



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Aislamiento e identificación de bacterias oxidantes del azufre en el jal minero “La Concha” en Taxco de Alarcón, Guerrero.

Área de Investigación: Ciencias Ambientales

TESIS

Que para obtener el grado de

Bióloga

Presenta:

Diana Hansel García Gutiérrez

Dr. Jorge Antonio Valdivia
Anistro

Director de Tesis

Biól. Maricela Arteaga Mejía

Asesora de Tesis



Cd. Mx. Junio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1 Contenido

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. ANTECEDENTES	8
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
5. JUSTIFICACIÓN	12
6. ZONA DE ESTUDIO	13
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
8. HIPÓTESIS	17
9. OBJETIVO GENERAL	17
10. OBJETIVOS PARTICULARES	17
11. MÉTODO	18
11.1 Muestreo	18
11.2 Valoración de parámetros	19
11.2.1 Determinación de color	19
11.2.2 Determinación de pH	19
11.3 Comparación de medios de cultivo	20
11.4 Procesamiento de muestras para los análisis microbiológicos	21
11.5 Clasificación por morfología colonial y estimación de las unidades formadoras de colonias (UFC)	22
11.6 Determinación de índices de diversidad	23
11.7 Obtención de cultivos axénicos	23
11.8 Caracterización fenotípica	24
11.8.1 Tinción de Gram	25
11.8.2 Prueba de crecimiento a diferente pH	25
11.8.3 Prueba de formación de biopelícula	26
11.8.4 Prueba de resistencia a antibióticos	26
11.8.5 Prueba de catalasa	27
11.9 Identificación genética	27
11.10 Análisis estadístico	28
12. RESULTADOS	28
12.1 Muestreo	28
12.1.1 Determinación de color	30
12.1.2 Determinación de pH	36

12.2	Estandarización de medios de cultivo	44
12.3	Determinación de los índices de diversidad.....	47
12.4	Clasificación por morfología colonial y cuantificación	49
12.5	Caracterización fenotípica	66
12.5.1	Tinción Gram	66
12.5.2	Prueba de crecimiento a diferente pH	71
12.5.3	Formación de biopelícula	75
12.1.1	Prueba de resistencia a antibióticos.....	78
12.1.2	Prueba de catalasa	81
12.2	Identificación genética	82
13.	<i>DISCUSIÓN</i>.....	83
13.1	Análisis colorimétrico y determinación de pH de los residuos mineros del jal “La Concha”.....	84
13.2	Comparación de medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias oxidantes del azufre	87
13.3	Evaluación de la composición de las comunidades bacterianas a través de índices de diversidad	89
13.4	Clasificación de las bacterias oxidantes del azufre aisladas del jal “La Concha” con base a la morfología colonial.....	91
13.5	Caracterización fenotípica y descripción de estrategias ecológicas de las BOA del jal “La Concha”.....	92
13.6	Identificación genética de las BOA aisladas del jal “La Concha”.....	97
14.	<i>CONCLUSIONES</i>	100
15.	<i>REFERENCIAS</i>	101
16.	<i>ANEXOS</i>	116

1. RESUMEN

El jal “La Concha” se localiza en el distrito minero de Taxco de Alarcón, estado de Guerrero. Es un sitio de confinamiento de desechos mineros que tienen décadas de exposición a la intemperie. En “La Concha” se ha reportado la generación de lixiviados (drenaje ácido de mina) que se vierten en el río Cacalotenango. A pesar la heterogeneidad de las condiciones ambientales, la extrema acidez, las altas concentraciones de sulfato y de metales pesados; existe una amplia gama de bacterias que habitan los jales mineros. Este estudio tuvo como objetivo principal, describir la diversidad de bacterias oxidantes del azufre (BOA) que participa en la dinámica biogeoquímica aerobia del ciclo del azufre en el jal. La diversidad cultivable de BOA se analizó en residuos que presentaban variabilidad colorimétrica generada por su oxidación ambiental y por la probable actividad metabólica de las BOA. Los sitios analizados confirmaron el alto grado de oxidación del jal por la dominancia de colores pardos y de condiciones de pH heterogéneas que tienden a la acidificación. Las propiedades ambientales descritas en el “La Concha” están dentro de las condiciones de crecimiento de las bacterias oxidantes del azufre (BOA). Para el análisis microbiológico, se utilizaron tres medios de cultivo para el aislamiento de las BOA; siendo agar para *Thiobacillus*, que contiene tiosulfato como fuente de azufre, el medio que mostró el mayor crecimiento de bacterias productoras de ácido. Los índices de diversidad bacteriana se encuentran dentro de lo estimado en otros sitios con desechos mineros; sin embargo, algunos valores mostraron una variación considerable que puede ser generada por la heterogeneidad en las propiedades físicas, químicas y biológicas del jal. Se describieron 15 morfotipos coloniales dominantes que se presentaron en las muestras analizadas de “La Concha”; la variación en las características de cada uno de los morfotipos puede ser una respuesta adaptativa de las BOA a los factores de estrés del jal. El análisis de las propiedades fenotípicas de las BOA aisladas del jal “La Concha” mostró que son bacterias acidófilas que producen ácido durante la oxidación del azufre, con metabolismo aerobio y crecimiento mesofílico, que producen biopelícula para la lixiviación de los sulfuros metálicos y con resistencia a antibióticos en respuesta a la presencia de metales pesados. A nivel genético, las BOA del jal “La Concha” se relacionaron con bacterias aisladas de sitios contaminados con propiedades diferentes a un jal o con bacterias que inducen el crecimiento vegetal. Por lo que, es probable que se esté generando un proceso de sucesión microbiana que podría estar siendo dirigido por la vegetación que se encuentra colonizando al jal “La Concha”.

2. INTRODUCCIÓN

El **azufre (S)** es un elemento que se encuentra en la Tierra en grandes cantidades en forma de minerales. El S tiene valencias que van desde 2- (como sulfuro S^{2-} y azufre orgánico reducido) a 6+ (como sulfato SO_4^{2-}); siendo el sulfato la forma química más estable que existe (Atlas y Bartha, 2002). El S representa el 1.0% de peso seco de los organismos, aproximadamente; y se presenta como componente de proteínas, de coenzimas y en la formación de grupos azufre-hierro en metaloproteínas (Sievert *et al.*, 2007).

El ciclo biogeoquímico del S es mediado por la actividad de microorganismos, los cuales, ocupan las diferentes formas químicas de S para realizar su metabolismo. Los compuestos de azufre se pueden usar como aceptores o donadores de electrones en procesos conocidos como *reducción de sulfatos/azufre* (bacterias sulfato reductoras (BSR) que tienen metabolismo quimiorganotrofo) y *oxidación de azufre* (bacterias oxidantes del azufre (BOA) que tienen un metabolismo quimiolitótrofo). El primer proceso es estrictamente anaerobio y, el segundo, puede ocurrir tanto aeróbica como anaeróbicamente. De modo que en el proceso aerobio, se produce una oxidación biológica en presencia de oxígeno o nitrato (NO_3^-) como receptores de electrones; mientras que, en la forma anaeróbica, la oxidación es responsabilidad de microorganismos fotótrofos (fotoreducen el CO_2 mientras oxidan los compuestos de azufre, denominado *fotosíntesis anoxigénica*) (Figura 1) (Robertson y Kuenen, 2006; Sievert *et al.*, 2007).

Metabólicamente, las **bacterias oxidantes del azufre (BOA)** son quimioautótrofas que oxidan compuestos reducidos de azufre a ácido sulfúrico (H_2SO_4) en presencia de oxígeno, y fueron descritas por Sergey Winogradsky en 1885 (Van Ginkel *et al.*, 2011). Algunas BOA usan partículas de azufre elemental (S^0) como donador de electrones (Baker y Banfield, 2003), dando como resultado la formación de sulfato (SO_4^{2-}) en forma de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y, en consecuencia, se incrementa la acidez y la conductividad eléctrica del medio. En presencia de contaminantes oxidados (p. ej. dióxido de azufre SO_2 o sulfato SO_4^{2-}) se llevará a cabo un proceso de reducción anaerobio, con lo que la actividad de BOA se inhibirá y causará el aumento de pH (Van Ginkel *et al.*, 2011).

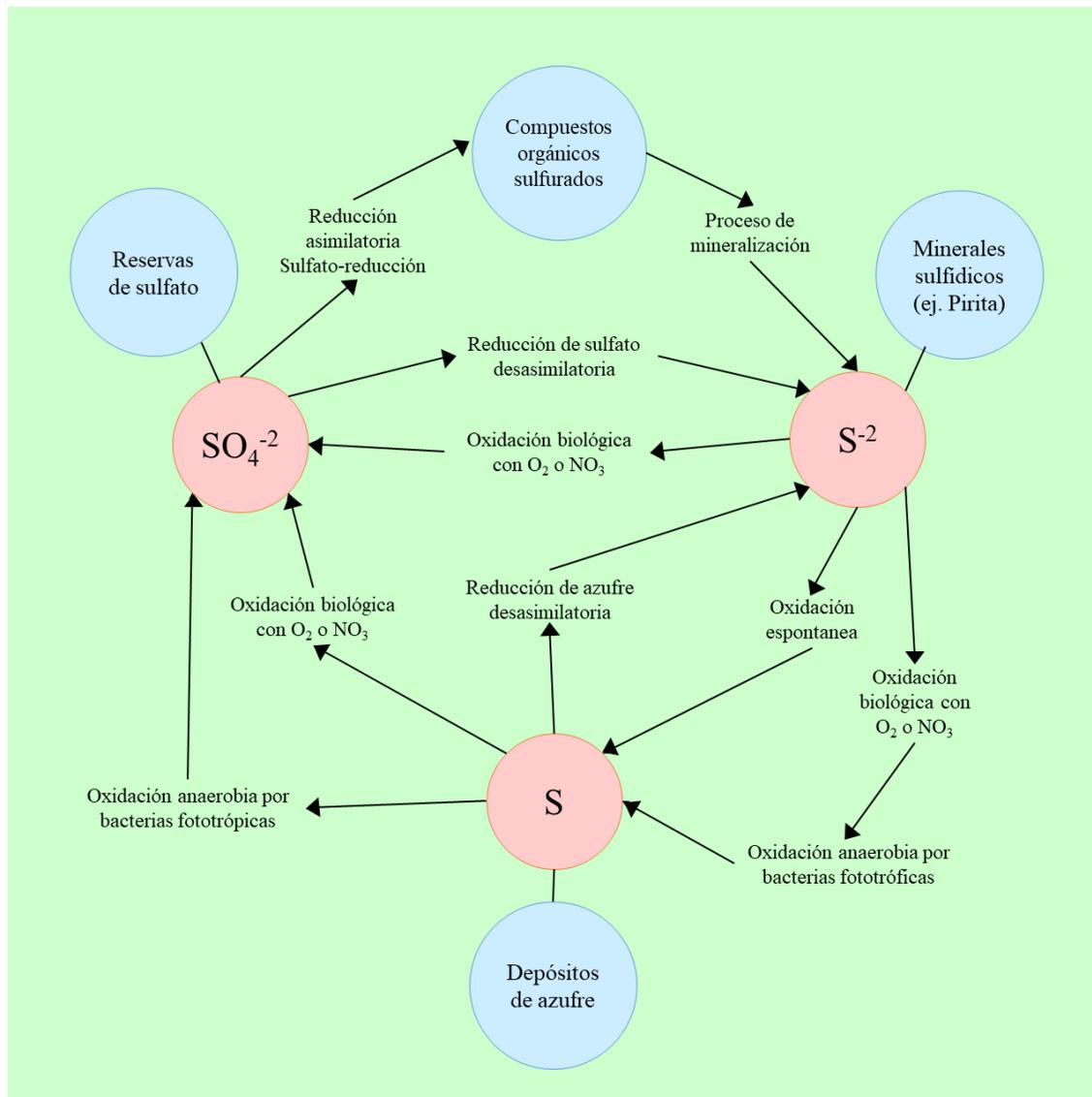


Figura 1. Ciclo del azufre (tomado y modificado de Bos y Kuenen, 1983).

De acuerdo con sus características y funciones metabólicas, las BOA se han clasificado en bacterias neutrófilas oxidantes de azufre (BNOA) y bacterias acidófilas oxidantes de azufre (BAOA). En un medio alcalino (pH = ~12.0), las BSR en presencia de sustancias con propiedades ácidas (p. ej. H₂S y CO₂) disminuyen abióticamente el pH a valores cercanos a 9.0, lo que permite la colonización de BNOA (p. ej. *Thiobacillus* y *Thiomonas*), las cuales, oxidan el H₂S y otros compuestos de azufre reducido a H₂SO₄, disminuyendo el pH a 5.0 y hasta 3.5. Con un pH igual o menor a 5.0, se propicia la proliferación de BAOA, (p. ej. *Acidithiobacillus thiooxidans*), las cuales, continúan la oxidación de azufre e incrementan la cantidad de H₂SO₄, disminuyendo el pH a 2.0, aproximadamente (Huber, et al., 2016).

El nombre *bacterias incoloras de azufre* (BIA) se ha utilizado desde la época de Winogradsky para designar procariotas que pueden utilizar compuestos reducidos de azufre (p. ej. S^{2-} , S^0 y sulfuros orgánicos) como fuentes de energía (Johnson y Hallberg, 2003). El adjetivo *incoloro* se refiere a la ausencia de pigmentación en estas bacterias, aunque debe de tenerse en cuenta que las colonias y los cultivos pueden ser de color rosa o marrón debido a su alto contenido de citocromo. Las BIA juegan un papel esencial en el componente oxidativo del ciclo del S, donde los compuestos reducidos sirven como donadores de electrones para bacterias fototrópicas. Los productos más comunes de la oxidación del S^{2-} son S^0 y SO_4^{2-} (Ivanov y Freney, 1983; Robertson y Kuenen, 2006; Espinosa Márquez, Revah, y Le Borgne, 2010).

La biolixiviación de minerales de sulfuro (pirita (FeS_2), pirrotita (Fe_7S_8), barita ($BaSO_4$), principalmente) es un proceso dependiente del agente oxidante de sulfuro (S^{2-}), clasificándose como: *mecanismos de lixiviación directos* (oxidación directa del azufre mineral por sistemas enzimáticos microbianos) o *indirectos* (oxidación de los sulfuros metálicos por hierro). El papel de las BOA en la transformación de azufre (S^0) a ácido sulfúrico (H_2SO_4) es uno de los más importantes en la biolixiviación de minerales de sulfuro (Tang, *et al.*, 2009).

Aunque los microorganismos que llevan a cabo diferentes reacciones del ciclo del S son extremadamente diversos, la mayoría pertenecen al dominio Bacteria. Como resultado de su actividad metabólica, el ciclo del azufre se interconecta con los otros ciclos biogeoquímicos (carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y hierro (Fe)) (Sievert *et al.*, 2007).

Por lo que, la diversidad y la composición de los microorganismos son un indicador del estado de los componentes del medio ambiente, como ocurre con la salud del suelo. Los microorganismos son componentes clave de la biota del suelo porque contribuyen a las funciones esenciales, como la descomposición de la materia orgánica, la recirculación de nutrientes y la determinación de sus propiedades físicas. Además, los microorganismos son componentes importantes de todas las redes alimenticias terrestres porque la nutrición de las plantas depende totalmente de su actividad metabólica (Pereira, *et al.*, 2014).

3. ANTECEDENTES

Durante el proceso de extracción de oro (Au) y plata (Ag), los desechos generados son fracciones de grano fino que no son tratadas y se acumulan cerca del sitio de producción. En México, los denominados *jales* representan la acumulación de los desechos mineros que se caracteriza por tener concentraciones altas de sulfuros minerales que quedan disponibles durante los procesos de extracción, flotación y cianuración (Pereira, *et al.*, 2014; Méndez-Ramírez y Hernández, 2012).

Los jales mineros pueden considerarse suelos incipientes, similares a los perfiles pedológicos normales, pero sin aparente composición orgánicos y biológicos. Representan sistemas geológicos complejos caracterizados por altas heterogeneidades verticales y laterales en tamaño de grano, litología, mineralogía y química. Los jales proceden de la explotación de minerales sulfurados se caracterizan por el alto porcentaje de mineralización y sulfuros (como pirita y pirrotita) (Figura 2). En las áreas de extracción de sulfuros abandonadas, los vertederos de desechos representan la fuente más importante para la formación del drenaje ácido de mina (DAM) y, por lo tanto, son los sitios más críticos para la contaminación del agua y el suelo (Jambor, 1994; Courtney, 2013; Kossoff *et al.*, 2014).



Figura 2. Coloraciones que indican el grado de oxidación de los compuestos sulfurados en jales mineros. Fotografía tomada en el jal “La Concha” en el municipio de Taxco, estado de Guerrero.

Los sitios de disposición de residuos de minas son frecuentes en regiones áridas y semiáridas en todo el mundo. En México, las principales áreas de deposición de desechos mineros incluyen el norte, centro y suroeste del país. El impacto global de estos sitios es enorme, ya que permanecen sin vegetación durante decenas o cientos de años, y pueden extenderse sobre decenas de hectáreas a través de la dispersión eólica y la erosión hídrica (Mendez y Maier, 2008).

Generalmente, los jales contienen diversos sulfuros metálicos (pirita (FeS_2), galeana (PbS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS) y arsenopirita (FeAsS)), que son la fuente de elementos potencialmente tóxicos (EPT), como el arsénico (As), cadmio (Cd), plomo (Pb), cobre (Cu), zinc (Zn), hierro (Fe), entre otros (Romero, *et al.*, 2007).

La disolución y alteración de algunos minerales como la calcita (CaCO_3), wollastonita (CaSiO_3), gibbsita ($\text{Al}(\text{OH})_3$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) y feldespatos (XAlSi_3O_8), propician el consumo de protones, lo que contribuye en el proceso de neutralización de las soluciones ácidas generadas por la oxidación de sulfuros metálicos en los jales. Los oxihidróxidos de hierro ($\text{FeO}(\text{OH})$) tienen una gran capacidad para la absorción y coprecipitación de arsénico (As) y de metales pesados (Romero, *et al.*, 2008; Pozo, *et al.*, 2010).

Algunos autores (Ortiz-Hernández, *et al.*, 1995; Hernández Acosta, *et al.*, 2009; Pozo *et al.*, 2010) han reportado que la sorción de los EPT en los oxihidróxidos de hierro es el principal control de su movilidad. Mientras que, Jiménez (2005) y Gutiérrez-Ruiz, *et al.*, (2007), reportan que la precipitación de minerales secundarios como la anglesita (PbSO_4), beudantita ($\text{PbFe}_3(\text{AsO}_4)(\text{SO}_4)(\text{OH})_6$) y escorodita ($\text{Fe}_{3+\text{AsO}_4} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), controlan la movilidad de los EPT liberados durante la oxidación de los jales.

Sin embargo, la exposición ambiental no es el único proceso involucrado en la oxidación de los residuos mineros ricos en sulfuro, porque la actividad microbiana participa considerablemente en la formación de DAM (Ledin y Pedersen, 1996; Tang *et al.*, 2009). Las bacterias quimiolitotróficas que utilizan azufre (S^0) y hierro (Fe) como donadores de electrones, contribuyen a la oxidación y solubilización de diversos metales (Karnachuk *et al.*, 2009). Johnson y Hallberg (2003) describieron a los microorganismos que comúnmente se relacionan con la formación del DAM; entre los que se encuentran bacterias hierro-oxidantes y sulfo-oxidantes (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. caldus*, *Thiomonas cuprina*,

Hydrogenobacter acidophilus, *Metallosphaera* spp. y *Sulfolobus metallicus*), pertenecientes a los grupos filogenéticos β - y δ -proteobacteria.

Liu et al. (2008) reportan resultados experimentales donde la concentración de S afectó fuertemente la solubilización de metales pesados durante el proceso de biolixiviación. Lo que indica que la actividad de las bacterias autóctonas oxidantes de azufre en los jales mineros fue mayor que en las condiciones experimentales elegidas. Después del proceso de biolixiviación, los metales acumulados en los desechos de la mina tenían concentraciones relativamente bajas. Los resultados mostraron que antes y después de la biolixiviación, los metales se encontraban en fracciones estables que se mantuvieron en el medio ambiente circundante.

Estos procesos de oxidación del azufre no solo ocurren a nivel ambiental. Por ejemplo, Huber et al. (2016) caracterizaron la diversidad microbiana relacionada con la corrosión de digestores de lodo por formación de H_2SO_4 . A través de diferentes análisis, lograron la descripción de diversas BAOA (que crecen en pH de 2.0 a 4.0) y de BNOA capaces de oxidar compuestos reducidos de azufre (tiosulfato $Na_2S_2O_3$ y azufre elemental S^0), las cuales, producen el H_2SO_4 que corroe dichos digestores.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El problema ambiental asociado a la extracción de minerales metálicos y la formación de jales mineros se relaciona con la deforestación, la erosión del suelo, la inundación de áreas bajas y la dispersión de sus residuos contaminantes hacia el entorno, así como la oxidación (ambiental o biológica) de los sulfuros minerales. En zonas áridas, el impacto de la minería se relaciona con la dispersión de las partículas contaminantes provocada por el viento (dispersión eólica) (Romero *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2014). Mientras que, en zonas lluviosas, la oxidación de los jales propicia la formación del DAM y su dispersión por escurrimientos superficiales (dispersión hídrica) (Figura 3).

La peligrosidad de los jales se evalúa en función de la capacidad de generación de DAM, que se forma a partir de la oxidación de la pirita, lo que origina aguas ácidas, con altas concentraciones de sulfatos, metales y metaloides en forma de iones disueltos (Talavera-Mendoza *et al.*, 2006; Corrales-Pérez y Romero, 2013).



Figura 3. Extracción de agua del interior de la mina que propicia la formación de drenaje ácido de mina (DAM) en el jal minero "La Concha".

La formación del DAM y su interacción con aguas naturales tienen graves impactos ambientales. Bajo condiciones adecuadas, el sulfato (SO_4^{2-}) puede reducirse biológicamente a sulfuro (S^{2-}), generando problemas de olor y riesgo de corrosión severa. La naturaleza ácida y la presencia de metales pesados puede conducir al daño ecológico irreversible del cuerpo receptor de agua (Tang *et al.*, 2009; Bing, *et al.*, 2016).

Para que ocurra la oxidación en los jales, es necesario que estén presentes sulfuros metálicos reactivos y que existan condiciones climáticas apropiadas (aire, agua o atmósfera húmeda) (Romero y Gutiérrez Ruiz, 2010). La oxidación de los sulfuros es limitada durante la extracción de Au y Ag, ya que esta se desarrolla lentamente a lo largo del tiempo. Después de la formación de los jales, la porosidad permite la difusión de oxígeno atmosférico. Antes de la oxidación, cuando los jales no presentan signos visibles de alteración, por lo general, son de color gris. Cuando ocurre la oxidación de los sulfuros, los jales cambian a una coloración café, amarilla o roja (Benner, *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2007; Romero y Gutiérrez Ruiz, 2010). La oxidación de los sulfuros no siempre produce el DAM, ya que su formación está en función del balance entre la cantidad de minerales productores de ácido (sulfuros metálicos) y los minerales con capacidad de neutralización (carbonatos, hidróxidos

y aluminosilicatos). Por lo que, cuando el potencial de neutralización excede al potencial de acidez, se consumirá toda la acidez generada, y las soluciones que drene el depósito de jales tendrá un pH cercano al neutro (Hernández Acosta *et al.*, 2009). Por otro lado, el desarrollo de otros procesos geoquímicos y físicos (neutralización química y actividad microbiana) puede controlar la acidez, la movilidad y la dispersión de EPT en los depósitos de jales (Romero *et al.*, 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el DAM, ha sido controlado a través de dos tipos de procesos, denominados *tratamientos activos*, que pueden ser químicos por la formación de precipitados sulfurados y de lodos, y *tratamientos pasivos*, como cubiertas vegetales y aditivos alcalinos. Sin embargo, la insostenibilidad económica de los *tratamientos activos* han motivado la comunidad científica explorar e investigar nuevas alternativas para el control del DAM (Talavera Mendoza *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2008; Corrales-Pérez y Romero, 2013).

A pesar de la extrema acidez, las altas concentraciones de sulfato (SO_4^{2-}) y de metales tóxicos, existe una amplia gama de microorganismos capaces de habitar jales y entornos ligados al DAM. Estos microorganismos pueden formar una biosfera quimioautótrofa en el subsuelo que se mantiene por donantes de electrones derivados de compuestos sulfurados (Benner *et al.*, 2000; Baker y Banfield, 2003).

Las interacciones microbio-mineral son importantes, ya que se pueden utilizar en el procesamiento de minerales y, además, pueden ser una fuente de nuevas biomoléculas (p. ej. enzimas) con aplicación biotecnológica. Por lo que, debido a su simplicidad biológica y geoquímica, los jales y entornos al DAM tienen potencial para ser sistemas modelo para el análisis de las interacciones biogeoquímicas y para el estudio de la estructura y función de la comunidad bacteriana (Baker y Banfield, 2003).

Las investigaciones de comunidades microbianas en estos ambientes pueden revelar la presencia de especies desconocidas con capacidades genéticas y metabólicas aún desconocidas. Los microorganismos que habitan en el DAM han sido estudiados con distintos fines, incluyendo su aplicación para la biorremediación de sitios mineros y el desarrollo de consorcios para la biolixiviación. Además de la diversidad metabólica de las

comunidades microbianas presentes en estos sitios, se pueden iniciar estudios de genómica, de ecología evolutiva, de mecanismos de tolerancia y de interacciones intra- e interespecíficas vinculadas a factores ambientales (Pereira *et al.*, 2014).

Trabajos previos han descrito la dinámica geoquímica del jal “La Concha” (Talavera Mendoza *et al.*, 2005; Dótor-Almazán *et al.*, 2014; Montero, 2019); sin embargo, no existen investigaciones previas del jal donde se haya descrito la diversidad de microorganismos asociada a los procesos biogeoquímicos que allí ocurren. Por lo que el presente estudio tiene como objetivo describir la diversidad de bacterias oxidantes del azufre (BOA) como iniciativa para la descripción de la dinámica del ciclo del azufre en el jal y para iniciar el desarrollo de alternativas para la disminución de impacto ambiental que estos sitios contaminados producen.

6. ZONA DE ESTUDIO

El municipio de Taxco de Alarcón se localiza al norte del Estado de Guerrero, entre las coordenadas 18° 38' 43" y 99° 21' 25" latitud norte y 18° 22' 21" y 99° 40' 43" longitud oeste a una altitud promedio de 1500 m.s.n.m. (Figura 4). Ocupa una extensión territorial de 347 km² y limita al norte con los municipios de Tetipac y Pilcaya, al sur con Iguala de la independencia, al este con Buenavista de Cuéllar y el estado de Morelos, al suroeste con el de Teloloapan y al oeste con los de Ixcateopan y Cuauhtémoc, y al noroeste con el municipio de Pedro Ascencio (INEGI, 2009).

La geología del municipio data del Mesozoico y Cenozoico. Al centro sur, partes del noroeste y noreste se extienden algunas zonas de rocas sedimentarias del Cretácico inferior (lutita arenisca y conglomerado); al oeste y sureste se presentan las rocas ígneas extrusivas del Terciario (tobas y andesitas); al este, centro y parte del noroeste abundan las areniscas y conglomerados del Terciario superior. La región es rica en yacimientos de metales preciosos, principalmente plata (INEGI, 1991). Los principales recursos hidrológicos del municipio son: los ríos Cacalotenango, Taxco, Temixco e Icatepec; y los arroyos permanentes: Acatlán, Almoloya, Las Trojes, La Trampa y San Pedro Atengo (CONABIO, 2015).

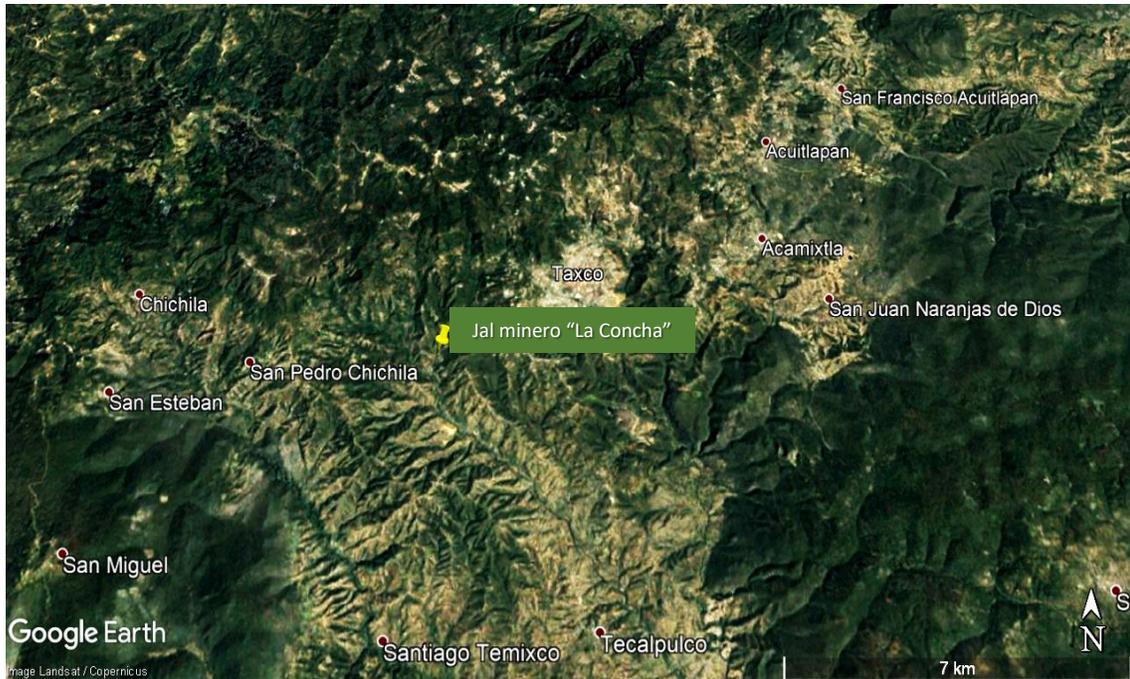


Figura 4. Ubicación del municipio de Taxco de Alarcón en el estado de Guerrero, México (Google Earth, 2015).

Al centro y sur del municipio se extiende la zona en que predominan los suelos rendzinas: ricos en cal, muy arcillosos y aptos para cierto tipo de cultivos; al centro y noroeste se presentan los suelos cambisol: poco desarrollados, susceptibles a la erosión y poco aptos para construcción y la agricultura (INEGI, 1991).

El clima predominante en el municipio es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual registrada en la zona es mayor a los 27°C y la precipitación media anual varía entre los 800 y 1000mm. En las partes altas de la Sierra se presenta el clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano; la temperatura oscila entre los 22°C y los 27°C y la precipitación media anual varía entre 800 y 1.000mm (INEGI, 2009).

La vegetación es de tipo selva baja caducifolia y de bosque de clima templado. Pertenecen a esta comunidad natural árboles como: el tepehuaje, el copal, el pochote, el mezquite y el cacahuate, de los cuales hay presencia en todo el territorio municipal. En las zonas altas o templadas del municipio se presentan bosques de coníferas, principalmente pino y encino; al norte, sur y oeste se presentan las mayores extensiones de selva baja caducifolia (POGEG, 2015-2021).

Los recursos naturales más importantes provienen de sus minas. Los minerales que se explotan son: oro, plata, plomo y zinc. Al noroeste se practica la agricultura de temporal y al oeste existen algunas zonas de pastizal inducido. De las principales actividades del municipio destaca la pecuaria, tanto intensiva como extensiva, así como la explotación de especies forestales (POGEG, 2015-2021).

El área minera de Taxco ha sido una de las más importantes para la explotación de metales básicos y preciosos desde tiempos prehispánicos. La mineralización aparece principalmente en vetas hidrotermales, en minerales de reemplazo y *stockworks* (serie de fisuras dicotómicas y ramificadas a gran escala, llenas de materia mineral) (Romero y Gutiérrez, 2010). El área se encuentra a una altitud de 1700 msnm (Romero *et al.*, 2007).

En 1945, se inició la construcción de una planta de tratamiento por frotación y las actividades fueron concluidas en 1973. En este período, fueron generados 5×10^6 toneladas de desechos mineros ricos en sulfuro que fueron descargados en dos valles estrechos adyacentes. Dando como resultado dos pilas de acumulación de desechos cubriendo un área de 20 ha en la región de Taxco (Romero *et al.*, 2007; Talavera-Mendoza *et al.*, 2016).

Los yacimientos minerales de la región están formados de vetas hidrotermales con sulfuros de Pb-Zn, encajonados de lutitas, calizas y areniscas del Cretácico. Los sulfuros metálicos reportados son pirita (FeS_2), esfalerita (ZnS), galena (PbS) y arsenopirita (FeAsS). Los minerales transparentes más abundantes son cuarzo, calcita y feldespatos potásicos (Romero *et al.*, 2008).

El “método de minado” fue a través de tajo subterráneo, en el cual, por medio de obras en el interior de galeras o túneles se accede a la masa mineral para su extracción. Para el “proceso de beneficio”, se utilizó el método de flotación selectiva, mediante la cual por acción selectiva permite obtener en un concentrado un solo mineral valioso (Corrales-Pérez y Romero, 2013).

El jal “La Concha” es uno de los sitios donde se confinaron desechos mineros, los cuales, han estado expuestos a la intemperie por más de 50 años. Este jal se encuentra dentro del distrito minero de Taxco (

Figura 5) y ha sido reportada generación de DAM, el cual, se vierte en el río Cacalotenango (latitud $18^{\circ} 41' N$ Longitud $99^{\circ} 45' O$), esta situación ha ocasionado un desequilibrio en el sistema hídrico de la región, afectando la flora y la fauna (Corrales-Pérez y Romero, 2013).



Figura 5. Ubicación geográfica del jal minero "La Concha". En las coordenadas: Latitud norte $18^{\circ} 32' 27''$, latitud oeste $99^{\circ} 38' 10''$.

7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la diversidad de bacterias oxidantes del azufre presentes en los residuos del jal minero “La Concha”?

8. HIPÓTESIS

La acidez extrema registrada en los jales mineros es una consecuencia de la oxidación de los sulfuros presentes en sus residuos. La coloración y el pH de los residuos del jal “La Concha” son un indicativo del grado de oxidación de los compuestos sulfurados que contiene, proceso que estará vinculado con la actividad de diferentes bacterias oxidantes del azufre (BOA). Por lo que, los colores pardos presentes en el jal serán los que presenten una mayor diversidad de BOA por ser los residuos que presentan el nivel máximo de oxidación.

9. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar las bacterias oxidantes del azufre (BOA) presentes en los residuos del jal minero “La Concha” en Taxco, estado de Guerrero.

10. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clasificar las muestras por su color y cuantificar el pH para inferir el grado de oxidación de los residuos del jal “La Concha”.
2. Identificar las condiciones de crecimiento óptimas de las BOA para definir los medios de cultivo que serán empleados para su aislamiento en los residuos del jal “La Concha”.
3. Establecer la abundancia relativa de las BOA cultivables que habitan en los residuos del jal “La Concha” a través de la estimación de las unidades formadoras de colonias.
4. Determinar la diversidad alfa y beta para evaluar la composición de las comunidades bacterianas y determinar la similitud entre las cepas de BOA encontradas en los residuos del jal “La Concha”.
5. Clasificar las BOA que habitan en los residuos del jal “La Concha” con base a los caracteres morfológicos de sus colonias microbianas.
6. Caracterizar fenotípicamente las BOA para describir algunas de sus estrategias ecológicas que utilizan para tolerar las condiciones adversas presentes en el jal “La Concha”.
7. Realizar la identificación genética y determinar la relación filogenética de las BOA que habitan los residuos del jal “La Concha”.

11. MÉTODO

11.1 Muestreo

Para establecer los puntos de muestreo se realizó un recorrido alrededor del jal “La Concha”, estos se establecieron donde se presentó la mayor variación colorimétrica en los desechos, como evidencia de la oxidación y probable actividad de las BOA. En el año 2016 se realizaron tres muestreos, en los meses de septiembre, octubre y noviembre. Durante el año 2017, se realizaron cinco muestreos, en los meses de febrero, marzo, mayo, agosto y octubre, divididos en seis sitios de muestreos en el jal. El número de muestras colectadas se determinó con base a la variación colorimétrica de cada sitio observada en cada muestreo. Por muestra se colectaron ~10g en tubos estériles, sellados herméticamente, que se almacenaron a 4.0°C en completa oscuridad hasta su análisis microbiológico (Figura 6).



Figura 6. Toma de muestra del sustrato del jal “La Concha” con tubos estériles para el análisis microbiológico.

11.2 Valoración de parámetros

11.2.1 Determinación de color

Las muestras se clasificaron conforme a su variación colorimétrica de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 por el método AS-22. En una placa de porcelana se colocó 1.0g de muestra seca, se consideró el matiz (*hue*), la claridad (*value*) y la pureza (*chroma*) de la tabla de Munsell (Munsell, 1975) (Figura 7).

