dhal P.K. y Sar P. (2014). Microbial communities in uranium mine tailings and mine water sediment from Jaduguda U mine, India: A culture independent analysis. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 49 (6), 694-709. <https://doi.org/10.1080/10934529.2014.865458>
- Diaby N., Dold B., Pfeifer H.R., Holliger C., Johnson D.B. y Hallberg K.B. (2007). Microbial communities in a porphyry copper tailings impoundment and their impact on the geochemical dynamics of the mine waste. *Environmental Microbiology* 9 (2), 298-307. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01138.x>
- Dold B. (2014). Evolution of acid mine drainage formation in sulphidic mine tailings. *Minerals* 4 (3), 621-641. <https://doi.org/10.3390/min4030621>
- Dótor-Almazán A., Armienta-Hernández M.A., Talavera-Mendoza O. y Ruiz J. (2017). Geochemical behavior of Cu and sulfur isotopes in the tropical mining region of Taxco, Guerrero (southern Mexico). *Chemical Geology* 471 (5), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2017.09.005>
- Dunn A.K. (2023). Alternative oxidase in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1864 (1), 148929. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148929>

- Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M. y Banfield J.F. (2000). An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287 (5459), 1796-1799. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1796>
- Elberling B., Schippers A. y Sand W. (2000). Bacterial and chemical oxidation of pyritic mine tailings at low temperatures. *Journal of Contaminant Hydrology* 41, 225-238. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(99\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(99)00085-6)
- Fahimipour A.K. y Gross T. (2020). Mapping the bacterial metabolic niche space. *Nature Communications* 11, 4887. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18695-z>
- Falagán C. y Johnson D.B. (2016). *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (1), 206-211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000698>
- Fashola M.O., Ngole-Jeme, V.M. y Babalola O.O. (2020). Heavy metal immobilization potential of indigenous bacteria isolated from gold mine tailings. *International Journal of Environmental Research* 14, 71-86. <https://doi.org/10.1007/s41742-019-00240-6>
- Florence K., Sapsford D.J., Johnson D.B., Kay C.M. y Wolkersdorfer C. (2016). Iron-mineral accretion from acid mine drainage and its application in passive treatment. *Environmental Technology* 37 (11), 1428-1440. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1118558>
- Gabriel F.Â., Hauser-Davis R.A., Soares L., Mazzuco A.C.A., Rocha R.C.C., Saint Pierre T.D., Saggiaro E., Correia F.V., Ferreira T.O. y Bernardino A.F. (2020). Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *PeerJ* 8, e10266. <https://doi.org/10.7717/peerj.10266>
- García-Balboa C., Baselga-Cervera B., García-Sánchez A., Igual J.M., López-Rodas V. y Costas E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology* 144-145, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.003>
- Gallo G., Puopolo R., Carbonaro M., Maresca E. y Fiorentino G. (2021). Extremophiles, a nifty tool to face environmental pollution: From exploitation of metabolism to genome engineering. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (10), 5228. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105228>
- García-Gutiérrez D. (2022). Aislamiento e identificación de bacterias oxidantes del azufre en el jal minero "La Concha" en Taxco de Alarcón, Guerrero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, 150 pp.
- Giovanella P., Vieira G.A.L., Ramos Otero I.V., Pais Pellizzer E., de Jesus Fontes B. y Sette L.D. (2020). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *Journal of Hazardous Materials* 382, 121024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>
- Golby S., Ceri H., Marques L.L.R. y Turner R. (2014). Mixed-species biofilms cultured from an oil sand tailings pond can biomineralize metals. *Microbial Ecology* 68, 70-80. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0331-z>
- Gómez-Bernal J.M., Santana-Carillo J., Romero-Martin F., Armienta-Hernández M.A., Morton-Bermea O. y Ruiz-Huerta E. (2010). Plantas de sitios contaminados con desechos mineros en Taxco, Guerrero, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (87), 131-133.
- Gu J., Sunahara G., Duran R., Yao J., Cui Y., Tang C., Li H. y Mihucz V.G. (2019). Sb(III)-resistance mechanisms of a novel bacterium from non-ferrous metal tailings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 186, 109773. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109773>
- Häder D.P. y Barnes P.W. (2019). Comparing the impacts of climate change on the responses and linkages between terrestrial and aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment* 682, 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.024>
- Hallberg K.B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy* 104, 448-453. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2009.12.013>
- Hammer Ø., Harper D.A.T. y Ryan. P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1), 1-9.
