Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Nacional de Salta

Caracterización genética y bioquímica de microorganismos relacionados al metabolismo del litio en aguas y suelos del NOA

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Tesista: Lic. Fabiana Lilian Martínez

Directora: Dra. Verónica Irazusta

Co-directora: Dra. Verónica Beatriz Rajal

- Año 2019 -

Agradecimientos

A Dios, por cada letra escrita, por cada paso dado. Desde el principio y en todo el camino.

A mi familia, esos locos a los que amo con el alma; por los que me levanto todos los días agradecida de la vida. Gracias por aguantarme durante todo este tiempo, en mis días de crisis existencial y de alegrías absolutas, con mis cambios de humor y mis manías. Gracias por las tardes de mates, de charlas, de consejos. Gracias por insistirme en que yo sí puedo. Gracias por haber insistido hasta hacer que les crea. Con ustedes la vida es hermosa. No me importa nada más, los tengo, me tienen. Los amo.

A Mimi reina y mi beibi, por enseñarme que las cosas que más disfrutamos hacer y las personas con las que compartimos momentos son lo más importante, siempre. Por regalarme sonrisas, sorpresas y esperanza, carcajaditas, secretos y travesuras. Mi vida brilla cuando los veo. Mis preocupaciones se desvanecen cuando los escucho. Vuelvo a mi niñez cuando juego con ustedes. No me falten nunca. Son lo que más amo en la vida.

A mis jefas, Vero Irazusta y Vero Rajal, por darme una oportunidad sin conocerme y por creer en mí a lo largo de estos años. Gracias por abrirme las puertas a este grupo hermoso. Tuve suerte de haberlas conocido.

A Dr Shiladitya y a Priya DasSarma, por adoptarme como hija suya mientras estuve en Estados Unidos. Trabajar con ustedes fue una de las mejores experiencias de mi doctorado. Sentir la calidez de su familia fue maravilloso y aprendí un montón de ustedes. Son excelentes personas e increíbles investigadores. Ojalá la vida les sonría siempre. Y ojalá volvamos a reunirnos.

A mis amigos de siempre. Esos que la vida te regala sin preguntas. Mis flacas Ale y Fer, Anike, Rosen y Dada. Gracias por estar, apoyarme, sacarme de la rutina y por dejarme sentirlos cerca en todo momento, a pesar de la distancia. Gracias a mis amigos por ser mi familia.

A Rami, Dolo y Neli, mis primeros años fueron súper lindos gracias a ustedes. Me enseñaron a crecer y a entender que la carga es más liviana si se la comparte. Gracias por los momentos que compartimos, por la paciencia, los consejos y el aliento en los momentos difíciles. Son personas que admiro, quiero y respeto muchísimo. Gracias por

hacerme sentir su apoyo y por ofrecer su ayuda incondicional. Simplemente, gracias. Por todo.

A mi compañera de viajes, Flor Y. Gracias por aguantarme, por confiar en mí y por escucharme mil veces renegando sobre lo mismo. Gracias por la paciencia y por tus renegadas, por tu humor y tus cursilerías.

A Nico Samuel, mi pequeño, a Cristian, Facu y Carlitos. Gracias por entrar en mi vida de sorpresa y por quedarse.

A los chicos del LAgS, Emi, Roque, Martin, Diego, Leo, Sari, Geor, Mer, Héctor, Flor L, Norma, Noel, Anto, Lucía, por sus palabras de aliento y la buena onda de todos los días. Por estar pendientes de mis avances y alentarme a no bajar los brazos. Estos últimos días fueron un verdadero apoyo para mí.

A Ceci y Moni, no solamente por el apoyo anímico, sino además por la ayuda en actividades de laboratorio para mi tesis. Gracias Ceci por tu contribución de laboratorio y análisis. Gracias por las extracciones interminables Moni, por anotar todo prolijamente y por salvarme (tantas veces) cuando el agua me llegaba al cuello.

Al personal del INIQUI, por su apoyo diario, por las charlas y los consejos. Gracias por estar desde el principio y durante todo este camino.

A mis amigos Asaad, Sharad y Andrew. Fue una bella casualidad coincidir con ustedes. Aprendí que la vida está llena de momentos y de experiencias inesperadas. Gracias por cuidarme como hermanos, por las charlas en las que el tiempo vuela, por las comidas picantes y por su paciencia.

A mis compañeros de laboratorio en IMET, Victoria, Mychala y Susan, por ayudarme en esta etapa llena de expectativas. Gracias a Wolf Pecher por la paciencia en compartir conmigo sus conocimientos.

Gracias en especial a Yangjie, mi compañera de viajes internacional. Gracias por acompañarme y compartir juntas momentos inolvidables. Gracias por perderte conmigo en Nueva York y por sacarme fotos perfectas. Vas a estar por siempre en mi corazón.

A Tobías y Nalette, por mostrarme que cuando uno quiere realmente hacerse escuchar, lo puede conseguir. Solo hay que insistir.

Por ultimo, pero indispensable, a mi mate. Dulce o amargo, caliente o frío. Por consolarme en los días de más cansancio, darme fuerzas en los tiempos difíciles y concentración en los eternos días de escritura.

A todos, gracias por creer en mí, aún cuando yo misma tenía dudas de poder lograrlo.

Índice

Agradecimientos

Resumen

Abstract

Hipótesis

Objetivos

Página

Capítulo 1: El litio

1.1. Introducción 1 - 1

1.1.1. Fuentes de litio 1 - 2

1.1.1.1. Fuentes líquidas 1 - 3

1.1.1.2. Fuentes minerales 1 - 3

1.1.2. Usos y demanda de litio a nivel mundial 1 - 4

1.2. Objetivos: 1 - 6

1.3. Materiales y Métodos 1 - 6

1.3.1. Relevamiento de la información 1 - 6

1.4. Resultados y discusión 1 - 7

1.4.1. Distribución mundial y explotación de las fuentes de litio 1 - 7

1.4.1.1. Depósitos y explotación de litio a partir de minerales 1 - 7

1.4.1.2. Depósitos y explotación de litio a partir de salmueras 1 - 8

1.4.2. Producción mundial y regional 1 - 10

1.4.2.1. Producción de litio en Argentina 1 - 12

1.4.3. El Salar del Hombre Muerto: características, localización e importancia industrial 1 - 14

1.5. Conclusiones 1 - 15

1.6. Referencias 1 - 16

Capítulo 2: Caracterización fisicoquímica y comunidad microbiana de muestras del Salar del Hombre Muerto

2.1. Introducción 2 - 1
2.1.1. Ambientes hipersalinos 2 - 2
2.1.2. Microorganismos halófilos y halotolerantes 2 - 3
2.2. Objetivos 2 - 5
2.3. Materiales y métodos 2 - 5
2.3.1. Selección del sitio y toma de muestras 2 - 5
2.3.2. Análisis fisicoquímico de las muestras 2 - 7
2.3.3. Extracción de ADN genómico 2 - 7
2.3.3.1. Control de calidad y cuantificación del ADN extraído 2 - 8
2.3.4. Secuenciación del amplicon 16S RNAr 2 - 8
2.3.5. Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación 2 - 9
2.4. Resultados y discusión 2 - 9
2.4.1. Análisis fisicoquímico 2 - 9
2.4.1.1. Caracterización de las muestras de suelo 2 - 9
2.4.1.2. Caracterización de las muestras líquidas 2 - 12
2.4.2. Análisis de la comunidad microbiana 2 - 14
2.4.2.1. Extracción de ADN de las muestras líquidas y de suelos 2 - 14
2.4.2.2. Microorganismos del dominio Archaea en muestras de suelo del Salar del Hombre Muerto 2 - 14
2.4.2.3. Bacterias en las muestras de suelo a niveles taxonómicos de filo y clase 2 - 16
2.5. Conclusiones 2 - 20
2.6. Referencias 2 - 20

Capítulo 3: Aislamiento y caracterización de microorganismos tolerantes a litio del Salar del Hombre Muerto

3.1. Introducción 3 - 1
3.1.1. Potenciales aplicaciones biotecnológicas 3 - 2
3.1.1.1. Síntesis de EPS 3 - 2
3.1.1.2. Síntesis de pigmentos 3 - 3
3.2. Objetivos 3 - 4

3.3. Materiales y métodos 3 - 4
3.3.1. Observación microscópica 3 - 4
3.3.2. Aislamiento de microorganismos 3 - 5
3.3.3. Selección de microorganismos tolerantes a cloruro de litio 3 - 6
3.3.3.1. Tolerancia a sales y a cloruro de litio en medio sólido 3 - 6
3.3.3.2. Tolerancia al cloruro de litio en medio líquido 3 - 7
3.3.4. Caracterización de los aislamientos 3 - 8
3.3.4.1. Propiedades macro y microscópicas 3 - 8
3.3.4.2. Capacidad formadora de biofilm 3 - 8
3.3.5. Identificación y construcción de árbol filogenético 3 - 9
3.3.5.1. Extracción de ADN 3 - 9
3.3.5.2. Amplificación del fragmento 16S del ADNr y secuenciación 3 - 9
3.3.5.3. Identificación y construcción del árbol filogenético 3 - 10
3.4. Resultados y discusión 3 - 10
3.4.1. Observación microscópica de las muestras líquidas 3 - 10
3.4.2. Aislamiento de microorganismos 3 - 11
3.4.2.1. Aislamiento de hongos 3 - 11
3.4.2.2. Aislamiento de bacterias 3 - 12
3.4.3. Selección de aislamientos tolerantes a litio 3 - 13
3.4.3.1. Selección de aislamientos tolerantes a litio por ensayos en medio sólido 3 - 13
3.4.3.2. Formulación del medio de cultivo y condiciones óptimas de crecimiento 3 - 14
3.4.3.3. Selección de aislamientos tolerantes a cloruro de litio por ensayos en medio líquido 3 - 15
3.4.4. Caracterización de los aislamientos seleccionados 3 - 16
3.4.4.1. Morfología y tinción de Gram 3 - 16
3.4.4.2. Formación de biofilm 3 - 18
3.4.4.3. Producción de pigmentos 3 - 20
3.4.4.4. Identificación 3 - 21
3.4.4.5. Armado del árbol filogenético 3 - 25
3.5. Conclusiones 3 - 26
3.6. Referencias 3 - 27

Capítulo 4: Interacción litio-microorganismos

4.1. Introducción 4 - 1

4.1.1. Formación de biominerales, biolixiviación 4 - 1

4.1.2. Biosorción y síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) 4 - 2

4.1.3. Remoción de litio mediada por microorganismos 4 - 3

4.2. Objetivos 4 - 4

4.3. Materiales y métodos 4 - 4

4.3.1. Selección de bacterias 4 - 4

4.3.2. Crecimiento en medio definido sin y con LiCl 4 - 4

4.3.3. Ensayos de adsorción de litio a células en solución acuosa 4 - 6

4.3.4. Cuantificación de litio 4 - 6

4.3.5. Análisis morfológico de las bacterias 4 - 7

4.3.6. Análisis estadísticos de los datos 4 - 8

4.4. Resultados y discusión 4 - 8

4.4.1. Crecimiento en medio liquido con y sin litio 4 - 8

4.4.2. Adsorción del litio 4 - 17

4.4.3. Efecto del litio sobre las células 4 - 24

4.5. Conclusiones 4 - 31

4.6. Referencias 4 - 32

Capítulo 5: Crecimiento de arqueas en presencia de litio

5.1. Introducción 5 - 1

5.1.1. Arqueas halófilas, propiedades e interacción con sales 5 - 2

5.2. Objetivos 5 - 4

5.3. Materiales y métodos 5 - 4

5.3.1. Cepas estudiadas 5 - 4

5.3.2. Tolerancia a LiCl en medio de cultivo sólido 5 - 6

5.3.3. Crecimiento en medio líquido con LiCl 5 - 7

5.3.4. Análisis estadísticos de los datos 5 - 8

5.4. Resultados y discusión 5 - 8

5.4.1. Tolerancia a LiCl en medio sólido 5 - 8

5.4.2. Crecimiento en medio líquido en presencia de LiCl 5 - 10

5.4.3. Evaluación de la concentración de NaCl óptima para el crecimiento 5 - 19
5.4.4. Determinación de la concentración de LiCl óptima para el crecimiento 5 - 20
5.4.5. Comparación entre las bacterias y arqueas más tolerantes al litio 5 - 21
5.5. Conclusiones 5 - 23
5.6. Referencias 5 - 24

Capítulo 6: Estudio del genoma y del metiloma de *Micrococcus luteus* SA211

6.1. Introducción 6 - 1
6.1.1. Detección de secuencias de ARN a partir del ADN genómico 6 - 2
6.1.2. *Micrococcus luteus*: importancia, propiedades y potenciales aplicaciones 6 - 3
6.2. Objetivos 6 - 4
6.3. Materiales y métodos 6 - 4
6.3.1. Cepa en estudio 6 - 4
6.3.2. Extracción de ADN genómico, evaluación de la integridad, concentración y calidad del ADN obtenido 6 - 5
6.3.3. Secuenciación del genoma y determinación del metiloma 6 - 5
6.3.4. Comparación del genoma de SA211 con el de otros *Micrococcus* mediante herramientas de bioinformática 6 - 6
6.3.5. Predicción del proteoma 6 - 8
6.4. Resultados y discusión 6 - 8
6.4.1. Características generales del genoma y metiloma 6 - 8
6.4.2. Anotación del genoma 6 - 10
6.4.3. Comparación de los genomas de SA211 con otros *Micrococcus* cercanos filogenéticamente 6 - 13
6.4.4. Comparación de los pIs de las proteínas predichas en la cepa SA211 con los de otros organismos. 6 - 16
6.5. Conclusiones 6 - 20
6.6. Referencias 6 - 20

Capítulo 7: Análisis proteómico de bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto

7.1. Introducción 7 - 1
7.2. Objetivos 7 - 3
7.3. Materiales y métodos 7 - 4
7.3.1. Selección de cepas y extracción de proteínas totales 7 - 4
7.3.1.1. Cultivo de *Micrococcus luteus* SA211 y extracción de proteínas totales 7 - 4
7.3.2. Sistemas electroforéticos 7 - 5
7.3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes monodimensionales (1D SDS PAGE) 7 - 5
7.3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes bidimensionales (2D SDS PAGE) 7 - 6
7.3.3. Tinción de los geles 7 - 7
7.3.4. Análisis de los geles e identificación de proteínas 7 - 8
7.4. Resultados y discusión 7 - 8
7.4.1. Síntesis diferencial de proteínas en presencia de diferentes concentraciones de litio (1D SDS PAGE) 7 - 9
7.4.2. Síntesis diferencial de proteínas de la cepa *Micrococcus luteus* SA211 en presencia de litio y de sodio 7 - 11
7.4.3. Estudio del proteoma de *Micrococcus luteus* SA211 en ausencia y presencia de dos concentraciones de litio 7 - 13
7.4.4. Identificación de los *spots* seleccionados 7 - 15
7.5. Conclusiones 7 - 22
7.6. Referencias 7 - 23

Conclusiones finales

Perspectivas futuras

Índice de figuras

Página

Figura 1.1 Distribución de fuentes de litio a nivel mundial. Elaboración propia con datos de Bradley y col 2017 (11). 1 - 2

Figura 1.2 Principales usos del litio de acuerdo a los porcentajes de consumo en 2013, Elaboración propia con datos publicados por Delbuono y col (2017) (1). 1 - 5

Figura 1.3 Demanda de litio, expresada como miles de toneladas de carbonato de litio equivalente (LCE) proyectada para el 2025 (Fuente: Delbuono y col 2017) (1). 1 - 6

Figura 1.4 Distribución mundial de pegmatitas de litio-cesio-tantalio (LCT) (puntos rojos) y de granitas de litio (puntos amarillos) (Fuente: Bradley y col 2017) (11). 1 - 8

Figura 1.5 Distribución de salmueras en salares, salmueras de pozos petrolíferos, geotermales, arcillas y depósitos de zeolita. (Fuente: Bradley y col 2017) (11). 1 - 9

Figura 1.6 Producción mundial de litio desde 1900 a 2007 teniendo en cuenta la reserva (Fuente: Bradley y col 2007) (11). 1 - 11

Figura 1.7 Salares con proyectos de extracción de litio en provincias del norte argentino (Fuente: Delbuono y col 2017) (1). 1 - 14

Figura 1.8 Exportaciones argentinas de cloruro y carbonato de litio expresadas en litio equivalente (LCE) (Fuente: Delbuono y col 2017) (1). 1 - 15

Figura 2.1 Salar del Hombre Muerto, Catamarca, Argentina. Foto: Reuters (https://www.clarin.com/economia/gigante-coreano-compro-mina-litio-catamarca-us-280-millones_0_BkULTznkm.html). 2 - 2

Figura 2.2 Pigmentos en la salmuera de la Bahía de San Francisco debido a la presencia de arqueas halófilas (Crédito de la fotografía: Robert Campbell). 2 - 4

Figura 2.3 Zonas de muestreo de suelo, sitios S1 (izquierda) y S2 (derecha) en el Salar del Hombre Muerto. 2 - 6

Figura 2.4 Localización de los puntos de muestreo de suelos en el Salar del Hombre Muerto, imagen tomada por Google Earth, acceso el 11 de Diciembre de 2018. 2 - 6

Figura 2.5 Distribución de arqueas de acuerdo a su filo en las muestras de suelo del Salar del Hombre Muerto. Se indica además la abundancia relativa de los géneros detectados en el filo Euryarchaeota. 2 - 15

Figura 2.6 Abundancia relativa (%) de microorganismos de acuerdo a su filo en las muestras de suelo S1A (sitio 1, 0-10 cm de profundidad) y S1B (sitio 1, 10-60 cm de profundidad) del Salar del Hombre Muerto. Se tomaron abundancias relativas superiores al 1 %. 2 - 16

Figura 2.7 Abundancia relativa (%) de microorganismos de acuerdo a su clase en las muestras de suelo S1A (sitio 1, 0-10 cm de profundidad) y S1B (sitio 1, 10-60 cm 2 - 19

de profundidad) del Salar del Hombre Muerto. Se tomaron abundancias relativas superiores al 1 %.

Figura 3.1 Esquema del ensayo del canal para la evaluación de tolerancia a LiCl por parte de las bacterias halotolerantes en placas de Petri conteniendo medio de cultivo APCsal. 3 - 7

Figura 3.2 A, B Imágenes de microscopía óptica (100 X) de las muestras de salmuera; se observa la presencia de microorganismos verdes y cristales de sal. C, D (4.000 y 1.500 X, respectivamente) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la muestra líquida filtrada en membranas de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,22 μm). 3 - 11

Figura 3.3 A Hongo filamentoso aislado de muestras de Salar del Hombre Muerto cultivado en medio Sabsal (izquierda, medio de cultivo Sabouraud preparado con 12,5% de salmuera) y Sab (derecha, medio de cultivo Sabouraud) a 30 °C. **B** Imagen de microscopía óptica (40X) de un *Penicilluim* biverticilado con esporas esféricas, aislado de una muestra líquida y cultivado en medio Sabsal a 30 °C. 3 - 12

Figura 3.4 Ensayo del canal en placas de Petri utilizando medio APCsal. Las fotografías muestran el crecimiento bacteriano frente a soluciones de cloruro de litio 297 y 636 g/L. 3 - 13

Figura 3.5 Tolerancia al LiCl de las cepas seleccionadas utilizando el ensayo del canal y en medio líquido. Se muestra el número de aislamientos que fueron capaces de crecer a diferentes distancias (indicadas abajo) desde el borde del canal (izquierda). En el gráfico de torta de la derecha se muestran cuántas cepas de las previamente clasificadas como tolerantes a cloruro de litio fueron capaces de crecer en medio líquido definido con distintas concentraciones de LiCl: 0 (MD), 10 (D10), 30 (D30), 40 (D40), 50 (D50) y 60 (D6O) g/L. 3 - 15

Figura 3.6 Colonias de aislamientos bacterianos crecidos en APCsal a 30 °C, durante 2 días. 3 - 17

Figura 3.7 Imágenes de microscopía óptica (100X) de las células bacterianas después de la tinción de Gram. A Cocos Gram positivos, B Bacilos Gram positivos. 3 - 17

Figura 3.8 Ensayo de formación de biofilms (a 30 °C) con los aislamientos seleccionados como tolerantes a LiCl. Se utilizaron los medios de cultivo DM (sin LiCl) y D30 (30 g/L LiCl) en microplacas de 96 pocillos. **A.** Fotografía de una placa de 96 pocillos luego de aplicar el método de tinción con cristal violeta. **B.** Número de aislamientos capaces de producir biofilms en los medios evaluados. 3 - 19

Figura 3.9 Fotografía ilustrativa de la formación de pigmentos compatibles con carotenoides por bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto. Crecimiento en medio de cultivo APCsal a 30 °C durante cuatro días. 3 - 20

Figura 3.10 Árbol filogenético obtenido por el análisis de las secuencias de los aislamientos del Salar del Hombre Muerto (el número de acceso está indicado entre paréntesis) y bacterias de la base de datos del NCBI. 3 - 25

Figura 4.1 Curva de calibración para la cuantificación de Li soluble en medio alcalino utilizando quinizarina. Se utilizó 4 x 10^{-5} M de quinizarina, 7,4 x 10^{-4} M NaOH 10^{-3} M Na_2CO_3 y 90% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) en un volumen final de 2 mL. Se incubó a 25 °C durante una hora y las lecturas se realizaron a 601 nm. 4 - 7

Figura 4.2 Crecimiento de *Bacillus atrophaeus* HX11 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 9

Figura 4.3 Crecimiento de *Bacillus licheniformis* FAMB1 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. N es la concentración de biomasa expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). 4 - 10

Figura 4.4 Crecimiento de *Bacillus atrophaeus* HA120A en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 11

Figura 4.5 Crecimiento de *Bacillus* sp. SA313 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 12

Figura 4.6 Crecimiento de *Brevibacterium halotolerans* SX139 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 12

Figura 4.7 Crecimiento de *Micrococcus* sp. M12 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 13

Figura 4.8 Crecimiento de *Kocuria rosea* SA129B en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. 4 - 14

DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Figura 4.9 Crecimiento de *Micrococcus luteus* SA211 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 14

Figura 4.10 Curvas de crecimiento normalizadas para las cepas bacterianas evaluadas en medio de cultivo **(A)** sin (DM) y **(B)** con 20 g/L de LiCl (D20) a 30 °C y 200 rpm. Se utilizaron las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211. La concentración de biomasa para todas las cepas se expresó como una medida de la densidad óptica (DO) a 600 nm, con excepción de la cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 que se expresó como las unidades formadoras de colonia por mililitro (N en UFC/mL) y se representó en el eje secundario. El subíndice 0 indica el valor inicial, que se usó para la normalización. 4 - 16

Figura 4.11 Litio residual mínimo detectado en el sobrenadante durante el crecimiento de las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211, en medio líquido definido con 20 g/L de LiCl a 30 °C y 200 rpm. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 17

Figura 4.12 Remoción de litio empleando *Bacillus atrophaeus* HX11. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 18

Figura 4.13 Remoción de litio empleando *Bacillus licheniformis* FAMB1. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 19

Figura 4.14 Remoción de litio empleando *Bacillus atrophaeus* HA120A. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 19

Figura 4.15 Remoción de litio empleando *Bacillus* sp. SA313. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de 4 - 20

células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Figura 4.16 Remoción de litio empleando *Brevibacterium halotolerans* SX139. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 21

Figura 4.17 Remoción de litio empleando *Micrococcus* sp. M12. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 21

Figura 4.18 Remoción de litio empleando *Kocuria rosea* SA129B. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 22

Figura 4.19 Remoción de litio empleando *Micrococcus luteus* SA211. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 23

Figura 4.20 Mínimo valor de litio residual detectado en el sobrenadante después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Se evaluaron las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211 Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. 4 - 24

Figura 4.21 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus atrophaeus* HX11 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. Las flechas rojas señalan la formación de estructuras redondeadas que podrían ser estructuras de resistencia. 4 - 26

Figura 4.22 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus licheniformis* FAMB1 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 26

Figura 4.23 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus atrophaeus* HA120A obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 28

Figura 4.24 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus* sp. SA313 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 28

Figura 4.25 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Brevibacterium halotolerans* SX139 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 29

Figura 4.26 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Micrococcus* sp. M12 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 30

Figura 4.27 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Kocuria rosea* SA129B obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 30

Figura 4.28 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Micrococcus luteus* SA211 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. 4 - 31

Figura 5.1 Ensayo del canal para determinar la tolerancia de cepas de arqueas halófilas a 7 y 10 M de LiCl (296,8 y 424 g/L). Se incluyeron cepas ATCC (*N. asiática, H noriciense, H sinaiiensis, H curtirubrum, H salinarum, H saccharovorum*), *Halobacterium* sp. GSL-19, *Halobacterium* sp. NRC-1, y cepas aisladas del Salar de Uyuni, Bolivia, llamadas 4-1A, 4-2, *Haloterrigena* sp. 5-1, 5-3, *Natrinema* sp. 5-4, 5-5, 5-6ª y *Natrinema* sp. 6-1. 5 - 9

Figura 5.2 Curvas de crecimiento de *Halobacteruim* sp. NRC-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl, respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl, respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 11

Figura 5.3 Curvas de crecimiento de *Halorubrum lacusprofundi* en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 12

Figura 5.4 Curvas de crecimiento de *Halorubrum* sp. 3-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 13

Figura 5.5 Curvas de crecimiento de la cepa 4-2 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 14

Figura 5.6 Curvas de crecimiento de *Haloterrigena* sp. 5-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 15

Figura 5.7 Curvas de crecimiento de *Natrinema* sp. 5-4 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 16

Figura 5.8 Curvas de crecimiento de *Natrinema* sp. 6-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 17

Figura 5.9 Curvas de crecimiento de *Salarchaeum* sp. DS1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 18

Figura 5.10 Máximos valores de biomasa producida por arqueas halófilas cultivadas en medios de cultivo con concentraciones finales de 116,9; 175,3; 233,8 y 259 g/L de NaCl, incubadas a 37 ° C y 100 rpm. El sombreado azul indica el rango de salinidad para el crecimiento óptimo de microorganismos halófilos moderados, y el rosado el de halófilos extremos (5). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 19

Figura 5.11 Máximos valores de biomasa producida por arqueas halófilas cultivadas en medios de cultivo con concentraciones finales de 42,4; 84,8; 127,2; 156,9 g/L de LiCl, incubadas a 37 ° C y 100 rpm. La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial. 5 - 20

Figura 5.12 Relación de biomasa producida en medio de cultivo con litio en relación a la obtenida en el mismo tiempo en medio de cultivo sin litio para cada 5 - 22

microorganismo. DO_{Li} es la máxima densidad óptica medida en medio de cultivo con litio agregado (20 g/L para bacterias, medio D20 y 42,4 g/L para arqueas, medio CM2Li1) y DO es la correspondiente sin LiCl (DM y CM2 para bacterias y arqueas respectivamente). Se cultivó a 37 °C y 100 rpm para arqueas y 200 rpm y 30 °C para bacterias.

Figura 6.1 Imagen de *Micrococcus luteus* SA211 crecida en medio de cultivo APCsal. 6 - 4

Figura 6.2 Geles de las corridas electroforéticas de las muestras de ADN control (sin digerir) y digeridas con ARNasa (Inbio, 10 mg/mL, 2,5 U/μg). Cada 20 μL de extracto de ácidos nucleicos totales se agregaron 3 μL de enzima y se incubó durante 40 min a 37 °C. 6 - 8

Figura 6.3 Distribución de las proteínas totales de *Micrococcus luteus* SA211 de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI). 6 - 11

Figura 6.4 Comparación de las secuencias de los genomas correspondientes a las cepas *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. CH7, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Micrococcus* sp. KT16 y *Micrococcus luteus* SA211. Los bloques de colores de cada genoma representan secuencias compartidas. Las secuencias compartidas se relacionan mediante líneas de unión entre los genomas. 6 - 14

Figura 6.5 Comparación de las secuencias de los genomas correspondientes a las cepas de *Micrococcus luteus* NCTC 2665, SGAir0127 y SA211. Los bloques de colores de cada genoma representan secuencias compartidas. Las secuencias compartidas se relacionan mediante líneas de unión entre los genomas. 6 - 15

Figura 6.6 Distribución de pI de las proteínas totales predichas de *Halobacterium* sp. NRC-1, *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* 168*, Escherichia coli* BL21y *Micrococcus luteus* SA211. 6 - 16

Figura 6.7 Distribución de pI de las proteínas totales predichas para *Halobacterium* sp. NRC-1, *Methanothermobacter thermautotrophicus, Salinibacter rubrum* y *Micrococcus luteus* SA211. 6 - 18

Figura 6.8 Distribución de pI de las proteínas totales predichas de diferentes cepas de *Micrococcus,* entre las que se encuentran *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. KT16, *Micrococcus* sp. CH7 y *Micrococcus luteus* SA211. 6 - 19

Figura 7.1 Síntesis diferencial de proteínas en geles monodimensionales de las cepas *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Brevibacterium halotolerans* SX139 y *Bacillus licheniformis* FAMB1 cultivadas en medio definido con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de cloruro de litio. Las flechas rojas señalan las bandas presentes en solo una de las 7 - 9

condiciones evaluadas para cada cepa y las verdes señalan proteínas presentes en ambas concentraciones de LiCl pero sobresintetizadas en la situación señalada.

Figura 7.2 Síntesis diferencial de proteínas en geles monodimensionales producidas por *Micrococcus luteus* SA211 cultivada en medio definido sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl y con 14 (Na1) y 42 g/L (Na2) de NaCl. Las flechas rojas indican bandas detectadas sólo en esa condición, las verdes indican sobresíntesis con respecto a DM y las celestes señalan proteínas que están presentes en todas las condiciones en distintas intensidades. 7 - 12

Figura 7.3 Geles bidimensionales mostrando las proteínas sintetizadas por *Micrococcus luteus* SA211 cultivado en medio definido sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl. Los geles con las letras A, B y C corresponden a tres experimentos independientes (kDa: kilodalton). 7 - 13

Figura 7.4 Análisis del proteoma de *Micrococcus luteus* SA211 cultivado en medios sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl. Los geles bidimensionales se tiñeron con Coomassie Coloidal y se evaluaron por triplicado. Los *spots* marcados con círculos, numerados del 1 al 46 para facilitar su localización, son los que mostraron diferencias en su intensidad, por lo que se cortaron del gel y se enviaron a secuenciar (kDa: kilodalton). 7 - 15

Índice de tablas

Página

Tabla 1.1 Salares con las reservas más grandes de litio a nivel mundial, cantidades de recurso disponibles, operadores encargados de la extracción de litio en cada salar y producción anual de litio (Fuente: Flexer y col 2018) (10). 1 -10

Tabla 1.2 Proyectos de extracción de litio en salares de Argentina en distintas etapas de producción (Fuente: Delbuono y col 2017) (1). 1 - 12, 1 - 13

Tabla 2.1 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo provenientes de dos sitios (S1 y S2), a dos profundidades (A, muestra superficial y B muestra profunda), del Salar de Hombre Muerto. 2 - 10

Tabla 2.2 Composición de las muestras líquidas de la reserva de agua dulce y de la salmuera del Salar del Hombre Muerto por ICP-AES. 2 - 13

Tabla 3.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y la selección de microorganismos de muestras líquidas y de suelos del Salar del Hombre Muerto. 3 - 5

Tabla 3.2 Componentes del medio de cultivo definido utilizado para los ensayos de tolerancia a LiCl en medio líquido y para la determinación de la formación de biofilms. El pH se ajustó a 7. 3 - 14

Tabla 3.3 Morfología y clasificación de Gram de las bacterias clasificadas como tolerantes al cloruro de litio en medio líquido, según su origen. 3 - 18

Tabla 3.4 Identidad parcial determinada a través de la secuenciación del fragmento 16S de ADNr de los 26 aislamientos y características generales de las cepas. 3 - 23

Tabla 5.1 Arqueas halófilas evaluadas de acuerdo a su tolerancia a LiCl. Las composiciones químicas de las salmueras fueron obtenidas de bibliografía (8, 22, 23). 5 - 4, 5 - 5

Tabla 5.2 Composición del medio de cultivo CM^{+}, utilizado para el crecimiento de arqueas halófilas. El pH se ajustó a 7,2. 5 - 6

Tabla 5.3 Medios de cultivo utilizados para el análisis de tolerancia a LiCl de arqueas halófilas. 5 - 8

Tabla 5.4 Cepas de bacterias y arqueas que produjeron la mayor cantidad de biomasa en medios de cultivo con litio en relación al crecimiento producido en ausencia de litio. Se utilizó el medio DM y D20 (sin y con 20 g/L de LiCl) para bacterias y CM2 y CM2Li1 (0 y 42,4 g/L de LiCl) para arqueas). El tiempo señalado en la tabla indica el período de incubación en el que se alcanza la máxima cantidad de biomasa para cada cepa. 5 - 22

Tabla 6.1 Secuencias de genomas comparadas utilizando el software libre Mauve. 6 - 7

Tabla 6.2 Motivos metilados en *Micrococcus luteus* SA211. Las secuencias están en dirección 5´ a 3´. Las bases subrayadas indican la base metilada en la secuencia. Los motivos con R tienen un nucleótido A o G. 6 - 10

Tabla 6.3 Locus en el genoma de *Micrococcus luteus* SA211 de secuencias de ARNr y ARNt. 6 - 11, 6 - 12, 6 - 13

Tabla 7.1 Composición de los geles separador y concentrador. 7 - 5

Tabla 7.2: Composición de la solución de rehidratación. 7 - 7

Tabla 7.3 Composición de las soluciones equilibradoras I y II. 7 - 7

Tabla 7.4 Identificación de proteínas sintetizadas diferencialmente por *Micrococcus luteus* SA211 en medios de cultivo definido con 0 (DM), 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl. 7 - 16, 7 - 17, 7 - 18

Resumen

La obtención de litio ha tomado gran importancia en los últimos años debido a la gran demanda para la producción principalmente de baterías. Este elemento tiene además otras utilidades, como en la industria cerámica y médica. Se conoce que la forma más económica y eficiente de obtener litio es a partir de salmueras naturales con altas concentraciones del metal, distribuidas principalmente en la zona de la puna sudamericana, al oeste de los Estados Unidos y en lagos salinos de China. El Salar del Hombre Muerto, ubicado en el noroeste argentino, es uno de los vértices del "Triángulo del litio" que incluye toda el área comprendida entre este Salar, el de Uyuni en Bolivia y el de Atacama en Chile. En esta zona se concentra alrededor del 85% del litio soluble a nivel mundial.

En la presente tesis doctoral se planteó como objetivo general determinar la influencia del litio sobre diferentes géneros microbianos aislados de muestras ambientales con elevada concentración de mineral y caracterizar la composición de las comunidades microbianas que se encuentran en estos ambientes. A partir de este conocimiento, intentar discernir los mecanismos que les permiten a los organismos tolerar dichas condiciones adversas y sus potenciales capacidades y/o aplicaciones biotecnológicas.

Se inició este trabajo determinando la importancia del litio, resaltando sus aplicaciones y demanda a nivel mundial. Posteriormente se describió la distribución del metal alrededor del mundo, teniendo en cuenta las reservas actualmente en explotación como las que aún permanecen sin explotar. Se seleccionó el Salar del Hombre Muerto como sitio de estudio de donde se tomaron muestras de suelo de dos puntos diferentes, de agua dulce y de salmuera. Estas se caracterizaron de acuerdo con su composición química y sus propiedades físicas. También se estudió la composición de la comunidad microbiana en muestras de suelo utilizando técnicas de metagenómica. El análisis de los datos obtenidos permitió establecer una relación entre las propiedades de los suelos con las comunidades microbianas que lo habitan.

Por otra parte, se evaluó la presencia de microorganismos mediante microscopía óptica y electrónica en las muestras de agua dulce y salmuera y se aislaron bacterias y hongos mediante técnicas microbiológicas a partir de las muestras disponibles. Del total de 238 cepas bacterianas obtenidas, se continuó el trabajo con aquellas capaces de crecer en altas concentraciones salinas (186), de las que se evaluó su tolerancia al cloruro de litio mediante el crecimiento en medios de cultivo sólido (ensayo del canal) y

líquido. Las 36 cepas bacterianas clasificadas como tolerantes en medio líquido (de un total de 56 clasificadas como tal en medio sólido) se caracterizaron en cuanto a su morfología microscópica y la de sus colonias y a su capacidad de formar biofilms y de producir carotenoides. De ellas, 26 cepas se secuenciaron e identificaron empleando técnicas de biología molecular y bioinformática. Se depositaron las secuencias obtenidas en el GeneBank.

A partir de los aislamientos bacterianos tolerantes a litio, se seleccionó un grupo de 8 cepas de las que se evaluó la capacidad de crecer en presencia de cloruro de litio y de recuperar el litio soluble. Se verificó que las células poseen la capacidad de adsorber una fracción del litio soluble y que en algunas de las cepas el litio, en elevadas concentraciones, afectó a la morfología celular.

Asimismo, se evaluó la tolerancia al cloruro de litio de 19 cepas de arqueas halófilas, de diferente origen, en medio sólido mediante el ensayo del canal y el crecimiento en medio líquido con diferentes concentraciones de sales de sodio y litio. Se identificaron tres cepas halófilas extremas y dos con capacidad para crecer en altas concentraciones de litio, siendo estas últimas comparables a los aislamientos bacterianos obtenidos.

Finalmente, se seleccionó una de las cepas aisladas del Salar del Hombre Muerto, *Micrococcus luteus* SA211, para profundizar su estudio. Se secuenció y analizó su genoma y metiloma completo, lo que permitió analizar la potencialidad de la cepa y predecir que la mayoría de las proteínas que la cepa podría sintetizar serían ácidas. Se estudió la síntesis diferencial de proteínas de esta (y de otras tres cepas) en ausencia y presencia de sales de litio para identificar las proteínas involucradas en la respuesta al litio, a la vez que se compararon con las sintetizadas en presencia de sodio. Se identificaron 46 proteínas diferencialmente sintetizadas, involucradas en distintas funciones del metabolismo celular, relacionadas con la presencia de litio.

En conclusión, se alcanzaron los objetivos propuestos en el tiempo previsto. Este trabajo, primero en su índole con muestras del Salar del Hombre Muerto, constituye una base sólida para profundizar los estudios de las capacidades de las cepas obtenidas y optimizar procesos de recuperación de litio soluble, entre otras potenciales aplicaciones biotecnológicas observadas en las cepas aisladas.

Abstract

Lithium exploitation has gained great importance in the last years because of the increasing demand mainly for battery production. The element has also other uses, such as in ceramic and medical industry. It is known that the cheapest and most efficient way of obtaining lithium is from natural brines with high concentrations of the metal, which are mainly located in the South American Puna Plateau, in the west of the United States and in salt lakes from China. The Salar del Hombre Muerto, located in the northwest of Argentina, is one of the vertices of the “Lithium Triangle”, which includes all the area between this salt flat, the Uyuni´s in Bolivia and the Atacama´s in Chile. This area harbors around 85% of soluble lithium worldwide.

The general objective of this thesis was to establish the influence lithium has on different microorganisms isolated from environmental samples with high mineral concentration and to characterize the microbial communities from these environments. This knowledge would allow to determine the mechanisms used by these organisms to tolerate such adverse conditions and their potential capabilities and/or biotechnological applications.

First, the importance of lithium was determined, highlighting its applications and the global demand. Then, the worldwide distribution of the metal was described, considering the reserves currently under exploitation, as well as those that are not yet exploited. The Salar del Hombre Muerto was selected as the study site, from which soil samples from two different points, and fresh water and brine samples were collected. Samples were characterized regarding their chemical and physical properties. Also, the composition of the microbial communities from soil samples was studied using metagenomics. The analysis of the obtained data allowed to establish a relationship between soil properties and the composition of their microbial community.

On the other side, the presence of microorganisms was assessed in fresh water and the brine through optic and electronic microscopy. Bacteria and fungi were isolated by microbiological techniques from the all the samples. From a total of 238 bacterial isolates, those able to grow in presence of high salt concentrations (186) were selected and their tolerance to lithium chloride, by culturing them in solid and liquid media, was assessed. The 36 strains classified as tolerant in liquid medium (out of a total of 56 classified as such in solid medium) were further characterized regarding their microscopic morphology and that of their colonies and their capacity for biofilm formation and

carotenoid production. From those, 26 isolates were sequenced and identified through molecular techniques and bioinformatics. The sequences were uploaded to the GeneBank database.

From the lithium tolerant isolates, a set of 8 strains was selected and their ability to grow in the presence of lithium chloride and to recover soluble lithium was evaluated. The cells´ ability to adsorb a fraction of soluble lithium and the fact that the morphology of some cells was affected due to high concentrations of lithium, were verified.

Likewise, the tolerance to lithium chloride of 19 halophile archaeal strains from different origins was assessed in solid media, as well as their ability to grow in liquid media with different concentrations of sodium and lithium salts. Three extreme halophile strains and two able to grow in the presence of high lithium concentrations were identified, being the latest comparable to the bacterial isolates obtained.

Finally, *Micrococcus luteus* SA211, one of the isolates from the Salar del Hombre Muerto, was selected for further studies. Its whole genome and methylome were sequenced and analyzed, allowing to evaluate the strain potential and to predict that most of the proteins that could be produced would be acidic. The differential protein synthesis for this strain (and three others) in absence and presence of lithium, to identify the proteins involved in the response to the metal, were studied, at the time that they were compared to the ones synthesized in the presence of sodium. Forty-six proteins differentially synthesized, involved in different functions of cell metabolism and related to the presence of lithium were identified.

To conclude, the aims proposed for this thesis were achieved in the expected time. This work, first of its kind with samples from the Salar del Hombre Muerto, constitutes a solid base to deepen in the study of the isolates capabilities and to optimize the soluble lithium recovery processes, among other potential biotechnological applications observed for the isolated strains.

El presente trabajo se desarrolló principalmente en el Laboratorio de Aguas y Suelos del INIQUI y en la Facultad de Ingeniería, de la UNSa.

Las tareas desarrolladas en el marco de esta tesis doctoral se llevaron a cabo mediante las siguientes fuentes de financiación:

Becas

- Beca Interna Doctoral otorgada por CONICET, lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI); (CONICET - UNSA) Tema: "Caracterización genética y bioquímica de microorganismos relacionados al metabolismo del litio en aguas y suelos del NOA". Director de beca: Dra. Irazusta, Verónica Patricia, Co-director: Dra. Rajal, Verónica Beatriz. Período: 04/2014 - 03/2019.
- Beca de traslado otorgada por la Sociedad Argentina de Microbiología General para asistir al X Congreso Argentino de Microbiología General. Período: 02/07/2014 – 04/07/2014
- Beca para participar del curso CABBIO: "Principios y métodos de laboratorio y computacionales para el estudio de microbiomas". Centro Argentino Brasileño de Biotecnología, realizado en Belo Horizonte, Brasil. Período: 08/2015 - 08/2015.
- Beca de traslado otorgada por la Sociedad Argentina de Microbiología General para asistir al XI Congreso Argentino de Microbiología General. Período: 05/08/2015 – 07/8/2015.
- Beca para participar del curso *Summer Course Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering*, desarrollado en la Universidad de Nanyang, Singapur. Período: 07/2016 - 07/2016:
- Beca para realizar el Taller de Biodiversidad Microbiana Nativa: "Contribuciones desde la bioinformática a la comprensión de la interacción planta-microorganismos Centro de estudios en zonas áridas (CEAZA)", financiado por el Centro de investigación regional, Comisión nacional de investigación científica y tecnológica llevado a cabo en La Serena, Chile. Período: 11/2017 - 11/2017.
- Beca de traslado - otorgado por la Sociedad Argentina de Microbiología General para asistir al XII Congreso Argentino de Microbiología General. Período: 02/08/2017 – 04/08/2017.
- Beca Fulbright - Ministerio de Educación de la Nación para estancias cortas de investigación, Tema: *Sequencing and analysis of the genome of a halophilic bacterium isolated from El Salar del Hombre Muerto,* desarrollada en el Instituto

de Tecnología Marina y Ambiental, Universidad de Maryland, Baltimore, Estados Unidos. Director de beca: ShiladityaDasSarma. 07/2018 - 10/2018

Proyectos de investigación

- Proyecto CONICET. "Aislamiento y Caracterización de microorganismos relacionados al metabolismo del Litio y otros minerales en aguas y suelos del NOA". Período: 2013-2015. Directora: Dra. Verónica Irazusta Rol: Integrante. Resolución Nº 3960/13.
- Proyecto PIP 2014-0332. "Aislamiento y Caracterización de microorganismos relacionados al metabolismo de Litio, Boro y Sodio en suelos del NOA: Aplicaciones agronómicas y biotecnológicas" Período: 2015-2019. Directora Dra. Verónica Irazusta. Rol: Integrante.
- Proyecto PICT D-2013-0932. "Estudios de la expresión génica y proteica en levaduras con capacidad de biorremediar ambientes contaminados con metales pesados" Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Período: 2014-2018. Rol: Integrante. Res 147/13.
- Proyecto CIUNSa 2070/4. "Sistemas físicos y Biotecnológicos para la obtención de aguas seguras y la remediación de suelos". Directora: Dra. Verónica Rajal, Período: 2014- 2019. Rol: Integrante. Res 183/2014-CCI.

Hipótesis de trabajo

El trabajo de tesis se ha desarrollado en base a tres hipótesis de trabajo:

1. Los microorganismos aislados de ambientes con elevadas concentraciones de sodio y litio, presentan una tolerancia natural a la sales y son capaces de crecer en medios de cultivo con litio y de recuperarlo.
2. Factores ambientales extremos, como los que se encuentran en los salares de la puna, condicionan la diversidad microbiana de esos ambientes.
3. Los microorganismos adaptados a los ambientes salinos extremos cuentan con una batería de genes, que les permiten sintetizar proteínas que cumplen roles esenciales para la supervivencia en esas condiciones, a la vez que resultan de interés biotecnológico.

Objetivos

General

El objetivo general de este trabajo fue determinar la influencia del litio sobre diferentes géneros microbianos aislados de muestras ambientales con elevada concentración de mineral y caracterizar la composición de las comunidades microbianas que se encuentran en estos ambientes. A partir de este conocimiento, intentar discernir los mecanismos que les permiten a los organismos tolerar dichas condiciones adversas y sus potenciales capacidades y/o aplicaciones biotecnológicas.

Específicos

- Profundizar el estudio del litio, teniendo en cuenta sus aplicaciones, fuentes, localización de reservas y explotación a nivel mundial.
- Caracterizar muestras obtenidas del Salar del Hombre Muerto de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y describir la comunidad microbiana presente en muestras de suelos.
- Aislar, seleccionar, caracterizar e identificar diferentes géneros microbianos de las muestras del Salar del Hombre Muerto según su capacidad de tolerar elevadas concentraciones de LiCl.
- Determinar la capacidad de remover litio por parte de cepas bacterianas.
- Determinar la tolerancia a LiCl de arqueas halófilas de diferentes orígenes.

- Seleccionar, entre los aislamientos obtenidos del Salar del Hombre Muerto, uno con potencial biotecnológico, secuenciar su genoma y analizarlo.
- Estudiar la síntesis diferencial de proteínas en bacterias seleccionadas capaces de proliferar en presencia de elevadas concentraciones de LiCl, identificar las proteínas y en lo posible su función.

Capítulo 1: El litio

1.1. Introducción

El litio es el metal más liviano sobre la Tierra y pertenece al grupo I de metales alcalinos junto con el sodio, potasio, rubidio y cesio. Por su naturaleza química y elevada electronegatividad, se encuentra naturalmente formando parte de salmueras y de minerales ya que su reactividad es muy elevada en estado puro (1). Es altamente flameable y ligeramente explosivo cuando se lo expone al aire y principalmente al agua. También es corrosivo por lo que es necesario utilizar elementos de protección al manipularlo para evitar el contacto con la piel.

Las funciones biológicas del litio aún no fueron determinadas pero se sabe que dicho metal tiene la capacidad de reemplazar iones como sodio, potasio, magnesio y calcio, por lo que su presencia produce un efecto en los organismos con los que tiene contacto. En el caso de humanos, se conoce que en zonas en las que la concentracón de litio en agua potable es menor a lo normal (0,07-0.170 mg/L), la tasa de suicidios, crímenes y adicción a drogas es mayor (2). Además, Shahzad y col (2016) (3) evidenciaron que la presencia de litio produce alteraciones en el metabolismo de las plantas, dependiendo de la naturaleza de la planta y de la concentración de litio a la que ella es expuesta. Por otro lado, el reemplazo de iones indispensables para el correcto funcionamiento de enzimas lleva a alteraciones en su actividad, que resultan en cambios a nivel metabólico (4), por lo que el litio también podría tener un efecto a este nivel.

El nombre del elemento proviene del griego *lithos,* que significa piedra y tiene una densidad exactamente igual a la mitad de la del agua. Desde su descubrimiento por Johann Arfverdson en 1817 hasta su obtención en forma pura en 1855 (conseguido por Robert Bunsen y Augustus Matthiesen), el litio fue estudiado en gran detalle y su primer aplicación de mayor envargadura fue en la fabricación de lubricantes de altas temperaturas, utilizados para los motores de los aviones en la segunda Guerra Mundial (5). Desde 1955 creció su demanda por la fabricación de bombas termonucleares (5, 6). Por otro lado, Jonh Cade (1949) descubrió que también se lo

puede utilizar en el tratamiento de trastornos bipolares, teniendo una aplicación en la medicina (7).

El litio, encontrado de forma natural es una mezcla de dos isotopos estables, Li-6 y Li-7, siendo el último el más abundante (8 vs 92%, respectivamente) (2).

1.1.1. Fuentes de litio

Como consecuencia de la demanda continua a nivel mundial, los recursos conocidos de litio han aumentado y se han identificado alrededor de 50 millones de toneladas. En total (entre salmueras de salares, geotérmicas, hectorita, de yacimientos petrolíferos y pegmatitas), los recursos de Estados Unidos (EEUU) fueron estimados en 6,8 millones de toneladas. En Argentina el valor es de 9,8 millones de toneladas, Bolivia 9 millones, Chile 8,4 millones, China 7 millones, Australia 5 millones, Canada 1,9 millones, Congo, Rusia y Serbia 1 millón cada uno, República Checa 840.000, Zimbabwe 500.000, España 400.000, Mali 200.000, Brasil y México 180.000 cada uno, Portugal 100.000 y Austria 50.000 toneladas (8).

En la naturaleza, el 58% del litio se encuentra en salares, en pegmatitas el 26%, como arcillas de litio el 7% y en salmueras geotermales, jadarita y otras salmueras, en un 9% (Figura 1.1) (9, 10, 11).

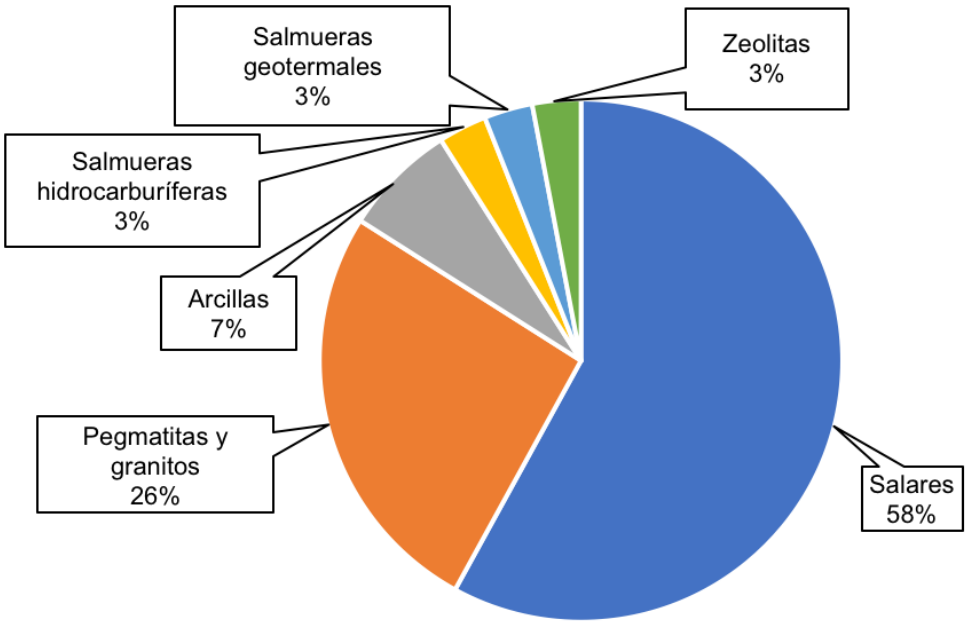


Figura 1.1 Distribución de fuentes de litio a nivel mundial. Elaboración propia con datos de Bradley y col 2017 (11).

1.1.1.1. Fuentes líquidas

Las salmueras son las fuentes de litio de mayor capacidad para producción a gran escala y a largo plazo (12). El litio se obtiene de salmueras mediante procesos de evaporación a cielo abierto, utilizando energía solar. Esta es una gran ventaja en comparación con la recuperación de litio de minerales, ya que reduce el costo del proceso. Para obtener una tonelada de litio se requieren 5,22 toneladas de salmuera ó 35,56 toneladas de pegmatita (13). Estos datos demuestran que la recuperación de litio a partir de salmueras es más eficiente en comparación con la de pegmatitas.

La salmuera concentrada contiene una mezcla de sales (cloruros y sulfatos de sodio, potasio, calcio, magnesio, boro y litio). Es importante en las muestras acuosas determinar la relación de magnesio/litio, ya que altas concentraciones de magnesio interfieren en la recuperación de litio de las salmueras (14).

Las mejores tasas de recuperación de litio ocurren en ambientes con altas tasas de evaporación debido a elevada radiación solar, baja humedad, vientos moderadamente intensos y poca precipitación. Estas condiciones climáticas se dan en ciertas regiones de Latinoamérica que se constituyen así en grandes reservorios del mineral.

La concentración de litio en el agua de mar es baja (0,17 ppm) en comparación con la de los salares (1.000 – 3.000 ppm). La recuperación de litio del agua de mar implica llevar a cabo procesos de intercambio iónico con resinas, extracción con solventes, coprecipitación y adsorción. El uso de estas metodologías encarece el proceso, haciéndolo inviable a escala industrial (13).

1.1.1.2. Fuentes minerales

El litio se encuentra en más de 145 minerales diferentes, pero se extrae de ambligonita, lepidolita, petalita, eucriptita y espodumeno (13). La mayoría de los minerales de litio se encuentran en pegmatitas (rocas ígneas de gran tamaño) de litio-cesio-tantalio (LCT) y los más importantes son espodumeno, petalita y lepidolita. Entre los anteriores, el espodumeno es el más abundante. Los concentrados de espodumeno se utilizan para producir carbonato de litio y a partir de éste, litio metálico (13).

En general, los minerales que contienen litio están compuestos además de metales raros (como berilio, tantalio, cesio, etc.), por lo que se utilizan para la extracción tanto del litio como de estos metales (15). El litio se comercializa como mineral concentrado, sales de litio y metal refinado.

1.1.2. Usos y demanda de litio a nivel mundial

El uso excesivo de fuentes convencionales de energía, tales como los combustibles fósiles (carbón, gas y petróleo), es una de las principales causas del cambio climático global. Dichas alteraciones climáticas representan una de las mayores amenazas a la supervivencia de organismos vivos, razón principal por la que es indispensable disminuir las emisiones de gases invernadero (16). Esta es la principal razón por la que en la actualidad se están estudiando diferentes fuentes alternativas de energía que permitan reemplazar a los combustibles fósiles (16, 17). El uso de energías renovables (solar, eólica, etc.) es una opción muy prometedora, sin embargo está sujeta a las condiciones meteorológicas de cada área.