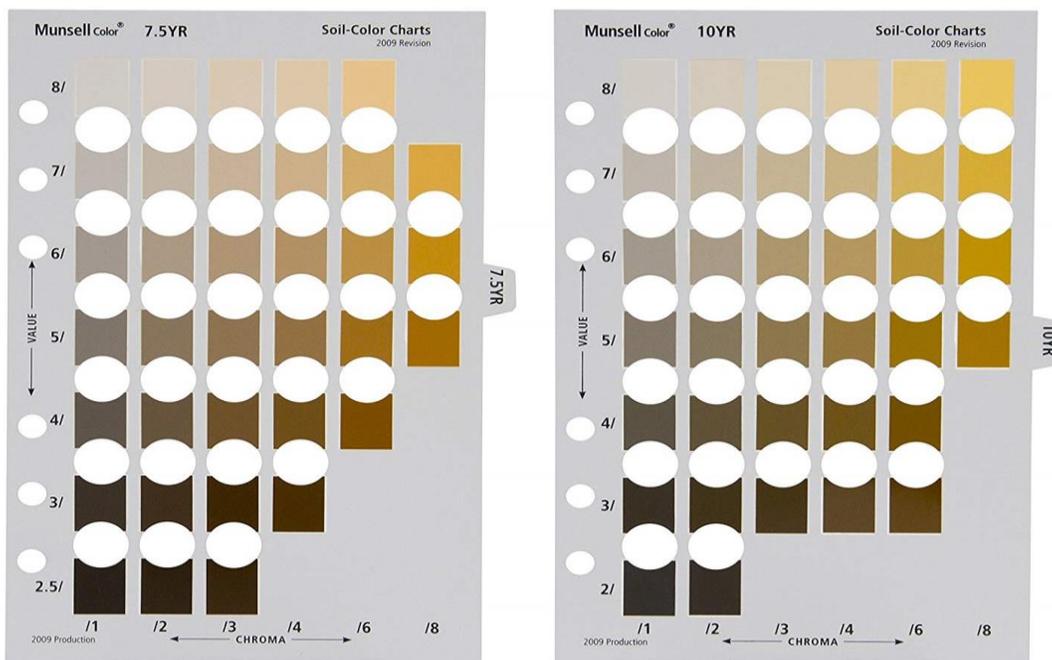


Figura 7. Tabla cualitativa de Munsell para la clasificación del sustrato del jal de acuerdo con su variación colorimétrica.

11.2.2 Determinación de pH

Para la determinación de pH, se utilizó el procedimiento del *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de suelos contaminados* (Fernández Linares *et al.*, 2006). Se colocó 1.0g de muestra en 10mL de agua destilada, y se agitó sobre una parrilla de oscilación durante un minuto. Transcurrido el tiempo, se dejó reposar durante un minuto y se realizó la lectura con un potenciómetro marca *Thermo Scientific* modelo H03062 (Figura 8).

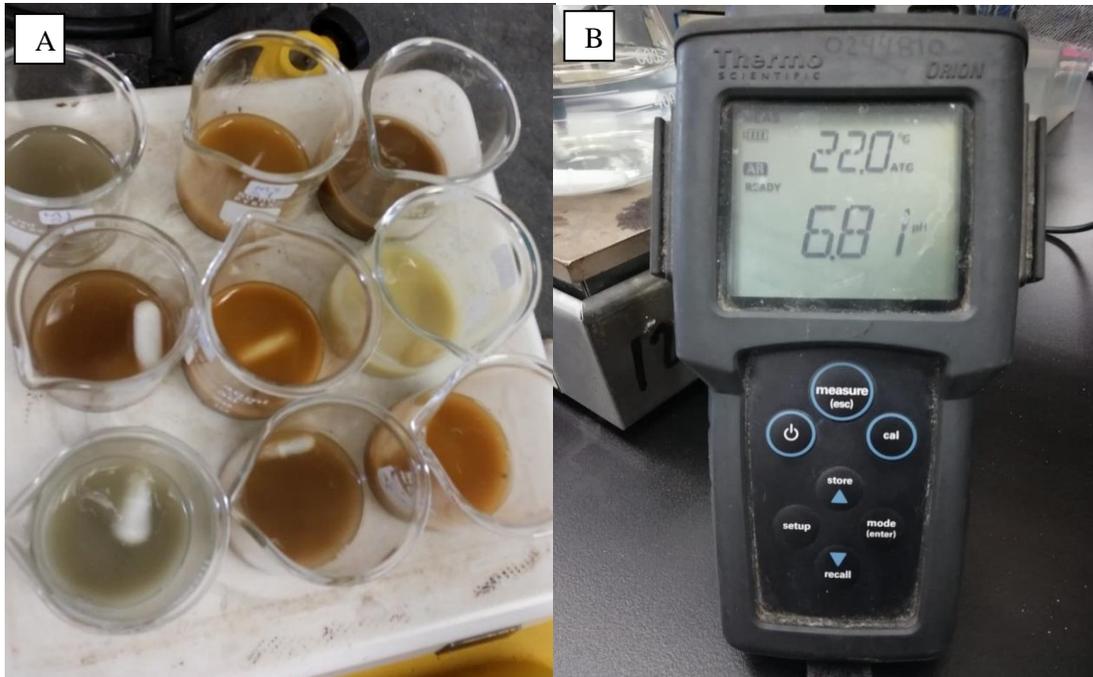


Figura 8. Determinación del pH. (A) Muestras en agitación; (B) Potenciómetro utilizado para la medición de pH de las muestras.

11.3 Comparación de medios de cultivo

Para el análisis microbiológico, se compararon las condiciones de crecimiento utilizando tres medios de cultivo: medio de cultivo aerobio para BOA (MCA) (Luo, *et al.*, 2013), *Thiobacillus* agar (TA) y *Thiobacillus acidophilus* agar (TAC) (Starosvetsky, Zukerman, y Armon, 2013) (Anexo 1). También se probó la eficacia de tres indicadores de pH (azul de bromofenol, rojo fenol y verde de bromocresol) con el fin de confirmar la disminución de pH por la oxidación de los compuestos reducidos del azufre y, como consecuencia, la producción de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Figura 9). Para establecer las condiciones ideales de crecimiento, se consideraron tres variables: pH del medio de cultivo, días de incubación y temperatura.



Figura 9. Medio de cultivo para aislamiento de BOA. (A) Medio de cultivo aerobio (MCA) con indicador rojo fenol; (B) Medio de cultivo *Thiobacillus* agar (TA) con azul de bromofenol; (C) Medio de cultivo *Thiobacillus acidophilus* agar (TAC) con verde de bromocresol.

11.4 Procesamiento de muestras para los análisis microbiológicos

El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio bajo condiciones de esterilidad. Se pesó 1.0g de muestra y se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) en solución salina estéril al 0.85%. Posteriormente, se prepararon los tres medios de cultivo específicos para BOA y las muestras fueron sembradas en medio sólido (Cajas Petri) (Figura 10).

Para el crecimiento microbiano, las cajas Petri se mantuvieron a 30°C en una incubadora Marca Felisa modelo FE133AD, el tiempo de incubación se determinó hasta que se observó el crecimiento de las colonias.



Figura 10. Procesamiento de las muestras para el aislamiento de las BOA. (A) Preparación de diluciones seriadas; (B) Coloración de las muestras sembradas; (C) Siembra de muestras en medio de cultivo selectivo.

11.5 Clasificación por morfología colonial y estimación de las unidades formadoras de colonias (UFC)

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la cuantificación del número de colonias y descripción morfológica (criterios: forma, elevación, margen y color) (Arellano *et al.*, 2005). Para realizar la caracterización morfológica de las colonias se observaron en un microscopio estereoscopio marca Zeiss Stemi modelo DV4 (Figura 11).

Se cuantificaron los diferentes morfotipos coloniales para estimar las unidades formadoras de colonias (UFC), considerando un intervalo de crecimiento de 30 a 250 colonias por caja sembrada. Lo que proporcionó la abundancia del morfotipo por sitio de muestreo.

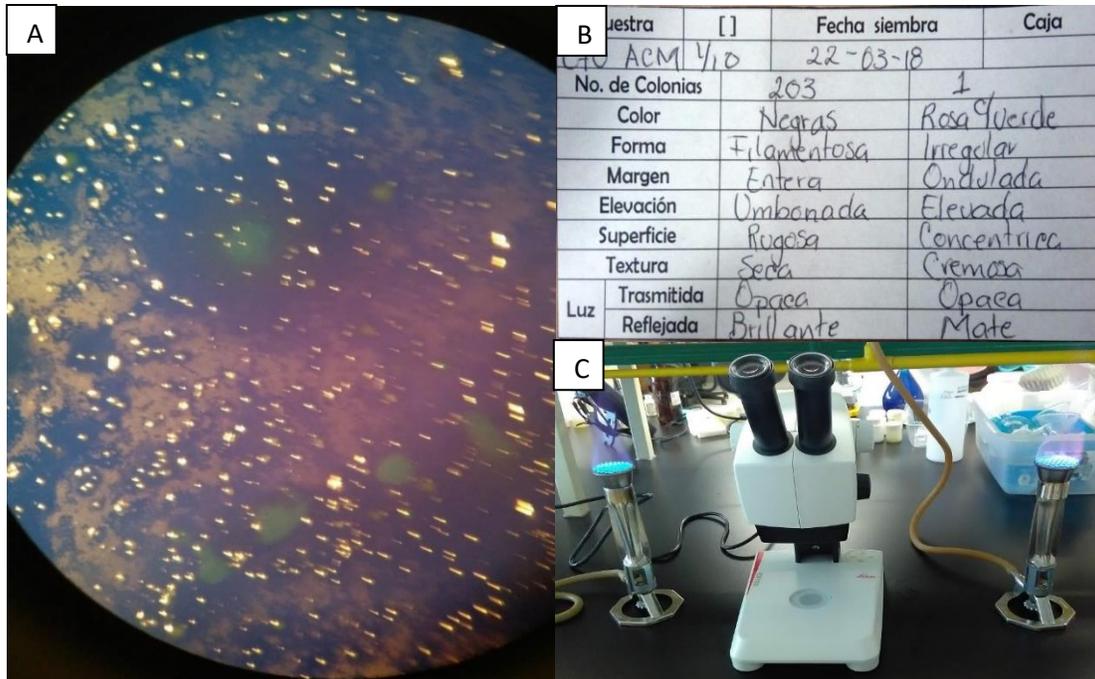


Figura 11. Caracterización morfológica de colonias. (A) Crecimiento de colonias bacterianas en medio de cultivo sólido; (B) Formato individual para cuantificación de morfotipos bacterianos en caja Petri. (C) Observación morfológica de colonia usando microscopio estereoscópico en zona estéril.

11.6 Determinación de índices de diversidad

Una vez obtenido el número total de colonias, se realizó la determinación de la diversidad alfa por medio de la estimación de los índices de Shannon-Weiner (H'), Simpson ($1-D'$) y dominancia de Simpson (D'), y la diversidad beta por los índices de equitatividad (J') y Jaccard (I_j).

11.7 Obtención de cultivos axénicos

Después del período de incubación, se realizó el conteo de colonias viables y se calcularon las unidades formadoras de colonias. Se aisló el 10% o un número representativo de acuerdo con la cantidad de colonias que crecieron en cada muestra (Figura 12).

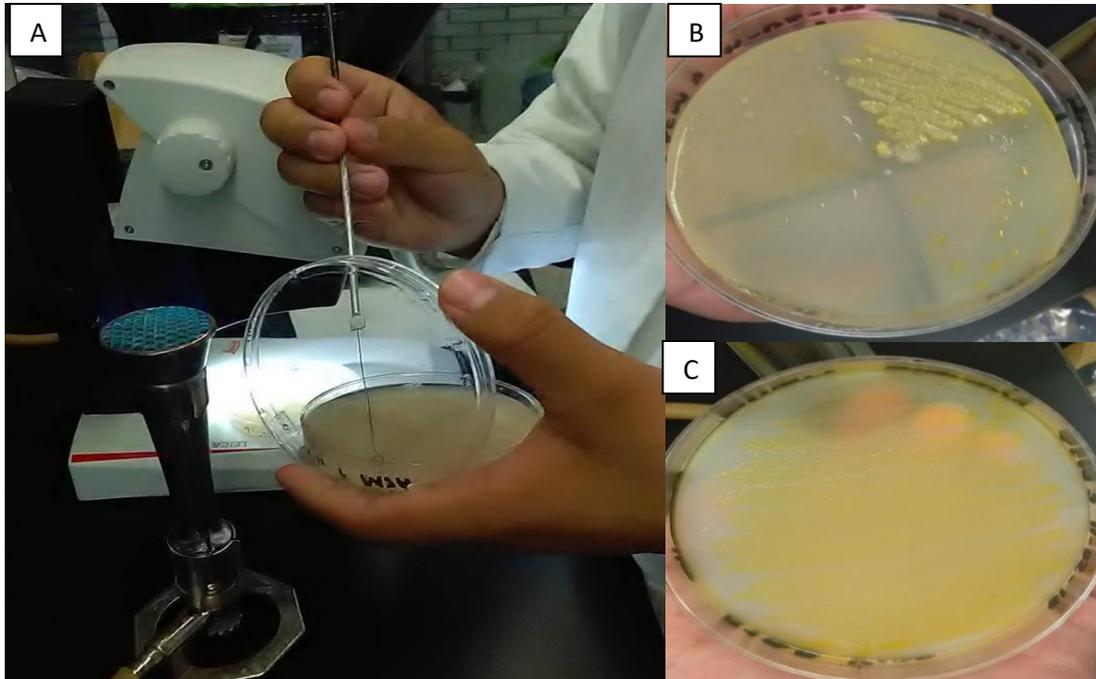


Figura 12. Obtención de cultivos puros. (A) Técnica de estriado para obtención de aislados, (B) Aislado de BOA por cuadrante, (C) Cultivo axénico.

11.8 Caracterización fenotípica

Se realizaron cinco pruebas para la caracterización fenotípica: tinción de Gram, crecimiento a diferente pH, formación de biopelícula, resistencia a antibióticos y prueba de catalasa. Para la realización de las pruebas se utilizó cultivo fresco, con un tiempo de incubación de 24 a 48 h (Figura 13).

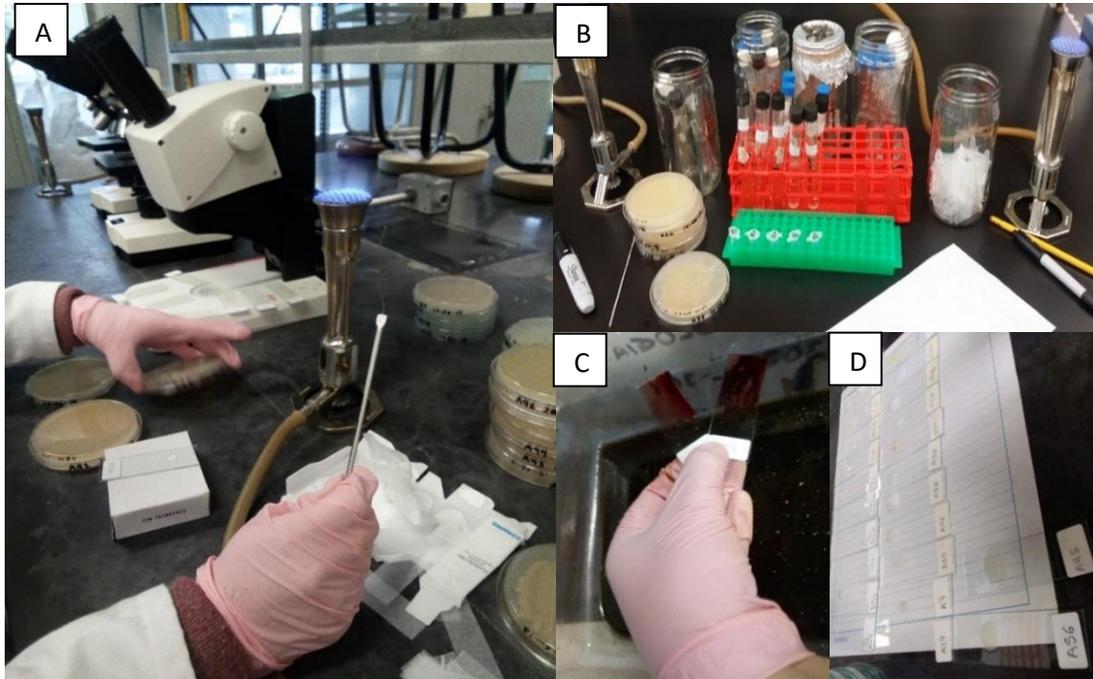


Figura 13. Caracterización fenotípica de las colonias. (A) Toma de muestra para la caracterización, (B) prueba de formación de biopelícula y resistencia a antibióticos (C) Tinción de Gram (D) prueba de catalasa.

11.8.1 Tinción de Gram

Para la tinción de Gram se realizó una siembra por estriado en ángulo recto de cada uno de los morfotipos, y se incubaron de 24 a 48 h. Una vez obtenida la biomasa de los aislados, se realizaron frotos en portaobjetos, se cubrió la preparación con cristal violeta, y se movió suavemente el portaobjetos para distribuir el colorante por las células, una vez transcurrido 1.0 minuto se enjuagó con abundante agua destilada. A continuación, se cubrió con Lugol y se dejó actuar por 1.0 minuto y, después de enjuagarse, se retiró el colorante sobrante con una mezcla de alcohol-acetona y agua para detener la acción del colorante. Finalmente, se agregó safranina por 1.0 minuto y se enjuagó con agua destilada y la muestra se dejó secar al aire. Después se observó a 100x en un microscopio marca Zeiss Stemi modelo DV4.

11.8.2 Prueba de crecimiento a diferente pH

Se preparó medio de cultivo líquido a diferente pH (medio de cultivo aerobio para BOA, *Thiobacillus* agar y *Thiobacillus acidophilus* agar). Se esterilizó y en tubos Erlenmeyer con taparrosca de baquelita estériles se colocaron 10mL del medio líquido seleccionado. Con diferentes morfotipos se inoculó cada tubo con un asa bacteriológica y en condiciones de

asepsia. Se realizaron dos lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm para estimar la biomasa producida, la primera lectura después de 24 h de incubación a 30.5 °C y la segunda a las 48 h.

11.8.3 Prueba de formación de biopelícula

La prueba de formación de biopelícula se realizó por el método de placa de microtitulación (O'Toole, 2011). Una vez obtenidos los aislados de los morfotipos, se tomó un aproximado de 5 a 10 colonias y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.0mL con medio de cultivo estéril y se incubaron a 30.5 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 100µL de cada tubo en una placa de microtitulación, cada prueba se realizó por duplicado. Se incubó nuevamente por 24 h a 30.5°C. Después del período de incubación se eliminó el medio líquido de la placa volteando su contenido sobre papel absorbente, se lavó la placa sumergiéndola en un recipiente con agua, se quitó el excedente de agua cuidadosamente y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 125µL de solución cristal violeta al 0.1% a cada pozo de la placa de microtitulación, ésta se mantuvo por 15 minutos, se enjuagó nuevamente sumergiéndola en agua en repetidas ocasiones hasta eliminar por completo el colorante restante o cualquier residuo. Una vez limpia y seca, se realizó el registro de los resultados obtenidos.

11.8.4 Prueba de resistencia a antibióticos

Para realizar la prueba de resistencia, se seleccionaron tres antibióticos: tetraciclina de 30µg, gentamicina de 10µg y amikacina de 30µg. Utilizando un asa bacteriológica estéril, se inoculó la caja Petri con una muestra de biomasa de la bacteria a analizar, aplicando un estriado recto a lo largo de toda la superficie del medio de cultivo, se colocaron los discos de antibióticos sobre el agar, utilizando pinzas de disección previamente esterilizadas al mechero. Los discos se colocaron distribuidos de manera que no tenga contacto con la pared de la caja (15mm) y de distancia entre ellos (30mm). Se incubaron a 30.5°C por 24 y 48 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se identificaron los procesos de inhibición mediante la formación del halo alrededor del disco del antibiótico y se midió el diámetro del área de inhibición.

11.8.5 Prueba de catalasa

Para la prueba de catalasa, se utilizaron aislados axénicos frescos de cada uno de los morfotipos, con la ayuda de un asa bacteriológica se colocó biomasa fresca sobre un portaobjetos y con la ayuda de un gotero, se le agregó peróxido de hidrógeno al 30%, distribuyéndolo sobre la muestra para permitir la interacción inmediata con el reactivo.

11.9 Identificación genética

La extracción de DNA se realizó por medio de la incubación de las colonias a 56 °C durante 2.0 h. Con 100µL de buffer TE (Tris- HCl 10 mM pH 8, y EDTA 1 mM pH 8) y 10µL de proteinasa K (14mg mL⁻¹). Posteriormente, se colocaron en una placa de calentamiento a 100°C durante 10 min y se centrifugó a 1x10⁵ rpm por 15 s, se quitó el sobrenadante y se pasó a otro tubo. Se almacenó a -20°C hasta su uso (Figura 14).

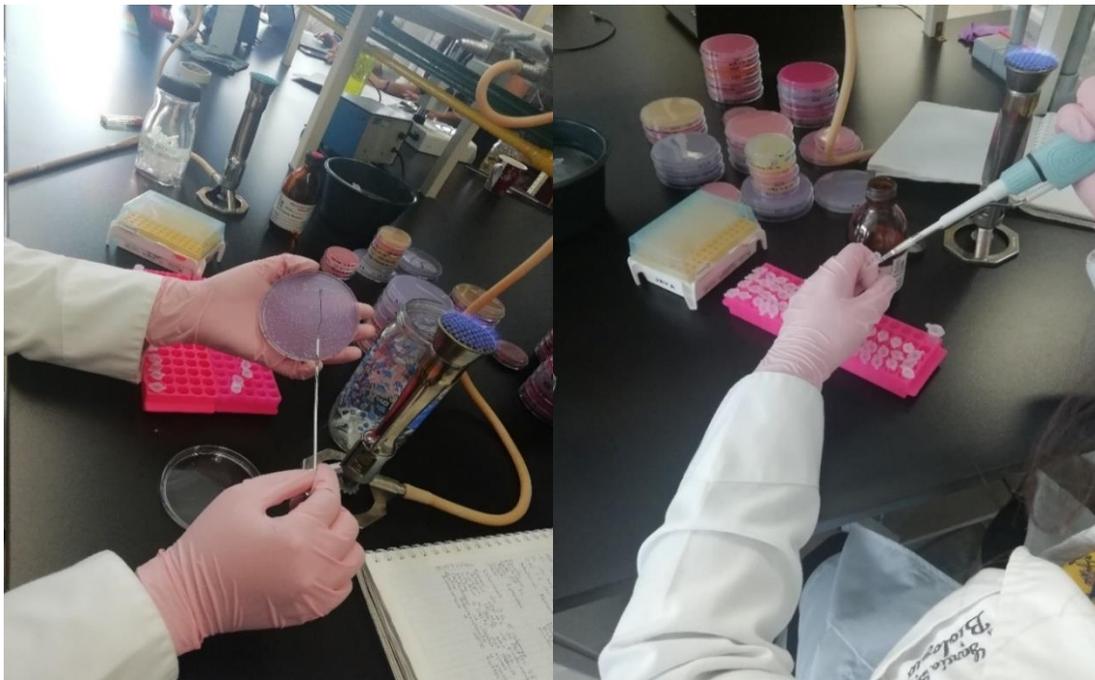


Figura 14. Extracción de DNA para la identificación genética. (A) Toma de muestra de cultivo fresco. (B) Preparación de muestra para la extracción.

Una vez obtenidos los aislados puros, se realizó la identificación genética de la diversidad microbiana a través de la amplificación del gen ribosomal 16S (ARNr 16S). Los productos de la amplificación fueron secuenciados para obtener la composición nucleotídica de cada gen ARNr 16S. A través de programas bioinformáticos (BioEdit), se revisó la calidad de la secuencia y se comparó con bases de datos para inferir su identidad (GenBank, NCBI) (Valdivia-Anistro, 2016). Con la información obtenida de las bases de datos se construyó un árbol filogenético con el programa MEGA 7.0 para establecer la relación evolutiva y funcional en relación con los procesos de oxidación del azufre en el jal.

11.10 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico multivariado para identificar la relación de los parámetros ambientales con la diversidad de BOA en los residuos del jal “La Concha”.

12. RESULTADOS

12.1 Muestreo

Se realizaron ocho muestreos en un periodo de un año, el primer muestreo se realizó el 2 de septiembre del 2016 y el último el 27 de octubre del 2017, con el fin de monitorear la variación colorimétrica en diferentes condiciones climáticas. Las temperaturas más altas se registraron en los meses de marzo y mayo del 2016, siendo las máximas temperaturas registradas de 30.6°C y 30.9°C, respectivamente; mientras que la temperatura más baja se observó en el mes de octubre del 2016 con 8°C. Los meses más lluviosos son septiembre del 2016 con 233 mm y agosto del 2017 con 260 mm (Tabla 1).

Tabla 1. Variación climática de los meses de muestreo durante el 2016-2017

	2016			2017				
	Sep.	Oct.	Nov.	Feb.	Mzo.	May.	Ago.	Oct.
Temp. Media (°C)	19.25	18.6	17.12	20.6	22.7	24	20.9	20.6
Temp. Mínima (°C)	14	12.2	8.5	13.1	14.9	17.1	15.8	15.1
Temp. Máxima (°C)	24.5	25	25.75	28.1	30.6	30.9	26	26.1
Precipitación (mm)	233	90	13	6	6	91	260	92

Se establecieron seis sitios de muestreo: el sitio A, se encuentra al sur del jal, sustrato totalmente expuesto sin vegetación; el sitio B se localiza al este, presenta visualmente la mayor heterogeneidad en cuanto a la variación colorimétrica, además, muestra evidencia de escurrimiento de agua; el sitio C se ubica al norte, en el cual aumenta la pendiente, la variación colorimétrica disminuye y las evidencias de perturbación del jal son evidentes; el sitio D se localiza al oeste, donde converge el río Cacalotenango, éste es el sitio con mayor homogeneidad y de tonalidad rosácea; el sitio E se encuentra en la parte superior del jal al suroeste, donde el sustrato está endurecido, existe vegetación bien establecida y durante la época de lluvias presenta una capa delgada de musgo y, finalmente, el sitio F se encuentra en la entrada de la mina, donde al momento del muestreo se encontraba una gran cantidad de agua, por lo que el sedimento es lodoso y de color pardo oscuro, además, se encuentra en completa oscuridad y la entrada del aire es poca, contrario al sustrato del jal.

En cada sitio se colectaron entre una y 25 muestras de acuerdo con tres factores: la presencia de las coloraciones, las condiciones climáticas y las características del sitio de muestreo (Figura 15).



Figura 15. Sitios de muestreo del jal "La Concha".

Se colectaron un total de 138 muestras de acuerdo con la heterogeneidad de cada sitio, distribuidas en ocho muestreos (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras colectadas durante el 2016-2017

2016			2017				
Septiembre	Octubre	Noviembre	Febrero	Marzo	Mayo	Agosto	Octubre
13	9	10	12	23	34	28	9

Valoración de parámetros

12.1.1 Determinación de color

Las tres coloraciones más representativas en los seis sitios de muestreo fueron: gris (19%), amarillas (29%) y pardas (49%); mientras que, en menores proporciones hay coloraciones rojizas (1%) y blancas (2%) (Figura 16; Anexo 2).

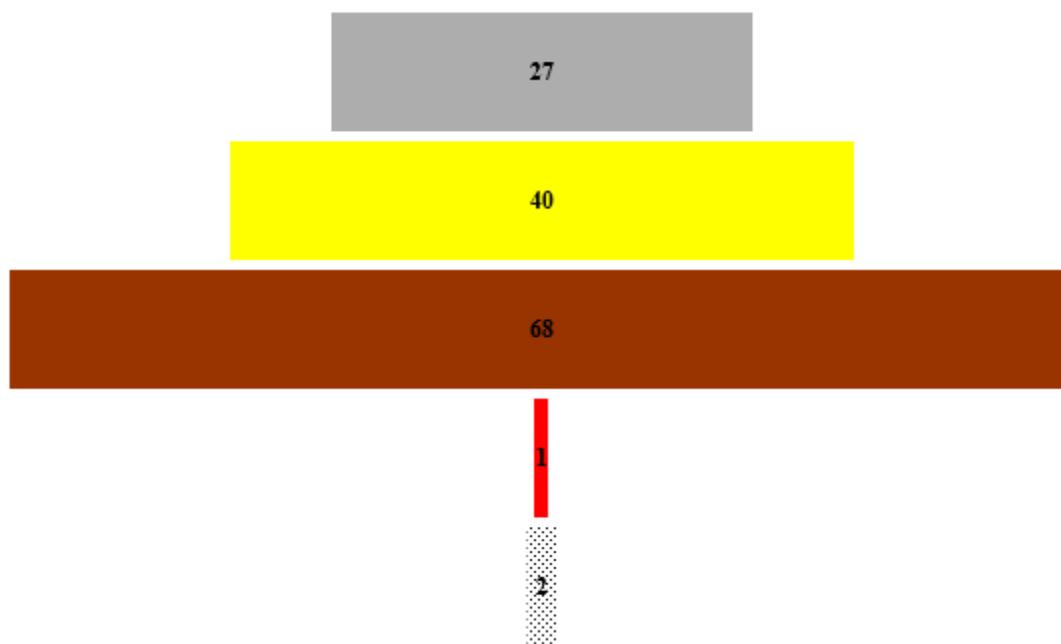


Figura 16. Representatividad de color de las muestras colectadas durante el 2016-2017.

De acuerdo con la tabla Munsell, se obtuvieron cinco colores y diferentes matices, en las tonalidades grises se determinaron cuatro matices, para las coloraciones amarillas se describieron cinco matices, once matices para las coloraciones pardas, en la tonalidad blanca se presentaron dos matices (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.;**

Tabla 3). Las tonalidades pardo son las más abundantes, seguidas de las amarillas y las grises, respectivamente; Se colectaron solo dos muestras de coloración blanca, una en el mes de marzo y otra en agosto, ambas en el 2017. Finalmente, la coloración roja se presentó únicamente en el muestreo del mes de marzo.



Figura 17. Determinación de color por método Munsell en placa de porcelana.

El sitio A se recolectaron 56 muestras, de las cuales el 43% son de color pardo, 32% son amarillas, las muestras grises con un 23% y las blancas con un 2%. De acuerdo con los meses de muestreo del 2016, en el mes de septiembre se tomaron dos muestras, una gris y otra parda, debido a la baja heterogeneidad; En el muestreo del mes de noviembre se colectaron seis muestras, una gris, dos amarillas y tres pardas.

Tabla 3. Clasificación de las muestras según su color de acuerdo con el sistema de clasificación de Munsell.

Color	Tonalidad	Matiz	Claridad y pureza
Gris	Gris	10 YR	5/1
		5 Y	6/1
		GLE Y 1	5/N
	Gris claro	5 Y	7/2
	Gris parduzco claro	2.5 Y	6/2
	Gris verdoso	Y GLE Y 1	6/10
Amarillo	Amarillo	10 YR	7/6
			8/8
		5 Y	8/6
			8/8
	Amarillo olivo	2.5 Y	6/6
		5 Y	6/6
	Amarillo pálido	2.5 Y	8/3
			7/4
		5 Y	8/4
			8/9
	Amarillo pardo	10 YR	6/4
	Amarillo rojizo	7.5 Y	4/3
Pardo	Pardo amarillento	10 YR	5/4
			5/6
	Pardo amarillento claro	2.5 Y	6/4
	Pardo amarillento oscuro	10 YR	4/6
	Pardo fuerte	7.5 10 YR	5/8
	Pardo grisáceo	10 YR	5/2
	Pardo grisáceo oscuro	2.5 Y	3/2
	Pardo olivo	2.5 Y	4/4
	Pardo olivo claro	2.5 Y	5/3
	Pardo olivo oscuro	2.5 Y	3/3
	Pardo pálido	7.5 YR	4/3
	Pardo rojizo claro	2.5 Y	7/4
Rojo	Rojo amarillento	5 YR	4/6
Blanco	Blanco	5 Y	6/1
		GLE Y 1	8/N

Por otro lado, en los muestreos del 2017, en el mes de febrero se colectaron cinco muestras una pardo, dos grises y dos amarillas; en el mes de marzo se colectaron diez muestras, dos grises, cinco amarillas y tres pardo; en el mes de mayo se tomaron trece muestras, de las cuales, ocho son de color pardo, tres grises y dos amarillas; en el muestreo de agosto, se colectaron once muestras, cuatro amarillas, cuatro pardas, dos grises y una blanca; se colectaron nueve muestras en el muestreo de octubre, donde cuatro son pardo, tres amarilla y dos grises (Figura 18).

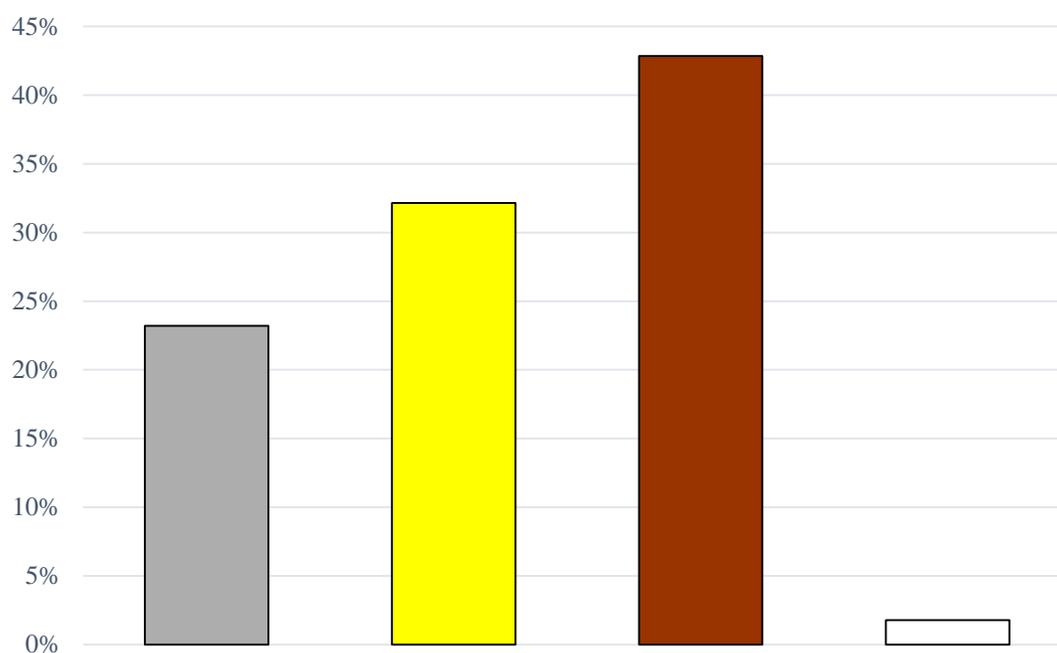


Figura 18. Porcentaje de color de las muestras del sitio A clasificadas con el sistema de Munsell.

En el sitio B se colectaron 44 muestras, este sitio presentó la mayor heterogeneidad, ya que se describieron las cinco coloraciones en al menos un muestreo, la coloración más abundante fue parda (56%), seguido de las coloraciones gris y amarilla (ambas con un 20%); finalmente, las coloraciones blancas y rojas con un 2% respetivamente. En cuanto a los sitios de muestreo, en septiembre del 2016 se colectaron en total seis muestras, de las cuales, cuatro fueron pardas, una gris y una amarilla, en octubre se colectó una muestra parda, en noviembre se colectaron cuatro muestras pardas. En el 2017, durante el mes de febrero se clasificaron seis muestras, de las cuales tres fueron pardas, dos amarillas y una gris, en marzo se

obtuvieron siete muestras, dos grises, dos amarillas, una parda, una blanca y una roja; en el mes de mayo se obtuvieron trece muestras en total, de las cuales siete son pardas, tres grises y tres amarillas; finalmente para el muestreo de agosto se obtuvieron siete muestras, cuatro pardas, dos grises y una amarilla (Figura 19).

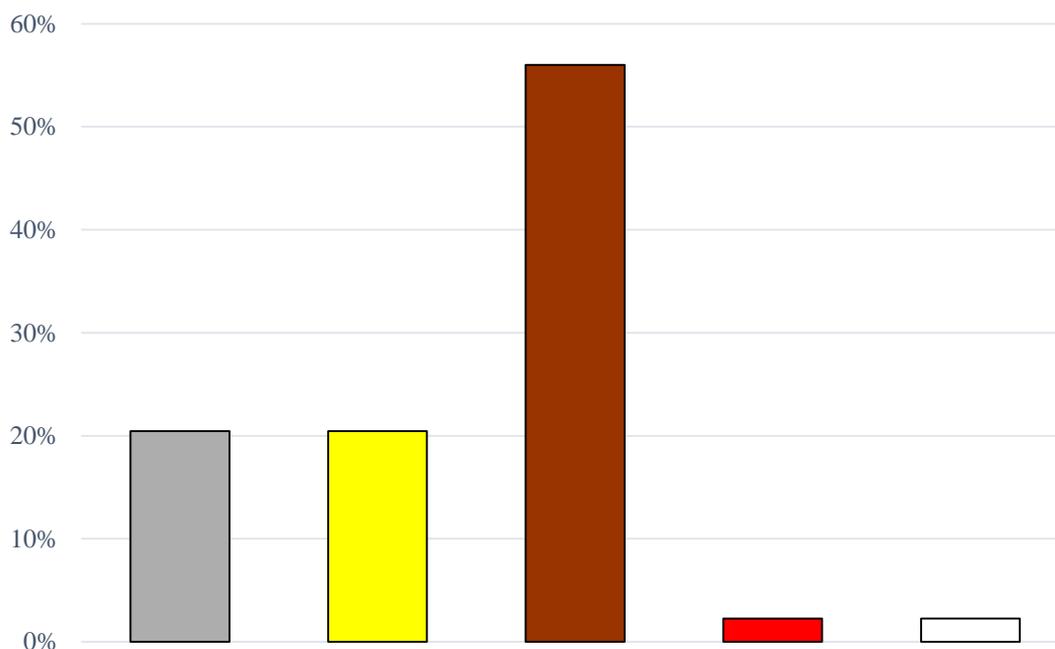


Figura 19. Porcentaje de color de las muestras del sitio B clasificadas con el sistema de Munsell.