- Hederstedt L. (2022). Diversity of cytochrome *c* oxidase assembly proteins in bacteria. *Microorganisms* 10 (5), 926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050926>
- Hedrich S. y Schippers A. (2021). Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic environment. *Current Issues in Molecular Biology* 40 (1), 25-48. <https://doi.org/10.21775/cimb.040.025>
- Helmuth B., Broitman B.R., Yamane L., Gilman S.E., Mach K., Mislan K.A. y Denny M.W. (2010). Organismal climatology: Analyzing environmental variability at scales relevant to physiological stress. *The Journal of Experimental Biology* 213 (6), 995-1003. <https://doi.org/10.1242/jeb.038463>
- Herrera-Quiterio A., Toledo-Hernández E., Aguirre-Noyola J.L., Romero Y., Ramos J., Palemón-Alberto F. y Toribio-Jiménez J. (2020). Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología* 52 (3), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.003>
- Hou B.C., Wang E.T., Li Y., Jia R.Z., Chen W.F., Man C.X., Sui X.H. y Chen W.X. (2009). Rhizobial resource

- associated with epidemic legumes in Tibet. *Microbial Ecology* 57 (1), 69-81. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9397-4>
- Hu L., Wu H., Zhang L., Zhang P. y Wen Q. (2016). Geotechnical properties of mine tailings. *Journal of Materials in Civil Engineering* 29 (2), 04016220-1-10. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)MT.1943-5533.0001736](https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0001736)
- Huang L., Baumgartl T. y Mulligan D. (2012). Is rhizosphere remediation sufficient for sustainable revegetation of mine tailings? *Annals of Botany* 110 (2), 223-238. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs115>
- Huynh D., Haferburg G., Bunk B., Kaschabek S.R, Sand W. y Schlömann M. (2024). *Alicyclobacillus* sp. SO9, a novel halophilic acidophilic iron-oxidizing bacterium isolated from a tailings-contaminated beach, and its effect on copper extraction from chalcopyrite in the presence of high chloride concentration. *Research in Microbiology* 175 (1-2), 104150. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104150>
- Johnson D.B. y Aguilera A. (2019). Extremophiles and acidic environments. En: *Encyclopedia of microbiology* (Schmidt T.M., Ed). Academic Press, Elsevier, Amsterdam, Holanda, 206-227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90687-3>
- Kalayu G. (2019). Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. *International Journal of Agronomy*, 4917256. <https://doi.org/10.1155/2019/4917256>
- Khan M.S., Ahmad E., Zaidi A. y Oves M. (2013). Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: Importance in crop production. En: *Bacteria in agrobiolgy: Crop productivity* (Maheshwari D., Saraf M. y Aeron A., Eds). Springer, Berlin, Alemania, 237-263. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_10
- Kossoff D., Dubbin W., Alfredsson M., Edwards S., Macklin M. y Hudson-Edwards K. (2014). Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Geochemistry* 51, 229-245. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.09.010>
- Krieg N.R. y Padgett P.J. (2011). 3. Phenotypic and physiological characterization methods. En: *Methods in microbiology* 38 (Rainey F. y Oren A., Ed.). Academic Press, Elsevier, Amsterdam, Holanda, 15-60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00003-6>
- Labonté-Raymond P.L., Pabst T., Bussière B. y Bresson E. (2020). Impact of climate change on extreme rainfall events and surface water management at mine waste storage facilities. *Journal of Hydrology* 590, 125383. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2020.125383>
- Lennon J.T., Abramoff R.Z., Allison S.D., Burckhardt R.M., DeAngelis K.M., Dunne J.P., Frey S.D., Friedlingstein P., Hawkes C.V., Hungate B.A., Khurana S., Kivlin S.N., Levine N.M., Manzoni S., Martiny A.C., Martiny J.B.H., Nguyen N.K., Rawat M., Talmy D., Todd-Brown K. y Zakem E.J. (2024). Priorities, opportunities, and challenges for integrating microorganisms into Earth system models for climate change prediction. *mBio* 15 (5), e0045524. <https://doi.org/10.1128/mbio.00455-24>
- Li X., Mercado R., Kernan T., West A.C. y Banta S. (2014). Addition of citrate to *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultures enables precipitate-free growth at elevated pH and reduces ferric inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 111 (10), 1940-1948. <https://doi.org/10.1002/bit.25268>