Por su parte, las baterías de litio surgieron a partir del estudio de alternativas de almacenamiento de energía y su utilización amigable con el medio ambiente. Dichas baterías son capaces de almacenar grandes cantidades de energía en volúmenes relativamente pequeños, en comparación con las baterías convencionales (18, 19). La producción de baterías de litio ha estado en constante crecimiento en los últimos años (13), y tiene potencial para continuar de esa forma ya que además se utilizan en teléfonos celulares, electrónicos inalámbricos y computadoras portátiles. En baterías, el litio puede utilizarse en combinación con materiales activos en el ánodo, cátodo y como electrolito. Las diferentes combinaciones afectan el voltaje, la densidad de energía y los ciclos de carga/descarga (13). Las baterías producidas pueden ser primarias (un uso) o secundarias (recargables). Las primeras utilizan litio metálico como ánodo y una sal de litio disuelta en un solvente orgánico como electrolito. Las baterías secundarias usan grafito como ánodo, un óxido metálico de litio como cátodo y una sal de litio en un solvente orgánico como electrolito. Además, se está evaluando la posibilidad de utilizar litio reciclado para el armado de baterías, de gran importancia a mediano y largo plazo (11, 20).

Las aplicaciones y versatilidad del litio lo hacen realmente atractivo (5). En cuanto a la proporción de litio destinada a distintos usos, la producción de baterías representa el 39% de la demanda, seguido por el uso en vidrios y cerámicas (donde se lo utiliza para aumentar la dureza de los productos y disminuir la expansión térmica de los cerámicos) (13), en la fabricación de grasas y aceites, aleaciones, polímeros, filtros de aire y en usos para la industria farmacéutica (Figura 1.2). Hasta no hace mucho tiempo, la aplicación más importante del litio era la producción de vidrios y cerámicas, la cual ha sido superada por el uso en baterías, además se espera que en 2025, el uso de litio para baterías represente dos tercios de la demanda. Al ser este cambio muy

reciente, en algunos informes continúan observándose los datos de la producción de vidrios y cerámicas como aplicación principal (11).

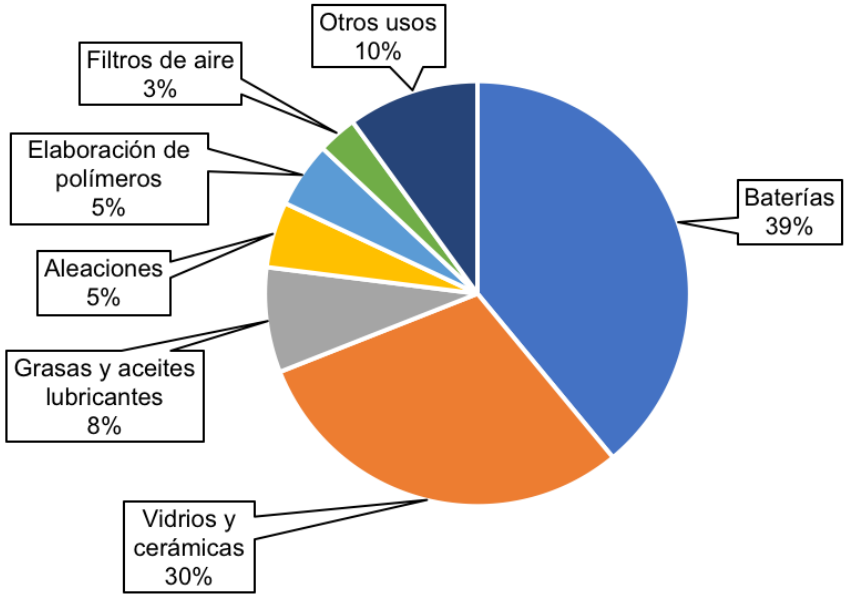


Figura 1.2 Principales usos del litio de acuerdo a los porcentajes de consumo en 2013, Elaboración propia con datos publicados por Delbuono y col (2017) (1).

La utilización de litio en tratamientos de aire es consecuencia de su capacidad de absorber humedad, y se lo utiliza en aires acondicionados en procesos simultáneos al enfriamiento del aire (15). Además, un porcentaje se utiliza para producir compuestos inorgánicos como absorbentes de dióxido de carbono, catalizadores, soluciones para revelado de fotografías, entre algunas de las aplicaciones minoritarias (13, 15).

Con respecto a la demanda de litio a nivel mundial, la proyección desarrollada por Delbuono y col (2017) (1) estima un incremento en el uso de litio para la obtención de baterías, representando una demanda de las dos terceras partes de la producción de litio (Figura 1.3). Es importante conocer la demanda estimada, para determinar si podrá ser abastecida con las reservas disponibles para la extracción. Cabe remarcar que, al haber incrementado tanto la demanda de litio en el último tiempo, no sólo las fuentes naturales disponibles son relevantes, sino que está tomando gran importancia la reutilización del litio.

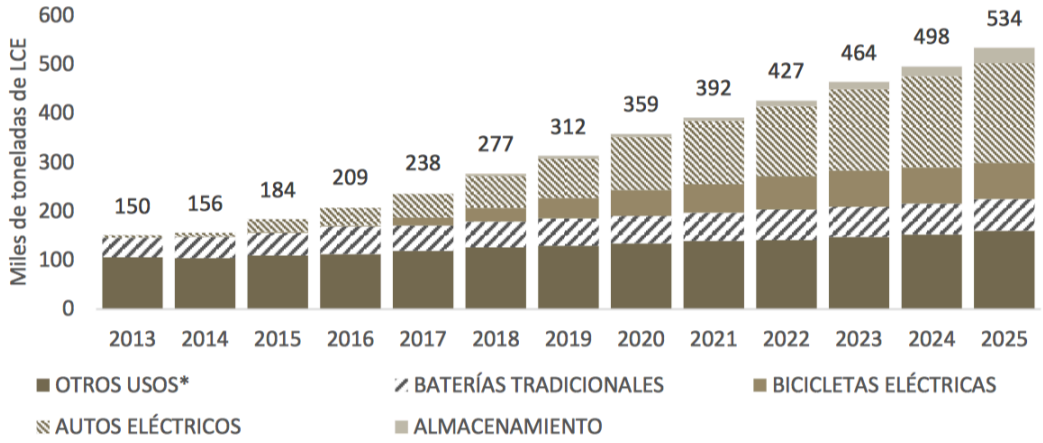


Figura 1.3 Demanda de litio, expresada como miles de toneladas de carbonato de litio equivalente (LCE) proyectada para el 2025 (Fuente: Delbuono y col 2017) (1).

1.2. Objetivos:

- Establecer las fuentes de litio en explotación a nivel mundial
- Evaluar la producción mundial y regional del elemento
- Determinar los salares actualmente en explotación en Argentina
- Caracterizar al Salar del Hombre Muerto como fuente de litio en Argentina

1.3. Materiales y Métodos

Se llevó a cabo la búsqueda de datos actuales de fuentes y explotación de litio para realizar una evaluación a nivel mundial y determinar cuál es la situación regional en ese aspecto.

1.3.1. Relevamiento de la información

El estudio de las características, propiedades y aplicaciones del litio ha estado en constante aumento en los últimos años. Como consecuencia de su elevada potencialidad en aplicaciones industriales, su estudio fue llevado a cabo tanto por entidades gubernamentales como por una gran variedad de institutos de investigaciones a nivel mundial.

La información recopilada para el armado y la organización de este capítulo ha sido obtenida de fuentes públicas como por ejemplo de informes del Ministerio de Energía y Minería de la Nación Argentina y del Servicio Geológico de Estados Unidos principalmente (1, 8, 9, 11, 18). El mercado del litio está en constante crecimiento, y es por esta razón que fue posible acceder a fuentes de información actuales con datos oficiales.

Con respecto a las fuentes de litio, es posible encontrar una gran cantidad de información al respecto no sólo de las características del metal, sino que también de las fuentes naturales distribuídas a nivel mundial que pueden utilizarse como potenciales puntos de explotación del metal.

Asimismo, al haber encontrado litio bajo diferentes formas en la naturaleza, se han desarrollado mecanismos de extracción específicos para cada caso, y el estudio de estas situaciones también ha experimentado un incremento importante a nivel mundial.

El estudio de este metal de importancia tan alta, permite acceder a información actual y de calidad con respecto a todos los aspectos que se propusieron estudiar en este capítulo, desde sus características, pasando por sus aplicaciones, para finalmente evaluar las fuentes de las que se puede obtener y evaluar el caso específico de la situación de Argentina en este marco.

1.4. Resultados y discusión

La búsqueda de información se utilizó para organizar los datos disponibles con respecto a la distribución y producción del litio a nivel mundial y señalar cuál es la situación actual en Argentina.

1.4.1. Distribución mundial y explotación de las fuentes de litio

El litio se encuentra ampliamente distribuído a nivel mundial, estando presente en diferentes formas en los cinco continentes. Las fuentes minerales de litio se encuentran en minerales que están dispersos por el globo, mientras que las reservas en salmueras tienen una distribución menor, encontrándose principalmente en el continente americano. Aunque una cantidad importante de los depósitos se encuentran en explotación, y ésta va en aumento, todavía hay numerosos lugares de reserva sin explotar.

1.4.1.1. Depósitos y explotación de litio a partir de minerales

En Norteamérica, los depósitos más importante de litio en minerales se encuentran en el Kings Mountain, un cinturón de pegmatita localizado al este de Estados Unidos y en Canadá (Figura 1.4), que contienen además berilio, aunque estos depósitos aún no han sido explotados. En Sudamérica las reservas minerales más grandes de litio se encuentran en Minas Gerais, Brasil. Con respecto a Australia, los depósitos más grandes están al sudoeste (en Greenbushes), zona que también ha sido utilizada para la obtención de tantalio y litio (15). En África están la pegmatita Bikita, el cinturón Kamativi y el sistema de pegmatitas de la República de Congo.

En cuanto a la producción, los principales productores de litio a partir de pegmatitas son Australia, Brasil, China, Portugal y Zimbabwe.



Figura 1.4 Distribución mundial de pegmatitas de litio-cesio-tantalio (LCT) (puntos rojos) y de granitas de litio (puntos amarillos) (Fuente: Bradley y col 2017) (11).

1.4.1.2. Depósitos y explotación de litio a partir de salmueras

Con respecto a las reservas de litio en salmueras, los depósitos principales se encuentran en las zonas del Altiplano Andino (incluye zonas de los países de Argentina, Chile, Bolivia y Perú), en China (principalmente en dos lagos salinos de altura, el Lago Zabuye en la meseta Tibetana y la cuenca de Qaidam en la meseta de Mongolia) y el sudoeste estadounidense (Figura 1.5) (21). Los procesos de extracción en salmueras de la Puna se ven favorecidos por el clima árido de esta zona, que facilita el primer paso de la obtención de litio mediante evaporación solar. Sin embargo, la desventaja con respecto a la obtención de litio de salmueras es que son pocas las fuentes explotables a nivel mundial (las salmueras de interés están concentradas en Sudamérica y China) y los tiempos de evaporación necesarios para el proceso son relativamente largos (14).

La obtención de litio a partir de salmueras hipersalinas en Sudamérica representa aproximadamente dos tercios de la producción a nivel mundial (21). El Salar de Atacama en Chile es la principal fuente de carbonato de litio, y su salmuera tiene una concentración de litio promedio de 1.400 ppm (21). En Bolivia se encuentra el Salar de

Uyuni, considerado como el más grande del planeta (15), que cuenta con 9 millones de toneladas métricas de litio estimadas en una concentración de 320 ppm. La desventaja de este Salar es la relativamente baja concentración de litio en su salmuera (320 ppm) y elevada concentración de magnesio (6.080 ppm) (14, 22).

En el caso de China el lago Zabuye tiene una reserva estimada de 1 millón de toneladas métricas a una concentración de aproximadamente 1000 ppm (11).

En cuanto a las reservas norteamericanas, la salmuera de Clayton Valley (Silver Peak, Nevada) ha sido explotada desde 1966 para producir carbonato y hidróxido de litio. Esta salmuera tiene una concentración de litio de alrededor de 200 ppm y su reserva estimada es de 0,3 millones de toneladas métricas (11, 22). En Estados Unidos también existen reservas de litio en pozos petrolíferos, pero la naturaleza de las muestras es tan compleja desde un punto de vista químico que aún no son muy atractivas como fuentes de dicho elemento (11).



Figura 1.5 Distribución de salmueras en salares, salmueras de pozos petrolíferos, geotermales, arcillas y depósitos de zeolita. (Fuente: Bradley y col 2017) (11).

Con respecto a la producción, Chile es el principal productor de carbonato de litio en el mundo, seguido por China y Argentina (Tabla 1.1). El litio es concentrado y purificado en dos plantas, una de cloruro y otra de hidróxido de litio en Antofagasta. El Salar de Atacama es el de mayor producción, seguido por el de Olaroz y en tercer

lugar se encuentra el del Hombre Muerto (Tabla 1.1). Con respecto a China, los mayores recursos de litio se encuentran en el lago West Taijinar, provincia de Qinghai.

Tabla 1.1 Salares con las reservas más grandes de litio a nivel mundial, cantidades de recurso disponibles, operadores encargados de la extracción de litio en cada salar y producción anual de litio (Fuente: Flexer y col 2018) (10).

País	Reserva	Li métalico equivalente (t)	Operador	Concentración de Li (ppm)	Producción actual (t/año)
Argentina	Salar de Olaroz	$1,2x10^6$	Sales de Jujuy	690	17.500
Argentina	Salar del Hombre Muerto	$8x10^5$	FMC Lithium	620	19.730[A]
Chile	Salar de Atacama	$3x10^6$	Sociedad Química y Minera de Chile SA	1.500	54.000[A]
Chile	Salar de Atacama	$3x10^6$	Albemarle	1.500	72.000[A]
China	Lago de agua salada Chaerhan	$1x10^6$	Qinghai Lanke Lithium Industry	210-350	5.000[A]
China	West Taijinar	$2,7x10^6$	CITIC Guoan Lithium Science & Technology	100-300	5.000[A]
China	Zhabuye	$1x10^6$	Tibet Mineral Development	1.000	5.000
Estados Unidos	Clayton Valley (Silver Peak)	$3x10^5$	Rockwood Holdingsm Inc.	230	6.000

[A] Corresponde a la suma de producción de Li_2CO_3 y LiCl

1.4.2. Producción mundial y regional

La producción de litio a nivel mudial fue en aumento en los últimos años. En un comienzo la extracción ocurría principalmente a partir de depósitos minerales, sin embargo en la actualidad, las fuentes preferidas son las salmueras (Figura 1.6).

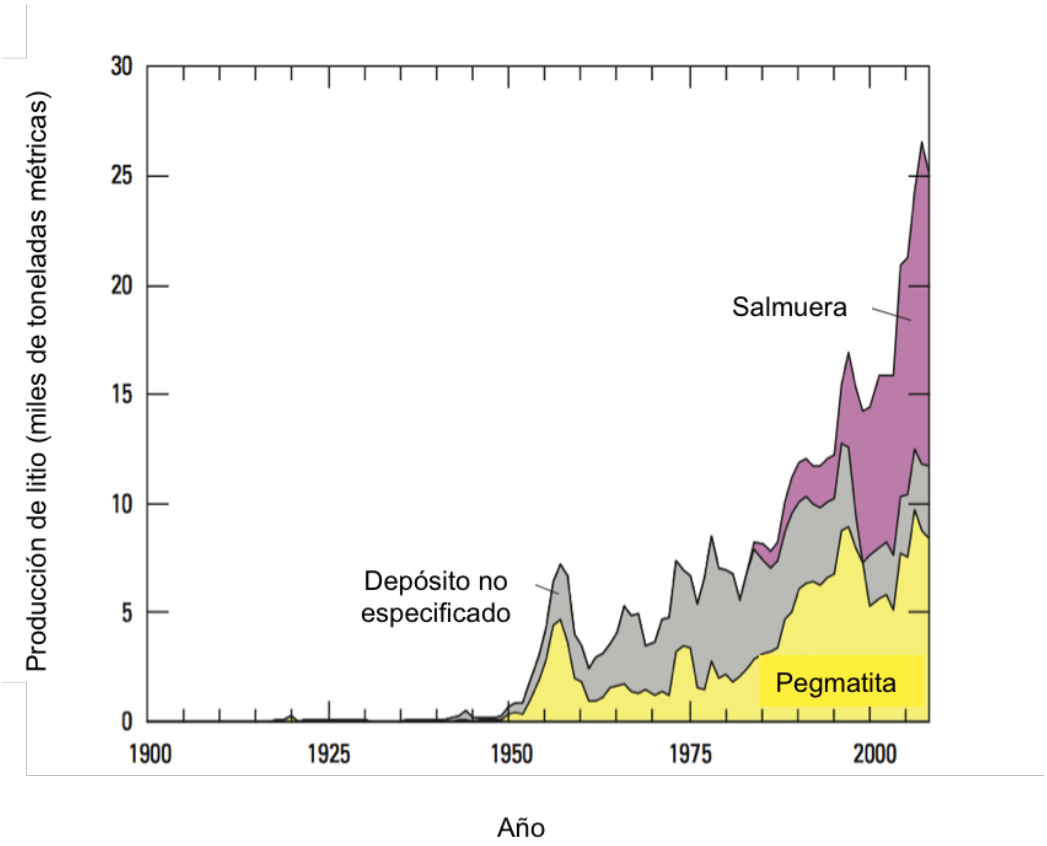


Figura 1.6 Producción mundial de litio desde 1900 a 2007 teniendo en cuenta la reserva (Fuente: Bradley y col 2007) (11).

En 2011, la producción mundial de litio fue de 34.800 toneladas métricas, un 30% más que en 2010 (13). En 2016, la producción alcanzó las 192.500 t de carbonato de litio equivalente (LCE) (1). A pesar de la preferencia por las salmueras como fuente de litio, Australia, que produce litio a partir de minerales, es el principal productor, con un 40% del mercado (11, 18). El litio obtenido proviene principalmente de la mina Greenbushes, que produce concentrados de espodumeno a partir de pegmatitas (15). En segundo lugar está Chile, con una producción estable que alcanza el 33% del mercado y produce derivados de litio en el Salar de Atacama a través de las compañías Sociedad Química y Minera de Chile y Sociedad Chilena de Litio Chemetall (1, 18). Al tercer lugar lo ocupa Argentina, con una oferta del 16% del litio mundial, incrementada desde el 2015 por al aporte del Salar de Olaroz, operado por Orocobre. El resto de la producción proviene del Salar del Hombre Muerto, operado por Food Machinery Corporation (FMC) Lithium, que también aumentó su producción en los últimos años (1). China ocupa el cuarto lugar con respecto a la producción de litio, explotando tanto las salmueras de Qaidam como depósitos minerales (1, 11, 15). Además, China produce carbonato e hidróxido de litio a partir de concentrado de espodumeno australiano (1).

La producción de litio a partir de minerales se ha incrementado por la utilización de litio en baterías y además, las minas también son una fuente importante de tantalio, un metal con alto valor económico utilizado en capacitores para la mayoría de los circuitos eléctricos y electrónicos (13).

1.4.2.1. Producción de litio en Argentina

La producción de litio en Argentina se lleva a cabo principalmente a través de la explotación de salmueras de la Puna. En el Ministerio de Energía y Minería de la Nación existen registrados numerosos proyectos de extracción de litio (Tabla 1.2), los cuales se encuentran en distintas etapas (1).

Tabla 1.2 Proyectos de extracción de litio en salares de Argentina en distintas etapas de producción (Fuente: Delbuono y col 2017) (1).

Proyecto	Salar	Empresa	Provincia	Estado
Salar de Olaroz	De Olaroz[A]	Orocobre SA, Toyota tsusho, JEMSE	Jujuy	Operación
Mina Fénix	Del Hombre Muerto	FMC Lithium	Catamarca	Operación
Salar del Rincón	Del Rincón[A]	ENIRGI Group Corporation	Salta	Operación parcial/ Planta Piloto
Caucharí-Olaroz	De Caucharí[A]	Lithium Americas, JEMSE, SQM	Jujuy	Construcción
Pozuelos	De Pozuelos	POSCO, Lithea	Salta	Construcción Planta Piloto
Sal de Vida	Del Hombre Muerto[A]	Galaxy Resources Limited	Catamarca	Factibilidad
Sal de Los Ángeles	De Diablillos[A]	Lithium-X Energy Corp - Aberdeen International Inc	Salta	Análisis económico preliminar

JEMSE: Jujuy Energía y Minería Sociedad del Estado
[A] Estos proyectos incluyen la extracción de litio y potasio

Tabla 1.2 Proyectos de extracción de litio en salares de Argentina en distintas etapas de producción *(Continuación)* (Fuente: Delbuono y col 2017) (1).

Proyecto	Salar	Empresa	Provincia	Estado
Cauchari	De Caucharí[A]	Advantage Lithium, Orocobre SA	Jujuy	Exploración Avanzada
Salar de Centenario Ratones	De Ratones	Eramet	Salta	Exploración Avanzada
Mariana I, II, III	Llullaillaco	International Lithium JV, Jiangxi Ganfeng Lithium Co Ltd	Salta	Exploración Avanzada
Centenario	Centenario[A]	Lithium Power International	Salta	Exploración Avanzada
Gallego Project	Del Hombre Muerto	Everlight Resources	Salta	Exploración Avanzada
Antofalla	De Antofalla[A]	Advantage Lithium, Albemarle, Bolland International	Catamarca	Exploración Avanzada

JEMSE: Jujuy Energía y Minería Sociedad del Estado
[A] Estos proyectos incluyen la extracción de litio y potasio

Los salares más importantes para la extracción de litio en Argentina son el de Olaroz y el del Hombre Muerto. Sin embargo, hay también otros salares en el área que cuentan con salmueras de altas concentraciones de litio, tales como los Salares de Cauchari, del Rincón, de Ratones, de Centenario y de Diablillos, todos en el noroeste argentino (Figura 1.7).

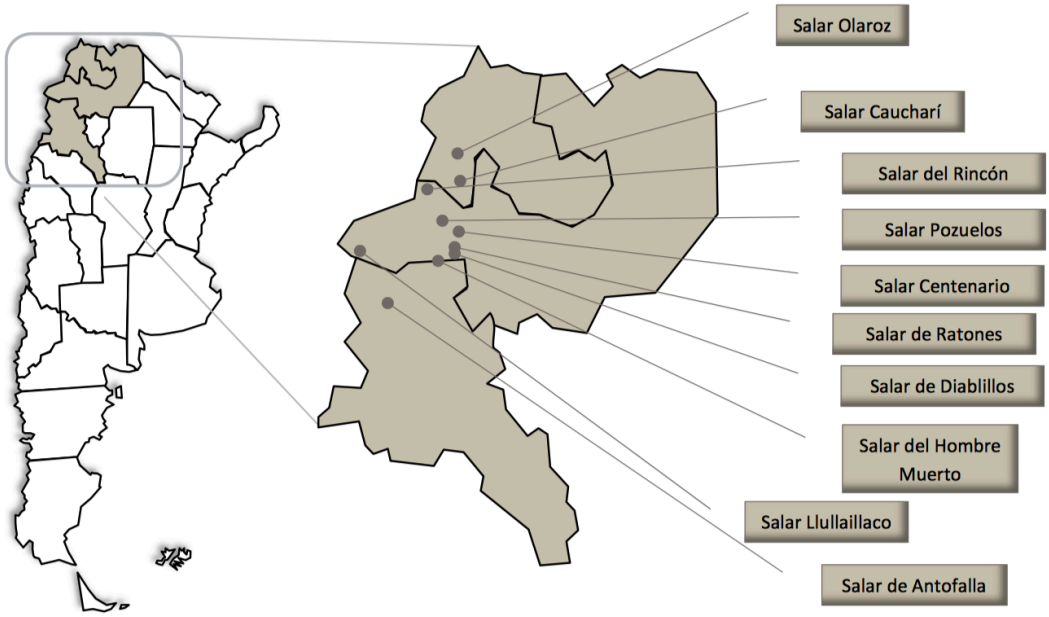


Figura 1.7 Salares con proyectos de extracción de litio en provincias del norte argentino (Fuente: Delbuono y col 2017) (1).

1.4.3. El Salar del Hombre Muerto: características, localización e importancia industrial

La zona sudamericana que incluye el área entre el Salar de Uyuni (Bolivia), Salar de Atacama (Chile) y Salar del Hombre Muerto (Argentina) se conoce como el triángulo de litio y concentra más del 80% del litio disponible en salmueras y más de 60% de los recursos totales de litio (1, 12).

Una de las mayores reservas de litio en la República Argentina, es el Salar del Hombre Muerto, que se encuentra en Antofagasta de la Sierra en la provincia de Catamarca. El Salar del Hombre Muerto consiste de dos subcuencas con salmueras que contienen entre 220 a 1000 ppm de Li con concentraciones bajas de magnesio (15). El depósito salino presente en esa zona se conoce como Yacimiento Fénix y es explotado actualmente por la empresa estadounidense FMC Lithium, que opera a través de la Minera del Altiplano S.A. FMC Lithium cuenta en el Salar del Hombre Muerto con una planta de absorción selectiva, una de carbonato de litio y servicios auxiliares y en la provincia de Salta con una planta de cloruro de litio y una estación de transferencia de cargas. La producción anual de esta empresa es 12.000 t de carbonato y 7.730 t de cloruro de litio. A partir del litio producido, la misma empresa fabrica electrodos y baterías recargables principalmente (23).

En Argentina, el Salar del Hombre Muerto ha sido la única salmuera en producción de litio por muchos años. Sin embargo, actualmente se están explotando otras salmueras como la del Salar del Rincón en Salta y el Salar de Olaroz en Jujuy. Las exportaciones argentinas de litio (tanto carbonato como cloruro) han ido en aumento en las últimas dos décadas (Figura 1.8). Entre los años 2015 y 2016, se produjo un aumento del 111%, debido principalmente a la producción de Olaroz.

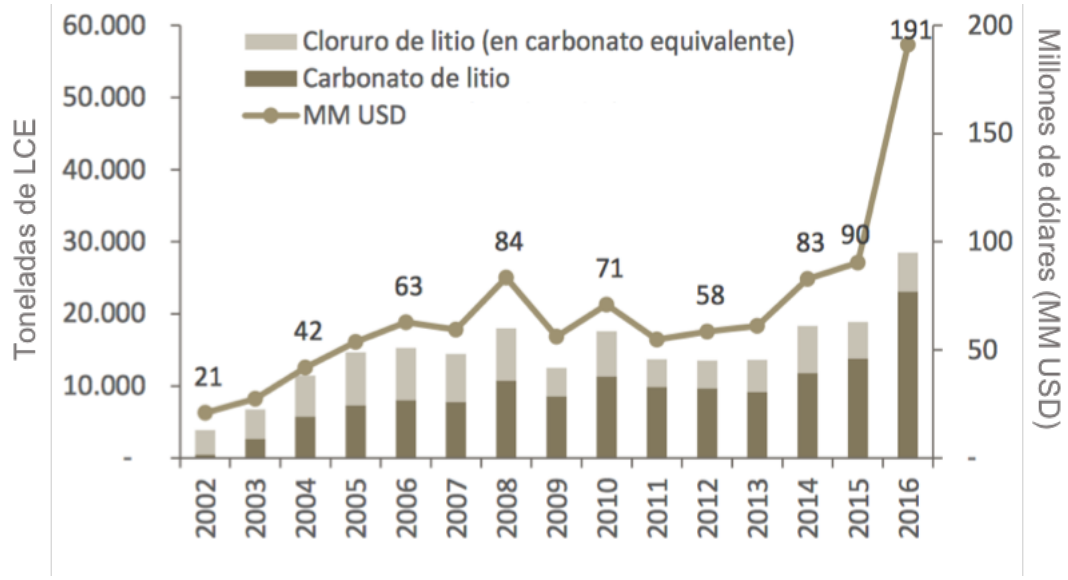


Figura 1.8 Exportaciones argentinas de cloruro y carbonato de litio expresadas en litio equivalente (LCE) (Fuente: Delbuono y col 2017) (1).

1.5. Conclusiones

Alrededor del mundo, se explota litio a partir de diversas fuentes, siendo las salmueras las de mayor importancia por la facilidad que representa la extracción. El principal productor de litio en el mundo es Australia, y lo obtiene a partir de la explotación de la mina Greenbushes. Al segundo lugar lo ocupa Chile, obteniendo litio de salmueras del Salar de Atacama. Argentina, en tercer lugar, produce litio mediante la explotación de los Salares de Olaroz y del Hombre Muerto, y en cuarto lugar está China, que obtiene litio mediante la explotación tanto de sus salmueras como de sus depósitos minerales.

Las reservas de litio en forma de minerales se encuentran distribuídas en una mayor cantidad de lugares, pero la concentración de litio en estas reservas es menor que las encontradas en salmueras. Ambos tipos de reservas son importantes para la extracción y comercialización del metal, y aún continúa la búsqueda de nuevas fuentes y la optimización de los procesos de extracción.

En Argentina, una de las reservas más importantes es el Salar del Hombre Muerto, que ha sido la principal fuente de litio por varios años. En el último tiempo se han explorado nuevos salares y dado inicio a nuevos proyectos de extracción que han permitido aumentar las exportaciones de litio, representando un ingreso importante de divisas al país.

1.6. Referencias

1. Delbuono V, Such T, Toledo E, Jerez D. 2017. Informe especial: Situación actual y perspectivas. Mercado de Litio. Ministerio de Energía y Minería, Presidencia de la Nación Argentina 1-27.
2. Shahzad B, Mughal MN, Tanveer M, Gupta D, Abbas G. 2017. Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview. Environ Sci Pollut Res 24(1) :103-115.
3. Shahzad B, Tanveer M, Hassan W, Shah AN, Anjum SA, Cheema SA, Ali I. 2016. Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities–A review. Plant Physiol Biochem 107:104-115.
4. Laye VJ, DasSarma S. 2018. An Antarctic Extreme Halophile and Its Polyextremophilic Enzyme: Effects of Perchlorate Salts. Astrobiology 18(4):412-418.
5. Aguilar F, Zeller L. 2012. Litio: El nuevo horizonte minero, dimensiones sociales, económicas y ambientales. Centro de derechos humanos y ambiente (CEDHA), Córdoba, Argentina. http://center-hre.org/wp-content/uploads/2012/06/INFORME-LITIO-FINAL.pdf. Fecha del último acceso: 27/01/2019.
6. Lapp RE. 1956. The “Humanitarian” H-Bomb. Bull At Sci 12(7):261-264.
7. Cade JF. 1949. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. Med J Aust 2(10):349-352.
8. Jaskula BW. 2018. Mineral Commodity Summary, US Geological Survey. https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/lithium/mcs-2018-lithi.pdf. Fecha del último acceso: 27/11/2018.
9. Bradley D, Jaskula B. 2014. Lithium—For harnessing renewable energy: U.S. Geological Survey Fact Sheet 2014–3035. https://dx.doi.org/10.3133/fs20143035. Fecha del último acceso: 27/11/2018.
10. Argento M, Zícari J. 2017. Las disputas por el litio en Argentina: ¿Materia prima, recurso estratégico o bien común? Revista Prácticas de Oficio 1 (19):36-48.
11. Bradley DC, Stillings LL, Jaskula BW, Munk LeeAnn and McCauley AD. 2017. Lithium p K1-K21. *In* Schulz KJ, DeYoung JH Jr, Seal RR II, Bradley DC (ed), Critical mineral resources of the United States - Economic and environmental

geology and prospects for future supply: U.S. Geological Survey Professional Paper 1802, Reston, Virginia.

12. Flexer V, Baspineiro CF, Galli CI. 2018. Lithium recovery from brines: A vital raw material for green energies with a potential environmental impact in its mining and processing. Sci Total Environ 639:1188-1204.
13. Talens Peiró L, Villalba Méndez G, Ayres RU. 2013. Lithium: Sources, Production, Uses, and Recovery Outlook. JOM 65(8): 986-996.
14. Meshram P, Pandey BD, Mankhand TR. 2014. Extraction of lithium from primary and secondary sources by pre-treatment, leaching and separation: A comprehensive review. Hydrometallurgy 150:192-208.
15. Kesler SE, Gruber PW, Medina PA, Keoleian GA, Everson MP, Wallington TJ. 2012. Global lithium resources: Relative importance of pegmatite, brine and other deposits. Ore Geol Rev 48:55-69.
16. Chu S, Cui Y, Liu N. 2017. The path towards sustainable energy. Nat Mater 16(1):16-22.
17. Rahman FA, Aziz MMA, Saidur R, Bakar WAWA, Hainin MR, Putrajaya R, Hassan NA. 2017. Pollution to solution: Capture and sequestration of carbon dioxide (CO_2) and its utilization as a renewable energy source for a sustainable future. Renew Sust Energ Rev 71:112-126.
18. Castello A, Kloster M. 2015. Industrialización del Litio y Agregado de Valor Local: Informe Tecno-Productivo. Centro Interdisciplinario de Estudios en Ciencia Tecnología e Innovación. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva http://www.mincyt.gob.ar/_post/descargar.php?idAdjuntoArchivo=41325. Fecha de último acceso: 18/02/2019.
19. Richa K, Babbitt CW, Gaustad G. 2017. Eco-efficiency analysis of a lithium-ion battery waste hierarchy inspired by circular economy. J Ind Ecol 21 (3):715-730.
20. Ahmadi L, Young SB, Fowler M, Fraser RA, Achachlouei MA. 2015. A cascaded life cycle: reuse of electric vehicle lithium-ion battery packs in energy storage systems. Int J Life Cycle Asses 22(1):111–124.
21. Warren JK. 2017. Lithium in saline geosystems: Lake brines and clays. Salty Matter, Salt Work Consultants 1-13 http://www.saltworkconsultants.com/publications.html. Fecha de ultimo acceso: 18/02/2019.
22. Gruber PW, Medina PA, Keoleian GA, Kesler SE, Everson MP, Wallington TJ. 2011. Global Lithium Availability. A Constraint for Electric Vehicles? J Ind Ecol 15(5):760-775.

23. Manrique A. 2014. Tesis de posgrado. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina. *Explotación del litio, producción y comercialización de baterías de litio en Argentina.*

Capítulo 2: Caracterización fisicoquímica y comunidad microbiana de muestras del Salar del Hombre Muerto

2.1. Introducción

Los microorganismos están presentes en prácticamente todos los ambientes explorados. Se han encontrado organismos capaces de colonizar sitios con condiciones tan inhóspitas que resultaron en un gran atractivo en cuanto a sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (1, 2, 3). En volcanes, cristales de sal, en las profundidades del mar, en el aire, expuestos a altas dosis de radiación UV, a grandes amplitudes térmicas, en presencia de contaminantes, sólo por mencionar algunos ejemplos, se han encontrado comunidades microbianas que no sólo sobreviven en dichas condiciones, sino que muchas veces las necesitan para su proliferación (4, 5). Los ambientes en los que no se esperaría encontrar vida por poseer condiciones hostiles, se conocen como ambientes extremos y los organismos que requieren de esas condiciones para proliferar tomaron el nombre de extremófilos o “amantes de condiciones extremas”.

De acuerdo con la condición extrema para la que estén preparados, los microorganismos se pueden clasificar en psicrófilos o termófilos (requieren temperaturas extremadamente bajas o altas para crecer, respectivamente), barófilos (crecen en presiones altas), alcalófilos o acidófilos (proliferan en ambientes extremadamente básicos o ácidos, respectivamente) y halófilos (requieren altas concentraciones de sales para su desarrollo). Muchas veces los organismos requieren más de una condición extrema para proliferar, y por lo tanto se habla de poliextremófilos (6). Este es el caso, por ejemplo, de los microorganismos que habitan las profundidades del mar, adaptados a vivir en elevadas concentraciones de sal y, además, en altas presiones.

En cada uno de los ambientes extremos existen comunidades compuestas por microorganismos adaptados. Las adaptaciones varían de acuerdo con las condiciones a las que son expuestos, y han sido desarrolladas a lo largo de los años para habitar

esos nichos. Muchas veces, los microorganismos cumplen funciones específicas en una comunidad organizada, permitiendo a la comunidad aprovechar los recursos disponibles y adaptarse a los cambios en el ambiente.

2.1.1. Ambientes hipersalinos

En los ambientes hipersalinos el factor limitante de crecimiento más notable es la elevada concentración de sales, que a veces viene acompañada de bajas concentraciones de oxígeno disuelto y de nutrientes, de valores de pH extremos y elevadas temperaturas y presiones y de la presencia de compuestos tóxicos. Entre algunos ejemplos a mencionar de ambientes con altas concentraciones de sales se encuentran lagos, salmueras, suelos salinos, minas, piletas de evaporación y sedimentos. El Salar del Hombre Muerto, que constituye una importante reserva de litio en el país (Capítulo 1), es un excelente ejemplo de un ambiente hipersalino del noroeste argentino (Figura 2.1).



Figura 2.1 Salar del Hombre Muerto, Catamarca, Argentina. Foto: Reuters (https://www.clarin.com/economia/gigante-coreano-compro-mina-litio-catamarca-us-280-millones_0_BkULTznkm.html).

La salinidad y sodicidad en suelos abarcan un área de aproximadamente 950 millones de hectáreas alrededor del mundo (7). La salinidad afecta el 23% del suelo arable y los suelos salino-sódicos afectan un 10% adicional (7). Esto tiene efectos negativos sobre la producción agrícola y produce un cambio en la composición y actividad de las comunidades microbianas. Los microorganismos participan en los ciclos geoquímicos, por lo que su actividad es indispensable para mantener el equilibrio de la naturaleza. Conocer cuáles son los microorganismos que forman parte de los ambientes hipersalinos y determinar las características fisicoquímicas del ambiente, permitirá determinar los ciclos geoquímicos en los que están involucrados.

En cuanto a las salmueras, de acuerdo con su composición química pueden ser clasificadas en talasohalinas o atalasohalinas. Las primeras se caracterizan por tener una composición similar a la del agua de mar, siendo el NaCl el principal componente (8), como por ejemplo es el caso de algunos suelos salinos, y lagos, como el Great Salt Lake (8). Por su parte, las salmueras atalasohalinas, difieren en cuanto a su composición iónica y pueden tener concentraciones elevadas de cationes divalentes como el magnesio (9). Un ejemplo en este caso es el Mar Muerto, con magnesio y calcio como cationes mayoritarios (10, 11). La concentración de sales del Mar Muerto es de 35% (p/p); sin embargo, el sodio no es el ion dominante y presenta concentraciones elevadas de bromuros y cloruros. En otros casos, las salmueras atalasohalinas pueden estar desprovistas de magnesio y calcio por la presencia de altas concentraciones de carbonato. Esto lleva a la formación de lagos salinos alcalinos, con valores de pH superiores a 10.

La presencia de sales afecta tanto la presión osmótica celular como a la actividad de agua de los ambientes (12). Microorganismos que no estén naturalmente adaptados no serán capaces de sobrevivir en un ambiente con poca disponibilidad de agua. Muchas veces estos ambientes sufren variaciones estacionales, por lo que los microorganismos deben tener la capacidad de modificar su metabolismo rápidamente para sobrevivir a estos cambios.

2.1.2. Microorganismos halófilos y halotolerantes

Los ambientes con concentraciones naturales elevadas de sales están colonizados por una gran variedad de microorganismos “amantes de la sal”. Los organismos halófilos incluyen arqueas heterotróficas, fototróficas y metanogénicas, bacterias fotosintéticas, litotróficas y heterotróficas así como microorganismos eucariotas fotosintéticos y heterotróficos (6,10).

Las arqueas halófilas crecen mejor en concentraciones altas de sales, y en algunos casos presentan una coloración que puede dar lugar a la pigmentación de las aguas que habitan (Figura 2.2). En el caso de las arqueas halófilas, algunas especies son poliextremófilas. Por ejemplo, tres especies de haloarqueas aisladas de la Antártida (*Halobacterium* sp DL1, *Halohasta litchfieldiae* y *Halorubrum lacusprofundi*) tienen además la capacidad de crecer a temperaturas bajas (10).



Figura 2.2 Pigmentos en la salmuera de la Bahía de San Francisco debido a la presencia de arqueas halófilas (Crédito de la fotografía: Robert Campbell).

Las cianobacterias son abundantes en lagos y muchas veces se encuentran formando tapetes microbianos. Los microorganismos que forman parte de los tapetes son capaces de crecer en un amplio rango de NaCl (de 2 a 5 M) y presentan láminas de diferentes colores donde su composición está controlada por factores como la luz, la temperatura, la salinidad, el oxígeno disuelto y la presencia de sulfuros. La diferencia en la coloración de sus láminas depende del desarrollo de bacterias fotosintéticas (cianobacterias) que contienen distintos pigmentos y, por lo tanto, distintos patrones de utilización de la luz disponible (10).

En cuanto a las bacterias, existen especies moderadamente halófilas y halotolerantes pertenecientes a una gran variedad de géneros. Algunos de los géneros mejor conocidos que se encontraron en ambientes salinos (salmueras, suelos, agua de mar) son *Halomonas, Chromohalobacter, Bacillus, Halobacillus, Marinococcus*, *Salinicoccus, Brevibacterium,* entre otros (10, 12, 13). Existen también actinobacterias halófilas que crecen mejor a concentraciones moderadas de NaCl (10). En suelos salinos, existen microorganismos que forman comunidades microbianas y pertenecen a filos microbianos específicos como Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi y Acidobacteria (10, 11). La característica principal de los microorganismos halotolerantes es que no requieren de concentraciones elevadas de sales para su crecimiento, pero al tolerarlas pueden proliferar en ambientes salinos.

Entre los microorganismos eucariotas capaces de crecer en ambientes con elevada salinidad, se encuentran principalmente las algas verdes, estando ampliamente distribuidas las especies que pertenecen al género *Dunaliella* (10). La mayoría de estos microorganismos son halófilos moderados, con pocas especies capaces de crecer en

concentraciones de saturación de cloruro de sodio. En general, estos organismos sintetizan solutos compatibles para combatir el estrés osmótico del ambiente (10). También se han encontrado levaduras y hongos filamentosos en ambientes con elevadas concentraciones de sal y generalmente tienen un metabolismo aeróbico (10).

2.2. Objetivos

- Seleccionar sitios de muestreo en el Salar del Hombre Muerto
- Tomar muestras líquidas y de suelo de los sitios seleccionados
- Caracterizar desde el punto de vista fisicoquímico las muestras obtenidas
- Analizar la comunidad microbiana de las muestras obtenidas

2.3. Materiales y métodos

Se caracterizaron muestras del salar con respecto a su composición y propiedades físicas y además se estudió la comunidad microbiana que habita en suelos.

2.3.1. Selección del sitio y toma de muestras

El Salar del Hombre Muerto se localiza al sur de la Puna de Atacama (una altiplanicie compartida entre Chile y Argentina). Se encuentra en el límite entre Salta y Catamarca en el departamento de Antofagasta de la Sierra a 4.000 msnm y cuenta con una salmuera subterránea saturada de cloruro de sodio, y con concentraciones importantes de litio, potasio, sulfato y boro (14, 15, 16, 17). Además, tiene concentraciones bajas de rubidio, cesio y bromo. En general, el litio en el salar se encuentra en una concentración entre 500 y 800 ppm y es uno de los salares más importantes en cuanto a la producción de litio en el mundo, tal como fue descripto en el Capítulo 1. Las reservas llegan a 850.000 toneladas de litio, a una profundidad de 70 metros.

Por su importancia como reserva de litio y su ubicación, se eligió este salar para el estudio de muestras de aguas y suelos. Se tomaron dos muestras líquidas, una de una reserva de agua dulce en el Salar y otra de la salmuera propiamente dicha, en botellas plásticas limpias de un litro y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Por otra parte, se tomaron cuatro muestras de suelo siguiendo las indicaciones de las normas ISO (10381-1:2002), se colectaron en bolsas negras plásticas y se llevaron al laboratorio para su procesamiento. Las muestras (S) se nombraron con números (1 y 2) según el sitio y con letras (A y B) según la profundidad. Así, la muestra de suelo S1 corresponde a una zona alejada del Salar y la S2 al Salar propiamente dicho, separados entre sí por aproximadamente 2 km. En la Figura 2.3 se pueden ver las zonas de donde

fueron tomadas las muestras y en la Figura 2.4 se muestras las localizaciones de los puntos de muestreo en el Salar en un mapa.



Figura 2.3 Zonas de muestreo de suelo, sitios S1 (izquierda) y S2 (derecha) en el Salar del Hombre Muerto.



Figura 2.4 Localización de los puntos de muestreo de suelos en el Salar del Hombre Muerto, imagen tomada por Google Earth, acceso el 11 de Diciembre de 2018.

Además, en cada sitio se recolectaron muestras de suelo de dos profundidades: S1A correspondiente a la muestra superficial (0-10 cm de profundidad) y S1B a la más profunda (10-60 cm de profundidad en relación con la superficie del suelo) del sitio 1. Con respecto a las muestras tomadas en el salar, es importante destacar que en el sitio 2 los primeros 10 cm correspondieron a una costra de sal, por lo que se separó esta capa para tomar las muestras de suelo. No se realizaron análisis en la costra de sal superficial. En el sitio 2, S2A es la muestra de 10-30 cm de profundidad y S2B de 30-60 cm. En el laboratorio, cada una de las muestras de suelo fue dividida en dos fracciones,

una de las cuales se mantuvo sin ningún tratamiento adicional y la otra fracción se dejó secar a temperatura ambiente por 72 h, se molió utilizando un mortero y se pasó por tamiz de 2,0 mm. Luego, todas las muestras fueron preservadas a 4 °C hasta su uso. Las bolsas fueron tratadas de manera de asegurar su aireación, conservándose sin apilar.

2.3.2. Análisis fisicoquímico de las muestras

Se analizaron las muestras de suelo para determinar algunas de sus características fisicoquímicas más importantes, entre las que se destacan la textura (expresado como porcentaje de arena, limo y arcilla), capacidad hídrica de saturación, pH, conductividad eléctrica y una serie de iones solubles en el extracto de saturación, entre los que se incluyeron sodio, potasio, calcio y magnesio. Además, se determinaron carbono y materia orgánica, nitrógeno total, fósforo extractable, relación de adsorción de sodio, porcentaje de sodio intercambiable y cloruros solubles. La determinación de los parámetros descriptos se llevó a cabo en las instalaciones de INTA, Cerrillos, Salta.

Por otro lado, se analizó la composición química de las muestras líquidas, determinando la concentración de algunos elementos presentes, entre los que se incluyeron sodio, magnesio, potasio, litio, arsénico, boro, calcio, hierro, azufre, silicio, rubidio y estroncio. La determinación se realizó mediante espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) utilizando un espectrómetro Optima 4300 DV Perkin Elmer (Norwalk, EEUU). El pH y la conductividad eléctrica de las muestras líquidas se determinaron con un instrumento HANNA multiparámetro HI3512 y la turbidez y salinidad fueron medidos con un instrumento de sistema de monitoreo de calidad de agua (HORIBA, Japón). Los sólidos totales, suspendidos y disueltos se determinaron siguiendo el protocolo de Métodos Estándares para la Examinación de Aguas y Aguas Residuales (18).

2.3.3. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico de las muestras de suelos se extrajo con el kit de MoBio para suelos (PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation Kit). Se siguieron las instrucciones del fabricante, a excepción de una mínima modificación en la etapa de elución final. Brevemente, se pesaron 250 mg de suelo seco tamizado por malla de 2 mm (ASTM 10) y se colocaron en buffer de lisis preservado en refrigeración a 4 °C. Posteriormente, se homogenizaron con microesferas mecánicamente en el instrumento FastPrep 24® (MP Biomedicals) durante 45 s a 6 m/s y se procedió con las etapas de centrifugación (10.000 rpm) con diferentes buffers de limpieza durante 1 min cada uno. Finalmente, la elución se realizó por medio de dos lavados con 40 µl del buffer de elución estéril del

kit (10 mM Tris, pH 7,5- 8,5, libre de EDTA). Los extractos de ADN genómico se congelaron inmediatamente a -80 °C, hasta la síntesis del amplicón para posterior secuenciación. En el caso de algunas muestras en las cuales se observó una coloración remanente, se adicionó una etapa de limpieza con columnas del kit OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research) para purificar el ADN.

2.3.3.1. Control de calidad y cuantificación del ADN extraído

La cuantificación se realizó utilizando métodos espectrofotométricos y de fluorescencia. En el primer caso, se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (Thermo Scientific) para obtener el cociente de absorción 260/280, indicativo de la calidad del ADN extraído. Valores cercanos a 2,0 son indicativos de una pureza óptima y libres de contaminación con ARN y/o proteínas. En el segundo caso, el ADN se cuantificó fluorométricamente con Qubit 2.0 ® (Invitrogen), con el kit de alta sensibilidad (dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen, California); se prepararon los estándares correspondientes siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.4. Secuenciación del amplicon 16S RNAr

La secuenciación del amplicón del gen 16S se realizó mediante dos pasos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo los protocolos estandarizados del Earth Microbiome Project (http://www.earthmicrobiome.org/), con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Inicialmente, se amplificó la región hipervariable V4-V5 del gen 16S (515F-directo primer 5'-ID-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' y 926R-inverso primer 5'-ID-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'). Se eligió este par de primers, porque produce una menor sobreestimación de la clase Gammaproteobacteria, un taxón común en muestras marinas (19). Se corrieron controles negativos y positivos en cada tanda de amplificaciones por PCR. Se utilizaron 10 ng de ADN genómico extraído, 12,5 μL de la mezcla lista para usar KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems), 0,5 μM de cada primer y agua libre de nucleasa para completar 25 μL de volumen total de reacción. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 min, 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C por 40 s y 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 72 °C durante 5 min. Los productos de la PCR, por triplicado, se combinaron y purificaron usando microperlas magnéticas (Agencourt AMPure XP-PCR purification, Beckman Coultier). Posteriormente, mediante el uso de la plataforma Agilent 2200 TapeStation se verificó la calidad y tamaño de los productos purificados de la PCR. Estos amplicones se utilizaron para correr una segunda reacción de PCR para insertar

los marcadores duales específicos de Illumina y así poder usar la tecnología multiplex. Luego de la cuantificación de la librería, las muestras se secuenciaron usando el secuenciador MiSeq (Illumina, Inc.; San Diego, CA.) en el Singapore Centre for Environmental Life Sciences Engineering (SCELSE). El kit Miseq v3 se usó para producir *reads* (lecturas) con una longitud de 300 pares de bases.

2.3.5. Análisis bioinformático de los datos de la secuenciación

Las lecturas se recortaron con un umbral de Q20 y se removieron los primers y adaptadores con el software Cutadapt-1.9.1 (20). Se utilizó el programa *Paired-End read merger* (PEAR 0.9.8) (21) para combinar (unir) las lecturas. Se siguió el flujo de trabajo propuesto por la plataforma *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME 1.9.1) (22), usando *uchime* para la remoción de quimeras y el agrupamiento *de novo* OTU clustering con UCLUST (23) con un 3% de divergencia entre secuencias para el agrupamiento. La base de datos SILVA rRNA (24) se utilizó para la asignación de taxonomía. Se eliminaron las lecturas alineadas a Phi-X, cloroplasto y mitocondria, como así también singletons and doubletons. Se obtuvieron un total de 428.843 lecturas combinadas de alta calidad, con una longitud promedio de 380 pares de bases. La muestra S1A contó con 259.076 lecturas mientras que la muestra S1B obtuvo 169.767 lecturas. Con fines comparativos y para obtener el mismo nivel de cobertura y profundidad de secuenciación, ambas muestras se normalizaron a 169.767 lecturas para realizar el análisis de comunidad microbiana.

2.4. Resultados y discusión

El análisis de las muestras permitió determinar sus características y la estructura de la comunidad microbiana presente en los suelos.

2.4.1. Análisis fisicoquímico

La caracterización de las muestras de acuerdo a su composición permitió realizar comparaciones entre sitios diferentes y de acuerdo a su profundidad.

2.4.1.1. Caracterización de las muestras de suelo

El estudio de la composición de los suelos junto con sus características fisicoquímicas es muy importante ya que ellos representan ambientes muy variados y complejos. Los suelos analizados están compuestos principalmente de arena y con porcentajes variables de arcilla y limo (Tabla 2.1). La composición de los suelos está directamente relacionada con su capacidad de aireación y tiene un efecto directo sobre las comunidades bacterianas presentes (25).

Tabla 2.1 Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo provenientes de dos sitios (S1 y S2), a dos profundidades (A, muestra superficial y B muestra profunda), del Salar de Hombre Muerto.

	S1A	**S1B**	**S2A**	**S2B**
Profundidad (cm)	0-10	10-60	10-30	30-60
Arena (%)	73	92	44	60
Limo (%)	20	6	20	18
Arcilla (%)	7	2	36	22
Calificación textural	Franco arenoso	Arenoso	Franco arcilloso	Franco arenoso
Capacidad hídrica de saturación (%)	23	24	57	39
pH_{sa}[A]	8,1	8,4	8,5	8,8
pH_{ps}[A]	7,1	7,9	7,6	7,6
Conductividad eléctrica en extracto de saturación (ES) (dS/m)	182	22,8	398	332
Carbonato de Ca y Mg (Calcáreos) (%)	23	10,1	15,1	2,7
C orgánico (%)	0,28	0,19	1,55	1,12
Materia orgánica (%)	0,48	0,33	2,67	1,93
N total (%)	0,03	0,01	0,11	0,08
Relación C/N	9	19	14	14
P extractable (ppm)	4	<1	1	1
Na soluble en ES (meq/L)	1.480	145	4.200	3.700
K soluble en ES (meq/L)	82	15	300	200
Ca soluble en ES (meq/L)	382	67	172	172
Mg soluble en ES (meq/L)	80	10	78	98
Relación de adsorción de sodio (RAS)	97	23	376	318
Na intercambiable (PSI) (%)	59	25	85	82
Cl soluble en el ES (meq/L)	1.760	180	4.490	3.390

[A]pH_{sa}: pH en suspensión de agua
[A]pH_{ps}:pH en pasta saturada

Otra de las características importantes de los suelos es el valor de su pH. Existen diferentes formas de realizar esta medición, pero se conoce que la medición del pH en suspensiones de suelo-agua puede sobreestimar el valor real del pH del suelo cuando toma valores superiores a 6,6 (26). Al ser este el caso, los valores de pH que se tuvieron

en cuenta para realizar comparaciones y caracterizar las muestras fueron los de pasta saturada. El pH en suspensión de agua (pH_{sa}) de todas las muestras (suelo: agua: 1:2,5) mostró valores entre 8,1 y 8,8, mientras que el medido en pasta saturada (pH_{ps}) se midió entre 7,1 y 7,9 en todas las muestras de suelo.

En la muestra S1A se observó la presencia de cristales de sal, dando una coloración blanquecina a la superficie, contrariamente a lo observado para la S1B. En cuanto a la composición iónica de los suelos, en general los iones mayoritarios fueron en todas las muestras, el cloruro y el sodio. Las diferencias más grandes en cuanto a concentraciones de iones, valores de conductividad y porcentaje de materia orgánica se observaron entre los dos sitios de muestreo, lo que se justifica por las diferentes condiciones de los suelos en las dos localizaciones. En cuanto a los elementos presentes, la concentración de calcio y potasio en S1A fue alrededor de cinco veces mayor que en S1B, y para el magnesio la diferencia es ocho veces mayor en la muestra superficial (Tabla 2.1). Con respecto a S2, la concentración de iones es mucho más elevada en relación a S1 y esto se confirma con un valor mayor de conductividad. La presencia de precipitados blancos en las muestras indicó altas concentraciones de sales, que podrían ser de calcio, ya que también lograron detectarse carbonatos de calcio y magnesio.

En cuanto a los compuestos orgánicos presentes, la cantidad de carbono y materia orgánica fue mayoritaria en el S2, tanto en la muestra superficial como en la de profundidad. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Bischoff y col (2018) (27), que realizaron un estudio para determinar la manera en la que los componentes orgánicos del suelo variaban en relación con la salinidad del suelo. Ellos también encontraron un aumento en la cantidad de componentes orgánicos presentes en suelos con concentraciones de sales crecientes, contrario a lo que habían hipotetizado, ya que en general, en suelos salinos se observaron cantidades bajas de materia y carbono orgánicos (28, 29). En general, los suelos afectados por elevadas concentraciones de sales tienen potenciales osmóticos muy bajos, limitando el crecimiento de plantas, dando como resultado valores muy bajos de materia orgánica. Sin embargo, este resultado estaría ligado fuertemente al gradiente de humedad del suelo. Si este parámetro covaría con la salinidad, el estrés salino puede ser similar, permitiendo el crecimiento de plantas aún en presencia de elevadas concentraciones de sales, y por esta razón puede no detectarse una disminución en las mediciones de materia y carbono orgánicos en el suelo (27). Además, es necesario tener en cuenta la textura del suelo, ya que está ligada fuertemente a la capacidad del suelo de retener agua (30). En el caso de las muestras S2A y S2B, presentan porcentajes más altos de limo y arcilla que los

correspondientes a las muestras de S1. Al tener partículas más pequeñas, los suelos S2 tienen mayor capacidad para retener agua, por lo que ocurriría una situación similar a la descripta por Bischoff y col (2018) (27).