En el sitio C, se colectaron 21 muestras, de las cuales, el 48% son pardas, el 33% son amarillas y las grises con un 19%. En este sitio solo se realizaron cuatro muestreos, en septiembre del 2016 se colectaron tres muestras pardo, en octubre se obtuvieron ocho muestras, de las cuales tres son pardas, tres grises y dos amarillas. Durante el 2017, en el mes de marzo se colectaron un total de cinco muestras, dos amarillas, dos pardas y una gris; y en el mes de mayo con cinco muestras, tres amarillas y dos pardas (Figura 20).

El sitio D se tomaron 13 muestras, fue donde se encontró la mayor homogeneidad a diferencia con la variación en la periferia del jal, las coloraciones más abundantes son pardas y amarillas con un 54% y 38%, respectivamente, mientras que solo se caracterizó una muestra de color gris (~8%). Las muestras de este sitio se tomaron en tres muestreos del 2017, en febrero se colectó una muestra amarilla, en el mes de mayo se tomaron tres muestras dos amarillas y una parda; para el mes de agosto, donde la heterogeneidad en las coloraciones

fue mayor, se obtuvieron nueve muestras, de las cuales seis son pardas, dos amarillas y una gris (Figura 21).

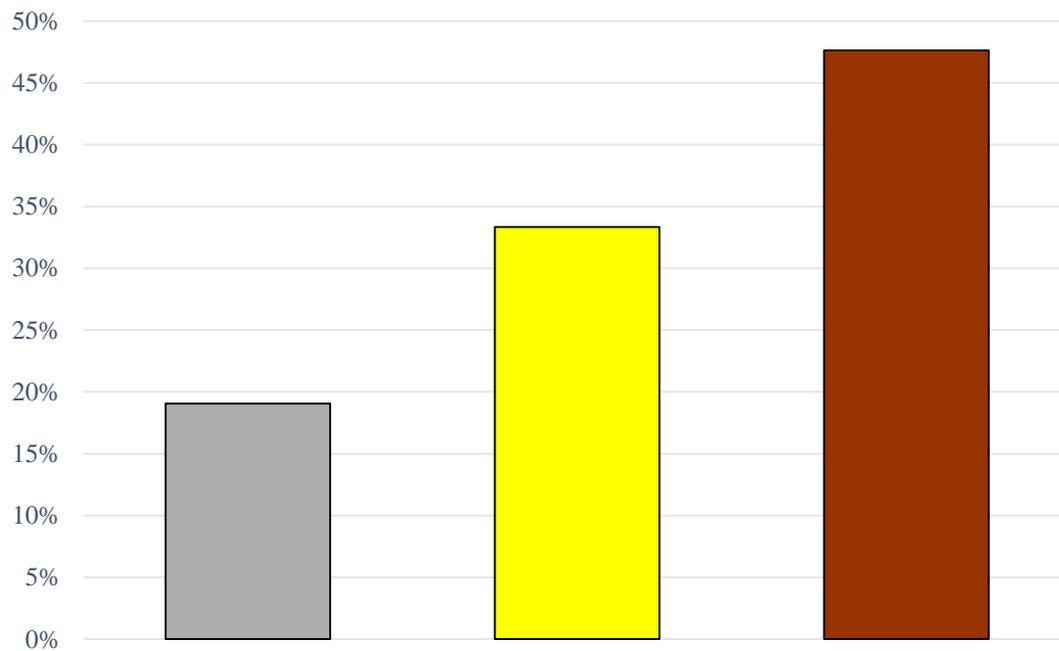


Figura 20. Porcentaje de color de las muestras del sitio C clasificadas con el sistema de Munsell.

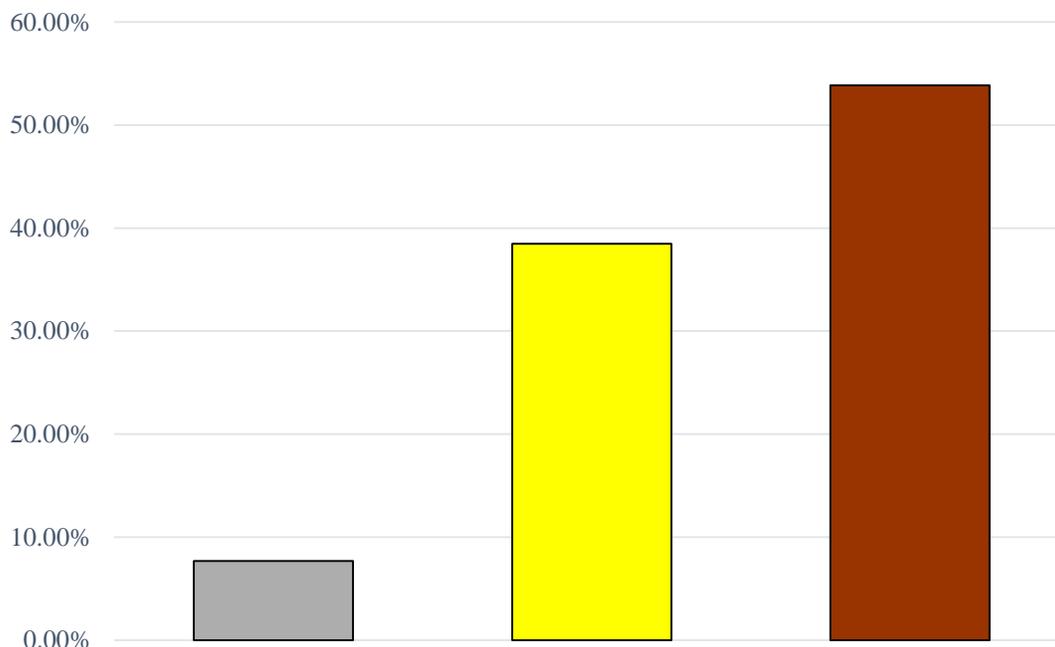


Figura 21. Porcentaje de color de las muestras del sitio D clasificadas con el sistema de Munsell.

El sitio E al encontrarse en la parte superior y en condiciones de homogeneidad, solo se tomaron dos muestras en el 2017, una en el mes de marzo de color pardo y otra en el mes de agosto de color amarilla. Por otro lado, debido a que el sitio F se encontraba inundado al momento del muestreo se tomaron dos muestras, ambas de color pardo en el mes de septiembre del 2016.

12.1.2 Determinación de pH

El promedio de los pH más altos se calculó en septiembre con 6.42 unidades, mientras que, el promedio más bajo se registró con 2.21 unidades en el muestreo de febrero del 2017, todos los valores promedio están dentro de los pH ácidos y la tendencia es de alrededor de 4.00 unidades. Los valores más altos se encuentran en la neutralidad con valores de 7.00 y los valores más ácidos se encuentran en pH de entre 1.00 y 2.00 unidades (Tabla 4).

Tabla 4. Comportamiento del pH de las muestras de acuerdo con los muestreos.

Muestreo	Mínimo	Máximo	Promedio	
2016	Septiembre	2.13	8.56	6.42
	Octubre	1.13	7.79	4.09

	Noviembre	1.13	7.92	3.47
	Febrero	0.06	6.69	2.21
	Marzo	1.80	7.30	3.58
2017	Mayo	1.62	7.60	4.07
	Agosto	2.69	7.08	4.11
	Octubre	2.00	7.10	4.11

Del total de las muestras, se obtuvo un máximo de 8.56 unidades en el mes de septiembre del 2016 y un mínimo de 0.06 en el mes de febrero del 2017, ambos valores pertenecen a muestras del sitio A. Los pH más bajos se cuantificaron en las muestras amarillas, y aunque el valor más alto se presentó en una muestra gris, la tendencia de los pH más altos se encuentra en las muestras pardo. Las medidas de tendencia central para las coloraciones grises, con un máximo de 8.56 unidades, un mínimo de 1.13 unidades, con una media de 3.08 y una desviación estándar de 1.88, se obtuvo una mediana de 2.6; para las muestras amarillas, se presentó un máximo de 7.4 unidades y un mínimo de 0.06 unidades, se calculó una media de 3.28 con una desviación estándar de 1.73 y una mediana de 3.30; para las muestras pardas, el valor máximo obtenido fue de 8.02 unidades y un valor mínimo de 1.13 unidades, también se calculó la media y la desviación estándar con un valor de 4.88 y 1.96 respectivamente; finalmente, para las dos muestras blancas una con 1.8 unidades y otra con 4.19, la media obtenida fue de 2.99, la desviación estándar con 1.68 y una mediana de 2.99 (Figura 22; Anexo 3).

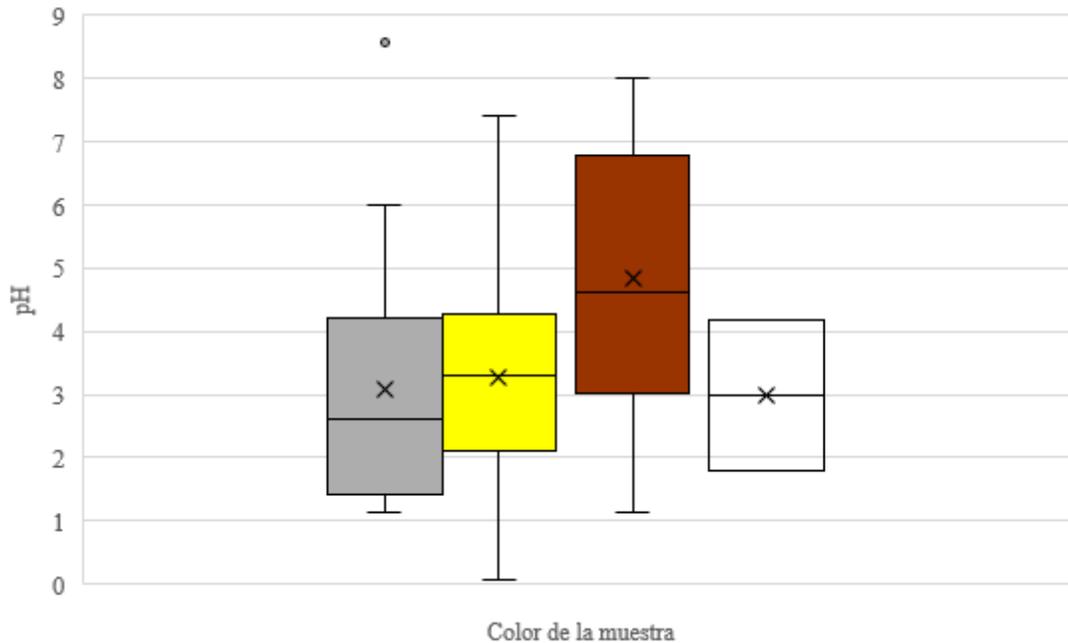


Figura 22. Valores de pH clasificados por color de las muestras recolectadas durante el 2016-2017.

En el sitio A, en las muestras grises el valor de pH más alto fue de 8.56 unidades registrado en el mes de septiembre del 2016, el valor mínimo fue de 1.13 unidades en el mes de febrero del 2017. En las medidas de tendencia central, la media fue de 3.47, la desviación estándar 2.18 y una mediana de 2.8; para las muestras amarillas, el valor más alto fue de 7.4 unidades en el mes de mayo del 2017 y el mínimo fue de 0.06 en febrero del 2017, la media fue de 3.20, la desviación estándar de 1.78 y la mediana con 3.27; mientras que, para las muestras pardas el valor máximo registrado fue de 7.92 y el valor mínimo es de 1.13, ambas muestras fueron tomadas en el mes de noviembre del 2016, se calculó una media de 4.07, una desviación estándar de 1.86, y la mediana de 3.58. En este sitio se tomó una muestra blanca en el mes de agosto del 2017 con un pH de 4.19 (Figura 23).

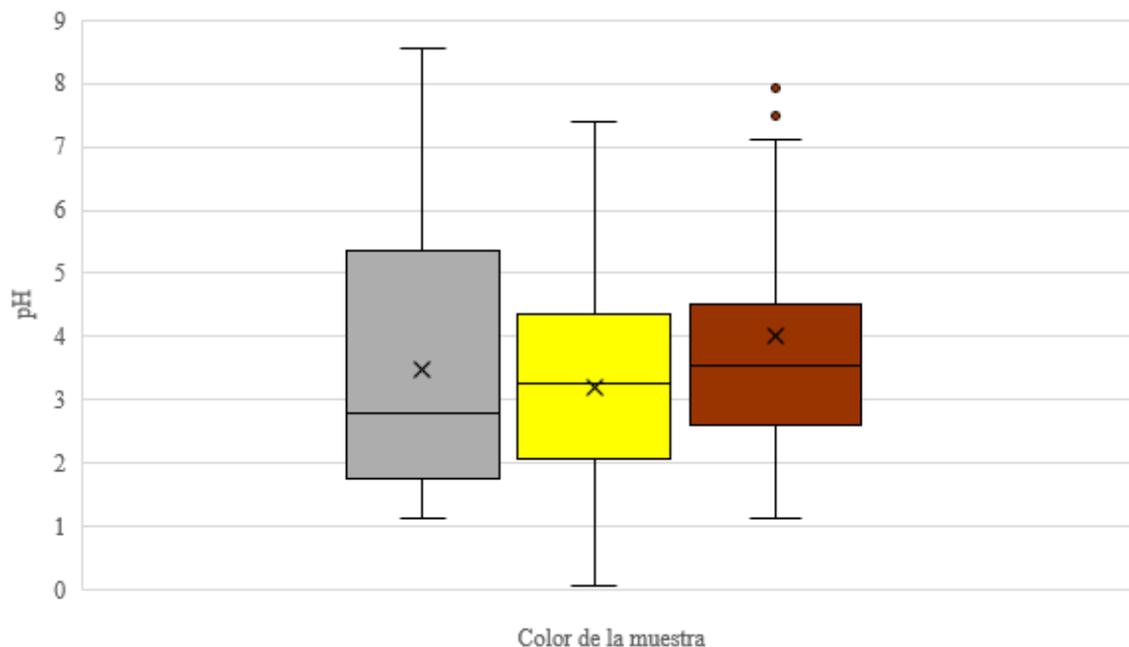


Figura 23 Valores de pH clasificados por color del sitio A.

Para el sitio B, en las muestras grises, el valor más alto de pH se midió en mayo del 2017, con un valor de 6 unidades, el valor mínimo fue de 1.31 unidades en el mes de febrero del 2017, el valor de la media fue de 3.07, la desviación estándar fue de 1.68 y la mediana de 2.26; en las coloraciones amarillas, el valor más alto fue de 7.07 en el mes de septiembre del 2016 y el valor mínimo fue de 0.69 en febrero del 2017, la media fue de 2.61, la desviación estándar fue de 1.95 y la mediana de 2.1; para las muestras pardo el pH máximo medido fue de 7.91 en el mes de septiembre del 2017 y el valor mínimo es de 1.6 en una muestra colectada en febrero del 2017, la media fue de 5.51 y la desviación estándar fue de 1.84 y la mediana de 6.36; la muestra blanca con un pH de 1.8 unidades y la muestra roja de 4.2 unidades fueron colectadas en el mes de marzo del 2017. Para este sitio los valores de pH de las tres principales coloraciones se colectaron en el mes de febrero del 2017 (Figura 24).

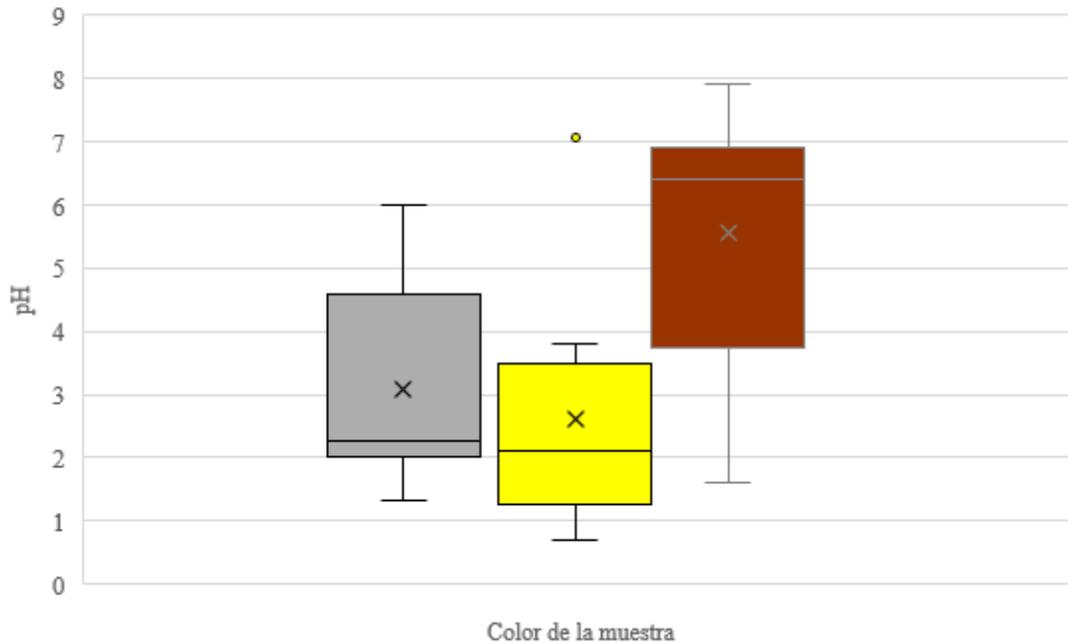


Figura 24. Valores de pH clasificados por color del sitio B.

En el sitio C, las muestras de tonalidades grises presentaron un pH máximo de 2.2 en una muestra recolectada en marzo, el pH más bajo se registró en octubre de 2016, con un valor de 1.33, se obtuvo una media de 1.58 y una desviación estándar de 0.41, la mediana fue de 1.41; para las muestras amarillas, el valor máximo fue de 5.89 en el mes de octubre del 2016, el valor más bajo fue de 1.62 obtenido de una muestra del mes de mayo del 2017, el valor de la media estuvo en 3.64, la desviación estándar en 1.37 y una mediana de 3.68; para las muestras pardo, se obtuvo un valor máximo de 7.6 y el valor mínimo fue de 2.13, ambos en el mes de septiembre, la media fue de 5.29, la desviación estándar fue de 2.11 y la mediana fue de 6.27 (Figura 25).

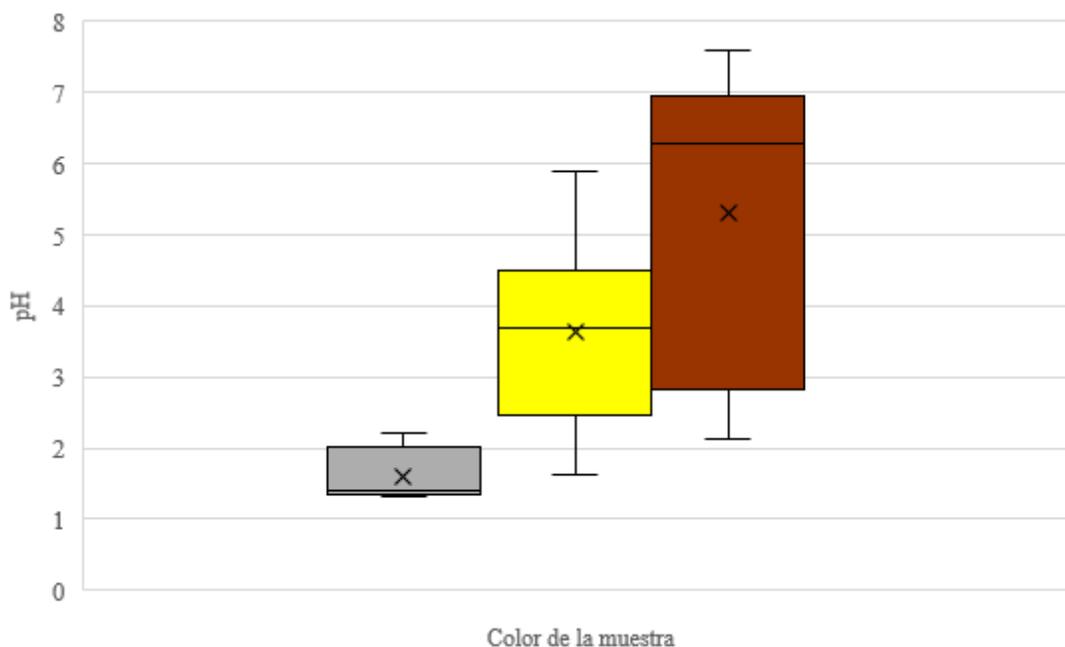


Figura 25. Valores de pH clasificados por color del sitio C.

En el sitio D, en las muestras amarillas se encontró el valor de pH más alto, con 6.69 en el mes de febrero y un valor mínimo de 2.26 en el mes de mayo, para las medidas de tendencia central, la media se valoró en 4.18, la desviación estándar 1.76 y una mediana de 3.79; para las muestras pardo, el valor máximo de pH fue de 5.73 y el pH más bajo fue de 2.89, ambos en muestras recolectadas en agosto del 2017, la media fue de 4.32 y la desviación estándar fue de 1.20 y la mediana fue de 4.48. Solo se tomó una muestra gris con 4.2 unidades en el mes de agosto del 2017 (Figura 26). En el sitio E, solo se tomaron dos muestras, una de color amarillo con un pH de 3.72 en agosto y una parda con 2.91 en el mes de marzo (Figura 27). Mientras que en el sitio F, las dos muestras son de color pardo y fueron tomadas en septiembre del 2016, una con un pH de 7.68 y 8.02. Una vez realizada la valoración de los parámetros, se seleccionaron 62 muestras para el análisis microbiológico. Los meses de mayor heterogeneidad en condiciones de diferentes pH y color (Tabla 5 y Tabla 6).

Tabla 5. Número de muestras seleccionadas para el análisis microbiológico.

Mes de muestreo	2016			2017				
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Febrero	Marzo	Mayo	Agosto	Octubre
Muestras seleccionadas	7	6	6	6	9	11	11	6

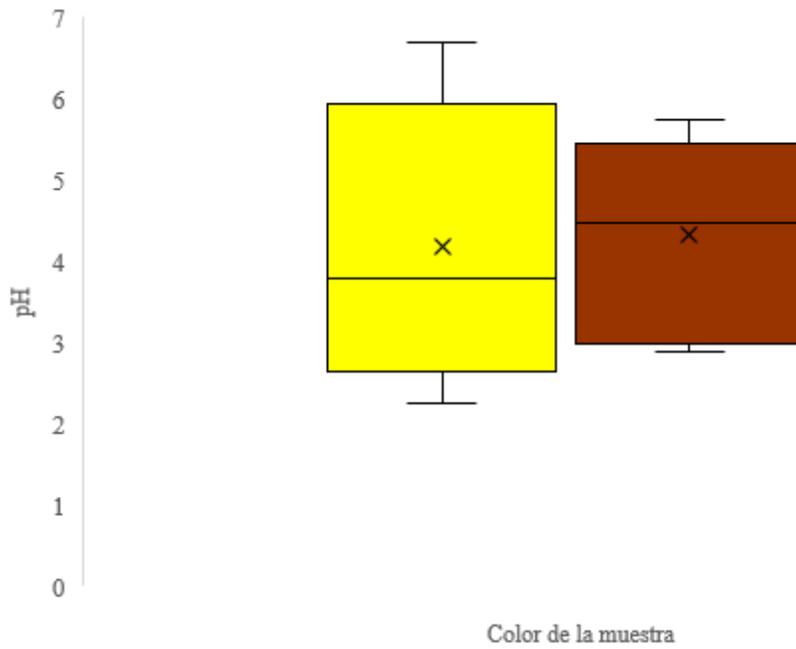


Figura 26. Valores de pH clasificados por color del sitio D.

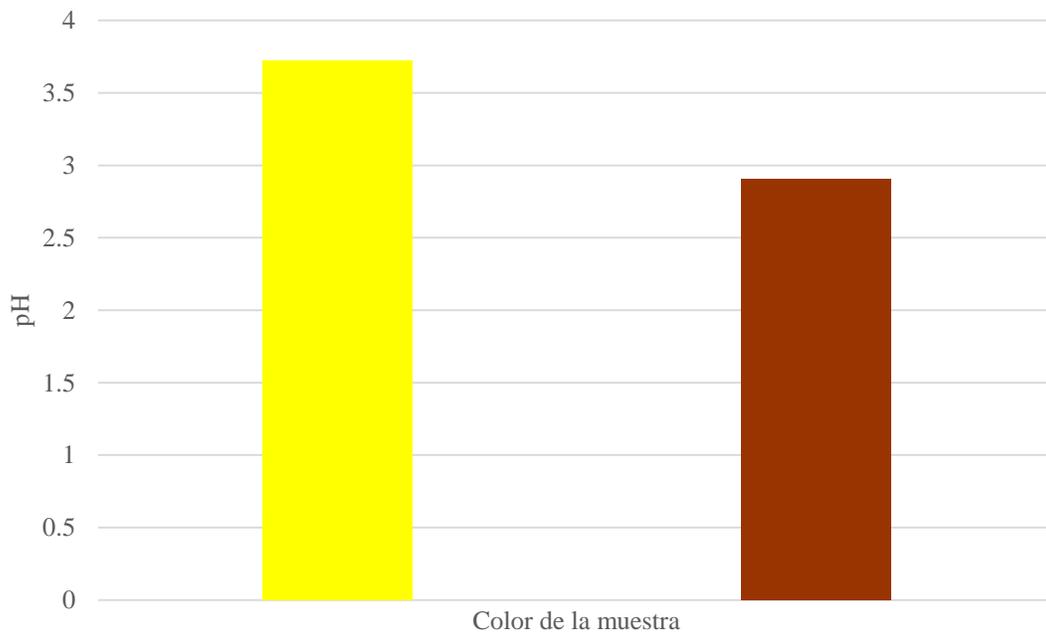


Figura 27. Valores de pH clasificados por color del sitio E.

Tabla 6. Relación entre pH, color y sitio de las muestras seleccionadas para el análisis microbiológico.

COLOR	pH	SITIO A	SITIO B	SITIO C	SITIO D	SITIO E	SITIO F
	Total de muestras	18	19	12	9	2	2
GRIS	1	A1N 1.31	B3F 1.31	C3O 1.33			
	2	A2O 2.90	B10MY 2.10	C5M 2.20			
	3	A4A 3.11	B2A 3.45				
	4				D4A 4.20		
	5	A3O 5.00	B7M 5.70				
	6		B2MY 6.00				
	7						
	8	A1S 8.56					
AMARILLO	0	A3N 0.83	B4F 0.70				
	1		B5M 1.80	C4MY 1.62			
	2	A9O 2.00	B6M 2.10	C5MY 2.45	D1MY 2.26		
	3	A8A 3.49	B3A 3.16	C7O 3.45	D2MY 3.04	E1A 3.72	
	4	A5O 4.20		C3M 4.50			
	5	A7M 5.01		C5O 5.89	D5A 5.16		
	6				D1F 6.69		
PARDO	1	A4N 1.13	B6F 1.60				
	2	A4O 2.70	B5F 2.44	C1O 2.21	D1A 2.8	E1M 2.91	
	3	A5N 3.54	B1N 3.00	C3MY 3.02	D7A 3.50		
	4	A1F 4.51	B2N 4.05	C1MY 4.79	D3MY 4.48		
	5		B3S 5.77		D9A 5.23		
	6	A2MY 6.80	B6S 6.42	C2O 6.82			
	7	A6O 7.10	B1O 7.79	C3S 7.60			F2S 7.68
	8						F1S 8.02
ROJO	1						
	2						
	3						
	4		B3M 4.20				
	5						
	6						
	7						
BLANCO	1		B2M 1.80				
	2						
	3						
	4	2	A1A 4.19				
	5						
	6						
	7						

12.2 Estandarización de medios de cultivo

El medio de cultivo selectivo de *Thiobacillus* agar (TA), cuya fuente de azufre es el tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) junto con otras sales sulfatadas presentó el mayor crecimiento bacteriano ($459,593 \text{ UFC g}^{-1}$); mientras que, el medio de cultivo aerobio para bacterias oxidantes del azufre (MCA), que contiene como única fuente de azufre el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, se calculó un total de $310,201 \text{ UFC g}^{-1}$. Finalmente, el medio *Thiobacillus acidophilus* agar (TAA), que tiene como fuente de azufre diferentes sales sulfatadas, presentó el menor crecimiento ($220,848 \text{ UFC g}^{-1}$) (Figura 28).

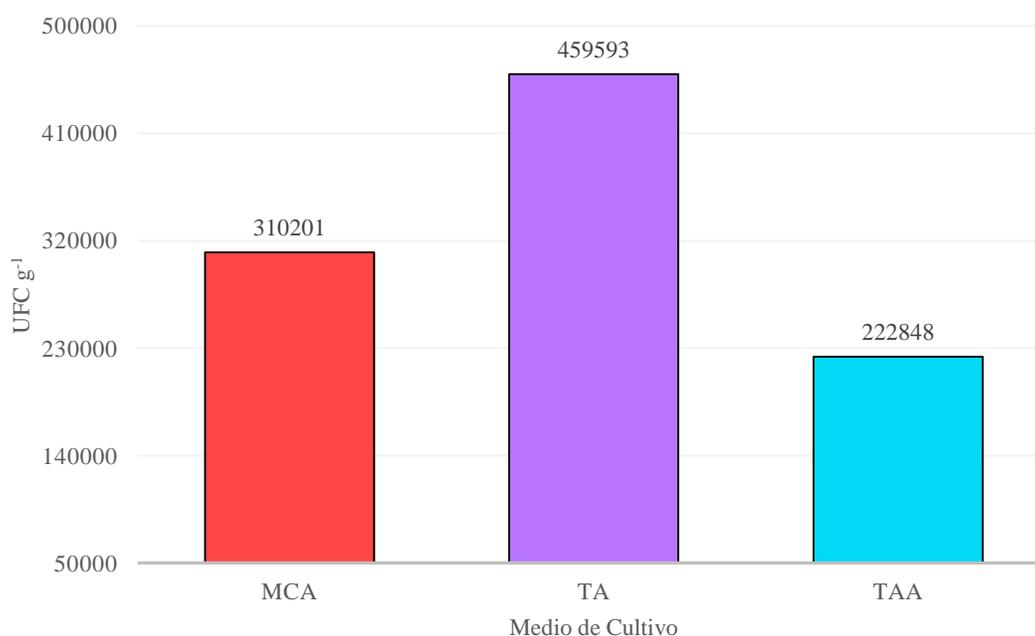


Figura 28. Crecimiento de las BOA estimado en UFC en los diferentes medios de cultivos selectivos.

La eficiencia de los tres medios de cultivo con respecto al mes de muestreo, el medio TA presentó una media de $44,925 \text{ UFC g}^{-1}$, un mínimo de $26,321 \text{ UFC g}^{-1}$ en el mes de noviembre del 2016, y un máximo de $66,121 \text{ UFC g}^{-1}$ en el mes de mayo del 2017. El MCA presentó un máximo de $56,897 \text{ UFC g}^{-1}$ en el mes de agosto del 2017 y un mínimo de $37,930 \text{ UFC g}^{-1}$ descrito en el mes de marzo del 2017 con una media de $40,047 \text{ UFC g}^{-1}$. Finalmente, el medio de cultivo TAA tuvo una media de $39,107 \text{ UFC g}^{-1}$, con un mínimo de $28,475 \text{ UFC g}^{-1}$.

g^{-1} registradas en el mes de octubre del 2016 y un máximo de 58,735 UFC g^{-1} para el mes de mayo del 2017.

De los meses de muestreo del 2016, en septiembre el medio MCA fue el más efectivo con un 38%, seguido del medio TAC con un 35% y el medio TA con un 27%; en octubre, el medio TA mostró mayor eficiencia con un 40%, después el MCA con un 31% y por último el medio TAC con 29%; para el mes de noviembre, el medio con mayor crecimiento fue TA con un 41%, seguido del medio TAC con un 36% y el medio ACM con un 23%. Por parte de los muestreos del 2017, en el mes de febrero el medio con un mejor crecimiento fue el medio TA con un 37%, el medio TAC con un 34% y el MCA con 29%; de las muestras analizadas del mes de marzo, un 40% de las UFC crecieron en el medio TA, 34% en el medio MCA y, por último, el medio TAC con un 26%; para el mes de mayo, el medio TA tuvo el mayor crecimiento con un 38%, después el medio TAC con un 33% y el MCA con un 29%; del mes de agosto, el MCA mostró la mayor abundancia con un 36%, seguido del medio TA con un 34% y el medio con TAC con un 30%; para el muestreo del mes de octubre, el medio más eficiente fue MCA con un 37%, seguido del medio TA con un 34% y el medio TAC con un 29% (Figura 29).

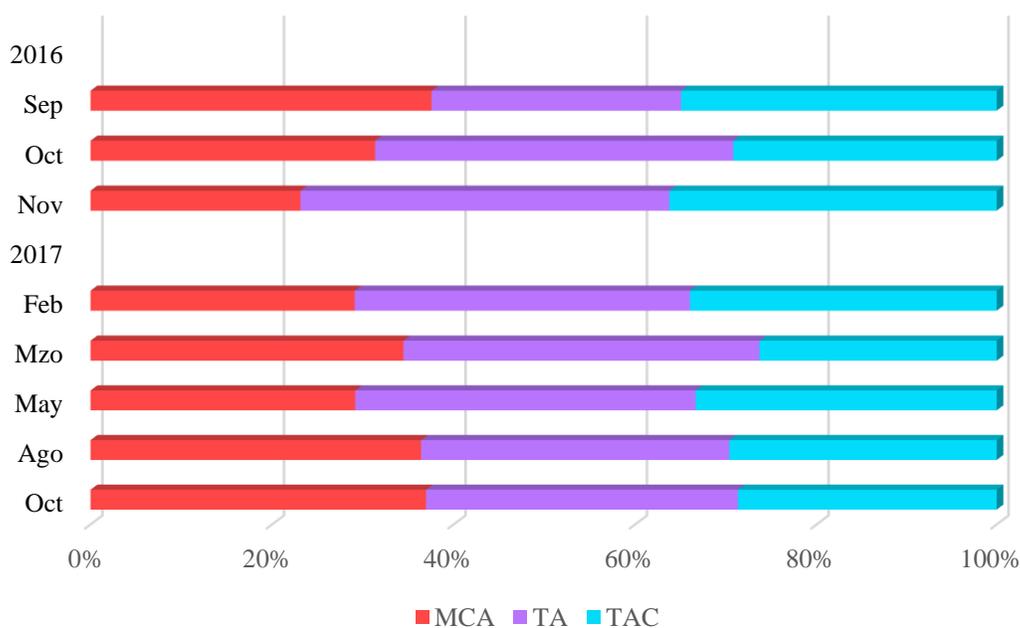


Figura 29. Porcentaje de crecimiento bacteriano de acuerdo con el medio de cultivo durante los muestreos del 2016-2017.

En función con el pH, el indicador que presentó cambios en la coloración debido a la producción de ácido sulfúrico (H_2SO_4) por acción metabólica de bacterias cultivadas. Del total de las muestras sembradas en medio de cultivo con indicador rojo fenol se observó un 93% de cambio en la coloración en el medio MCA. Por el contrario, el indicador verde de bromocresol (39%) en medio TAC y el indicador de azul de bromofenol (13%) en medio TA, fueron los que mostraron una menor proporción en el cambio de coloración (Figura 30). Siendo el azul de bromofenol el menos efectivo para la observación cualitativa de la disminución de pH (Figura 31). El cambio de color del medio dependía principalmente del pH de las muestras, es decir, en las muestras que tenían pH altos (>6.0), el cambio en el medio fue más notorio de aquellas que tenían pH bajos (<5.0).