- Li Y., Sun Q., Zhan J., Yang Y. y Wang D. (2016). Vegetation successfully prevents oxidization of sulfide minerals in mine tailings. *Journal of Environmental Management* 177, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.026>
- Lin H., Jiang X., Li B., Dong Y. y Qian L. (2021). Soilless revegetation: An efficient means of improving physicochemical properties and reshaping microbial communities of high-salty gold mine tailings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 207, 111246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111246>
- Lin S.Q., Wang G.J., Liu W.L., Zhao B., Shen Y.M., Wang M.L. y Li X.S. (2022). Regional distribution and causes of global mine tailings dam failures. *Metals* 12 (6), 905. <https://doi.org/10.3390/met12060905>
- Lianou A. y Koutsoumanis K.P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 160 (2), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Lindsay M.B.J., Moncu M.C., Bai J.G., Jambo J.L., Ptace C.J. y Blowe D.W. (2015). Geochemical and mineralogical aspects of sulfide mine tailings. *Geochemistry* 57, 157-177. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.01.009>
- Liu J., Hua Z.S., Chen L.X., Kuang J.L., Li S.J., Shu W.S. y Huang L.N. (2014). Correlating microbial diversity patterns with geochemistry in an extreme and heterogeneous environment of mine tailings. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (12), 3677-3686. <https://doi.org/10.1128/AEM.00294-14>
- Lu X. y Wang H. (2012). Microbial oxidation of sulfide tailings and the environmental consequences. *Elements* 8 (2), 119-124. <https://doi.org/10.2113/gselements.8.2.119>
- MacWilliams M.P. (2009). Citrate test protocol. American Society of Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Citrate-Test-Protocol> 10/03/2025
- Madigan M.T., Bender K.S., Buckley D.H, Sattley W.M. y Stahl D.A. (2019). *Brock biology of microorganisms*. 15a ed. Pearson Education, Nueva York, EUA, 1064 pp.

- Mahdhi M., Nzoué A., de Lajudie P. y Mars M. (2008). Characterization of root-nodulating bacteria on *Retama raetam* in arid Tunisian soils. *Progress in Natural Science* 18 (1), 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2007.06.002>
- Marhual N.P., Pradhan N., Kar R.N., Sukla L.B. y Mishra B.K. (2008). Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology* 99 (17), 8331-8336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.003>
- Martínez-Calvo A., Bhattacharjee T., Ba R.K., Luu H.N., Hancock A.M., Wingreen N.S. y Datta S.S. (2022). Morphological instability and roughening of growing 3D bacterial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (43), e2208019119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2208019119>
- Maureira A., Zapata M., Olave J., Jeison D., Wong L.S., Panico A., Hernández P., Cisternas L.A. y Rivas M. (2024). MICP mediated by indigenous bacteria isolated from tailings for biocementation for reduction of wind erosion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 12, 1393334. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1393334>
- Menezes-Oliveira V.B., Scott-Fordsmand J.J., Soares A.M. y Amorim M.J. (2013). Effects of temperature and copper pollution on soil community-extreme temperature events can lead to community extinction. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32 (12), 2678-2685. <https://doi.org/10.1002/etc.2345>
- Merino N., Aronson H.S., Bojanova D.P., Feyhl-Buska J., Wong M.L., Zhang S. y Giovannelli D. (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology* 10, 780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Miranda-Carrasco A., Viguera-Cortés J.M., Villa-Tanaca L. y Hernández-Rodríguez C. (2018). Cyanotrophic and arsenic oxidizing activities of *Pseudomonas mendocina* P6115 isolated from mine tailings containing high cyanide concentration. *Archives of Microbiology* 200, 1037-1048. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1514-2>
- Mishra S., Huang Y., Li J., Wu X., Zhou Z., Lei Q., Bhatt P. y Chen S. (2022). Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. *Chemosphere* 294, 133609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133609>
- Montero-Sánchez R. (2019). Descripción de la dinámica del azufre en el jal minero "El Fraile" en Taxco de Alarcón, estado de Guerrero. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México, 107 pp.