Con respecto a su clasificación, y teniendo en cuenta los parámetros fisicoquímicos determinados, los suelos toman distintas categorías. Para que un suelo sea considerado salino, la World Soil Resources Reports (WRB) ha fijado el valor mínimo de conductividad eléctrica en 15 dS/m (31), clasificación por la cual todos los suelos evaluados en este estudio entran en la categoría de "salinos". Sin embargo, el Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos ha fijado este valor mínimo en 30 dS/m, por lo que según este valor, tres de las cuatro muestras serían consideradas salinas en el presente estudio (S1A, S2A y S2B) (32). Por otro lado, el valor de sodio intercambiable (PSI) es también importante a la hora de clasificar los suelos. Suelos con valores mayores a 15% de PSI se consideran sódicos (26). Por lo tanto, las cuatro muestras estudiadas presentan características de suelos tanto salinos como sódicos (28).

2.4.1.2. Caracterización de las muestras líquidas

Se analizó la composición de la salmuera y de la muestra de agua dulce provenientes del Salar del Hombre Muerto (Tabla 2.2). El componente mayoritario en la composición de la salmuera es el sodio, característico de las salmueras en esta zona. En el Salar de Uyuni (Bolivia) se han encontrado concentraciones similares de sodio a las del Salar del Hombre Muerto; sin embargo, la diferencia principal se encuentra en la concentración de magnesio, que está presente en el salar boliviano hasta en un factor de más de 30 veces en comparación con la del Hombre Muerto (33). El potasio de las salmueras del Salar del Hombre Muerto es potencialmente aprovechable para la extracción, ya que se encuentra en concentración elevada y su obtención sería favorecida por las características ambientales del salar (16).

Tabla 2.2 Composición de las muestras líquidas de la reserva de agua dulce y de la salmuera del Salar del Hombre Muerto por ICP-AES.

Elementos (ppm)	Salmuera	Agua dulce
Na	98.055,00	30,97
K	8.153,00	3,12
S	3.393,50	11,73
Mg	1.062,50	3,49
Li	773	0,44
Ca	566,5	23,18
B	447,5	0,64
Rb	39,2	N/A
Sr	16	N/A
Si	5,5	16,48
As	1,8	1,38
Fe	0,5	N/D

N/A No analizado
N/D No detectado

Con respecto a la concentración de litio, este salar se encuentra entre los que presentan mayores concentraciones a nivel mundial (16) con valores comparables a salares de Bolivia y China. Esta característica es la base de su importancia económica e industrial. En la muestra analizada también se ha detectado una concentración elevada de boro, mayor a la informada en análisis previos (34, 35) y similares a los del Salar de Uyuni (33).

En la salmuera se midió un pH de 7,2 con una conductividad 256,0 mS/cm. La determinación de sólidos disueltos dio 276,9 g/L, prácticamente sin sólidos suspendidos, lo que concordó con la turbidez por debajo del punto de detección del equipo utilizado.

Las mediciones de la muestra de reserva de agua dulce dieron valores de pH de 7,52, conductividad eléctrica de 0,305 mS/cm y un porcentaje de salinidad de 0,01. Como puede verse claramente, los datos de salinidad y conductividad eléctrica son característicos de una muestra con baja concentración de iones. En esta muestra no se encontraron valores elevados de ninguno de los elementos analizados, verificando que ambas fuentes se encuentran aisladas una de la otra.

2.4.2. Análisis de la comunidad microbiana

La comunidad microbiana se analizó a través de herramientas de secuenciación masiva.

2.4.2.1. Extracción de ADN de las muestras líquidas y de suelos

La extracción de ADN se llevó a cabo en todas las muestras estudiadas, sin embargo, la presencia de concentraciones muy altas de sales, de cantidades bajas de microorganismos y dificultades en el procesamiento de las muestras en los procedimientos de extracción llevaron a obtener cantidades muy bajas de ADN.

Finalmente se seleccionó la muestra de suelo S1 para la caracterización de la comunidad microbiana. A partir de las muestras correspondientes a las dos profundidades en este punto se obtuvieron cantidades suficientes de ADN con las que se llevó a cabo el análisis.

En general, la proporción detectada de organismos pertenecientes al dominio Bacteria fue muy alta con respecto a la del dominio Archaea, probablemente debido a que el proceso de extracción de ADN le fue más favorable. Cabe destacar que el kit utilizado para la extracción de ADN fue seleccionado por sus particularidades específicas para suelo, lo que permite la detección de la mayor cantidad de microorganismos presentes en este tipo de muestras. Sin embargo, se ha informado que la caracterización de las comunidades utilizando diferentes kits puede llevar a la obtención de resultados diferentes, por lo que es necesario tener en cuenta todos los elementos utilizados para la descripción de la comunidad (36).

2.4.2.2. Microorganismos del dominio Archaea en muestras de suelo del Salar del Hombre Muerto

En las dos muestras de suelo del sitio 1 se encontraron Archaeas. En S1A (0-10 cm) la proporción fue del 3% del total de microorganismos detectados, mientras que fue de sólo 0,78% para S1B (10-60 cm). Es decir, se encontró una mayor proporción de Archaeas en la porción de suelo superficial, que contiene salinidad más elevada y que está directamente expuesta a condiciones ambientales más extremas.

En cuanto a los filos encontrados en las dos muestras, el más abundante fue Euryarchaeota, con un 67% de abundancia relativa (Figura 2.5), seguido por Thaumarchaeota. En el primer filo se encontraron organismos del género *Halolamina*, en mayor abundancia relativa, conocidos por estar distribuidos en una gran variedad de

ambientes salinos (37). En general, los microorganismos del filo Euryarchaeota se encontraron en mayor abundancia relativa en la muestra de suelo superficial (2,328 % en S1A en comparación a 0,106 % detectados en S1B), ya que al tener concentraciones más elevadas de sales favorecen la proliferación de arqueas halófilas (datos no mostrados).

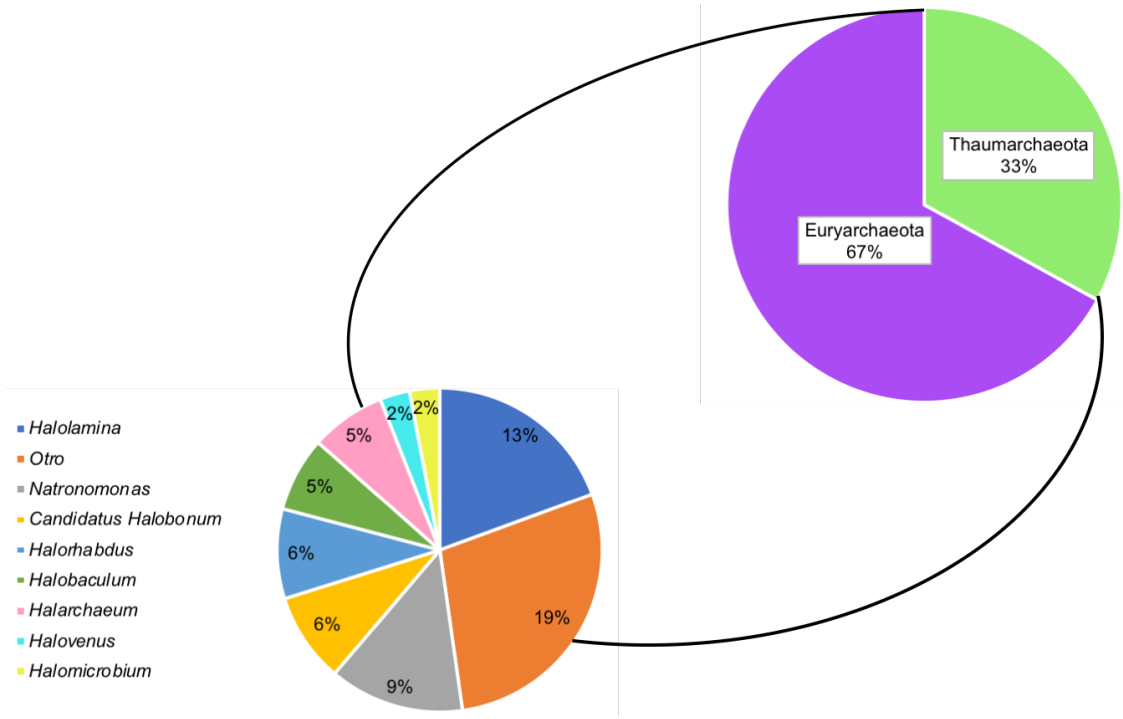


Figura 2.5 Distribución de arqueas de acuerdo con su filo en las muestras de suelo del Salar del Hombre Muerto. Se indica además la abundancia relativa de los géneros detectados en el filo Euryarchaeota.

Miembros del filo Thaumarchaeota se detectaron en suelos, ambientes marinos, sedimentos y pantanos y son abundantes en muestras salinas (38). Los microorganismos incluidos en este filo son heterótrofos, algunos tienen la capacidad de fijar carbono y podrían participar en procesos de nitrificación, ya que se encontraron en ellos genes involucrados en la oxidación del amonio (38).

Además, en S1 se encontraron organismos pertenecientes a los géneros *Natronomonas, Candidatus Halobonum, Halobaculum, Halarchaeum*, todos pertenecientes al filo Euryarchaeota. Además de participar en procesos involucrados en el ciclo geoquímico del nitrógeno, algunos de ellos han sido descriptos como solubilizadores de fosfato, por lo que participarían en ambos ciclos (39). Estos microorganismos han sido caracterizados como productores de ácidos orgánicos, por lo

que la solubilización de fosfatos ocurriría mediante el mecanismo de disminución del pH mediante la síntesis de ácido glucónico, cítrico, fórmico y/o fumárico, por ejemplo, por mencionar algunos (39). Esta función de las arqueas halófilas puede ser fundamental en ambientes hipersalinos para promover el crecimiento vegetal mediante solubilización de fosfatos y fijación de nitrógeno.

2.4.2.3. Bacterias en las muestras de suelo a niveles taxonómicos de filo y clase

En las muestras estudiadas se observó una mayor proporción de microorganismos pertenecientes al filo Actinobacteria (Figura 2.6). Con una abundancia relativa de alrededor de 34-35%, fueron los microorganismos con mayor representación en las muestras estudiadas. Otros filos detectados fueron Proteobacteria, Chloroflexi y Acidobacteria; sin embargo, las abundancias son diferentes a las encontradas en otros suelos salinos, que tuvieron predominancia de Proteobacteria, seguido por Acidobacteria y Actinobacteria (25).

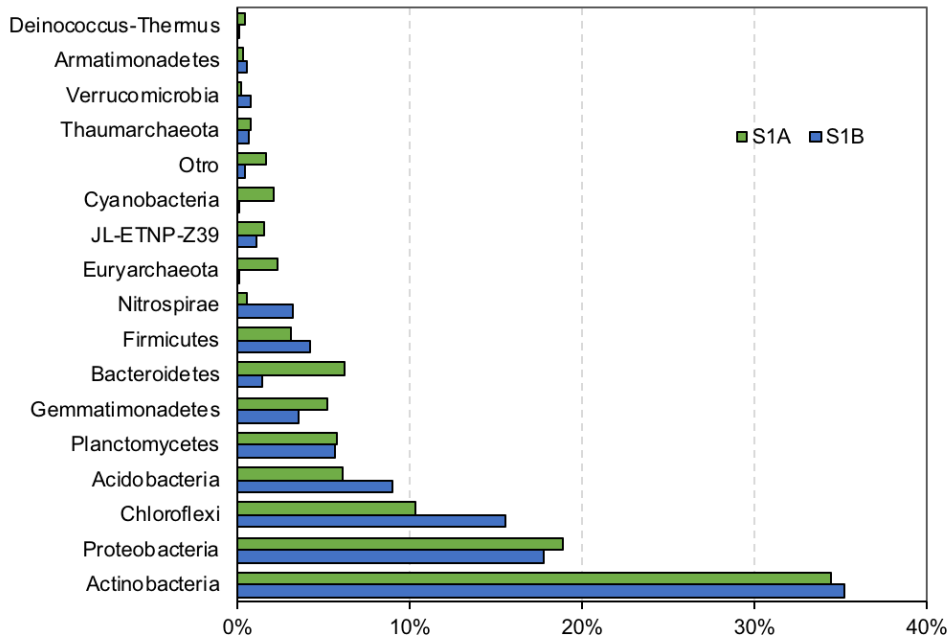


Figura 2.6 Abundancia relativa (%) de microorganismos de acuerdo a su filo en las muestras de suelo S1A (sitio 1, 0-10 cm de profundidad) y S1B (sitio 1, 10-60 cm de profundidad) del Salar del Hombre Muerto. Se tomaron abundancias relativas superiores al 1%.

En un estudio realizado sobre nueve muestras de suelos salinos superficiales en Italia (Sicilia), los taxones dominantes fueron Proteobacteria (95,95%), Actinobacteria (85,39%), Acidobacteria (72,12%), Verrucomicrobia (70,60%) y Firmicutes (64,14%) (32). Además, se encontraron en menor cantidad, pero distribuidos en todas las muestras a ejemplares de Bacteroidetes, Chloroflexi y Chlorobi. La distribución relativa

de los grupos de bacterias varía de acuerdo al sitio y al grado de salinidad del suelo en el que se realizó el análisis. Ellos encontraron un grupo de filos distribuidos de manera uniforme y que estarían relacionados a suelos salinos o hipersalinos. Así, agruparon a los filos Acidobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria y Bacteroidetes como característicos de ambientes salinos. Todos estos filos también se detectaron en S1. Este grupo de filos también se encontró como dominante en dos ambientes salinos de Polonia, uno naturalmente salino y el otro con salinidad antropogénica (40). Sin embargo, en esa investigación se encontró que el filo Proteobacteria era el más abundante (alrededor del 9%) en ambos sitios, mientras que en el presente caso solo se encontraron en mayor proporción en S1A (18 %), que contiene concentraciones de sal más altas. Cabe destacar que, en cuanto a las características fisicoquímicas de las muestras, las estudiadas por Szymańska y col (2018) (40) tienen concentración de sodio similar a S1A, reafirmando que estos microorganismos son los que mejor prevalecen en ambientes salinos.

En cuanto a las diferencias encontradas entre la muestra superficial (0-10 cm) y la de profundidad (10-60 cm), en los filos Actinobacteria y Proteobacteria el porcentaje de los organismos encontrados fue muy similar (alrededor del 34% para Actinobacteria y 18% para Proteobacteria en ambas muestras). Las diferencias fueron más acentuadas con respecto a los filos Chloroflexi y Acidobacteria, encontrándose representados en mayor proporción en la muestra entre 10 y 60 cm de profundidad (S1B). Microorganismos pertenecientes al filo Chloroflexi han sido aislados de muchos ambientes, entre los que se encuentran sedimentos marinos y de agua dulce (41). Estos organismos tienen una gran diversidad metabólica, incluyendo fotoautrótofos y fermentadores, además de ejemplares que son capaces de utilizar compuestos organohalogenados. Al ser capaces de tener un metabolismo anaeróbico, se puede comprender que se encuentren en mayor proporción en las capas más profundas del suelo, donde es más difícil acceder al oxígeno. Además, Seuradge y col (2017) (42) encontraron una relación directa entre la abundancia de Chloroflexi y Nitrospirae (entre otros) con la profundidad del suelo, tal como se encontró en este estudio, donde el porcentaje de Nitrospirae fue de alrededor de 5 veces mayor en S1B que en S1A.

Con respecto a las Acidobacteria, su estudio ha permitido determinar que tienen la potencialidad de reducir nitratos y nitritos, además de reducir hierro (43). Las bacterias de este filo pueden ser aerobias o microaerófilas y también hay organismos anaeróbicos facultativos. Esta variedad de capacidades metabólicas puede explicar que estén presentes en las dos muestras de suelo a distintas profundidades, con la posibilidad de que realicen diferentes tipos de metabolismo en ambas muestras (43).

Chen y col (2017) (44) estudiaron variaciones en la actividad metabólica y en la estructura de comunidades microbianas en suelo utilizando agua de riego con concentraciones de sales crecientes. Comparando las comunidades desarrolladas en un período de 5 meses con exposición a distintas salinidades, ellos pudieron determinar que la riqueza del suelo fue mayor en suelos con mayor salinidad y que además en estos casos la diversidad microbiana fue menor. Tres filos se encontraron en mayor proporción como consecuencia del riego con agua con elevada salinidad (Proteobacteria, Actinobacteria y Chloroflexi), dos en abundancias menores (Planctomycetes, Bacteroidetes) y dos no sufrieron modificaciones (Gemmatimonadetes y Acidocabteria). Finalmente, es interesante mencionar que la composición de la comunidad microbiana de las muestras después del riego con concentraciones elevadas de sales presentó los mismos filos mayoritarios que en el análisis realizado en las muestras del presente trabajo, verificando que esos microorganismos son los que prevalecen en muestras con alta salinidad.

Los microorganismos pertenecientes al filo Gemmatimonadetes son conocidos por estar adaptados a condiciones de baja humedad (42), condición que en este caso se encontró en S1A. Además, en esta muestra se detectó una mayor abundancia relativa de microorganismos del filo Cyanobacteria, que participan en procesos de fotosíntesis oxigénica, lo que explica que estén prácticamente sólo en la muestra superficial, con mayor exposición a la luz solar y al oxígeno atmosférico.

Teniendo en cuenta la abundancia de clases (Figura 2.7) se acentúan las diferencias entre S1A y S1B. La clase Alphaproteobacteria se encontró en ambas muestras en mayor proporción (entre 10 y 12%), y teniendo en cuenta el resto de las Proteobacterias secuenciadas, la segunda clase en abundancia fue la Gammaproteobacteria, en un porcentaje similar al de la Deltaproteobacteria (alrededor del 3%) y finalmente y en un porcentaje de abundancia relativa muy bajo (alrededor del 1%) se encontraron las Betaproteobacterias.

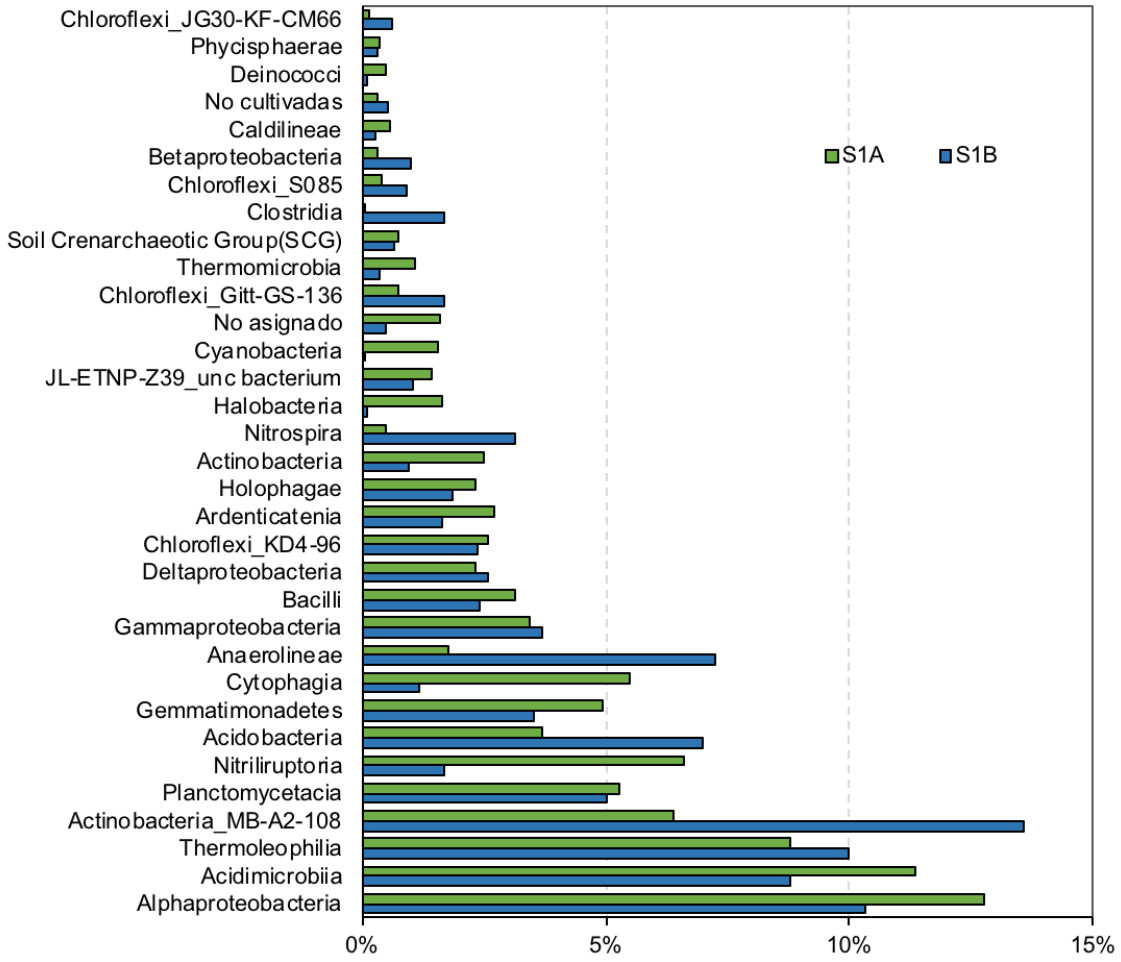


Figura 2.7 Abundancia relativa (%) de microorganismos de acuerdo con su clase en las muestras de suelo S1A (sitio 1, 0-10 cm de profundidad) y S1B (sitio 1, 10-60 cm de profundidad) del Salar del Hombre Muerto. Se tomaron abundancias relativas superiores al 1 %.

Con respecto a la clase Acidimicrobiia, se observó una disminución en el porcentaje de organismos en S1B. Iwaoka y col (2017) (45) estudiaron los impactos en la fertilidad y salinidad del suelo mediados por comunidades microbianas y establecieron una relación negativa entre el aumento del pH del suelo con el porcentaje de Acidimicrobiia encontrado en el sitio. En este caso ocurre la misma situación, ya que la muestra S1A tiene un pH cercano a 7, la S1B a 8 y en la primera se observa mayor porcentaje de Acidimicrobiia.

La presencia de microorganismos de la clase Actinobacteria MB-A2-108 está directamente relacionada tanto a la profundidad de la muestra de suelo como a su pH, e inversamente relacionada al carbono total presente (42). Esto permite entender la mayor abundancia de organismos de esta clase en S1B con respecto a S1A (13,5% vs 5%).

2.5. Conclusiones

Independientemente de su profundidad, las muestras de suelos mostraron una elevada proporción de iones sodio y cloruro y junto con el análisis de otros parámetros medidos, fueron clasificados como suelos salino-sódicos.

Con respecto al análisis de las muestras líquidas, la de agua dulce mostró bajas concentraciones de iones, mayor turbidez y pH neutro. En el caso de la salmuera, su composición es característica de salmueras talasohalinas, resaltando la elevada concentración de sodio pero principalmente destacando la concentración de litio presente, razón de la importancia económica del salar a nivel mundial.

Las comunidades microbianas de las muestras de suelo del sitio 1 presentaron algunas diferencias entre las dos profundidades analizadas. En la muestra superficial se encontraron microorganismos capaces de fotosintetizar y realizar un metabolismo aeróbico, mientras que en la de profundidad se encontraron microorganismos que pueden realizar respiración anaeróbica. La composición de las comunidades no sólo está ligada a las características fisicoquímicas del suelo y a la profundidad de donde fueron tomadas las muestras, sino que sobre todo está muy relacionada a la concentración de sales presentes.

2.6. Referencias

1. Dumorne K, Córdova DC, Astorga-ElóM, RenganathanP. 2017. Extremozymes: a potential source for industrial applications. J Microbiol Biotechnol 27(4):649-659.
2. Chen GQ, Jiang XR. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. Curr Opin Biotechnol 50:94-100.
3. Wang J, Salem DR, Sani RK. 2019. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. Carbohydr Polym 205:8-26.
4. Medrano-Santillana M, Souza-Brito EM, Duran R, Gutierrez-Corona F, Reyna-López GE. 2017. Bacterial diversity in fumarole environments of the Paricutín volcano, Michoacán (Mexico). Extremophiles 21(3):499-511.
5. Bendia AG, Araujo GG, Pulschen AA, Contro B, Duarte RT, Rodrigues F, Galante D, Pellizari VH. 2018. Surviving in hot and cold: psychrophiles and thermophiles from Deception Island volcano, Antarctica. Extremophiles 22(6):917-929.
6. Singh P, Jain K, Desai C, Tiwari O, Madamwar D. 2019. Microbial Community Dynamics of Extremophiles/Extreme Environment, p 323-332. *In* Das S, Dash HR

(ed), Microbial Diversity in the Genomic Era, Academic Press, Elsevier, Amsterdam.

7. Wong VN, Greene RSB, Dalal RC, Murphy BW.2010. Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: a review. Soil Use Manage 26(1):2-11.
8. Safarpour A, Amoozegar MA, Ventosa A. 2018. Hypersaline Environments of Iran: Prokaryotic Biodiversity and Their Potentials in Microbial Biotechnology, p 265-298. *In* D. Egamberdieva, Birkeland NK, Panosyan H, Li WJ (ed), Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications, vol 8. Springer, Singapore.
9. Oren A. 2006. Life at high salt concentrations, *In*: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt, E. (eds), The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. 3rd ed. Springer, Verlag, New York.
10. DasSarma S, DasSarma P. 2017. Halophiles. *In*: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub4
11. Oren A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. Saline Syst 4(2):1-13.
12. Biswas J, Paul AK. 2017. Diversity and Production of Extracellular Polysaccharide by Halophilic Microorganisms. Biodiversity Int J 1(2):1-9.
13. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Oren A. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiol Rev 42:353–375.
14. Vinante D, Alonso RN. 2006. Evapofacies del Salar del Hombre Muerto, Puna Argentina: Distribución y génesis. Rev Asoc Geol Argent 61 (2):286-297.
15. Kesler SE, Gruber PW, Medina PA, Keoleian GA, Everson MP, Wallington TJ. 2012. Global lithium resources: Relative importance of pegmatite, brine and other deposits. Ore Geol Rev 48:55-69.
16. Bastrakov EN, Clarke JDA, de Caritat P, English PM, Howard FJF, Jaireth S, Magee JW, McPherson AA, Roach IC, Schroder IF, Thomas M, Wilford JR. 2013. A review of Australian salt lakes and assessment of their potential for strategic resources *In* Mernagh TP. (ed) Record 2013/39. Geoscience Australia: Canberra.
17. Flexer V, Baspineiro CF, Galli CI. 2018. Lithium recovery from brines: A vital raw material for green energies with a potential environmental impact in its mining and processing. Sci Total Environ 639:1188-1204.

18. Eaton AD. American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation. 2005. *In* Standard Methods for the examination of water and wastewaters, 21th Ed, Washington, DC.
19. Parada AE, Needham DM, Fuhrman JA. 2016. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. Environ Microbiol 18(5):1403-1414.
20. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. journal 17(1):10-12.
21. Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics 30(5):614-620.
22. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Gonzalez Peña A, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods 7:335-336.
23. Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26(19):2460-2461.
24. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res 41(D1):D590-D596.
25. Menéndez-Serra M, Triadó-Margarit X, Castañeda C, Herrero J, Casamayor EO. 2019. Microbial composition, potential functional roles and genetic novelty in gypsum-rich and hypersaline soils of Monegros and Gallocanta (Spain). Sci Total Environ 650:343-353.
26. Abrol P, Yadav JSP, Massoud FI. 1988. Salt-Affected Soils and their Management. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). http://www.fao.org/3/x5871e/x5871e00.htm Fecha de último acceso: 14 de Diciembre de 2018.
27. Bischoff N, Mikutta R, Shibistova O, Dohrmann R, Herdtle D, Gerhard L, Fritzsche F, Puzanov A, Silanteva M, Grebennikova A, Guggenberger G. 2018. Organic matter dynamics along a salinity gradient in Siberian steppe soils. Biogeosciences 15(1):13-29.

28. Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. ISWCR 3(4):316-323.
29. Wong VNL, Greene RSB, Dalal RC, Murphy BW. 2010. Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: a review. Soil Use Manag 26(1):2-11.
30. Angella G, Frías C, Salgado R. 2016. Conceptos básicos de las relaciones agua-suelo-planta. INTA ed. ISSN N° 1850-4086, Estación Experimental Agropecuaria Santiago del Estero.
31. IUSS Working Group WRB. 2007. World Reference Base for Soil Resources 2006, first update. World Soil Resources Reports No. 103. FAO, Rome.
32. Canfora L, Bacci G, Pinzari F, Lo Papa G, Dazzi C, Benedetti A. 2014. Salinity and Bacterial Diversity: To What Extent Does the Concentration of Salt Affect the Bacterial Community in a Saline Soil? PLoS ONE 9(9):e106662. doi:10.1371/journal.pone.0106662
33. Haferburg G, Gröning JA, Schmidt N, Kummer NA, Erquicia JC, Schlömann M. 2017. Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia. Microbiol Res 199:19-28.
34. Kistler RB, Helvaci C. 1994. Boron and borates, p 171-186. *In*: Carr, D.D. (ed), Industrial Minerals and Rocks. 6th Edition, Society for Mining, Metallurgy and Exploration Inc., Littleton, Colorado.
35. Garrett DE. 1998. Borates: handbook of deposits, processing, properties, and use, , p 1-483, 1st ed. Academic Press, San Diego, California.
36. Hallmaier-Wacker LK, Lueert S, Roos C, Knauf S. 2018. The impact of storage buffer, DNA extraction method, and polymerase on microbial analysis. Sci Rep 8(1):6292.
37. Cha IT, Yim KJ, Song HS, Lee HW, Hyun DW, Kim KN, Choi JS, Kim DK, Lee SJ, Seo MJ, Choi HJ, Bae JW, Rhee SK, Roh, SW, Nam YD. 2014. *Halolamina rubra* sp. nov., a haloarchaeon isolated from non-purified solar salt. Antonie van Leeuwenhoek 105(5):907-914.
38. Seyler LM, Mc Guinness LM, Kerkhof LJ. 2014. Crenarchaeal heterotrophy in salt marsh sediments. ISME J8(7):1534.
39. Yadav AN, Sharma D, Gulati S, Singh S, Dey R, Pal KK, Kaushik R, Saxena, AK. 2015. Haloarchaea endowed with phosphorus solubilization attribute implicated in phosphorus cycle. Sci Rep 5:12293.
40. Szymańska S, Borruso L, Brusetti L, Hulisz P, Furtado B, Hrynkiewicz K. 2018. Bacterial microbiome of root-associated endophytes of *Salicornia europaea* in

correspondence to different levels of salinity. Environ Sci Pollut Res 25:25420 https://doi.org/10.1007/s11356-018-2530-0

41. Hug LA, Castelle CJ, Wrighton KC, Thomas BC, Sharon I, Frischkorn KR, Williams KH, Tringe SG, Banfield JF. 2013. Community genomic analyses constrain the distribution of metabolic traits across the *Chloroflexi* phylum and indicate roles in sediment carbon cycling. Microbiome 1(1):22.
42. Seuradge BJ, Oelbermann M, Neufeld JD. 2017. Depth-dependent influence of different land-use systems on bacterial biogeography. FEMS Microbiol Ecol 93(2).
43. Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA, Kuramae EE. 2016. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. Front Microbiol 7:744. doi: 10.3389/fmicb.2016.00744
44. Chen L, Li C, Feng Q, Wei Y, Zheng H, Zhao Y, Feng Y, Li H. 2017. Shifts in soil microbial metabolic activities and community structures along a salinity gradient of irrigation water in a typical arid region of China. Sci Total Environ 598, 64-70.
45. Iwaoka C, Imada S, Taniguchi T, Du S, Yamanaka N, Tateno R. 2018. The impacts of soil fertility and salinity on soil nitrogen dynamics mediated by the soil microbial community beneath the halophytic shrub tamarisk. Microb Ecol 75(4):985-996.

Capítulo 3: Aislamiento y caracterización de microorganismos tolerantes a litio del Salar del Hombre Muerto

3.1. Introducción

Como se expuso en el Capítulo 2, los microorganismos presentes en ambientes extremos han desarrollado capacidades que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales hostiles. Unos de los ambientes extremos más estudiados son los hipersalinos, que toman esa clasificación cuando la concentración de sal supera 3,5 % (p/v) (1). Los microorganismos capaces de sobrevivir en estos ambientes se clasifican de acuerdo con su capacidad de tolerar o al grado de requerimiento de sales para su crecimiento. Aquellos capaces de crecer en ambientes sin sal pero que también proliferan en ambientes salinos se denominan halotolerantes. Si, en cambio, necesitan sal para proliferar, son halófilos y de acuerdo con la cantidad requerida pueden ser halófilos leves (1-5% (p/v) de NaCl), moderados (5-20% (p/v) de NaCl) o extremos (20-30% (p/v) de NaCl) (2).

Los mecanismos mejor conocidos mediante los cuales los microorganismos pueden proliferar en ambientes con concentraciones altas de solutos son el *salt-in* y *salt-out.* Estos permiten mantener una elevada presión osmótica dentro de la célula mediante la acumulación de sales inorgánicas (KCl) y solutos orgánicos, respectivamente. Las adaptaciones a ambientes hipersalinos en general no son suficientes si el ambiente bajo estudio sufre variaciones, en cuyo caso es también importante la capacidad de adaptación al cambio. Los organismos que utilizan el mecanismo *salt-out* tienen mayor capacidad de adaptación a disminuciones de salinidad en los ambientes (2, 3).

Muchos de los ambientes hipersalinos se encuentran en zonas con exposiciones elevadas a la radiación solar y grandes amplitudes térmicas. Por esto, en algunos

casos un microorganismo adaptado a sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de sales también puede soportar temperaturas de crecimiento muy bajas (ser psicrófilo) (por ej. *Halobacterium* sp. DL1) o valores de pH altos (*Natronomonas pharaonis*) (2).

3.1.1. Potenciales aplicaciones biotecnológicas

Como estrategias de supervivencia, los microorganismos han desarrollado distintas capacidades. Entre ellas se encuentran sintetizar sustancias extracelulares, generar compuestos que absorban radiaciones perjudiciales en sus membranas y modificar la relación con las sales presentes en el medio ambiente para poder mantener el balance osmótico y evitar su lisis (4, 5, 6). Estas capacidades son muy atractivas desde el punto de vista biotecnológico.

Las propiedades de Archaea y de Bacteria de producción de sustancias extracelulares, enzimas, osmoprotectores, formación de biofilms, síntesis de carotenoides, por mencionar algunos, son de gran importancia para su aplicación en procesos a gran escala. Las ventajas que representan estos compuestos en comparación a otros similares producidos por organismos no halófilos, es que poseen y mantienen su actividad en condiciones de baja actividad de agua, permitiendo utilizarse en procesos biotecnológicos bajo esas condiciones. En este capítulo se hace hincapié en la capacidad microbiana de síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés -*exopolymeric substances*-) y de formación de pigmentos, ya que son las propiedades que se evaluaron en los microorganismos bajo estudio.

3.1.1.1. Síntesis de EPS

Los EPS producidos por las bacterias pueden estar relacionados a la capacidad de desarrollar biofilms, los cuales participan en las funciones de adhesión y de colonización de superficies. El biofilm formado también debe permitir el intercambio de nutrientes con el ambiente, razón por la cual su composición es muy importante (7).

La composición de las sustancias producidas puede variar tanto dependiendo del microorganismo como de los nutrientes disponibles y de las condiciones ambientales bajo las que está creciendo (8).

Los microorganismos halófilos tienen la capacidad de excretar sustancias exopoliméricas, formadas por compuestos carbonados, proteínas y que presentan elevada viscosidad, resistencia a salinidad, temperatura y pH extremos (8). Es la

capacidad de mantener sus propiedades en esas condiciones la que los hace interesantes para su aplicación en las industrias farmacéutica, en biomedicina y en la industria alimenticia.

3.1.1.2. Síntesis de pigmentos

Los carotenoides se encuentran entre los pigmentos más abundantes en la naturaleza y presentan características antioxidantes, son fuentes de vitamina y pueden utilizarse como colorante de alimentos (5, 6). Dichas propiedades han tomado gran importancia por las aplicaciones biotecnológicas que pueden tener en diversas industrias, principalmente en la alimenticia (9). Químicamente, estos compuestos son isoprenoides lipofílicos que toman distintas coloraciones entre amarillo, anaranjado y rojo.

Una gran variedad de microorganismos tiene la capacidad de producir carotenoides como un mecanismo de defensa frente a condiciones de exposición a la radiación. Los microorganismos que habitan ambientes marinos han desarrollado mecanismos protectores que incluyen la síntesis de estos compuestos que en general cumplen un rol biológico muy importante. Algunos de los carotenoides producidos por bacterias y arqueas en ambientes marinos son β-caroteno, astaxantina, salinixantina, bacterioruberina y saproxantina (10, 11). Estos compuestos tienen actividades antioxidante, anticáncer, antiinflamatoria, antidiabetes y antitumorales, entre otras (12, 13).

Los carotenoides son necesarios para estimular los sistemas de fotorreparación de dímeros de timina originados por la exposición a radiación ultravioleta. Los más abundantes en las Archaeas son las bacterioruberinas de C50 y en menores cantidades se encuentran el β-caroteno y licopeno (2). En el caso de las haloarqueas también se ha observado la síntesis de retinal (14).

En cuanto a la síntesis de carotenoides en bacterias, destacan el β-caroteno, licopeno, zeaxantina, astaxantina y luteína. Asker (2017) (11) ha encontrado que es necesario optimizar la concentración de sales para la producción, ya que tanto el medio de cultivo, como la agitación y el tiempo del cultivo tienen un efecto importante sobre el crecimiento celular y la producción de carotenoides.

En general, los microorganismos capaces de proliferar en ambientes hipersalinos son ventajosos como fuentes de carotenoides porque generalmente tienen requerimientos nutricionales bajos para el crecimiento. Esto hace que la producción de carotenoides utilizando microorganismos halófilos, presente más ventajas que la

producción utilizando microorganismos no halófilos, ya que la elevada salinidad de los medios de cultivo inhibe el crecimiento de otros microorganismos y favorece la proliferación de los de interés (10). Además, son fuente de carotenoides raros; a modo de ejemplo se encuentran las bacterioruberinas, sintetizadas por arqueas.

3.2. Objetivos

- Detectar la presencia de microorganismos en las muestras líquidas mediante técnicas de microscopía
- Aislar y caracterizar microorganismos a partir de muestras líquidas y de suelos del Salar del Hombre Muerto
- Evaluar la tolerancia al litio de los aislamientos obtenidos
- Identificar y caracterizar los aislamientos bacterianos mediante metodologías de biología molecular

3.3. Materiales y métodos

Las muestras del Salar se utilizaron para detectar la presencia, aislar y caracterizar microorganismos adaptados a ese ambiente.

3.3.1. Observación microscópica

Para la observación mediante técnicas de microscopía, óptica y electrónica de barrido, se utilizaron las muestras líquidas (salmuera y agua dulce, respectivamente).

La observación de la muestra de salmuera mediante microscopio óptico (Arcano, XSZ 107) fue realizada en fresco, colocando una alícuota de la muestra en porta objeto y observando con un aumento de 100X.

En el caso de la observación por microscopía electrónica, una alícuota de la muestra de agua dulce se filtró (Millipore Sigma SLGSV255F Millex® GS Sterile Vented Syringe Filter y membranas de acetato de celulosa estériles con tamaño de poro 0,22 μm). Estas se observaron a través del microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés - *Scanning Electron Microscope*-) (Zeiss, EVO LS 15). La muestra se llevó posteriormente al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido (LASEM), del Instituto de Investigaciones para la Industria Química, Universidad Nacional de Salta, Argentina, donde se llevaron a cabo los puntos críticos, metalizados y observación.

3.3.2. Aislamiento de microorganismos

Se emplearon distintos medios de cultivo para el aislamiento de microorganismos (Tabla 3.1). El aislamiento de bacterias se realizó en *Yeast Peptone Dextrose* (Levadura peptona dextrosa - YPD), YPD suplementado con salmuera (YDPsal), *Agar Plate Count* (Agar para el recuento en placa - APC) y APC suplementado con salmuera (APCsal), mientras que para el aislamiento de hongos se utilizaron YPD, YPDsal, Agar Sabouraud (Sab) y Agar Sabouraud suplementado con salmuera (Sabsal). La salmuera agregada (Tabla 3.1) fue la proveniente del Salar del Hombre Muerto (caracterizada en el Capítulo 2). Se la adicionó a los medios correspondientes y se esterilizaron en autoclave. La incubación se realizó a 24 °C hasta observar crecimiento y en el caso de los medios líquidos, se agitó a 150 rpm.

Tabla 3.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y la selección de microorganismos de muestras líquidas y de suelos del Salar del Hombre Muerto.

Componente	APC[A]	YPD[A]	CN[A]	Sab[A]
Glucosa (g/L)	1	20	-	40
Extracto de levadura (g/L)	2,5	10	-	-
Peptona (g/L)	5	20	5[C]	10[C]
Extracto de carne (g/L)	-	-	3	-
Salmuera (%) (v/v)	12,5[B]	33,3 [B]	2,5 [B]	12,5 [B]
Agar (g/L)	15	-	-	15

[A] APC: Agar Plate Count, Agar para el recuento en placa, YPD: Yeast Peptone Dextrose, levadura, peptona dextrosa; CN: Caldo Nutritivo; Sab: medio de cultivo Sabouraud, específico para el crecimiento de hongos.

[B] Sólo para medios de cultivo con sal (APCSal, YPDsal, CNsal y Sabsal, respectivamente). La composición química de la salmuera utilizada fue descripta en el Capítulo 2, sección 2.4.1.2.

[C] Se adicionó pluripeptona el lugar de peptona.

Una vez obtenidos los aislamientos bacterianos y asegurada su pureza, se sembraron en 20 mL de CNsal (caldo nutritivo suplementado con salmuera) en frascos de 100 mL y se cultivaron durante 24 h en agitación orbital a 150 rpm y 30 °C. Se cosecharon las células por centrifugación a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga Eppendorf 5415R), se resuspendieron en 2 mL de CNsal fresco y se almacenaron en glicerol a -20 y -80 °C por duplicado hasta su uso.

Para el enriquecimiento de microorganismos de las muestras líquidas, se agregaron 5 mL a 20 mL de medio de cultivo rico (YPD e YPDsal, Tabla 3.1) en Erlenmeyer de 100 mL y se incubó a 30 °C y 150 rpm hasta observar crecimiento. Alícuotas provenientes de los cultivos anteriores se utilizaron para el aislamiento en placas de Petri con medio sólido con y sin el agregado de salmuera (APC, APCsal, Sab y Sabsal), las que luego de su siembra se incubaron a 30 °C hasta observar crecimiento. Los hongos obtenidos a partir de este aislamiento fueron almacenados en medio de cultivo sólido a 4 °C. La morfología de los hongos se evaluó mediante microscopía óptica en fresco; sin embargo, los ensayos posteriores de caracterización y tolerancia a cloruro de litio se desarrollaron utilizando únicamente los aislamientos bacterianos.

Las muestras de suelo (S1A, S1B, S2A y S2B), descriptas en el Capítulo 2, se dividieron y trataron en paralelo de dos formas diferentes. Por un lado, se secaron, molieron y tamizaron (suelo tratado), mientras que a otra porción no se le realizó ninguno de dichos procedimientos (suelo no tratado). Para la desorción o extracción de microorganismos, se agregaron 5 g de suelo (tratado y no tratado) en Erlenmeyers de 250 mL con 45 mL de hexametafosfato al 1% (p/v) o con agua destilada estéril (15). El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el aislamiento de microorganismos fue de dos días. Los frascos se agitaron a 200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se dejaron decantar durante 1 h y se sembraron 100 μL del sobrenadante y sus diluciones seriadas (1:10) en placas de Petri conteniendo APC o APCsal. Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento.

3.3.3. Selección de microorganismos tolerantes a cloruro de litio

Con el propósito de seleccionar los aislamientos que presenten mayor tolerancia al litio se realizaron ensayos de evaluación en medios de cultivo líquido y sólido.

3.3.3.1. Tolerancia a sales y a cloruro de litio en medio sólido

Todas las bacterias aisladas se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo sólido APCsal, y se incubaron a 30 °C durante cinco días, para determinar su capacidad de crecimiento en presencia de sales.

Las bacterias capaces de crecer en medio de cultivo APCsal fueron evaluadas con respecto a su tolerancia a cloruro de litio utilizando el ensayo del canal. Para ello, se utilizaron placas de Petri conteniendo medio de cultivo sólido (APC). Una vez

solidificado el medio se cortó un canal rectangular con bisturí estéril y se sembraron las bacterias de forma perpendicular al canal, desde el borde del canal hacia afuera de la placa (una distancia total de 3 cm, Figura 3.1). Luego se colocaron 650 μL de una solución de cloruro de litio estéril en el centro del canal y se dejó la placa a temperatura ambiente hasta que la solución difundiera totalmente en el agar. Se evaluaron distintas concentraciones de litio: 0,4; 0,8; 1,2; 4; 8; 13; 42; 64; 85; 167; 297; 424 y 636 g/L. Finalmente, las placas se incubaron a 30 °C y se evaluó el crecimiento durante 3 días.

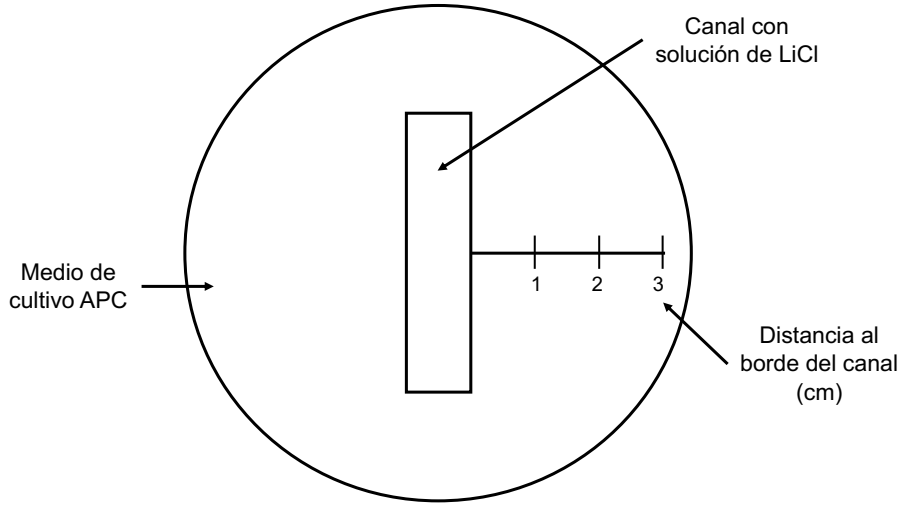


Figura 3.1 Esquema del ensayo del canal para la evaluación de tolerancia a LiCl por parte de las bacterias halotolerantes en placas de Petri conteniendo medio de cultivo APCsal.

Se consideraron como tolerantes a cloruro de litio a aquellos aislamientos bacterianos capaces de crecer al menos una distancia de 1,5 cm desde el borde del canal.

3.3.3.2. Tolerancia al cloruro de litio en medio líquido

Las bacterias seleccionadas como tolerantes en el ensayo del canal fueron evaluadas para determinar su tolerancia al cloruro de litio en medio de cultivo líquido. Para ello se determinaron previamente la composición del medio y las condiciones ambientales adecuadas. En cuanto a la composición, se evaluó la capacidad de los microorganismos de crecer utilizando diferentes fuentes de carbono (glucosa y sacarosa) y de nitrógeno (sulfato de amonio, nitrato de potasio, L-asparagina y urea). Asimismo, se determinaron los valores de temperatura y pH óptimos para el crecimiento, para lo cual se cultivó a 4, 20, 30, 37 y 41 °C y pH 5, 7 y 9.

Una vez decididas las condiciones ambientales óptimas y las mejores fuentes de carbono y nitrógeno para el crecimiento, se preparó el medio de cultivo con el

agregado de concentraciones crecientes de cloruro de litio: 0, 10, 30, 40, 50 y 60 g/L (los medios se llamaron DM, D10, D30, D40, D50 y D60, respectivamente). Se sembraron tubos conteniendo 5 mL del medio de cultivo correspondiente y se colocaron en un agitador orbital a 200 rpm y 30 °C durante 5 días. Se clasificaron como tolerantes aquellos aislamientos capaces de crecer en medio de cultivo definido conteniendo como mínimo 30 g/L de LiCl.

3.3.4. Caracterización de los aislamientos

Las cepas bacterianas aisladas se caracterizaron de acuerdo con sus propiedades morfológicas y otras capacidades.

3.3.4.1. Propiedades macro y microscópicas

Se determinaron las propiedades morfológicas microscópicas de los aislamientos encontrados como tolerantes a cloruro de litio mediante tinción de Gram (16) y las macroscópicas de las colonias formadas en placas de Petri con medio APCsal. Las colonias se clasificaron de acuerdo con su pigmentación, forma y bordes.

Por otro lado, se observaron las colonias obtenidas en medio APCsal y todas aquellas que presentaron coloración amarilla, naranja o roja (en alguna de sus tonalidades) se consideraron como probablemente productoras de carotenoides.

3.3.4.2. Capacidad formadora de biofilm

Se evaluaron todas las cepas tolerantes, obtenidas en los ensayos en medio líquido, de acuerdo con su capacidad para formar biofilms en placas estériles de 96 pocillos. Las cepas se sembraron por duplicado usando como medios de cultivo DM y D30 y se evaluaron el crecimiento y la formación de biofilm luego de 6 días de incubación a 30 °C. Una vez completado ese tiempo, se eliminó el cultivo planctónico, las placas se lavaron con agua corriente dos veces y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego se agregaron 125 μL de cristal violeta 0,1% (p/v) a cada pocillo. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron hasta quitar totalmente el exceso de colorante y se secaron a temperatura ambiente. El agregado de 200 μL de etanol 96° permitió solubilizar el exceso el cristal violeta de las paredes de los pocillos (17). La presencia de color en el pocillo permitió determinar la capacidad de formar biofilms de los microorganismos. Se utilizó como control negativo el medio de cultivo estéril sin el agregado de bacterias.

3.3.5. Identificación y construcción de árbol filogenético

La identificación de las bacterias seleccionadas se realizó mediante la secuenciación del fragmento 16S de su ADNr, extraído a partir de cultivos puros de los aislados.

3.3.5.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico de los aislamientos bacterianos seleccionados se realizó utilizando el protocolo propuesto por Pospiech y Neumann (1995) (18). Para ello, se cultivaron las cepas en medio CNsal a 30 °C y 200 rpm hasta observar crecimiento. Posteriormente se cosecharon mediante centrifugación (durante 10 minutos a 3.000 rpm en centrífuga Eppendorf 5415R) y se lisaron mediante la acción de 800 μL de lisozima (PB-L Productos Bio-Lógicos, 10 mg/mL, 35.000 U/mg) en buffer SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM de Tris, pH 7,5) durante 2 h a 37 °C. Transcurrido el período de incubación, se agregaron 80 μL de SDS al 10% (p/v), 20 μL de proteinasa K (Invitrogen, 20 mg/mL, 40 U/mg) y se incubó por 2 h a 55 °C. Posteriormente se agregaron 335 μL de 5 M NaCl y 700 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se centrifugó la solución a 12.000 rpm por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa. Se precipitó el ADN con etanol, para lo que se utilizaron al menos 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C, se dejó toda la noche a -20 °C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. El ADN obtenido se resuspendió en 50 μL de agua MiliQ estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso.

El tamaño y la integridad del ADN obtenido se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado con buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA), utilizando un marcador de peso molecular MilMarker B042-50 (Biodynamics). El gel se reveló con SYBR Safe en transiluminador (Labnet, U1000-230). El ADN se cuantificó utilizando Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

3.3.5.2. Amplificación del fragmento 16S del ADNr y secuenciación

Se amplificó el ADN extraído mediante PCR utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5´-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (19) o 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') y 1389R (5'-GGGCGGWGTGTACAA GGC-3') (20). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo que se indica a continuación: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min y 35

ciclos incluyendo desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 57°C por 30 s y extensión a 72 °C por 90 s.

El tamaño y la concentración de los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado con buffer TAE (Tris, ácido acético y EDTA) utilizando un marcador de peso molecular MilMarker B042-50 (Biodynamics) y revelado son SYBR Safe en transiluminador (Labnet, U1000-230). Los productos de PCR (sin purificar) se enviaron a Macrogen (Seoul, South Korea) para su secuenciación.

3.3.5.3. Identificación y construcción del árbol filogenético

Se utilizó el programa Chromas versión 2.6 para obtener secuencias del fragmento 16S para cada bacteria. La secuencia final se comparó, utilizando BLAST (blastn), con las secuencias de 16S bacteriano disponibles en la base de datos de Genebank (21). Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W 1.74 (22) y se incorporaron a la base de datos de GeneBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Las secuencias obtenidas se utilizaron para la construcción de un árbol filogenético utilizando el software MEGA4 (http://www.megasoftware.net) (23).

3.4. Resultados y discusión

Se caracterizó a microorganismos presentes en el Salar con respecto a sus propiedades, tolerancia e identidad.

3.4.1. Observación microscópica de las muestras líquidas

En las muestras de salmuera se observaron claramente, mediante microscopía óptica, cristales de sal junto a filamentos verdes, de apariencia similar a algas microscópicas (Figura 3.2 A y B). La presencia de algas en las muestras de agua también ve verificó mediante SEM (Figura 3.2 C y D). Numerosos autores se han enfocado en la búsqueda de algas halotolerantes, ya que presentan capacidad para acumular betacarotenos en condiciones de alta salinidad. Se conoce que las aguas salinas son ambientes en los que pueden encontrase diferentes especies de algas halófilas, como por ejemplo a *Dunaliella salina*, conocida por estar presente en aguas con concentraciones altas de sales. Esta alga se caracteriza por su capacidad de producir β-caroteno y por coexistir en ambientes con cepas bacterianas como *Halomonas* y *Halobacterium* spp (24). Además, también se ha informado la presencia

de diatomeas en ambientes salinos (25), con estructuras celulares similares a las encontradas mediante SEM en las muestras líquidas de este estudio.