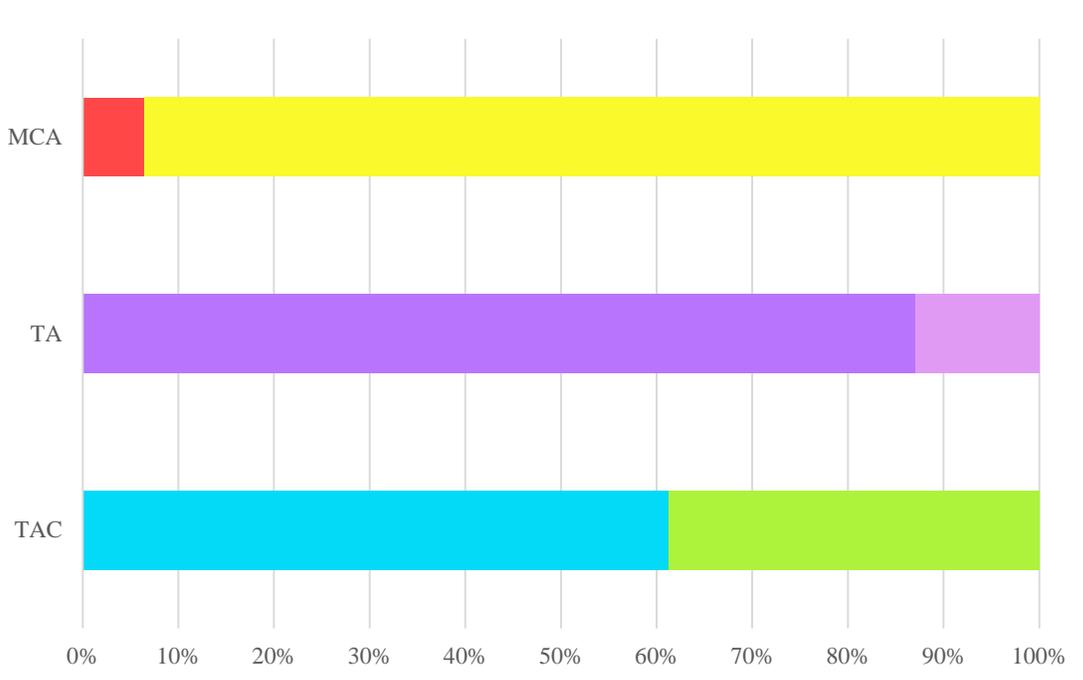


Figura 30. Porcentaje de variación colorimétrica de los indicadores de pH. A la izquierda se indica el color inicial del indicador, a la derecha el color generado por el cambio de pH en el medio de cultivo.

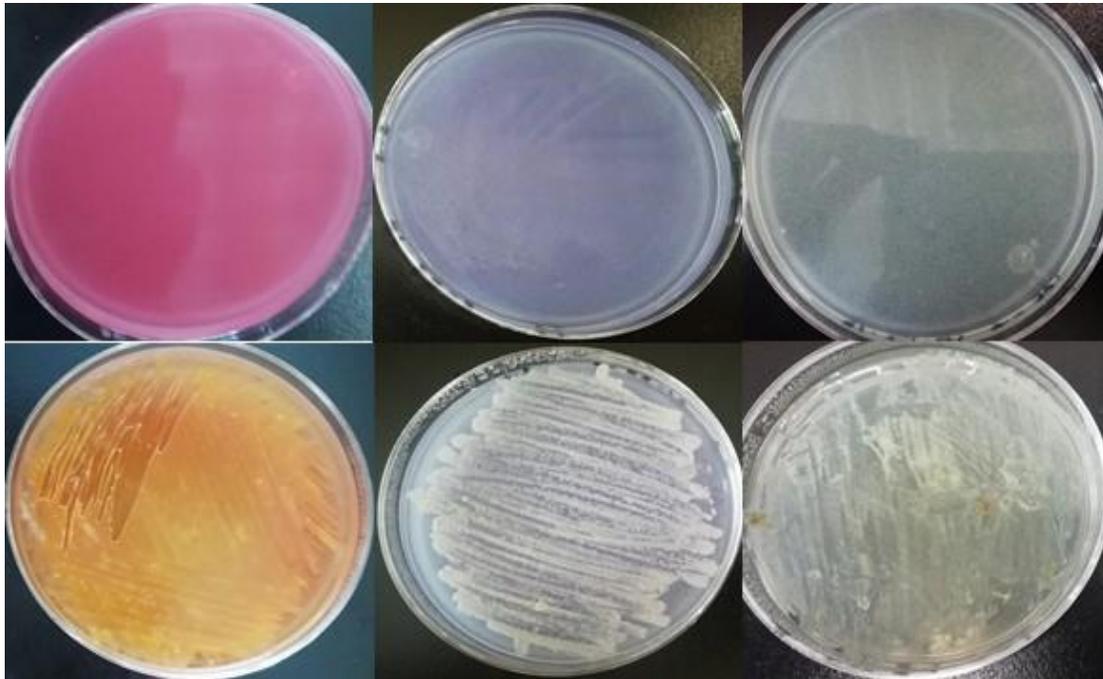


Figura 31. Cambio de color del indicador por disminución de pH. De izquierda a derecha: medio MCA, TA y TAC. Arriba el medio antes de la inoculación, abajo el cambio después de 24 h de incubación.

Con los resultados anteriores, se establecieron las condiciones ideales de crecimiento y aislamiento de las BOA: Las muestras se sembraron en medio de cultivo con diferente pH (pH 3, pH 5 y pH 7) en los tres medios de cultivo se obtuvo un mayor crecimiento y un mejor desarrollo de las colonias a pH 7. En cuanto a días de incubación, el mejor crecimiento se observó a los siete días y, el cambio de la coloración del indicador se observó a partir del tercer día de incubación. Aunque la temperatura media de la zona oscila entre los 17° y 24°C, el crecimiento bacteriano se desarrolló a una temperatura óptima de 30.5°C.

12.3 Determinación de los índices de diversidad

Los índices basados en la dominancia son parámetros inversos al concepto de uniformidad o equidad de la comunidad. Toman en cuenta la representatividad de las especies con mayor valor de importancia sin evaluar la contribución del resto de las especies. El índice de Simpson es un índice de dominancia que manifiesta la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de una muestra sean de la misma especie. Está fuertemente influido por la importancia de las especies más dominantes. En el jal, el valor del índice de Simpson (1-D) es de 0.89 y por lo tanto el índice de dominancia (D') es de 0.11, lo que refleja que hay una

alta diversidad de bacterias presentes en el sustrato y una baja dominancia. El índice de Shannon expresa la uniformidad de los valores de importancia a través de todas las especies de la muestra. Mide el grado promedio de incertidumbre en predecir a qué especie pertenecerá un individuo escogido al azar. Para la diversidad presente en el jal, el índice de Shannon-Weiner (H') tiene un valor de 1.05, lo que indica una baja diversidad de especies presentes en el sitio.

En la mayoría de los ecosistemas naturales el índice (H') varía entre 0.5 y 5.0, valores inferiores a 2.0 se consideran de baja diversidad y superiores a 3.0, sitios con alta diversidad. El índice de equidad de Pielou mide la proporción de la diversidad observada con relación a la máxima diversidad esperada. Cuando el valor es cercano a cero, corresponde a situaciones donde todas las especies son igualmente abundantes. En la diversidad estudiada del jal se obtuvo un valor de 0.23, lo que indica que no existe una especie con mayor abundancia.

Tabla 7 Índices de diversidad de bacterias oxidantes del azufre aisladas del jal "La Concha".

Índice de Simpson (1-D)	0.89
Índice de Dominancia (D')	0.11
Índice de Shannon-Wiener (H')	1.05
Índice de Equitatividad (J')	0.23

Tabla 8 Comparación de índice de Simpson y dominancia de acuerdo con el pH de la muestra.

	pH ácidos	pH alcalinos
Índice de Simpson (1-D)	0.12	0.17
Índice de dominancia (D')	0.88	0.83

Los índices de similitud expresan el grado en el que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, por lo que son una medida inversa de la diversidad beta, que se refiera al cambio de especies entre dos muestras. Sin embargo, a partir del valor de similitud, se puede calcular fácilmente la disimilitud entre las muestras. Estos índices pueden obtenerse con base en datos cualitativos o cuantitativos directamente o a través de métodos de ordenaciones o clasificación de las comunidades. En cuanto el índice de similitud entre especies, la mayor similitud entre sitios de muestreo se presentó entre el sitio A y el sitio B (73.3%), mientras que el sitio B con el sitio C tuvieron una relación de (46.15%), el sitio A

con el sitio C (40%), el sitio C con el sitio E (37.5%) el sitio A con el sitio D (35.71%), para los sitios D con el sitio E; y el sitio E con el sitio F comparten un 28.57%, el sitio A con el sitio F (26.67%), el sitio B con el sitio E (23.08%) el sitio B con los sitios D y F comparten el 21.43% cada uno, el sitio A con el sitio E y el sitio C con el sitio D presentan un 20% y en menor similitud el sitio D y el sitio C con el sitio F (11.11% y 9.09% cada uno) (Tabla 9).

Tabla 9. Índice de Jaccard (J') para la similitud entre sitios de muestreo.

	B	C	D	E	F
A	73.33	40.00	35.71	20.00	26.67
B		46.15	21.43	23.08	21.43
C			20	37.5	9.09
D				28.57	11.11
E					28.57

12.4 Clasificación por morfología colonial y cuantificación

De acuerdo con los criterios establecidos por Saucedo y colaboradores (2005) para la clasificación morfológica de colonias bacterianas, se consideraron las siguientes características: forma, margen, elevación, superficie, textura y color (Anexo 4). Con dichos criterios se describieron 15 morfotipos de colonias bacterianas (Tabla 10; Figura 32).

Tabla 10. Clasificación de los aislados de BOA por la morfológica de su colonia bacteriana.

Morfotipo	Color	Forma	Margen	Elevación	Superficie	Textura
AC	Azul	Circular	Entero	Convexa	Concéntrica	Viscosa
AF	Amarilla	Filamentosa	Lobulado	Elevada	Concéntrica	Viscosa
BC	Blanca	Circular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Seca
BI	Blanca	Irregular	Ondulado	Elevada	Rugosa	Pastosa
BP	Blanca	Puntiforme	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa
CA	Canela	Irregular	Ondulado	Plana	Radial	Viscosa
CI	Crema	Irregular	Ondulado	Pulvinada	Rugosa	Viscosa
MC	Marrón	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Viscosa
NC	Naranja	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Viscosa
NF	Negra	Filamentosa	Entero	Umbonada	Rugosa	Seca
PF	Pardo	Filamentosa	Ondulado	Convexa	Lisa	Viscosa
RC	Rosa	Circular	Entero	Convexa	Concéntrica	Viscosa
RN	Roja con centro naranja	Irregular	Entero	Plana	Rugosa	Algodonosa
RV	Rosa con centro verde	Irregular	Ondulada	Elevada	Concéntrica	Cremosa
VI	Verde	Irregular	Entero	Plana	Lisa	Viscosa



Morfotipo AC



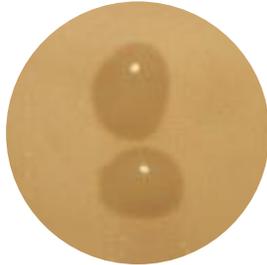
Morfotipo AF



Morfotipo BC



Morfotipo BI



Morfotipo BP



Morfotipo CA



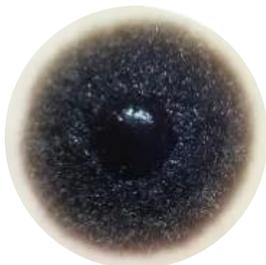
Morfotipo CI



Morfotipo MC



Morfotipo NC



Morfotipo NF



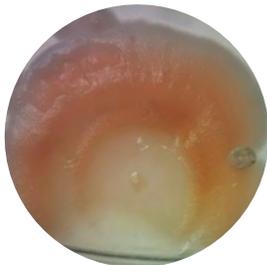
Morfotipo PF



Morfotipo RC



Morfotipo RN



Morfotipo RV



Morfotipo VI

Figura 32. Diversidad de los morfotipos coloniales de los aislados con los medios selectivos para BOA.

El medio de cultivo que presentó la mayor diversidad y abundancia fue el medio de cultivo TA con un total de 14 morfotipos, siendo el más abundante *BP* (56,920 UFC g⁻¹), y *AC* con la menor abundancia (2,312 UFC g⁻¹). Mientras que los medios MCA y TAC, presentaron 13 morfotipos. Para el medio MCA, el mayor crecimiento fue dado por el morfotipo *NF* con 66,802 UFC g⁻¹ y la menor abundancia fue para *BC* con 7,703 UFC g⁻¹. Por otro lado, en el medio TAC, la mayor abundancia fue para el morfotipo *BP* con un total de 58,094 UFC g⁻¹ y un menor crecimiento para el morfotipo *PF* con 4,256 UFC g⁻¹ (Tabla 11; **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabla 11. Morfotipos bacterianos presentes en cada medio de cultivo.

Morfotipo	MCA	TA	TAC
AC	+	+	+
AF	+	+	+
BC	+	+	+
BI	-	+	-
BP	+	+	+
CA	+	+	-
CI	+	-	+
MC	+	+	+
NC	+	+	+
NF	+	+	+
PF	+	+	+
RC	+	+	+
RN	+	+	+
RV	-	+	+
VI	+	+	+

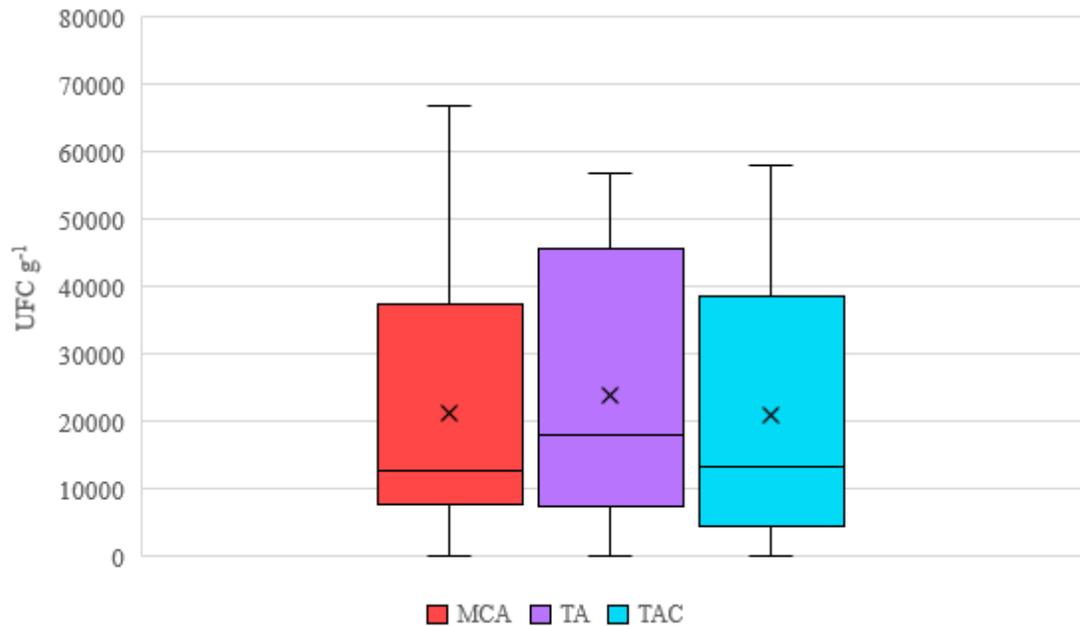


Figura 33 Abundancia de morfotipos bacterianos por medio de cultivo durante los muestreos del 2016-2017.

En cuanto a la presencia de los morfotipos en cada medio de cultivo, el morfotipo *BI* fue el único cuyo crecimiento se desarrolló en un solo medio de cultivo (TA), mientras que tres morfotipos se presentaron en dos medios de cultivo: morfotipo *CA* en los medios de cultivo MCA (46%) y TA (54%), *CI* en MCA (46%) y TAC (54%) y, *RV* en TA (48%) y TAC (52%). Los restantes once morfotipos crecieron en los tres medios de cultivo: medio MCA seis morfotipos mostraron el mayor crecimiento (*AC*, 46%; *AF*, 37%; *BC*, 39%; *MC*, 43%; *NF*, 37% y, *RN*, 35%) y, medio TA tres morfotipos tuvieron mayor crecimiento (*PF*, 51%; *RC*, 46% y, *VI*, 34%). Finalmente, para el medio TAC solo dos morfotipos obtuvieron la mayor abundancia *BP* (35%) y *NC* (36%). Por el contrario, el menor crecimiento se observó en el medio TA en cinco morfotipos: *NF* y *NC* con 31% cada uno, *AF* (28%), *MC* (23%) y *AC* (14%); para el medio TAC tres morfotipos tuvieron un menor crecimiento: *RN* (32%), *BC* (24%) y *PF* (5%) (Figura 34).

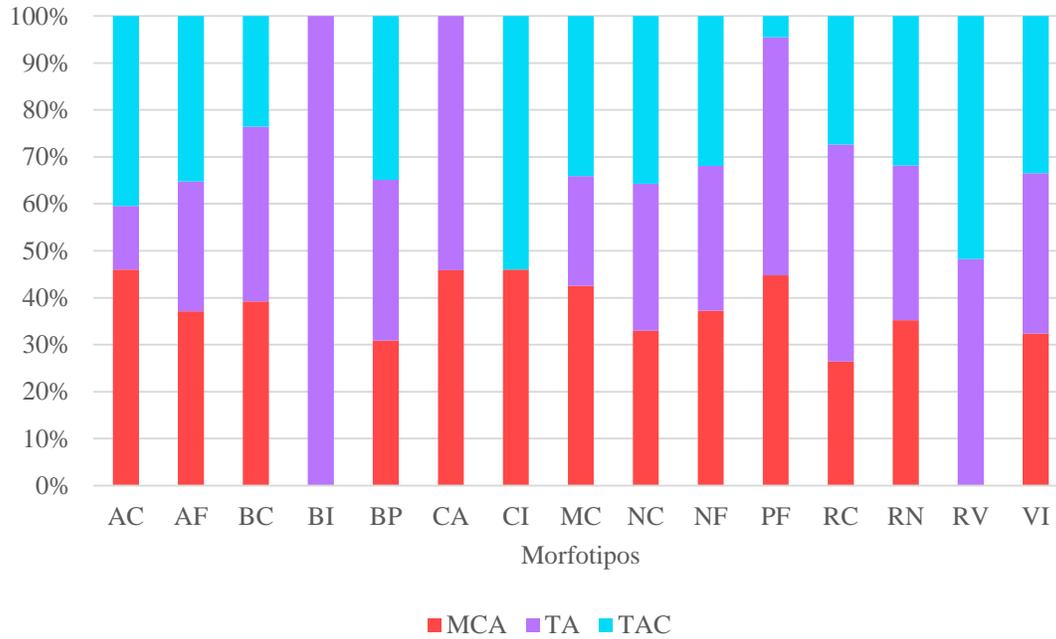


Figura 34. Abundancia de morfotipos bacterianos en cada medio de cultivo.

En todos los meses de muestreo, el morfotipo con mayor abundancia fue *NF* (179,215 UFC g⁻¹) y el morfotipo *BI* tuvo la menor abundancia (15,782 UFC g⁻¹) (Figura 35).

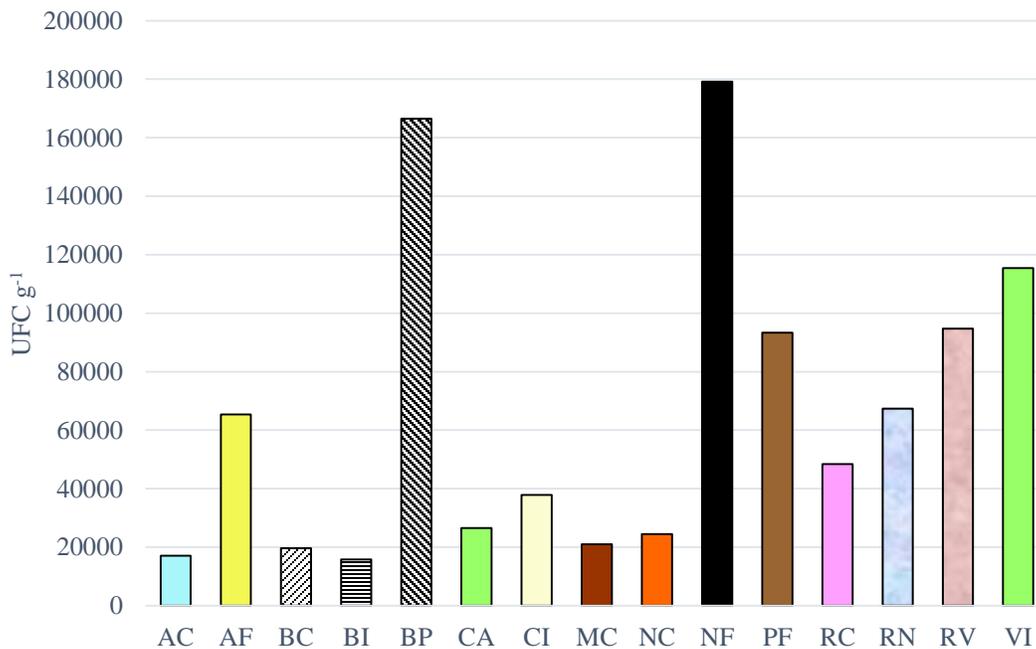


Figura 35. Abundancia de los morfotipos bacterianos durante el 2016-2017.

En el 2016, el morfotipo *NF* fue el más abundante (67,629 UFC g⁻¹) y *BC* fue el morfotipo de menor abundancia (2,221 UFC g⁻¹). En 2017, la mayor y la menor abundancia que corresponden a los morfotipos *BP* (111,589 UFC g⁻¹) y *MC* (8,946 UFC g⁻¹), respectivamente (Figura 36).

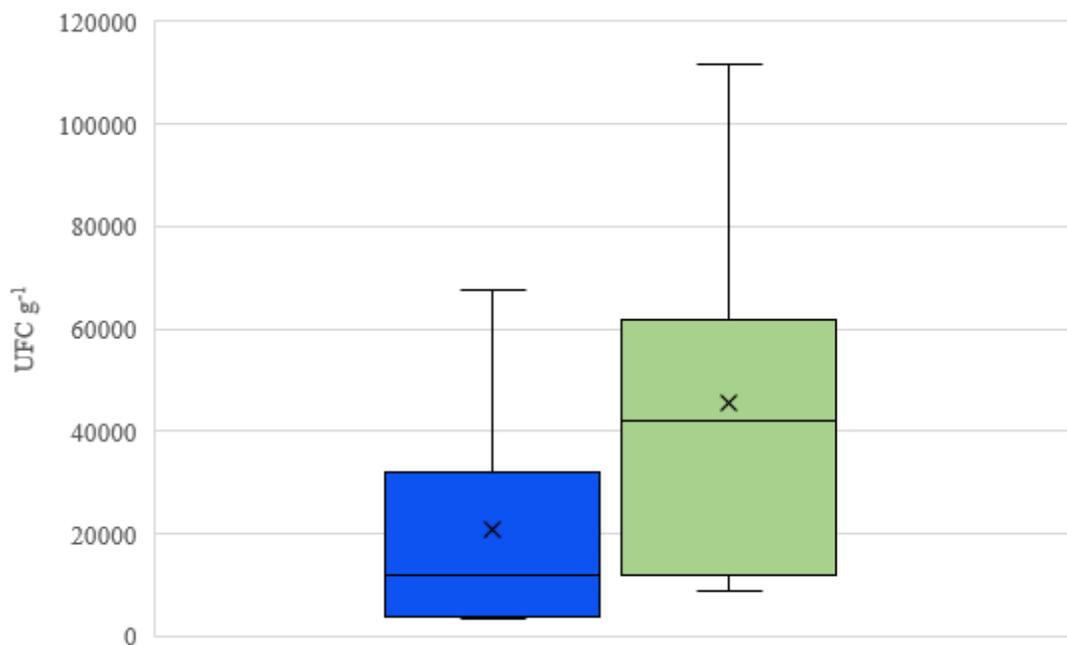


Figura 36. Abundancia de morfotipos bacterianos por año de muestreo. En azul 2016 y en verde 2017.

La abundancia de los morfotipos bacterianos estuvo relacionada con el sitio y las condiciones del muestreo (estado del tiempo, el color y el pH del sustrato): sitio A, 93%; sitio B, 80%; sitio C, 47%; sitio D y F 33% y, finalmente, sitio E, 27%. Siendo E, el sitio con menor abundancia de morfotipos. La abundancia de morfotipos por año de muestreo fue: 2016, septiembre con 80%, noviembre con 53% y, octubre con la menor abundancia, 40%. En 2017, la mayor diversidad se presentó en agosto con 87%, febrero con 73%, mayo con 67%, octubre con 60% y marzo con 33%.

En cuanto al color de la muestra: pardo tuvo la mayor diversidad con una representación del 100% de los morfotipos; gris con 93%; amarillas con 80%, blancas con 73% y, rojas con 27%.

En cuanto a la abundancia de los morfotipos por pH de la muestra: 100% de los morfotipos crecieron en un pH de 4.00 a 4.99; en pH ~2.0, el 73% de morfotipos; en pH ~5.0, el 67% de morfotipos; pH de 3.0 y 8.0, 60% cada uno; pH de ~1.0, 53% de morfotipos; 40% en pH <1.0; pH ~6.0, 33% de morfotipos y, pH ~7.0, 20% de morfotipos (Tabla 12).

Tabla 12. Características de las muestras para el crecimiento de los morfotipos de BOA.

Morfotipo	Sitio			Mes de muestreo				pH sustrato					Color sustrato		
AC	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
AF	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
BC	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
BI	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
BP	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
CA	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
CI	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
MC	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
NC	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
NF	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
PF	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
RC	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
RN	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
RV	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	
VI	A	B	C	S	O	N	F	0	1	2	3	4	GRIS	AMARILLO	PARDO
	D	E	F	M	MY	A	OC	5	6	7	8	9	ROJO	BLANCO	

En cuanto a la abundancia por sitio de muestreo en UFC de morfotipos: **sitio A** tuvo el mayor crecimiento (330,524 UFC g⁻¹), máximo de 60,458 UFC g⁻¹ para morfotipo **BP** y mínimo de 4,216 UFC g⁻¹ para morfotipo **CA**; **sitio B** (300,038 UFC g⁻¹ totales), máximo de 83,918 UFC g⁻¹ para morfotipo **NF** y mínimo de 480 UFC g⁻¹ para morfotipo **BC**; **sitio C** (197,177 UFC g⁻¹ totales), máximo de 48,424 UFC g⁻¹ para morfotipo **NF** y mínimo de 3,389 UFC g⁻¹ para morfotipo **CA**; **sitio D** (107,581 UFC g⁻¹ totales), máximo de 43,982 UFC g⁻¹ para morfotipo **AF** y mínimo de 4,024 UFC g⁻¹ para morfotipo **NC**. Los **sitios E** y **F** presentaron la menor abundancia con 27,427 y 29,895 UFC g⁻¹, respectivamente. En el sitio E, el máximo fue de 12,166 UFC g⁻¹ morfotipo **VI** y el mínimo de 3,744 UFC g⁻¹ morfotipo **BP**. Para el sitio F, el valor máximo y mínimo fueron 12,604 y 2,191 UFC g⁻¹ en los morfotipos **NC** y **AC**, respectivamente (Figura 37).

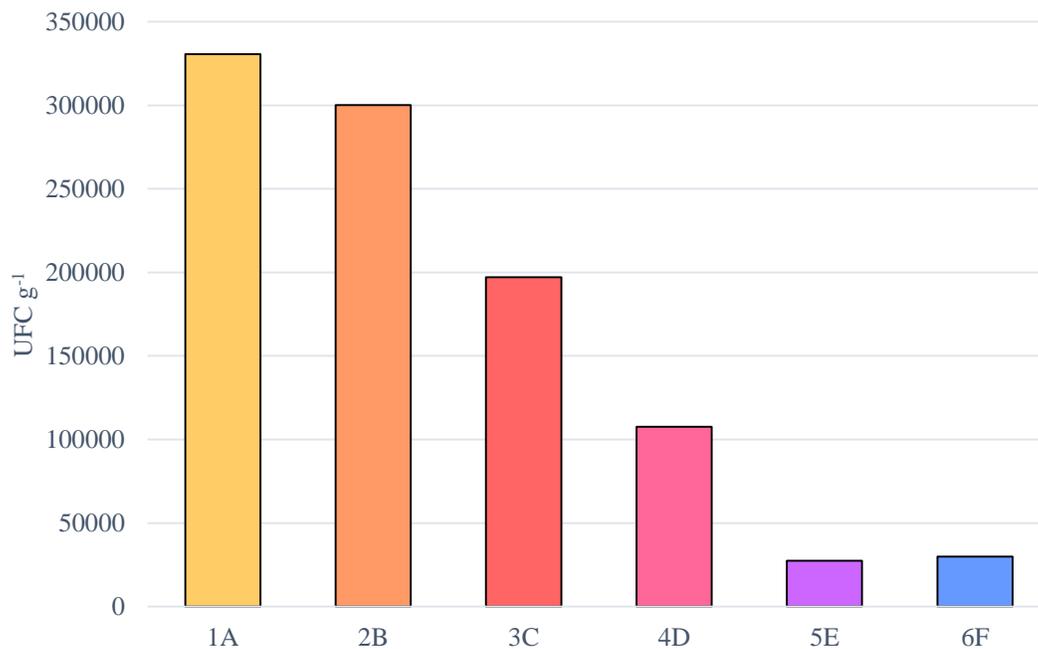


Figura 37. Abundancia de morfotipos bacterianos por sitio de muestreo.

La abundancia de morfotipos en los sitios de muestreo fue heterogénea. En el sitio A se presentaron todos los morfotipos, con excepción de *VI*. Los morfotipos *CI* y *BP* se presentaron en cinco sitios. El morfotipo *CI* en el sitio A (49%), seguido el sitio D (22%), los sitios B y E con 11% cada uno y, el sitio F (6.0%). El morfotipo *BP* en el sitio A, 36%; sitio B, 28%; D, 20%; sitio C, 13%, y sitio E, 2.0%. Los morfotipos *NF*, *PF* y *VI* se presentaron en 4 sitios; los morfotipos *AC*, *BI*, *CA*, *NC*, *RV* se presentaron en tres sitios de muestreo, mientras que los morfotipos *AF*, *BC*, *MC*, *RC*, *RN* se presentaron en dos sitios de muestreo (Figura 38).

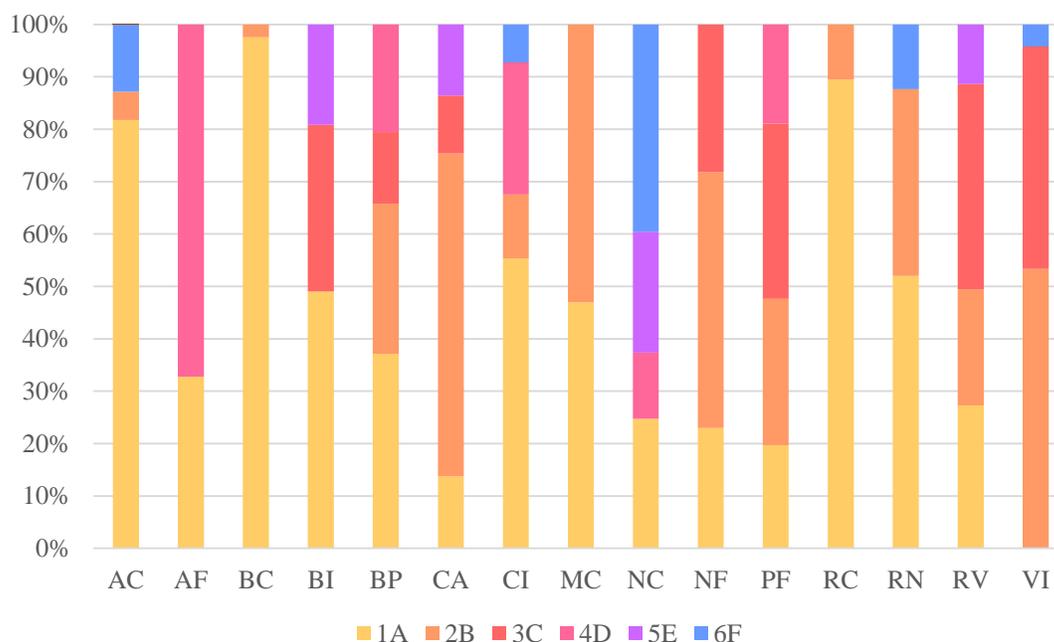


Figura 38. Abundancia de los morfotipos por sitio de muestreo.

Durante los muestreos del 2016, el muestreo de noviembre tuvo la mayor abundancia de morfotipos (113,767 UFC g⁻¹); siendo el morfotipo *NF* el más abundante (38,894 UFC g⁻¹) y *PF* el menos abundante (40 UFC g⁻¹). En septiembre se cuantificaron 100,907 UFC g⁻¹; la mayor abundancia (20,429 UFC g⁻¹) fue para el morfotipo *BP* y, la menor abundancia (221 UFC g⁻¹) fue para el morfotipo *BC*. El mes de octubre tuvo el menor crecimiento (97,564

UFC g⁻¹); los morfotipos de mayor y menor abundancia fueron *PF* (22,758 UFC g⁻¹) y *CA* (3,389 UFC g⁻¹).

En 2017, la mayor abundancia se observó en el mes de mayo (176,257 UFC g⁻¹); donde el morfotipo *BP* (33,863 UFC g⁻¹) fue el más abundante y el morfotipo *BI* (6,206 UFC g⁻¹) fue el menos abundante. En agosto, fue el segundo con mayor abundancia (156,426 UFC g⁻¹); el morfotipo *BP* fue el más abundante (181 UFC g⁻¹) y *AC* fue el menos abundante (2,067 UFC g⁻¹). En octubre (128,185 UFC g⁻¹ totales), la mayor abundancia la tuvo el morfotipo *RC* (29,844 UFC g⁻¹) y la menor abundancia la tuvo el morfotipo *MC* (1,649 UFC g⁻¹). En marzo (110,008 UFC g⁻¹ totales), la mayor abundancia (49,989 UFC g⁻¹) la tuvo el morfotipo *NF* y la mínima (124 UFC g⁻¹) el morfotipo *AC*. Finalmente, el mes de febrero tuvo la menor abundancia total (109,708 UFC g⁻¹), donde el morfotipo *NF* fue el más abundante (36,637 UFC g⁻¹) y el morfotipo *AC* el menos abundante (1,406 UFC g⁻¹) (Figura 39).

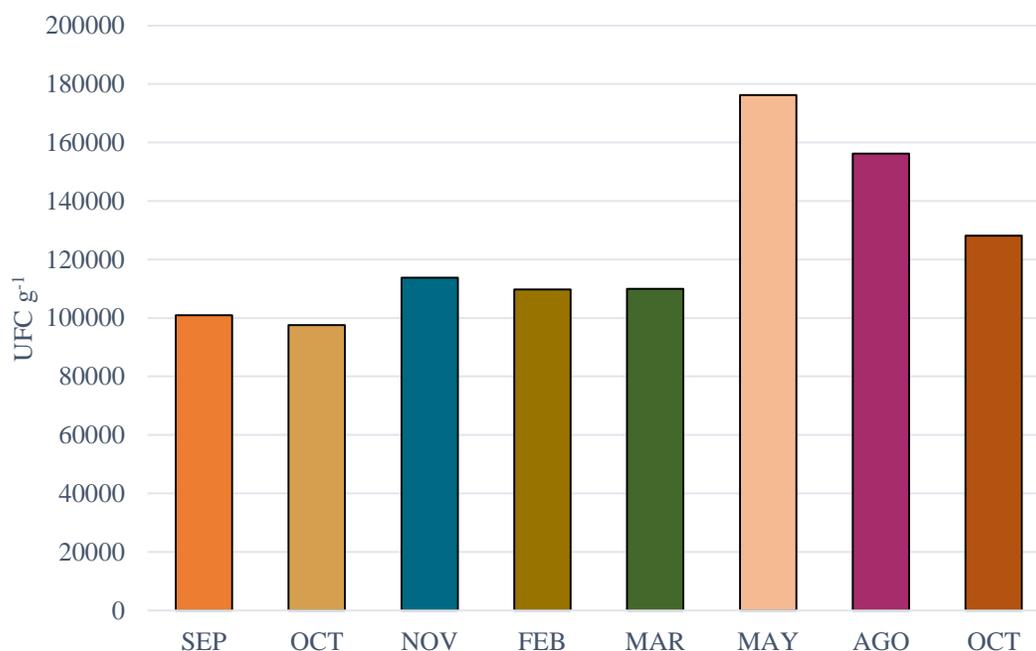


Figura 39. Abundancia de morfotipos bacterianos por mes de muestreo.

La abundancia de los morfotipos por número de muestreo también fue heterogénea. Ninguno de los morfotipos se presentó en los ocho muestreos. Los morfotipos *BP*, *PF* y *VI* crecieron en siete muestreos y su abundancia fue similar. Los morfotipos *RN* y *NF* se presentaron a lo largo de seis muestreos. La mayor abundancia de *RN* (39%) en octubre 2017 y de *NF* (28%) en marzo 2017. Para cada morfotipos, la menor abundancia (3.0%) fue en agosto y septiembre (5.0%), respectivamente. Dos morfotipos se presentaron en cinco muestreos, *AC* con mayor abundancia en mayo 2017 (49%) y *MC* con mayor abundancia en septiembre 2016 (41%). Seis morfotipos se cuantificaron en cuatro muestreos y su mayor abundancia fue: *CI* y *AF* en agosto (48 y 39%, respectivamente); *RF* y *BC* en octubre 2017 (62 y 54%, respectivamente); *CA* en marzo (45%) y, *RV* en mayo (29%). Finalmente, los morfotipos menos abundantes, se presentaron en tres muestreos. El morfotipo *BI* en noviembre 2016 y, mayo y agosto 2017. El morfotipo *NC* se presentó durante los muestreos de mayo, agosto y octubre 2017 (Figura 40).