- Moreno R. y Rojo F. (2023). The importance of understanding the regulation of bacterial metabolism. *Environmental Microbiology* 25 (1), 54-58. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16123>
- Moulton V., Spillner A. y Wu T. (2018). UPGMA and the normalized equidistant minimum evolution problem. *Theoretical Computer Science* 721, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.01.022>
- Munyai R., Odour-Ogola H.J. y Modise D.M. (2021). Microbial community diversity dynamics in acid mine drainage and acid mine drainage-polluted soils: Implication on mining water irrigation agricultural sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 701870. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.701870>
- Nautiyal C.S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170 (1), 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>
- Ndeddy-Aka R.J. y Babalola O.O. (2017). Identification and characterization of Cr-, Cd-, and Ni-tolerant bacteria isolated from mine tailings. *Bioremediation Journal* 21 (1), 1-19. <https://doi.org/10.1080/10889868.2017.1282933>
- Nguyen T., Kim T., Ta H.M., Yeo W.S., Choi J., Mizar P., Lee S.S., Bae T., Chaurasia A.K. y Kim K.K. (2019). Targeting mannitol metabolism as an alternative antimicrobial strategy based on the structure-function study of mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 10 (4), e02660-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02660-18>
- Oleskin A.V., Botvinko I.V. y Tsavkelova E.A. (2000). Colonial organization and intercellular communication of microorganisms. *Microbiology* 69, 249-265. <https://doi.org/10.1007/BF02756730>
- Oliás M. y Nieto J.M. (2015). Background conditions and mining pollution throughout history in the Río Tinto (SW Spain). *Environments* 2 (3), 295-316. <https://doi.org/10.3390/environments2030295>
- Opara C.B., Kamariah N., Spooren J., Pollmann K. y Kutschke, S. (2023). Interesting halophilic sulphur-oxidising bacteria with bioleaching potential: Implications for pollutant mobilization from mine waste. *Microorganisms* 11 (1), 222. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010222>
- Oshima T., Arakawa H. y Baba M. (1977). Biochemical studies on an acidophilic, thermophilic bacterium, *Bacillus acidocaldarius*: Isolation of bacteria, intracellular pH, and stabilities of biopolymers. *The Journal of Biochemistry* 81 (4), 1107-1113. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131535>
- O'Toole G.A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>

- Pantigoso H.A., Newberger D. y Vivanco J.M. (2022). The rhizosphere microbiome: Plant-microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology* 133 (5), 2864-2876. <https://doi.org/10.1111/jam.15686>
- Parades-Aguilar J., Calderón K., Agustín-Salazar S., Ceruti P., Ambrogi V., Gámez-Meza N. y Medina-Juárez L.A. (2024). Isolation and identification of metal-tolerant bacteria with a potential biotechnological application. *Scientific Reports* 14, 3663. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54090-0>
- Parrilli E., Tedesco P., Fondi M., Tutino M.L., Lo Giudice A., de Pascale D. y Fani R. (2021). The art of adapting to extreme environments: The model system *Pseudoalteromonas*. *Physics of Life Reviews* 36, 137-161. <https://doi.org/10.1016/j.plrev.2019.04.003>
- Pérez R., Tapia Y., Antilén M., Casanova M., Vidal C., Silambarasan S. y Cornejo P. (2021). Rhizosphere management for phytoremediation of copper mine tailings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 21, 3091-3109. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00591-0>
- Pi-Puig T., Solé J. y Gómez Cruz A. (2020). Mineralogical study and genetic model of efflorescent salts and crusts from two abandoned tailings in the Taxco mining district, Guerrero (Mexico). *Minerals* 10 (10), 871-895. <https://doi.org/10.3390/min10100871>
- Qin Y., He H., Ou X. y Bao T. (2019). Experimental study on darkening water-rich mud tailings for accelerating desiccation. *Journal of Cleaner Production* 240, 118235. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118235>
- Queiroz H.M., Ruiz F., Deng Y., de Souza Júnior V.S., Ferreira A.D., Otero X.L., de Lima Camêlo D., Bernardino A.F. y Ferreira T.O. (2022). Mine tailings in a redox-active environment: Iron geochemistry and potential environmental consequences. *Science of The Total Environment* 807 (Pt 3), 151050. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151050>