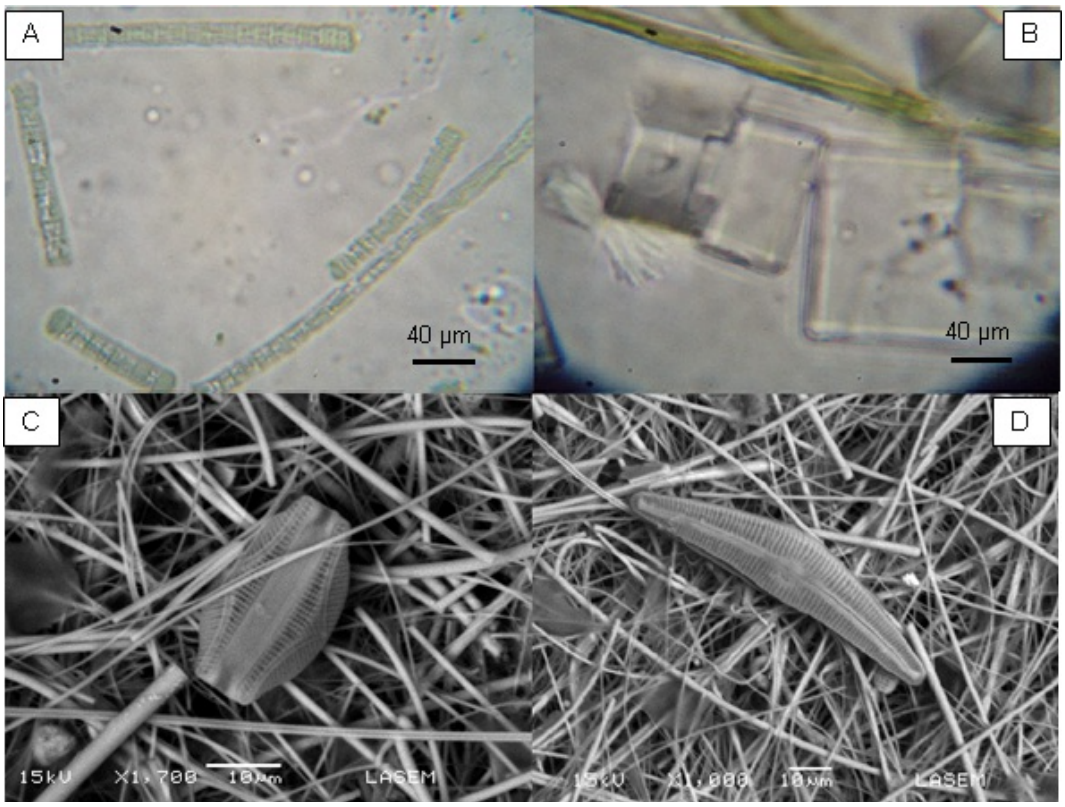


Figura 3.2 A, B Imágenes de microscopía óptica (100 X) de las muestras de salmuera; se observa la presencia de microorganismos verdes y cristales de sal. C, D (4.000 y 1.500 X, respectivamente) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la muestra líquida filtrada en membranas de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,22 µm).

3.4.2. Aislamiento de microorganismos

Las muestras de suelos y agua se utilizaron para el aislamiento de microorganismos, pudiendo recuperar tanto hongos filamentosos como bacterias.

3.4.2.1. Aislamiento de hongos

Un total de cinco cepas de hongos filamentosos fueron aislados de las muestras de agua luego de ser inoculadas en medio de cultivo Sab y Sabsal. La observación mediante microscopio óptico permitió la identificación de un *Penicillium* biverticilado con esporas esféricas (Figura 3.3).

Otros autores también encontraron hongos del género *Penicillium* en ambientes extremos y los caracterizaron por sus propiedades como promotores de crecimiento vegetal bajo estrés salino (26). Estas propiedades incluyen la producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes, además de disparar las reacciones de la

planta frente a patógenos. En general, en los ambientes hipersalinos se encuentran comunidades de microorganismos, entre los que se incluyen bacterias y hongos adaptados a las elevadas concentraciones de sales. Como se describió en el Capítulo 2, las comunidades bacterianas que habitan los ambientes hipersalinos incluyen una gran variedad de microorganismos y la presencia de hongos en los mismos ambientes permitiría establecer una relación entre microorganismos de distintos dominios. La interacción de estos microorganismos podría dar como resultado final la proliferación de plantas a pesar de las condiciones hostiles del ambiente.

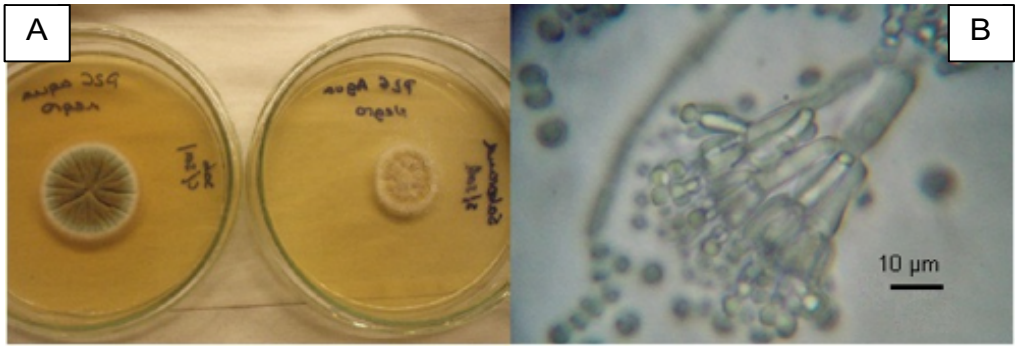


Figura 3.3 A Hongo filamentoso aislado de muestras de Salar del Hombre Muerto cultivado en medio Sabsal (izquierda, medio de cultivo Sabouraud preparado con 12,5% (v/v) de salmuera) y Sab (derecha, medio de cultivo Sabouraud) a 30 °C. **B** Imagen de microscopía óptica (40X) de un *Penicilluim* biverticilado con esporas esféricas, aislado de una muestra líquida y cultivado en medio Sabsal a 30 °C.

3.4.2.2. Aislamiento de bacterias

No se observaron diferencias en los recuentos de colonias (1 x 10^3 UFC/mL) entre las dos matrices líquidas (agua destilada o hexametafosfato estéril) utilizadas para la desorción de los microorganismos de las muestras de suelo. Tampoco se observaron diferencias en los recuentos obtenidos (1 x 10^3 UFC/mL) a partir de las muestras de suelos tratados, en comparación con los suelos sin tratar.

Las muestras líquidas permitieron aislar 45 cepas bacterianas, mientras que a partir de las de suelo se obtuvieron 193 aislamientos, dando un total de 238 cepas bacterianas. La mayoría de los microorganismos fueron aislados del sitio de muestreo S1, que tiene condiciones ambientales menos hostiles en comparación con el sitio S2. Esta situación es similar a la descripta por Wong y col (2010) (27), quienes encontraron mayor actividad microbiana en suelos con menor salinidad que en aquellos de salinidad más alta.

3.4.3. Selección de aislamientos tolerantes a litio

De los 238 aislamientos bacterianos obtenidos, sólo 186 fueron capaces de crecer en medio de cultivo sólido en presencia de sales (APCsal). Estos microorganismos se clasificaron como halotolerantes y se seleccionaron para posteriores análisis.

3.4.3.1. Selección de aislamientos tolerantes a litio por ensayos en medio sólido

Luego de evaluar el crecimiento de los microorganismos mediante el ensayo del canal utilizando distintas concentraciones de LiCl, se determinó que la que produce la mayor inhibición en el crecimiento microbiano es la cercana al punto de saturación de la sal. Cuando se utilizaron concentraciones de LiCl más bajas todos los microorganismos crecieron hasta el borde del canal, impidiendo visualizar la sensibilidad a la sal. Se seleccionó la concentración de 636 g/L (15 M) de LiCl para determinar tolerancia al cloruro de litio de los 186 microorganismos capaces de crecer en APCsal (Figura 3.4).

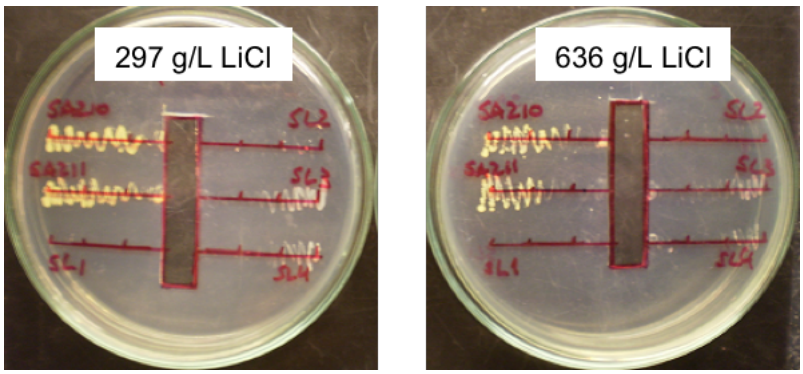


Figura 3.4 Ensayo del canal en placas de Petri utilizando medio APCsal. Las fotografías muestran el crecimiento bacteriano frente a soluciones de cloruro de litio 297 y 636 g/L.

De las 186 cepas evaluadas, 52 fueron capaces de crecer hasta una distancia de 1,5 cm desde el borde del canal que contiene la solución concentrada de LiCl. En este ensayo, la solución concentrada de metal en el canal difunde en el agar en dirección radial hacia los bordes de la placa, generándose como consecuencia un gradiente de concentraciones, siendo las zonas más concentradas las del borde del canal y las de menor concentración las más alejadas. A pesar de esta limitación esta metodología se utilizó para estudiar la resistencia a metales pesados (28) y a boro (29) en actinomicetes, ya que permite observar de manera sencilla la sensibilidad de los microorganismos.

Mediante este análisis se determinó que el 72% de los aislamientos capaces de crecer en medio de cultivo APCsal presentan sensibilidad en presencia de una solución de 636 g/L de cloruro de litio, siendo incapaces de crecer próximas al canal conteniendo esta solución.

3.4.3.2. Formulación del medio de cultivo y condiciones óptimas de crecimiento

De la evaluación del crecimiento en diferentes condiciones se observó que la mayoría de los aislamientos (85%) crece de forma óptima a pH 7, y es el valor que se seleccionó para ensayos posteriores. Asimismo, aunque muchos de los aislamientos analizados crecieron tanto a 20 °C como a 41 °C, el mejor valor de entre los ensayados para todos ellos fue de 30 °C, siendo éste el seleccionado para cultivos sucesivos.

La fuente de carbono preferida por todos los microorganismos fue la glucosa, en una concentración de 10 g/L. De entre las fuentes de nitrógeno evaluadas, la mayoría de los microorganismos crecieron utilizando urea y L-asparagina preferentemente (71% de los microorganismos evaluados). Aunque muchos (57%) mostraron la capacidad de crecer utilizando sulfato de amonio, el crecimiento fue menor en comparación a los otros dos compuestos. Teniendo en cuenta la preferencia de crecimiento utilizando L-asparagina, ésta fue esta fuente de nitrógeno seleccionada finalmente como componente del medio de cultivo definido para el crecimiento y la evaluación de los microorganismos en los ensayos posteriores.

A partir de los resultados obtenidos se determinó el medio de cultivo líquido definido que se utilizó en lo sucesivo para caracterizar a las bacterias de acuerdo a su capacidad de formación de biofilms y tolerancia a cloruro de litio (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Componentes del medio de cultivo definido utilizado para los ensayos de tolerancia a LiCl en medio líquido y para la determinación de la formación de biofilms. El pH se ajustó a 7.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	10
L-asparagina	0,5
K_2HPO_4	0,5
$FeSO_4.7H_2O$	0,001
$MgSO_4$	0,02

3.4.3.3. Selección de aislamientos tolerantes a cloruro de litio por ensayos en medio líquido

Con los 52 microorganismos seleccionados por su tolerancia al litio en medio sólido se realizaron los ensayos de tolerancia en el medio líquido definido anteriormente optimizado. Siete de las cepas no fueron capaces de crecer en las condiciones del ensayo. Nueve de ellas crecieron hasta una concentración máxima de 10 g/L de LiCl, dos mostraron crecimiento hasta 30 g/L de LiCl, 8 hasta 40 g/L, la mayoría de las cepas creció hasta 50 g/L como concentración máxima de cloruro de litio en el medio de cultivo y sólo 7 fueron capaces de crecer en la concentración máxima evaluada (60 g/L LiCl) (Figura 3.5).

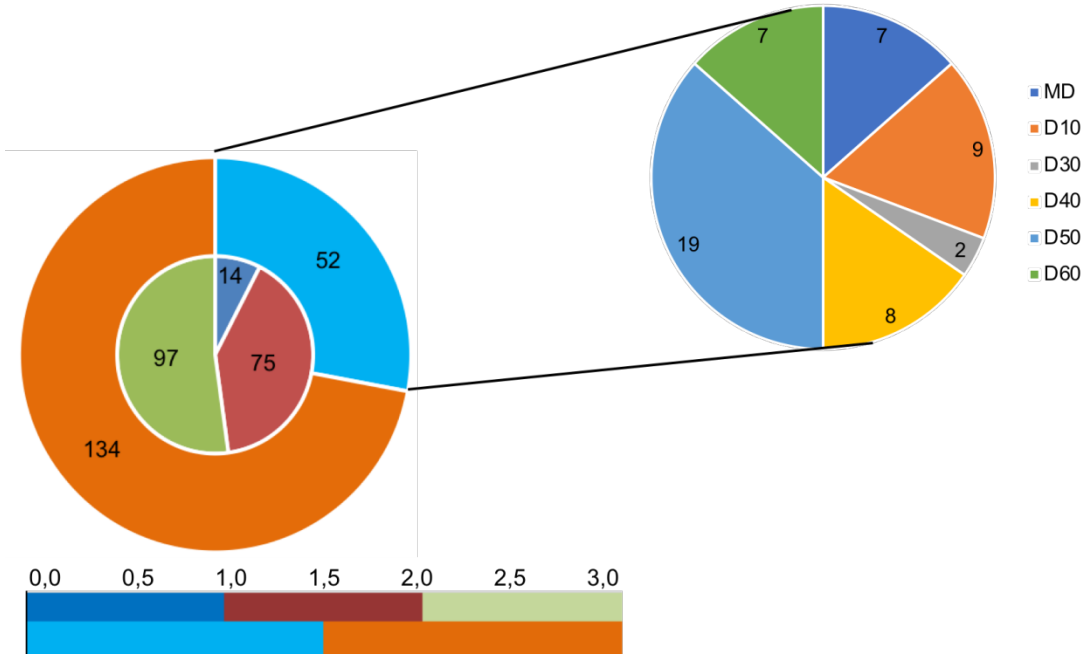


Figura 3.5 Tolerancia al LiCl de las cepas seleccionadas utilizando el ensayo del canal y en medio líquido. Se muestra el número de aislamientos que fueron capaces de crecer a diferentes distancias (indicadas abajo) desde el borde del canal (izquierda). En el gráfico de torta de la derecha se muestran cuántas cepas de las previamente clasificadas como tolerantes a cloruro de litio fueron capaces de crecer en medio líquido definido con distintas concentraciones de LiCl: 0 (MD), 10 (D10), 30 (D30), 40 (D40), 50 (D50) y 60 (D6O) g/L.

El hecho de que los microorganismos toleren concentraciones más bajas en medio líquido que en medio sólido fue observado también en cepas de *Streptomyces*, frente al ácido bórico en ese caso, por Moraga y col (2014) (29). Esto puede ser consecuencia de que en medio de cultivo líquido los microorganismos están en contacto directo más íntimo con los compuestos del medio de cultivo, mientras que, en el medio sólido con el ensayo del canal, las concentraciones varían de acuerdo con la distancia del canal, dependiendo de la capacidad de difundir de las soluciones

utilizadas. Majzlik y col (2011) (30) también informaron una mayor sensibilidad a la presencia de zinc y cobre de bacterias del género *Streptomyces* en medio de cultivo líquido, posiblemente como consecuencia de la interacción de los microorganismos con los componentes del medio de cultivo. Esta interacción induciría a la bacteria a formar un ambiente favorable alrededor de las células que puede unir iones formando complejos, disminuyendo su disponibilidad y en última instancia su acción sobre el metabolismo microbiano (30).

Como resultado de esta evaluación, los 36 aislamientos capaces de proliferar en concentraciones de cloruro de litio iguales o mayores a 30 g/L se clasificaron como tolerantes a litio en medio líquido. Se seleccionaron estas cepas para una caracterización más profunda, detallada en las secciones posteriores.

3.4.4. Caracterización de los aislamientos seleccionados

3.4.4.1. Morfología y tinción de Gram

Las 36 cepas bacterianas seleccionadas como tolerantes a LiCl en medio de cultivo líquido se cultivaron en placas de Petri con APCsal hasta obtener colonias aisladas para su caracterización macroscópica. De entre todas ellas, sólo tres formaron colonias con bordes difusos. Todos los otros aislamientos crecieron formando colonias con bordes redondeados y de forma circular. En la Figura 3.6 y a modo ilustrativo, se pueden ver algunos de los aislamientos bacterianos evaluados; los aislamientos denominados FAMB1, SX139 y M12 formaron colonias circulares, de bordes definidos y regulares, mientras que el HA120A creció sobre el agar con bordes difusos y lobulados.

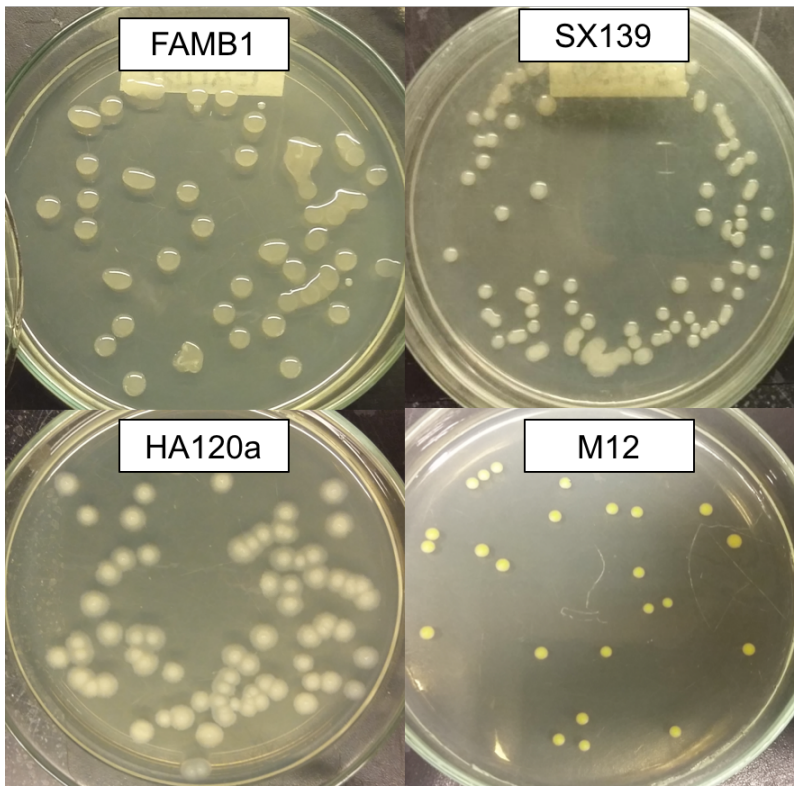


Figura 3.6 Colonias de aislamientos bacterianos crecidos en APCsal a 30 °C, durante 2 días.

Con respecto a la tinción de Gram, entre las bacterias seleccionadas se encontraron tanto Gram positivas como Gram negativas y ejemplares de todas las morfologías (Figura 3.7). Se compiló toda la información obtenida sobre la caracterización (Tabla 3.3) y se clasificaron los aislamientos de acuerdo con su origen, morfología y tinción de Gram. A partir de eso se seleccionaron 10 cepas de las muestras de agua, de las cuales seis crecen con morfología bacilar, tres cocoide y una como cocobacilo, para continuar los estudios.

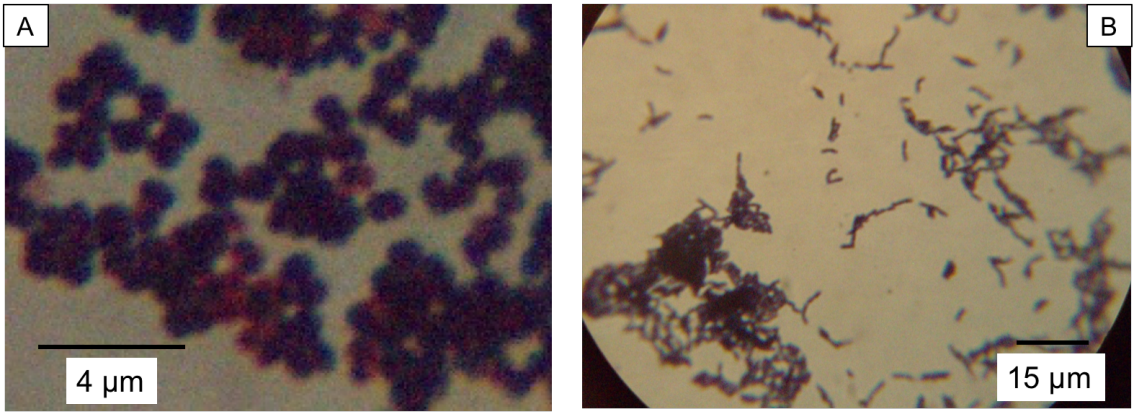


Figura 3.7 Imágenes de microscopía óptica (100X) de las células bacterianas después de la tinción de Gram. **A** Cocos Gram positivos, **B** Bacilos Gram positivos.

Tabla 3.3 Morfología y clasificación de Gram de las bacterias clasificadas como tolerantes al cloruro de litio en medio líquido, según su origen.

Morfología celular	Muestras líquidas		Muestras de suelo		Total
	Gram		Gram		
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	
Coco	3	0	3	0	6
Bacilo	6	0	19	1	26
Cocobacilo	1	0	2	1	4
Total	**10**	**0**	**24**	**2**	**36**

La mayoría de los aislamientos seleccionados (34 de las 36 cepas) fueron clasificados como Gram positivos, lo que es común de encontrar en ambientes con elevada salinidad, ya que la rigidez de la estructura de la pared de una célula Gram positiva es favorable para la supervivencia y proliferación de las bacterias en ambientes hostiles (31). Orhan y Gulluce (2015) (32), aislaron 45 microorganismos de suelos salinos, y clasificaron a 44 de ellos como Gram positivos. Además, sólo 6 de sus aislamientos presentaron forma de coco. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, ya que la mayoría de los aislamientos fueron bacilos Gram positivos.

3.4.4.2. Formación de biofilm

Las bacterias seleccionadas como tolerantes a cloruro de litio se evaluaron de acuerdo con su capacidad de formar biofilms en medios de cultivo DM (sin LiCl) y D30 (con 30 g/L de LiCl). De las 36 cepas evaluadas, 19 formaron biofilms en DM y de ellas, sólo 12 mantuvieron la capacidad en D30. Cuatro de los aislamientos fueron capaces de formar biofilms sólo en D30 y, aunque crecieron 13 no formaron biofilms en ninguna de las condiciones evaluadas (Figura 3.8).

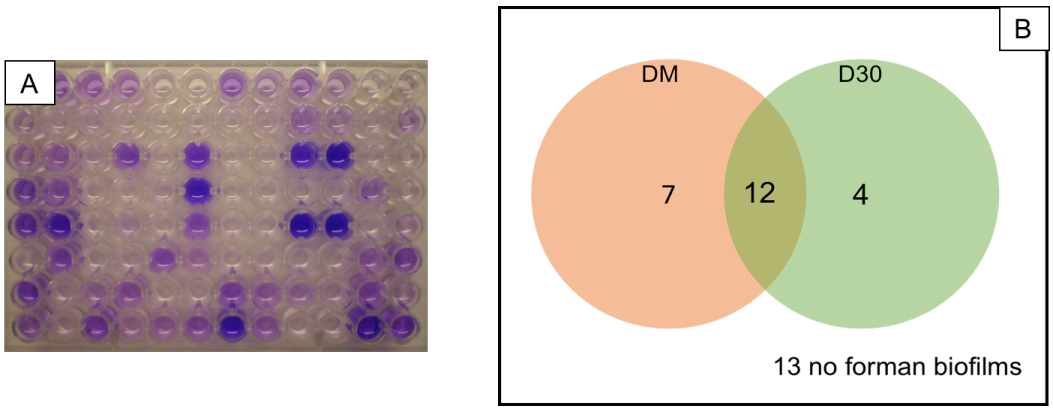


Figura 3.8 Ensayo de formación de biofilms (a 30 °C) con los aislamientos seleccionados como tolerantes a LiCl. Se utilizaron los medios de cultivo DM (sin LiCl) y D30 (30 g/L LiCl) en microplacas de 96 pocillos. **A.** Fotografía de una placa de 96 pocillos luego de aplicar el método de tinción con cristal violeta. **B.** Número de aislamientos capaces de producir biofilms en los medios evaluados.

Es sabido que la capacidad de formar biofilms por parte de los microorganismos está relacionada con un mecanismo de defensa frente a diferentes condiciones ambientales (33). Esto se debe a que los biofilms confieren a los microorganismos mayor protección o resistencia frente a condiciones adversas, como serían la acción de antibióticos y predadores, la desecación, la salinidad y la presencia de metales pesados (34, 35).

La caracterización de los aislamientos de acuerdo con su capacidad para formar biofilms en presencia y ausencia de litio se evaluó para determinar si podría ser una respuesta al estrés salino. Se determinó que 13 de las cepas evaluadas no forma biofilms en ninguna de las condiciones, y que además 19 lo hacen en ausencia de cloruro de litio. Sólo cuatro cepas bacterianas forman biofilms únicamente en D30. Con estos resultados se puede afirmar que la capacidad de formar biofilms no está ligada a la supervivencia bacteriana, ya que todas las cepas son capaces de crecer sin formar biofilms aún en presencia de cloruro de litio.

Alrededor del 60% de los aislamientos creció en medio de cultivo sólido APCsal formando colonias en las que se visualizan sustancias de aspecto mucoso (como FAMB1 y SX139 en la Figura 3.6). La formación de dichas sustancias estaría estrechamente relacionada a la capacidad de los microorganismos de formar biofilms (35).

La composición de los biofilms depende principalmente de las condiciones ambientales, más que de la identidad de las especies que lo forman (35). Por otro lado, la composición de los biofilms es muy importante para establecer sus propiedades, por

lo que sería necesario estudiarla para determinar la manera en la que podría interactuar con los elementos del ambiente.

3.4.4.3. Producción de pigmentos

La formación de pigmentos es otro de los mecanismos utilizados por los microorganismos para afrontar la exposición a condiciones adversas (36). La producción de pigmentos en la membrana celular les permite protegerse frente a radiaciones de elevada energía, que podrían afectar la estructura de ADN provocando la acumulación de mutaciones, con la posterior muerte celular (37).

Los 36 aislamientos seleccionados como tolerantes al litio en medio líquido se cultivaron en placa de Petri (medio de cultivo APCsal, incubación a 30 °C) para determinar la producción de pigmentos compatibles con carotenoides en las membranas celulares (Figura 3.9). Sólo seis de los aislamientos, de los géneros *Kocuria, Curtobacterium* y *Micrococcus,* mostraron pigmentos de color amarillo y anaranjado, en distintas intensidades.

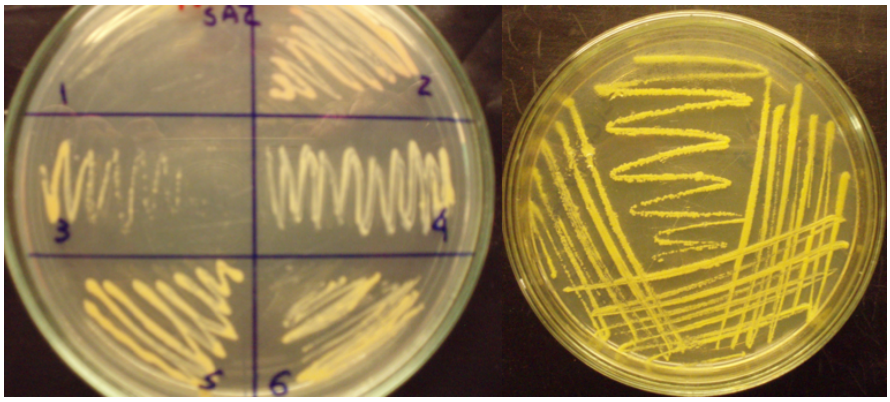


Figura 3.9 Fotografía ilustrativa de la formación de pigmentos compatibles con carotenoides por bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto. Crecimiento en medio de cultivo APCsal a 30 °C durante cuatro días.

En un estudio realizado por Rezaeeyan y col (2017) (13), detectaron la capacidad de producir carotenoides de un aislamiento bacteriano halófilo parcialmente identificado como *Kocuria* sp. cepa QWT-12. El análisis del carotenoide producido por esta cepa permitió determinar que presenta propiedades anticancerígenas. Además, se conoce que los carotenoides tienen aplicaciones como suplementos nutricionales, en farmacia y en colorantes de comidas (10). Por su alta demanda es importante buscar alternativas de producción de estos compuestos, y los microorganismos halófilos son una opción prometedora. En el caso de Rezaeeyan y col (2017) (13), el

pigmento producido presentó una coloración amarilla mientras que, en el presente estudio, se aislaron dos representantes del género *Kocuria,* uno de color amarillo y otro naranja (cepas denominadas M9 y SA129B, respectivamente). Al presentar las cepas M9 y QWT-12 la misma coloración y pertenecer el mismo género bacteriano, se podría estimar que las características químicas y propiedades de los compuestos son similares. Sin embargo, es necesario profundizar en su caracterización para sostener esta afirmación.

En estudios realizados por Albarracín y col (2016) (38), se han agrupado organismos capaces de resistir a elevadas exposiciones a la radiación ultravioleta en salares de altura, entre los que se encontraron como miembros de la familia Micrococcaceae a los géneros *Micrococcus* y *Kocuria.* Ambos géneros fueron detectados también entre las cepas aisladas en esta investigación. La capacidad de estos organismos de producir pigmentos les conferiría además la habilidad de colonizar ambientes con elevada exposición a radiación ultravioleta, como son los salares de altura.

La capacidad de sintetizar pigmentos, en conjunto con la habilidad de producir sustancias poliméricas extracelulares, les permite a los microorganismos colonizar ambientes con elevada salinidad, alta exposición a la radiación y baja actividad de agua, como son los salares de altura. Los aislamientos caracterizados mostraron tanto la habilidad de formar biofilms como de producir pigmentos, por lo que estas propiedades podrían estar involucradas en su capacidad para colonizar ambientes con condiciones ambientales hostiles. De esta manera, la síntesis de sustancias exopoliméricas evitaría la desecación, la acción de sustancias antibióticas y de los cambios de temperatura y la síntesis de pigmentos impediría el desarrollo de mutaciones en las células que son capaces de sintetizarlos.

3.4.4.4. Identificación

Teniendo en cuenta la tolerancia al cloruro de litio y demás características de los aislamientos obtenidos, se descartaron aquellos que podían representar cepas repetidas. Así, se seleccionó un grupo final de 26 bacterias para su identificación por la secuenciación del fragmento 16S de su ADNr.

El análisis de la secuencia y la comparación en bases de datos permitió clasificar a los aislamientos como pertenecientes a tres filos: Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. De entre los 26 microorganismos identificados, 16 pertenecen al género *Bacillus* sp, tres a *Micrococcus* sp, tres a *Brevibacterium* sp, dos a *Kocuria* sp y hay un ejemplar de *Curtobacterium* sp y uno de *Halomonas* sp (Tabla 3.4). Yadav y

Saxena (2018) (21) han encontrado una gran diversidad microbiana en ambientes salinos extremos. Entre los géneros halotolerantes encontrados se encuentran microorganismos de *Bacillus, Brevibacterium, Halolamina, Halomonas, Haloterrigena, Marinobacter, Oceanobacillus, Penicillium, Pseudomonas, Streptomyces*, por mencionar algunos. Tanto los organismos de manera individual o mediante interacciones entre ellos, mostraron propiedades de promover el crecimiento vegetal (PGP por sus siglas en inglés -*Plant growth promoting*-) en suelos sometidos a estrés salino. Todos esos géneros, informados como característicos de ambientes salinos (26, 39), también se encontraron en el presente estudio, ya sea a través del aislamiento y secuenciación o de los análisis metagenómicos presentados en el Capítulo 2. Se ha informado que los microorganismos halotolerantes previamente mencionados tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, por lo que podrían ser utilizados como potenciadores del crecimiento de cultivos en ambientes salinos.

Tabla 3.4 Identidad parcial determinada a través de la secuenciación del fragmento 16S de ADNr de los 26 aislamientos y características generales de las cepas.

Cepa	Identidad parcial	% Identidad	Número de acceso	Morfología celular	Tinción de Gram	Pigmento	Formación de biofilm		Tolerancia a litio (g/L)
							DM	D30	
FAMB1	*Bacillus* sp	100	MF990749	Bacilos	+	No	+	+	50
HA120a	*Bacillus* sp	99	MF990750	Bacilos	+	No	+	+	40
HA120b	*Bacillus* sp	99	MF990751	Bacilos	+	No	+	+	60
HA120c	*Bacillus* sp	99	MF990752	Bacilos	+	No	+	+	60
HX11	*Bacillus* sp	99	MF990753	Bacilos	+	No	+	+	40
HX127	*Curtobacterium* sp	99	MF990754	Bacilos	+	Anaranjado	-	+	40
HX135	*Brevibacterium* sp	100	MF990773	Bacilos	+	No	-	-	50
M12	*Micrococcus* sp	100	MF990756	Cocos	+	Amarillo	-	-	50
M9	*Kocuria* sp	100	MF990755	Cocos	+	Amarillo	+	-	50
SA129b	*Kocuria* sp	100	MF990760	Cocos	+	Anaranjado	-	-	60
SA211	*Micrococcus* sp	100	MF990761	Cocos	+	Amarillo	+	-	50
SA313	*Bacillus* sp	100	MF990762	Bacilos	+	No	+	-	60
SA314	*Brevibacterium* sp	100	MF990774	Bacilos	+	No	+	+	50
SA32	*Bacillus* sp	99	MF990757	Bacilos	+	No	-	-	50
SA35	*Bacillus* sp	99	MF990758	Bacilos	+	No	+	+	60
SA39	*Bacillus* sp	100	MF990759	Bacilos	+	No	-	-	40
SFS	*Halomonas* sp	100	MF990763	Bacilos	-	No	-	-	40
SX120	*Micrococcus* sp	100	MF990765	Cocos	+	Amarillo	-	+	60
SX130	*Bacillus* sp	100	MF990766	Bacilos	+	No	-	-	50
SX139	*Brevibacterium* sp	99	MF990767	Bacilos	+	No	+	+	60
SX32	*Bacillus* sp	99	MF990764	Bacilos	+	No	-	-	40
V10	*Bacillus* sp	100	MF990772	Bacilos	+	No	+	-	40
V2	*Bacillus* sp	99	MF990768	Bacilos	+	No	-	-	50
V3a	*Bacillus* sp	100	MF990769	Bacilos	+	No	+	+	50
V3b	*Bacillus* sp	100	MF990770	Bacilos	+	No	-	+	50
V3c	*Bacillus* sp	99	MF990771	Bacilos	+	No	-	+	50

Algunas bacterias pertenecientes al género *Bacillus* ya han sido caracterizadas como dominantes en suelos salinos (40) y tolerantes a elevadas concentraciones de sales (41). Yadav y col (2015) (39) encontraron una gran variedad de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* relacionados en ambientes extremos en India. Orhan y Gulucce (2015) (32) han identificado a la mayoría de sus aislamientos bacterianos de suelos mediante secuenciación del fragmento 16S del ADNr y encontraron que una mayoría de *Bacillus* y un representante del género *Halomonas,* describiendo la misma situación a la encontrada en el presente estudio. Algunas especies de *Halomonas* han sido descriptos como productores de exoenximas y exopolisacáridos, entre algunos de los compuestos que son capaces de sintetizar (42). Además, tanto *Halomonas* como *Bacillus* han sido clasificados como resistentes a la radiación UV, otra propiedad de microorganismos capaces de colonizar ambientes de altura (38).

En general, algunos autores han encontrado que las bacterias Gram positivas prevalecen en suelos hipersalinos y salinos (43, 44, 45) y han caracterizado a bacterias de los géneros descriptos como tolerantes a ambientes salinos (41). Bacterias halófilas de los géneros *Alcaligenes, Bacillus, Microroccus* y *Pseudomonas* han sido encontrados en suelos salinos y sus diversas propiedades los hacen muy interesantes, ya que los microorganismos pertenecientes a cada género tienen propiedades diferentes (46, 47). Las bacterias por ejemplo de los géneros *Micrococcus* y *Bacillus* son halotolerantes y producen proteínas que tienen la capacidad de mantener su actividad tanto en presencia como en ausencia de sales (48). De la misma manera, en el caso de *Kocuria*, dos especies aisladas de lugares diferentes en India mostraron diferentes capacidades con potenciales aplicaciones. *Kocuria marina*, aislada del salar Kovalam, produce biosurfactantes (49) y *Kocuria turfanensis* 2M4 posee actividades promotoras de crecimiento vegetal en suelos salinos y fue aislada del desierto Little Rann de Kutch (50).

La caracterización de los microorganismos aislados por Yadav y Saxena (2018) (26) permitió asociarles roles específicos en el ambiente, siendo el género *Bacillus* en general el que participó en mitigar las concentraciones elevadas de sales, favoreciendo el crecimiento de las plantas. Se asoció también la capacidad de solubilizar sales de fosfato con la actividad de hongos filamentosos halotolerantes del género *Penicilluim*, que también se detectó en este trabajo mediante técnicas de microscopía. Estos hongos también han sido asociados a la producción de fitohormonas (26).

3.4.4.5. Armado del árbol filogenético

Con las secuencias del fragmento 16S de los aislamientos analizados e información de bases de datos se construyó un árbol filogenético (Figura 3.10). Basado en sus distancias evolutivas, el árbol filogenético se dividió en tres grupos (Clusters I, II y III). El Cluster I incluye microorganismos del género *Bacillus* y *Brevibacterium* y está formado por 18 aislamientos bacterianos. El Cluster II incluye 6 actinobacterias que pertenecen a los géneros *Kocuria*, *Micrococcus* y *Curtobacterium.* Este cluster tiene el mismo origen que el Cluster I, lo que permite determinar que son más cercanos filogenéticamente entre sí que con el Cluster III. Este último incluye únicamente al representante del género *Halomonas*.

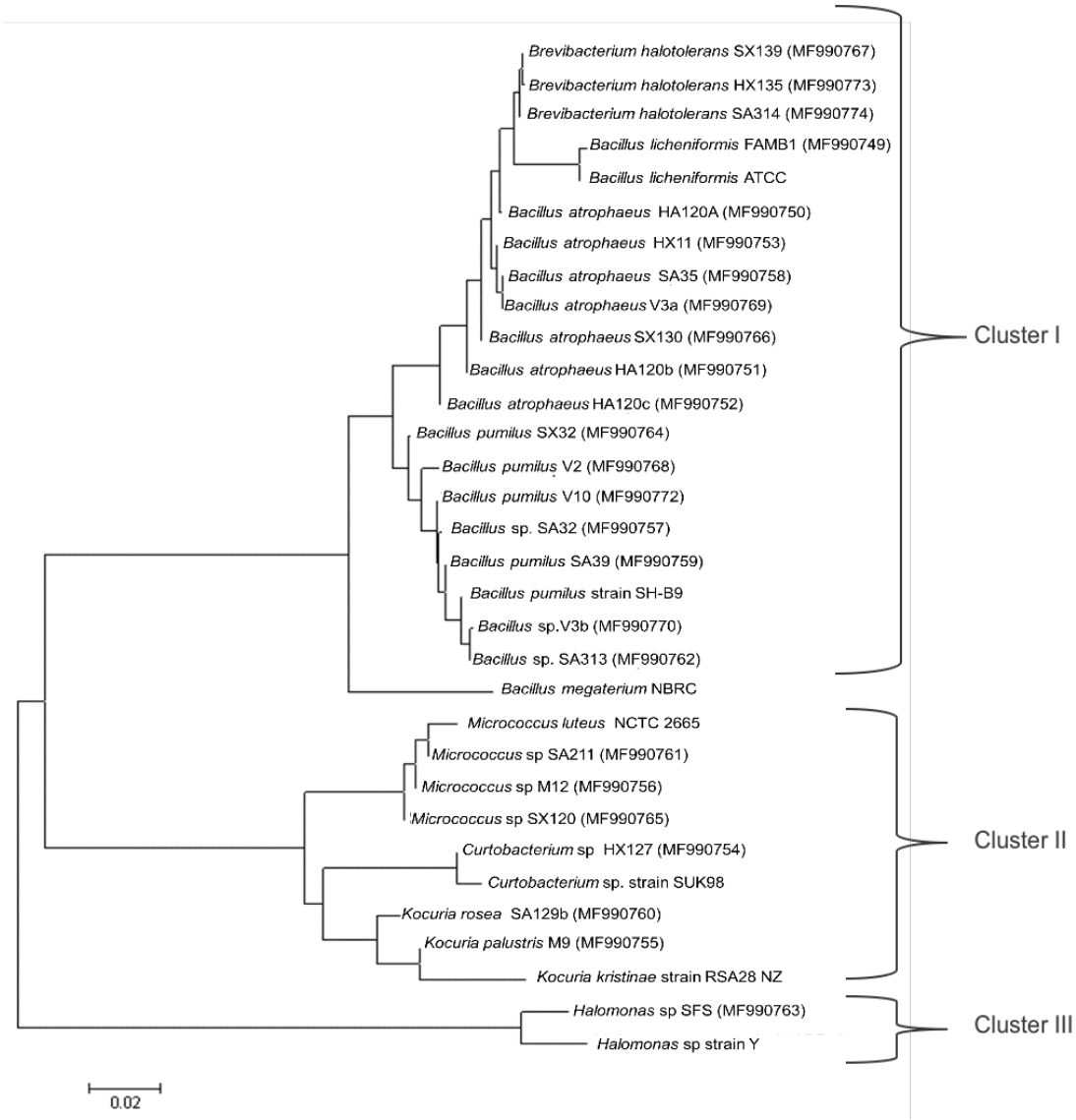


Figura 3.10 Árbol filogenético obtenido por el análisis de las secuencias de los aislamientos del Salar del Hombre Muerto (el número de acceso está indicado entre paréntesis) y bacterias de la base de datos del NCBI.

Con respecto a las especies estimadas, dentro del grupo *Bacillus,* cuatro se clasificaron como *B. pumilus,* siete como *B. atrophaeus,* FAMB1 está relacionada con *B. licheniformis* ATCC y tres cepas fueron clasificadas como cercanas a *Brevibacterium halotolerans.* En esta investigación no se aisló *Bacillus cereus,* especie mayoritaria en los resultados de Yadav y col (2015) (39).

La familia Bacillaceae está compuesta por microorganismos con forma de bacilos que son en su mayoría saprófitos y tienen la capacidad de formar esporas, característica que les permite estar presentes en una gran variedad de ambientes. Se conoce que la bacteria *Bacillus licheniformis* B3-15 (51) es halófila y termotolerante y ha sido informada como productora de exopolisacáridos (EPS). En este caso, su EPS tiene la capacidad de inmovilizar metales y tiene efectos antivirales e inmunomoduladores. FAMB1, la única cepa relacionada a la especie *B. licheniformis* en nuestro análisis, fue capaz de formar biofilms en todas las condiciones evaluadas.

Las cepas productoras de pigmentos (*Kocuria, Curtobacterium y Micrococcus*) fueron agrupadas en un solo cluster, mostrando que están íntimamente relacionadas entre sí y que son filogenéticamente diferentes a *Bacillus* y *Halomonas.*

Se conoce que las cepas del género *Halomonas* son capaces de producir exopolímeros y de formar biofilms (52), aunque esto no ocurrió en el presente trabajo en las condiciones estudiadas. Los factores ambientales (incluidas las fuentes de carbono y nitrógeno) afectan la capacidad formadora de biofilms, por lo que la optimización de la producción de exopolímeros debe hacerse para cada organismo. En el caso estudiado por Karuppiah y col (2015) (52), se observó que la interacción entre las fuentes de carbono y nitrógeno tienen un rol muy importante en la producción de exopolímeros, habiéndola potenciado utilizando peptona.

3.5. Conclusiones

En las muestras evaluadas se detectó la presencia de una gran variedad de microorganismos, ya que se encontraron tanto algas, como bacterias y hongos. Los géneros encontrados en las muestras de suelos por medio del análisis de los aislamientos y a través de metagenómica (Capítulo 2) son característicos de ambientes salinos y presentan propiedades con potenciales aplicaciones biotecnológicas. Entre los aislamientos evaluados se encontraron bacterias capaces de formar biofilms y de producir pigmentos, características que favorecen a la supervivencia y proliferación microbiana en ambientes salinos de altura.

Asimismo, las bacterias caracterizadas presentaron tolerancia a concentraciones altas de cloruro de litio, siendo capaces de proliferar en medios de cultivo con concentraciones de hasta 60 g/L de sal.

El conjunto de las propiedades analizadas en los aislamientos seleccionados puede ser utilizado para proyectar las potenciales aplicaciones de estas cepas. Su utilización en la obtención de EPS, carotenoides o componentes que actúen como PGP son de gran atractivo, y todas las cepas evaluadas poseen alguna de estas características.

3.6. Referencias

1. Enache M, Teodosiu G, Itoh T, Kamekura M, Stan-Lotter H. 2017. Halophilic Microorganisms from Man-Made and Natural Hypersaline Environments: Physiology, Ecology, and Biotechnological Potential. *In* Stan-Lotter H, Fendrihan S. (ed), Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes. Springer, Cham, Suiza.
2. DasSarma S, DasSarma P. 2017. Halophiles. *In* John Wiley & Sons (ed), Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub4
3. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Oren A. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiol Rev 42:353-375.
4. DasSarma P, Coker JA, Huse V, DasSarma S. 2009. Halophiles, industrial applications. p 1-43. *In* Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. John Wiley & Sons, Inc Hoboken, NJ.
5. Margesin R, Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles 5(2):73-83.
6. Coker JA. 2016. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. F1000Res 5, F1000 Faculty Rev-396.
7. Casillo A, Lanzetta R, Parrilli M, Corsaro M. 2018. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. Mar Drugs16(69):1-34.
8. Wang J, Salem DR, Sani RK. 2019. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. Carbohydr Polym 205:8-26.

9. Oren A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol 31(8-9):825-834.
10. Torregrosa-Crespo J, Montero Z, Fuentes J, Reig García-Galbis M, Garbayo I, Vílchez C, Martínez-Espinosa R. 2018. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. Mar drugs 16(6):203.
11. Asker D. 2017. Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. J Agric Food Chem 65(41):9101-9109.
12. Ortega-Cabello L, Pérez-Méndez HI, Manjarrez-Alvarez N, Solís-Oba A, López-Luna A. 2017. Effect of iron salts on *Rhodococcus* sp and *Gordonia* sp on carotenoid production. Rev Mex Ing Quim 16(1):1-10.
13. Rezaeeyan Z, Safarpour A, Amoozegar MA, Babavalian H, Tebyanian H, Shakeri F. 2017. High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. Strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. EXCLI J 16:840-851.
14. DasSarma S, Kennedy SP, Berquist B, Victor NW, Baliga NS, Spudich JL, Krebs MP, Eisen JA, Johnson CH, Hood L. 2001. Genomic perspective on the photobiology of Halobacterium species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. Photosynth Res 70:3-17.
15. Moraga NB, Poma HR, Amoroso MJ, Rajal VB. 2014. Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. J Basic Microbiol 54(6):568–577.
16. Lammert J. 2007. Techniques in microbiology: a student handbook. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
17. Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. 2011. Growing and analyzing static biofilms. Curr Protoc Microbiol 22(1):1B-1.1-1B1.18.
18. Pospiech A, Neumann B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria.Trends Genet 11(6):217-218.
19. Gürtler V, Stanisich V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. Microbiology 142:3-16.
20. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-CosgroveN, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. 2011. Microbial communities in the tonsils of healthy pigs. VetMicrobiol147(3–4):346-357.

21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403-10.

22. Thompson JD, HigginsDG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence align- ment through sequence weighting, position-specific gap penalities and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673-4680.

23. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596–1599.

24. Keerthi S, Koduru UD, Nittala SS, Parine NR. 2015. The heterotrophic eubacterial and archaeal co-inhabitants of the halophilic *Dunaliella salina* in solar salterns fed by Bay of Bengal along south eastern coast of India. Saudi J Biol Sci 25:1411-1419.

25. Lundholm N, Jvind Moestrup Ø. 2000. Morphology of the marine diatom *Nitzschia navis-varingica*, sp. nov. (Bacillariophyceae), another producer of the neurotoxin domoic acid. J Phycol 36(6):1162-1174.

26. Yadav AN, Saxena AK. 2018. Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. J Appl Biol Biotechnol 6(1):48-55.

27. Wong VNL, GreeneRSB, DalalRC, MurphyBW. 2010. Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: a review. Soil Use Manag 26(1):2-11.

28. Amoroso MJ, Castro GR, Carlino FJ, Romero NC, Hill RT, Oliver G. 1998. Screening of heavy metal-tolerant actinomycetes isolated from the Sali River. J Gen Appl Microbiol 44(2):129-132.

29. Moraga NB, Poma HR, Amoroso MJ, Rajal VB. 2014. Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. J Basic Microbiol 54(6):568–577..

30. Majzlik P, Strasky A, Adam V, Nemec M, Trnkova L, Zehnalek J, Hubalek J, Provaznik I, Kizek R. 2011. Influence of zinc (II) and copper (II) ions on *Streptomyces* bacteria revealed by electrochemistry. Int J Electrochem Sci 6:2171-2191.

31. Yan N, Marschner P, Cao W, Zuo C, Qin W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. ISWCR 3(4):316-323.

32. Orhan F, Gulluce M. 2015. Isolation and Characterization of Salt-Tolerant Bacterial Strains in Salt-Affected Soils of Erzurum, Turkey. Geomicrobiol J 32(6):521-529.

33. Chen G, Chen X, Yang Y, Hay AG, Yu X, Chen Y. 2011. Sorption and distribution of copper in unsaturated *Pseudomonas putida* CZ1 biofilms as determined by X-ray fluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol 77(14):4719-4727.

34. Chien CC, Lin BC, Wu CH. 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. Biochem Eng J 78:132–137.

35. Blanco Y, Rivas LA, González-Toril E, Ruiz-Bermejo M, Moreno-Paz M, ParroV, Palacín A, Aguilera A, Puente-Sánchez, F. 2019. Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. Sci Total Environ 650:384-393.

36. Mohana DC, Thippeswamy S, Abhishek RU. 2013. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. Radiat Prot Environ 36:168-174.

37. Jones DL, Baxter BK. 2017. DNA Repair and Photoprotection: Mechanisms of Overcoming Environmental Ultraviolet Radiation Exposure in Halophilic Archaea. Front Microbiol 8:1882.

38. Albarracín VH, Gartner W, Farias ME. 2016. Forged Under the Sun: Life and Art of Extremophiles from Andean Lakes. Photochem Photobiol 92:14-28.

39. Yadav AN, Verma P, Kumar M, Pal KK, Dey R, Gupta A, Padaria JC, Gujar GT, Kumar S, Suman A, Prasanna R, Saxena AK. 2015. Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific Bacilli from extreme environments of India. Ann Microbiol 65(2):611-629.

40. Mata JA, Béjar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Quesada E. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. Res Microbiol157(9):827–835.

41. Ali I, Prasongsuk S, Akbar A, Aslam M, Lotrakul P, Punnapayak H, Rakshit SK.2016. Hypersaline habitats and halophilic microorganisms. Maejo Int J Sci Technol 10(03):330-345.

42. Amjres H, Béjar V, Quesada E, Abrini J, Llamas I. 2011. *Halomonas rifensis* sp. nov., an exopolysaccharide producing, halophilic bacterium isolated from a solar saltern. Int J Syst Evol Microbiol, 61(11):2600–2605.

43. Yumoto I, Hirota, K, Goto T, Nodasaka Y, Nakajima K. 2005. *Bacillus oshimensis* sp. nov., a moderately halophilic, non-motile alkaliphile. Int J Syst Evol Microbiol 55:907–911.

44. Arora S, Vanza MJ, Mehta R, Bhuva C, Patel PN. 2014. Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. Afr J Microbiol Res 8(33):3070–3078.

45. Mata JA, Béjar V, Llamas I, Arias S, Bressollier P, Tallon R, Urdaci MC, Quesada E. 2006. Exopolysaccharides produced by the recently described halophilic bacteria *Halomonas ventosae* and *Halomonas anticariensis*. Res Microbiol 157(9):827-835.

46. Ma Y, Galinski EA, Grant WD, Oren A, Ventosa A. 2010. Halophiles 2010: Life in saline environments. Appl Environ Microbiol 76(21):6971–6981.

47. Dalmaso GZL, Ferreira D, Vermelho AB. 2015. Marine extremophiles a source of hydrolases for biotechnological applications. Mar Drugs 13:1925–1965.

48. Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, Nishikawa K. 2003. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. J Mol Biol 327(2):347-357.

49. Sarafin Y, Donio MBS, Velmurugan S, Michaelbabu M, Citarasu T. 2014. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works. Saudi J Biol Sci 21:511-519.

50. Goswami D, Pithwa, S, Dhandhukia, P, Thakker JN. 2014. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: A novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. J Plant Interact 9(1):566–576.

51. Casillo A, Lanzetta R, ParrilliM, Corsaro M. 2018. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. Mar drugs 16(2):69.

52. Karuppiah P, Venkatasamy V, Viswaprakash N, Ramasamy T. 2015. A statistical approach on optimization of exopolymeric substance production by *Halomonas* sp. S19 and its emulsification activity. Bioresour Bioprocess 2(1):48.

Capítulo 4: Interacción litio-microorganismos

4.1. Introducción

Todos los ambientes están habitados por comunidades microbianas adaptadas a las condiciones de cada nicho. De acuerdo con éstas, los microorganismos desarrollaron diferentes capacidades que les permitieron sobrevivir y colonizar esos hábitats.

Hay ambientes en los que hay una gran variedad de metales, algunos presentes en concentraciones muy elevadas. En numerosas investigaciones se han descripto algunos de los mecanismos utilizados por los microorganismos para resistir la presencia de metales en el ambiente, algunos con elevada toxicidad. Entre ellos se encuentran la precipitación y la acumulación en el exterior de la membrana plasmática, el transporte activo a través de la membrana, la acumulación de los metales en el interior y/o exterior celular mediante unión a proteínas y la detoxificación mediada por enzimas que transforman los metales a una forma menos tóxica (1, 2).

4.1.1. Formación de biominerales, biolixiviación

Los microorganismos pueden actuar como inductores de la formación de biominerales. En general este fenómeno no está ligado a un grupo de microorganismos específico, sino que muchos organismos diferentes filogenéticamente podrían tener influencia en la formación de precipitados. Se ha estudiado por ejemplo la interacción de *Halomonas maura* con manganeso (3), verificando su capacidad de inducir la precipitación de cristales en formas de sulfatos. Otros microorganismos relacionados a la oxidación de manganeso pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Micrococcus*. Este proceso de transformación de manganeso soluble a óxidos insolubles es indispensable en la biomineralización del metal (4). Otro ejemplo es el estudio realizado por Shuster y col (2015) (5), en el que se demostró la capacidad de consorcios microbianos de secuestrar iones de oro y precipitarlos. En este último ejemplo también la formación de biofilms tuvo una función importante, no sólo porque funcionó como protector ante los iones oro (tóxicos para las células), sino

que además formó la superficie sobre la cual se secuestraron los iones. Además, la capacidad de precipitar sales como calcio y magnesio utilizando bacterias halotolerantes del Salar de Atacama está siendo analizado por su potencialidad para aumentar la calidad de agua que podría utilizarse en procesos industriales (6). Por su parte, cepas del género *Streptomyces* han sido descriptas como capaces de precipitar boro en solución y formar biominerales (7).

Muchas veces, la remoción de metales implica su solubilización, en lugar de su precipitación. Esto es principalmente cuando la fuente a partir de la cual se quiere extraer el metal de interés cuenta con concentraciones bajas del metal, o es muy compleja, como en el caso de minerales o de residuos sólidos. Para esta situación, existen también microorganismos capaces de solubilizar metales, por ejemplo *Acinetobacter* sp, caracterizada por su habilidad para solubilizar manganeso (8).

4.1.2. Biosorción y síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

La biosorción es la propiedad de la de biomasa microbiana de unir metales a través de procesos físicos y químicos (9). A través de este fenómeno los iones en solución se adsorben a la superficie microbiana a través de fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, interacciones electrostáticas y mediante la formación de complejos. La biosorción, basada en biomasa microbiana, está ganando atención porque es efectiva, de bajo costo, amigable con el ambiente y es una metodología que puede utilizarse cuando el metal de interés está en concentraciones bajas (10). Una de las ventajas de este proceso es que una pequeña cantidad de microorganismos representa una gran superficie de adsorción, explicando de esta forma la efectividad del proceso.