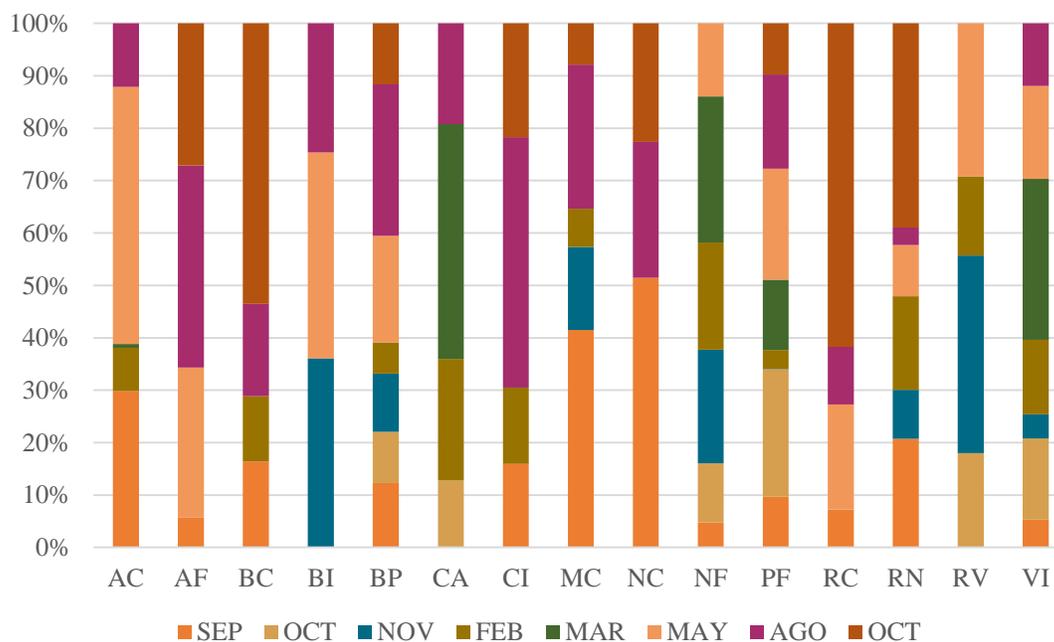


Figura 40. Abundancia de morfotipos bacterianos por mes de muestreo.

En 2016, mes de septiembre, el sitio B presentó la mayor diversidad de morfotipos (10) y en UFC g⁻¹ (42,517); seguido del sitio A, con siete morfotipos y 18,026 UFC g⁻¹; el sitio F, con cinco morfotipos y 29,895 UFC g⁻¹ y, el sitio C, con solo dos morfotipos y 10,469 UFC g⁻¹. Para octubre, donde la mayor diversidad y abundancia se describió en el sitio C (6 morfotipos y 83,121 UFC g⁻¹) y el sitio B (dos morfotipos y 14,443 UFC g⁻¹). En el último muestreo del 2016, mes de noviembre, se registraron 6 morfotipos para los sitios A y B, con una diversidad de 71,816 y 41,951 UFC g⁻¹, respectivamente (Tabla 13).

En el 2017, mes de febrero, la mayor abundancia se observó en el sitio A (9 morfotipos que representan 24,967 UFC g⁻¹) y sitio B (ocho morfotipos que representan 81,396 UFC g⁻¹). En el sitio D, se presentó un solo morfotipo PF con 3,345 UFC g⁻¹. En el mes de marzo, el sitio B, tuvo la mayor abundancia (63,405 UFC g⁻¹) y se describieron cinco morfotipos (*AC, CA, NF, PF, VI*); seguido del sitio C con tres morfotipos (*NF, PF, VI*; 23,817 UFC g⁻¹). Para los demás sitios y morfotipos se observó mucha variabilidad (

Tabla 14).

En relación con el color de la muestra, las tonalidades pardo mostraron los quince morfotipos con un total de 414,640 UFC g⁻¹, donde el morfotipo *NF* tuvo la mayor abundancia (87,314 UFC g⁻¹) y el morfotipo *CA* con un mínimo de 3,300 UFC g⁻¹. Las tonalidades grises presentaron catorce morfotipos con un total de 220,339 UFC g⁻¹, la máxima abundancia fue para *VI* con 31,986 UFC g⁻¹ y un mínimo de 1,150 UFC g⁻¹. Las tonalidades amarillas tuvieron una diversidad de doce morfotipos con una abundancia total de 306,327 UFC g⁻¹, donde el máximo fue de 66,549 UFC g⁻¹ para el morfotipo *BP* y un mínimo de 4,789 UFC g⁻¹ para el morfotipo *BC*. En las tonalidades blancas se presentaron once morfotipos y un total de 30,288 UFC g⁻¹ y un máximo de 8,358 UFC g⁻¹ y un mínimo de 637 UFC g⁻¹ para los morfotipos *CA* y *CI*, respectivamente. En el color rojo se presentó la menor diversidad con un total de cuatro morfotipos y una abundancia de 21,048 UFC g⁻¹, donde el máximo fue de 13,209 UFC g⁻¹ pertenecientes al morfotipo *NF* y un mínimo de 859 UFC g⁻¹ para el morfotipo *PF* (Figura 41).

Tabla 13. Morfotipos bacterianos presentes en los sitios de muestreo en 2016.

Sitio	Septiembre		Octubre		Noviembre	
	Morfotipo	UFC g ⁻¹	Morfotipo	UFC g ⁻¹	Morfotipo	UFC g ⁻¹
A	AC	2,105			BI	5,694
	AF	3,700			BP	12,502
	BC	2,741			MC	2,238
	CI	2,901			NF	23,932
	MC	811			PF	40
	RC	3,252			RV	27,410
	RN	2,516				
Total	18,026		0		71,816	
B	AC	795	BP	9,140	BP	5,994
	BC	480	NF	5,303	MC	1,081
	BP	14,649			NF	14,962
	CI	676			RN	6,285
	MC	7,888			RV	8,272
	NF	8,572			VI	5,357
	PF	4,315				
	RC	250				
	RN	3,143				
	VI	1,749				
Total	42,517		14,443		41,951	
C	BP	5,777	BP	7,178		
	PF	4,692	CA	3,389		
			NF	20,163		
			PF	17,455		
			RV	17,053		
		VI	17,883			
Total	10,469		83,121			
F	AC	2,191				
	CI	2,438				
	NC	12,604				
	RN	8,313				
	VI	4,349				
Total	29,895		0		0	

Tabla 14. Morfotipos bacterianos presentes en los sitios durante 2017.

Sitio	Febrero		Marzo		Mayo		Agosto		Octubre	
	Morfotipo	UFC g ⁻¹								
A	AC	1,406	NF	9,382	AC	8,369	AC	2,067	AF	17,743
	BC	2,445	PF	627	BP	14,215	BC	3,460	BC	10,500
	BP	3,340			NF	2,936	BI	3,882	BP	19,328
	CA	1,631			RC	4,832	BP	11,073	CI	8,223
	CI	3,121					CA	2,585	MC	1,649
	MC	971					CI	4,549	NC	5,539
	NF	6,249					MC	4,176	PF	9,100
	RN	4,016					NC	2,345	RC	29,844
	RV	1,788					PF	5,654	RN	26,259
							RC	5,328		
						RN	2,241			
Total	24,967		10,009		30,352		47,360		128,185	
B	BP	6,543	AC	124	NF	5,622	BP	10,312		
	CA	4,525	CA	11,889	PF	6,682	CA	2,521		
	CI	2,410	NF	24,374	RC	4,850	CI	1,013		
	MC	561	PF	7,361	RN	6,563	MC	1,589		
	NF	30,388	VI	19,657	RV	2,809	PF	2,409		
	RN	8,018			VI	4,861	VI	7,095		
	RV	12,549								
	VI	16,402								
Total	81,396		63,405		31,387		24,939		0	
C			NF	8,923	BI	6,206				
			PF	4,543	BP	9,277				
			VI	10,351	PF	19,338				
					NF	4,527				
					RV	24,834				
					VI	15,588				
Total	0		23,817		79,770		0		0	
D	PF	3,345			AF	18,748	AF	25,234		
					BP	10,371	BP	23,052		
					PF	5,629	CI	8,492		
							NC	4,024		
							PF	8,686		
Total	3,345				34,748		69,488			
E	Morfotipo	UFC g ⁻¹								

	NF	7,351		BP	3,744	
	VI	5,467		CI	4,166	
				VI	6,699	
Total		0	12,818	0	14,609	0

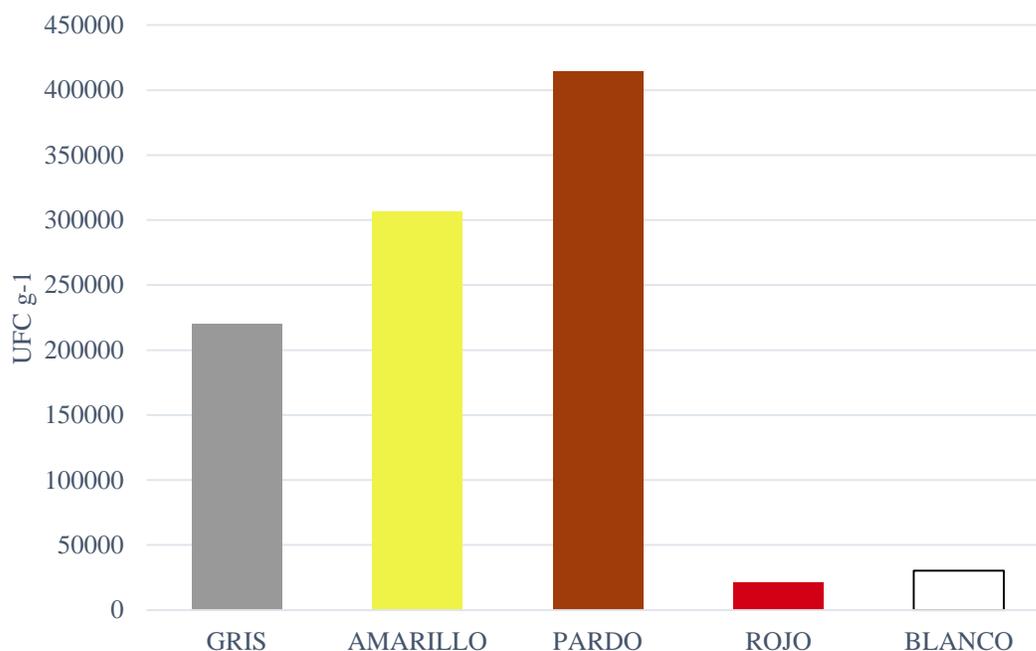


Figura 41. Unidades formadoras de colonias (UFC) cuantificadas por color de la muestra.

El único morfotipo que se presentó en las cinco coloraciones fue *PF*: 42% pardo; 34% amarillas; 21% gris; 2.0% blanco y 1.0% rojo. Mientras que nueve morfotipos se presentaron en cuatro coloraciones (*RN*, *MC*, *BI*, *BP*, *CI*, *RC* y *BC*), menos en las rojas. Los primeros cinco morfotipos estuvieron en coloraciones pardas (59%, 54%, 44%, 43%, 42%, respectivamente). Para los dos morfotipos restantes, la mayor abundancia fue en grises (39% y 31%, respectivamente). El morfotipo *CA* se presentó en tonalidades grises (51%), pardo, rojo y blanco. Los morfotipos *NF* y *VI* no crecieron en tonalidades blancas. *NF* obtuvo 49% en pardo y, 37% del morfotipo *VI* se cuantificó en muestras amarillas. Los morfotipos *RV*, *AF* y *AC* se presentaron en tres coloraciones (gris, amarilla y pardo). El morfotipo *AC*, se observó en tres coloraciones (gris, pardo y blanco); la mayor abundancia se cuantificó en el

color pardo. Finalmente, el morfotipo *NC* solo se observó en coloraciones pardas (90%) y blanco (10%) (Figura 42).

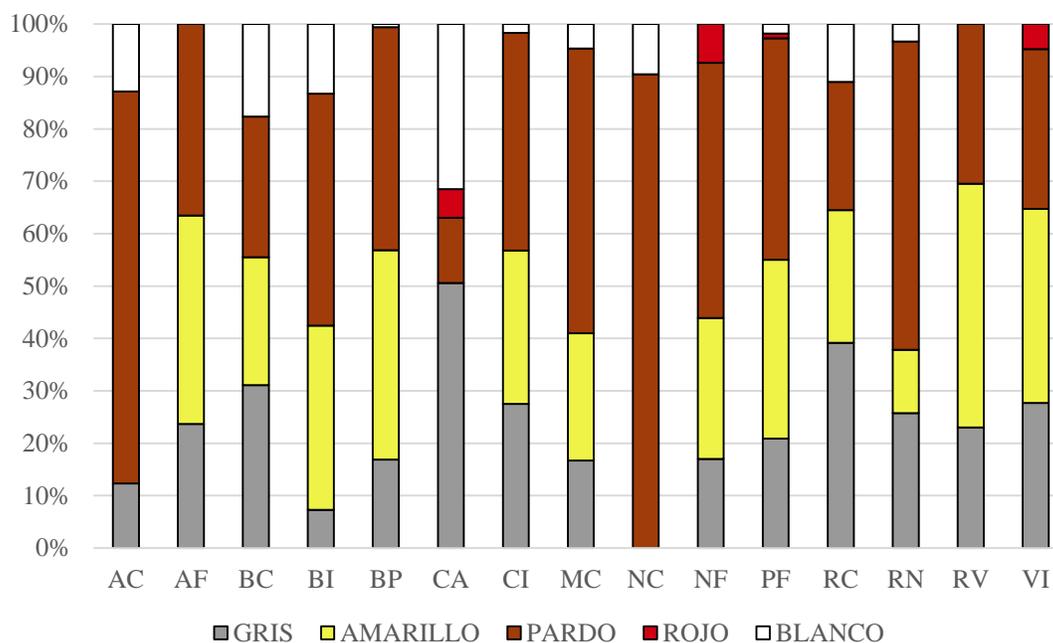


Figura 42. Abundancia de los morfotipos por color de la muestra.

En pH de la muestra, la mayor diversidad de morfotipos (15) se cuantificó entre un pH de 4.00 a 4.99, con una abundancia de 168,029 UFC g⁻¹ (máxima: 38,151 UFC g⁻¹ para *NF*; mínima: 2,345 UFC g⁻¹ para *NC*). La mayor abundancia se observó a pH de 2.0 (216,020 UFC g⁻¹) con 10 morfotipos (máxima: 40,621 UFC g⁻¹ para *NF*; mínima: 1,412 UFC g⁻¹ para *BI*). Seguido del pH 3.0 (168,029 UFC g⁻¹); la mayor abundancia fue para el morfotipo *BP* (53,571 UFC g⁻¹) y la menor para el morfotipo *CA* (4,125 UFC g⁻¹). En el pH 1.0 (134,961 UFC g⁻¹), con 41,241 UFC g⁻¹ para *NF* y 124 UFC g⁻¹ para *AC*. Para pH 5.0 (107,146 UFC g⁻¹) con un máximo de 25,506 UFC g⁻¹ y un mínimo de 1,845 UFC g⁻¹. Para pH 7.0 (79,376 UFC g⁻¹), la máxima abundancia fue de 49,014 UFC g⁻¹ para el morfotipo *BP* y la mínima de 13,512 para el morfotipo *NC*. Para pH 6.0 (43,262 UFC g⁻¹), la máxima abundancia (15,798 UFC g⁻¹) y mínima (480 UFC g⁻¹) fueron de los morfotipos *PF* y *BC*, respectivamente. Para pH 8.0 (37,405 UFC g⁻¹), la abundancia máxima (10,829 UFC g⁻¹) fue para el morfotipo *RN*

y la mínima (811 UFC g⁻¹) para *MC*. Por último, el pH 0 presentó la menor abundancia (33,889 UFC g⁻¹), dentro del cual, el morfotipo con mayor abundancia fue *RV* (16,375 UFC g⁻¹) y la mínima para *BP* (662 UFC g⁻¹) (Figura 43).

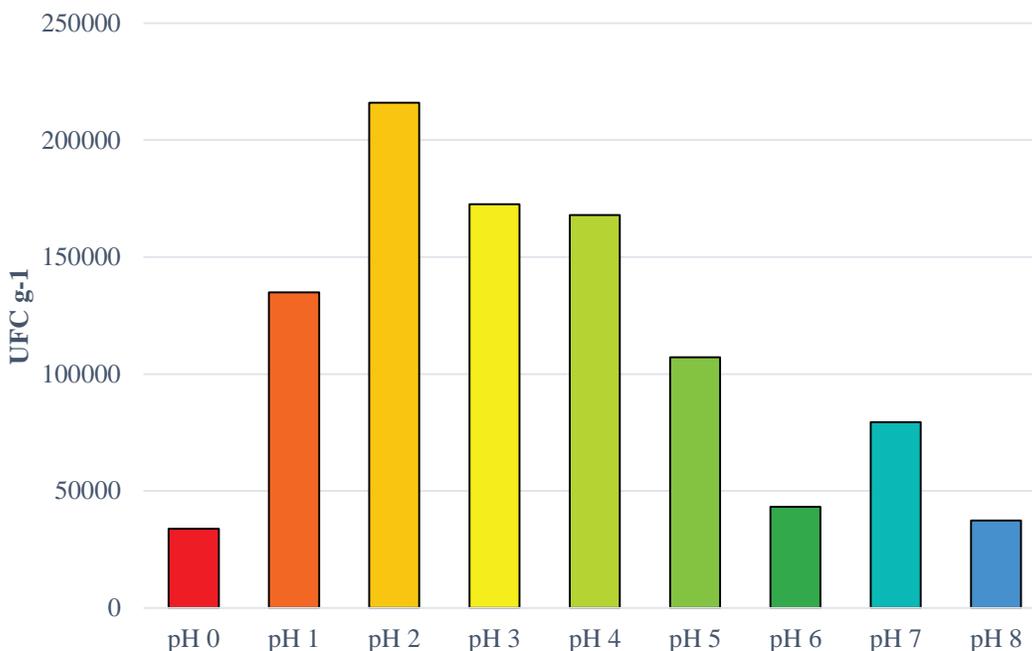


Figura 43. Abundancia en UFC por pH de la muestra.

Ningún morfotipo se presentó en los nueve rangos de pH; sin embargo, el morfotipo *VI* se presentó en un rango de pH>0 a pH<6 (el 25% de UFC totales se cuantificó de pH 2.0, seguido de pH 1.0 (21%), pH 3.0 (19%), pH 4.0 y pH 5.0 (14% cada uno), pH 8 (4.0%) y pH 0.0 (3.0%). Tres morfotipos se presentaron en seis rangos de pH, los morfotipos *CI*, *NF* y *PF*. Los morfotipos *BI*, *BP*, *MC*, *NC*, *RC*, *RV* se presentaron en cinco rangos de pH. Mientras que, los morfotipos *AC*, *AF*, *BC*, *CA* y *RN* se presentaron en cinco rangos de pH (Figura 44).

Los morfotipos *AC*, *AF*, *BC*, *CA*, *RN* y *BI* estuvieron presentes en cuatro pH diferentes, seguidos de *MC*, *NC*, *RC*, *RV* con cinco distintos pH, los morfotipos *BP*, *CI*, *NF* y *PF* en 6 rangos de pH diferentes. Por lo anterior, se seleccionaron 76 aislados para realizar la caracterización fenotípica.

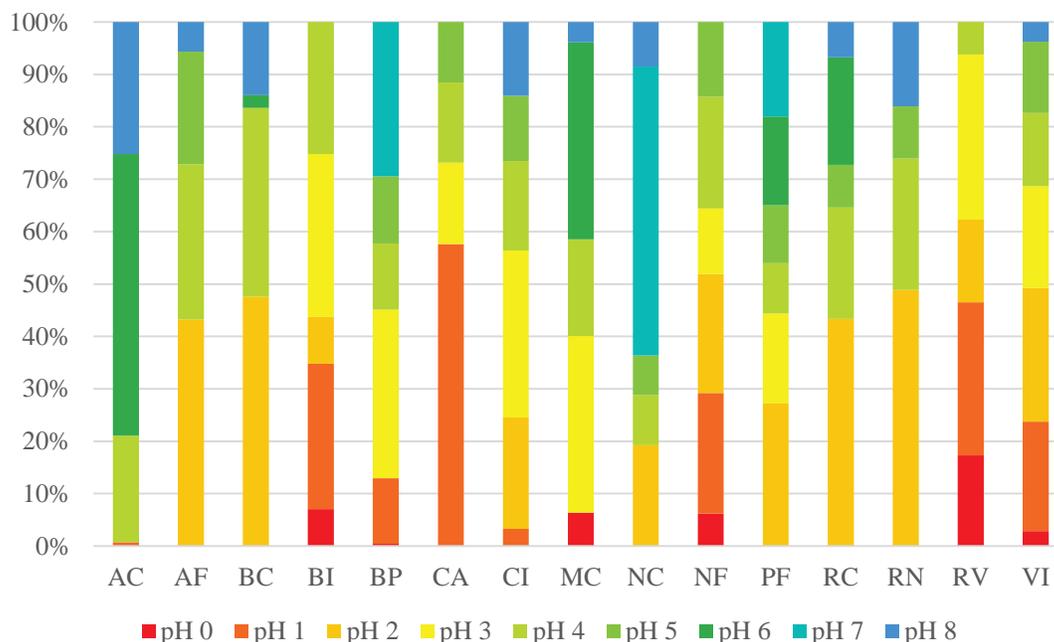


Figura 44. Abundancia de los morfotipos por pH de la muestra.

12.5 Caracterización fenotípica

Se realizaron cinco pruebas para la caracterización fenotípica de los 76 aislados de BOA del jal “La Concha”. Estos aislados fueron seleccionados porque estaban representados los 15 morfotipos a diferentes pH, por sitio de muestreo, fecha de muestreo y color de la muestra. Del total de los aislados, 26 son del sitio A, 22 del sitio B, 13 del sitio C, 8 del sitio D, dos del sitio E y cinco del sitio F. De estas mismas, 26 fueron aisladas del medio TA, mientras que para los medios MCA y TAC se obtuvieron 25 aislados, respectivamente. Manteniendo la proporción de las muestras por color, se seleccionaron 29 aislados de muestras pardas, 23 aislados de muestras amarillas, 17 muestras de color gris, tres muestras de color blanco y dos de color rojo.

12.5.1 Tinción Gram

Para la tinción Gram, el 47% son Gramnegativos, el 43% son Grampositivos y el 11% restante son Gram-variables (Figura 45; Figura 46). Mientras que, para su morfología celular, 80% son bacilos, 13% cocobacilos y 7.0% son cocos (Figura 47;Figura 48) (Tabla 15).

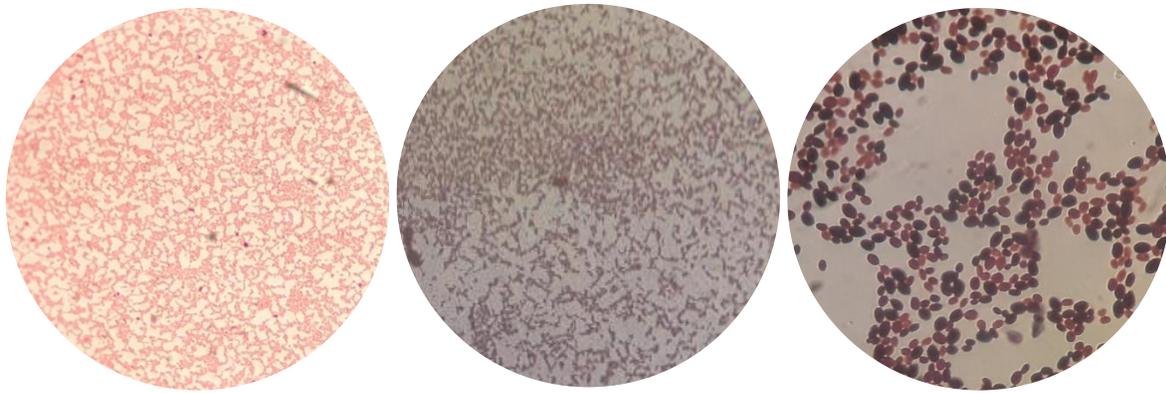


Figura 45. Tinción Gram. De izquierda a derecha: Gramnegativa, Grampositiva y, Gram-variable.

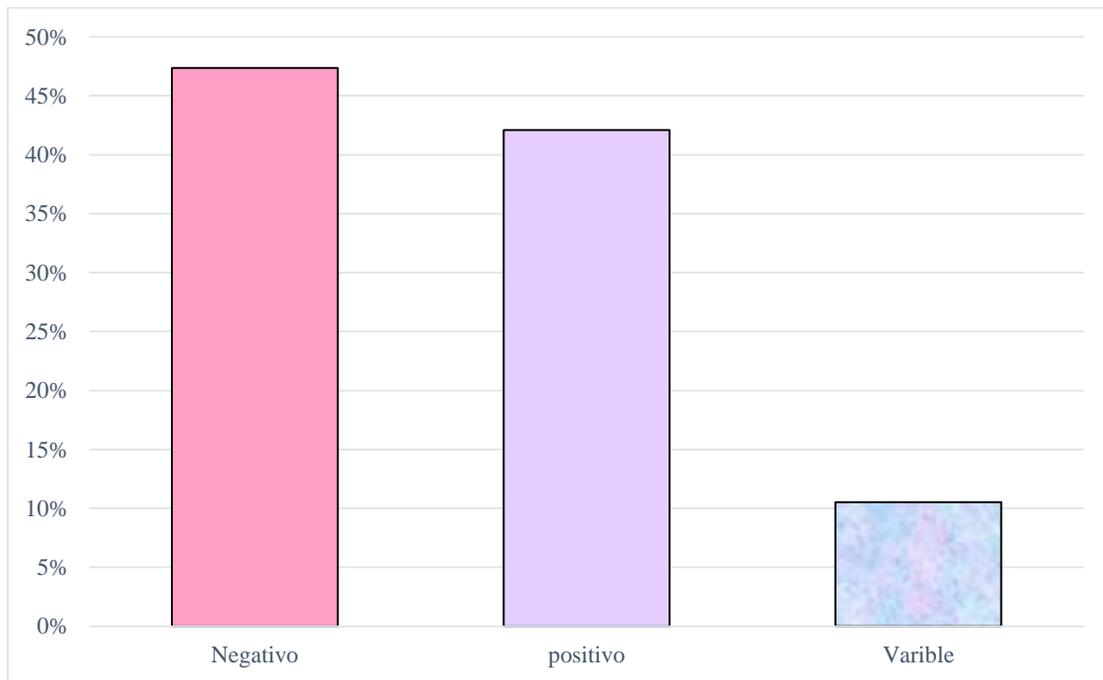


Figura 46. Porcentaje de aislados analizados de acuerdo con la estructura de la pared y membrana celular.

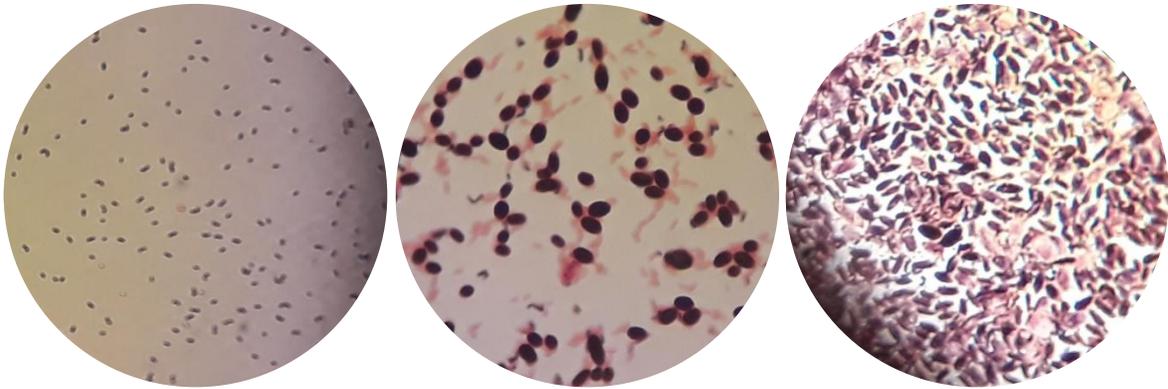


Figura 47. Forma celular bacteriana. De izquierda a derecha: cocos, bacilos y cocobacilos.

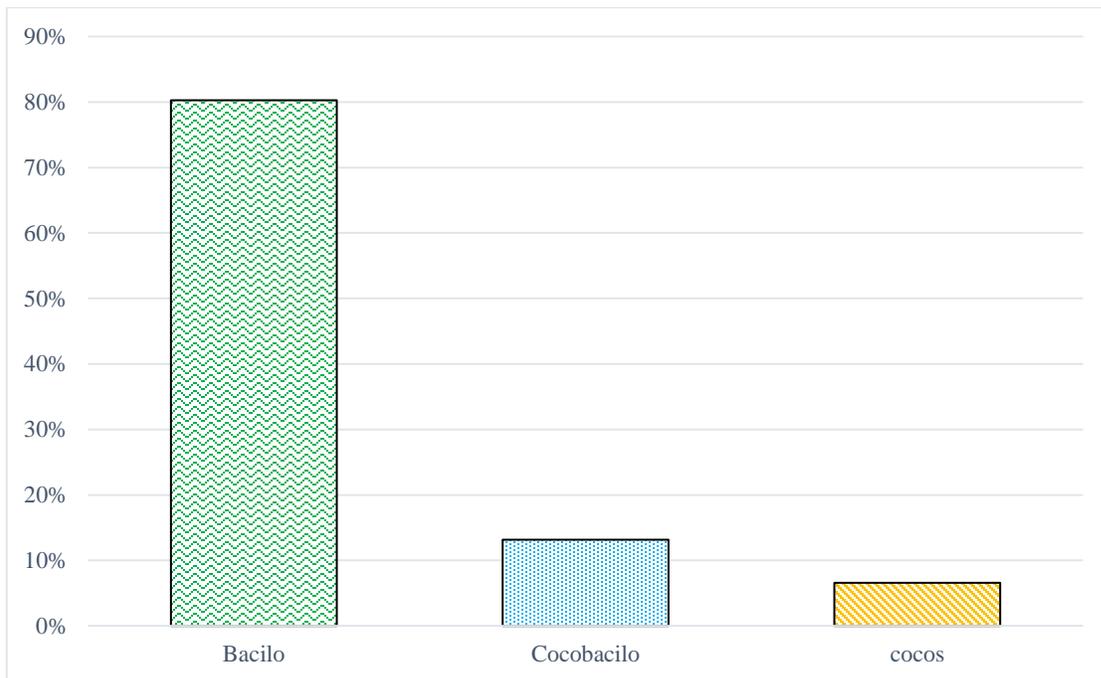


Figura 48. Porcentaje de bacterias de acuerdo con su morfología celular.

Tabla 15. Descripción de las características celulares de las bacterias aisladas del jal minero “La Concha”.

Morfotipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	Tipo de pared	Forma celular
AC	1	B	Marzo	TAC	Blanca	Positiva	Bacilo
	4	A	Febrero	ACM	Pardo	Negativo	Cocos
	6	A	Mayo	TAC	Pardo	Positiva	Bacilo
	8	F	Septiembre	TA	Pardo	Positiva	Bacilo
AF	2	D	Mayo	TA	Amarilla	Variable	Bacilo
	4	D	Mayo	TAC	Pardo	Variable	Bacilo
	5	A	Octubre	ACM	Gris	Negativo	Bacilo
	8	A	Septiembre	TA	Gris	Negativo	Bacilo
BC	2	A	Octubre	TAC	Gris	Positiva	Bacilo
	4	A	Octubre	ACM	Amarilla	Positiva	Bacilo
	6	B	Septiembre	TA	Pardo	Positiva	Bacilo
	8	A	Septiembre	ACM	Gris	Negativo	Bacilo
BI	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	Negativo	Bacilo
	1	A	Noviembre	TA	Gris	Negativo	Bacilo
	2	C	Mayo	TA	Amarilla	Negativo	Bacilo
	3	A	Noviembre	TA	Pardo	Positiva	Bacilo
	4	C	Mayo	TA	Pardo	Negativo	Bacilo
BP	0	B	Febrero	ACM	Amarilla	Negativo	Bacilo
	1	A	Noviembre	ACM	Pardo	Positiva	Bacilo
	3	E	Agosto	TAC	Amarilla	Negativo	Bacilo
	4	D	Agosto	TA	Gris	Negativo	Bacilo
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla	Negativo	Bacilo
	7	C	Septiembre	TA	Pardo	Negativo	Bacilo
CA	1	B	Febrero	TA	Pardo	Negativo	Cocobacilo
	3	A	Agosto	ACM	Gris	Negativo	Bacilo
	4	B	Marzo	ACM	Rojo	Negativo	Bacilo
	5	B	Marzo	TA	Gris	Negativo	Bacilo
CI	1	B	Febrero	TAC	Gris	Negativo	Bacilo
	2	B	Febrero	TAC	Pardo	Negativo	Bacilo
	3	A	Agosto	ACM	Amarilla	Positiva	Cocos
	4	D	Agosto	ACM	Gris	Variable	Bacilo
	5	D	Agosto	TAC	Amarilla	Negativo	Bacilo
	8	F	Septiembre	ACM	Pardo	Negativo	Bacilo
MC	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla	Positiva	Cocos
	3	B	Agosto	TA	Amarilla	Positiva	Bacilo
	4	B	Noviembre	TAC	Pardo	Positiva	Bacilo
	6	B	Septiembre	ACM	Pardo	Positiva	Bacilo
	8	A	Septiembre	ACM	Gris	Variable	Bacilo

Tabla 16. Continuación.

Morfotipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	Tipo de pared	Forma bacteriana
NC	2	A	Octubre	ACM	Pardo	Positiva	Bacilo
	4	A	Agosto	ACM	Blanca	Negativo	Bacilo
	5	D	Agosto	TA	Pardo	Negativo	Bacilo
	7	F	Septiembre	TAC	Pardo	Positiva	Bacilo
	8	F	Septiembre	TAC	Pardo	Positiva	Bacilo
NF	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	Positiva	Bacilo
	1	B	Marzo	ACM	Amarilla	Positiva	Bacilo
	2	E	Marzo	ACM	Pardo	Positiva	Bacilo
	3	C	Mayo	TAC	Pardo	Positiva	Bacilo
	4	B	Marzo	TA	Rojo	Negativo	Bacilo
	5	A	Marzo	TAC	Amarilla	Positiva	Bacilo
PF	2	D	Agosto	TA	Pardo	Variable	Cocobacilo
	3	B	Agosto	TA	Amarilla	Positiva	Bacilo
	4	C	Marzo	ACM	Amarilla	Positiva	Bacilo
	5	D	Agosto	TA	Amarilla	Positiva	Cocos
	6	C	Octubre	ACM	Pardo	Positiva	Bacilo
	7	B	Octubre	ACM	Pardo	Variable	Bacilo
RC	2	A	Octubre	ACM	Amarilla	Positiva	Bacilo
	4	A	Agosto	TA	Blanca	Negativo	Cocobacilo
	5	A	Octubre	ACM	Gris	Positiva	Bacilo
	6	B	Mayo	TAC	Gris	Positiva	Bacilo
	8	A	Septiembre	TAC	Gris	Variable	Bacilo
RN	2	A	Octubre	TAC	Amarilla	Positiva	Cocobacilo
	4	B	Noviembre	ACM	Pardo	Negativo	Bacilo
	5	B	Septiembre	TA	Pardo	Positiva	Cocobacilo
	8	A	Septiembre	TAC	Gris	Positiva	Cocobacilo
RV	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla	Negativo	Bacilo
	1	C	Mayo	TA	Amarilla	Negativo	Bacilo
	2	B	Febrero	TA	Pardo	Negativo	Cocobacilo
	3	C	Octubre	TAC	Amarilla	Negativo	Cocos
	4	C	Mayo	TAC	Pardo	Negativo	Cocobacilo
VI	0	B	Febrero	ACM	Amarilla	Negativo	Bacilo
	1	C	Octubre	TAC	Gris	Negativo	Bacilo
	2	B	Mayo	TAC	Gris	Variable	Cocobacilo
	3	B	Noviembre	ACM	Pardo	Negativo	Bacilo
	4	C	Marzo	TA	Amarilla	Positiva	Cocobacilo
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla	Negativo	Bacilo
	8	F	Septiembre	TA	Pardo	Negativo	Bacilo

12.5.2 Prueba de crecimiento a diferente pH

En la prueba de crecimiento a diferente pH en los tres medios de cultivos (Figura 50 a 52), se observó que el medio TA pH 3.0 obtuvo los valores más altos de absorbancia en el 29% de los aislados, seguido del medio MCA pH 3.0, donde el 18% de los aislados tuvieron un crecimiento alto. Mientras que en los medios TA pH 5.0 y MCA pH 7.0, en ambos, se observó que 11% de aislados tuvieron una absorbancia alta. Para los medios TAC pH 3.0, MCA y TA pH de 7.0, tuvieron crecimiento 8.0% de los aislados cada uno. Finalmente, en el medio TAC pH 5.0, solo 3.0% de los aislados crecieron significativamente (Tabla 17).

Tabla 17. Capacidad de crecimiento de las BOA a diferentes condiciones de pH.