- Raddadi N., Cherif A., Daffonchio D., Neifar M. y Fava F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (19), 7907-7913. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6874-9>
- Radojević I.D., Ćirković K.G., Grujović M.Ž., Mladenović K.G. y Ostojić A.M. (2024). Characterization of bacterial isolates from tailings pond and their resistance to heavy metals and antibiotics. *Applied Biochemistry and Microbiology* 60, 347-357. <https://doi.org/10.1134/S0003683824020157>
- Rawat M., Chauhan M. y Pandey A. (2024). Extremophiles and their expanding biotechnological applications. *Archives of Microbiology* 206 (6), 247. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03981-x>
- Reiner K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Catalase-Test-Protocol> 15/02/2025
- Reynolds J. (2005). Serial dilution protocols. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Serial-Dilution-Protocols> 5/03/2025
- Romero F.M., Armienta M.A. y González-Hernández G. (2007). Solid-phase control on the mobility of potentially toxic elements in an abandoned lead/zinc mine tailings impoundment, Taxco, Mexico. *Applied Geochemistry* 22 (1), 109-127. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.07.017>
- Rouchalová D., Rouchalová K y Čablík V. (2024) Bioleaching of mine tailings by mesophilic: *Acidithiobacillus* spp., *Leptospirillum ferrooxidans*, and thermophilic: *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* cultures with the addition of Ag⁺ additive. *Minerals* 14 (3), 255. <https://doi.org/10.3390/min14030255>
- Roy B., Chakraborty R., Choudhury N., Ghosh A., Chakraborty R., Ghosh J. y Mitra A.K. (2023). Metagenomic analysis of acid mine drainage, presence of acidometallophiles, and their possible role in biomining. En: *Biohydrometallurgical processes: Metal recovery and remediation* (S. Dey, Ed). CRC Press, Boca Raton, EUA, pp. 28-43. <https://doi.org/10.1201/9781003451457>
- Sæther B.E. y Engen S. (2015). The concept of fitness in fluctuating environments. *Trends in Ecology and Evolution* 30 (5), 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.007>
- Sajjad W., Ilahi N., Kang S., Bahadur A., Banerjee A., Zada S., Ali B., Rafiq M. y Zheng G. (2024). Microbial diversity and community structure dynamics in acid mine drainage: Acidic fire with dissolved heavy metals. *Science of The Total Environment* 909, 168635. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168635>
- Salas-Luévano M.A., Mauricio-Castillo J.A., González-Rivera M.L., Vega-Carrillo H.R. y Salas-Muñoz S. (2017). Accumulation and phytostabilization of As, Pb and Cd in plants growing inside mine tailings reforested in Zacatecas, Mexico. *Environmental Earth Sciences* 76, 806. <https://doi.org/10.1007/s12665-017-7139-y>
- Salazar-Ardiles C., Asserella-Rebollo L. y Andrade D.C. (2022). Free-living amoebas in extreme environments: The true survival in our planet. *BioMed Research International* 2022, 2359883. <https://doi.org/10.1155/2022/2359883>
- Sánchez-Castro I., Amador-García A., Moreno-Romero C., López-Fernández M., Phrommavanh V., Nos J., Descostes M. y Merroun M.L. (2017). Screening of bacterial strains isolated from uranium mill tailings porewaters for bioremediation purposes. *Journal of Environmental Radioactivity* 166 (Pt1), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.03.016>

- Santana-Flores A., Sánchez-Ayala A., Romero-Ramírez Y., Toledo-Hernández E., Ortega-Acosta S.Á. y Toribio-Jiménez J. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados, obtenidas de los jales mineros El Fraile, México. *Terra Latinoamericana* 38, 67-75. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>
- Sato T.U. y Kaneko K. (2020). Evolutionary dimension reduction in phenotypic space. *Physical Review Research* 2, 013197. <https://doi.org/10.1103/PhysRevResearch.2.013197>
- Sayed A.M., Hassan M.H.A., Alhadrami H.A., Hassan H.M., Goodfellow M. y Rateb M.E. (2020). Extreme environments: Microbiology leading to specialized metabolites. *Journal of Applied Microbiology* 128 (3), 630-657. <https://doi.org/10.1111/jam.14386>
- Schultz J. y Rosado A.S. (2020). Extreme environments: A source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles* 24 (2), 189-206. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01151-2>
- SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, México, 31 de diciembre.