Otro fenómeno de interés es la formación de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que pueden llevar a los microorganismos de un ambiente a adherirse a superficies y proliferar en ellas, formando biofilms. Éste, como ya se ha mencionado en el capítulo anterior, es uno de los mecanismos utilizados por los microorganismos para protegerse de contaminantes o de otros estreses que puedan presentarse en el ambiente. La formación de EPS, ligada íntimamente a la disponibilidad de nutrientes en el medio, puede llevar al atrapamiento de iones, siendo otra forma de remover metales de un ambiente. Además, la síntesis de EPS puede estar involucrada en procesos de biolixiviación, como es en el caso de *Thiobacillus ferrooxidans* (11), en el que cumple un rol esencial en las primeras etapas de adhesión a pirita para la extracción de hierro.

Ambas formas de interacción de microorganismos con metales son potencialmente aprovechables para desarrollar procesos de remediación de ambientes o de recuperación de compuestos para su posterior utilización o reutilización, en el caso de realizar la remoción de los metales de productos usados (12).

4.1.3. Remoción de litio mediada por microorganismos

Uno de los metales de mayor importancia en los últimos años, por la diversidad en aplicaciones y su creciente demanda a nivel mundial, es el litio. Como se explicó en capítulos anteriores, los procesos de recuperación de litio se desarrollan a partir tanto de salmueras como de minerales, ricos en el metal y se llevan a cabo mediante fenómenos químicos y físicos, sin la intervención de organismos vivos.

La obtención de litio a partir de fuentes en las que el elemento se encuentre en bajas concentraciones podría llevarse a cabo mediante procesos en los que participen organismos vivos o sus partes. La interacción del litio con microorganismos permitiría su remoción del ambiente en el que se encuentra, siendo una alternativa interesante en los procesos de recuperación que no son viables de acuerdo con las metodologías de obtención utilizadas actualmente. La opción de recuperar litio de baterías usadas o de otras fuentes reciclables ha tomado gran importancia en el último tiempo, por lo que el desarrollo de tecnologías que favorezcan este proceso se está analizando en profundidad. La alternativa de utilizar microorganismos para la recuperación de litio es muy atractiva, y puede ser mediada por una gran variedad de ellos.

La remoción de litio mediada por microorganismos se encuentra en estudio desde años anteriores. Tsuruta (2005) (13) ha evaluado la capacidad de 70 cepas microbianas de remover el metal cuando se encuentran en presencia de una solución con cloruro de litio. Para la evaluación, se incluyeron bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Esta investigación permitió determinar que la capacidad de remover litio de los sobrenadantes fue muy alta en el caso de las cepas *Arthrobacter nicotianae* y *Brevibacterium helovolum,* y que dicha capacidad se veía fuertemente afectada por variaciones de pH. En general, la tendencia de las cepas que presentaron mayores valores de adsorción favoreció a las bacterias Gram positivas. Además, Belfiore y col (2018) (14) han evaluado la capacidad de la cepa *Rhodococcus* sp $A5_{wh}$ de adsorber litio, demostrando que es capaz de removerlo de soluciones acuosas.

Teniendo en cuenta la importancia de la recuperación de litio y la capacidad de los microorganismos de interactuar con los metales, se considera que la evaluación de las cepas aisladas del Salar del Hombre Muerto es de gran importancia para determinar si tienen la capacidad de remover litio del ambiente.

4.2. Objetivos

- Evaluar el crecimiento de las bacterias seleccionadas en medio de cultivo con cloruro de litio y seleccionar aquella que presente mejor crecimiento en presencia de litio.
- Establecer si las bacterias seleccionadas tienen la capacidad remover litio de soluciones acuosas y en ese caso seleccionar la cepa más prometedora.
- Analizar si se producen variaciones morfológicas de las bacterias seleccionadas como consecuencia de la presencia de LiCl en el medio de cultivo

4.3. Materiales y métodos

Se seleccionó un grupo de bacterias sobre el cual se realizaron ensayos para establecer la manera en la que la presencia de litio afecta su crecimiento y morfología celular. Además, se determinó si los microorganismos son capaces de interactuar con el litio en solución.

4.3.1. Selección de bacterias

A partir de las 26 bacterias previamente clasificadas (sección 3.4.4.4.) como tolerantes a cloruro de litio, se seleccionaron 8 aislamientos para continuar con los estudios: *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211.

Las bacterias seleccionadas mostraron capacidad de crecer en medio de cultivo definido adicionado con LiCl entre 40 y 60 g/L (sección 3.4.3.3.). De entre los 8 aislamientos, tres presentan coloración compatible con la formación de carotenoides y no forman biofilms y el resto no presenta coloración pero son capaces de crecer formando biofilms. Todas las bacterias fueron clasificadas como Gram positivas.

4.3.2. Crecimiento en medio definido sin y con LiCl

Se cultivaron las 8 bacterias seleccionadas en medio definido sin cloruro de litio (DM) y con el agregado de 20 g/L de cloruro de litio (D20). La composición del medio de cultivo DM se definió en el Capítulo 3, en la Tabla 3.2. El pH se ajustó a 7,5. Los cultivos se realizaron por duplicado en Erlenmeyers de 500 mL, conteniendo 100 mL de medio, el que se sembró con un inóculo fresco. Este inóculo se preparó a partir de

cultivos frescos de cada aislamiento crecidos en medio sólido APCsal, de cada uno de los cuales se tomó una colonia pura y se la sembró en medio líquido CNsal y se incubó a 30 °C y 200 rpm durante toda la noche. Las células se cosecharon y lavaron con medio DM y se agregaron a los Erlenmeyers que contenían los medios de cultivos para tener una concentración inicial de células correspondiente a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,2 inicial medida en espectrofotómetro Biotraza 752 UV Visible.

A pesar de que todas las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en concentraciones más altas, se eligió la de 20 g/L de LiCl porque a partir de este valor se comenzó a observar un efecto sobre el crecimiento en muchas de las cepas ensayadas, y se consideró que la visualización del efecto del litio sobre el crecimiento sería más notable utilizando esta concentración de sal. La cuantificación de litio en los sobrenadantes de los cultivos se realizó con el objetivo de conocer si las cepas seleccionadas presentaban la capacidad de retener, unir o adsorber el litio durante su crecimiento, produciendo variaciones en la concentración de litio en el sobrenadante.

Solo en el caso de la cepa FAMB1, la producción de agregados celulares durante el cultivo representó un impedimento para realizar mediciones de densidad óptica, por lo que para esta cepa, el crecimiento se determinó mediante recuento en placa. En este caso, el inóculo se preparó de la misma manera que con los otros aislamientos y en cada punto de muestreo se tomó una alícuota del cultivo, se diluyó en DM y las diluciones sucesivas (1:10) se sembraron en superficie con espátula de Drigalsky estéril sobre medio de cultivo sólido APC.

En todos los casos se siguió el crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria, para lo cual se tomaron muestras a distintos tiempos, según la velocidad de crecimiento de cada microorganismo. Como ejemplo, para *Micrococcus luteus* SA211, se tomaron muestras cada 24 h, mientras que para *Kocuria rosea* SA129B en DM, se hizo lo propio cada 3 h.

En cada punto de muestreo y a partir de cada Elernmeyer se tomaron dos muestras de 1 mL cada una. Una de ellas se utilizó para la determinación de la densidad óptica o para recuento en placa en el caso de FAMB1, y la otra para cuantificar el litio en el sobrenadante. Para ello, esta segunda muestra se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf 5415R) y el sobrenadante se recuperó y refrigeró a 4 °C hasta su uso.

4.3.3. Ensayos de adsorción de litio a células en solución acuosa

Los inóculos de las cepas seleccionadas se prepararon a partir de cultivos frescos de cada aislamiento crecidos en medio sólido APCsal, de cada uno de los cuales se tomó una colonia pura y se la sembró en medio líquido CN (para evitar que el litio de la salmuera con la que se prepara CNsal interfiriera con la interacción de las células con el litio soluble en el ensayo) y se incubó a 30 °C y 200 rpm durante toda la noche. Las células obtenidas se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min y se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio de cultivo. Se tomaron 0,01 g (peso seco) de células por duplicado para inocular dos Erlenmeyer conteniendo 50 mL de solución de LiCl 72 μM (pH 5,8), siguiendo las indicaciones del ensayo llevado a cabo por Tsuruta (2005) (13). Asimismo, se tomaron del mismo cultivo inicial y por duplicado 0,01 g (peso seco) de células para la determinación de peso seco.

Las suspensiones celulares en solución de LiCl se agitaron a temperatura ambiente a 100 rpm para evitar la decantación de las células. Para cada cepa se tomaron 0,5 mL de muestras de cada Erlenmeyer para cuantificar el litio en los sobrenadantes antes de agregar las bacterias a la solución de LiCl, inmediatamente luego de agregarlas (tiempo cero), y luego de 1, 2, 4, 6 y 8 h. Para cada alícuota, la suspensión de células se centrifugó a 10.400 rpm durante 15 min y el sobrenadante se recuperó y refrigeró hasta realizar la cuantificación de litio. El ensayo de adsorción se realizó por duplicado. Al finalizar el ensayo, la viabilidad de las células se verificó mediante siembra en placa.

4.3.4. Cuantificación de litio

La cuantificación de litio en muestras líquidas se llevó a cabo mediante una reacción química en la que el litio soluble reacciona con 1,4 dihidroxiantraquinona (quinizarina). Si la reacción ocurre en medio alcalino en presencia de dimetilsulfóxido, se obtiene una coloración azul-violácea, cuya intensidad es proporcional a la concentración de litio en solución (15).

El rango óptimo de determinación de la técnica es entre 50 a 600 ppb de litio (Figura 4.1), por lo tanto, cuando fue necesario las muestras se diluyeron. Tanto para las muestras de los sobrenadantes obtenidos durante el crecimiento como para las muestras de sobrenadantes de los ensayos de adsorción el procedimiento fue el mismo. Este consistió en tomar una alícuota de 182 μL de cada muestra (o una dilución) y agregarla a una solución formada por: 4 x 10^{-5} M de quinizarina (Sigma-Aldrich), 7,4 x 10^{-4} M NaOH (Cicarelli), 10^{-3} M Na_2CO_3 (Sigma-Aldrich) y 90% (v/v) de

dimetilsulfóxido (DMSO) (Biopack) en un volumen final de 2 mL. La reacción se incubó a 25 °C durante una hora y posteriormente se realizaron lecturas a 601 nm en espectrofotómetro Biotraza 752 UV Visible. Los valores se expresaron en % de Li residual, que representa el % de litio remanente en el sobrenadante con respecto al total.

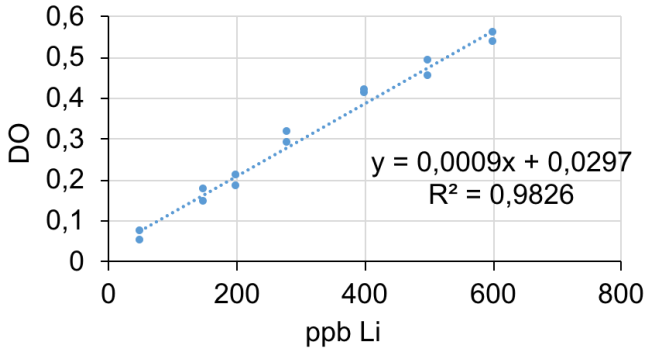


Figura 4.1 Curva de calibración para la cuantificación de Li soluble en medio alcalino utilizando quinizarina. Se utilizó 4 x 10^{-5} M de quinizarina, 7,4 x 10^{-4} M NaOH, 10^{-3} M Na_2CO_3 y 90% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) en un volumen final de 2 mL. Se incubó a 25 °C durante una hora y las lecturas se realizaron a 601 nm.

4.3.5. Análisis morfológico de las bacterias

Para la evaluación de la morfología celular, las bacterias seleccionadas se cultivaron en medio líquido definido con y sin litio. En este caso, la finalidad fue observar cuán importante puede ser la variación en la morfología o la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares asociada con la presencia de litio. Por esta razón, en este caso se seleccionó una concentración de litio que permita el crecimiento de todas las bacterias, pero que produzca un estrés a la célula más intenso. Para ello, las células fueron cultivadas en medio de cultivo definido sin litio (DM) y con el agregado de 30 g/L de LiCl (medio D30) a partir de un inóculo preparado como se describió anteriormente (sección 4.3.2.). Las bacterias se incubaron hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento y se cosecharon mediante centrifugación a 5.000 rpm por 10 min (Centrífuga Eppendorf 5415R). La pureza de los cultivos se corroboró sembrando alícuotas de cada cultivo en medio APCsal, que se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Posteriormente, las células se fijaron con formaldehído al 10% (v/v) en buffer fosfato (pH 7) durante 48 h a 4 °C. Una vez transcurrido este período, las células se deshidrataron mediante lavados sucesivos con alcohol etílico en concentraciones crecientes, utilizando las siguientes soluciones: 30, 50, 70, 80, 96% (v/v) y, finalmente con etanol absoluto. En cada lavado, las células se resuspendieron cuidadosamente y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min, descartándose el sobrenadante. Una vez

finalizados los lavados, las células se llevaron al Laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Investigaciones para la Industria Química (LASEM - INIQUI), donde se realizaron los puntos críticos y metalizados. Esta etapa es necesaria ya que tanto las bacterias como los polímeros que forman son materiales no conductores, entonces es necesario someterlas a un proceso de recubrimiento con oro/paladio a través de un metalizador (DESK-IV). Además, el proceso de metalización tiene una función protectora, evitando que el material se queme o altere por acción del alto voltaje utilizado (16).

Las muestras preparadas se observaron en el LASEM y se tomaron fotografías de todas las cepas en los dos medios de cultivo, evaluando además la presencia de compuestos orgánicos extracelulares.

4.3.6. Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos tanto de crecimiento como de remoción de litio del sobrenadante fueron evaluados mediante el análisis de la varianza a través de Infostat con un nivel de significancia de 0,05.

En algunos casos además de evaluaron los valores de las medias obtenidas de a pares mediante un análisis de t de Student, también con un nivel de significancia de 0,05.

4.4. Resultados y discusión

La manera en que la presencia de cloruro de litio afecta el crecimiento bacteriano se evaluó tanto a través del crecimiento como de la morfología celular en presencia de la sal. Asimismo, se determinaron las cinéticas de disminución del litio en las soluciones durante el crecimiento y utilizando células en suspensión.

4.4.1. Crecimiento en medio liquido con y sin litio

El crecimiento de las bacterias seleccionadas se evaluó en medio de cultivo líquido definido tanto en presencia de 20 g/L de LiCl (D20) como en su ausencia (DM).

En el caso de la cepa parcialmente identificada como *Bacillus atrophaeus* HX11 (sección 3.4.4.5.), el crecimiento desarrollado en DM alcanza la fase estacionaria rápidamente, a las 9 h de crecimiento (Figura 4.2). Sin embargo, la misma cepa en presencia de litio presenta un comportamiento muy diferente, alcanzando una densidad celular máxima (2,6 veces mayor) a los dos días y medio de cultivo en medio D20, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p<0,05). Con respecto a la

remoción del litio presente en el sobrenadante, esta cepa es capaz de reducir alrededor de un 20% del litio presente inicialmente.

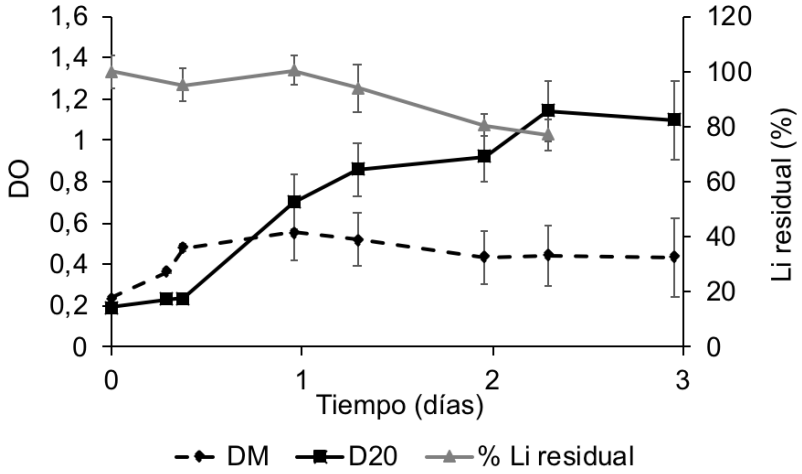


Figura 4.2 Crecimiento de *Bacillus atrophaeus* HX11 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

La forma de crecer de este microorganismo permitió determinar que es capaz de producir sustancias exopoliméricas extracelulares (3.4.4.) por lo que la síntesis de estas sustancias podría ser el mecanismo utilizado por HX11 para interactuar con el litio. Chowdury y col (2008) (17) evaluaron el comportamiento de especies del género *Bacillus* aisladas de lagos salinos en presencia de metales pesados en concentraciones iguales y superiores a 0,1 mM, encontrando que los microorganismos son capaces de formar gránulos en el interior celular acumulando el metal mediante la formación de nanopartículas. En las especies evaluadas (17), esto ocurre con plomo, cromo, mercurio y níquel. Además, se conoce que la interacción microbiana con metales pesados puede ocurrir a través de sustancias producidas por los microorganismos (2). Determinar la forma en la que HX11 interactúa con el litio implica realizar estudios más profundos para establecer si la cepa puede acumularlo intracelularmente o si la síntesis y excreción de sustancias es el mecanismo preferido por la cepa.

Por su parte la cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 también mostró una ventaja en el crecimiento en medio de cultivo D20 con respecto a DM, aunque en este caso en menor proporción que la cepa HX11 (Figura 4.3). Se ha informado en otra cepa de *Bacillus licheniformis*, la B3-15, aislada de muestras de las Islas Vulcano, Italia, que crece mejor en ambientes con sales en comparación al desarrollado en medios sin sal, presentando un crecimiento óptimo en 2% (p/v) de NaCl a pesar de que es capaz de

proliferar en un rango de 0 a 7% (p/v) (18). La cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 también es productora de sustancias poliméricas extracelulares, ya que se ha verificado su capacidad de adherirse a superficies y se ha observado la producción de sustancias de consistencia viscosa en APCsal (sección 3.4.4.1.). Sin embargo, no producen un efecto detectable en relación con el litio soluble presente. Esto puede deberse a que la sustancia sintetizada por el microorganismo en esas condiciones no presenta características que favorezcan la interacción (19). Otras cepas de *Bacillus licheniformis* han sido descriptas con aplicaciones potenciales en la detoxificación de plomo, cromo y cobre mediante bioadsorción en la superficie celular (2). Al ser la composición de los EPS dependiente de los nutrientes disponibles, sería necesario realizar una optimización del medio que permita a *Bacillus licheniformis* FAMB1 sintetizar EPS capaz de adherir litio soluble.

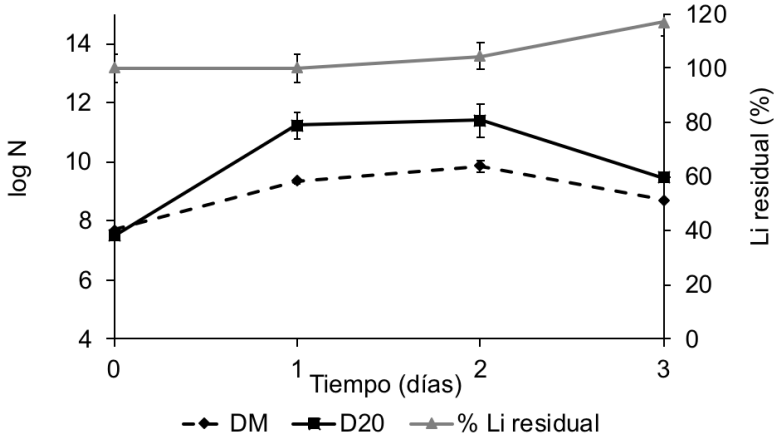


Figura 4.3 Crecimiento de *Bacillus licheniformis* FAMB1 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar. N es la concentración de biomasa expresada en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

La cepa *Bacillus atrophaeus* HA120 alcanzó la fase estacionaria de crecimiento alrededor del sexto día de incubación en ambos medios de cultivo. Aunque se observó un incremento en la DO levemente superior en medio D20 con respecto a DM (Figura 4.4), esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p>0,05$), por lo que se puede afirmar que la presencia de litio no tiene efecto sobre el crecimiento celular de esta cepa. Esta cepa produjo una la disminución de litio en el sobrenadante de alrededor del 30%, que se estabilizó al momento en el que el crecimiento alcanza la fase estacionaria. Se podría hipotetizar entonces que, en este caso el fenómeno de disminución de litio en el sobrenadante es dependiente de la cantidad de células en el medio (o de la superficie que ellas ofrecen para los fenómenos superficiales) y, por

tanto, al alcanzar una cantidad estable, también se estabiliza la cantidad de litio que son capaces de adsorber.

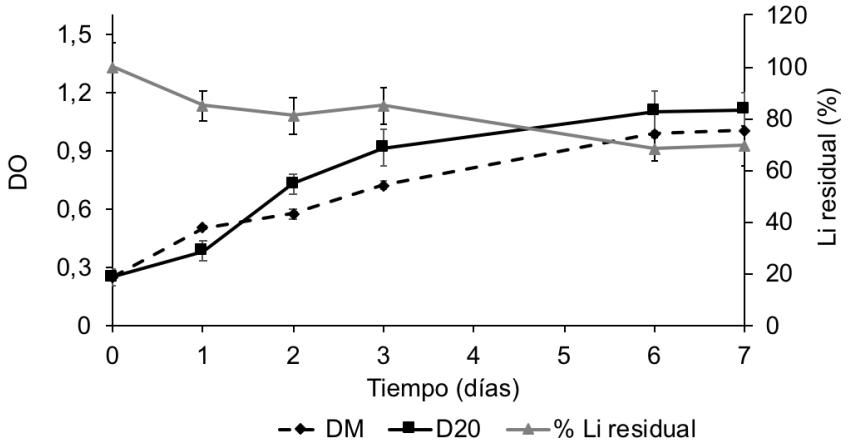


Figura 4.4 Crecimiento de *Bacillus atrophaeus* HA120A en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Por su parte, el aislamiento *Bacillus* sp. SA313 presentó máximos de crecimiento a las 24 h en medio de cultivo DM, a las 31 h en medio de cultivo D20 (Figura 4.5). Se observó una disminución en la cantidad de litio soluble de un 15% a las 31 horas de crecimiento correspondiéndose, como en la cepa *Bacillus atrophaeus* HA120A, la máxima densidad de células con la mayor capacidad de disminución de litio en el sobrenadante. Al final de la fase estacionaria puede observarse un cambio en la tendencia de la concentración de litio en el sobrenadante, que aumenta cuando la densidad óptica disminuye. Dicho aumento en la detección de litio en el sobrenadante podría implicar que son necesarias las células activas o al menos enteras para que ocurra la interacción con litio y por lo tanto su disminución del medio de cultivo. Hong y Brown (2006) (20) determinaron que la capacidad de adsorción de las superficies celulares está ligada tanto a las condiciones extracelulares como a la fase de crecimiento en la que se encuentren las células, por lo que la capacidad de adsorber compuestos puede presentar variaciones a lo largo del crecimiento celular. Este puede ser el fenómeno desarrollado por SA313, ya que la remoción de litio del sobrenadante varía a lo largo del crecimiento celular.

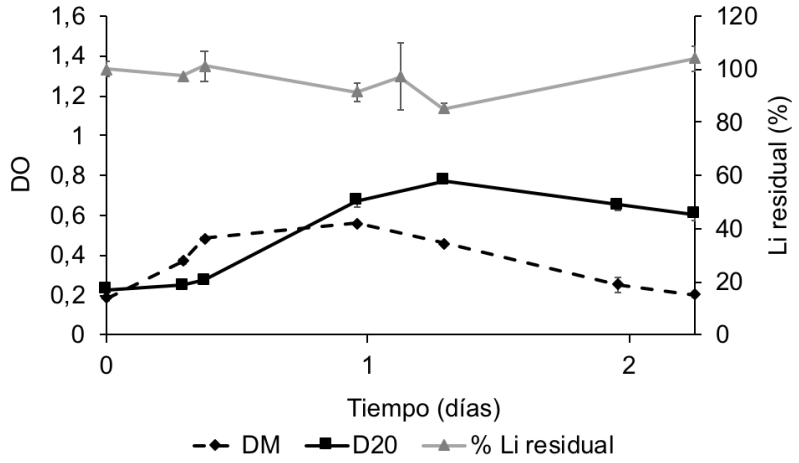


Figura 4.5 Crecimiento de *Bacillus* sp. SA313 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Brevibacterium halotolerans SX139, por su parte, alcanzó la fase estacionaria de crecimiento en 24 horas, tanto en DM como en D20 (Figura 4.6). En este caso, la mayor densidad celular se consiguió en medio de cultivo libre de litio. El Li residual permaneció estable durante los primeros dos días de incubación, y disminuyó en un 20% al tercer día, cuando el microorganismo se encuentra en plena fase estacionaria. Esta bacteria también presenta la capacidad de producir sustancias poliméricas extracelulares, por lo que la disminución de litio soluble podría deberse a la interacción del ion con sustancias sintetizadas por la célula. Sin embargo, sería necesario realizar evaluaciones del EPS formado para poder apoyar esta afirmación.

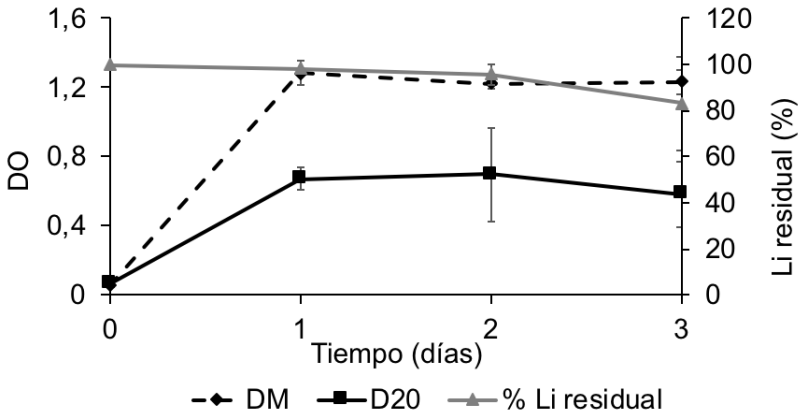


Figura 4.6 Crecimiento de *Brevibacterium halotolerans* SX139 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Las cepas mencionadas arriba -*Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139- se agruparon como cercanas filogenéticamente, mientras que las cepas evaluadas a continuación se agruparon en un *cluster* separado, tal como se discutió en el Capítulo 3 (Sección 3.4.4.5).

Con respecto al crecimiento, el de *Micrococcus* sp. M12 se vio notablemente afectado por la presencia de litio en el medio de cultivo, alcanzando una densidad celular en fase estacionaria de alrededor del doble en DM en comparación con D20 (Figura 4.7). No se detectó disminución en la concentración de litio en el sobrenadante.

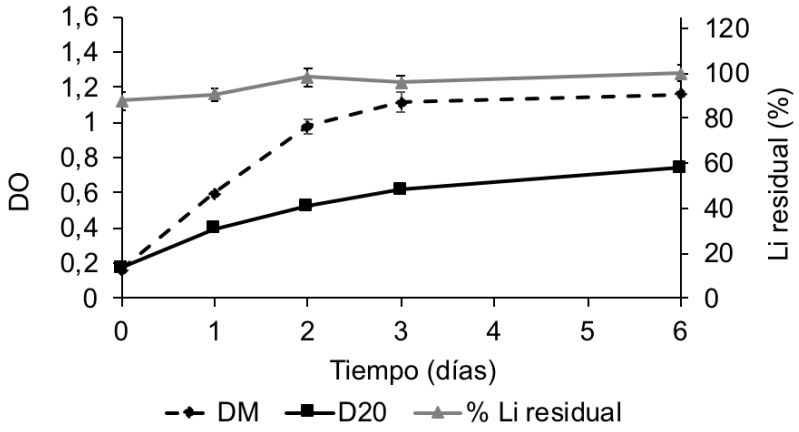


Figura 4.7 Crecimiento de *Micrococcus* sp. M12 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

El crecimiento de *Kocuria rosea* SA129B se vio fuertemente inhibido (no hubo prácticamente crecimiento) cuando la cepa se cultivó en medio con litio (Figura 4.8), y tampoco se observaron cambios en el litio disuelto, probablemente como consecuencia de la ausencia de células que interactúen con el litio. El crecimiento se produjo a gran velocidad en medio de cultivo sin litio, alcanzando el máximo de DO luego de un día de incubación. En el medio D20 el crecimiento fue mucho menor. Esta cepa es capaz de crecer en presencia de NaCl a mayor velocidad que en LiCl (datos no mostrados), por lo que sería específicamente el litio el responsable de la disminución en su capacidad de crecimiento.

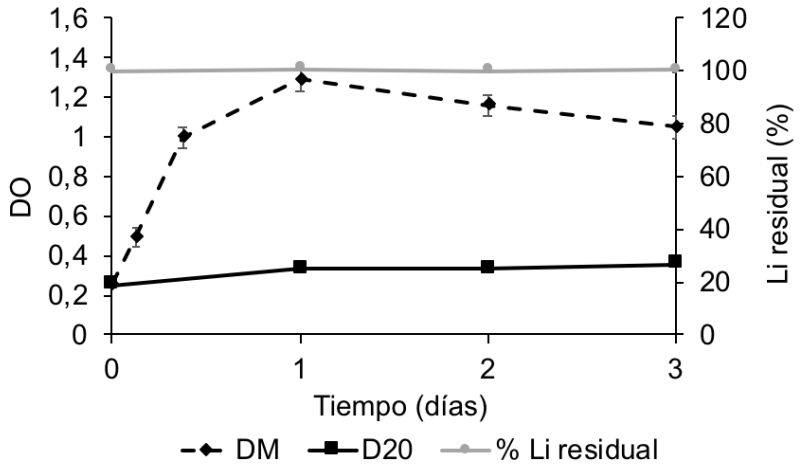


Figura 4.8 Crecimiento de *Kocuria rosea* SA129B en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Por su parte, la cepa *Micrococcus luteus* SA211, aunque pudo crecer en el medio con litio, se vio afectada negativamente por la presencia del metal (Figura 4.9). No se detectó una disminución en el litio en el sobrenadante, a pesar de ser Gram positiva.

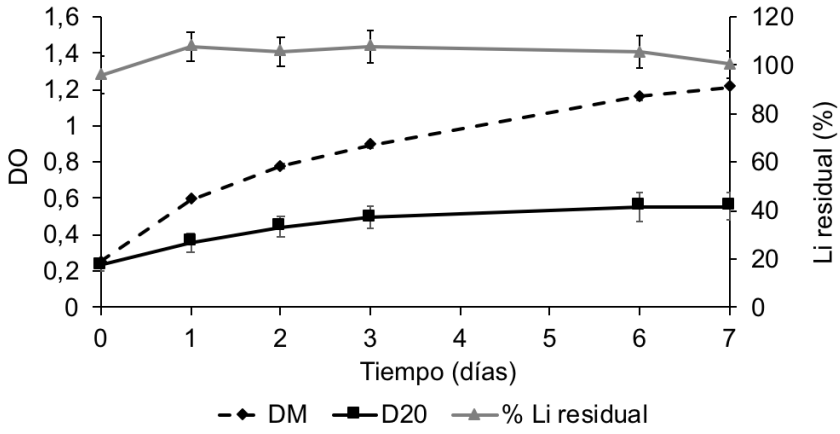


Figura 4.9 Crecimiento de *Micrococcus luteus* SA211 en medio líquido definido sin (DM) y con 20 g/L de LiCl (D20) y Li residual (%) en el sobrenadante del cultivo en D20. DO es la densidad óptica de los cultivos medida a 600 nm. Los valores representados corresponden al promedio de dos réplicas con su correspondiente desvío estándar.

Tsuruta (2005) (13) evaluó la capacidad de una gran variedad de cepas microbianas de adsorber litio en su superficie, encontrando que las bacterias Gram positivas son capaces de adsorber una mayor cantidad frente a las Gram negativas. Esto puede deberse a que los polímeros de ácidos teicoicos de las paredes de las células Gram positivas le dan a la superficie celular una carga negativa fuerte por la

gran cantidad de grupos fosfatos ionizados. Teniendo esto en cuenta, la interacción del litio con la superficie de estas células produce interacciones más fuertes que las encontradas en la superficie de células Gram negativas, obteniendo una mayor acumulación de litio en las paredes Gram positivas. Con respecto por ejemplo al uranio, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* presentaron una mayor capacidad de adsorción, permitiendo estimar que distintas cepas podrían utilizarse para acumular metales de forma selectiva (21).

En el estudio realizado por Belfiore y col (2018) (14) se puede ver que el crecimiento de la bacteria *Rhodococcus* sp $A5_{wh}$ se vio ligeramente inhibido en medio con concentraciones de cloruro litio de alrededor a 20 g/L, la misma concentración utilizada en los medios de cultivo de este estudio. Además, *Rhodococcus* sp $A5_{wh}$ no fue capaz de crecer en el medio con concentración máxima de aproximadamente 60 g/L de LiCl. Es necesario destacar que en ese caso la determinación de tolerancia se llevó a cabo no solamente en medio de cultivo sólido, sino que además se utilizó un medio de cultivo complejo (como es el LB). La determinación de la tolerancia a LiCl en medios de cultivo diferentes puede llevar a obtener resultados de tolerancia diferentes. Se conoce que en medios de cultivo ricos los componentes del medio pueden afectar la interacción del microorganismo con el metal, dando un resultado de mayor tolerancia cuando en realidad la interacción que tiene con el metal es menor que cuando se utiliza un medio de cultivo definido (22). En general, la cantidad total de metal en una muestra no refleja necesariamente el grado toxicidad del metal, ya que muchos otros factores como la salinidad, el pH, la temperatura y los componentes del medio pueden afectar al estrés final del metal sobre la célula (23). Estos factores pueden alterar la concentración final de los iones o alterar el estado de los metales (23). La presencia de componentes tales como peptona, triptona, extracto de levadura en los medios ricos puede llevar a la formación de complejos metálicos, protegiendo a los microorganismos de la toxicidad del metal (23).

A los efectos comparativos, se normalizaron las curvas de crecimiento obtenidas tanto sin litio (DM) (Figura 4.10 A) como con 20 g/L de LiCl (D20) (Figura 4.10 B). Las cepas que mejor crecieron tanto en DM como en D20 fueron SX139 y FAMB1. A pesar de presentar un mayor crecimiento, SX139 recuperó baja cantidad de litio. Como ya se mencionó, HX11 creció mejor en presencia de LiCl en el medio de cultivo y además fue de las cepas que presentó mayor adsorción, por lo que tiene un gran potencial para remover litio soluble del medio.

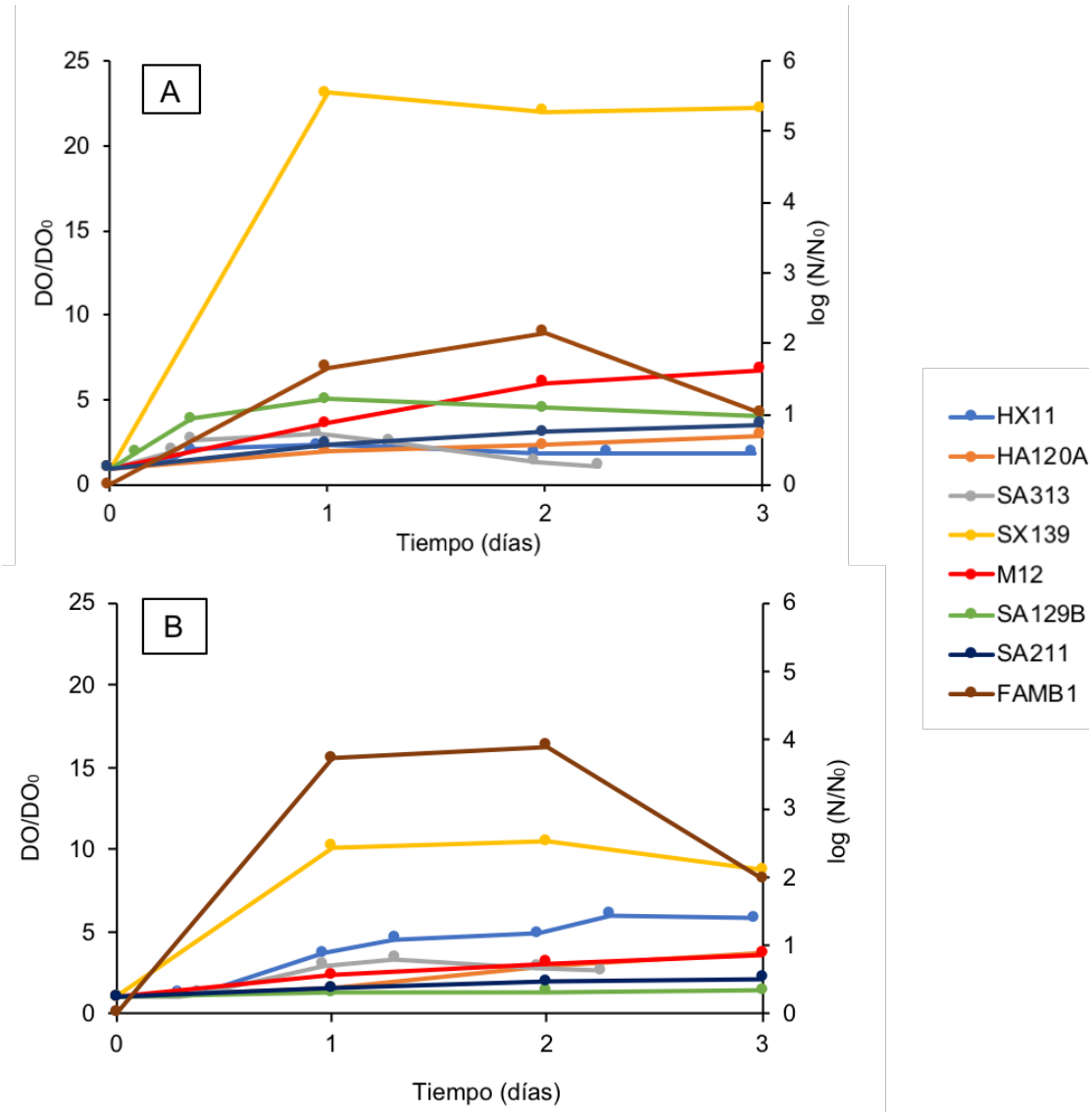


Figura 4.10 Curvas de crecimiento normalizadas para las cepas bacterianas evaluadas en medio de cultivo **(A)** sin (DM) y **(B)** con 20 g/L de LiCl (D20) a 30 °C y 200 rpm. Se utilizaron las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211. El crecimiento para todas las cepas se expresó como una medida de la densidad óptica (DO) a 600 nm, con excepción de la cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 que se expresó como las unidades formadoras de colonia por mililitro (N en UFC/mL) y se representó en el eje secundario. El subíndice 0 indica el valor inicial, que se usó para la normalización.

Se observaron diferencias en el crecimiento de las bacterias evaluadas del Cluster I (sección 3.4.4.5), a pesar de tener un origen filogenético similar. Sin embargo, parece haber una tendencia a un crecimiento mejor en presencia de litio (en la concentración evaluada) que en su ausencia y a una capacidad de interactuar con el metal ocasionando su disminución en el sobrenadante. Al tener en cuenta los valores mínimos de litio residual detectados en el sobrenadante en los medios de cultivo D20

para cada cepa, independientemente del tiempo que les haya tomado alcanzar ese valor, se puede ver que las que producen una mayor remoción son HA120A, HX11 y SA313 (Figura 4.11). Todas estas cepas son cercanas desde el punto de vista filogenético (sección 3.4.4.5.) y se detectó además que producen una sustancia polimérica extracelular (sección 3.4.4.2).

Asimismo, las diferencias encontradas entre las concentraciones de litio detectadas en los sobrenadantes de la cepa HA120A en relación con el resto son estadísticamente significativas (p<0,001), por lo que se puede afirmar que esta cepa es la que produce la mayor remoción de litio soluble del grupo evaluado.

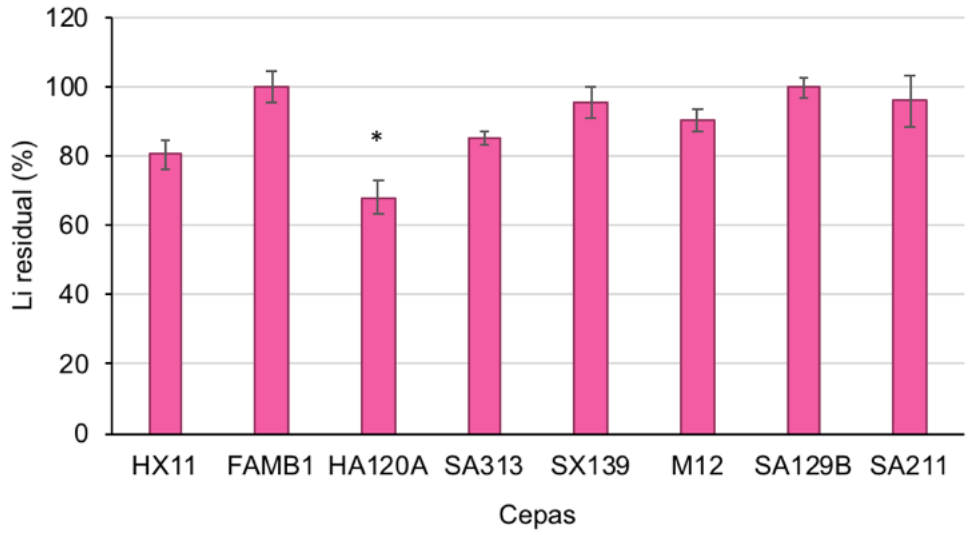


Figura 4.11 Litio residual mínimo detectado en el sobrenadante durante el crecimiento de las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211, en medio líquido definido con 20 g/L de LiCl a 30 °C y 200 rpm. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar. El asterisco indica la cepa que más litio recuperó, con una diferencia estadísticamente significativa utilizando un nivel de significación de 0,05.

4.4.2. Adsorción del litio

Se realizó un ensayo para establecer si las variaciones de litio observadas en los sobrenadantes celulares era consecuencia de la interacción del metal con las células en suspensión.

En el caso del aislamiento *Bacillus atrophaeus* HX11, se observó una disminución inmediata de litio soluble de un 20% en el tiempo cero, correspondiente al momento del agregado de las células, y luego continuó disminuyendo hasta alcanzar valores del 50% de remoción de litio a las 8 h de incubación (Figura 4.12). Estos valores de

remoción presentaron la misma tendencia que los resultados de la sección anterior donde el mismo microorganismo fue capaz de remover el 20% del litio soluble en el medio de cultivo durante el crecimiento.

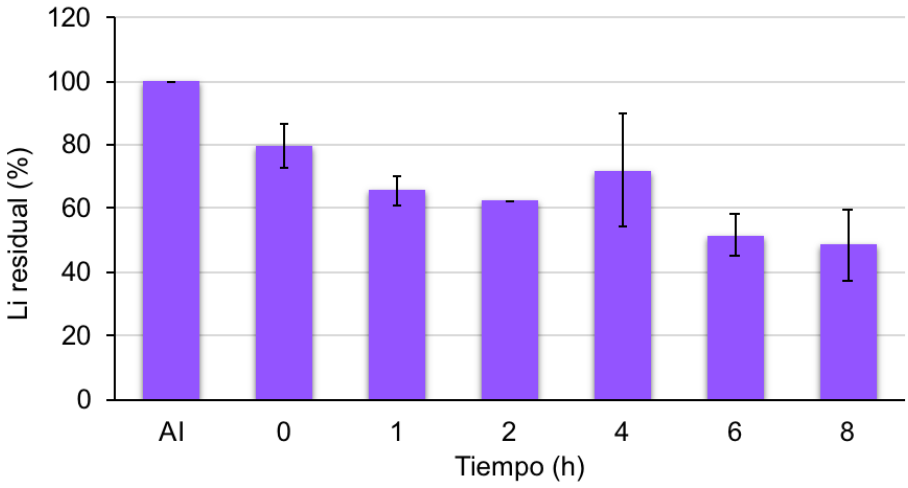


Figura 4.12 Remoción de litio empleando *Bacillus atrophaeus* HX11. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Por su parte, la cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 alcanzó los valores máximos de adsorción de litio 1 h luego de haber inoculado las células (Figura 4.13). En este caso se produjo una disminución de litio en el sobrenadante de hasta un 30% aproximadamente, sin embargo, la tendencia no se mantuvo, sino que al contrario las siguientes mediciones mostraron valores de litio más elevado en el sobrenadante. De un modo interesante otro estudio realizado también con una cepa de *Bacillus licheniformis* demostró que dicha bacteria tiene la capacidad de adsorber litio utilizando una solución con la misma concentración de LiCl, mismo valor de pH y con la misma proporción de células que la utilizada en este trabajo en una cantidad de 56,5 µmoles/g de biomasa seca en 1 hora (13). Esto significa que alrededor de 1,5% del litio inicial fue capaz de unirse a las células o a alguna estructura y dejar de estar disponible en solución. Sin embargo, en nuestro caso, la cepa *Bacillus licheniformis* FAMB1 demostró una mayor capacidad de adsorción siendo capaz de retener hasta el 15% del litio en solución.

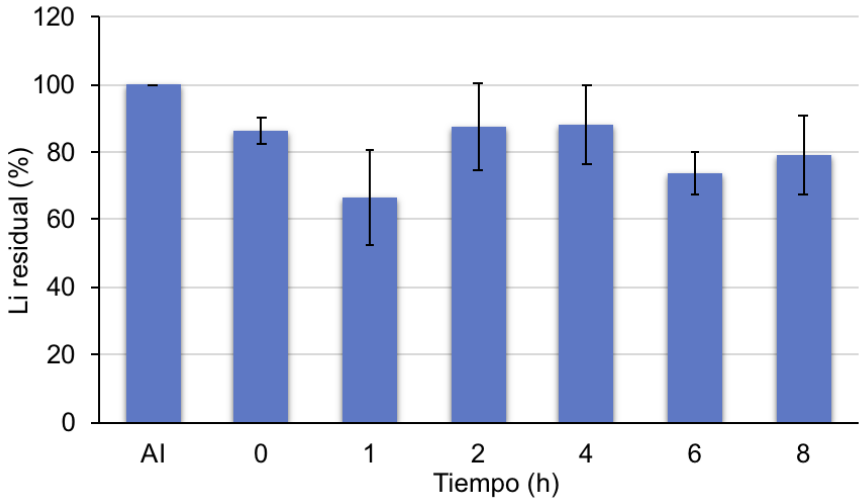


Figura 4.13 Remoción de litio empleando *Bacillus licheniformis* FAMB1. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Para la cepa *Bacillus atrophaeus* HA120A, la remoción de litio de la solución inmediatamente luego de agregar el inóculo fue del 10% y luego aumentó hasta alcanzar el 40% a las 2 h (Figura 4.14). Es importante aclarar que durante el experimento de adsorción las células no pueden crecer, ya que la solución a la que son inoculadas solo contiene agua y litio. Si se comparan los resultados obtenidos para la misma cepa con respecto a la capacidad de adsorber litio cuando está creciendo, se puede observar que las interacciones con el metal fueron similares en ambos casos (sección 4.4.1).

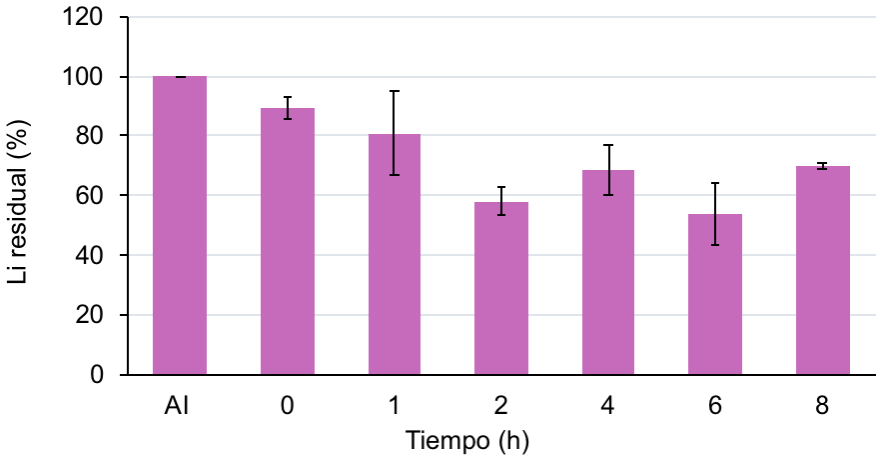


Figura 4.14 Remoción de litio empleando *Bacillus atrophaeus* HA120A. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Cuando se empleó la cepa *Bacillus* sp. SA313, se observó una disminución inmediata del 30% del litio en el sobrenadante, manteniéndose de ese modo hasta las determinaciones realizadas incluso después de 6 h de incubación (Figura 4.15).

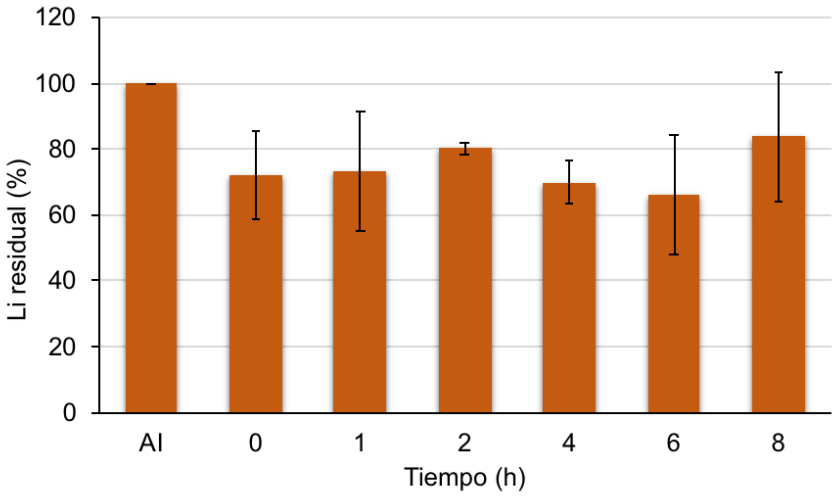


Figura 4.15 Remoción de litio empleando *Bacillus* sp. SA313. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Brevibacterium halotolerans SX139 no mostró capacidad de adsorber litio en las primeras horas de incubación, detectándose una disminución de litio soluble en el sobrenadante recién luego de las 2 h (Figura 4.16). A partir de ese momento, el litio soluble continuó disminuyendo y a las 8 h alcanzó el máximo valor de adsorción de alrededor de 40%. Otras especies del género evaluadas por Tsuruta (2005) fueron capaces de acumular litio de forma muy eficiente, adsorbiendo alrededor del 25% de litio inicial en una hora (13), superando los valores alcanzados por SX139 en ese tiempo. Sin embargo, con esta última se alcanzaron mayores valores de adsorción, aunque en un tiempo más prolongado.

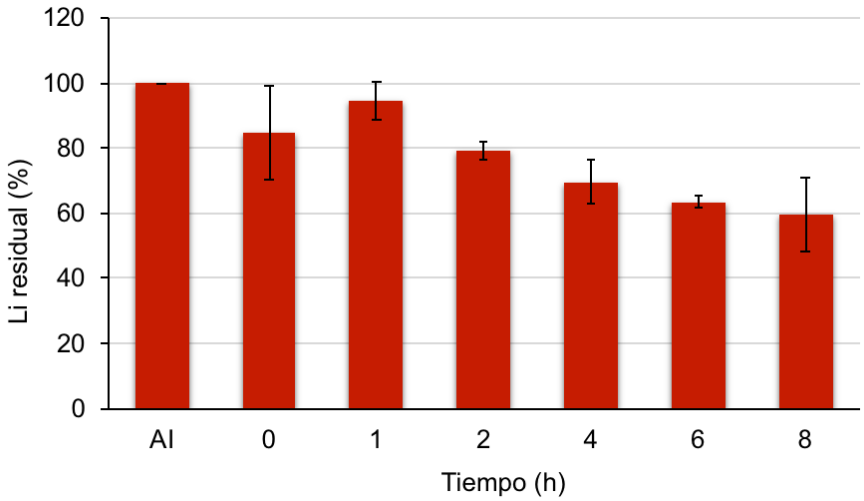


Figura 4.16 Remoción de litio empleando *Brevibacterium halotolerans* SX139. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Las tres últimas cepas pertenecen al Filo Actinobacteria. *Micrococcus* sp M12 se mostró capaz de reducir entre el 20 y 30% del litio soluble, de manera estable hasta el final del ensayo (Figura 4.17).

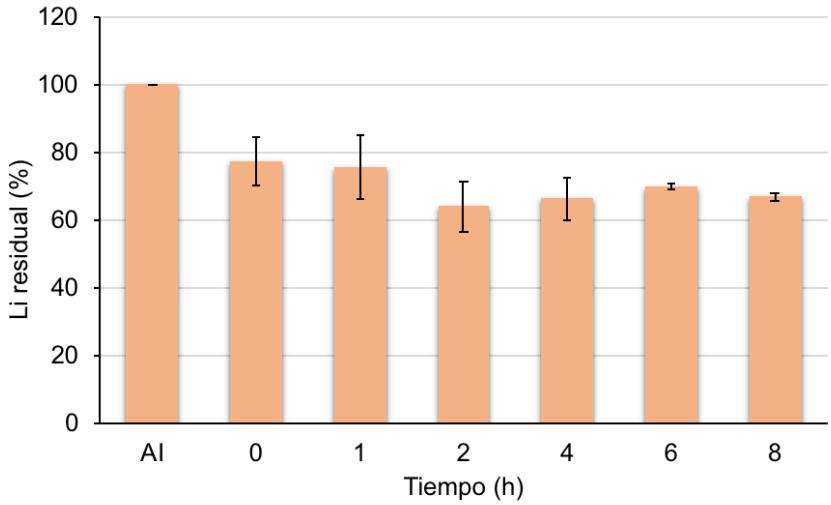


Figura 4.17 Remoción de litio empleando *Micrococcus* sp. M12. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Por otro lado, con *Kocuria rosea* SA129B se produjo la mayor disminución de litio soluble en el menor tiempo, alcanzando el 50% de remoción de litio en el sobrenadante inmediatamente luego de agregar las células a la solución (Figura 4.18).

Sin embargo, este fenómeno no se mantuvo estable, observándose a las dos horas la reaparición paulatina de litio en el sobrenadante hasta alcanzar la concentración inicial. En este caso se pudo evidenciar que el fenómeno de adsorción mediado por esta cepa fue inmediato y reversible, por lo que parecería haber una gran afinidad de las células por el litio, el cual se va desorbiendo con el tiempo.

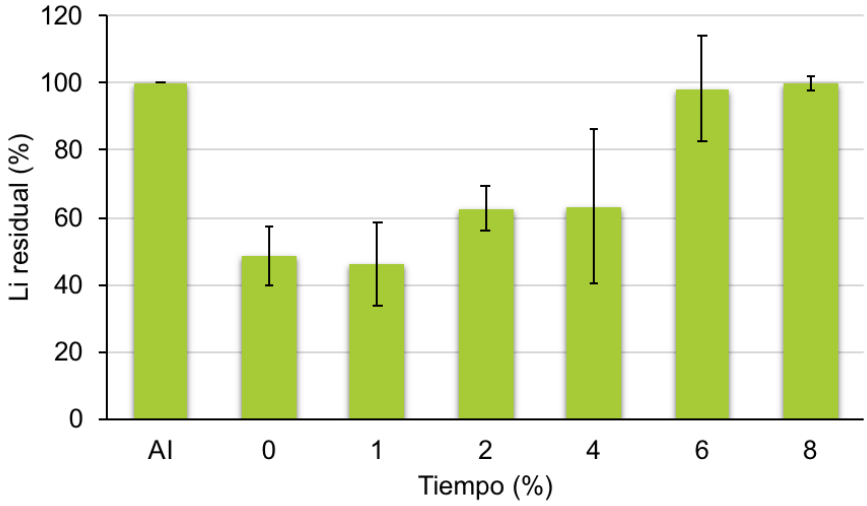


Figura 4.18 Remoción de litio empleando *Kocuria rosea* SA129B. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

Por su parte, *M. luteus* SA211 mostró una mínima adsorción de litio soluble (Figura 4.19). Luego de las 6 horas de comenzado el ensayo se alcanzó el valor máximo de adsorción de alrededor de 30%, aunque luego el litio fue rápidamente desorbido.