Morfotipo	MCA			TA			TAC		
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 3	pH 5	pH 7	pH 3	pH 5	pH 7
AC	0.113	0.192	0.159	0.179	0.281	0.34	0.187	0.241	0.336
	0.189	0.232	0.008	0.283	0.336	0.436	0.236	0.284	0.222
	0.182	0.351	0.436	0.081	0.132	0.088	0.105	0.241	0.262
	0.13	0.052	0.32	0.07	0.053	0.314	0.126	0.052	0.317
AF	0.232	0.092	0.052	0.467	0.226	0.018	0.219	0.395	0.071
	0.241	0.23	0.249	0.254	0.104	0.008	0.247	0.167	0.128
	0.189	0.219	0.415	0.449	0.238	0.351	0.369	0.228	0.383
	0.266	0.413	0.237	0.155	0.091	0.107	0.21	0.217	0.172
BC	0.427	0.187	0.084	0.309	0.358	0.214	0.283	0.087	0.276
	0.3	0.138	0.177	0.2	0.098	0.066	0.25	0.118	0.121
	0.018	0.095	0.065	0.206	0.091	0.214	0.303	0.412	0.129
	0.322	0.038	0.092	0.211	0.211	0.109	0.266	0.124	0.514
BI	0.412	0.21	0.214	0.361	0.158	0.053	0.132	0.147	0.104
	0.027	0.26	0.164	0.274	0.185	0.217	0.218	0.237	0.197
	0.045	0.152	0.172	0.216	0.219	0.093	0.156	0.168	0.251
	0.055	0.07	0.086	0.385	0.159	0.251	0.22	0.114	0.168
	0.046	0.246	0.135	0.102	0.21	0.063	0.074	0.228	0.099
BP	0.137	0.131	0.249	0.25	0.166	0.328	0.319	0.139	0.387
	0.431	0.117	0.088	0.32	0.06	0.079	0.375	0.088	0.083
	0.129	0.207	0.129	0.214	0.141	0.239	0.471	0.147	0.201
	0.358	0.395	0.247	0.407	0.161	0.135	0.123	0.216	0.049
	0.103	0.168	0.196	0.228	0.33	0.246	0.206	0.252	0.308
	0.084	0.125	0.171	0.258	0.263	0.233	0.236	0.226	0.263
CA	0.254	0.462	0.363	0.248	0.258	0.35	0.251	0.36	0.356
	0.033	0.189	0.224	0.259	0.237	0.172	0.214	0.227	0.204
	0.227	0.234	0.441	0.241	0.14	0.07	0.18	0.12	0.169
	0.277	0.142	0.274	0.369	0.202	0.283	0.323	0.172	0.278
CI	0.065	0.105	0.173	0.327	0.216	0.201	0.232	0.143	0.305

	0.146	0.111	0.223	0.298	0.143	0.268	0.245	0.162	0.278
	0.311	0.247	0.021	0.209	0.1	0.079	0.26	0.173	0.05
	0.025	0.092	0.21	0.297	0.179	0.07	0.2	0.055	0.188
	0.162	0.106	0.123	0.377	0.189	0.207	0.266	0.263	0.264
	0.405	0.079	0.048	0.203	0.058	0.144	0.304	0.068	0.096
MC	0.029	0.266	0.138	0.284	0.214	0.395	0.156	0.24	0.266
	0.122	0.239	0.195	0.23	0.22	0.349	0.269	0.191	0.396
	0.181	0.123	0.153	0.451	0.208	0.045	0.316	0.165	0.099
	0.35	0.281	0.267	0.241	0.17	0.156	0.295	0.255	0.211
	0.395	0.346	0.135	0.284	0.124	0.114	0.339	0.235	0.124

	MCA			TA			TAC		
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 3	pH 5	pH 7	pH 3	pH 5	pH 7
NC	0.101	0.069	0.02	0.063	0.325	0.21	0.277	0.294	0.301
	0.232	0.108	0.07	0.23	0.254	0.189	0.231	0.181	0.129
	0.125	0.312	0.297	0.179	0.158	0.212	0.152	0.235	0.408
	0.29	0.421	0.314	0.345	0.205	0.203	0.317	0.362	0.258
	0.222	0.14	0.254	0.13	0.222	0.108	0.176	0.181	0.181
NF	0.021	0.202	0.229	0.285	0.163	0.137	0.286	0.216	0.235
	0.238	0.336	0.436	0.249	0.206	0.232	0.246	0.271	0.334
	0.549	0.435	0.213	0.446	0.213	0.324	0.465	0.324	0.336
	0.013	0.096	0.192	0.267	0.157	0.13	0.339	0.279	0.211
	0.249	0.233	0.231	0.462	0.222	0.114	0.281	0.086	0.084
	0.269	0.346	0.21	0.141	0.191	0.266	0.205	0.268	0.238
PF	0.025	0.202	0.188	0.278	0.174	0.109	0.233	0.175	0.171
	0.155	0.147	0.049	0.359	0.071	0.059	0.301	0.214	0.153
	0.025	0.413	0.177	0.259	0.109	0.236	0.142	0.261	0.206
	0.128	0.19	0.248	0.154	0.117	0.357	0.267	0.144	0.402
	0.049	0.108	0.082	0.273	0.184	0.143	0.187	0.129	0.231
	0.206	0.104	0.222	0.181	0.336	0.232	0.193	0.27	0.227
RC	0.283	0.181	0.13	0.478	0.147	0.123	0.38	0.164	0.126
	0.154	0.135	0.3	0.467	0.305	0.431	0.31	0.22	0.365
	0.294	0.255	0.216	0.256	0.357	0.145	0.275	0.306	0.18
	0.183	0.169	0.28	0.301	0.197	0.105	0.244	0.233	0.192
	0.114	0.2	0.161	0.297	0.361	0.29	0.132	0.192	0.301
RN	0.276	0.25	0.314	0.165	0.104	0.217	0.22	0.177	0.265
	0.046	0.01	0.027	0.332	0.185	0.116	0.267	0.045	0.427
	0.188	0.335	0.087	0.412	0.219	0.232	0.121	0.209	0.301
	0.04	0.237	0.209	0.2	0.229	0.186	0.119	0.233	0.197
	RV	0.014	0.101	0.301	0.3	0.201	0.107	0.416	0.333
0.238		0.18	0.123	0.269	0.154	0.029	0.415	0.379	0.317
0.171		0.102	0.074	0.371	0.157	0.078	0.268	0.244	0.175
0.045		0.201	0.355	0.214	0.263	0.1	0.129	0.232	0.227
0.027		0.101	0.179	0.279	0.234	0.022	0.358	0.21	0.12

	0.187	0.335	0.253	0.435	0.253	0.182	0.311	0.294	0.217
	0.283	0.198	0.334	0.076	0.32	0.008	0.189	0.022	0.059
VI	0.418	0.36	0.303	0.374	0.359	0.089	0.396	0.364	0.196
	0.387	0.302	0.098	0.209	0.267	0.107	0.098	0.177	0.056
	0.096	0.237	0.407	0.326	0.306	0.238	0.211	0.271	0.322
	0.18	0.17	0.203	0.258	0.177	0.088	0.203	0.253	0.211
	0.178	0.038	0.02	0.305	0.192	0.132	0.189	0.355	0.274

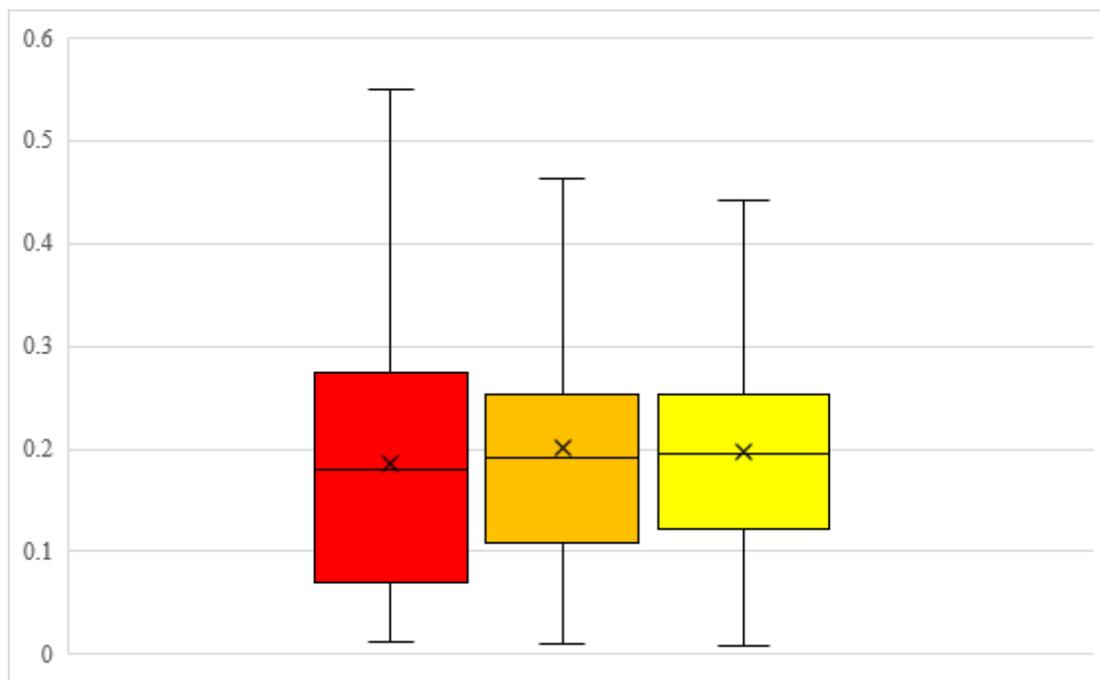


Figura 49. Capacidad de crecimiento de las BOA a diferentes condiciones de pH en el medio MCA. De izquierda a derecha: pH 7, pH y pH3.

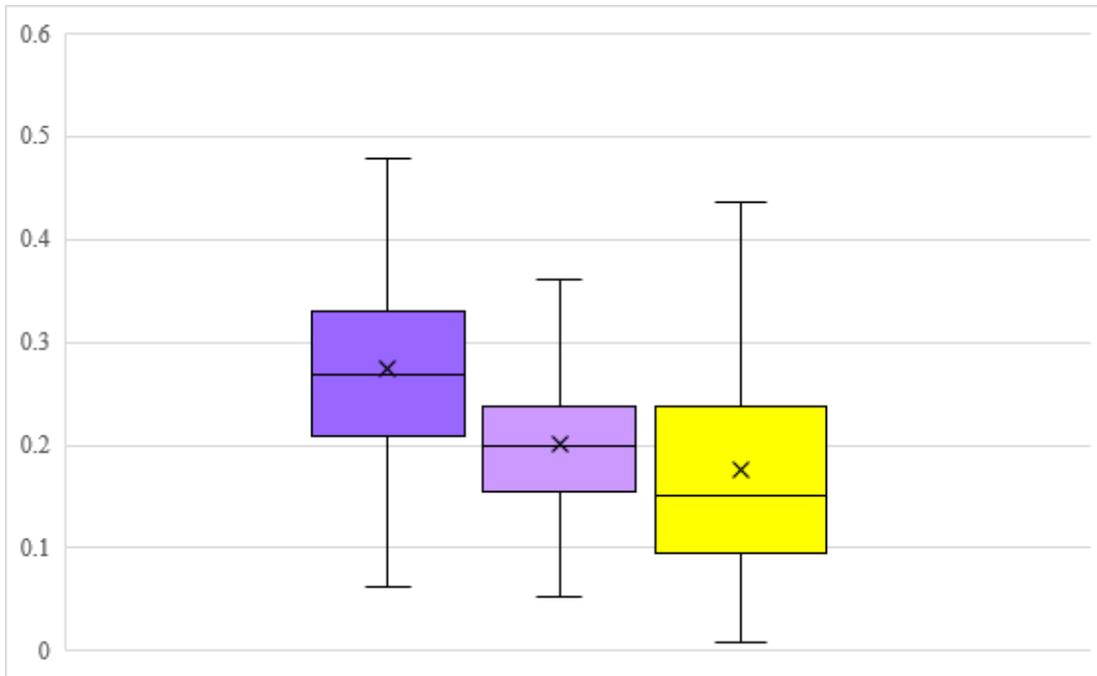


Figura 50. Capacidad de crecimiento de las BOA a diferentes condiciones de pH en el medio TA. De izquierda a derecha: pH 7, pH y pH3.

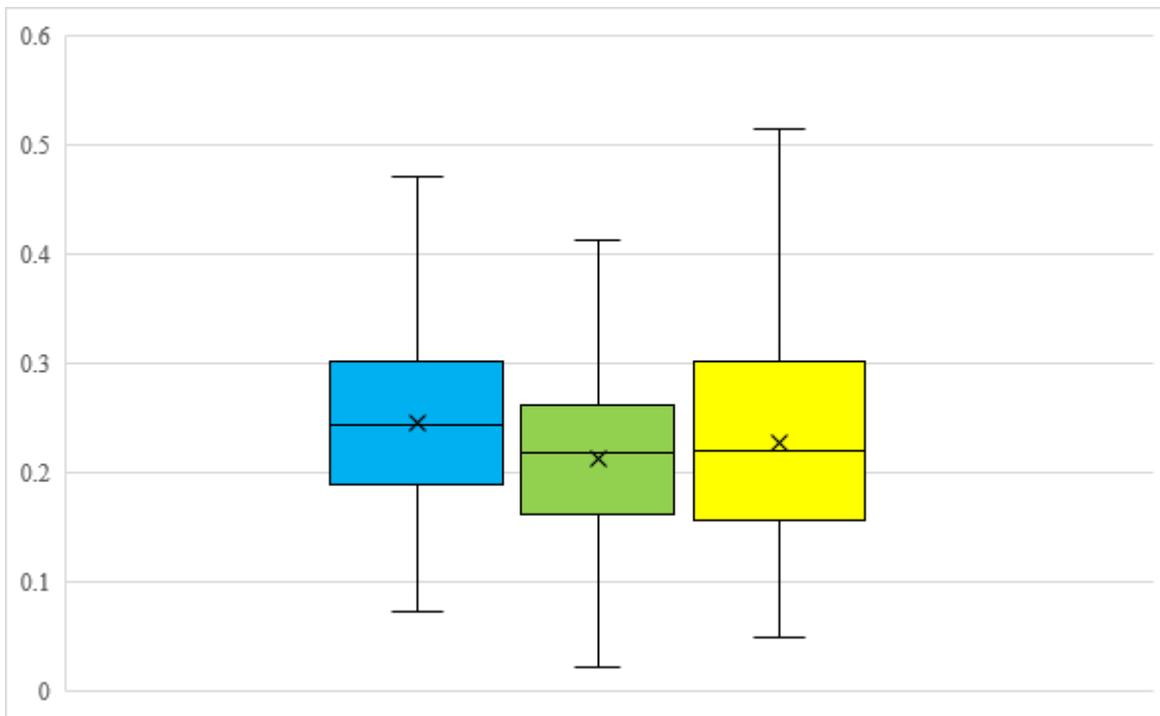


Figura 51. Capacidad de crecimiento de las BOA a diferentes condiciones de pH en el medio TAC. De izquierda a derecha: pH 7, pH y pH3.

12.5.3 Formación de biopelícula

La biopelícula es una estructura producida por diversos microorganismos que se organizan como una comunidad, en la cual, pueden adquirir protección de factores de estrés ambientales y para la obtención de alimentos. Las bacterias aisladas del jal “La Concha” mostraron la capacidad de formar una biopelícula, lo cual, les sirve como una estrategia de protección contra las condiciones del sitio. Además, todas son bacterias no móviles, ya que, formaron la biopelícula en la base de la microplaca del ensayo (Figura 53; Tabla 17).

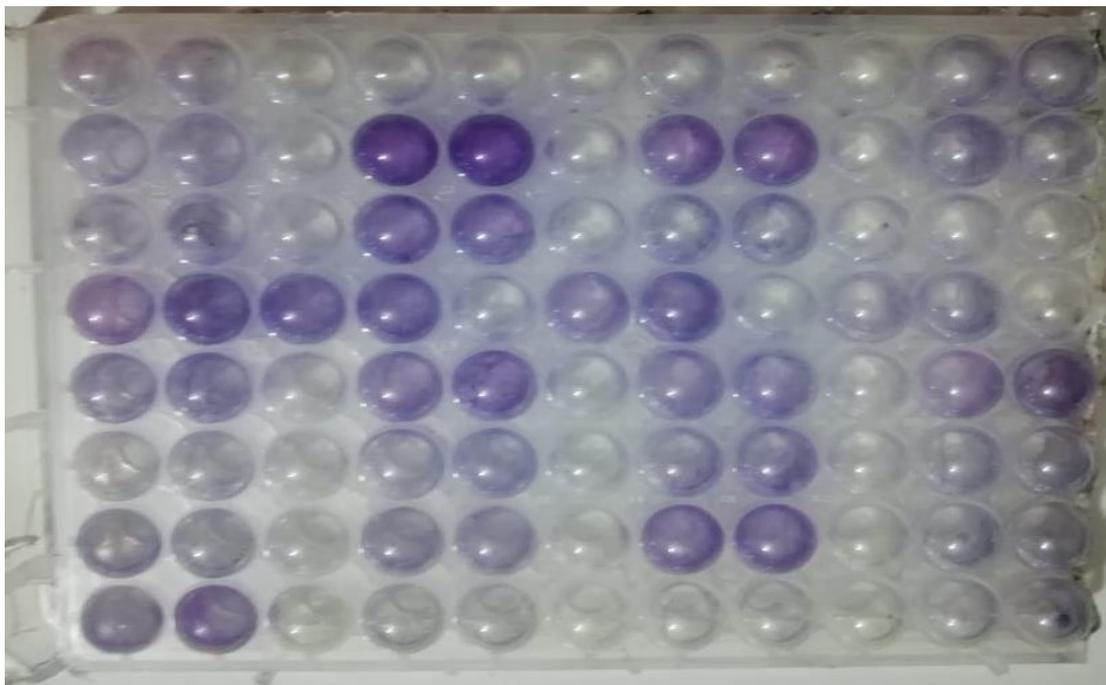


Figura 52. Placa de microtitulación para prueba de formación de biopelícula.

Tabla 17. Resultados de prueba de formación de biopelícula.

Morfotipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	Biopelícula	movilidad
AC	1	B	Marzo	TAC	Blanca	Positiva	No móvil
	4	A	Febrero	ACM	Pardo		
	6	A	Mayo	TAC	Pardo		
	8	F	Septiembre	TA	Pardo		
AF	2	D	Mayo	TA	Amarilla	Positiva	No móvil
	4	D	Mayo	TAC	Pardo		
	5	A	Octubre	ACM	Gris		
	8	A	Septiembre	TA	Gris		
BC	2	A	Octubre	TAC	Gris	Positiva	No móvil
	4	A	Octubre	ACM	Amarilla		
	6	B	Septiembre	TA	Pardo		
	8	A	Septiembre	ACM	Gris		
BI	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	Positiva	No móvil
	1	A	Noviembre	TA	Gris		
	2	C	Mayo	TA	Amarilla		
	3	A	Noviembre	TA	Pardo		
	4	C	Mayo	TA	Pardo		
BP	0	B	Febrero	ACM	Amarilla	Positiva	No móvil
	1	A	Noviembre	ACM	Pardo		
	3	E	Agosto	TAC	Amarilla		
	4	D	Agosto	TA	Gris		
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla		
	7	C	Septiembre	TA	Pardo		
CA	1	B	Febrero	TA	Pardo	Positiva	No móvil
	3	A	Agosto	ACM	Gris		
	4	B	Marzo	ACM	Rojo		
	5	B	Marzo	TA	Gris		
CI	1	B	Febrero	TAC	Gris	Positiva	No móvil
	2	B	Febrero	TAC	Pardo		
	3	A	Agosto	ACM	Amarilla		
	4	D	Agosto	ACM	Gris		
	5	D	Agosto	TAC	Amarilla		
	8	F	Septiembre	ACM	Pardo		
MC	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla	Positiva	No móvil
	3	B	Agosto	TA	Amarilla		
	4	B	Noviembre	TAC	Pardo		
	6	B	Septiembre	ACM	Pardo		
	8	A	Septiembre	ACM	Gris		

Morfotipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	Biopelícula	movilidad
NC	2	A	Octubre	ACM	Pardo	Positiva	No móvil
	4	A	Agosto	ACM	Blanca		
	5	D	Agosto	TA	Pardo		
	7	F	Septiembre	TAC	Pardo		
	8	F	Septiembre	TAC	Pardo		
NF	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	Positiva	No móvil
	1	B	Marzo	ACM	Amarilla		
	2	E	Marzo	ACM	Pardo		
	3	C	Mayo	TAC	Pardo		
	4	B	Marzo	TA	Rojo		
PF	5	A	Marzo	TAC	Amarilla	Positiva	No móvil
	2	D	Agosto	TA	Pardo		
	3	B	Agosto	TA	Amarilla		
	4	C	Marzo	ACM	Amarilla		
	5	D	Agosto	TA	Amarilla		
RC	6	C	Octubre	ACM	Pardo	Positiva	No móvil
	7	B	Octubre	ACM	Pardo		
	2	A	Octubre	ACM	Amarilla		
	4	A	Agosto	TA	Blanca		
	5	A	Octubre	ACM	Gris		
RN	6	B	Mayo	TAC	Gris	Positiva	No móvil
	8	A	Septiembre	TAC	Gris		
	2	A	Octubre	TAC	Amarilla		
	4	B	Noviembre	ACM	Pardo		
	5	B	Septiembre	TA	Pardo		
RV	8	A	Septiembre	TAC	Gris	Positiva	No móvil
	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla		
	1	C	Mayo	TA	Amarilla		
	2	B	Febrero	TA	Pardo		
	3	C	Octubre	TAC	Amarilla		
VI	4	C	Mayo	TAC	Pardo	Positiva	No móvil
	0	B	Febrero	ACM	Amarilla		
	1	C	Octubre	TAC	Gris		
	2	B	Mayo	TAC	Gris		
	3	B	Noviembre	ACM	Pardo		
	4	C	Marzo	TA	Amarilla		
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla		
8	F	Septiembre	TA	Pardo			

12.1.1 Prueba de resistencia a antibióticos

Para la prueba de resistencia a antibióticos se utilizaron tres antibióticos: amikacina, tetraciclina y gentamicina (Figura 55). A las 24 horas de estar en contacto con los antibióticos, el 55% fueron resistentes a amikacina, el 50% fueron resistentes a tetraciclina y el 43% fueron resistentes a gentamicina. Pasadas 48 horas, para amikacina y gentamicina, se observó un menor porcentaje de resistencia (32% cada una); mientras que, para la tetraciclina la resistencia aumento 61% (Tabla 18).



Figura 53. Formación de halos de inhibición o resistencia a antibióticos por las BOA aisladas del jal “La Concha”.

Tabla 8. Resistencia a antibióticos a las 24 y 48 horas de incubación.

Morfortipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	24 h			48 h		
						T	G	A	T	G	A
AC	1	B	Marzo	TAC	Blanca	R	2.1	R	R	R	R
	4	A	Febrero	ACM	Pardo	R	R	2.2	R	2.5	2.2
	6	A	Mayo	TAC	Pardo	1.4	2.3	2.5	1.4	2.7	2.5
	8	F	Septiembre	TA	Pardo	R	2	1	R	1.3	1.5
AF	2	D	Mayo	TA	Amarilla	R	1.2	R	R	1.5	R
	4	D	Mayo	TAC	Pardo	R	R	R	R	R	R
	5	A	Octubre	ACM	Gris	1.3	2.5	2	1.3	2.5	2
	8	A	Septiembre	TA	Gris	1.5	2	1.5	1.5	2.5	1.6
BC	2	A	Octubre	TAC	Gris	R	R	R	R	R	0.3
	4	A	Octubre	ACM	Amarilla	R	R	R	R	R	R
	6	B	Septiembre	TA	Pardo	R	1.5	R	R	R	R
	8	A	Septiembre	ACM	Gris	R	R	R	R	R	1
BI	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	R	R	R	R	R	R
	1	A	Noviembre	TA	Gris	1.7	2.2	1.8	2.2	1.8	2.5
	2	C	Mayo	TA	Amarilla	2.2	2.5	R	2.8	1	R
	3	A	Noviembre	TA	Pardo	R	R	R	R	R	R
	4	C	Mayo	TA	Pardo	2.6	R	1.7	3	2	2.3
BP	0	B	Febrero	ACM	Amarilla	2.4	R	0.9	2.4	1.4	1.4
	1	A	Noviembre	ACM	Pardo	1	1.7	1.6	1.1	2	2.4
	3	E	Agosto	TAC	Amarilla	R	2.5	1.1	R	1.5	1.6
	4	D	Agosto	TA	Gris	R	R	R	R	R	R
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla	R	1.9	1.4	R	1.7	2
	7	C	Septiembre	TA	Pardo	R	R	1.5	R	1.9	2.1
CA	1	B	Febrero	TA	Pardo	R	R	R	R	1.5	2
	3	A	Agosto	ACM	Gris	1.9	2.7	R	2.5	0.5	R
	4	B	Marzo	ACM	Rojo	R	1.7	2.3	R	2.3	2.3
	5	B	Marzo	TA	Gris	R	1.4	R	R	R	0.9
CI	1	B	Febrero	TAC	Gris	R	2.9	R	R	R	0.6
	2	B	Febrero	TAC	Pardo	R	2.7	R	R	R	0.8
	3	A	Agosto	ACM	Amarilla	1.6	R	R	1.6	0.8	0.9
	4	D	Agosto	ACM	Gris	3	1	R	3.5	2	R
	5	D	Agosto	TAC	Amarilla	2.5	R	R	3	0.9	1.1
	8	F	Septiembre	ACM	Pardo	R	1.8	R	R	R	0.5
MC	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla	R	R	R	R	R	R
	3	B	Agosto	TA	Amarilla	R	2.2	R	R	R	1.1
	4	B	Noviembre	TAC	Pardo	2.1	R	2	2.6	2	2
	6	B	Septiembre	ACM	Pardo	R	R	2	R	1.7	2.3
	8	A	Septiembre	ACM	Gris	1.5	1.5	2	1.5	1.8	2.2

Tabla 8. Continuación.

Morfortipo	pH	Sitio	Muestreo	Medio	Color	24 h			48 h		
						T	G	A	T	G	A
NC	2	A	Octubre	ACM	Pardo	1.5	2	1.5	R	2.2	R
	4	A	Agosto	ACM	Blanca	2	1.5	1.5	2.1	2.2	1.7
	5	D	Agosto	TA	Pardo	1.1	R	R	R	R	R
	7	F	Septiembre	TAC	Pardo	R	R	1.5	1	1	2
	8	F	Septiembre	TAC	Pardo	1.4	2.2	2.4	1.4	2.5	2.5
NF	0	A	Noviembre	TA	Amarilla	1.3	R	R	1.3	0.7	R
	1	B	Marzo	ACM	Amarilla	R	R	R	R	1.3	1.4
	2	E	Marzo	ACM	Pardo	2	1.3	1.4	2	1.5	1.6
	3	C	Mayo	TAC	Pardo	1.2	R	2	R	2	2
	4	B	Marzo	TA	Rojo	R	1.1	R	R	R	0.7
	5	A	Marzo	TAC	Amarilla	R	R	R	2.8	1.5	1.5
PF	2	D	Agosto	TA	Pardo	1.3	1.2	R	R	0.6	0.7
	3	B	Agosto	TA	Amarilla	R	2.4	R	R	R	0.1
	4	C	Marzo	ACM	Amarilla	R	1.5	R	R	R	R
	5	D	Agosto	TA	Amarilla	R	R	1.2	R	1.5	1.7
	6	C	Octubre	ACM	Pardo	2.3	2.6	1.6	2.3	1.6	2
	7	B	Octubre	ACM	Pardo	1.5	1.7	2	1.9	1.7	2.6
RC	2	A	Octubre	ACM	Amarilla	1.6	2.4	2.3	1.6	2.5	2.3
	4	A	Agosto	TA	Blanca	1.7	1.3	0.8	2.2	0.8	1.3
	5	A	Octubre	ACM	Gris	R	2.1	2.4	R	2.4	2.4
	6	B	Mayo	TAC	Gris	2.4	2.9	2.1	R	2.1	2.5
	8	A	Septiembre	TAC	Gris	R	1.6	1.3	R	1.8	1.9
RN	2	A	Octubre	TAC	Amarilla	2.3	R	R	2.3	0.4	0.5
	4	B	Noviembre	ACM	Pardo	0.9	R	R	R	0.5	1.3
	5	B	Septiembre	TA	Pardo	0.7	R	R	R	0.6	R
	8	A	Septiembre	TAC	Gris	2	R	R	2.5	1	R
RV	0	A	Noviembre	TAC	Amarilla	1.1	1.1	R	R	R	R
	1	C	Mayo	TA	Amarilla	R	R	R	1.5	R	1.5
	2	B	Febrero	TA	Pardo	R	2.2	R	R	R	1.5
	3	C	Octubre	TAC	Amarilla	0.7	1	R	R	0.7	R
	4	C	Mayo	TAC	Pardo	1.4	R	1.9	R	1.9	2.5
VI	0	B	Febrero	ACM	Amarilla	R	R	R	R	R	R
	1	C	Octubre	TAC	Gris	R	2.3	R	R	R	R
	2	B	Mayo	TAC	Gris	1.5	R	1.9	R	2.1	2.3
	3	B	Noviembre	ACM	Pardo	R	1.2	2	R	1.2	2.5
	4	C	Marzo	TA	Amarilla	2.1	1.4	R	2.1	0.6	R
	5	C	Octubre	TAC	Amarilla	0.9	R	R	0.9	0.7	R
	8	F	Septiembre	TA	Pardo	2.7	1.6	2	3.3	1.6	2

12.1.2 Prueba de catalasa

Las pruebas bioquímicas relacionadas con el metabolismo microbiano ayudan a comprender cómo la célula realiza sus funciones de crecimiento y reproducción, siendo capaz de transformar diversos nutrientes para la obtención de su energía (Hayward, 2006). La prueba de la catalasa describe un tipo de metabolismo oxidativo y todas las cepas aisladas del jal mostraron una reacción positiva al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por lo que tienen un metabolismo aerobio (Figura 56).



Figura 54. Reacción de efervescencia generada por la enzima catalasa en las BOA aisladas del jal.

12.2 Identificación genética

De los aislados axénicos obtenidos, se realizó la identificación genética de la diversidad microbiana de nueve morfotipos. Una vez obtenidos los productos de la amplificación por PCR fueron secuenciados para obtener la composición nucleotídica del gen ARNr 16S. Las secuencias fueron comparadas con las secuencias disponibles en GenBank de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information). Se seleccionaron las secuencias de las cepas que mostraron el mayor porcentaje de identidad con las secuencias obtenidas de los aislados del jal (Tabla 18).

Tabla 18. Identidad genética de las BOA del jal “La Concha” de acuerdo con el gen ARNr 16S.

Aislado	Características del aislado	Microorganismo filogenéticamente más relacionado	similitud	identidad
A01N	Sitio: A Muestreo: Nov 2016 pH de la muestra: 1.31 Morfotipo: RC	<i>Achromobacter sp</i>	100%	MG214481.1
		<i>Achromobacter xilosoxidans</i>	100%	KY697918.1
		<i>Achromobacter denitrificans</i>	100%	MF033478.1
		<i>Achromobacter marplatensis</i>	100%	MG009233.1
D04S	Sitio: D Muestreo: Sep 2016 pH de la muestra: 7.58 Morfotipo: NC	<i>Actinomycetales bacterium</i>	100%	KY475779.1
		<i>Arthrobacter oxydans</i>	100%	KR812324.1
		<i>Pseudarthrobacter oxydans</i>	100%	KY696070
A04MY	Sitio: A Muestreo: mayo 2017 pH de la muestra 5.70 Morfotipo: BC	No cultivables	100%	MF314717.1
		<i>Pseudomonas sp</i>	100%	KX670935.1
		<i>Pseudomonas kunmingensis</i>	100%	MF928339

13. DISCUSIÓN

El objetivo general del presente trabajo fue aislar e identificar las bacterias oxidantes del azufre (BOA) que habitan los residuos del jal minero “La Concha” en Taxco, estado de Guerrero. Este estudio busca comprender los efectos de las condiciones limitantes de nutrientes y el alto contenido de metales pesados sobre el potencial de interacción de la comunidad cultivable de BOA. Para cumplir con este objetivo, entre otros, se realizaron ocho muestreos entre septiembre 2016 y octubre del 2017, divididos en seis sitios que presentaban una evidente variación colorimétrica debido a los estados de oxidación del azufre presente en los residuos del jal. Para clasificar cualitativamente las muestras, se determinó el color con el sistema de clasificación colorimétrica de Munsell y se describieron cinco colores: gris con cuatro tonalidades y seis matices; amarillo con cinco tonalidades y seis matices; amarillo con cinco tonalidades y seis matices; pardo con once tonalidades y doce matices; rojo con una tonalidad y un matiz; blanco, con una tonalidad y dos matices. La coloración más abundante durante todos los muestreos fue el color pardo, lo que confirma el nivel alto de oxidación del jal. Los valores de pH fueron muy heterogéneos; sin embargo, la mayoría de las muestras presentaron valores ácidos. En las coloraciones amarillas se presentaron los valores más bajos de pH. En el transcurso de los ocho muestreos, se describieron quince morfotipos coloniales que fueron aislados con medios de cultivo específicos para esta categoría metabólica del ciclo del azufre (medio de cultivo aerobio para BOA (MCA), *Thiobacillus* agar (TA) y *Thiobacillus acidophilus* agar (TAC)), de los cuales, *Thiobacillus* agar aisló la mayor abundancia (en UFC g⁻¹) y diversidad de morfotipos. Los tres medios de cultivo requirieron de siete días de incubación para el crecimiento de las bacterias. Así mismo se realizaron cinco pruebas fenotípicas: tinción Gram, prueba de crecimiento a diferentes condiciones de pH, formación de biopelícula, resistencia a antibióticos y prueba de catalasa. En la tinción Gram, el 11% de los morfotipos fueron Gram-variables, el 47% son Gramnegativos y el 42% restante fueron Grampositivos. En cuanto a morfología celular, el 80% son bacilos, el 13% son cocobacilos y el restante 7.0% son cocos. La prueba de crecimiento a diferentes condiciones de pH confirmó que las cepas aisladas de este jal tienen un mejor desempeño fisiológico en condiciones de acidez. La prueba de formación de biopelícula mostró que todos los morfotipos analizados tienen la capacidad de producirla; sin embargo, no presentan movilidad. También se analizó la capacidad de resistencia antibióticos

en un lapso de 24 horas en los aislados de BOA, lo cual, mostró que 55% fueron resistentes a amikacina, 43% a gentamicina y 50% a tetraciclina. Para la prueba de catalasa los quince morfotipos dieron positivo, lo que confirma que son bacterias oxidantes. Finalmente, la identificación genética de los morfotipos más abundantes mostró que no se encuentran relacionadas con cepas que tradicionalmente han sido identificadas como BOA. Su identidad genética estuvo relacionada con cepas bacterianas que han sido aisladas de otros sitios contaminados y que presentan la capacidad de formar simbiosis con organismos vegetales, generando interacciones ecológicas que fomentan su crecimiento.

13.1 Análisis colorimétrico y determinación de pH de los residuos mineros del jal “La Concha”

Los jales mineros son una mezcla heterogénea de roca triturada y fluidos que se generan de la extracción de metales de importancia económica, combustibles minerales y carbón (Courtney, 2013; Kossoff *et al.*, 2014). El sustrato de los jales es denominado un suelo antropogénico porque son el resultado de la alteración inducida derivada de actividades económicas (Echevarria y Morel, 2015). Específicamente, el tipo de suelo antropogénico generado por la industria minera se denomina tecnosol o sustrato tecnogénico, el cual, se caracteriza por estar contaminado con diversos elementos potencialmente tóxicos (p. ej. metales pesados) (Šimonovičová *et al.*, 2019). Por esta razón, los residuos del jal “La Concha” fueron analizados con los parámetros que se emplean para la caracterización de un suelo natural.

El color de los suelos se puede utilizar para explicar su génesis y su grado de meteorización; además, de que es un criterio importante para su clasificación. El color del suelo se ve influenciado por: compuestos adicionales (con color e incoloros) distintos de los óxidos de Fe; contenido de humedad; cantidades, tamaño de partículas y morfología de minerales; sustitución catiónica de elementos menores. Por lo tanto, la identificación de los compuestos minerales a través de la determinación de color tiene el potencial de producir información sobre la pedogénesis (Rucks, *et al.*, 2004; Azzali, *et al.*, 2011). El color de un jal está definido por la composición química y mineralógica del material parental de la zona

donde se ubica la mina. Este color puede cambiar por los procesos de intemperismo y, por la cantidad, el tipo y el tamaño de partícula de los minerales colorantes (Azzali *et al.*, 2011).

En las muestras recolectadas del jal “La Concha” la clasificación colorimétrica de sus residuos fue un punto de referencia para identificar el grado de la oxidación de los compuestos sulfurados que contiene (Talavera Mendoza *et al.*, 2005). De acuerdo con el sistema de clasificación de Munsell, los residuos del jal “La Concha” se agruparon en cinco categorías: gris, amarillo, pardo, rojo y blanco. Existe una alta heterogeneidad en los colores presentes en el jal, siendo la coloración parda la más abundante, seguidas de las coloraciones amarillas y grises, respectivamente. En menor proporción se observaron coloraciones blancas y rojas. Los residuos generados de la minería se caracterizan por tener una coloración gris claro y oscuro debido al contenido alto de sulfuros (pirita, principalmente) (Korehi *et al.*, 2014; Lilić *et al.*, 2014). La oxidación de los sulfuros genera un cambio de color de grises a café rojizo a ocre (café), reflejando su grado de meteorización (Azzali *et al.*, 2011).