- Shapiro J.A. (1995). The significances of bacterial colony patterns. *BioEssays* 17 (7), 597-607. <https://doi.org/10.1002/bies.950170706>
- Shields P. y Tsang A.Y. (2006). Mannitol salt agar plates protocols. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Mannitol-Salt-Agar-Plates-Protocols> 10/03/2025
- Shields P. y Cathcart L. (2010). Oxidase test. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Image-Gallery/Oxidase-Test> 5/03/2025
- Shu W.S. y Huang L.N. (2022). Microbial diversity in extreme environments. *Nature Reviews Microbiology* 20 (4), 219-235. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00648-y>
- Shukla A.K. y Singh A.K. (2020). Exploitation of potential extremophiles for bioremediation of xenobiotics compounds: A biotechnological approach. *Current Genomics* 21 (3), 161-167. <https://doi.org/10.2174/1389202921999200422122253>
- Simate G.S. y Ndlovu S. (2014). Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2 (3), 1785-1803. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.07.021>
- Šimonovičová A., Ferienc P., Vojtková H., Pangallo D., Hanajík P., Kraková L., Feketeová Z., Čerňanský S., Okenicová L., Žemberyová M., Bujdoš M. y Pauditšová E. (2017). Alkaline technosol contaminated by former mining activity and its culturable autochthonous microbiota. *Chemosphere* 171, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.131>
- Smith A.C. y Hussey M.A. (2005). Gram stain protocols. American Society for Microbiology [en línea]. <https://asm.org/Protocols/Gram-Stain-Protocols> 10/03/2025
- Sojka M., Ptak M., Jaskuła J. y Krasniqi V. (2022). Ecological and health risk assessments of heavy metals contained in sediments of polish dam reservoirs. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20 (1), 324. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010324>
- Strayer D.L., Power M.E., Fagan W.F., Pickett S.T.A. y Belnap J. (2003). A classification of ecological boundaries. *BioScience* 53 (8), 723-729. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0723:ACOEB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0723:ACOEB]2.0.CO;2)
- Sun J., He X., Le Y., Al-Tohamy R. y Ali S.S. (2024). Potential applications of extremophilic bacteria in the bioremediation of extreme environments contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Management* 352, 120081. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120081>
- Talavera-Mendoza O., Ruiz J., Villaseñor E.D., Guzmán A.R., Cortés A., Salgado-Souto S.A., Dótor-Almazán A. y Rivera-Bustos R. (2016). Water-rock-tailings interactions and sources of sulfur and metals in the subtropical mining region of Taxco, Guerrero (southern Mexico): A multi-isotopic approach. *Applied Geochemistry* 66, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.12.002>
- Tarigan D.M., Barus W.A., Munar A. y Lestami A. (2023). Exploration and morphological characterization of phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria in saline soil. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 55 (2), 550-563. <https://doi.org/10.54910/sabrao2023.55.2.27>
- Tariq M.R., Shaheen F., Mustafa S., Ali S., Fatima A., Shafiq M., Safdar W., Sheas M.N., Hameed A. y Nasir M.A. (2022). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ* 10, e13782. <https://doi.org/10.7717/peerj.13782>
- Teng W., Jialiang K., Zhenhao L. y Wensheng S. (2017). Microbial diversity and community assembly across environmental gradients in acid mine drainage. *Minerals* 7 (6), 106. <https://doi.org/10.3390/min7060106>
- Toledo-Hernández E., Santana-Flores A., Sánchez-Ayala A., Romero-Ramírez Y., Ortega-Acosta S. y Toribio-Jiménez J. (2020). Identification and isolation of heavy-metal tolerant and bioaccumulator bacteria obtained from El Fraile mine tailings, Mexico. *Revista Terra Latinoamericana* 38 (1), 67-75. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.430>
- Toribio-Jiménez J., Rodríguez-Barrera M.Á., Valdez-Lucena M., Barrera-Flores B., Segura D., Wilson-Corral

- V., Flores-Alfaro E. y Romero Y. (2014). Production of biosurfactants by bacteria isolated from a mine tailing zone in Southern Mexico and their resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology Research* 6 (4), 23-31.