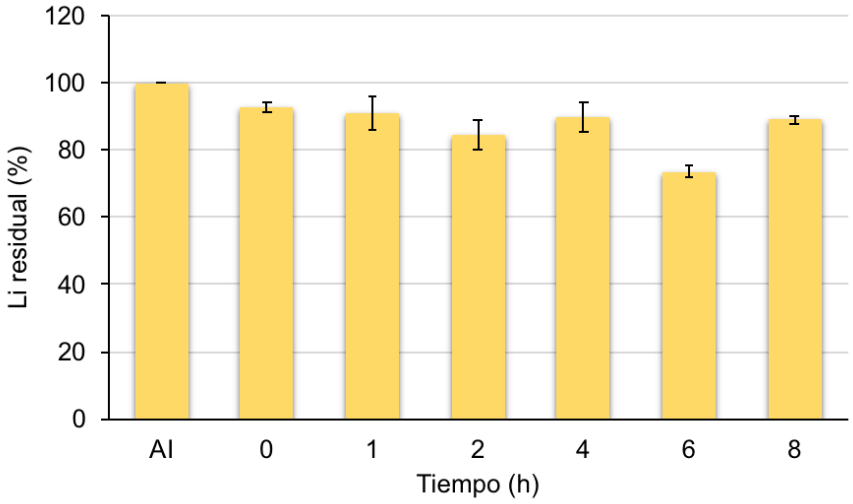


Figura 4.19 Remoción de litio empleando *Micrococcus luteus* SA211. Se muestra el litio residual detectado en el sobrenadante antes (AI) y después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

En este ensayo cabe destacar que, aunque la masa agregada en cada caso fue la misma, en las cepas formadoras de EPS no se pudo distinguir cuales fueron las proporciones de EPS y de células que se agregaron a la solución. Para las tres últimas cepas, que no forman EPS, la biomasa agregada incluyó solo células, por lo que las interacciones del metal con la superficie celular fueron directas, mientras que, en el caso de las bacterias formadoras de EPS, las interacciones del metal pudieron ser tanto con las células como con el EPS. Dependiendo de la carga y composición del EPS producido, las interacciones podrían ser diferentes. Por esto sería muy importante profundizar en el estudio y determinar la composición del EPS, ya que esto podría permitir dilucidar el mecanismo de interacción con el litio y potenciarla.

En el estudio desarrollado por Belfiore y col (2018) (14) se logró recuperar alrededor del 40% del litio agregado luego de 3 horas. Sin embargo, es necesario considerar que la masa de células que utilizaron es 100 veces mayor que la empleada en este ensayo, por lo que también será mucho mayor la superficie de interacción con la solución de litio. Además, Ren y col (2015) (9) demostraron que la cantidad de biomasa agregada a la solución de metales es un parámetro muy importante que determina el grado de adsorción para una concentración inicial determinada. Esto puede ocurrir por un aumento en la disponibilidad de sitios en la superficie que pueden interactuar con los iones cuando aumenta la concentración de biomasa agregada (9). Asimismo, el valor de pH de la solución de metal utilizada también afecta el fenómeno de adsorción. Se vio que para la adsorción de plomo llevada a cabo por la cepa *Bacillus* PZ-1, los valores de pH que favorecieron el fenómeno se encontraron entre 5

y 6. De la misma forma, Tsuruta (2005) (13) encontró que el valor óptimo de pH para la adsorción de litio en *Arthrobacter nicotianae* IAM12342 fue de 5,8. Sin embargo, este valor debe ser optimizado, ya que las características diferentes de la superficie y de las sustancias producidas por las células utilizadas pueden ser exclusivas de cada cepa.

A modo de síntesis, y teniendo en cuenta la máxima capacidad de adsorción de todos los microorganismos o mínimo valor de Li residual obtenido en el sobrenadante (Figura 4.20), se puede determinar que la cepa *Bacillus atrophaeus* HX11 es la más efectiva, seguida por *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Brevibacterium halotolerans* SX139 y *Kocuria rosea* SA129B. Sin embargo, se verificó mediante el análisis realizado que la remoción de litio no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las cepas evaluadas. En general, todas presentan una capacidad de remover un porcentaje similar de litio soluble del medio (p=0,0237).

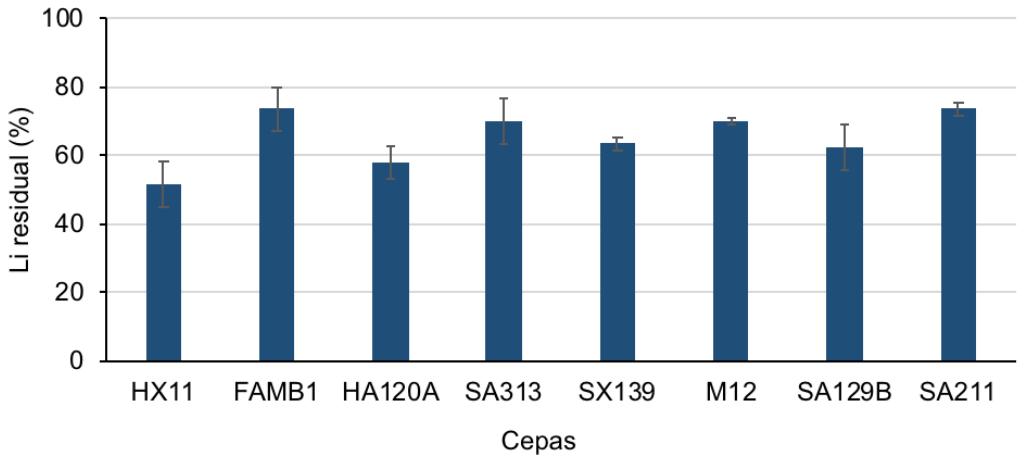


Figura 4.20 Mínimo valor de litio residual detectado en el sobrenadante después de inocular 0,01 g de células (peso húmedo) a 50 mL de una solución 72 µM de LiCl. Se evaluaron las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Micrococcus* sp. M12, *Kocuria rosea* SA129B y *Micrococcus luteus* SA211 Los valores corresponden al promedio de dos medidas con su correspondiente desvío estándar.

4.4.3. Efecto del litio sobre las células

Las sustancias poliméricas extracelulares cumplen muchas funciones en las bacterias, entre las que se encuentra la protección contra la deshidratación y la estabilización de enzimas cuando ocurren variaciones a nivel ambiental del pH y la salinidad (14). Además, participan en la adhesión a superficies y el secuestro de sustancias tóxicas (24). Una de las maneras en las que las células pueden responder

a la presencia de sales es mediante la síntesis de estas sustancias y síntesis de estructuras de resistencia a pesar de que eso requiere de un gasto adicional de energía (25, 28, 30).

Las bacterias están formadas por una membrana plasmática cubierta de una pared celular rígida, que es la que define la morfología celular. Cuando se exponen a concentraciones altas de sales, el agua fluye a través de la membrana, afectando el volumen, la turgencia celular y las concentraciones de iones intracelulares (26).

Se realizó microscopía electrónica de barrido sobre las cepas seleccionadas cultivadas en medio de cultivo definido sin (DM) y con el agregado de 30 g/L de cloruro de litio (D30), lo que permitió no sólo determinar variaciones en la morfología, sino además detectar y verificar la producción de sustancias poliméricas extracelulares en algunas de ellas. Muchas de las especies de *Bacillus* están relacionadas íntimamente desde el punto de vista filogenético, y además tienen la capacidad de producir EPS (27), como ya se había observado en los ensayos de biofilm (sección 3.4.4.2.).

B. atrophaeus HX11 creció de manera bacilar y con producción de EPS que mantiene a las células unidas entre si en medio DM (Figura 4.21), mientras que en presencia de litio la morfología celular presentó grandes variaciones. Se observaron células de mayor tamaño, más redondeadas y/o amorfas, perdiendo la clásica morfología bacilar. En medio D30 también se observó la producción de EPS. Una posible explicación a las formas redondas de las células en presencia de litio podría deberse a la formación de esporas ya que se sabe que las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de formar estas estructuras de resistencia (28). Sella y col (2014) (29) han estudiado la estructura de las esporas formadas por *B. atrophaeus*, describiendo que además se forman en condiciones de estrés ambiental. Las estructuras formadas por esta cepa en estado de esporulación tienen morfología diferente a la de las células en estado vegetativo, tomando formas más redondeadas similares a la observada en HX11 (Figura 4.21, flechas rojas). Además, bajo algunas condiciones de estrés, células con morfología de bacilo pueden desarrollar zonas con protuberancias como ocurre en el caso de la interacción de células con antibióticos β-lactámicos y en general, es una manera de retener la estabilidad osmótica (30), por lo que coincidiría con el efecto que tiene en HX11 la presencia de altas concentraciones de LiCl.

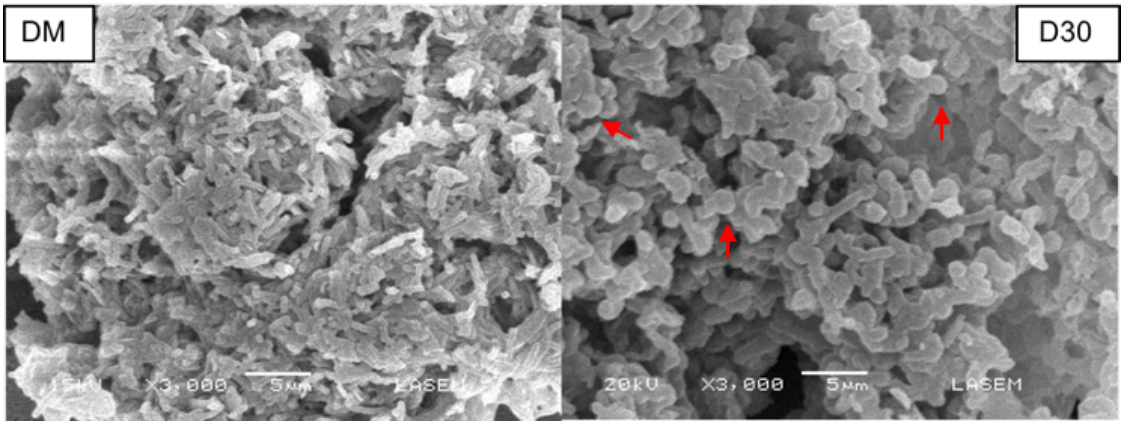


Figura 4.21 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus atrophaeus* HX11 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm. Las flechas rojas señalan la formación de estructuras redondeadas que podrían ser estructuras de resistencia.

En el caso de la cepa *B. licheniformis* FAMB1, se pudo ver un claro aumento en la producción de EPS en presencia de cloruro de litio (Figura 4.22). En cuanto a su morfología, se observaron filamentos alargados, similares a los bacilos observados en ausencia de litio, pero en este caso se encontraron formando cadenas que se entrelazan. Esto ocurre como consecuencia de producción de peptidoglicano en las paredes laterales, pero no en la pared septal durante el crecimiento, entonces las células se hacen muy largas. Este fenómeno se conoce como “Filamentación” o “Elongación” y se ha detectado en algunas bacterias como respuesta a diferentes tipos de estrés, como es la presencia de antibióticos u otros estresores físicos o químicos (30).

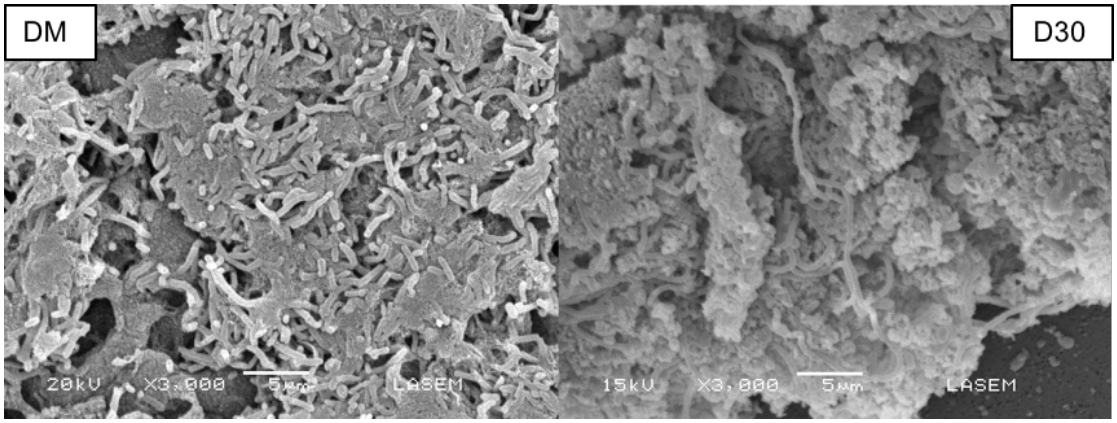


Figura 4.22 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus licheniformis* FAMB1 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

Con respecto a la síntesis de EPS, Belfiore y col (2018) (14) encontraron un resultado similar con la cepa *Rhodococcus* sp $A5_{wh}$, la cual fue capaz de formar estas sustancias tanto en presencia como en ausencia de LiCl, aunque la producción fue mucho más notable en presencia del metal. Este resultado puede estar ligado a que la presencia del metal produce estrés en las células bacterianas, induciendo la síntesis de sustancias exopoliméricas para proteger la célula, como un mecanismo de aislamiento del medio. La síntesis de estas sustancias, su posterior acumulación y el agrupamiento de las células, lleva a la formación de un biofilm. Es importante destacar que, aunque un microorganismo sea capaz de formar biofilm en un soporte, esta capacidad no ocurre en cualquier superficie, por lo que es necesario tener en cuenta la naturaleza del material al que el microorganismo es capaz de adherirse.

La producción de EPS por parte *B. licheniformis* ha demostrado tener varias utilidades y aplicaciones industriales, entre ellas la recuperación de petróleo, como describieron Simpson y col (2011) (27), destacando además la conocida capacidad de producir EPS por miembros pertenecientes a dicha especie. En otros casos se ha demostrado que es indispensable la presencia de *B. licheniformis* DB1-9 para que la biomineralización de sales de carbonatos pueda ocurrir. En este caso la bacteria participa en la regulación del pH y en la síntesis de anhidrasa carbónica, ambas indispensables para que se lleve a cabo la mineralización (31).

Otro de los casos en los que la síntesis de EPS fue notable en el crecimiento en los dos medios de cultivo estudiados, fue con *B. atrophaeus* HA120A (Figura 4.23). Sin bien no se observaron grandes cambios a nivel morfológico en presencia del metal, se observó nuevamente un incremento en la síntesis de EPS en D30. Es interesante observar que el EPS producido cambia su aspecto en los diferentes medios de cultivo. Mientras que en DM se forma una película delgada y homogénea, en D20 la sustancia es amorfa, granular y compacta en la cual las células están inmersas formando aglomerados.

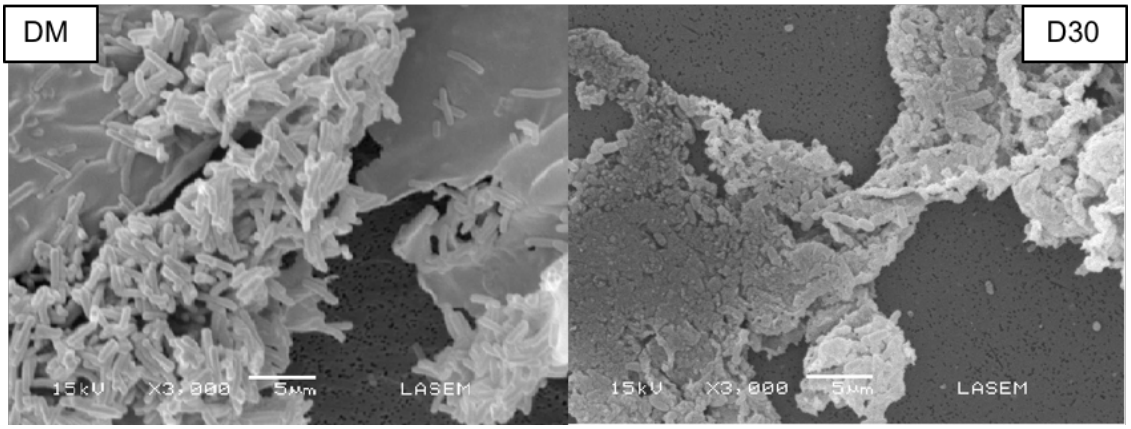


Figura 4.23 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus atrophaeus* HA120A obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

La cepa *Bacillus* sp. SA313 sintetiza una gran cantidad de EPS cubriendo las células en los dos medios de cultivo utilizados (Figura 4.24). Es interesante observar que en DM hay una importante producción de EPS y una morfología irregular de las células similar a la observada anteriormente en presencia de litio por las otras cepas de *Bacillus.* Estos resultados podrían indicar que para esta cepa el medio DM resulta estresante probablemente por la falta de sales en el mismo. Se hace necesario recordar que las cepas aisladas y seleccionadas provienen de un ambiente con altas concentraciones de varias sales y el crecimiento en un medio sin sal puede resultar muy diferente a sus requerimientos naturales. Las mismas células tienen una morfología diferente cuando crecen en D30. En este caso la morfología celular es apenas percibida, como consecuencia de la gran cantidad de EPS presente.

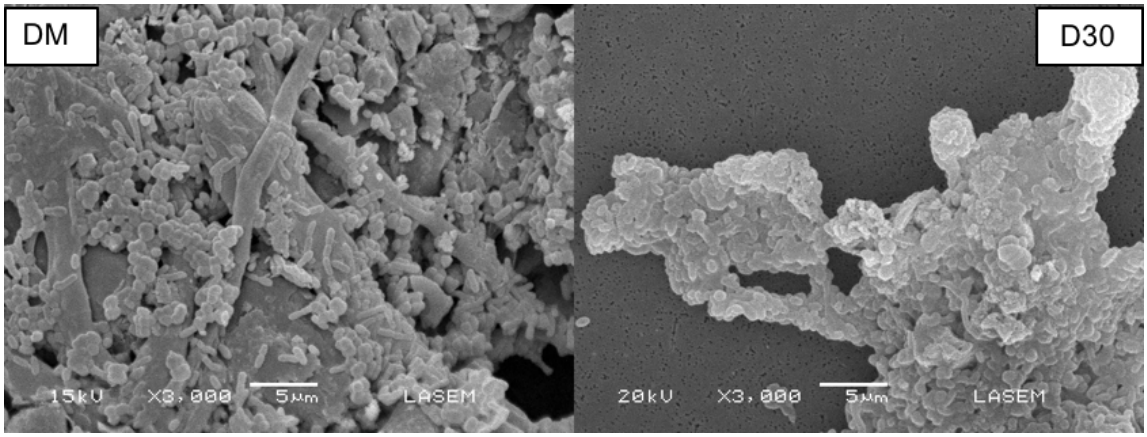


Figura 4.24 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Bacillus* sp. SA313 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

En el caso de *B. halotolerans* SX139 se puede observar un claro crecimiento bacilar tanto en ausencia como en presencia de litio (Figura 4.25). Se detectó en las fotografías la presencia de fibras cuando la bacteria creció en presencia de litio, y se observaron bacterias adheridas a la superficie de las fibras formando EPS. Cabe destacar que se pudo determinar que las fibras están formadas por compuestos orgánicos.

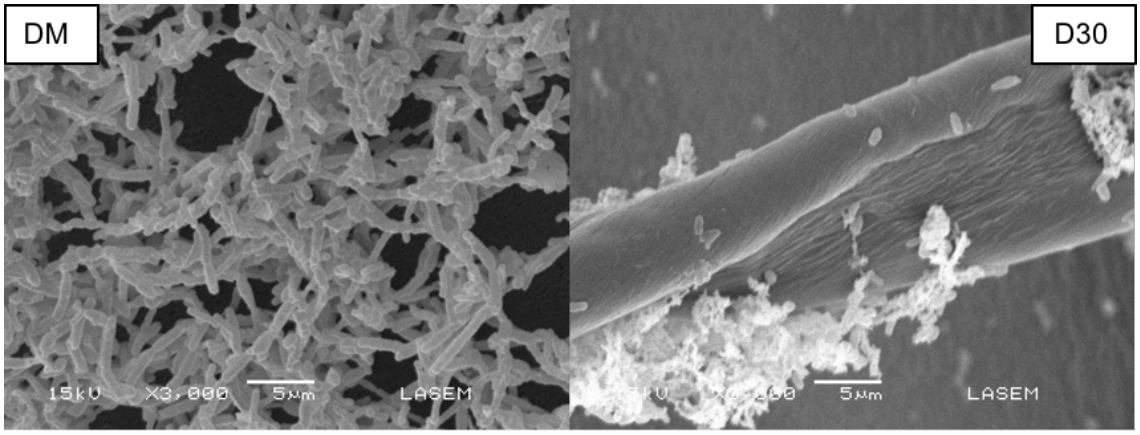


Figura 4.25 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Brevibacterium halotolerans* SX139 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

Con respecto a *Micrococcus* sp M12, se observaron células cocoides pequeñas agrupadas en tétradas, que en presencia de litio generaron una sustancia adherida a su superficie que las mantuvo unidas (Figura 4.26). Además, se encontraron en D30 células amorfas. Por otro lado, y en concordancia con los resultados de las curvas de crecimiento, se observó una disminución en la cantidad de células presentes cuando crecieron en D30.

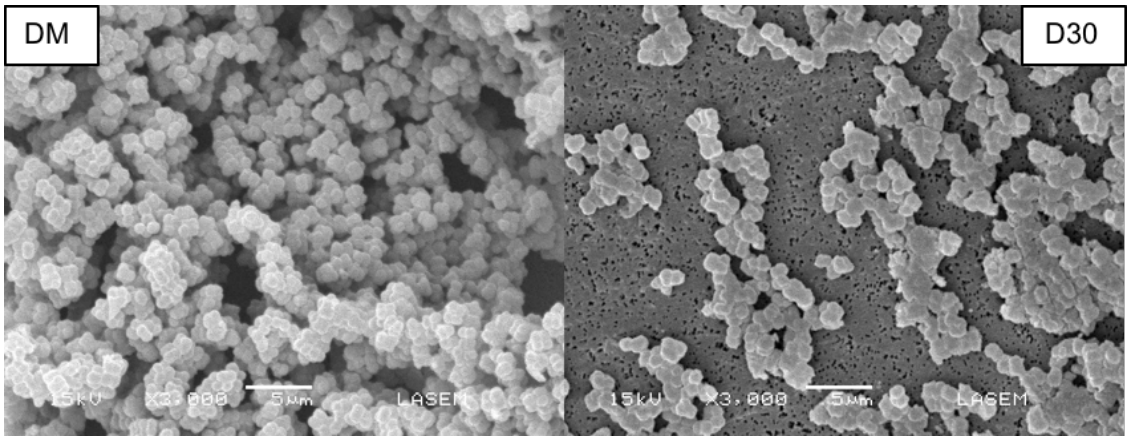


Figura 4.26 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Micrococcus* sp. M12 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

La disminución del número de células en presencia de litio es aún más notable en el caso de *Kocuria rosea* SA129B, donde en ambos medios de cultivo se observaron cocos (Figura 4.27). En este caso la morfología celular no se vio afectada y tampoco se detectó la síntesis de sustancias poliméricas, siendo el número de células la única variación en cuanto al crecimiento celular en ambos medios de cultivo.

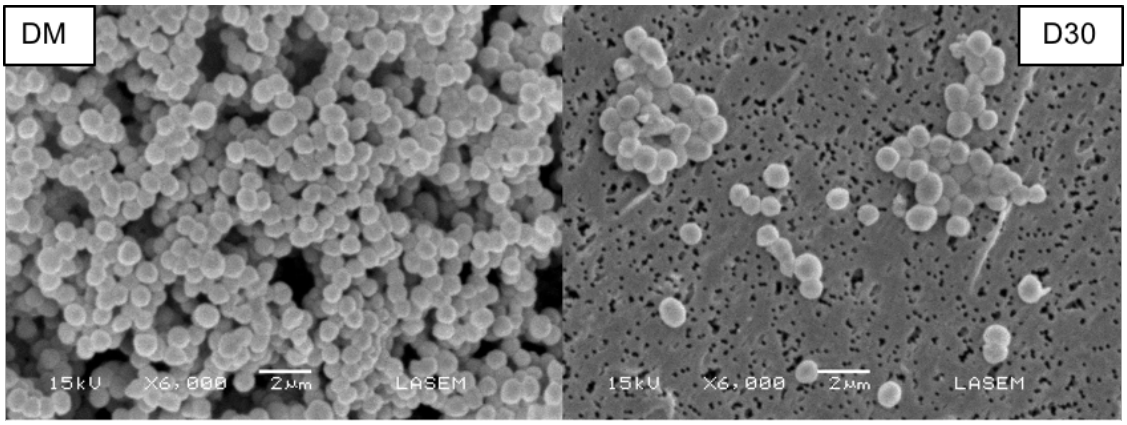


Figura 4.27 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Kocuria rosea* SA129B obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

Por último, la cepa *Micrococcus luteus* SA211 mantuvo su morfología celular tanto en presencia como en ausencia de cloruro de litio, y no se observaron variaciones en el crecimiento en ninguno de los medios de cultivos estudiados para este aislamiento (Figura 4.28).

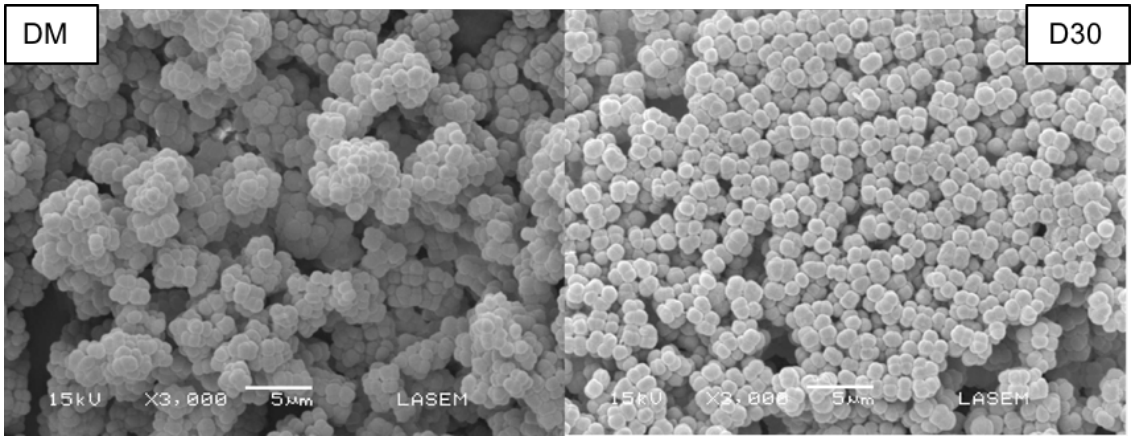


Figura 4.28 Fotografías de microscopía electrónica de barrido (3.000X) de *Micrococcus luteus* SA211 obtenidos de cultivos en medio líquido definido sin (DM) y con 30 g/L de LiCl (D30) a 30 °C y 200 rpm.

En un estudio llevado a cabo por Kurniawan y Yamamoto (2013) (32), se determinó que los biofilms ambientales presentan cargas tanto negativas como positivas en su superficie, por lo que son capaces de interactuar con una gran diversidad de iones. En particular, el litio demostró ser capaz de adsorberse al biofilm de manera instantánea, manteniéndose estable esa unión con el transcurso del tiempo (32). Esos resultados mostraron el potencial de recuperación de metales y metales pesados utilizando biofilms. La cantidad de litio adsorbido varía de acuerdo con la composición del biofilm (32), la que a su vez está ligada a las condiciones ambientales bajo las cuales se formó. Estos resultados parecen ser prometedores si se piensa en los diferentes biofilms formados por las cepas aisladas del Salar del Hombre Muerto, siempre teniendo en cuenta que, para utilizar los EPS en procesos de remoción de litio, primero se deberán estudiar con mayor profundidad y ajustar las variables críticas involucradas en el proceso de formación del EPS.

4.5. Conclusiones

Los microorganismos aislados del Salar del Hombre Muerto y clasificados como tolerantes a cloruro de litio presentaron la capacidad de crecer en presencia y ausencia del metal. Las cepas *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A y *Bacillus* sp. SA313 mostraron mayor absorbancia cuando fueron cultivadas con 20 g/L de LiCl que cuando lo hicieron en ausencia de él.

Con respecto a la capacidad de adsorber litio durante el crecimiento, *B. atrophaeus* HA120A es la que presenta la mayor capacidad de adsorción, seguida por *B. atrophaeus* HX11 y *Bacillus* sp. SA313, estas últimas dos sin diferencias

estadísticamente significativas entre ellas en la capacidad de adsorción. Todas las otras cepas presentaron menores porcentajes de adsorción de litio durante el crecimiento celular.

Teniendo en cuenta la capacidad de adsorber litio desde la solución acuosa, todas las cepas presentaron un comportamiento parecido, teniendo capacidades muy similares en cuanto a la adsorción.

La presencia de litio indujo algunos cambios observables como la formación de estructuras celulares de morfología esférica (*Bacillus atrophaeus* HX11), un aumento en la síntesis de EPS (*Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313, *Brevibacterium halotolerans* SX139) y variaciones en la morfología celular (*Micrococcus* sp. M12). En cambio, algunas células permanecieron inalteradas en presencia de la sal (*Kocuria rosea* SA120B, *Micrococcus luteus* SA211). La síntesis de EPS también se detectó en algunas cepas en ausencia de litio (*Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus* sp. SA313).

Con los resultados obtenidos se puede afirmar que las cepas *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus atrophaeus* HX11, *Bacillus* sp. SA313 y *Bacillus licheniformis* FAMB1 presentan un gran potencial de remoción del metal y por lo tanto pueden ser consideradas como una alternativa prometedora en procesos de remoción de litio soluble.

4.6. Referencias

1. Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotox Environ Safe 45(3):198-207.
2. Sowmya M, Hatha AM. 2017. Cadmium and Lead Tolerance Mechanisms in Bacteria and the Role of Halotolerant and Moderately Halophilic Bacteria in Their Remediation. p 557–573. *In* Surajit Das and Hirak Ranjan Dash (ed), Handbook of Metal-Microbe interaction and Bioremediation. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
3. Rivadeneyra A, Gonzalez-Martinez A, Portela GR, Martin-Ramos DJ, Gonzalez-Lopez J, Rivadeneyra MA. 2017. Biomineralisation of carbonate and sulphate by the halophilic bacterium *Halomonas maura* at different manganese concentrations. Extremophiles 21(6):1049-1056.
4. Das AP, Sukla LB, Pradhan N, Nayak S. 2011. Manganese biomining: a review. Bioresour Technol 102(16):7381-7387.

5. Shuster J, Marsden S, Maclean LC, Ball J, Bolin T, Southam G. 2015. The immobilization of gold from gold (III) chloride by a halophilic sulphate-reducing bacterial consortium. Geol Soc Lon Spec Pub 393(1):249-263.
6. Arias D, Cisternas LA, Rivas M. 2017. Biomineralization of calcium and magnesium crystals from seawater by halotolerant bacteria isolated from Atacama Salar (Chile). Desalination 405:1-9.
7. Moraga NB, Irazusta V, Amoroso MJ, Rajal VB. 2017. Bio-precipitates produced by two autochthonous boron tolerant *Streptomyces* strains. J Environ Chem Eng 5(4):3373-3383.
8. Ghosh S, Das AP. 2017. Bioleaching of manganese from mining waste residues using *Acinetobacter* sp. Geology, Ecology, and Landscapes 1:(2)77-83.
9. Ren G, Jin Y, Zhang C, Gu H, Qu J. 2015. Characteristics of *Bacillus* sp. PZ-1 and its biosorption to Pb (II). Ecotox Environ Safe 117:141-148.
10. Li PS, Tao HC. 2013. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. Crit Rev Microbiol, 41(2):140–149.
11. Gehrke T, Telegdi J, Thierry D, Sand W. 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. Appl Environ Microbiol 64(7):2743-2727.
12. Pollmann K, Kutschke S, Matys S, Raff J, Hlawacek G, Lederer FL. 2018. Bio-recycling of metals: recycling of technical products using biological applications. Biotechnol Adv 36:1048-1062.
13. Tsuruta T. 2005. Removal and recovery of lithium using various microorganisms. J Biosci Bioeng 100(5):562–566.
14. Belfiore C, Curia MV, Farías ME. 2018. Characterization of *Rhodococcus* sp. A5wh isolated from a high-altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress. Rev Argent Microbiol 50(3):311-322.
15. Gracia LG, Rodríguez LC, Ceba MR. 1997. Spectrophotometric determination of lithium with Quinizarin in drugs and serum. Talanta 44(1):75-83.
16. Sahagún JLO. 1997. Métodos de microscopía electrónica de barrido en biología. Globo Livros, Cantabria: Universidad de Cantabria, Santander.
17. Chowdhury S, Mishra M, Adarsh VK, Mukherjee A, Thakur AR, Chaudhur SR. 2008. Novel metal accumulator and protease secretor microbes from East Calcutta Wetland. Am J Biochem Biotech 3:255-264.
18. Maugeri TL, Gugliandolo C, Caccamo D, Panico A, Lama L, Gambacorta A, Nicolaus B. 2002. A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. Biotechnol Lett 24(7):515-519.

19. Mishra A, Jha B. 2013. Microbial Exopolysacchrides. p 179–192. *In* Rosenberg E, DeLong EF, Thompson F, Lory S, Stackebrandt E (ed), The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology, 4th ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
20. Hong Y, Brown DG. 2006. Cell surface acid–base properties of *Escherichia coli* and *Bacillus brevis* and variation as a function of growth phase, nitrogen source and C:N ratio. Colloids Surf B: Biointerfaces 50(2):112-119.
21. Tsuruta T. 2005. Separation of rare earth elements by microorganisms. J Nucl Radiochem Sci 6(1):81-84.
22. Majzlik P, Strasky A, Adam V, Nemec M, Trnkova L, Zehnalek J, Hubalek J, Provaznik I, Kizek R. 2011. Influence of zinc (II) and copper (II) ions on Streptomyces bacteria revealed by electrochemistry. Int J Electrochem Sci 6:2171–2191.
23. Solanki P, Kothari V. 2012. Metal tolerance in halotolerant bacteria isolated from saline soil of Khambhat. Res Biotechnol 3(3):1-11.
24. De Carvalho CC, Fernandes P. 2010. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. Mar Drugs 8(3):705-727.
25. Poli A, Di Donato P, Abbamondi GR, Nicolaus B. 2011. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. Archaea 2011:1-10.
26. Sleator RD, Hill C. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol Rev 26(1):49-71.
27. Simpson DR, Natraj NR, McInerney, MJ, Duncan KE. 2011. Biosurfactant-producing *Bacillus* are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities. Appl Microbiol Biotechnol 91:1083-1093.
28. Plomp M, Leighton TJ, Wheeler KE, Pitesky ME, Malkin AJ. 2005. *Bacillus atrophaeus* outer spore coat assembly and ultrastructure. Langmuir 21(23):10710-10716.
29. Sella SR, Vandenberghe LP, Soccol CR. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. Microbiol Res 169(12):931-939.
30. Cushnie TPT, O'Driscoll NH, Lamb AJ. 2016. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. Cell Mol Life Sci 73: 4471-4492.
31. Han Z, Gao X, Zhao H, Tucker M, Zhao Y, Bi Z, Pan J, Wu G, Yan H. 2018. Extracellular and Intracellular Biomineralization Induced by *Bacillus licheniformis* DB1-9 at Different Mg/Ca Molar Ratios. Minerals 8(12):1-26.
32. Kurniawan A, Yamamoto T. 2013. Biofilm polymer for biosorption of pollutant ions. Procedia Environ Sci 17:179-187.

Capítulo 5: Crecimiento de arqueas de distintos orígenes en presencia de litio

5.1. Introducción

Los microorganismos pertenecientes al dominio Archaea son conocidos por su capacidad de colonizar ambientes extremos. Dichas características los hace muy atractivos por las potenciales aplicaciones biotecnológicas que tienen tanto las arqueas metabólicamente activas como sus productos (1, 2, 3, 4). Cuando los microorganismos extremos colonizan ambientes hipersalinos, toman la clasificación de halófilos y pueden encontrarse en suelos, salmueras, lagos salinos, etc. que están distribuidos alrededor del mundo (5). Los microorganismos halófilos no pueden crecer en ausencia de sales; necesitan al menos 0,2 M de NaCl para crecer, y los halófilos extremos crecen hasta en 5,1 M de NaCl. De acuerdo a las concentraciones de sal requeridas para el crecimiento, los halófilos débiles crecen de forma óptima entre 0,2 y 0,85 M (11,7 y 49,7 g/L de NaCl respectivamente), los moderados entre 0,85 y 3,4 M (49,7 y 198,7 g/L de NaCl respectivamente) y los extremos entre 3,4 y 5,1 M de NaCl (198,7 y 298 g/L respectivamente) (5). A pesar de que en un ambiente hipersalino se encuentran generalmente mezclas de diferentes sales en altas concentraciones, la clasificación de las arqueas halófilas se ha establecido de acuerdo con la concentración de NaCl requerida. Es importante destacar que dicha sal es la que se encuentra generalmente en concentración más elevada en ambientes hipersalinos, siendo uno de los principales factores que afectan el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos presentes.

La zona del Altiplano Andino ubicado en Sudamérica alberga un gran número de salares, siendo el de Uyuni al sudoeste de Bolivia, el más grande del mundo (6). Las salmueras pertenecientes a este salar fueron clasificadas como atalasohalinas de acuerdo con su composición química y tienen concentraciones relativamente elevadas de litio y boro, de gran importancia para su explotación (7, 8).

Con respecto a la composición microbiana del Salar, se han llevado a cabo algunos estudios mediante técnicas de metagenómica y cultivo de microorganismos en laboratorio, lo que ha permitido encontrar nuevas especies, tales como son *Halomonas boliviensis, Chromohalobacter sarecensis, Halomonas andenensis*, por mencionar algunos ejemplos (9, 10, 11). En el estudio metagenómico llevado a cabo por Haferburg y col (2017) (8) en muestras provenientes del Salar de Uyuni se detectó la presencia de 26 géneros pertenecientes a la familia Halobacteriaceae, mientras que Perez-Fernandez y col (2016) (6) encontraron una gran variedad de bacterias presentes generalmente en ambientes halófilos, además de arqueas termófilas y psicrófilas. Esto muestra la gran variedad de microorganismos que están presentes en el Salar y que pudieron ser detectados mediante técnicas moleculares.

El mecanismo mediante el cual las arqueas pueden sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de NaCl depende de su capacidad de acumular en el interior celular solutos iónicos, principalmente cloruro de potasio, lo que les permite equilibrar las presiones osmóticas, evitar la lisis celular y promover el correcto plegamiento de las proteínas (5, 12, 13). Cuando alcanzan valores de concentración de KCl en el interior celular equivalente a la concentración de NaCl extracelular, las haloarqueas son capaces de mantener su turgencia y evitar la entrada o salida de agua. Las enzimas de estos organismos están adaptadas a las condiciones intracelulares que incluyen residuos acídicos, que les permite mantener su actividad incluso en presencia de altas concentraciones de sal (12, 13, 14). El estrés resultante de las altas concentraciones de sales puede deberse a la osmolaridad y, por otro lado, a la toxicidad de iones específicos (15). La presencia de compuestos tóxicos en el ambiente puede tener efectos negativos en el crecimiento y metabolismo, afectando la viabilidad y actividad celulares.

5.1.1. Arqueas halófilas, propiedades e interacción con sales

La adaptación de las arqueas halófilas a ambientes hipersalinos hace que no sean capaces de crecer en ambientes sin sales o bajos de salinidad. Asimismo, si se reemplazan iones sodio por otros iones, las células pueden sufrir estrés, y en muchos de los casos los iones pueden tener un efecto tóxico sobre los microorganismos (16).

La Astrobiología estudia el posible comportamiento de microorganismos en otros planetas y ha ganado interés en el último tiempo. Al tener las arqueas la capacidad de crecer en ambientes hostiles semejantes a los observados en planetas como Marte, se utilizan como modelos de vida en dichos planetas (5, 17). Sus características de crecimiento en altas concentraciones de sales, bajas temperaturas y altos niveles de

radiación aumentan la posibilidad que las arqueas sobrevivan en el espacio y en otros planetas (18). En relación con las sales presentes en Marte, se conoce que con respecto a los cationes los depósitos de magnesio y sodio son abundantes, mientras que el sulfato y los cloruros son los aniones predominantes (19). Asimismo, se han detectado grandes cantidades de sales de perclorato en Marte, siendo el Salar de Atacama en Chile uno de los ambientes más similares en cuanto a la presencia de esta sal. Se conoce además que los percloratos son tóxicos y oxidantes fuertes (19).

En general, la presencia de diferentes metales puede afectar el crecimiento de las arqueas y tener efectos negativos además en otros procesos, como por ejemplo en la capacidad de adhesión a superficies. En el caso, por ejemplo, de *Halobacterium salinarum* R1, las células crecen adheridas más firmemente a superficies en presencia de cinc, el níquel no afecta la propiedad de adhesión y el cobre la reduce (20). Esto permite pensar que las células son capaces de detectar, distinguir y reaccionar de manera diferencial a la presencia de distintos metales en un ambiente determinado. Las adaptaciones a las altas concentraciones de sodio no aseguran que los microorganismos sean capaces de tolerar concentraciones elevadas de cualquier metal, y su interacción con diferentes elementos del ambiente hace que puedan sobrevivir en algunos ambientes y colonizarlos, pero que les sea imposible vivir en otros.

La presencia de iones magnesio y potasio, además del sodio, no tendrían un efecto tóxico en el crecimiento microbiano (21). Muchas de las enzimas de estos microorganismos tienen funciones que están relacionadas estrechamente con la concentración de estos iones, por lo que cumplen funciones importantes en el metabolismo. Por otro lado, es posible que la presencia de otros iones como las sales de percloratos tengan efectos negativos sobre el crecimiento o la actividad enzimática de los microorganismos (16).

Poco se sabe de la manera en la que las arqueas del Salar de Uyuni interactúan con el litio, y la forma en la que dicho metal puede afectar su crecimiento. Conocer el metabolismo microbiano en presencia del metal y su interacción con litio, ayudaría a conocer su potencialidad como recuperadores de litio en diferentes condiciones.

5.2. Objetivos

- Evaluar la tolerancia de arqueas halófilas a soluciones concentradas de LiCl.
- Estudiar el crecimiento de arqueas provenientes del Salar de Uyuni en presencia de litio y determinar la cepa que presente mayor crecimiento.
- Determinar la concentración óptima de cloruro de sodio para el crecimiento de los aislamientos bajo estudio.

5.3. Materiales y métodos

Se evaluó la tolerancia a LiCl de arqueas halófilas mediante crecimiento en medios de cultivo en presencia de la sal.

5.3.1. Cepas estudiadas

Las cepas de arqueas utilizadas para los ensayos de tolerancia y crecimiento en litio incluyeron algunas de colección ATCC y otras, de distinto origen, pertenecientes al Instituto de Tecnología Marina y Ambiental (IMET) a cargo del Dr Shiladitya DasSarma (Tabla 5.1). Esta tarea se desarrolló en el Instituto de Tecnología Marina y Ambiental de la Universidad de Maryland, Baltimore, Estados Unidos, durante una estadía de tres meses y medio (desde Julio a Noviembre de 2018) producto de una Beca Fulbright.

Tabla 5.1 Arqueas halófilas evaluadas de acuerdo a su tolerancia a LiCl. Las composiciones químicas de las salmueras fueron obtenidas de bibliografía (8, 22, 23).

Identidad de las cepas	Origen	Na (g/L)	Li (g/L)	Mg (g/L)	K (g/L)
Natrialba asiatica	ATCC 700177 (24)	-	-	-	-
Halobacterium noricense	ATCC BAA-852 (25)	-	-	-	-
Haloarcula sinaiiensis	ATCC 33800 (26)	-	-	-	-
Halobacterium curtirubrum	ATCC 33170 (27)	-	-	-	-
Halorubrum saccharovorum	ATCC 29252 (28)	-	-	-	-
Halorubrum lacusprofundi	ATCC 49239 (29)	-	-	-	-

N/D: No determinado
N/I: Cepas que aún no han sido identificadas
[A]Cepa provista por T. Torsvik a S. DasSarma

Tabla 5.1 Arqueas halófilas evaluadas de acuerdo a su tolerancia a LiCl. Las composiciones químicas de las salmueras fueron obtenidas de bibliografía (8, 22, 23) *(Continuación).*

Identidad de las cepas	Origen	Na (g/L)	Li (g/L)	Mg (g/L)	K (g/L)
Halorubrum sp. 3-1	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
4-1A$_{(N/I)}$	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
4-2$_{(N/I)}$	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
Haloterrigena sp. 5-1	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
5-3 $_{(N/I)}$	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
Natrinema sp. 5-4	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
5-5 $_{(N/I)}$	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
5-6A $_{(N/I)}$	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
Natrinema sp. 6-1	Salar de Uyuni, Bolivia	92,9	0,8	14,9	16,4
Halobacterium sp. GSL-19	Great Salt Lake, EEUU	58,5	N/D	6,65	3,75
Halobacterium salinarum	IMET^{A}	-	-	-	-
Salarchaeum sp.DS1	Mar Muerto	34	20	41	75,6
Halobacterium sp. NRC-1	San Francisco, California	25	N/D	N/D	N/D

N/D: No determinado
N/I: Cepas que aún no han sido identificadas
^{A}Cepa provista por T. Torsvik a S. DasSarma

Se utilizó la totalidad de las cepas (a excepción de DS1, que fue aislada posteriormente a la realización de este ensayo) para la determinación de la tolerancia en medio de cultivo sólido, mientras que para el ensayo en medio líquido se utilizaron las cepas parcialmente identificadas del Salar de Uyuni y 4-2, DS1 del Mar Muerto, *Halobacterium* sp. NRC-1 y *Halorubrum lacusprofundi.* Estas cepas fueron seleccionadas para el estudio en medio líquido porque el Salar de Uyuni tiene concentraciones elevadas de litio en su salmuera, por lo que se estimó que las arqueas aisladas de este sitio tendrían una tolerancia elevada al cloruro de litio. En el Mar Muerto la concentración de litio es baja, por lo que se buscó determinar la

sensibilidad de una cepa originaria de un ambiente en el que no haya estado en contacto con concentraciones altas de litio. Finalmente, y como ya se conoce la forma en la que *Halobacterium* sp. NRC-1 y *Halorubrum lacusprofundi* crecen en presencia de cloruro de sodio (5), se las utilizó como controles de crecimiento, y además se buscó caracterizarlas de acuerdo con su tolerancia al cloruro de litio.

Las cepas de colección tienen diferentes orígenes, entre los que se encuentran el Deep Lake, en la Antártida (*Halorubrum lacusprofundi,* que además es psicrófila), una mina salina en Austria (*Halobacterium noricense*) y el Mar Rojo (Sabkha Gavish, cepa *Haloarcula sinaiiensis*), por mencionar algunos ejemplos. Los ambientes desde donde fueron aisladas las cepas utilizadas son diferentes entre sí. Esto puede ser útil para realizar comparaciones entre cepas que no necesariamente utilicen los mismos mecanismos para su proliferación en presencia de sales.

5.3.2. Tolerancia a LiCl en medio de cultivo sólido

Todas las arqueas disponibles (Tabla 5.1) se evaluaron de acuerdo con su tolerancia al cloruro de litio en medio de cultivo sólido mediante el ensayo del canal, descripto en el Capítulo 3 (sección 3.3.1). El ensayo se llevó a cabo utilizando medio de cultivo complejo (Complex Media, CM^+) (30) (Tabla 5.2) sólido, lo que se logró con el agregado de agar en una concentración final de 20 g/L, específico para arqueas halófilas.

Tabla 5.2 Composición del medio de cultivo CM^+, utilizado para el crecimiento de arqueas halófilas. El pH se ajustó a 7,2.

Componente	Concentración
NaCl	250 g/L
$MgSO_4.7H_20$	20 g/L
$Na_3C_6H_5O_7$	3 g/L
KCl	2 g/L
Peptona neutralizada	10 g/L
$FeCl_2.4H_2O$	2,3 mg/L
$ZnSO_4.7H_2O$	440 µg/L
$MnSO_4.H_2O$	330 µg/L
$CuSO_4.5H_2O$	10 µg/L

Tal como se describió anteriormente, las placas se prepararon con medio de cultivo CM^+ sólido, en el centro de la placa se realizó un canal cortado con bisturí

estéril y se sembraron las cepas de forma perpendicular al canal desde su borde hacia afuera hasta una distancia de 3 cm. Posteriormente se agregó una solución de 7 o 10 M de LiCl y se incubó a 37 °C hasta observar crecimiento.

5.3.3. Crecimiento en medio líquido con LiCl

De entre las cepas de arqueas evaluadas, al ser halófilas, ninguna es capaz de crecer sin cloruro de sodio. Esto se tuvo en cuenta para la formulación del medio de cultivo con el agregado de cloruro de litio ya que el medio CM^+ cuenta con una concentración de sales cercanas a la saturación. Por esta razón no fue posible simplemente agregar LiCl al medio de cultivo, sino que se redujo la concentración de NaCl hasta 116,88 g/L (2 M) y a este medio (que se denominó CM2) se le agregó LiCl en las concentraciones 42,4; 84,8; 127,2 y 156,9 g/L (1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl, respectivamente) (Tabla 5.3). Asimismo, y para descartar que las posibles variaciones en el crecimiento de las arqueas fuera consecuencia de la disminución de NaCl en el medio de cultivo original, se realizaron curvas de crecimiento en las concentraciones de 116,3; 175,3; 223,76 y 250 g/L NaCl (CM2, CM3, CM4 y CM^+, respectivamente). Se seleccionaron estas concentraciones para cubrir el rango entre el medio base utilizado para los medios preparados con LiCl (116,3 g/L NaCl) y la concentración utilizada de forma rutinaria para el crecimiento de arqueas halófilas (250 g/L NaCl).

El inóculo se preparó en medio CM^+ líquido. Para esto, se sembraron tubos de ensayo conteniendo 3 mL de medio con cada cepa y se incubaron durante 5 días a 37 °C y 200 rpm. Se tomó una alícuota del cultivo que se utilizó para inocular microplacas estériles de 12 pocillos (Corning Costar 3513) conteniendo 3 mL de medio de cultivo correspondiente. Las placas se llevaron a una incubadora con agitación orbital a 37 °C y 100 rpm. Las mediciones de densidad óptica se tomaron utilizando un lector de microplaca Spectramax® Series M multimodal (Molecular Devices).

El crecimiento de las cepas en cada medio (Tabla 5.3) se evaluó por triplicado con un control negativo de cada medio estéril sin inocular. La concentración 3,7 M de LiCl fue la más alta utilizada ya que no fue posible disolver más sal en el medio de cultivo.

Tabla 5.3 Medios de cultivo utilizados para el análisis de tolerancia a LiCl de arqueas halófilas.

Medio de cultivo	Sales y concentraciones utilizadas
CM2	116,9 g/L (2 M) NaCl
CM3	175,3 g/L (3 M) NaCl
CM4	233,8 g/L (4 M) NaCl
CM^+	250 g/L (4,3 M) NaCl
CM2Li1	116,3 g/L (2 M) NaCl + 42,4 g/L (1 M) LiCl
CM2Li2	116,3 g/L (2 M) NaCl + 84,8 g/L (2 M) LiCl
CM2Li3	116,3 g/L (2 M) NaCl + 127,2 g/L (3 M) LiCl
CM2Li3,7	116,3 g/L (2 M) NaCl + 156,9 g/L (3,7 M) LiCl

5.3.4. Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza a través de Infostat con un nivel de significancia de 0,05. En algunos casos además de evaluaron los valores de las medias obtenidas de a pares mediante un análisis de T de Student, también con un nivel de significancia de 0,05.

5.4. Resultados y discusión

Se evaluaron cepas de arqueas halófilas de distinto origen de acuerdo con su tolerancia al LiCl en medios de cultivo sólido y líquido.

5.4.1. Tolerancia a LiCl en medio sólido

Las 16 cepas de arqueas se evaluaron de acuerdo con su tolerancia frente a LiCl 7 M (296,8 g/L) y 10 M (424 g/L) (Figura 5.1). Se pudo determinar que, tanto las cepas aisladas del Salar de Uyuni (Figuras 5.1 C y D) como las otras (Figuras 5.1 A y B), crecieron hasta las cercanías del borde del canal que contenía las soluciones de cloruro de litio.

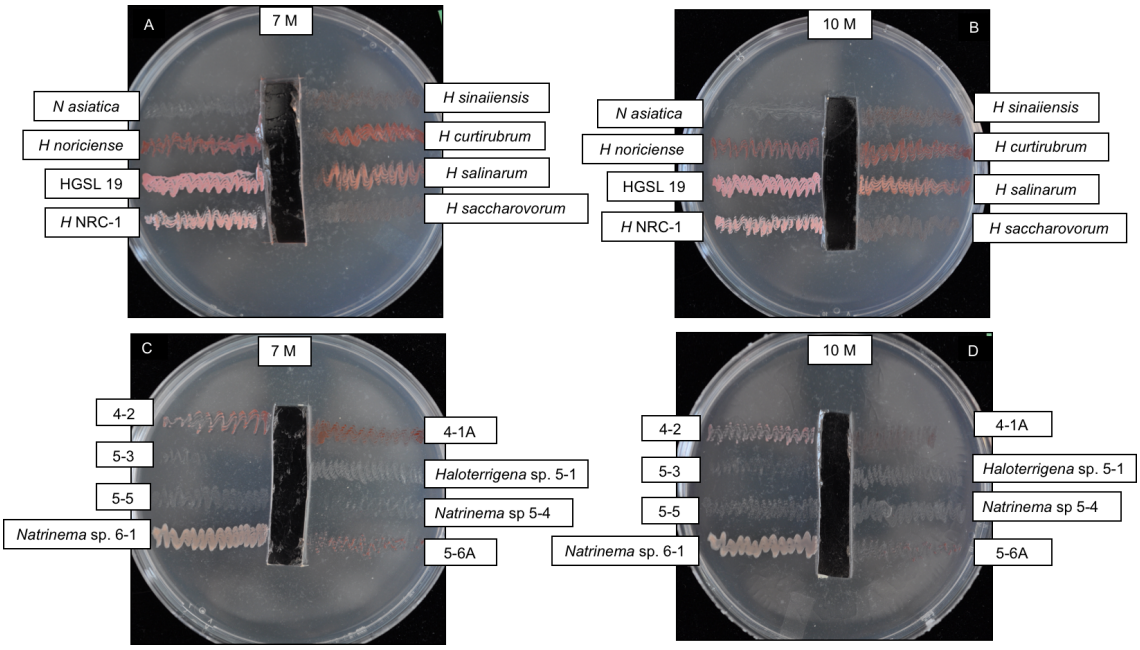


Figura 5.1 Ensayo del canal para determinar la tolerancia de cepas de arqueas halófilas a 7 M (A y C) y 10 M (B y C) de LiCl (296,8 y 424 g/L). Se incluyeron cepas ATCC (*N. asiática, H noriciense, H sinaiiensis, H curtirubrum, H salinarum, H saccharovorum*), *Halobacterium* sp. GSL-19, *Halobacterium* sp. NRC-1, y cepas aisladas del Salar de Uyuni, Bolivia, llamadas 4-1A, 4-2, *Haloterrigena* sp. 5-1, 5-3, *Natrinema* sp. 5-4, 5-5, 5-6ª y *Natrinema* sp. 6-1.