Según lo descrito por Romero *et al.* (2008), los residuos de los jales mineros de Taxco tienen una coloración gris por su contenido alto de sulfurados minerales reducidos y, cuando ocurre su oxidación, cambia su color a amarillo, café (pardo) y rojo. También pueden estar presentes minerales con capacidad de neutralización como: carbonatos, hidróxidos y aluminosilicatos. Algunos de los minerales que podrían estar generando los colores en el jal “La Concha” podrían ser la hematita (Fe_2O_3 ; color rojo) y la goethita ($\alpha\text{-FeOOH}$; color amarillo) (Benner, *et al.*, 2000; Rucks *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2007; Romero y Gutiérrez Ruíz, 2010). En 2019, Montero determinó el color en un área del relave “La Concha” con evidencia de un grado heterogéneo de oxidación. Sus resultados mostraron las coloraciones características del proceso de oxidación de la forma más reducida de azufre (gris) a su forma elemental (amarillo) y al nivel máximo de oxidación (sulfatos, colores pardo-rojizos). Por lo tanto, los colores identificados en el presente estudio confirman que el tecnosol del jal “La Concha” tiene un nivel alto de oxidación.

El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos porque se relaciona con la disponibilidad de nutrientes y la

presencia de elementos tóxicos (Thomas, 1996). El pH se refiere a el grado de adsorción de iones de hidrógeno activos que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los compuestos sólidos y líquidos, que fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. La escala de pH en el suelo se divide en tres condiciones generales: la acidez, la neutralidad y la alcalinidad. Estas a su vez, se subdividen en: fuertemente ácidos (<5.0), moderadamente ácido (5.1-6.5), neutro (6.6-7.3), moderadamente alcalino (7.4-8.5), fuertemente alcalino (>8.6). (Fernández *et al.*, 2006).

En el presente estudio, se observó una gran variabilidad en los valores de pH a lo largo de los sitios analizados. Por ejemplo, en el sitio A se obtuvo el valor de pH más alcalino (8.56) que fue determinado en una muestra de coloración gris; de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, este valor de pH se clasifica como moderadamente alcalino. Mientras que el valor más bajo de pH (0.06) fue determinado en una muestra amarilla (clasificada como fuertemente ácida; NOM-021-RECNAT-2000). A pesar de esta posible tendencia que describiría el proceso de oxidación gradual del azufre presente en los residuos del jal “La Concha”, al analizar los resultados de pH por año o sitio de muestreo, no se observó un comportamiento constante (ver Figuras 23 a 28). Esta heterogeneidad en el pH es una característica de los jales de Taxco y de otras partes del mundo (Corrales-Pérez y Romero, 2013; Talavera Mendoza *et al.*, 2016; Crognale *et al.*, 2017; Šimonovičová *et al.*, 2019). Los jales de Taxco tienen una concentración alta en sulfuros que tienden a oxidarse y generar lixiviados extremadamente ácidos (pH <2.0) con concentraciones altas de sulfatos y de metales pesados (Talavera Mendoza *et al.* 2005, 2006, 2016). Además de los factores ambientales, la actividad biológica participa en el proceso de oxidación del azufre. En condiciones aerobias y en presencia de luz, el sulfuro y el azufre elemental se oxidan espontáneamente por la acción de bacterias fotosintéticas que producen iones sulfato e hidrógeno que disminuyen el pH del medio (Madigan, 2008).

La pirita es el sulfuro mineral más abundante en los desechos mineros, su oxidación biológica también propicia la acidificación de los jales y, en consecuencia, la generación del ion hierro III (ion férrico) por hidrólisis (Olson *et al.*, 1981). Ambos procesos son realizados

por las bacterias oxidantes del azufre (BOA) y por las bacterias oxidantes de hierro (BOH), respectivamente (Hebert *et al.*, 2005; Dopson y Johnson, 2012).

Metabólicamente, las BOA se clasifican como fotoautotróficas (BOAP) y quimiolitotróficas (BOAQ) (Pokorna y Zabranska, 2015). Las BOAP obtienen la energía de la luz y las BOAQ de procesos de oxidación (Tang *et al.*, 2009).

Las BOAQ pueden usar el oxígeno (aerobias) o los nitratos/nitritos (anaerobias) como aceptores durante la oxidación de especies inorgánicas reducidas de azufre (sulfuro de hidrógeno, tiosulfatos, sulfitos y azufre elemental) (Satoh *et al.*, 2009; Pokorna y Zabranska, 2015). Estas bacterias del azufre se caracterizan por ser Gramnegativas y, de acuerdo con el género o especie, pueden crecer a una temperatura óptima de 4.0 a 90°C y en un rango de pH de 1.0 a 9.0 (Tang *et al.*, 2009; Pokorna y Zabranska, 2015). Cuando las BOA se desarrollan en valores de pH ~9.0, se les denomina bacterias neutrófilas (BOAN) y tienen la capacidad de disminuir el pH del medio entre 5.0 y 3.5. Con un pH ≤ 5.0, se propicia la proliferación de bacterias acidófilas (BOAA), las cuales, continúan la oxidación del azufre y disminuyen el pH a ~2.0. La disminución del pH del medio se debe al incremento de la producción de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Huber *et al.*, 2016).

La heterogeneidad de la composición química de los jales mineros se ve reflejada en la variabilidad de los valores de pH (ácidos, neutros y básicos) determinados en este y en estudios previos (Hernández Acosta *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2014; Talavera Mendoza *et al.*, 2016; Montero, 2019). Por esta razón, los valores de pH cuantificados en el jal “La Concha” da indicios de la presencia de BOA debido a su amplia versatilidad metabólica.

13.2 Comparación de medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias oxidantes del azufre

En la actualidad existen diversos medios de cultivo bacterianos que contienen los nutrientes necesarios para cubrir los requerimientos específicos permiten su aislamiento, propagación y cultivo (Cercenado y Cantón, 2010; Ramírez-Gama *et al.*, 2013). Diversos trabajos han sido desarrollados para comprender la ecología y la fisiología de las bacterias que intervienen en el ciclo del azufre (Friedrich *et al.*, 2001; Lens y Kuenen, 2001). También existen estudios

acerca del complejo ciclo interno del azufre que se produce en las biopelículas en ambientes altamente ácidos (Baldwin y Fraser, 2009). Sin embargo, la información relacionada con la diversidad filogenética y la versatilidad metabólica de las bacterias del ciclo del azufre es limitada. Las condiciones de crecimiento (sales minerales y suplementos vitamínicos) de algunos géneros que participan en el ciclo del azufre (*Thiobacillus*, *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Desulfovibrio*) han sido completamente determinadas (Velázquez, 2013). Por lo que, se decidió tomar esta información como punto de referencia y hacer las modificaciones pertinentes para ampliar el espectro de aislamiento de las BOA (pH, concentración de las sales y tiempos de incubación, principalmente).

Para el aislamiento de las BOA del jal “La Concha” se seleccionaron tres medios de cultivo con diferentes condiciones nutricionales y de pH. El medio de cultivo aerobio (MCA; pH 6.8) y *Thiobacillus* agar (TA; pH 6.0), ambos con tiosulfato como principal fuente de azufre; y el medio *Thiobacillus acidophilus* agar (TAA; pH 6.5) usa sales sulfatadas como fuente de azufre. La producción de H_2SO_4 por las BOA se determinó al cuantificar los cambios en el pH del medio; para lo cual, se probó la eficacia de tres indicadores: rojo fenol, que cambia de color rojo a amarillo en un rango de pH entre 8.5 y 6.9; verde de bromocresol, que cambia de color azul a amarillo en un rango de pH entre 5.4 y 3.8, y azul de bromofenol, que cambia de color morado a amarillo en un rango de pH entre 4.6 a 3.0. Estos indicadores fueron seleccionados para abarcar las condiciones de pH óptimas para el crecimiento de las BOA (Huber *et al.*, 2016).

Las colonias de presuntivas BOA que crecieron en los tres medios de cultivo fueron clasificadas de acuerdo con sus caracteres fenotípicos. Es importante mencionar que en los tres medios de cultivo se observó una disminución significativa del pH debido a la producción de H_2SO_4 (Pokorna y Zabranska, 2015). Siendo el medio TA fue el que tuvo un mayor rendimiento en el aislamiento de las BOA del jal “La Concha”, debido a que ~60% de los aislados generaron la disminución del pH en el medio. El alto rendimiento del medio TA para el aislamiento de BOA ha sido observado anteriormente (Huber *et al.*, 2016).

13.3 Evaluación de la composición de las comunidades bacterianas a través de índices de diversidad

Estudios han descrito el efecto generado por el impacto antropogénico sobre la diversidad y la composición de las comunidades bacterianas. En suelo de humedales y de montaña, las comunidades bacterianas son sensibles a los cambios de pH, cambio de uso y al nivel de restauración (Hartman *et al.*, 2008; Mayerhofer *et al.*, 2021). En lagos, las comunidades bacterianas se ven afectadas por el efecto del ingreso económico en la zona; siendo la calidad del aire, la concentración de ozono y la urbanización, los principales factores que disminuyen su diversidad y composición (Luo *et al.*, 2022). En sedimentos costeros de regiones subtropicales, el ensamblaje de las comunidades bacterianas depende de los cambios en los factores ambientales y de la presencia de metales pesados (Zhao *et al.*, 2022). En jales mineros diversos factores modulan la diversidad y la composición de las comunidades bacterianas, como: cambios de pH (Mendez *et al.*, 2008); la presencia de metales pesados (Zhang *et al.*, 2012); la movilidad de sales (conductividad eléctrica; Wakelin *et al.*, 2012); la disponibilidad de fósforo y la presencia de vegetación (Rosario *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018; Colin *et al.*, 2019); la cantidad de dióxido de carbono (Li *et al.*, 2019) y, la concentración de carbono orgánico total (Wu *et al.*, 2022).

En el presente trabajo, la composición de las comunidades bacterianas y la similitud entre las cepas cultivables encontradas en el jal “La Concha” fue evaluada a través de la estimación de la diversidad alfa y beta a partir de las unidades formadoras de colonias (UFC). La abundancia de las BOA en UFC de “La Concha” son similares a lo observado en sitios mineros de Suecia (Hebert *et al.*, 2005). Actualmente, los índices de diversidad de las bacterias presentes en jales mineros han sido calculados con datos de secuencias ambientales y no existe un criterio único para seleccionarlos. A pesar de lo anterior, al comparar los índices estimados con las bacterias cultivables de la “La Concha”, se observó que el índice de dominancia ($D' = 0.11$) fue superior a lo observado en jales con desechos de la extracción de oro en Sudáfrica ($\bar{x} = 0.013$; Sibanda *et al.*, 2019); el índice de Simpson ($1-D = 0.89$) se aproximó a lo estimado en Sudáfrica ($\bar{x} = 0.9861$; Sibanda *et al.*, 2019) y en jales ricos en pirita en China ($\bar{x} = 0.9867$; Wu *et al.*, 2022), pero fue superior a lo observado en jales ricos

en arsénico de minas de oro de la Malasia (0.1661; Hamood Altowayti *et al.*, 2020); el índice de Shannon-Weiner ($H' = 1.05$) fue mayor a lo estimado en tecnosoles alcalinos de Europa ($\bar{X} = 0.19$; Zappelini *et al.*, 2015), e inferior a lo calculado en Sudáfrica ($\bar{X} = 5.7908$; Sibanda *et al.*, 2019) y en los jales de pirita en China ($\bar{X} = 9.2833$; Wu *et al.*, 2022) y, finalmente, índice de equidad de Pielou ($J' = 0.23$) fue menor a lo estimado en los tecnosoles alcalinos ($\bar{X} = 0.72$; Zappelini *et al.*, 2015) y en los jales de pirita en China ($\bar{X} = 0.84$; Wu *et al.*, 2022). Pereira *et al.* (2014) describieron la diversidad de BOA en desechos de minas de cobre en Brasil. El índice de Simpson (1-D) en muestras cercanas a la neutralidad fue 0.86 y en muestras ácidas fue de 0.66. Lo que demostraba una abundancia baja en el sitio con presencia de drenaje ácido de mina (DAM). En el presente estudio, se observó una abundancia alta (1-D = 0.89) a pesar de la heterogeneidad del pH. En el jal “La Concha”, los índices revelaron que no hubo diferencias significativas entre el DAM y las muestras de tecnosol en términos de diversidad. Estudios han demostrado que después de un siglo de exposición al DAM, la comunidad bacteriana se estabiliza y aumenta su diversidad a un nivel similar a áreas conservadas (Bouskill *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2013;). La mina de “La Concha” operó por más de 50 años, por lo que se esperaba que la diversidad fuera menor en sitios donde se registró mayor acidez, dado que solo unos pocos grupos de bacterias serían resistentes a las condiciones extremas de este sitio.

Debido a sus condiciones físicas y químicas, los jales mineros son considerados reservorios de bacterias de gran potencial biotecnológico y de biorremediación (Sibanda *et al.*, 2019). En algunas áreas contaminadas se ha observado una abundancia alta de ciertos grupos bacterianos que son tolerantes a metales pesados (Kunito *et al.*, 1999). Sin embargo, los efectos de la presencia de metales pesados sobre las comunidades bacterianas del suelo no se han comprendido completamente. Guo *et al.* (2009) observaron que suelos contaminados con metales pesados en dos minas de cobre (Australia) no tuvieron ningún impacto en la diversidad microbiana. Pero, Chodak *et al.* (2013) describieron que un alto contenido de metales pesados en suelos forestales influye negativamente en la actividad y la diversidad bacteriana.

En los mismos sitios de muestreo del presente estudio, Montero (2019) realizó la cuantificación de fosfatos y de materia orgánica, siendo la primera vez que se reporta su

presencia en el jal “La Concha”. Como se mencionó anteriormente, la presencia de nutrientes también modula la diversidad y la composición de las comunidades bacterianas en jales mineros (Rosario *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018; Colin *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2022).

Por lo tanto, la diversidad y la composición de las comunidades de bacterias en los tecnosoles de origen minero depende de la acción de diversas variables, además de la influenciada de la toxicidad generada por los metales pesados y los factores de estrés como la acidez.

13.4 Clasificación de las bacterias oxidantes del azufre aisladas del jal “La Concha” con base a la morfología colonial

La morfología colonial es un criterio importante a nivel taxonómico y para el diagnóstico en la microbiología y su proceso de formación depende de factores ambientales (pH, temperatura, principalmente) y de la concentración de nutrientes (Brocklehurst *et al.*, 1995; McKay y Peters, 1995; Bae *et al.*, 2011). Las colonias son agrupaciones bacterias y pueden contener $\sim 1.0 \times 10^6$ células (Drazek *et al.*, 2015; Jeanson *et al.*, 2015). Dentro de las colonias, las bacterias pueden adaptarse a condiciones limitadas de nutrientes; a cambios de temperatura, de pH y de humedad y, en consecuencia, se producen cambios fenotípicos (Ngo Thi y Naumann, 2007). La Sociedad de Microbiología de Londres describe cuáles son las características que se usan para describir una bacteria que crece en una caja Petri (Microbiology Society, s.f.). Aplicando estos criterios, se describieron 15 morfotipos coloniales en las presuntivas BOA aisladas del jal “La Concha”.

La clasificación de las bacterias cultivables por su morfología colonial (biotipos) es un procedimiento básico en la ecología microbiana para seleccionar clonas (en ambientes complejos) o para el aislamiento de especies dominantes (evaluación de la diversidad) (Lebaron *et al.*, 1998). La descripción de la morfología colonial puede proporcionar información sobre la diversidad individual (o intraespecífica) generada por cambios genéticos permanentes o reversibles (Sousa *et al.*, 2013a). También, las morfologías coloniales son un indicador de variación fenotípica como una respuesta adaptativa a factores de estrés (Sousa *et al.*, 2013b). Por ejemplo, en bacterias patógenas, los cambios en su

morfología colonial son generados en respuesta a la desnutrición (*starvation*), a la limitación de hierro y a crecimiento a temperatura elevada (42°C) (Chantratita *et al.*, 2007).

Las morfologías observadas en las colonias bacterianas de las muestras del jal minero “La Concha” no coinciden con lo reportado anteriormente en los géneros clasificados como BOA (*Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Beggiatoa* y *Thiothrix*), los cuales, se caracterizan por ser incoloras (*colorless sulfur-oxidizing bacteria*) (Pokorna y Zabranska, 2015). En el presente estudio, los aislados seleccionados se caracterizaban por tener colonias con pigmentación amarilla, azul, canela, naranja, rosa, blanca, verde y roja. La clasificación de las bacterias por su morfología colonial puede subestimar su diversidad taxonómica: los morfotipos con más similitudes pueden pertenecer a un mismo grupo genético, pero con los morfotipos variables tiene mayor diversidad genética (Lebaron *et al.*, 1998). Las colonias seleccionadas de “La Concha” tuvieron la principal propiedad metabólica de las BOA, que es la acidificación del medio de cultivo; por lo que, es probable que existan más grupos bacterianos que tengan esta capacidad metabólica. Por otro lado, los 15 morfotipos descritos en las muestras del jal “La Concha” fueron descritos en los diferentes sitios de muestreo y mostraron variación en su abundancia y en su distribución. Los jales mineros son ambientes heterogéneos en su composición física y química (Courtney, 2013; Kossoff *et al.*, 2014; Šimonovičová *et al.*, 2019), lo cual, podría generar microambientes que limitan la distribución de los grupos bacterianos que lo colonizan. Uno de los aspectos que más llama la atención son los patrones de similitud en colonias bacterianas en diferentes ecosistemas y la existencia de patrones variables cuando se cultiva una cepa en condiciones análogas (Sousa *et al.*, 2013a). Por lo tanto, la variación en la morfología colonias de las BOA podría ser una consecuencia de la diversidad intraespecífica de este grupo metabólico con implicaciones genéticas y fenotípicas en respuesta a las condiciones ambientales y a los factores de estrés del jal “La Concha”.

13.5 Caracterización fenotípica y descripción de estrategias ecológicas de las BOA del jal “La Concha”.

Para analizar la variación intraespecífica de las BOA aisladas del jal “La Concha” se realizó su caracterización fenotípica. Los análisis fenotípicos forman parte de un grupo de pruebas

utilizadas en la descripción de cepas ambientales y para la identificación de nuevas especies bacterianas (Cercenado y Cantón, 2010).

La **tinción Gram** es una de las técnicas más importantes en la microbiología, la cual, se basa en la retención del color primario que se ve al microscopio como púrpura-café en bacterias **Grampositivas** y, aquellas que no se quedan con la primera tinción, se ven en color rojo al microscopio y se denominan bacterias **Gramnegativas** (Tripathi y Sapra, 2021). Algunas veces la distinción entre estas dos categorías no es clara, y se observan células Gramnegativas entre células Grampositivas, por lo cual, se denominan **Gram-variables** (Beveridge, 1990). Al realizar la tinción de Gram en los aislados de BOA del jal “La Concha” se observó que 47% son Gramnegativos, 42% fueron Grampositivos y 11% fueron Gram-variables. En términos generales, las BOA conocidas como *colorless sulfur-oxidizing bacteria* son Gramnegativas (Pokorna y Zabranska, 2015). A pesar de que las BOA de “La Concha” no son incoloras, la tinción de Gram mostró que son el tipo celular más abundante. Sin embargo, existen bacterias acidófilas moderadas (p. ej. *Sulfobacillus* spp.) que tienen la capacidad de oxidar azufre en su forma elemental y de compuestos inorgánicos reducidos (p. ej. tiosulfato) que son Grampositivas, pero no habitan sitios con acidez extrema (Dopson y Johnson, 2012). El género *Sulfobacillus* (especie tipo *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* Golovacheva y Karavaiko 1991, 179VP) es un bacilo que forma endosporas y que produce colonias sin pigmentación (da Costa *et al.*, 2015). Las bacterias clasificadas como Gram-variables son una consecuencia del estrés presente durante su crecimiento (p. ej. pH, temperatura, electrolitos o limitación de nutrientes); pero, algunas especies se caracterizan por esta variabilidad incluso en condiciones óptimas de crecimiento (Beveridge, 1990). Por lo que, esta variabilidad observada con la tinción de Gram puede ser por la presencia de BOA que pertenecen a grupos filogenéticos con condiciones de crecimiento vinculadas a la heterogeneidad (física y química) o por los factores de estrés del jal “La Concha”.

El pH es un parámetro que se considera como el control primario para el metabolismo microbiano (Zhalnina *et al.*, 2015). El pH está correlacionado con la composición y actividad de las comunidades bacterianas a lo largo de gradientes biogeoquímicos (Thompson *et al.*, 2017). Las bacterias tienen la capacidad de crecer en diferentes rangos de pH: acidófilos (pH

= 1.0-3.0), **neutrófilos** (5.5-9.0) y **alcalófilos** (10-13) (Sánchez-Clemente *et al.*, 2018). El pH influye la tasa respiración y en los procesos de óxido-reducción (Redox) (p. ej. reducción del hierro y sulfatos, y metanogénesis) (Jin y Kirk, 2018). Experimentalmente, se ha observado que los cambios de pH pueden determinar propiciar o inhibir el crecimiento y, en casos extremos, puede causar la extinción de la población bacteriana (Ratzke *et al.*, 2018). Las BOA tienen la capacidad de crecer óptimamente en un rango de pH de 1.0 a 9.0 (Pokorna y Zabranska, 2015). Las cepas aisladas del jal “La Concha” fueron aisladas en muestras con estos valores de pH. Sin embargo, la prueba de crecimiento a diferentes condiciones de pH mostró que las BOA de “La Concha” tienen un mejor desempeño fisiológico en condiciones de acidez. Por lo tanto, la tendencia de oxidación de los residuos de “La Concha” le otorgan esta capacidad fisiológica a los aislados de BOA de este jal y se clasificarían como acidófilas.

Las **biopelículas** (o *biofilm*) son comunidades de microorganismos que se encuentran embebidos en una matriz de sustancias extrapoliméricas (ADN, lípidos, polisacáridos y proteínas) que son sintetizadas por ellos mismos, las cuales, le dan estructura y estabilidad mecánica (Flemming y Wingender, 2010). Dentro de esta matriz ocurren diversas actividades enzimáticas que generan un microambiente donde ocurren un flujo de nutrientes y sustancias gaseosas (Allison, 2003). En sitios ricos en sulfuro (como cuevas, relaves y **lixiviados mineros**) en común encontrar la presencia de **biopelículas** (Bond *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2012; Yelton *et al.*, 2013). De hecho, en estas biopelículas ocurre el **ciclo del azufre**, llevándose a cabo la reducción de sulfatos y la oxidación de sulfuros (Satoh *et al.*, 2009). Por lo que, en estas biopelículas se lleva a cabo la **biolixiviación** de sulfuros metálicos por actividad microbiana (Bellenberg *et al.*, 2014). Por esta razón, las biopelículas son un **hábitat** común de las BOA (Dopson y Johnson, 2012). El ensayo en placa de microtitulación es una herramienta útil para describir las etapas iniciales de la formación de biopelículas bacterianas, en el cual, se pueden identificar algunos de los factores involucrados (p. ej. flagelos, pili, adhesinas y genes de producción de exopolisacáridos) y relacionarlo con procesos de resistencia a antibióticos (O’Toole, 2011). Al aplicar este ensayo en las BOA del jal “La Concha” se observó que todos los aislados analizados tenían la capacidad de formar biopelícula. Lo cual, sería un dato adicional que confirmaría su clasificación en esta categoría.

metabólica del ciclo del azufre; porque les otorga una ventaja ecológica para vivir en las condiciones presentes en el jal (Pokorna y Zabranska, 2015). En ambientes neutros se ha observado la presencia de BOA acidófilas, debido a que se pueden formar *micronichos acidicos* donde se desarrollan biopelículas (Huber *et al.*, 2016). Por esta razón, las BOA de “La Concha” pudieron ser aisladas de los residuos del jal con diferente grado de oxidación. Finalmente, el aislamiento de cepas bacterianas similares a las especies tipo de BOA en los residuos del jal “La Concha” no es algo atípico, porque la formación de una biopelícula durante el proceso de colonización de la pirita permite la adición celular de otras especies bacterianas (Bellenberg *et al.*, 2014). Por lo tanto, es probable que las cepas aisladas del jal “La Concha” hayan adquirido propiedades similares a las BOA tipo al interactuar con ellas dentro de biopelículas que les permiten desarrollar condiciones adecuadas para su desarrollo y supervivencia.

Además de las biopelículas, otra forma de comunicación e interacción bacteriana se lleva a cabo a través de señales químicas que se producen entre los vecinos microbianos (Taga y Bassler, 2003). Por ejemplo, los antibióticos son sustancias que se producen naturalmente que modulan la formación de biopelículas y la comunicación interespecífica bacteriana (Townsend y Shank, 2017). Los antibióticos son metabolitos secundarios de origen microbiano que son sintetizados para suprimir el crecimiento de competidores (Zhang y Straight, 2019). Fuera del uso antropogénico, los antibióticos son una forma de señalización que regula la expresión genética y fisiológica en poblaciones bacterianas (Romero *et al.*, 2011). Factores de estrés ambiental influyen en la susceptibilidad o resistencia bacteriana a los antibióticos (Poole, 2012; Kumar *et al.*, 2021). Siendo los metales pesados una presión selectiva que influye en la resistencia a antibióticos a nivel genético y fisiológico (Pal *et al.*, 2015; Wales y Davies, 2015). Metales presentes en los desechos derivados de la actividad minera (Cd, Cu, Hg, Pb y Zn) están vinculados a procesos de resistencia a antibióticos (Imran *et al.*, 2019). Esta relación se debe a que las bacterias que habitan sitios contaminados con metales pesados elevan su capacidad de adquisición de plásmidos con genes acoplados para la resistencia de ambos factores de estrés (Aminov y Mackie, 2007; Gillings y Oaulsen, 2014; Vos, 2020). “La Concha” es un jal con una elevada concentración de metales pesados

(Posadas-Hernández, 2019). En los últimos años, se han realizado estudios de metagenómica para describir la abundancia y la movilidad de genes de resistencia a antibióticos en sitios mineros donde se realizaba la extracción de cobre y oro, principalmente (Chen *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020; Qiao *et al.*, 2021). En el presente estudio, para analizar la relación entre la resistencia a antibióticos y los metales pesados presentes en “La Concha”, se utilizaron tres agentes microbianos. La amikacina y la gentamicina pertenecen a la familia de antibióticos aminoglucósidos y, la tetraciclina que es un antibiótico policétido; los tres se unen a las subunidades de los ribosomas para inhibir la síntesis de proteínas (Kumar *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2014; Ramirez y Tolmasky, 2017). A las 24 horas, entre el 40 y el 55% de los aislados analizados mostraron resistencia a los tres antibióticos. De los tres, la tetraciclina es el antibiótico más estudiado y su resistencia esta vinculada a varios metales (arsénico, cobalto, cobre, mercurio, plata, telurio y zinc) (Pal *et al.*, 2017). Mientras que, para la gentamicina, sólo existe un trabajo de investigación realizado en un mesocosmos con bacterias acuáticas (Stepanauskas *et al.*, 2006). Por otro lado, en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* se observó sensibilidad a la amikacina a concentraciones altas de varios metales (cobalto, cobre, mercurio, plata y zinc) (Iwalokun *et al.*, 2004). En otros jales mineros, la tetraciclina es el antibiótico más analizado. En 2017, Safari Sinegani y Younessi, aislaron bacterias con resistencia a antibióticos en desechos mineros de Irán, las cuales, tenían una alta resistencia a tetraciclina y eran sensibles a gentamicina; también mencionan que, a diferencia de otros sitios con metales pesados, las bacterias aisladas de jales eran resistentes a uno o dos antibióticos máximo. Zou *et al.* (2021) analizaron los genes de resistencia a antibióticos en aguas contaminadas por la minería, observando una alta abundancia de genes de resistencia a tetraciclina. En 2022, Zhou *et al.* aislaron bacterias resistentes a tetraciclina con una abundancia de 7.70×10^2 a 5.18×10^5 UFC g⁻¹ de una mina de uranio. Análisis de este tipo son útiles para la identificación de cepas con potencial uso para la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, como se observó con la cepa *Mucilaginibacter* sp. descrita en un jal minero de Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2022). A diferencia de lo reportado en estos trabajos, el ~50% de las BOA aisladas del jal “La Concha” mostraron resistencia a los tres antibióticos; algo que no se había descrito para la gentamicina y, está sería la primera vez que se reporta la resistencia a amikacina en aislados de jales mineros. **Por lo tanto, los**

metales pesados presentes en el jal “La Concha” podrían estar teniendo una alta influencia en la adquisición de genes de resistencia a antibióticos en las BOA.

La catalasa es una enzima antioxidante que mitiga el estrés oxidativo al destruir el peróxido de hidrógeno celular para producir agua y oxígeno (Nandi *et al.*, 2019). En bacterias, la prueba de la catalasa es utilizada para identificar su tipo de metabolismo (aerobio o anaerobio) (Zamocky *et al.*, 2008). Todos los aislados analizados de las BOA del jal “La Concha” fueron positivos a la enzima catalasa, lo cual, era de esperarse debido a su potencial de oxidación de las formas químicas reducidas de azufre. Sin embargo, a nivel experimental, en suelos enriquecidos con cromo (III y IV) y en jales mineros con cadmio y mercurio, la actividad de esta enzima a nivel bacteriano disminuye considerablemente (Newsome y Falagán, 2021). Una perspectiva diferente es el papel de esta enzima para contrarrestar el efecto adverso generado por los metales pesados en el suelo. En el colémbolo *Folsomia candida* se observó un incremento de la actividad de la catalasa y de otras enzimas antioxidantes en presencia de cadmio, cobre, plomo y zinc (Dai *et al.*, 2018). Además, en plantas colonizadoras de jales mineros de cobre, se observó la misma tendencia de incremento de la actividad de la catalasa y de otras enzimas antioxidantes y, adicionalmente, se generaban cambios en la estructura de las comunidades bacterianas (Chen *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2020). Por lo tanto, sería importante cuantificar la actividad de esta enzima en las BOA de “La Concha” para definir cuál es la dinámica que sigue en respuesta a los metales pesados que contiene el jal.

13.6 Identificación genética de las BOA aisladas del jal “La Concha”.

La amplificación *in vitro* del gen de ARNr 16S y, su posterior secuenciación, ha sido una herramienta importante para definir la posición filogenética de las bacterias (Rodicio y Mendoza, 2004). En sitios con desechos mineros se ha observado una dominancia de grupos bacterianos específicos. Por ejemplo, Baker y Banfield (2003) describieron diversas comunidades de arqueas y de bacterias ligadas a la formación del drenaje ácido de mina y con la capacidad de catalizar la oxidación de hierro y azufre. Los autores llegan a la conclusión de que las comunidades de estos sitios se caracterizan por tener un número muy limitado de especies debido a las condiciones de estrés a las que están expuestas. Mendez et

al. (2008) realizaron un análisis de la composición de las comunidades bacterianas presentes en dos muestras de minas altamente perturbadas con condiciones de pH (2.7 y 5.7, respectivamente) y compararon sus resultados con un sitio sin perturbación. Los fragmentos de ARNr 16S que fueron amplificados se relacionaron con bacteria acidófilas. A nivel de biopelícula, se observa una dominancia de comunidades de BOA y de bacterias sulfatos reductoras (Satoh *et al.*, 2009), lo cual, puede ser una consecuencia del nivel de estructuración alcanzado en este tipo de ambientes bacterianos. Sin embargo, el análisis de las secuencias obtenidas de los aislados del jal “La Concha” permitió la **identificación de géneros bacterianos distintos** a los que comúnmente han sido identificados como BOA o de sitios mineros.

Las secuencias del gen ARNr 16S de “La Concha” se relacionaron genéticamente con bacterias que habitan en sitios con presencia de contaminantes diferentes a los metales pesados o con bacterias que tienen actividades vinculadas con el crecimiento vegetal. Por ejemplo, el aislado A01N (morfortipo RC) fue obtenido de una muestra de color gris con un pH extremadamente ácido (1.31) y mostró 100% de identidad con la cepa *Achromobacter marplatensis* (MG009233.1) que tiene un efecto regulador y promotor del crecimiento en la rizosfera y que fue aislada de suelo contaminado en India. Sin embargo, **este tipo de resultados no son diferentes a lo observado en otros sitios mineros**. Por ejemplo, Tan et al. (2008), a nivel cultivable, observaron una dominancia 10 veces mayor de heterótrofos acidófilos cultivables sobre las BOA y las oxidantes de hierro. Mientras que Korehi et al. (2014), con secuencias ambientales, en jales mineros productores de drenaje ácido de mina presentaron una dominancia de Proteobacterias y Firmicutes. Y Pereira et al. (2014), con un análisis metagenómico en un sitio con drenaje ácido de mina, observaron que la composición de las comunidades bacterianas depende de la presencia de algunos metales pesados (níquel y zinc) y están dominadas por bacterias resistentes a condiciones extremas de desecación, irradiación, oxidación y temperaturas elevadas (géneros *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Thermus*, y *Trupera*).

Por otro lado, la **presencia de vegetación** en los jales mineros tiene una influencia importante en la estructura y la composición de las comunidades bacterianas que contienen. Rosario et al. (2007), en un jal minero con cubierta vegetal en Arizona, observaron

diferencias en la abundancia y en la composición de las comunidades bacterianas adyacentes a una planta que fue tratada con composta en comparación con un sitio sin tratamiento. Por otro lado, plantas de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) colonizadoras de un jal rico en plomo y zinc, tienen la capacidad de tolerar y acumular ambos metales y, su sistema radicular, mostró una dominancia de secuencias ambientales relacionadas con *Arthrobacter* y *Pseudomonas* (Zhang *et al.*, 2012). Ambos géneros fueron identificados en las BOA aisladas del jal “La Concha”. Finalmente, Jia *et al.* (2020) observaron que la composición de la comunidad bacteriana estaba definida por el efecto progresivo de fitorremediación, con presencia de algunos géneros dominantes, como: *Amnibacterium*, *Curtobacterium*, *Massilia*, *Methylobacterium* y *Sphingomonas*. Es importante mencionar que el “La Concha” han sido descritas varias especies colonizando sus residuos (Gómez-Bernal *et al.*, 2010). Por lo tanto, es posible que las condiciones físicas y químicas presentes en el jal “La Concha”, además de la presencia de vegetación, hayan modificado las propiedades de los residuos y esto haya propiciado el establecimiento y la proliferación de grupos bacterianos diferentes a las BOA tipo que han sido descritas en otros sitios mineros.

14. CONCLUSIONES

- I. A pesar de la variación colorimétrica observada en los residuos del jal “La Concha” se observó una dominancia de colores que describen su alto grado de oxidación. La heterogeneidad en los valores de pH es una característica de los jales mineros, lo cual, es una consecuencia de composición química.
- II. La diversidad en las condiciones ambientales del jal “La Concha” está dentro de los parámetros de crecimiento de las bacterias oxidantes del azufre. Colonias bacterianas con diferentes propiedades fenotípicas crecieron en los tres medios selectivos; siendo el agar para *Thiobacillus*, con tiosulfato como fuente de azufre, el medio de cultivo que tuvo el mayor número de cepas con la capacidad de disminuir el pH.
- III. Los índices de diversidad bacteriana estimados en los residuos del jal “La Concha” se encuentran dentro del rango de lo calculado en otros sitios con residuos mineros. Sin embargo, no existe una tendencia unidireccional, porque puede existir una gran variación en los valores obtenidos de algunos de los índices utilizados. Esta variabilidad se debe al efecto de la heterogeneidad de las condiciones de cada jal minero porque, no solo la presencia de metales pesados y la acidez, definen la diversidad y la composición de las comunidades bacterianas.
- IV. La clasificación de las bacterias oxidantes del azufre por las características de sus colonias mostró la dominancia de 15 morfotipos en todas las muestras analizadas del jal “La Concha”. Las propiedades fenotípicas de cada morfotipo pueden ser una respuesta adaptativa a los factores de estrés presentes en el jal y una forma de describir la diversidad intraespecífica de este grupo metabólico bacteriano.
- V. El análisis de las propiedades fenotípicas de las bacterias oxidantes del azufre del jal “La Concha” mostró que son bacterias acidófilas (disminución del $\text{pH} < 3.5$) con producción de ácido durante la oxidación del azufre (heterótrofas), con alta afinidad al oxígeno (aeróbicas), que se desempeñan mejor en condiciones mesofílicas, con formación de biopelícula para la lixiviación de los sulfuros metálicos y con resistencia a antibióticos en respuesta a la presencia de metales pesados.
- VI. Las propiedades físicas y químicas del jal “La Concha” han cambiados a lo largo del tiempo, permitiendo el establecimiento y la proliferación de grupos bacterianos diferentes a las especies tipo que definen al grupo metabólico oxidante del azufre. Uno de los posibles factores que ha inducido este cambio puede ser la presencia de la vegetación que se encuentra colonizando los residuos de “La Concha”.