- Treseder K.K. (2023). Ecological strategies of microbes: Thinking outside the triangle. *Journal of Ecology* 111 (9), 1832-1843. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.14115>
- Trottier M.O., Franklin K., Portocarrero J., Dufault D. y Millar R. (2023). The impact of climate change on extreme events for operation and closure of tailings facilities. *Proceedings of the Tailings and Mine Waste Conference*, November 5-8, 2023, Vancouver, Canadá. <https://doi.org/10.14288/1.0438154>
- Tycholiz C., Ferguson I.J., Sherriffa B.L., Cordeiro M., Sri Ranjan R. y Pérez-Flores M.A. (2016). Geophysical delineation of acidity and salinity in the Central Manitoba gold mine tailings pile, Manitoba, Canada. *Journal of Applied Geophysics* 131, 29-40. <https://doi.org/10.1016/j.jappgeo.2016.05.006>
- Urbanavičiūtė I., Bonfiglioli L. y Pagnotta M.A. (2023). Phenotypic and genotypic diversity of roots response to salt in durum wheat seedlings. *Plants* 12 (2), 412. <https://doi.org/10.3390/plants12020412>
- Vardanyan N., Sevoyan G., Navasardyan T. y Vardanyan A. (2019). Recovery of valuable metals from polymetallic mine tailings by natural microbial consortium. *Environmental Technology* 40 (26), 3467-3472. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1478454>
- Von Hegner I. (2020). Extremophiles: A special or general case in the search for extra-terrestrial life? *Extremophiles* 24 (1), 167-175. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01144-1>
- Wakelin S.A., Anand R.R., Reith F., Gregg A.L., Noble R.R., Goldfarb K.C., Andersen G.L., DeSantis T.Z., Piceno Y.M. y Brodie E.L. (2012). Bacterial communities associated with a mineral weathering profile at a sulphidic mine tailings dump in arid Western Australia. *FEMS Microbiology Ecology* 79 (2), 298-311. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01215.x>
- Wang C., Pan G., Lu X. y Qi W. (2023). Phosphorus solubilizing microorganisms: Potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 11, 1181078. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1181078>
- Wichlacz P.L., Unz R.F. y Langworthy T.A. (1986). *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., and *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 36 (2), 197-201. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-197>
- Wisselink H.W., Weusthuis R.A., Eggink G., Hugenholtz J. y Grobben G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: A review. *International Dairy Journal* 12, 151-161. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00153-4)
- Wu B., Luo H., Wang X., Liu H., Peng H., Sheng M., Xu F. y Xu H. (2022). Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings. *Science of The Total Environment* 802, 149899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149899>
- Wu D., Zhang Z., Gao Q. y Ma Y. (2018). Isolation and characterization of aerobic, culturable, arsenic-tolerant bacteria from lead-zinc mine tailing in southern China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34, 177. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2557-x>
- Xie X., Fu J., Wang J. y Liu J. (2010). Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a copper mine tailing in China. *African Journal of Biotechnology* 9 (26), 4056-4066.
- Yi Q., Wu S., Southam G., Robertson L., You F., Liu Y., Wang S., Saha N., Webb R., Wykes J., Chan T.S., Lu Y.R. y Huang L. (2021). Acidophilic iron- and sulfur-oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, drives alkaline pH neutralization and mineral weathering in Fe ore tailings. *Environmental Science and Technology* 55 (12), 8020-8034. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00848>
- Yuan S., Duan W. y Liu Y. (2021a). Effects of recycled fly ash on desiccation cracking of mine tailings with high water content. *Arabian Journal of Geosciences* 14, 2828. <https://doi.org/10.1007/s12517-021-09225-2>
- Yuan F., Yin S., Xu Y., Xiang L., Wang H., Li Z., Fan K. y Pan G. (2021). The richness and diversity of catalases in bacteria. *Frontiers in Microbiology* 12, 645477. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645477>
- Yurkevich N.V., Abrosimova N.A., Bortnikova S.B., Karin Y.G. y Saeva O.P. (2017). Geophysical investigations for evaluation of environmental pollution in a mine tailings area. *Toxicological and Environmental Chemistry* 99, 1328-1345. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1371308>
- Zhang H.B., Yang M.X., Shi W., Zheng Y., Sha T. y Zhao Z.W. (2007). Bacterial diversity in mine tailings compared by cultivation and cultivation-independent methods and their resistance to lead and cadmium. *Microbial Ecology* 54 (4), 705-712. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9229-y>
- Zhang R., Hedrich S., Jin D., Breuker A. y Schippers A. (2021). *Sulfobacillus harzensis* sp. nov., an acidophilic bacterium inhabiting mine tailings from a polymetallic mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71 (7), 004871. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004871>