Se puede ver entonces que todas las cepas tienen la habilidad de crecer en las dos concentraciones de LiCl ensayadas. Esto permitió confirmar que las cepas de arqueas seleccionadas pueden crecer no solamente en presencia de concentraciones cercanas a la saturación de NaCl, sino que crecen en presencia de soluciones altas de LiCl. La capacidad de estas cepas de proliferar con concentraciones prácticamente saturantes de litio (10 M) indica que la maquinaria especializada que desarrollan para su crecimiento les da capacidad para sobrevivir en ambientes con distintas composiciones de sales (31). En el caso del estudio de tolerancia realizado con bacterias frente a soluciones concentradas de LiCl (3.4.3.), se observó que muchas de las cepas obtenidas de ambientes hipersalinos eran sensibles a la presencia de la solución concentrada de LiCl (32), contrariamente a lo determinado para las arqueas evaluadas.

Como se desarrolló en el Capítulo 1 (sección 1.4.1.2), las reservas de litio a nivel mundial se localizan en sitios específicos. Sin embargo, las zonas con elevada salinidad abarcan áreas mucho más amplias y dispersas alrededor del mundo. Cabe destacar que elevada salinidad no implica la presencia de litio en altas concentraciones, sino que mayormente están compuestas por sodio, cloruros, potasio y magnesio (33). A través del resultado del ensayo del canal, se determinó que

arqueas halófilas que no fueron aisladas de sitios con concentraciones de litio elevadas (como las cepas ATCC) tienen la capacidad de proliferar en presencia de soluciones elevada de la sal. La razón principal de este resultado podría estar ligada entonces a la capacidad intrínseca de los microorganismos de sobrevivir en presencia de concentraciones elevadas de diferentes iones, entre los que pueden encontrarse metales tóxicos. Las arqueas cuentan con distintos mecanismos de defensa frente a metales presentes en el ambiente cuya presencia induce a la activación de respuestas celulares de defensa (34).

La cepa *Halobacterium* sp. NRC-1 fue estudiada en profundidad por Laye y DasSarma (2018) (16) con respecto a su habilidad de crecer en presencia de concentraciones elevadas de cloruros y percloratos de sodio y potasio. Además, la cepa es termotolerante y resistente a la radiación ultravioleta (35, 36, 37). La capacidad de crecer en condiciones donde varios factores ambientales son extremos convierte a esta cepa en una candidata interesante para estudiar en profundidad su comportamiento en esas situaciones.

Halorubrum lacusprofundi es un microorganismo aislado de la Antártida, es halófilo y psicrófilo, además de ser capaz de crecer en presencia de perclorato. En estudios realizados por Laye y DasSarma (2018) (19), se determinó que el crecimiento es inhibido por concentraciones altas de perclorato y magnesio. Sin embargo, este último tuvo un efecto más intenso en la actividad enzimática de la beta galactosidasa bajo estudio que sobre el crecimiento.

Cabe destacar que el crecimiento lento de algunas de las cepas aisladas del Salar de Uyuni, como las 5-3, 5-4 y 5-5 (Figura C y D), es la manera normal de crecimiento en este medio de cultivo y no es consecuencia de la presencia de litio. Las cepas aisladas del Salar de Uyuni y del Mar Muerto demoran al menos 7 días en crecer en CM^+, mientras que las cepas de colección, *Halobacterium* sp. GSL-19 y *Halobacterium* sp. NRC-1 crecen en placa en cuatro días.

Hasta donde llega mi conocimiento, esta es la primera vez que este tipo de ensayos se realiza en arqueas halófilas para evaluar su tolerancia frente a soluciones concentradas de cloruro de litio.

5.4.2. Crecimiento en medio líquido en presencia de LiCl

Los aislamientos provenientes del Salar de Uyuni, del Mar Muerto y dos cepas previamente caracterizadas (*Halobacterium* sp. NRC-1 y *Halobacterium lacusprofundi*) se evaluaron de acuerdo con su capacidad para crecer en medios de cultivo líquido preparado con distintas concentraciones de NaCl y LiCl.

Halobacterium sp. NRC-1 mostró que su crecimiento óptimo se alcanza en medio de cultivo CM^+ (4,3 M NaCl), clasificando a la cepa como halófila extrema, ya que no solo es incapaz de crecer en concentraciones de cloruro de sodio inferiores a 4 M, sino que a dicha concentración alcanza una DO cinco veces menor que la alcanzada en medio CM^+ (Figura 5.2). Este resultado se corresponde con la clasificación previa de esta cepa, caracterizada en profundidad y secuenciada por Ng y col (2000) (38). Con respecto al comportamiento de *Halobacterium* sp. NRC-1 en presencia de cloruro de litio, se observó mejor crecimiento en el medio CM2Li1 (175,3 g/L NaCl + 42,4 g/L LiCl), que a su vez fue mejor que en CM4, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$). El incremento en la concentración de litio perjudicó el crecimiento (CM2Li2) hasta alcanzar la inhibición completa (CM2Li3 y CM2Li3,7). Es interesante observar que el crecimiento en medio CM2Li1 presentó una ventaja con respecto a CM3, que es el medio equivalente en concentración molar total de iones. Al ser una cepa halófila extrema, este resultado parecería ser consecuencia de la naturaleza de las sales en sí, más que de la concentración total de sales en el medio de cultivo. Además, en el medio de cultivo con la mayor concentración de sales total CM2Li3 y CM2Li3,7, donde la concentración neta de sales es 5 M o superior, no se observó crecimiento. Esta respuesta podría ser parte de las características de las cepas halófilas extremas, ya que en general no son capaces de crecer en concentraciones superiores a 5,1 M de NaCl (5).

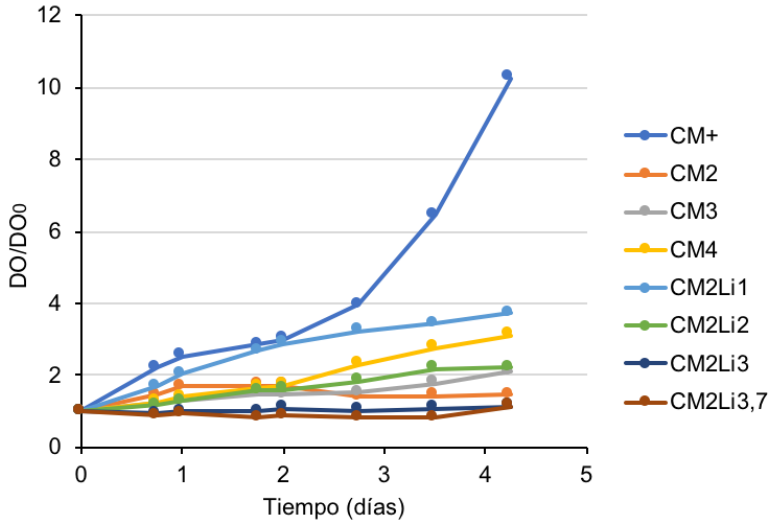


Figura 5.2 Curvas de crecimiento de *Halobacteruim* sp. NRC-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl, respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl, respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

La cepa *Halorubrum lacusprofundi* presentó el mayor crecimiento en el medio de cultivo CM3 (halófila moderada), seguido por los medios con concentraciones más elevadas de NaCl (CM^+ y CM4), que estadísticamente no presentan diferencias con CM2Li1 (Figura 5.3). Este resultado coincide con la caracterización de la cepa llevada a cabo por Anderson y col (2016) (39), en la que describen que es capaz de crecer en un rango de NaCl entre 1,5 y 4,5 M, con un óptimo de 3,5 M. Por su parte, el crecimiento en los medios de cultivo CM2Li2 y CM2 no presentó diferencias estadísticamente significativas (p= 0,783), indicando que las concentraciones de sal en ambos medios generaron un efecto similar, aunque la concentración neta de sales en CM2Li2 sea el doble con respecto a CM2. Por el comportamiento de las células frente al litio se puede pensar que concentraciones elevadas del mismo en los medios de cultivo resultan tóxicas, lo que puede observarse mediante la comparación del crecimiento con las mismas concentraciones netas de sales (comparando CM3 con CM2Li1 y CM4 con CM2Li2). Otra explicación podría ser similar a la observada en la cepa *Halobacterium* sp. NRC-1 y, por lo tanto, el efecto tóxico podría deberse a la elevada concentración de sales totales (de Na sumado a Li) en los medios de cultivo. Por lo tanto, hay que tener en cuenta no sólo el agregado de sales para determinar la toxicidad, sino la manera en la que las sales interactúan entre sí y con el microorganismo (16).

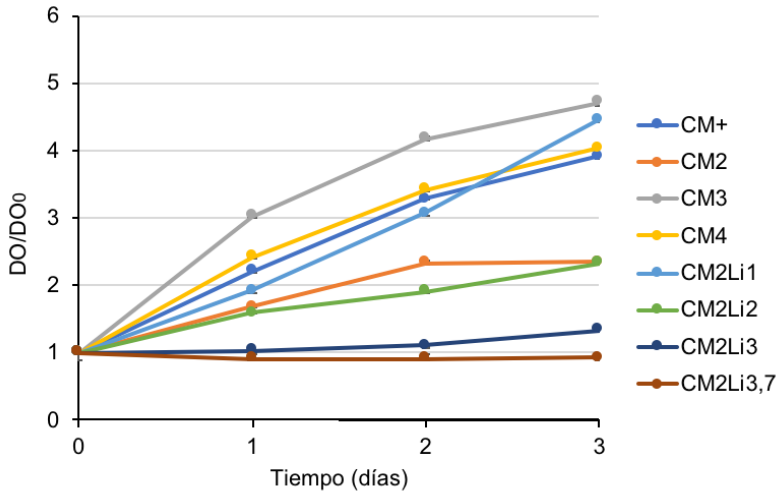


Figura 5.3 Curvas de crecimiento de *Halorubrum lacusprofundi* en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

En el estudio del comportamiento de *Halorubrum lacusprofundi* en presencia de otras sales, llevado a cabo por Laye y DasSarma (2018) (16), se desarrollaron

ensayos también reduciendo la concentración de NaCl para evaluar el efecto sobre las células de perclorato de sodio y de magnesio. Esto les permitió determinar que algunas haloarqueas son capaces de utilizar perclorato como aceptor final de electrones y que los efectos inhibitorios del crecimiento de estas sales son dominantes con respecto al efecto del magnesio.

Dos de las cepas aisladas del Salar de Uyuni, *Halorubrum* sp. 3-1 y 4-2, mostraron un comportamiento similar en los medios de cultivo evaluados, siendo capaces de crecer únicamente en presencia de los medios de cultivo con mayor concentración de NaCl. Los medios de cultivo preferidos por ambos microorganismos fueron CM4 y CM^+ (233,8 y 250 g/L NaCl respectivamente) (Figuras 5.4 y 5.5). Además, otro comportamiento en común entre las cepas fue que ninguna de ellas tuvo la capacidad de crecer en ninguno de los medios de cultivo preparados con LiCl.

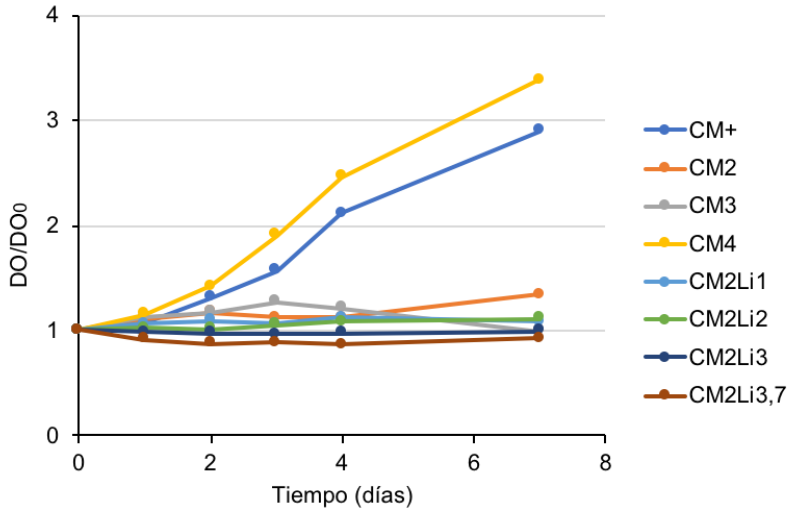


Figura 5.4 Curvas de crecimiento de *Halorubrum* sp. 3-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

En el caso de la cepa 4-2 (Figura 5.5), la cepa presentó un comportamiento estadísticamente semejante en CM3 en comparación al desarrollado en los medios de cultivo CM^+ y CM4 ($p= 0,344$ y $p= 0,736$ respectivamente). *Halorubrum* sp. 3-1, no fue capaz de crecer en CM3, y esta es una de las diferencias más notables entre ambos microorganismos.

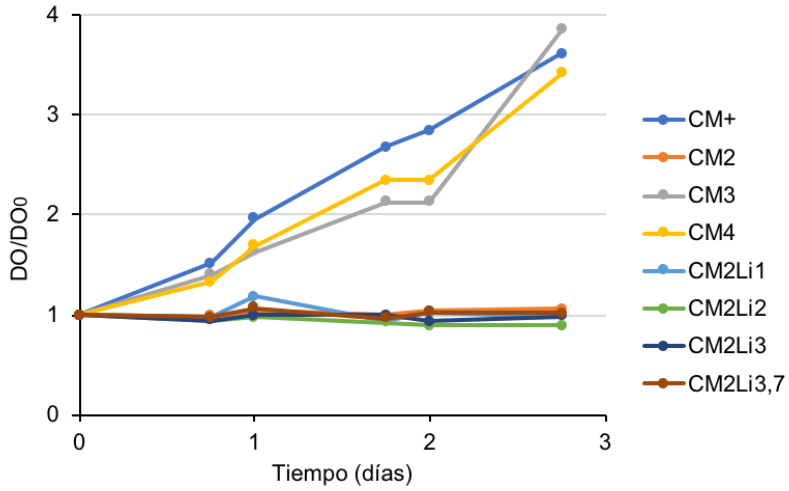


Figura 5.5 Curvas de crecimiento de la cepa 4-2 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

Al haber alcanzado el máximo crecimiento durante el período estudiado en medios de cultivo con concentraciones de sales superiores a 4 M de NaCl (233,8 g/L de NaCl), la cepa 4-2 fue clasificada como halófila extrema. Esta cepa es la única que aún no ha sido identificada molecularmente, pero su comportamiento fue muy similar al de *Halorubrum* sp. 3-1. Cabe destacar que la concentración de NaCl óptima para el crecimiento de *Halorubrum* sp. 3-1 evaluada en este ensayo fue superior a la informada en otras especies del mismo género, tales como *Halorubrum xinjiangense* y *Halorubrum* sp. Ha25 (40, 41).

A diferencia de las cepas *Halobacterium* sp. NRC-1 y *Halorubrum lacusprofundi*, y a pesar haber sido aisladas de un sitio con elevadas concentraciones de litio (8), este metal resultó inhibitorio para el crecimiento de *Halorubrum* sp. 3-1 y 4-2 en las condiciones evaluadas.

Haloterrigena sp. 5-1 alcanzó la mayor producción de biomasa en el medio de cultivo CM2Li1, con valores estadísticamente iguales a los alcanzados durante el crecimiento en CM3, CM4 y CM^+. La capacidad de crecer en concentraciones elevadas de NaCl permitió clasificarla también como halófila extrema (Figura 5.6).

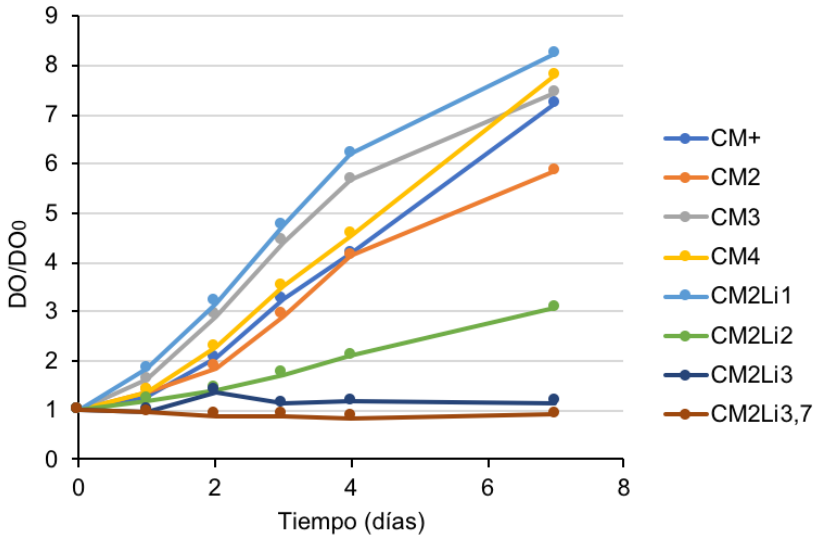


Figura 5.6 Curvas de crecimiento de *Haloterrigena* sp. 5-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

Otros autores han encontrado valores óptimos de crecimiento alrededor de 3,4 M de NaCl para especies del género, clasificándolas también en la misma categoría (42, 43). En general, se puede ver que el crecimiento con una concentración neta de sales mayor o igual a 3 M (independientemente de si hay NaCl o LiCl presente), favorece el crecimiento de esta cepa. Concentraciones más bajas de sales producen un efecto negativo sobre el crecimiento. Sin embargo, cuando la concentración de sales neta es 4 M, se puede establecer un efecto negativo del litio sobre el crecimiento, ya que en CM4 se alcanza el máximo crecimiento, mientras que en CM2Li2 es alrededor de tres veces menor.

Como la concentración neta de sales en CM2Li1 es 3 M y alcanza valores de densidad óptica cercanos al obtenido en CM4, se puede deducir que el litio tendría un efecto positivo sobre el crecimiento de la cepa ya que, a pesar de encontrarse en menor concentración en el medio de cultivo, es capaz de estimular el crecimiento en la misma proporción a la alcanzada en CM4. Sin embargo, si la comparación se hace teniendo en cuenta una concentración neta de sales de 3 M, no existen diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento. Esto muestra que la tolerancia a la presencia de litio de esta cepa no depende únicamente de su concentración, sino que además está ligada al efecto que ambas sales pueden tener en conjunto. Teniendo en cuenta las concentraciones de litio más elevadas, se puede ver que la cepa no es capaz de crecer en presencia de 3 ni 3,7 M LiCl. Es posible que la falta de crecimiento

en los medios CM2Li3 y CM2Li3,7 se deba a la concentración demasiado alta de sales totales en el medio de cultivo, repitiendo la situación encontrada para la cepa *Halobacterium* sp. NRC-1.

Con respecto a *Natrinema* sp. 5-4, crece de forma similar en CM2 y en CM2Li1 (no existen diferencias estadísticamente significativas) por lo que, en estas concentraciones, el litio no tendría un efecto tóxico (Figura 5.7). El máximo crecimiento teniendo en cuenta los medios de cultivo preparados únicamente con NaCl se alcanzó en CM2, a 37 °C, siendo clasificada como halófila moderada. Albuquerque y col (2012) (44) caracterizaron cepas pertenecientes a este género, encontrando valores óptimos de crecimiento entre 2,6 y 3,4 M de NaCl (concentraciones de NaCl mayores que en el presente estudio) aunque a una temperatura óptima de crecimiento de 45 °C. La diferencia de temperaturas podría ser la razón para presentar distintos niveles de tolerancia. Tanto en concentraciones netas de sal con valores de 3 M como 4 M, el crecimiento de la cepa se vio favorecido en presencia de litio. Las concentraciones más altas de litio y de sodio no permiten el crecimiento de la cepa en ninguno de los casos.

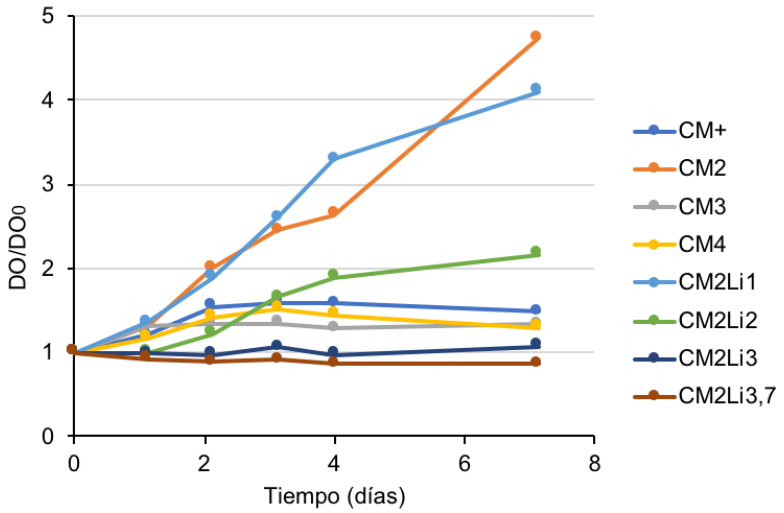


Figura 5.7 Curvas de crecimiento de *Natrinema* sp. 5-4 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

En el caso de *Natrinema* sp. 6-1 el máximo crecimiento se alcanzó en los medios de cultivo CM2 y CM2Li1, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos (p= 0,849). Este microorganismo se clasificó como halófilo moderado teniendo en cuenta su capacidad para crecer en medios de cultivo con NaCl (Figura 5.8). Nuevamente, se

observó lo mismo que con *Natrinema* sp. 5-4 con respecto a los valores óptimos de sal para el crecimiento, siendo el encontrado en este caso menor a los informados por otros autores, que reportaron óptimos de crecimiento en el rango de 2,6 y 3,4 m de NaCl (44, 45). A medida que la concentración de NaCl aumenta en los medios de cultivo, el crecimiento se ve negativamente afectado. Las diferencias en el crecimiento en los medios de cultivo CM2 y CM3 son significativas (p= 0,001) desde el punto de vista estadístico, por lo que el incremento de NaCl en un valor de 1 M tendría un efecto muy acentuado sobre el crecimiento. Por su parte, en presencia de litio, sólo el medio con 1 M de LiCl mostró un buen crecimiento, mientras que en el resto de los medios con litio se vio una fuerte inhibición.

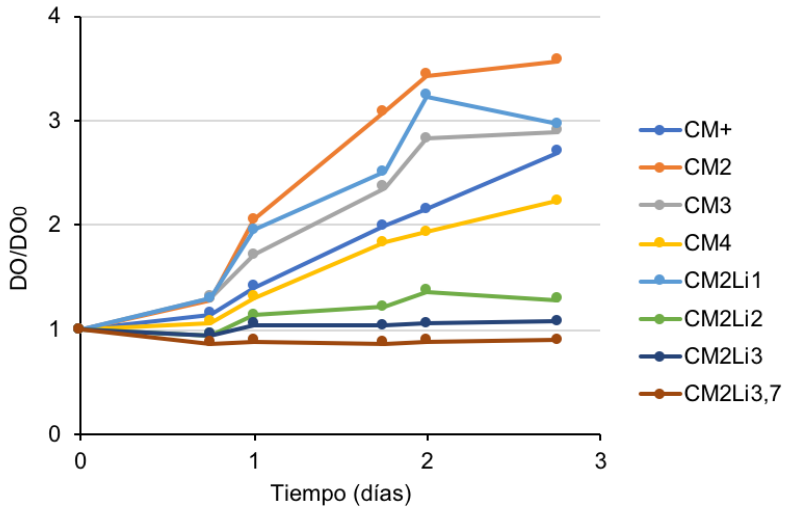


Figura 5.8 Curvas de crecimiento de *Natrinema* sp. 6-1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

Teniendo en cuenta los resultados en los medios de cultivo CM2 y CM2Li1, se puede afirmar que sobre esta cepa el litio no tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento ya que a pesar de que la concentración neta es mayor en el medio CM2Li1, el microorganismo crece de la misma forma que en presencia de 2 M NaCl. Por otra parte, comparando el crecimiento observado en CM2Li1 con CM3, se puede ver que la presencia de litio favorece el crecimiento. Sin embargo, se observa lo contrario si se tiene en cuenta el crecimiento cuando las concentraciones netas de sal son 4 M, siendo la diferencia, estadísticamente significativa (p= 0,008) a favor del crecimiento en CM4 en comparación al alcanzado en CM2Li2. Puede ocurrir entonces que, cuando las concentraciones de sales son muy elevadas en el medio de cultivo, la

presencia de litio tiene un efecto tóxico sobre las células y afecta de manera significativa al crecimiento.

Por último, la cepa *Salarchaeum* sp. DS1 aislada de una muestra de salmuera del Mar Muerto tiene una concentración óptima de NaCl para su crecimiento de 3 M de NaCl (halófila moderada) (Figura 5.6).

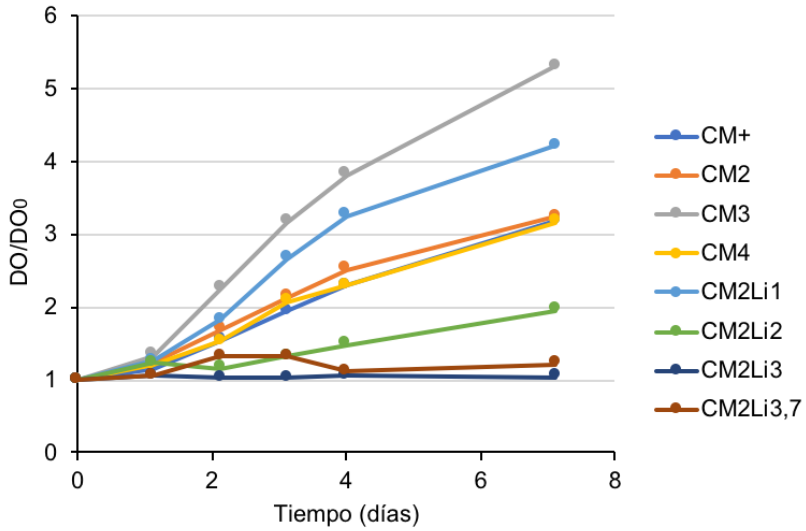


Figura 5.9 Curvas de crecimiento de *Salarchaeum* sp. DS1 en medios de cultivo con distintas concentraciones de sales: CM+, CM2, CM3, CM4 (4,3; 2; 3; y 4 M de NaCl respectivamente) y CM2Li1, CM2Li2, CM2Li3, CM2Li3,7 (2 M de NaCl adicionado con 1, 2, 3 y 3,7 M de LiCl respectivamente). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

Resultados similares se informaron para *Salarchaeum japonicum,* del mismo género que DS1, que resultó capaz de crecer entre 20 y 55 °C, con un óptimo a 40 °C y una concentración óptima de NaCl entre 2,3 y 3 M (46). Esta cepa no presenta diferencias estadísticamente significativas (p= 0,298) para el crecimiento en los medios de cultivo CM3 y CM2Li1. Se puede ver además que DS1 tiene el mismo comportamiento con respecto al crecimiento en los medios de cultivo CM2, CM4 y CM^+. En este caso, las diferencias encontradas en el crecimiento en CM3 y los medios de cultivos CM4 y CM^+ sí son estadísticamente significativas (p= 0,052 y p=0,007 respectivamente), por lo que la cepa bajo estudio es claramente incapaz de crecer en medios de cultivo con concentraciones más altas o bajas a 3 M de NaCl. Con respecto a los medios de cultivo CM4 y CM2Li2, el litio ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento, ya que la diferencia encontrada en los valores de DO es estadísticamente significativa (p= 0,004).

5.4.3. Evaluación de la concentración de NaCl óptima para el crecimiento

En la sección anterior se evaluó el crecimiento de arqueas halófilas en medios de cultivo con distintas concentraciones de NaCl y LiCl. Esto permitió determinar que las cepas *Halorubrum lacusprofundi,* 4-2, *Natrimena* sp. 5-4, *Natrinema* sp. 6-1 y *Salarchaeum* sp. DS1 son halófilas moderadas (Figura 5.10, cepas con valores máximos en el área sombreada de azul). Las cepas con máximo crecimiento en el área correspondiente a la de microorganismos halófilos extremos (área roja, Figura 5.10) fueron *Halobacterium* sp. NRC-1, *Halorubrum* sp. 3-1 y *Haloterrigena* sp. 5-1.

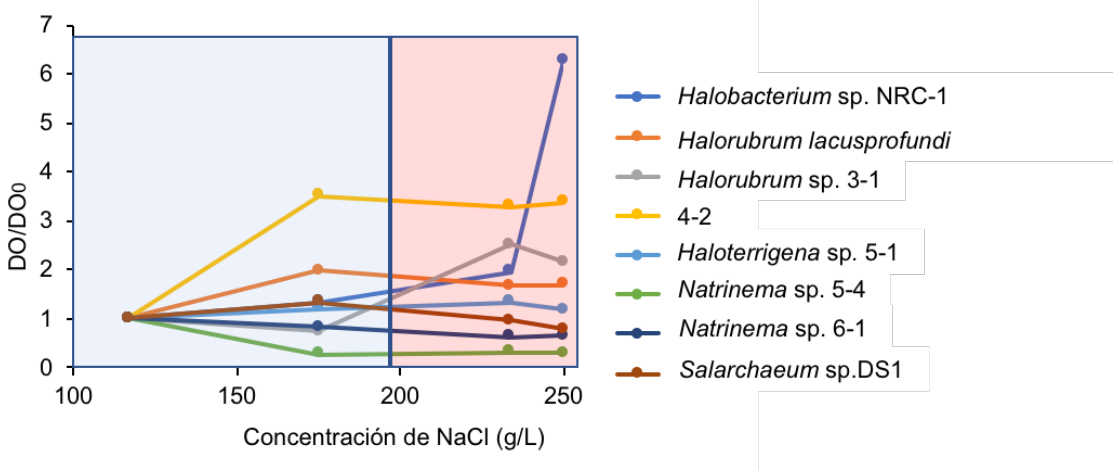


Figura 5.10 Máximos valores de biomasa producida por arqueas halófilas cultivadas en medios de cultivo con concentraciones finales de 116,9; 175,3; 233,8 y 259 g/L de NaCl, incubadas a 37 ° C y 100 rpm. El sombreado azul indica el rango de salinidad para el crecimiento óptimo de microorganismos halófilos moderados, y el rosado el de halófilos extremos (5). La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

Se puede observar que seis de las cepas requieren al menos 116,9 g/L de NaCl para crecer. Las excepciones fueron *Natrimena* sp. 5-4 y *Natrinema* sp. 6-1, en las que se observó un menor crecimiento en concentraciones más elevadas de NaCl, siendo el óptimo el valor de 2 M de NaCl. Sin embargo, es necesario también determinar las otras condiciones óptimas de crecimiento para los aislamientos evaluados, ya que los requerimientos de sales pueden variar dependiendo de otros factores como la temperatura de incubación, como fue determinado mediante este trabajo para la cepa *Natrinema* sp. 5-4. Todas las cepas evaluadas provenientes del Salar de Uyuni mostraron comportamientos diferentes, a pesar de haber sido aisladas de un medio con concentraciones altas de sodio (Tabla 5.1). Aunque el Salar de Uyuni contiene alrededor de 4 M de sodio en su salmuera (233,8 g/L de NaCl), no todas las cepas fueron capaces de crecer en presencia de esa cantidad de sal.

5.4.4. Determinación de la concentración de LiCl óptima para el crecimiento

Con respecto al crecimiento de las cepas en medio con cloruro de litio, se pudo ver que *Halobacterium* sp. NRC-1, *Halorubrum lacusprofundi, Haloterrigena* sp. 5-1 y *Salarchaeum* sp. DS1 mostraron preferencia por el medio de cultivo CM2Li2, preparado con 42,2 g/L de LiCl (1 M de LiCl) (Figura 5.11). *Salarchaeum* sp. DS1 tuvo un comportamiento similar en los medios de cultivo CM2 y CM2Li1 (0 y 42,4 g/L de LiCl respectivamente). En el caso de las cepas 4-2 y *Halorubrum* sp. 3-1, se observó que presentaron el mismo comportamiento en todos los medios de cultivo con litio (Figuras 5.4 y 5.5). *Natrimena* sp. 5-4 y *Natrinema* sp. 6-1 presentaron máximos de crecimiento en el medio CM2 (116,9 g/L de NaCl), en ausencia de LiCl. Para ambas cepas, se detectaron menores valores de crecimiento en todos los casos, independientemente de si las sales presentes son cloruro de sodio o de litio (Figuras 5.10 y 5.11).

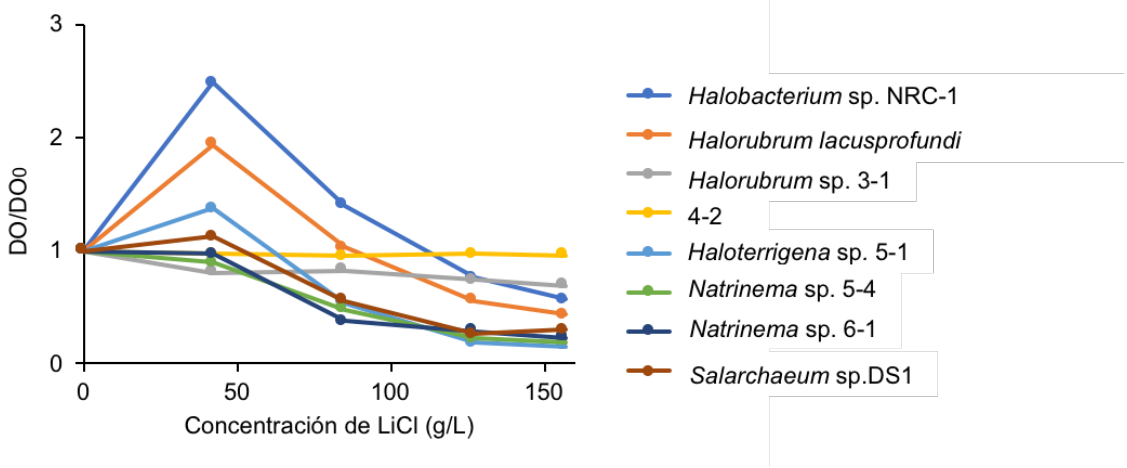


Figura 5.11 Máximos valores de biomasa producida por arqueas halófilas cultivadas en medios de cultivo con concentraciones finales de 42,4; 84,8; 127,2; 156,9 g/L de LiCl, incubadas a 37 ° C y 100 rpm. La densidad óptica (DO) se midió a 600 nm y la DO_0 utilizada para la normalización, corresponde al valor inicial.

El Salar de Uyuni tiene una concentración de litio de alrededor de 0,8 g/L (0,1 M de Li) (Tabla 5.1). Los microorganismos evaluados tienen la capacidad de crecer en presencia de concentraciones más elevadas a la de la salmuera del Salar, por lo que se puede estimar que la mayoría de las cepas serían capaces de mantener la viabilidad y proliferar en este ambiente. La cepa aislada del Mar Muerto (*Salarchaeum* sp. DS1) es capaz de crecer en medio con 42,4 g/L de LiCl, a pesar de haber sido aislada de un sitio con baja concentración de litio natural (20 ppm, Tabla 5.1). Esta

cepa está entonces capacitada a sobrevivir y proliferar en presencia de LiCl sin haber estado en contacto previo con elevadas concentraciones de este ion, por lo que la respuesta puede ser general a iones ambientales.

Todas las cepas de arqueas presentaron una tolerancia alta a la solución de LiCl 424 g/L en medio de cultivo sólido (5.4.1.). A partir de este resultado, se estimó que en medio líquido ocurriría una situación similar, pero se observó que el LiCl afectó considerablemente el crecimiento microbiano en medio líquido (5.4.2.). Este resultado es similar al obtenido en la evaluación de bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto (3.4.3.). La mayor tolerancia en medio de cultivo sólido puede haber sido consecuencia de que el contacto con la sal no es tan directo como ocurre en medio de cultivo líquido. El mismo efecto fue observado en cepas del género *Streptomyces* en dos casos separados, por un lado, en presencia de boro por Moraga y col (2014) (47) y, por otro, en presencia de zinc y cobre por Majzlik y col (2011) (48). Además, esto fue descripto previamente en esta investigación en el estudio de las cepas bacterianas caracterizadas del Salar del Hombre Muerto, en presencia de LiCl (Sección 3.4.3.3.). A pesar de que todas las arqueas estudiadas de acuerdo a su tolerancia en medio de cultivo sólido fueron capaces de crecer hasta el borde del canal, sólo algunas fueron capaces de crecer en medio líquido con litio. En el caso de las cepas 4-2 y *Halorubrum* sp. 3-1, no presentaron valores de crecimiento elevados en ninguna de los medios de cultivos preparados con LiCl, aún habiendo sido aisladas de un sitio en el que el litio se encuentra presente de forma natural (Salar de Uyuni).

5.4.5. Comparación entre las bacterias y arqueas más tolerantes al litio

De todas las cepas del dominio Bacteria evaluadas en el Capítulo 4 se seleccionaron *Bacillus atrophaeus* HX11 y *Bacillus* sp. SA313 como aquellas cuyo crecimiento se vio más favorecido en presencia de cloruro de litio. Estas se compararon con las dos arqueas estudiadas que tuvieron un efecto similar, *Halobacterium* sp. NRC-1 y *Halorubrum lacusprofundi* (Figura 5.12). Para ello, tanto para las cepas de bacteria como de arqueas, el valor de DO máximo medido durante el crecimiento en presencia de cloruro de litio fue normalizado en relación con el crecimiento medido en el mismo tiempo en medio de cultivo sin cloruro de litio. Se seleccionaron los valores máximos, los que indican cuántas veces más se produce biomasa en medio de cultivo con LiCl en relación con el obtenido sin LiCl.

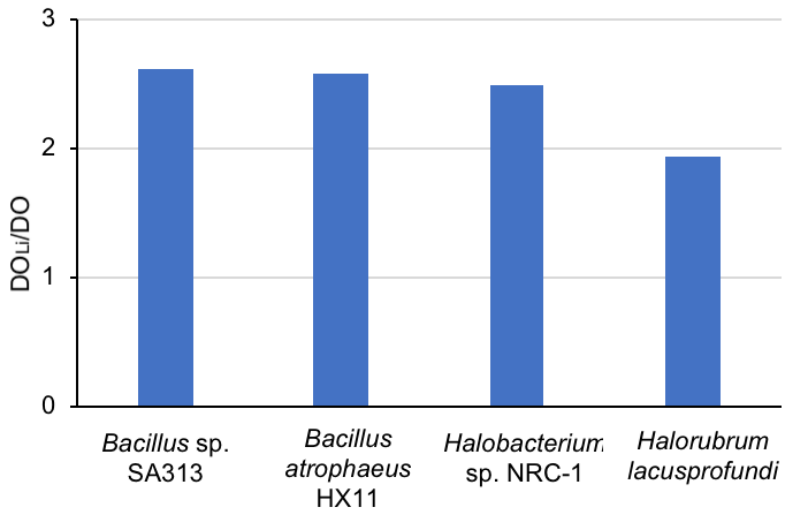


Figura 5.12 Relación de biomasa producida en medio de cultivo con litio en relación a la obtenida en el mismo tiempo en medio de cultivo sin litio para cada microorganismo. DO_{Li} es la máxima densidad óptica medida en medio de cultivo con litio agregado (20 g/L para bacterias, medio D20 y 42,4 g/L para arqueas, medio CM2Li1) y DO es la correspondiente sin LiCl (DM y CM2 para bacterias y arqueas respectivamente). Se cultivó a 37 °C y 100 rpm para arqueas y 200 rpm y 30 °C para bacterias.

Se alcanzaron valores máximos de DO diferentes en los cultivos de las cepas microbianas, sin embargo todos presentaron un aumento similar con respecto a la DO obtenida en medio de cultivo sin litio (Figura 5.12, Tabla 5.3). Cabe destacar que las arqueas evaluadas crecieron en el doble de concentración de LiCl que las bacterias y también el tiempo de incubación necesario para alcanzar ese valor fue superior.

Tabla 5.4 Cepas de bacterias y arqueas que produjeron la mayor cantidad de biomasa en medios de cultivo con litio en relación al crecimiento producido en ausencia de litio. Se utilizó el medio DM y D20 (sin y con 20 g/L de LiCl) para bacterias y CM2 y CM2Li1 (0 y 42,4 g/L de LiCl) para arqueas). El tiempo señalado en la tabla indica el período de incubación en el que se alcanza la máxima cantidad de biomasa para cada cepa.

Dominio	Cepa	Max DO	Tiempo (d)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Concentración de Li (g/L)
Bacteria	*Bacillus* sp. SA313	0,7	2,0	30	200	20
Bacteria	*Bacillus atrophaeus* HX11	1,1	2,3	30	200	20
Archaea	*Halobacterium* sp. NRC-1	0,5	3,0	37	100	42,4
Archaea	*Halorubrum lacusprofundi*	0,5	4,25	37	100	42,4

Se puede ver que independientemente del dominio al que pertenecen los microorganismos, en medios de cultivo con litio, los microorganismos seleccionados produjeron entre 1,9 y 2,6 más biomasa que en los correspondientes medios sin el metal. Este resultado es muy prometedor con respecto a la potencialidad de recuperar litio ambiental utilizando microorganismos. Estas cepas no sólo tienen la capacidad de crecer mejor en presencia de LiCl, sino que se observó que además pueden recuperarlo de soluciones acuosas (Sección 4.4.2.). *Bacillus atrophaeus* HX11 y *Bacillus* sp. SA313 fueron dos de las cepas bacterianas que adsorbieron la mayor cantidad de litio durante el crecimiento. Por su parte, no se ha estudiado aún la capacidad de arqueas de recuperar litio del ambiente; sin embargo, el resultado obtenido en este ensayo es muy prometedor, ya que se determinó que son capaces de crecer en ambientes con altas concentraciones de LiCl. Las arqueas utilizan mecanismos de adaptación a sales diferentes a los empleados por bacterias (5) por lo que sería interesante determinar si estos organismos son capaces de acumular litio en el interior celular.

En caso de ser necesario recuperar litio de sistemas con salinidad elevada (similar a la del agua de mar), una opción con mucho potencial es la utilización de arqueas halófilas capaces de crecer en ambientes con concentraciones elevadas de litio y que además sean capaces de recuperarlo. Si, por el contrario, los ambientes a partir de los cuales se quiere recuperar litio presentan condiciones de menor salinidad, las bacterias son una buena y prometedora opción para este fin. Es necesario tener en cuenta que el tiempo requerido para que cada microorganismo alcance la máxima producción de biomasa es característico de cada cepa y deberá ser evaluado en las condiciones en las que se quiere recuperar litio.

5.5. Conclusiones

En medio de cultivo sólido todas las cepas presentaron tolerancia a una solución 424 g/L de LiCl.

De acuerdo con sus requerimientos de NaCl para el crecimiento, los aislamientos de arqueas provenientes del Salar de Uyuni fueron clasificadas como halófilas extremas (*Halobacterium* sp. NRC-1, *Halorubrum* sp. 3-1 y *Haloterrigena* sp. 5-1), con valores de salinidad óptimos entre 198,7 y 298 g/L de NaCl. Las halófilas moderadas (*Halorubrum lacusprofundi,* 4-2, *Natrimena* sp. 5-4, *Natrinema* sp. 6-1 y *Salarchaeum* sp. DS1) presentaron valores óptimos de crecimiento entre 49,7 y 198,7 g/L de NaCl.

La tolerancia de los microorganismos frente a sales de litio está ligada fuertemente a la concentración final de sales del medio. En concentraciones bajas, el litio puede no

tener un efecto tóxico muy acentuado sobre las células, pero al incrementar su concentración es posible ver el efecto negativo sobre el crecimiento. Este comportamiento se observó en las cepas *Halobacterium* sp. NRC-1, *Haloterrigena* sp. 5-1, *Halorubrum lacusprofundi, Natrimena* sp. 5-4, *Natrinema* sp. 6-1 y *Salarchaeum* sp. DS1.

La cepa de arqueas que desarrolló el máximo crecimiento en presencia de litio fue *Halobacterium* sp. NRC-1 y lo hizo en el medio de cultivo CM2Li2, que contiene 42,4 g/L de LiCl. Sería necesario continuar realizando estudios para determinar si las cepas de arqueas evaluadas son capaces de recuperar litio presente en forma disuelta.

5.6. Referencias

1. Raddadi N, Cherif A, Daffonchio D, Neifar M, Fava F. 2015. Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. Appl Microbiol Biotechnol 99(19):7907-7913.
2. Dumorne K, Córdova DC, Astorga-Eló M, Renganathan P. 2017. Extremozymes: a potential source for industrial applications. J Microbiol Biotechnol 27(4):649-659.
3. Chen GQ, Jiang XR. 2018. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. Curr Opin Biotechnol 50:94-100.
4. Wang J, Salem DR, Sani RK. 2018. Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. Carbohydr Polym 205:8-26.
5. DasSarma S, DasSarma P. 2017. Halophiles. In Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Chichester, UK. doi:10.1002/9780470015902 .a0000394.pub4.
6. Perez-Fernandez CA, Iriarte M, Hinojosa-Delgadillo W, Veizaga-Salinas A, Cano RJ., Rivera-Perez J, Toranzos GA. 2016. First insight into microbial diversity and ion concentration in the Uyuni salt flat, Bolivia. Caribb J Sci 49(1):57-75.
7. Edbeib MF, Wahab RA, Huyop F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. World J Microbiol Biotechnol 32(8):135.
8. Haferburg G, Gröning JA, Schmidt N, Kummer NA, Erquicia JC, Schlömann M. 2017. Microbial diversity of the hypersaline and lithium-rich Salar de Uyuni, Bolivia. Microbiol Res 199:19-28.

9. Quillaguamán J, Delgado O, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. 2004. *Chromohalobacter sarecensis* sp. nov., a psychrotolerant moderate halophile isolated from the saline Andean region of Bolivia. Int J Syst Evol Microbiol 54(6):1921-1926.

10. Quillaguamán J, Hatti-Kaul R, Mattiasson B, Alvarez MT, Delgado O. 2004. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol 54(3):721-725.

11. Guzmán D, Quillaguamán J, Muñoz M, HattiKaul R. 2010. *Halomonas andesensis* sp. nov., a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. Int J Syst Evol Microbiol 60(4):749-753.

12. Müller-Santos M, de Souza EM, Pedrosa FDO, Mitchell DA, Longhi S, Carrière F, Canaan S, Krieger N. 2009. First evidence for the salt-dependent folding and activity of an esterase from the halophilic archaea *Haloarcula marismortui*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1791(8):719-729.

13. DasSarma S, DasSarma P. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. Curr Opin Microbiol 25:120-126.

14. Reed CJ, Lewis H, Trejo E, Winston V, Evilia C. 2013. Protein adaptations in archaeal extremophiles. Archaea 2013, Article ID 373275, http://dx.doi.org/10.1155/2013/373275.

15. Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological Basis for the High Salt Tolerance of Debaryomyces hansenii. Appl Environ Microbiol 63(10):4005-4009.

16. Laye VJ, DasSarma S. 2018. An Antarctic Extreme Halophile and Its Polyextremophilic Enzyme: Effects of Perchlorate Salts. Astrobiology 18(4):412-418.

17. Sinha N, Kral TA. 2018. Effect of UVC Radiation on Hydrated and Desiccated Cultures of Slightly Halophilic and Non-Halophilic Methanogenic Archaea: Implications for Life on Mars. Microorganisms 6(2): 43 https://doi.org/10.3390/microorganisms6020043.

18. DasSarma P, Laye VJ, Harvey J, Reid C, Shultz J, Yarborough A, Lamb A, Koske-Phillips A, Herbst A, Molina F, Grah, O, Phillips T, DasSarma S. 2017. Survival of halophilic Archaea in Earth's cold stratosphere. Int J Astrobiol 16(4):321-327.

19. Oren A, Elevi Bardavid R, Mana L. 2014. Perchlorate and halophilic prokaryotes: implications for possible halophilic life on Mars. Extremophiles 18:75-80.

20. Völkel S, Fröls S, Pfeifer F. 2018. Heavy Metal Ion Stress on *Halobacterium salinarum* R1 Planktonic Cells and Biofilms. Front Microbiol 9:3157.
21. Brown HL, Gibbons NE. 1955. The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria. Can J Microbiol 1(7):486-494.
22. Domagalski JL, Orem WH, Eugster HP. 1989. Organic geochemistry and brine composition in Great Salt, Mono, and Walker Lakes. Geochim Cosmochim Acta 53(11):2857-2872.
23. Staff Report. Salt Ponds. 2005. SAN FRANCISCO BAY CONSERVATION AND DEVELOPMENT COMMISSION. 50 California Street, Suite 2600. http://www.bcdc.ca.gov/planning/reports/SaltPonds_Jun2005.pdf. Fecha de último acceso: 14 de Febrero de 2019.
24. Kamekura M, Dyall Smith ML. 1995. Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. J Gen Appl Microbiol 41(4):333-350.
25. Gruber C, Legat A, Pfaffenhuemer M, Radax C, Weidler G, Busse HJ, Stan-Lotter H. 2004. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. Extremophiles 8:431–439.
26. Javor B, Requadt C, Stoeckenius W. 1982. Box-shaped halophilic bacteria. J Bacteriol 151(3):1532-42.
27. Ventosa A, Oren A. 1996. *Halobacterium salinarum* nom. corrig., a name to replace *Halobacterium salinarium* (Elazari-Volcani) and to include *Halobacterium halobium* and *Halobacterium cutirubrum.* Int J Syst Evol Microbiol 46(1):347-347.
28. Tomlinson GA, Hochstein LI. 1976. *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. Can J Microbiol 22(4):587-591.
29. Franzmann PD, Stackebrandt E, Sanderson K, Volkman JK, Cameron DE, Stevenson PL, Mcmeekin TA, Burton HR. 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. Syst Appl Microbiol 11(1):20-27.
30. Yao AI, Facciotti MT. 2011. Regulatory multidimensionality of gas vesicle biogenesis in *Halobacterium salinarum* NRC-1. Archaea 2011:1-13.
31. Oren A. 1994. The ecology of the extremely halophilic archaea. FEMS Microbiol Rev 13(4):415-439.

32. Martínez FL, Orce GI, Rajal VB, Irazusta VP. 2018. Salar del Hombre Muerto, source of lithium-tolerant bacteria. Environ Geochem Health 1-15.

33. Rengasamy P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot 57(5):1017-1023.

34. Srivastava P, Kowshik M. 2013. Mechanisms of metal resistance and homeostasis in haloarchaea. Archaea 2013, Article ID 732864. https://doi.org/10.1155/2013/732864

35. McCready S, Müller JA, Boubriak I, Berquist BR, Ng WL, DasSarma S. 2005. UV irradiation induces homologous recombination genes in the model archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. Saline Syst 1(1):3.

36. Coker JA, DasSarma P, Kumar J, Müller JA, DasSarma S. 2007. Transcriptional profiling of the model Archaeon *Halobacterium* sp. NRC1: responses to changes in salinity and temperature. Saline Syst 3(1):6.

37. DeVeaux LC, Müller JA, Smith J, Petrisko J, Wells DP, DasSarma S. 2007. Extremely radiation-resistant mutants of a halophilic archaeon with increased single-stranded DNA binding protein (RPA) gene expression. Radiation Res 168:507–514.

38. Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithauser B, Keller K, Cruz R, Danson M, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale, H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung KH, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood Leroy, DasSarma S. 2000. Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. Proc Nat Acad Sci 97(22):12176-12181.

39. Anderson IJ, DasSarma P, Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Del Rio TG, Tice H, Dalin E, Bruce D, Goodwin L, Pitluck, S, Sims D, Brettin TS, Detter JC, Han CS, Larimer F, Hauser L, Land M, Ivanova N, Richardson P, Cavicchioli R, DasSarma S, Woese CR, Kyrpides NC. 2016. Complete genome sequence of the Antarctic *Halorubrum lacusprofundi* type strain ACAM 34. Stand Genomic Sci 11(70):1-6.

40. Feng J, Zhou PJ, Liu SJ. 2004. *Halorubrum xinjiangense* sp. nov., a novel halophile isolated from saline lakes in China. Int J Syst Evol Microbiol 54(5):1789-1791.

41. Siroosi M, Amoozegar MA, Khajeh K, Fazeli M, Rezaei MH. 2014. Purification and characterization of a novel extracellular halophilic and organic solvent-tolerant

amylopullulanase from the haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25. Extremophiles 18(1):25-33.

42. Romano I, Poli A, Finore I, Huertas FJ, Gambacorta A, Pelliccione S, Nicolaus G, Lama L, Nicolaus B. 2007. *Haloterrigena hispanica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Fuente de Piedra, southern Spain. Int J Syst Evol Microbiol 57(7):1499-1503.
43. Gutiérrez MC, Castillo AM, Kamekura M, Ventosa A. 2008. *Haloterrigena salina* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake. Int J Syst Evol Microbiol 58(12):2880-2884.
44. Albuquerque L, Taborda M, La Cono V, Yakimov M, da Costa MS. 2012. *Natrinema salaciae* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from the deep, hypersaline anoxic Lake Medee in the Eastern Mediterranean Sea. Syst Appl Microbiol 35(6):368-373.
45. Tapingkae W, Tanasupawat S, Itoh T, Parkin KL, Benjakul S, Visessanguan W, Valyasevi R. 2008. *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 58(10):2378-2383.
46. Shimane Y, Hatada Y, Minegishi H, Echigo A, Nagaoka S, Miyazaki M, Ohta Y, Maruyama T, Usami R, Grant WD, Horikoshi K. 2011. *Salarchaeum japonicum* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea isolated from commercial salt. Int J Syst Evol Microbiol 61(9):2266-2270.
47. Moraga NB, Poma HR, Amoroso MJ, Rajal VB. 2014. Isolation and characterization of indigenous *Streptomyces* and *Lentzea* strains from soils containing boron compounds in Argentina. J Basic Microbiol 54(6):568–577.
48. Majzlik P, Strasky A, Adam V, Nemec M, Trnkova L, Zehnalek J, Hubalek J, Provaznik I, Kizek R. 2011. Influence of zinc (II) and copper (II) ions on *Streptomyces* bacteria revealed by electrochemistry. Int J Electrochem Sci 6:2171-2191.

Capítulo 6: Estudio del genoma y del metiloma de *Micrococcus luteus* SA211

6.1. Introducción

A partir de la revolución de secuenciación de genomas que comenzó en los años 1990s, el desarrollo de tecnologías para la secuenciación masiva ha llevado a la generación de muchas secuencias de genomas de un muy amplio espectro de organismos, en pocos días y a relativamente bajos precios. Sin embargo, esto ha llevado a la obtención de secuencias incompletas, como es el caso de la secuenciación a través de *Shotgun Sequencing* (1). Entre las tecnologías desarrolladas se comenzó con la secuenciación completa del genoma por *shotgun*, seguida por la de alto rendimiento y finalmente se desarrollaron diferentes tecnologías como PacBio SMRT (Pacific Biosciences, *Single Molecule Real Time Sequencing*) para llegar a la secuenciación de una sola molécula de ADN (2) La secuenciación mediante esta tecnología tiene muchas ventajas frente a la obtenida con otros equipos, entre ellas destacan la posibilidad de detectar mutaciones y modificaciones de bases, como es la metilación (3).

El estudio de cepas microbianas mediante el análisis de la secuencia de su genoma es muy útil, ya que permite determinar características potenciales de los microorganismos y determinar la existencia de genes de interés en diferentes cepas. A partir de la información del genoma se pueden expresar los genes de interés en otros sistemas, o clonarlos en organismos que se desean para una actividad potenciada. Los productos metabólicos de microorganismos extremófilos son muy interesantes por sus aplicaciones biotecnológicas. Por ejemplo, las proteasas son muy utilizadas en la industria, y aquellas producidas por arqueas haloalcalófilas tienen la capacidad de mantener su actividad en condiciones hostiles (4). El gen que codifica para la proteasa de interés proveniente de la arquea *Natrialba magadii* fue clonado y expresado en *Escherichia coli* y *Haloferax* volcanii, microorganismos con los que se obtuvieron niveles altos de producción de la enzima. De la misma forma, la enzima β-galactosidasa codificada por *Halorubrum lacusprofundi* fue sobre-expresada posteriormente a la clonación del gen correspondiente en la haloarquea modelo *Halobacterium* sp. NRC-1,

obteniendo cantidades hasta 20 veces más elevadas de enzima a las obtenidas a partir de *Halorubrum lacusprofundi* (5). Asimismo, se pueden realizar estudios evolutivos mediante la búsqueda de elementos génicos que hayan sido adquiridos por transferencia entre especies microbianas diferentes, por ejemplo, en procesos de adaptación a distintos ambientes o condiciones (6, 7,8).