15. REFERENCIAS

1. Allison D. G. (2003). The biofilm matrix. *Biofouling*, 19(2), 139–150. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>
2. Aminov, R. I., y Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS microbiology letters*, 271(2), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757>.
3. Arellano, P., González, M., Gutiérrez, R., Martínez, F., Romero, D., y Saucedo, C., (2005). Manual de prácticas para el laboratorio de microbiología general I 6° semestre. Carrera de Química Farmacéutico- Biológica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México 111. 35-39
4. Atlas R. y Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson-Addison Wesley. Madrid. 422-429.
5. Azzali, E., Marescotti, P., Frau, F., Dinelli, E., Carbone, C., Capitani, G., & Lucchetti, G. (2014). Mineralogical and chemical variations of ochreous precipitates from acid sulphate waters (asw) at the Rosia Montana gold mine (Romania). *Environmental earth sciences*. 10.1007/s12665-014-3264-z.
6. Bae, E., Aroonual, A., Bhunia, A. K., & Hirtleman, E. D. (2011). On the sensitivity of forward scattering patterns from bacterial colonies to media composition. *Journal of biophotonics*, 4(4), 236–243. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000051>
7. Baker, B. J., & 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)
8. Baldwin, D. S. and Fraser, M. (2009). Rehabilitation options for inland waterways impacted by sulfidic sediments - a synthesis. *Journal of Environmental Management* 91, 311-319.
9. Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., & Vera, M. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in microbiology*, 165(9), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.006>
10. Benner, S. G., Gould, W. D., & Blowes, D. W. (2000). Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage. *Chemical Geology*, 169(3–4), 435–448. [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(00\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(00)00219-9)
11. Beveridge T. J. (1990). Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of bacteriology*, 172(3), 1609–1620. <https://doi.org/10.1128/jb.172.3.1609-1620.1990>

12. Bing, H., Wu, Y., Zhou, J., & Sun, H. (2016). Biomonitoring trace metal contamination by seven sympatric alpine species in Eastern Tibetan Plateau. *Chemosphere*, 165, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.042>
13. Bond, P. L., Smriga, S. P., & Banfield, J. F. (2000). Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3842–3849. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3842-3849.2000>
14. Bos, P., Kuenen, J. G. 1983. Microbiology of sulphur oxidizing bacteria. 18–27. Microbial corrosion. The Metals Society. London.
15. Bouskill, N.J., Barker-Finkel, J., Galloway, T.S. et al. Temporal bacterial diversity associated with metal-contaminated river sediments. *Ecotoxicology* 19, 317–328 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10646-009->
16. Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., Ridge, Y. P., Seale, R., & Smith, A. C. (1995). The effect of transient temperatures on the growth of *Salmonella typhimurium* LT2 in gelatin gel. *International journal of food microbiology*, 27(1), 45–60. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00152-v](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00152-v)
17. Cercenado, E., & Cantón, R. (2010). Métodos de identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. España, Editorial Seimc, 6-8.
18. Chantratita, N., Wuthiekanun, V., Boonbumrung, K., Tiyawisutsri, R., Vesaratchavest, M., Limmathurotsakul, D., Chierakul, W., Wongratanacheewin, S., Pukritiyakamee, S., White, N. J., Day, N. P., & Peacock, S. J. (2007). Biological relevance of colony morphology and phenotypic switching by *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of bacteriology*, 189(3), 807–817. <https://doi.org/10.1128/JB.01258-06>
19. Chen, F., Wang, S., Mou, S., Azimuddin, I., Zhang, D., Pan, X., Al-Misned, F.A., Mortuza, M.G. (2015). Physiological responses and accumulation of heavy metals and arsenic of *Medicago sativa* L. growing on acidic copper mine tailings in arid lands,
20. Chen, J., Li, J., Zhang, H., Shi, W., & Liu, Y. (2019). Bacterial Heavy-Metal and Antibiotic Resistance Genes in a Copper Tailing Dam Area in Northern China. *Frontiers in microbiology*, 10, 1916. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01916>
21. Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., Niklińska, M. (2013). Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals, *Applied Soil Ecology* 64, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.11.004>.

22. Colin, Y., Goberna, M., Verdú, M., & Navarro-Cano, J. A. (2019). Successional trajectories of soil bacterial communities in mine tailings: The role of plant functional traits. *Journal of environmental management*, 241, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.023>
23. Comisión Nacional de la Biodiversidad (CONABIO) (2015). Sierras de Taxco – Huautla. RTP- 120. En línea, fecha de consulta: Consultado 20-04-2018 en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_120.pdf
24. Corrales-Pérez, D., & Romero, F. M. (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.
25. Courtney R. (2013). Mine tailings composition in a historic site: implications for ecological restoration. *Environmental geochemistry and health*, 35(1), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s10653-012-9465-z>
26. Crognaletti, S., D'Annibale, A., Pesciaroli, L., Stazi, S. R., & Petruccioli, M. (2017). Fungal Community Structure and As-Resistant Fungi in a Decommissioned Gold Mine Site. *Frontiers in microbiology*. 8, 2202. doi:10.3389/fmicb.2017.02202
27. da Costa, M., Rainey, F. & Albuquerque, L. (2015). *Sulfobacillus*. 10.1002/9781118960608.gbm00729.
28. Dai, W., Ke, X., Li, Z., Gao, M., Wu, L., Christie, P., & Luo, Y. (2018). Antioxidant enzyme activities of *Folsomia candida* and avoidance of soil metal contamination. *Environmental science and pollution research international*, 25(3), 2889–2898. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0489-x>
29. Dopson, M., & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental microbiology*, 14(10), 2620–2631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02749.x>
30. Dótor Almazán, A., Armienta Hernández, M. A., Árcega Cabrera, F., & Talavera Mendoza, O. (2014). Procesos de transporte de arsénico y metales en aguas superficiales del distrito minero de Taxco, México: Aplicación de isótopos estables. *Hidrobiológica*, 24(3), 245–256.
31. Drazek, L., Tournoud, M., Derepas, F., Guicherd, M., Mahé, P., Pinston, F., Veyrieras, J. B., & Chatellier, S. (2015). Three-dimensional characterization of bacterial microcolonies on solid agar-based culture media. *Journal of microbiological methods*, 109, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.011>
32. Echevarria, G. & Morel, J. (2015). Technosols of Mining Areas. *Tópicos em Ciência do Solo*. 9, 1-20.

33. Espinosa Márquez, J., Revah, S., & Le Borgne, S. (2010). Rutas Metabólicas De Oxidación Del Azufre En Bacterias Quimiolitotórficas , Relevancia Ambiental Y Biotecnología. *Mensaje Bioquímico*, XXXIV, 101–120.
34. Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., ... Arce Oretaga, J. M. (2006). Manual de Técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. (I. N. de E. Instituto Mexicano del petróleo, Ed.), (Vol. 6). México CDMX.
35. Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
36. Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., & Fischer, J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism?. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2873-2882.
37. Gillings, M. R., & Paulsen, I. T. (2014). Microbiology of the Anthropocene. *Anthropocene*, 5, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ancene.2014.06.004>
38. Golovacheva RS, Karavaiko GI. [Sulfobacillus, a new genus of thermophilic sporulating bacteria] *Mikrobiologiya*. 1978 Sep-Oct;47(5):815-822. PMID: 101742.
39. Gómez-Bernal, J. M., Santana-Carillo, J., Romero-Martin, F., Armienta-Hernández, M. A., Morton-Bermea, O., & Aurora 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.
40. Guo, Z., Megharaj, M., Beer, M., Ming, H., Mahmudur Rahman, M., Wu, W., & Naidu, R. (2009). Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils. *Bioresource technology*, 100(17), 3831–3836. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.043>
41. Gutiérrez-Ruiz, M., Romero, F. M., & González-Hernández, G. (2007). Suelos y sedimentos afectados por la dispersión de jales inactivos de sulfuros metálicos en la zona minera de Santa Barbara, Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 24(2), 170–184.
42. Hamood Altowayti, W. A., Almoalemi, H., Shahir, S., & Othman, N. (2020). Comparison of culture-independent and dependent approaches for identification of native arsenic-resistant bacteria and their potential use for arsenic bioremediation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 205, 111267. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111267>
43. Hartman, W. H., Richardson, C. J., Vilgalys, R., & Bruland, G. L. (2008). Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 105(46), 17842–17847.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808254105>
44. Herbert, R. B., Jr, Malmström, M., Ebenå, G., Salmon, U., Ferrow, E., & Fuchs, M. (2005). Quantification of abiotic reaction rates in mine tailings: evaluation of treatment methods for eliminating iron- and sulfur-oxidizing bacteria. *Environmental science & technology*, 39(3), 770–777. <https://doi.org/10.1021/es0400537>
 45. Hernández Acosta, E., Mondragón Romero, E., Cristobal Acevedo, D., Rubiños Panta, J. E., & Robledo Santoyo, E. (2009). Vegetación, residuos de mina y elementos potencialmente tóxicos de un jal de Pachuca, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 15(2), 109–114.
 46. Huber, B., Herzog, B., Drewes, J. E., Koch, K., & Müller, E. (2016). Characterization of sulfur oxidizing bacteria related to biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters. *BMC Microbiology*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0767-7>
 47. Imran, M., Das, K. R., & Naik, M. M. (2019). Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*, 215, 846–857.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114>
 48. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). (2009) Consultado 20-04-2018 en: <http://www.inegi.org.mx>
 49. Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática (INEGI). (1991) Taxco de Alarcón: Cuaderno de Información básica para la Planeación Municipal.
 50. Ivanov, M. V., & Freney, J. R. (1983). Principal Reactions of the Global Biogeochemical Cycle of Sulphur. In John Wiley and Sons (Ed.), *The Global Biogeochemical Sulphur Cycle* (p. 470). Nueva york.
 51. Iwalokun, B., Azenabor, A.B., Bamiro, S.B, & Akinsinde, K. (2004). The Sensitivity to Aminoglycosides and Heavy Metals of Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Lagos, Nigeria. *Nigerian Journal of Health and Biomedical Sciences*. 3.
10.4314/njhbs.v3i1.11503.
 52. Jambor, J. L. (1994): Mineralogy of the sulphide-rich tailings and their oxidation products. – In: JAMBOR, J. L. & BLOWES, D.W. (eds.): *The environmental geochemistry of sulphide minewastes*. Mineral Association of Canada Short Course Handbook 22: 59–102.
 53. Jeanson, S., Floury, J., Gagnaire, V., Lortal, S., & Thierry, A. (2015). Bacterial Colonies in Solid Media and Foods: A Review on Their Growth and Interactions with the Micro-Environment. *Frontiers in microbiology*, 6, 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>

54. Jia, T., Wang, Y., & Chai, B. (2020). Bacterial Community Characteristics and Enzyme Activities in *Bothriochloa ischaemum* Litter Over Progressive Phytoremediation Years in a Copper Tailings Dam. *Frontiers in microbiology*, 11, 565806.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.565806>
55. Jiménez Arévalo, I. Y. (2005). Evaluación de la dispersión y movilidad de elementos potencialmente tóxicos (arsénico, plomo y cadmio) en suelos de Zimapán, Hgo. Protocolo de proyecto de maestría, UASLP, México.
56. Jin Q and Kirk MF (2018) pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Front. Environ. Sci.* 6:21. doi: 0.3389/fenvs.2018.00021
57. Johnson, D. B., & Hallberg, K. B. (2003). The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*, 154(7), 466–473. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00114-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00114-1)
58. Jones, D. S., Albrecht, H. L., Dawson, K. S., Schaperdoth, I., Freeman, K. H., Pi, Y., Pearson, A., & Macalady, J. L. (2012). Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *The ISME journal*, 6(1), 158–170.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2011.75>
59. Karnachuk, O. V, Gerasimchuk, A. L., Banks, D., Frengstad, B., Stykon, G. A., Tikhonova, Z. L., Pimenov, N. V. (2009). Bacteria of the sulfur cycle in the sediments of gold mine tailings, Kuznetsk Basin, Russia. *Microbiology*, 78(4), 483–491.
<https://doi.org/10.1134/S0026261709040122>
60. Korehi, H., Blöthe, M., & Schippers, A. (2014). Microbial diversity at the moderate acidic stage in three different sulfidic mine tailings dumps generating acid mine drainage. *Research in microbiology*, 165(9), 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.007>
61. Kossoff, D., Dubbin, W.E., Alfredsson, M., Edwards, S.J., Macklin, M.G., & Hudson-Edwards, K.A. (2014). Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation. *Applied Geochemistry*, 51, 229-245.
62. Kumar, A., Rahal, A., Sohal, J. S., & Gupta, V. K. (2021). Bacterial stress response: understanding the molecular mechanics to identify possible therapeutic targets. *Expert review of anti-infective therapy*, 19(2), 121–127.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813021>
63. Kumar, C. G., Himabindu, M., & Jetty, A. (2008). Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal. *Critical reviews in biotechnology*, 28(3), 173–212.
<https://doi.org/10.1080/07388550802262197>

64. Kunito, T., Senoo, K., Saeki, K., Oyaizu, H. and Matsumoto, S. (1999) Usefulness of the sensitivity-resistance index to estimate the toxicity of copper on bacteria in copper-contaminated soils. *Ecotox Environ Safe* 44, 182–189.
65. Lebaron, P., Ghiglione, J. F., Fajon, C., Batailler, N., & Normand, P. (1998). Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. *FEMS microbiology letters*, 160(1), 137–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12903.x>
66. Ledin, M., & Pedersen, K. (1996). The environmental impact of mine wastes - Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews*, 41(1–2), 67–108. [https://doi.org/10.1016/0012-8252\(96\)00016-5](https://doi.org/10.1016/0012-8252(96)00016-5)
67. Lens, P. N. L., & Kuenen, J. G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*, 44(8), 57-66.
68. Li, Y., Wu, Z., Dong, X., Jia, Z., & Sun, Q. (2019). Variance in bacterial communities, potential bacterial carbon sequestration and nitrogen fixation between light and dark conditions under elevated CO₂ in mine tailings. *The Science of the total environment*, 652, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.253>
69. Lilić, J., Cupać, S., Lalević, B., & Andrić, V. (2014). Pedological characteristics of open-pit Cu wastes and post-flotation tailings (Bor, Serbia). *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(1), 161-175.
70. Liu, Y. G., Zhou, M., Zeng, G. M., Wang, X., Li, X., Fan, T., & Xu, W. H. (2008). Bioremediation of heavy metals from mine tailings by indigenous sulfur-oxidizing bacteria: Effects of substrate concentration. *Bioresource Technology*, 99(10), 4124–4129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.064>
71. Luo, J., Tian, G., & Lin, W. (2013). Enrichment, isolation and identification of sulfur-oxidizing bacteria from sulfide removing bioreactor. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(7), 1393–1399. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60179-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60179-X)
72. Luo, J., Zeng, H., Zhou, Q., Hu, X., Qu, Q., Ouyang, S., & Wang, Y. (2022). Anthropogenic impacts on the biodiversity and anti-interference ability of microbial communities in lakes. *The Science of the total environment*, 820, 153264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153264>
73. Madigan M.T. Martinko J. M., Dunlap P.V. y Clark, D. P., (2008) *Brock Biology of microorganisms*. Editorial Prentice Hall, Inc Decima edición, España, 1008
74. Mayerhofer, J., Wächter, D., Calanca, P., Kohli, L., Roth, T., Meuli, R. G., & Widmer, F. (2021). Environmental and Anthropogenic Factors Shape Major Bacterial Community

- Types Across the Complex Mountain Landscape of Switzerland. *Frontiers in microbiology*, 12, 581430. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.581430>
75. McKay, A. L., & Peters, A. C. (1995). The effect of sodium chloride concentration and pH on the growth of *Salmonella typhimurium* colonies on solid medium. *The Journal of applied bacteriology*, 79(4), 353–359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03148.x>
 76. Mendez, M. O., & Maier, R. M. (2008). Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments - An emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 278–283. <https://doi.org/10.1289/ehp.10608>
 77. Mendez, M. O., Neilson, J. W., & Maier, R. M. (2008). Characterization of a bacterial community in an abandoned semiarid lead-zinc mine tailing site. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3899–3907. <https://doi.org/10.1128/AEM.02883-07>
 78. Méndez-Ramírez, M., & Hernández, M. A. A. (2012). Distribución de Fe, Zn, Pb, Cu, Cd y As originada por residuos mineros y aguas residuales en un transecto del Río Taxco en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 29(2), 450–462.
 79. Microbiology Society (s.f.). Bacteria. Observing bacteria in a Petri dish. <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/bacteria/observing-bacteria-in-a-petri-dish.html>
 80. Montero, R. (2019). Descripción de la dinámica del azufre en el Jal Minero “El Fraile” en Taxco de Alarcón, estado de Guerrero. UNAM. Nota: aunque el título menciona al jal "El Fraile", el trabajo se realizó en el jal "La Concha". Fue un error en la denominación del sitio de estudio.
 81. Munsell, 1975. Standard soil color charts
 82. Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
 83. Newsome, L., & Falagán, C. (2021). The Microbiology of Metal Mine Waste: Bioremediation Applications and Implications for Planetary Health. *GeoHealth*, 5(10), e2020GH000380. <https://doi.org/10.1029/2020GH000380>
 84. Ngo Thi, N. A., & Naumann, D. (2007). Investigating the heterogeneity of cell growth in microbial colonies by FTIR microspectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(5), 1769–1777. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0829-z>
 85. Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., & Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry*, 395(5), 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>

86. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad, clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis, AS-22: determinación del color en suelo. Diario Oficial de la Federación, México CDMX.
87. Olson, G. J., McFeters, G. A., & Temple, K. L. (1981). Occurrence and activity of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms in alkaline coal strip mine spoils. *Microbial ecology*, 7(1), 39–50. <https://doi.org/10.1007/BF02010477>
88. Ortiz-Hernández, M. L., Gutiérrez-Ruiz, M., & Sánchez-Salinas, E. (1995). Propuesta De Manejo De Lodos Residuales De La Planta De Tratamiento De La Ciudad Industrial Del Valle De Cuernavaca, Estado De Morelso, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 1(2), 105–115.
89. O'Toole G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (47), 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
90. Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D. J., Larsson, D., & Hobman, J. L. (2017). Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Advances in microbial physiology*, 70, 261–313. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>
91. Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC genomics*, 16, 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>
92. Pereira, L. B., Vicentini, R., & Ottoboni, L. M. M. (2014). Changes in the bacterial community of soil from a neutral mine drainage channel. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096605>
93. Pielou, E. C. (1975). Ecological diversity (No. 574.524018 P5).
94. Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 2), 1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.007>
95. Poole K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(9), 2069–2089. <https://doi.org/10.1093/jac/dks196>
96. Portal oficial del gobierno del estado de Guerrero. Consultado el 24-04-18 en: <http://taxco.gob.mx/>
97. Posadas-Hernández, J. (2019). Análisis de la distribución de metales pesados en el jal "El Fraile", Taxco de Alarcón, estado de Guerrero. Informe de servicio social. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Nota: aunque el título menciona al jal "El Fraile", el

trabajo se realizó en el jal "La Concha". Fue un error en la denominación del sitio de estudio.

98. Pozo, M., Carretero, M. I., Pozo, E., Martín Rubí, J. A., y Maraver, F. (2010). Caracterización mineralógica y química de los peloides españoles y argentinos. Evaluación de elementos traza potencialmente tóxicos. Libro de resúmenes del II Congreso Iberoamericano de peloides. pp 27-38.
99. Qiao, L., Liu, X., Zhang, S., Zhang, L., Li, X., Hu, X., Zhao, Q., Wang, Q., & Yu, C. (2021). Distribution of the microbial community and antibiotic resistance genes in farmland surrounding gold tailings: A metagenomics approach. *The Science of the total environment*, 779, 146502. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146502>
100. Ramírez Gama R. M., Luna Millán B. Velázquez Madrazo O., Vierna García L., Mejía Chávez A., Tsuzuki Rayes G., Hernández Gómez L. Müggenburg I., Camacho Cruz A., Urzúa Hernández M. del C. (2013). Manual de prácticas de microbiología General. Facultad de química, UNAM, 309 pp.
101. Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2267. <https://doi.org/10.3390/molecules22122267>
102. Reis, M.P., Barbosa, F.A.R., Chartone-Souza, E. et al. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles* 17, 301–309 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0517-9>
103. Ratzke, C., & Gore, J. (2018). Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS biology*, 16(3), e2004248. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004248>
104. Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (2006). The Colorless Sulfur Bacteria. *Prokaryotes*, 2, 985–1011.
105. Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chemical reviews*, 111(9), 5492–5505. <https://doi.org/10.1021/cr2000509>
106. Romero, F. M., Armienta, M. A., & 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>

107. Romero, Francisco Martín, & Gutiérrez Ruiz, M. (2010). Estudio comparativo de la peligrosidad de jales en dos zonas mineras localizadas en el sur y centro de México. *Boletín de La Sociedad Geologica Mexicana*, 62(1), 43–53.
108. Romero, Francisco Martín, Armienta, M. A., Gutiérrez, M. E., & Villaseñor, G. (2008). Factores geológicos y climáticos que determinan la peligrosidad y el impacto ambiental de jales mineros. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 24(2), 43–54.
109. Rosario, K., Iverson, S. L., Henderson, D. A., Chartrand, S., McKeon, C., Glenn, E. P., & Maier, R. M. (2007). Bacterial community changes during plant establishment at the San Pedro River mine tailings site. *Journal of environmental quality*, 36(5), 1249–1259.
<https://doi.org/10.2134/jeq2006.0315>
110. Rucks, L., García, F., Kaplán, A., Ponce de León, J., & Hill, M. (2004). Propiedades físicas del suelo. *Universidad de la República: Facultad de agronomía. Montevideo, Uruguay*.
111. Safari Sinegani, A. A., & Younessi, N. (2017). Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.012>
112. Sánchez-Clemente, R., Igeño, M.I., Población, A.G., Guijo, M.I., Merchán, F. & Blasco, R. (2018). Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Proceedings 2*, no. 20: 1297. <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
113. Satoh, H., Odagiri, M., Ito, T., & Okabe, S. (2009). Microbial community structures and in situ sulfate-reducing and sulfur-oxidizing activities in biofilms developed on mortar specimens in a corroded sewer system. *Water research*, 43(18), 4729–4739.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.035>
114. Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell system technical journal*, 27(3), 379-423.
115. Sibanda, T., Selvarajan, R., Msagati, T., Venkatachalam, S., & Meddows-Taylor, S. (2019). Defunct gold mine tailings are natural reservoir for unique bacterial communities revealed by high-throughput sequencing analysis. *The Science of the total environment*, 650(Pt 2), 2199–2209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.380>
116. Sievert, S. M., Kiene, R. P., & Schulz-Vogt, H. N. (2007). The sulfur cycle. *Oceanography*, 175(June), 587–596.
117. Šimonovičová, A., Kraková, L., Paudišová, E., & Pangallo, D. (2019). Occurrence and diversity of cultivable autochthonous microscopic fungi in substrates of old environmental loads from mining activities in Slovakia. *Ecotoxicology and environmental safety*. 172, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.064>

118. Sousa, A. M., Machado, I., Nicolau, A., & Pereira, M. O. (2013a). Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.09.020>
119. Sousa, A. M., Nunes-Miranda, J. D., Reboiro-Jato, M., Fdez-Riverola, F., Lourenço, A., Pereira, M. O., & Capelo, J. L. (2013b). A new approach to bacterial colony morphotyping by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight-based mass spectrometry. *Talanta*, 116, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.058>
120. Starosvetsky, J., Zukerman, U., & Armon, R. H. (2013). A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* (syn. *Thiobacillus thiooxidans*) from water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 92(2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.009>
121. Stepanauskas, R., Glenn, T. C., Jagoe, C. H., Tuckfield, R. C., Lindell, A. H., King, C. J., & McArthur, J. V. (2006). Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental microbiology*, 8(9), 1510–1514. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01091.x>
122. Taga, M. E., & Bassler, B. L. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 Suppl 2(Suppl 2), 14549–14554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1934514100>
123. Talavera Mendoza, O., Ruiz, J., Díaz Villaseñor, E., Ramírez Guzmán, A., Cortés, A., Salgado Souto, S. A., 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>
124. Talavera Mendoza, O., Yta, M., Moreno Tovar, R., Dótor Almazán, A., Flores Mundo, N., & Duarte Gutiérrez, C. (2005). Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Geofísica Internacional*, 44(1), 49–64.
125. Talavera-Mendoza, O., Armienta- Hernández M. A., Abundis, J. G., y Mundo N. F., 2006. Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, southern Mexico. *Environmental Geochemistry Health*. 28(3):243-55.
126. Tan, G. L., Shu, W. S., Hallberg, K. B., Li, F., Lan, C. Y., Zhou, W. H., & Huang, L. N. (2008). Culturable and molecular phylogenetic diversity of microorganisms in an open-dumped, extremely acidic Pb/Zn mine tailings. *Extremophiles : life under extreme conditions*, 12(5), 657–664. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0171-9>

127. Tang, K., Baskaran, V., & Nemati, M. (2009). Bacteria of the sulphur cycle: An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 73–94. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.12.011>
128. Thomas, G. (1996). Soil pH and Soil Acidity. En: DL Sparks, AL Page, PA Helmke, RH Loeppert, PN Soltanpour, MA Tabatabai, CT Johnston, ME Sumner (Eds), *Methods of soil analysis, part 3 Chemical methods* 475-490. Soil Science Society of America, Inc., USA.
129. Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., et al. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature* 551, 457. doi: 10.1038/nature24621
130. Townsley, L., & Shank, E. A. (2017). Natural-Product Antibiotics: Cues for Modulating Bacterial Biofilm Formation. *Trends in microbiology*, 25(12), 1016–1026. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.06.003>
131. Tripathi N. y Sapra A. Gram Staining. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
132. Valdivia-Anistro, J. A. (2016) Análisis del efecto de la oligotrofia sobre el número de copias del operón ribosomal (RRN) y en la dinámica de crecimiento del género *Bacillus* en el sistema hidrológico del Valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, 78 pp.
133. Van Ginkel, S. W., Hassan, S. H. A., Ok, Y. S., Yang, J. E., Kim, Y. S., & Oh, S. E. (2011). Detecting oxidized contaminants in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Environmental Science and Technology*, 45(8), 3739–3745. <https://doi.org/10.1021/es1036892>
134. Vasconcelos, A., Andreote, F. D., Defalco, T., Delbaje, E., Barrientos, L., Dias, A., Gabriel, F. A., Bernardino, A. F., & Núñez-Montero, K. (2022). Mucilagibacter sp. Strain Metal(loid) and Antibiotic Resistance Isolated from Estuarine Soil Contaminated Mine Tailing from the Fundão Dam. *Genes*, 13(2), 174. <https://doi.org/10.3390/genes13020174>
135. Velázquez, A. (2013) Aislamiento e identificación de bacterias que participan en el ciclo del azufre en un humedal artificial de flujo subsuperficial en Tetipac, Edo. de Guerrero. UNAM
136. Vos M. (2020). The evolution of bacterial pathogens in the Anthropocene. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 86, 104611. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104611>
137. 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., & 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>
138. Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 4(4), 567–604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>
139. Wu, B., Luo, H., Wang, X., Liu, H., Peng, H., Sheng, M., Xu, F., & Xu, H. (2022). Effects of environmental factors on soil bacterial community structure and diversity in different contaminated districts of Southwest China mine tailings. *The Science of the total environment*, 802, 149899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149899>
140. Wu, Z., Yu, F., Sun, X., Wu, S., Li, X., Liu, T., Li, Y. (2018). Long term effects of *Lespedeza bicolor* revegetation on soil bacterial communities in Dexing copper mine tailings in Jiangxi Province, China, *Applied Soil Ecology* 125, 192-201,
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.01.011>.
141. Yan, C., Wang, F., Liu, H., Liu, H., Pu, S., Lin, F., Geng, H., Ma, S., Zhang, Y., Tian, Z., Chen, H., Zhou, B., & Yuan, R. (2020). Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: Microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes. *Environmental research*, 189, 109869. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109869>
142. Yelton, A. P., Comolli, L. R., Justice, N. B., Castelle, C., Deneff, V. J., Thomas, B. C., & Banfield, J. F. (2013). Comparative genomics in acid mine drainage biofilm communities reveals metabolic and structural differentiation of co-occurring archaea. *BMC genomics*, 14, 485. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-485>
143. Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1527–1548.
<https://doi.org/10.1089/ars.2008.2046>
144. Zappelini, C., Karimi, B., Foulon, J., Lacercat-Didier, L., Maillard, F., Valot, B., ... & Chalot, M. (2015). Diversity and complexity of microbial communities from a chlor-alkali tailings dump. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 101-110.
145. Zhalnina, K., Dias, R., de Quadros, P. D., Davis-Richardson, A., Camargo, F. A. O., Clark, I. M., et al. (2015). Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microb. Ecol.* 69, 395–406. doi: 10.1007/s00248-014-0530-2
146. Zhang, C., & Straight, P. D. (2019). Antibiotic discovery through microbial interactions. *Current opinion in microbiology*, 51, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.006>
147. Zhang, W. H., Huang, Z., He, L. Y., & Sheng, X. F. (2012). Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of

- metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead-zinc mine tailings. *Chemosphere*, 87(10), 1171–1178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.036>
148. Zhao, Z., Li, H., Sun, Y., Zhan, A., Lan, W., Pinn Woo, S., Shau-Hwai, A.T., Fan, J. (2022) Bacteria versus fungi for predicting anthropogenic pollution in subtropical coastal sediments: Assembly process and environmental response, *Ecological Indicators* 134, 108484, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108484>.
149. Zhou, S., Xiong, C., Su, Y., Wang, Y., Gao, Y., Tang, Z., Liu, B., Wu, Y., & Duan, Y. (2022). Antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in uranium mine: Distribution and influencing factors. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 304, 119158. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119158>
150. Zou, H. Y., He, L. Y., Gao, F. Z., Zhang, M., Chen, S., Wu, D. L., Liu, Y. S., He, L. X., Bai, H., & Ying, G. G. (2021). Antibiotic resistance genes in surface water and groundwater from mining affected environments. *The Science of the total environment*, 772, 145516. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145516>

16. ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo para bacterias oxidantes del azufre.

Medio de cultivo aerobio para bacterias oxidantes del azufre		
Nombre	Fórmula	Cantidad (g)
Tiosulfato de sodio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	6.00
Fosfato de sodio monobásico	NaH_2PO_4	1.22
Fosfato de sodio dibásico anhidro	Na_2HPO_4	1.39
Cloruro de amonio	NH_4Cl	1.00
Cloruro de magnesio	MgCl_2	0.10
Cloruro férrico	FeCl_2	0.03
Cloruro de calcio	CaCl_2	0.03
Cloruro de manganeso II	MnCl_2	0.03
Nitrato de potasio	KNO_3	0.50
Acetato de sodio	CH_3COONa	1.00
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	2.00
Agar bacteriológico		20.00

(Starosvetsky *et al.*, 2013)

Medio de cultivo <i>Thiobacillus</i> agar		
Nombre	Fórmula	Cantidad (g)
Tiosulfato de sodio	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	5.00
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.40
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50
Sulfato de hierro	FeSO_4	0.01
Cloruro de hierro	CaCl_2	0.25
Agar bacteriológico		20.00

(Luo *et al.*, 2013)

Medio de cultivo <i>Thiobacillus acidophilus</i> agar		
Nombre	Fórmula	Cantidad (g)
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00
Cloruro de potasio	KCl	0.10
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	0.50
Sulfato de hierro	FeSO_4	0.01
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.018
Solución de glucosa al 10%	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	20.00 mL

(Luo *et al.*, 2013)**Anexo 2.** Abundancia de color de las muestras de los muestreos realizados durante el 2016-2017.

Color	Sitio	Muestreo	No. de muestras
Gris	Sitio A	Septiembre 2016	1
		Noviembre 2016	1
		Febrero 2017	2
		Marzo 2017	2
		Mayo 2017	3
		Agosto 2017	2
		Octubre 2017	2
	Sitio B	Septiembre 2016	1
		Febrero 2017	1
		Marzo 2017	2
		Mayo 2017	3
		Agosto 2017	2
	Sitio C	Octubre 2016	3
		Marzo 2017	1
	Sitio D	Agosto 2017	1
	Total de muestras		
Amarillo	Sitio A	Noviembre 2016	2
		Febrero 2017	2
		Marzo 2017	5
		Mayo 2017	2
		Agosto 2017	4
		Octubre 2017	3
	Sitio B	Septiembre 2016	1
		Febrero 2017	2
		Marzo 2017	2
		Mayo 2017	3
		Agosto 2017	1
	Sitio C	Octubre 2016	2
		Marzo 2017	2
		Mayo 2017	3
	Sitio D	Febrero 2017	1
		Mayo 2017	2
		Agosto 2017	2
Sitio E	Agosto 2017	1	

Total, de muestras	40
---------------------------	-----------

Anexo 3. Valores de pH clasificados por color de las muestras recolectadas durante el 2016-2017.

Color	Sitio	Muestreo	No. de muestras	
Pardo	Sitio A	Septiembre 2016	1	
		Noviembre 2016	3	
		Febrero 2017	1	
		Marzo 2017	3	
		Mayo 2017	8	
		Agosto 2017	4	
		Octubre 2017	4	
	Sitio B	Septiembre 2016	4	
		Octubre 2016	1	
		Noviembre 2016	4	
		Febrero 2017	3	
		Marzo 2017	1	
		Mayo 2017	7	
		Agosto 2017	4	
	Sitio C	Septiembre 2016	3	
		Octubre 2016	3	
		Marzo 2017	2	
		Mayo 2017	1	
	Sitio D	Mayo 2017	2	
		Agosto 2017	6	
	Sitio E	Marzo 2017	1	
	Sitio F	Septiembre 2016	2	
	Total de muestras			68
	Rojo	Sitio B	Marzo 2017	1
Total de muestras			1	
Blanco	Sitio A	Agosto 2017	1	
	Sitio B	Marzo 2017	1	
Total de muestras			2	
pH	Sitio	Muestreo	No. de muestras	
0	Sitio A	Noviembre 2016	1	
		Febrero 2017	2	
	Sitio B	Febrero 2017	2	
Total de muestras			5	
1	Sitio A	Noviembre 2016	2	

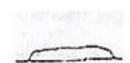
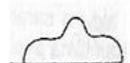
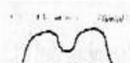
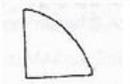
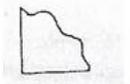
		Febrero 2017	2
	Sitio B	Febrero 2017	3
		Marzo 2017	3
	Sitio C	Octubre 2016	3
		Mayo 2017	1
Total de muestras			14
2	Sitio A	Marzo 2017	6
		Mayo 2017	7
		Agosto 2017	1
		Octubre 2017	3
	Sitio B	Septiembre 2016	1
		Febrero 2017	1
		Marzo 2017	1
		Mayo 2017	4
	Sitio B	Agosto 2017	1
	Sitio C	Septiembre 2016	1
		Octubre 2016	1
		Marzo 2017	1
		Mayo 2017	1
	Sitio D	Mayo 2017	1
		Agosto 2017	2
Sitio E	Marzo 2017	1	
Total de muestras			33

pH	Sitio	Muestreo	No. de muestras
3	Sitio A	Noviembre 2016	1
		Marzo 2017	3
		Mayo 2017	1
		Agosto 2017	6
	Sitio B	Noviembre 2016	2
		Mayo 2017	1
		Agosto 2017	3
	Sitio C	Octubre 2016	1
		Marzo 2017	1
		Mayo 2017	2
	Sitio D	Mayo 2017	1
		Agosto 2017	2
	Sitio E	Agosto 2017	1

Total de muestras			25
4	Sitio A	Noviembre 2016	1
		Febrero 2017	1
		Mayo 2017	2
		Agosto 2017	2
		Octubre 2017	4
	Sitio B	Noviembre 2016	1
		Marzo 2017	1
		Agosto 2017	1
	Sitio C	Marzo 2017	1
		Mayo 2017	1
Sitio D	Mayo 2017	1	
	Agosto 2017	1	
Total de muestras			17
5	Sitio A	Marzo 2017	1
		Mayo 2017	2
		Octubre 2017	1
	Sitio B	Septiembre 2016	1
		Noviembre 2016	1
		Febrero 2017	1
		Marzo 2017	1
	Sitio C	Octubre 2016	1
	Sitio D	Agosto 2017	4
Total de muestras			13
pH	Sitio	Muestreo	No. de muestras
6	Sitio A	Mayo 2017	1
	Sitio B	Septiembre 2016	2
		Marzo 2017	1
		Mayo 2017	5
		Agosto 2017	1
	Sitio C	Septiembre 2016	1
		Octubre 2016	2
		Marzo 2017	1
Sitio D	Febrero 2017	1	
Total de muestras			15
7	Sitio A	Septiembre 2016	1
		Noviembre 2016	1
		Mayo 2017	1

		Agosto 2017	1
		Octubre 2017	1
	Sitio B	Septiembre 2016	2
		Octubre 2016	1
		Mayo 2017	2
		Agosto 2017	1
	Sitio C	Septiembre 2016	1
		Marzo 2017	1
	Sitio F	Septiembre 2016	1
Total de muestras			14
8	Sitio A	Septiembre 2016	1
	Sitio F	Septiembre 2016	1
Total de muestras			2

Anexo 4. Descripción y clasificación morfológica

Forma			
Puntiforme		Irregular	
Circular		Rizoide	
Filamentosa		Como huso	
Elevación			
Plana		Pulvinada	
Elevada		Umbonada	
Convexa		Umbilicada	
Margen			
Entero		Lacerada	
Ondulada		Filamentoso	
Lobulado		Rizado	