La maquinaria intracelular de los organismos halófilos ha evolucionado para lograr el correcto plegamiento de las proteínas y su estabilidad permitiendo su funcionamiento en altas concentraciones de sales. Uno de los rasgos más notorios de las proteínas de los microorganismos halófilos es la alta frecuencia de residuos cargados negativamente en su superficie, lo que lleva a formar una red de sales hidratadas que regulan su estabilidad (9).

Con respecto a su ADN, los microorganismos halófilos, en general presentan un contenido de guanina-citosina (GC) elevado, superando el 60%, en comparación a otros microorganismos como *Escherichia coli,* cuyo contenido es del 50% (9). Debido a que estas bases se encuentran unidas por tres uniones puente hidrógeno, el mayor contenido de ellas está relacionado con una mayor estabilidad del ADN genómico. Por otro lado, y teniendo en cuenta que muchos de los microorganismos adaptados a altas concentraciones de sales están adaptados también a otros estreses ambientales como por ejemplo a la radiación UV, se sabe que un alto contenido de GC evita la formación de dímeros de timina originados por la exposición a dicha radiación impidiendo de esta forma la posible acumulación de mutaciones (10, 11). Sin embargo, no todos los microorganismos halófilos presentan un alto contenido de GC entre sus bases, una excepción es *Haloquadratum walsbyi*, cuyo contenido es 48,7% (9).

Paul y col (2008) (9), determinaron que los microorganismos halófilos presentan una composición de proteínas diferente a los no halófilos, dependiente de la composición de sus aminoácidos. Esta composición diferencial en sus aminoácidos lleva a que los valores de puntos isoeléctricos (pI) tengan una distribución unimodal con una gran mayoría de proteínas ácidas, mientras que los microorganismos no halófilos en general muestran una distribución bimodal con proteínas tanto ácidas como básicas, con una mediana cercana a la neutralidad.

6.1.1. Detección de secuencias de ARN a partir del ADN genómico

A medida que el número de secuencias de genomas fue aumentando, surgió la idea de analizar la secuencia del ADN en búsqueda de genes que codifiquen para ARN, ya sean de transferencia, ribosómicos o que participen en la formación de estructuras

terciarias (12). Es posible utilizar programas bioinformáticos para encontrar genes que codifiquen para secuencias de ARN.

Los programas utilizados para el análisis de secuencias de ARN pueden tener como objetivo describir la secuencia y/o la estructura del ARN y buscarlo en bases de datos de genomas. En cuanto a los programas basados en homología de secuencias, existen varios, entre los cuales el más conocido es BLAST. Este utiliza una sola secuencia de entrada y permite identificar segmentos de secuencias similares en bases de datos (12). El programa HMMER utiliza un alineamiento como entrada y puede determinar variaciones y conservaciones en genes o en motivos de las secuencias (12).

Al ser analizados por un programa, los resultados de búsquedas de secuencias y motivos dan como resultado un puntaje (*Score*) y un valor de esperanza (*E-value*) para cada secuencia similar obtenida (*hit*). El *E-value* expresa las veces que se obtendría un *hit* por azar teniendo en cuenta el mismo puntaje o uno más alto en una base de datos del mismo tamaño que la que se está utilizando para el análisis (12).

6.1.2. *Micrococcus luteus*: importancia, propiedades y potenciales aplicaciones

Se aislaron cepas de *Micrococcus luteus* de una gran variedad de ambientes, entre ellos de aire (13), suelos (14), lagos salinos de altura (15), suelos salinos (16) e incluso a partir de humanos (17). A pesar de no poseer la habilidad de formar esporas, los microorganismos de esta especie pueden iniciar un estado de latencia que les permite permanecer en un estado de baja actividad metabólica, logrando sobrevivir largos períodos de tiempo en condiciones adversas (14, 17, 18).

Los microorganismos pertenecientes al género *Micrococcus* son Gram positivos, no forman esporas, tienen morfología celular cocoide y son capaces de producir carotenoides. En estudios realizados por Mohana y col (2013) (19), se verificó la capacidad de cepas *Micrococcus* sp. y *Micrococcus luteus* de tolerar exposiciones elevadas a radiación ultravioleta C (UVC, de longitud de onda corta). Este tipo de radiación ocasiona daños de manera directa y/o indirecta en organismos vivos, siendo los carotenoides muchas veces responsables de la protección frente ella debido a sus propiedades protectoras y antioxidantes (19).

Entre sus propiedades, se ha comprobado la capacidad de *Micrococcus luteus* tanto de tolerar como de adsorber metales como el cobre, siendo la utilización de dichos microorganismos una nueva opción para su recuperación en procesos de bioadsorción (20). Se comprobó la capacidad de esta especie de biodegradar compuestos

xenobióticos, y de producir enzimas y compuestos bioactivos de importancia biotecnológica (18). En este sentido, Santhini y col (2009) (21) aislaron *Micrococcus* con la capacidad de degradar hidrocarburos como el pireno, mientras que otros autores encontraron cepas de esta especie capaces de metabolizar arsénico (22).

6.2. Objetivos

- Secuenciar el genoma de la bacteria seleccionada *Micrococcus luteus* SA211
- Caracterizar el genoma y metiloma de la cepa
- Comparar con secuencias de genomas relacionados filogenéticamente
- Analizar los puntos isoeléctricos de las proteínas predichas de SA211 y comparar con los de otros microorganismos

6.3. Materiales y métodos

Diferentes herramientas de biología molecular se utilizaron para analizar el genoma de *Micrococcus luteus* SA211.

6.3.1. Cepa en estudio

Micrococcus luteus SA211 fue aislada de muestras del Salar del Hombre Muerto, en el Noroeste Argentino. Esta cepa presenta forma de coco y sus células crecen agrupadas en tétradas, es Gram positiva, crece en concentraciones elevadas de cloruro de sodio (hasta 4 M), produce pigmentos amarillos en su membrana (Figura 6.1) y tiene la capacidad de adsorber hasta un 30% de litio soluble en soluciones acuosas (Capítulo 4, sección 4.6). Se seleccionó esta cepa por su gran potencialidad con respecto a las aplicaciones biotecnológicas, para realizar el análisis de su genoma.

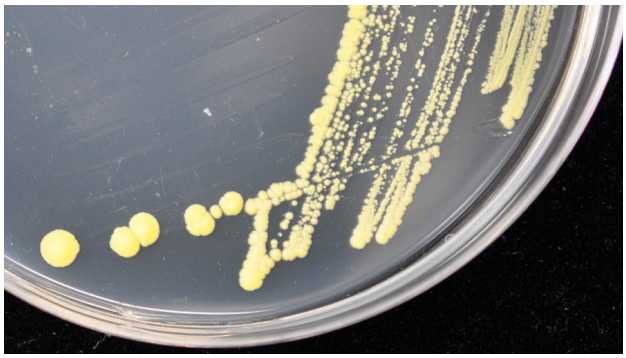


Figura 6.1 Imagen de *Micrococcus luteus* SA211 crecida en medio de cultivo APCsal.

6.3.2. Extracción de ADN genómico, evaluación de la integridad, concentración y calidad del ADN obtenido

Se obtuvo el ADN genómico de la cepa SA211 a partir de células cultivadas en medio CNsal (Capítulo 3, sección 3.3.2.) a 200 rpm y 30 °C durante 24 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente (Centrífuga Eppendorf 5415R) y se lisaron mediante el agregado de 800 μL de lisozima (10 mg/mL) preparada en buffer SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 7,5). Esta mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C para promover la acción de la enzima sobre la pared celular bacteriana. Posteriormente se agregaron 80 μL de SDS al 10% (p/v), 20 μL de proteinasa K (Invitrogen, 20 mg/mL, 40 U/mg) y la mezcla obtenida se incubó por 2 h a 55 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se agregaron 335 μL de NaCl 5 M y 700 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min y se recuperó la fase acuosa (23), se precipitó el ADN mediante el agregado de acetato de sodio (3 M, pH 5,2) e isopropanol (0,65 volúmenes) y se recuperó el ADN mediante centrifugación (12.000 rpm, 10 min) (24). El pellet obtenido se lavó con etanol, se secó y se resuspendió en buffer Tris-EDTA (TE), pH 8 y se lo almacenó a -20 °C hasta su uso.

Se cuantificó el ADN obtenido utilizando Nanodrop y Qubit (en ambos casos se utilizaron los protocolos estándares de cada equipo para la cuantificación del ADN, siguiéndose las especificaciones correspondientes). Para la secuenciación del genoma se utilizaron muestras con una razón de absorbancia de las longitudes de onda 260/230 cercanas a 1,8 (para asegurar la pureza del ADN) y con una concentración de al menos 4 μg/μL.

Posteriormente se realizó una electroforesis un gel de agarosa 1% preparado con SybrSafe durante 1 h a 85 V (Biorad). El gel se observó en un transiluminador (Labnet, U1000-230) y se identificaron bandas correspondientes al ADN genómico y otras de menor tamaño de ARN. Además, se lisaron 20 μL de extracto de ácidos nucleicos totales con 3 μL de enzima ARNasa (Inbio, 10 mg/mL, 2,5 U/μg) durante 40 min a 37 °C para verificar la presencia de ARN en la muestra.

6.3.3. Secuenciación del genoma y determinación del metiloma

La secuenciación del genoma se llevó a cabo mediante una plataforma PacBio RS II. El secuenciamiento estuvo a cargo de Richard Roberts y Brian Anton, de New Englans Biolabs, Beverly, Massachusetts (25). Se preparó una biblioteca de secuenciamiento SMRTbell a partir de ADN genómico fragmentado al azar a fragmentos

de 20 kb con un equipo Megaruptor (Diagenode, Denville, Nueva Jersey, EEUU) y los fragmentos se seleccionaron utilizando un BluePippin (Sage Science, Beverly, Massachusetts, EEUU). La biblioteca se secuenció utilizando una SMRT cell con química C4-P6 y un tiempo de secuenciación de 360 min. Las secuencias obtenidas (un total de 37.323) fueron ensambladas *de novo* utilizando RS_HGAP_Assembly.3 (26) en la plataforma SMRT Analysis 2.3.0 utilizando los parámetros por defecto. La corrección de errores y el cierre del genoma se realizaron utilizando RS_BridgeMapper.1, y los patrones de metilación fueron determinados utilizando RS_Modification_and_Motif_Analysis.1, ambos mediante SMRT Analysis y con los parámetros por defecto del programa.

También, mediante la secuenciación PacBio SMRT se pueden predecir cuáles son los motivos del genoma que han sido metilados e identificar las metiltransferasas m^6A y m^4C (MTasas) responsables de los patrones de metilación. Es decir que, se puede establecer no solamente cuáles son los genes de MTasas activos, sino que también cuál es la secuencia de reconocimiento a la que están asociados. El conjunto de motivos metilados del genoma se conoce como "Metiloma" (27).

La anotación del genoma fue realizada utilizando GeneMark (28), tRNAscan (29) y la Pipeline de Anotación de genomas procariotas del NCBI PGAP (30).

6.3.4. Comparación del genoma de SA211 con el de otros *Micrococcus* mediante herramientas de bioinformática

El genoma de la cepa *Micrococcus luteus* SA211 se comparó con secuencias de genomas del género *Micrococcus* cargadas en la base de datos del NCBI (Tabla 6.1) utilizando el software Mauve. Este software es una herramienta libre para realizar alineamientos de dos o más genomas con un navegador interactivo que permite visualizar los resultados e identificar regiones de elevada similitud (Bloques Colineales Locales - Locally Collinear Blocks LCBs) (1, 31).

Tabla 6.1 Secuencias de genomas comparadas utilizando el software libre Mauve.

Organismo	Biomuestra[A]	Bioproyecto[A]	Ensamble[A]	Tecnología usada para la secuenciación
Micrococcus luteus SA211	10253004	PRJNA497281	GCA_003691675.1	PacBio
Micrococcus luteus NCTC 2665	00000281	PRJNA20655	GCA_000023205.1	454 piro secuenciación
Micrococcus luteus SGAir0127	08222739	PRJNA388547	GCA_003071525.1	PacBio
Micrococcus sp. FDAARGOS_333	06173346	PRJNA224116	GCF_002206575.2	PacBio; Illumina (WGS)
Micrococcus sp. CH7	04335744	PRJNA224116	GCF_001595485.1	Illumina MiSeq (WGS)
Micrococcus sp. HMSC31B01 (e01)	03436263	PRJNA224116	GCF_001816085.1	Illumina (WGS)
Micrococcus sp. HMSC067E09 (e09)	04480031	PRJNA224116	GCF_001812555.1	Illumina (WGS)
Micrococcus sp. KT16	09083205	PRJNA224116	GCF_003315015.1	PacBio (WGS)

[A]datos tomados del NCBI. Todos los códigos de las biomuestras inician con SAMN.

En un primer análisis, se incluyeron a los genomas de *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. CH7, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Micrococcus* sp. KT16 y *Micrococcus luteus* SA211. En tanto, en el segundo análisis se tuvieron en cuenta únicamente aquellos microorganismos cuyo genoma estaba secuenciado por completo, sin zonas sin secuenciar (*gaps*), que incluyen a *Micrococcus luteus* SA211, NCTC 2665 y SGAir0127.

Por otra parte, también se realizó un análisis de la secuencia de SA211 con NCTC 2665 en la plataforma de la página web del Laboratorio de Halófilos del Dr DasSarma (https://halo.umbc.edu). La plataforma permite comparar genomas de a pares, dando como resultado *mismatches* (secuencias que no se corresponden entre los genomas) entre las secuencias comparadas y las localizaciones de las diferencias encontradas.

6.3.5. Predicción del proteoma

La secuencia del genoma de *Micrococcus luteus* SA211 se utilizó para predecir la identidad de las proteínas que la cepa podría sintetizar. Para la predicción de los genes en el genoma bacteriano se utilizó el programa GeneMark.hmm (32, 33, 34). Este programa permite encontrar puntos de transición entre estados de codificación y no codificantes. Se consideraron las identidades de proteínas con *E-values* menores a 10^{-6} (35).

6.4. Resultados y discusión

Micrococcus luteus SA211 se caracterizó mediante el análisis de la secuencia de su genoma.

6.4.1. Características generales del genoma y metiloma

La separación de los ácidos nucleicos totales mostró la presencia no solamente de ADN genómico en la muestra, sino además de otros elementos genéticos (Figura 6.2). La digestión la muestra con ARNasa permitió verificar que las bandas observadas previas a la digestión correspondían a ARN, ya que no se detectaron en el extracto digerido.

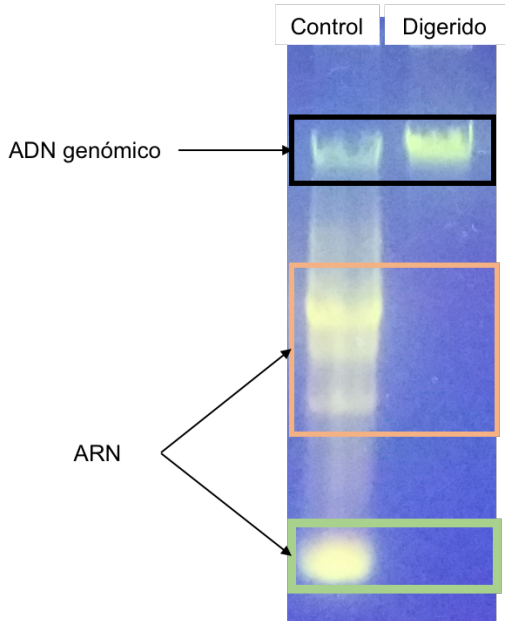


Figura 6.2 Geles de las corridas electroforéticas de las muestras de ADN control (sin digerir) y digeridas con ARNasa (Inbio, 10 mg/mL, 2,5 U/μg). Cada 20 μL de extracto de ácidos nucleicos totales se agregaron 3 μL de enzima y se incubó durante 40 min a 37 °C.

El genoma de SA211 está compuesto por 2.483.045 pb, es rico en GC (73%) y consiste en un solo cromosoma circular. Este genoma es de menor tamaño que el de

Micrococcus luteus NCTC 2665 (17), de 2.501.097 pb y comparten el mismo porcentaje de GC. Otro genoma similar, es el *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn (ATCC 12698), con 2.411.958 pb y contenido de GC del 73,14%, característico de esta especie (36). La secuenciación de SA211 mostró que esta cepa no presenta elementos genéticos extracromosómicos, lo contrario a lo descripto previamente por Dhanarani y col (2009) para otras especies de *Micrococcus* (37). Cepas de la especie *Micrococcus luteus* fueron descriptas como resistentes a antibióticos y con actividad osmotolerante, ligadas a la presencia de plásmidos (15, 18). Por otro lado, el genoma de la cepa SGAir0127 mostró la presencia de un plásmido como parte del genoma (38).

Los genomas microbianos contienen una variedad de modificaciones en sus bases, generalmente como consecuencia de metilaciones de residuos que contienen adenina o citosina. Estas metilaciones ocurren por la acción de sistemas de restricción-modificación (RM), que son mecanismos de defensa que protegen a la célula de bacteriófagos, por ejemplo. En general, los sistemas RM incluyen una enzima de restricción (endonucleasa) y una metilasa que son específicas para un motivo determinado. Las endonucleasas reconocen y escinden la cadena de ADN en el motivo para degradar el ADN extraño. Como el ADN bacteriano propio ha sido metilado, la bacteria está protegida y el sistema de degradación de ADN no actuará sobre su propio genoma. Estas modificaciones también participan en controlar procesos biológicos, como el ciclo celular, la replicación de ADN, su reparación, expresión génica y patogenicidad (39, 40, 41).

Las modificaciones a nivel de ADN pueden afectar una variedad de procesos en los organismos, incluyendo la expresión de genes, su silenciamiento, replicación del ADN, reparación y regulación de la transcripción. En genomas bacterianos, las N^6-metiladenina (m^6A), N^4-metilcitosina (m^4C) y 5-metilcitosina (m^5C) funcionan como componentes de sistemas de RM (3, 39). Los grupos metilo de estos elementos sobresalen del surco mayor de la doble hélice de ADN, que son en general sitios de reconocimiento para proteínas de unión al ADN, lo que lleva a una regulación en la interacción entre bases de adenina o citosina críticos con dichas proteínas. Este proceso de metilación de bases ocurre después de la replicación del ADN (14).

En el genoma de *Micrococcus luteus* SA211, los motivos metilados incluyen en su mayoría modificaciones en la base de adenina (Tabla 6.2), dando origen a N^6-metiladenina (m6A), que es la modificación más común encontrada en genomas bacterianos (40, 41). A su vez, mediante la metodología de secuenciación utilizada se determinó dónde se localizan las secuencias que codifican para las metiltransferasas (MTasas) que participaron en el proceso de metilación. Como las enzimas tienen la

capacidad de metilar secuencias específicas, al conocer cuáles son las secuencias que codifican para dichas enzimas se puede conocer cuáles son las secuencias diana, y relacionar su metilación a alguna propiedad específica en la célula. En el caso de los primeros tres motivos, todos los encontrados en el genoma estaban metilados (Tabla 6.2). En el caso de CTCGAG, sólo alrededor del 15-40% de los motivos detectados con esta secuencia presentaron metilación (probable m5C), y no se pudo determinar con precisión cuál es la base metilada.

Tabla 6.2 Motivos metilados en *Micrococcus luteus* SA211. Las secuencias están en dirección 5´ a 3´. Las bases subrayadas indican la base metilada en la secuencia. Los motivos con R tienen un nucleótido A o G.

Motivo	Modificación	Motivos detectados (%)	Locus de MTasa predicho
GC<u>A</u>(N7)R<u>T</u>GT	m6A*	100	FMM_08165
CAG<u>A</u>TG	m6A*	100	FMM_10000
AGCCC<u>A</u>	m6A*	99,9	FMM_11335
CTCGAG	probable m5C	15 - 40	FMM_08635

m6A: la base metilada es N^6-metiladenina
m5C: la base metilada es 5 metilcitosina

Una de las consecuencias más importantes de las metilaciones sobre los microorganismos es una resistencia incrementada que les permite proliferar en ambientes bajo estrés (42). Por ejemplo, *Escherichia coli* es capaz de crecer en presencia de antibióticos cuando presenta metilaciones en la adenina del motivo GATC de su genoma. Sin embargo, si no presenta dichas metilaciones pierde su capacidad de resistencia (42). Esta situación permite comprender la existencia de cepas de la misma especie con diferentes sensibilidades a compuestos tóxicos y a antibióticos (42). Además, en distintas cepas patógenas se ha relacionado de forma directa el grado de virulencia con la presencia de metilaciones (40).

6.4.2. Anotación del genoma

El genoma de *Micrococcus luteus* SA211 codifica para 2.161 proteínas totales (25), con un promedio de puntos isoeléctricos de 5,6 y una moda de 4,8, lo que indica la presencia de proteínas ácidas (Figura 6.3), las cuales son características de microorganismos halófilos (43). A comparación de la cepa *Micrococcus luteus* NCTC 2665, el genoma de SA211 codifica para 242 proteínas menos, en concordancia con el menor tamaño del genoma de la cepa. Asimismo, en el genoma de *Micrococcus luteus*

(Schroeter) Cohn (ATCC 12698) se detectó un total de 2.317 secuencias que codifican para proteínas, 156 menos que en las descriptas para *Micrococcus luteus* SA211.

La detección de proteínas utilizando Genemark dio un mayor valor (2.281) que las predichas por NCBI (2.161). Esto puede ser consecuencia de los programas utilizados para las predicciones.

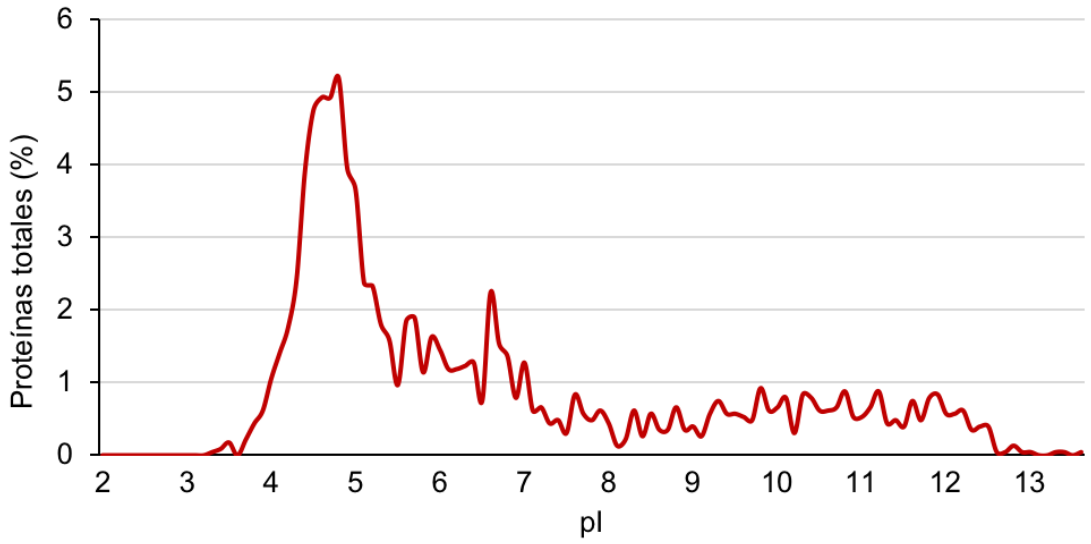


Figura 6.3 Distribución de las proteínas totales de *Micrococcus luteus* SA211 de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI).

En el genoma de SA211 también se encontraron secuencias que codifican para 48 RNAt (Tabla 6.3), tal como ocurre con *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn (ATCC 12698) (36) incluyendo a todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento y correcto funcionamiento de las células. Además, en SA211 se encontraron dos operones de los ARNr 5S, 16S y 23S, ubicados en diferentes direcciones en la secuencia (esto puede verse de acuerdo con las bases de inicio y de finalización en el genoma). Se localizó cada una de las secuencias de ARN detectadas en el genoma, pudiendo determinar además la dirección en la que se encuentra.

Tabla 6.3 Locus en el genoma de *Micrococcus luteus* SA211 de secuencias de ARNr y ARNt.

Locus	Base de inicio	Base de fin	Tipo de ARN	Nombre y operón
FMM_3001	57418	58533	ARNr	5s ARNr (1)
FMM_3002	54134	57223	ARNr	23S ARNr (1)
FMM_3003	52177	53687	ARNr	16S ARNr (1)
FMM_3004	445799	445684	ARNr	5S ARNr (2)

Tabla 6.3 Locus en el genoma de *Micrococcus luteus* SA211 de secuencias de ARNr y ARNt *(Continuación)*.

Locus	Base de inicio	Base de fin	Tipo de ARN	Nombre y operón
FMM_3005	449082	445993	ARNr	23S ARNr (2)
FMM_3006	451038	449528	ARNr	16S ARNr (2)
FMM_3007	58221	58297	ARNt	ARNt-Pro
FMM_3008	71190	71266	ARNt	ARNt-Thr
FMM_3009	73193	73266	ARNt	ARNt-Val
FMM_3010	193769	193845	ARNt	ARNt-Leu
FMM_3011	239494	239565	ARNt	ARNt-Gln
FMM_3012	348161	348232	ARNt	ARNt-Asn
FMM_3013	405585	405658	ARNt	ARNt-Met
FMM_3014	613023	613094	ARNt	ARNt-Gln
FMM_3015	613150	613222	ARNt	ARNt-Glu
FMM_3016	613352	613424	ARNt	ARNt-Glu
FMM_3017	688216	688289	ARNt	ARNt-Val
FMM_3018	729519	729592	ARNt	ARNt-Pro
FMM_3019	767922	767997	ARNt	ARNt-Ala
FMM_3020	769385	769457	ARNt	ARNt-Ala
FMM_3021	856740	856821	ARNt	ARNt-Leu
FMM_3022	1712060	1712133	ARNt	ARNt-Gly
FMM_3023	2161862	2161935	ARNt	ARNt-Ile
FMM_3024	2162167	2162239	ARNt	ARNt-Ala
FMM_3025	2194570	2194653	ARNt	ARNt-Leu
FMM_3026	2282484	2282556	ARNt	ARNt-Lys
FMM_3027	2297408	2297480	ARNt	ARNt-Glu
FMM_3028	2297597	2297670	ARNt	ARNt-Asp
FMM_3029	2297743	2297818	ARNt	ARNt-Phe
FMM_3030	2399680	2399765	ARNt	ARNt-Ser
FMM_3031	2481616	2481526	ARNt	ARNt-Ser
FMM_3032	1796351	1796279	ARNt	ARNt-Ala
FMM_3033	1583381	1583300	ARNt	ARNt-Tyr
FMM_3034	1572075	1572004	ARNt	ARNt-Thr

Tabla 6.3 Locus en el genoma de *Micrococcus luteus* SA211 de secuencias de ARNr y ARNt *(Continuación).*

Locus	Base de inicio	Base de fin	Tipo de ARN	Nombre y operón
FMM_3035	1571943	1571870	ARNt	ARNt-Met
FMM_3036	1554211	1554139	ARNt	ARNt-Trp
FMM_3037	1324002	1323929	ARNt	ARNt-Met
FMM_3038	1221243	1221167	ARNt	ARNt-Pro
FMM_3039	944012	943929	ARNt	ARNt-Leu
FMM_3040	819473	819400	ARNt	ARNt-Gly
FMM_3041	819381	819311	ARNt	ARNt-Cys
FMM_3042	819252	819181	ARNt	ARNt-Val
FMM_3043	819152	819079	ARNt	ARNt-Gly
FMM_3044	728465	728395	ARNt	ARNt-Gly
FMM_3045	714120	714047	ARNt	ARNt-Arg
FMM_3046	706867	706792	ARNt	ARNt-His
FMM_3047	591914	591842	ARNt	ARNt-Lys
FMM_3048	591199	591119	ARNt	ARNt-Leu
FMM_3049	534819	534747	ARNt	ARNt-Arg
FMM_3050	89479	89406	ARNt	ARNt-Arg
FMM_3051	29581	29508	ARNt	ARNt-Thr
FMM_3052	27789	27702	ARNt	ARNt-Ser
FMM_3053	19116	19025	ARNt	ARNt-Ser
FMM_3054	1882	1809	ARNt	ARNt-Arg

6.4.3. Comparación de los genomas de SA211 con otros *Micrococcus* cercanos filogenéticamente

Para la mayoría de los experimentos en los que se secuencian genomas, la comparación con otras secuencias es muy importante, con el objeto de determinar la existencia de similitudes y diferencias entre los genomas de los organismos comparados. Muchas veces es más fácil comprender dónde se encuentran estas diferencias e interpretar los resultados a través de la visualización de las comparaciones mediante la generación de figuras. Uno de los softwares utilizados para este fin es Mauve (44), que crea bloques de diferentes colores y los relaciona mediante líneas de unión, que permiten detectar cuáles son los locus compartidos y en qué ubicación de cada genoma se encuentran. Las secuencias compartidas se codifican como bloques del mismo color.

Asimismo, las secuencias que no se comparten aparecen como huecos en el genoma correspondiente.

La comparación del genoma de SA211 con otros filogenéticamente similares (*Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. CH7, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus* sp. KT16) permitió identificar secuencias compartidas entre los genomas. Asimismo, permitió determinar que los bloques mencionados anteriormente fueron conformados por secuencias muy cortas (bloques pequeños) y distribuidos de manera diferente en los genomas (Figura 6.4). Esto es consistente con la metodología utilizada para la secuenciación de las cepas de las bases de datos, ya que al ser Whole Genome Shotgun Sequencing (WGS) las secuencias de los genomas no se encuentran completas. Justamente, una de las dificultades de la secuenciación mediante WGS es que como resultado se obtienen secuencias cortas. Estas secuencias deben acomodarse mediante comparación con secuencias de genomas de organismos cercanos filogenéticamente para poder determinar el orden en el que los *contigs* (secuencias de ADN superpuestas que permiten reconstruir una secuencia original) o *scaffolds* (serie de *contigs* que se encuentran en el orden correcto, pero no necesariamente unidos) se encontrarían en el genoma. Esta metodología permite tener una cobertura de todo el genoma, pero la secuencia final se obtiene con *gaps* (brechas o espacios vacíos) razón por la que se observaron tantas diferencias en las comparaciones, aunque los porcentajes de homología hayan sido altos.

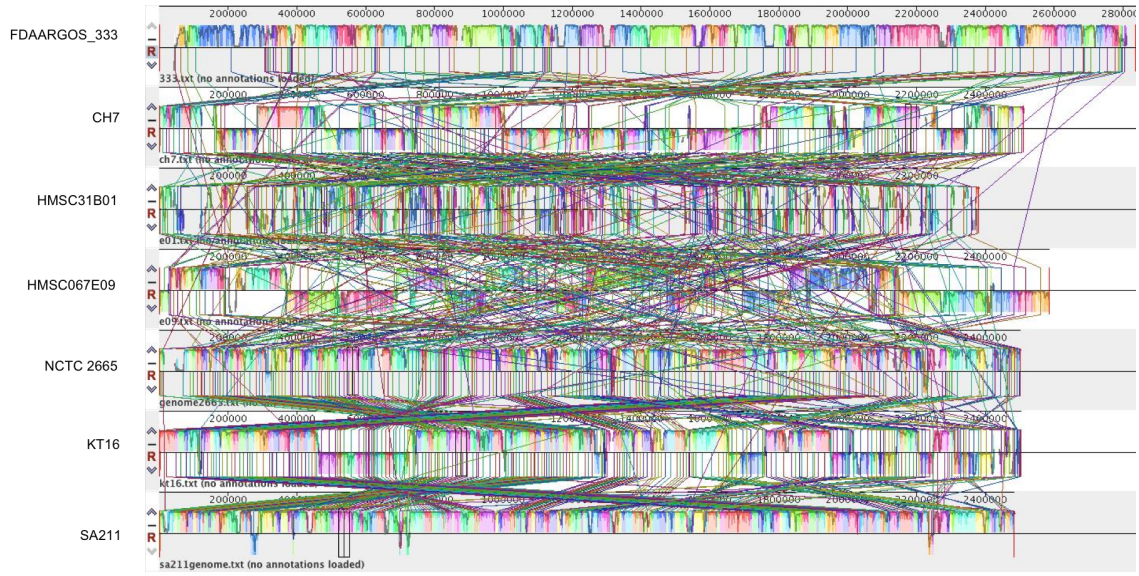


Figura 6.4 Comparación de las secuencias de los genomas correspondientes a las cepas *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. CH7, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus luteus* NCTC 2665, *Micrococcus* sp. KT16 y

Micrococcus luteus SA211. Los bloques de colores de cada genoma representan secuencias compartidas. Las secuencias compartidas se relacionan mediante líneas de unión entre los genomas.

Una segunda comparación, realizada con genomas de las cepas *Micrococcus luteus* SGAir0127 y *Micrococcus luteus* NCTC 2665, con una cobertura completa de la secuencia, permitió determinar las similitudes entre ellas. Se observaron cuatro bloques de alta homología presentes en todos los genomas, representados por los colores amarillo, rojo, violeta y azul (Figura 6.5). Por otro lado, se observa en el segundo genoma los bloques rojo y azul tienen otra localización; sin embargo, en todas están presentes todos los bloques, es decir que comparten la misma información genética. Además, las secuencias que son diferentes entre los genomas, representadas por huecos, son muy cortas en comparación con las compartidas.

Putonti y col (2017) (36) también compararon el genoma de *Micrococcus luteus* con la cepa NCTC 2665 utilizando Mauve y encontraron secuencias similares, así como regiones únicas de cada cepa, tal como se encontró con el genoma del presente estudio.

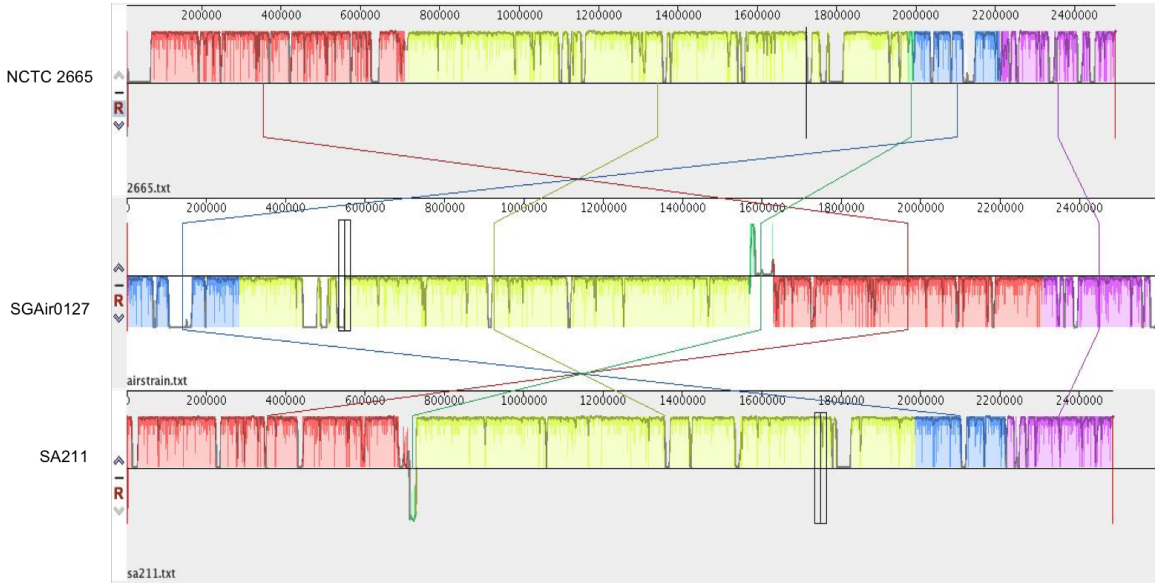


Figura 6.5 Comparación de las secuencias de los genomas correspondientes a las cepas de *Micrococcus luteus* NCTC 2665, SGAir0127 y SA211. Los bloques de colores de cada genoma representan secuencias compartidas. Las secuencias compartidas se relacionan mediante líneas de unión entre los genomas.

En cuanto a las comparaciones de genomas llevadas a cabo mediante la plataforma de Haloweb, se detectaron 1.024 *mismatches* entre las secuencias de *Micrococcus luteus* SA211 y NTCT 2665. Se evaluaron los *mismatches* encontrados, detectando en algunos de ellos deleciones para SA211. Es decir que, esta cepa carece de secuencias

presentes en NTCT 2665. A pesar de que en algunos *mismatches* se detectaron deleciones de 500 pb para SA211, estas secuencias no parecen participar en funciones imprescindibles para la célula.

6.4.4. Comparación de los pIs de las proteínas predichas en la cepa SA211 con los de otros organismos

Las proteínas predichas se analizaron mediante GeneMark.hmm y se determinaron los puntos isoeléctricos para cada una de ellas. Las diferencias entre las distribuciones de los pIs de proteínas de distintos organismos permitió establecer una separación entre las proteínas que pertenecen a microorganismos no halófilos con respecto a los halófilos (Figura 6.6). Para la comparación se seleccionaron los proteomas de *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* 168 y *Escherichia coli* BL21 cargados en la base de datos del NCBI. Además, se utilizaron los datos de pI de las proteínas totales de la cepa modelo de arqueas halófilas *Halobacterium* sp. NRC-1 y los valores de la cepa halófila *Micrococcus luteus* SA211.

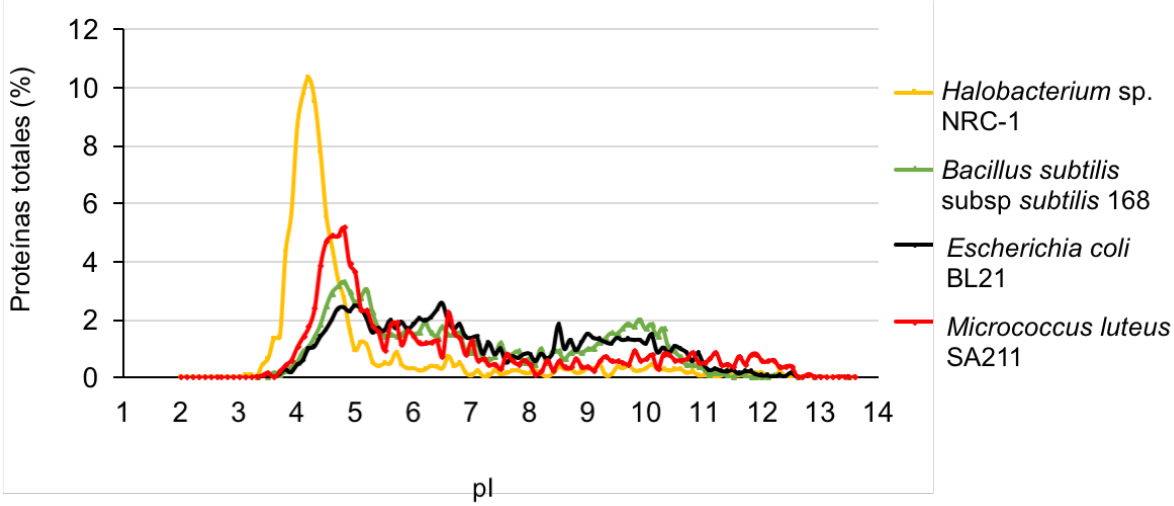


Figura 6.6 Distribución de pI de las proteínas totales predichas de *Halobacterium* sp. NRC-1, *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* 168, *Escherichia coli* BL21y *Micrococcus luteus* SA211.

La gran mayoría de las proteínas de NRC-1 fueron ácidas, presentaron una distribución unimodal, con una media de 5 y moda de 4,2. Estos valores de pI ácidos son característicos de microorganismos halófilos extremos. La propiedad de sintetizar proteínas con esta naturaleza les permite mantener su actividad en presencia de elevadas concentraciones de sales (33). En el caso de *Micrococcus luteus* SA211 se pudo ver una distribución similar, aunque no tan marcada hacia las proteínas ácidas y con una menor proporción de proteínas en casi todos los puntos isoeléctricos. Además,

SA211 presentó proteínas con valores de pI 12, característica que no se encontró en las otras cepas evaluadas.

En el caso de los pIs de las proteínas de *Escherichia coli* BL21 la distribución fue más homogénea y presentó pocas proteínas ácidas. En este caso no se observó una distribución unimodal, la mayor cantidad de proteínas del microorganismo tomaron valores de pI entre 5 y 7 y además, presentó una cantidad considerable de proteínas con pI entre 8,5 y 10. En general, la distribución en los valores de pI de las proteínas pertenecientes a microorganismos no halófilos da como resultado una media cercana a la neutralidad (43). Esto refuerza el hecho de que este microorganismo sea incapaz de crecer en presencia de altas concentraciones de sales, tal como fue verificado de manera experimental en el Laboratorio del Dr. DasSarma (datos no mostrados). Por otra parte, microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* han mostrado la capacidad de crecer en ambientes salinos (45), siendo halotolerantes, ya que también pueden crecer en medios sin sales. En el caso de la cepa de *Bacillus subtilis* subsp *subtilis* 168 analizada, se observó una situación intermedia entre *Micrococcus luteus* SA211 y *Escherichia coli*, BL21 ya que la mayoría de las proteínas presentaron un valor de pI alrededor de 5, pero además presentó otro pico cercano a 10. Estos resultados concuerdan con los datos descriptos por Kennedy y col (2001) (46), que observaron la misma distribución. Estos resultados mostraron que *Micrococcus luteus* SA211 tiene la capacidad de sintetizar proteínas ácidas, siendo ésta una característica importante para mantener su actividad en presencia de sales; pero además, también puede producir proteínas alcalinas que le darían la habilidad de crecer en medios no salinos, siendo de esta forma capaz de subsistir en ambas condiciones.

Paul y col (2008) (9) realizaron comparaciones de la distribución de los pIs predichos de las proteínas codificadas en genomas de microorganismos tanto halófilos como no halófilos, de los dominios Archaea y Bacteria. Del mismo modo que en este caso, ellos encontraron un incremento en los porcentajes de proteínas ácidas en las cepas halófilas en comparación con las no halófilas. Además, también detectaron un porcentaje considerable de proteínas con un valor de pI de 10, además de proteínas a pI 5. Puede observarse en su trabajo con microorganismos no halófilos, una distribución amplia con respecto a los valores de pI de las proteínas codificadas por el genoma, siendo muy diferentes a la situación descripta en el caso de microorganismos halófilos. Resultados similares también fueron descriptos por Kennedy y col (2001) (46), mostrando que las características de las proteínas codificadas por cada genoma varían de acuerdo con la naturaleza de los microorganismos.

Observando que la cepa bajo estudio presentó una distribución de los pI de sus proteínas diferente al de cepas no halófilas y al de arqueas halófilas extremas, se realizó una comparación entre los pI de las proteínas predichas del genoma de SA211 con el de una bacteria halófila (*Salinibacter rubrum*) y con una arquea poliextremófila, (*Methanothermobacter thermautotrophicus*), empleando *Halobacterium* sp. NRC-1 como referencia (Figura 6.7).

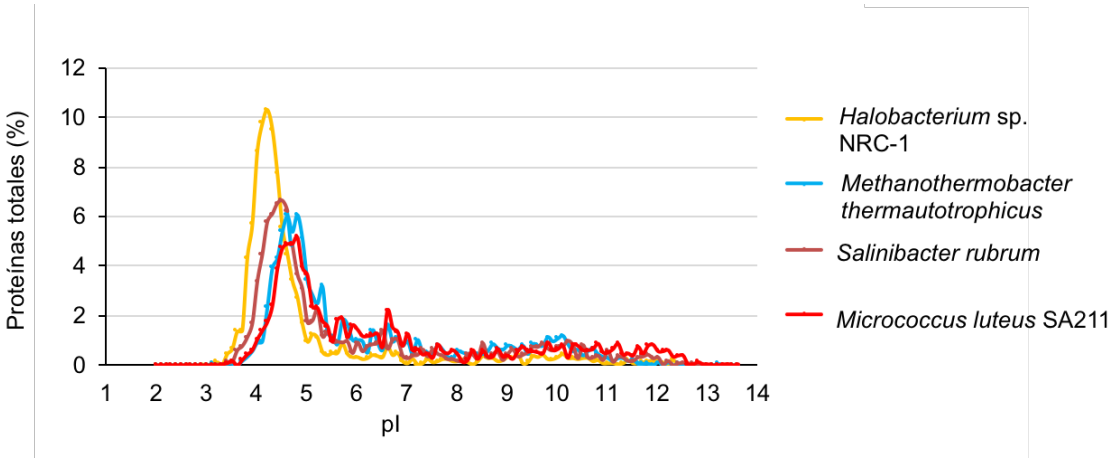


Figura 6.7 Distribución de pI de las proteínas totales predichas para *Halobacterium* sp. NRC-1, *Methanothermobacter thermautotrophicus, Salinibacter rubrum* y *Micrococcus luteus* SA211.

Los cuatro microorganismos estudiados mostraron una distribución unimodal de los valores de pI bastante uniforme. Sin embargo, cada microorganismo presentó sus particularidades con respecto a los puntos isoeléctricos de sus proteínas. Al ser *Halobacterium* sp. NRC-1 una cepa halófila extrema, su moda es la más ácida, seguida por la bacteria halófila *Salinibacter rubrum*. *Micrococcus luteus* SA211 no presentó tantas proteínas ácidas como las esperadas para una cepa halófila extrema. Por su parte, la arquea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* es metanogénica, termofílica, anaeróbica y basófila (47) y presenta un perfil de proteínas muy similar al de la cepa bajo estudio. A pesar de pertenecer a diferentes dominios se conoce que las cepas de arqueas alcalófilas comparten características con bacterias halófilas (48). Esto es consecuencia de que los ambientes halófilos tienen diferentes valores de pH, y muchos de los ambientes hipersalinos existentes son alcalinos. Como consecuencia de las adaptaciones a los ambientes, las arqueas basófilas deben mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad y lo hacen de la misma manera que los halófilos. Así, las proteínas estudiadas de microorganismos haloalcalófilos tienen una gran proporción de residuos acídicos, repitiendo la situación observada en proteínas halófilas (48). Esta podría ser una explicación a que las proteínas predichas para la cepa SA211

comparta de manera más cercana su distribución con la cepa de arquea y no con la bacteriana halófila respecto a sus pIs.

Además, los genomas de las cepas de *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. KT16, *Micrococcus* sp. CH7 y *Micrococcus luteus* SA211 se utilizaron para predecir los puntos isoeléctricos de las proteínas codificadas en sus genomas. A partir de estos datos, se analizó la distribución de los pIs de las proteínas predichas (Figura 6.8). Se pudo determinar que todos tienen una distribución de pI unimodal y también se detectó la presencia de proteínas con un valor de pI de 12, situación que no fue observada en el análisis de microorganismos halófilos, ya sean arqueas o bacterias, y halófilas o no. Al pertenecer todos los microorganismos al mismo género, se puede afirmar que la distribución de los pIs de las proteínas predichas a partir de la secuencia del genoma de todos ellos es común, al menos de los microorganismos del género *Micrococcus* utilizados para este análisis y difiere de las distribuciones observadas en los otros microorganismos evaluados.

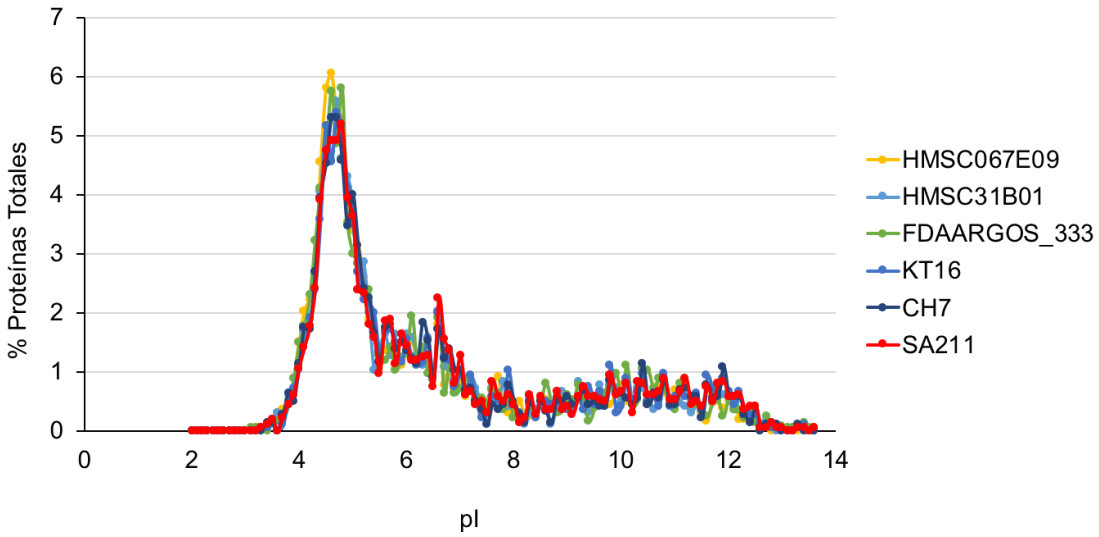


Figura 6.8 Distribución de pI de las proteínas totales predichas de diferentes cepas de *Micrococcus,* entre las que se encuentran *Micrococcus* sp. HMSC067E09, *Micrococcus* sp. HMSC31B01, *Micrococcus* sp. FDAARGOS_333, *Micrococcus* sp. KT16, *Micrococcus* sp. CH7 y *Micrococcus luteus* SA211.

El conjunto de proteínas predichas a partir del genoma de *Micrococcus luteus* SA211, conocido como proteoma, permitió detectar la presencia de genes codificantes para proteínas que participan en una gran variedad de funciones. La determinación del conjunto de proteínas que están codificadas en el genoma se conoce como “Anotación del genoma”. Esto permitió identificar proteínas involucradas en el metabolismo celular,

en el transporte a través de la membrana plasmática, en la interacción con metales, proteínas relacionadas a la respuesta a estrés ambiental, entre otras. Entre las proteínas encontradas, además se detectaron componentes de sistemas de reparación de ADN relacionados a daños causados por luz ultravioleta, por lo que esta cepa tiene potencialidad de ser resistente a la radiación, como ha sido descripto para otros microorganismos del mismo género (19). Es necesario realizar un análisis profundo de las proteínas predichas mediante GeneMark para determinar las propiedades potenciales de esta cepa tan prometedora.

6.5. Conclusiones

Las herramientas de biología molecular y bioinformática son muy poderosas y útiles en la obtención de información de microorganismos. Mediante el análisis de la cepa aislada del Salar del Hombre Muerto *Micrococcus luteus* SA211, se pudo determinar que contiene un solo cromosoma circular y no posee otros elementos genéticos.

A partir de las comparaciones entre los genomas de cepas relacionadas filogenéticamente a *Micrococcus luteus* SA211 se determinó que no existen diferencias considerables entre los genomas de los microorganismos analizados.

Mediante el análisis de las proteínas totales predichas por la secuencia del genoma de SA211 y la comparación con otros genomas se determinó que la mayor cantidad de ellas tienen naturaleza ácida, característico de microorganismos halófilos.

Finalmente, es importante destacar que, a partir de la secuencia del genoma de la cepa de interés, es posible profundizar en el estudio de sus propiedades y características con el fin de determinar sus potencialidades en aplicaciones biotecnológicas.

6.6. Referencias

1. Kremer FS, McBride AJA, Pinto LdS. 2017. Approaches for *in silico* finishing of microbial genome sequences. Genet Mol Biol 40(3):553-576.
2. Loman NJ, Pallen MJ. 2015. Twenty years of bacterial genome sequencing. Nat Rev Microbiol 13(12):787.
3. Rhoads A, Au KF. 2015. PacBio sequencing and its applications. Genomics Proteomics Bioinformatics 13(5):278-289.
4. De Castro RE, Ruiz DM, Giménez MI, Silveyra MX, Paggi RA, Maupin-Furlow JA. 2008. Gene cloning and heterologous synthesis of a haloalkaliphilic extracellular protease of *Natrialba magadii* (Nep). Extremophiles 12(5):677-687.

5. Karan R, Capes MD, DasSarma P, DasSarma S. 2013. Cloning, overexpression, purification, and characterization of a polyextremophilic β-galactosidase from the Antarctic haloarchaeon *Halorubrum lacusprofundi*. BMC biotechnol 13(1):1-11.
6. Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. 2007. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 91(4):351-372.
7. Henz SR, Huson DH, Auch AF, Nieselt-Struwe K, Schuster SC. 2004. Whole-genome prokaryotic phylogeny. Bioinformatics 21(10):2329-2335.
8. Snel B, Bork P, Huynen MA. 1999. Genome phylogeny based on gene content. Nature genet 21(1):108-110.
9. Paul S, Bag SK, Das S, Harvill ET, Dutta C. 2008. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. Genome Biol 9:R70 doi:10.1186/gb-2008-9-4-r70
10. Jones DL, Baxter BK. 2017. DNA Repair and Photoprotection: Mechanisms of Overcoming Environmental Ultraviolet Radiation Exposure in Halophilic Archaea. Front Microbiol 8(1882):1-16.
11. Matallana-Surget S, Meador JA, Joux F, Douki T. 2008. Effect of the GC content of DNA on the distribution of UVB-induced bipyrimidine photoproducts. Photochem Photobiol Sci 7(7):794-801.
12. Gautheret D. 2014. Screening Genome Sequences for known RNA Genes or Motifs. Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition 595-618.
13. Golofit-Szymczak M, Gorny RL. 2018. Microbiological air quality in office buildings equipped with different ventilation systems. Indoor Air 28(6):792-805.
14. Kuo V, Shoemaker WR, Muscarella ME, Lennon JT. 2017. Whole-Genome Sequence of the Soil Bacterium *Micrococcus* sp. KBS0714. Genome Announc 5(32):1-2.
15. Dib JR, Perez MF, Schuldes J, Poehlein A, Wagenknecht M, Farías ME, Meinhardt F, Daniel R. 2018. Complete genome sequences of pLMA1 and pLMA7, two large linear plasmids of *Micrococcus* strains isolated from a high-altitude lake in Argentina. Genome Announc 6(8): 1-2.
16. Martínez FL, Orce GI, Rajal VB, Irazusta VP. 2018. Salar del Hombre Muerto, source of lithium-tolerant bacteria. Environ Geochem Health 1-15.
17. Young M, Artsatbanov V, Beller HR, Chandra G, Chater KF, Dover LG, Goh EB, Kahan T, Kaprelyants AS, Kyrpides N, Lapidus A, Lowry SR, Lykidis A, Mahillon J, Markowitz V, Mavromatis K, Mukamolova GV, Oren A, Rokem JS, Smith MC,

Young DI, Greenblatt CL. 2010. Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. J Bacteriol 192:841-60.

18. Dib JR, Liebl W, Wagenknecht M, Farías ME, Meinhardt F. 2013. Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus.* Appl Microbiol Biotechnol 97:63-75.
19. Mohana DC, Thippeswamy S, Abhishek RU. 2013. Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. Radiat Prot Environ 36:168-174.
20. Letnik I, Avrahami R, Port R, Greiner A, Zussman E, Rokem JS, Greenblatt C. 2017. Biosorption of copper from aqueous environments by *Micrococcus luteus* in cell suspension and when encapsulated. Int Biodeterior Biodegradation 116:64-72.
21. Santhini K, Myla J, Sajani S, Usharani G. 2009. Screening of *Micrococcus* sp from oil contaminated soil with reference to bioremediation. Bot Res Int 2(4):248-252.
22. Vijay V, Vandana KB, Mathan Kumar R, Prabagaran SR. 2017. Genetic analysis of arsenic metabolism in *Micrococcus luteus* BPB1, isolated from the Bengal basin. Ann Microbiol 67: 79-89.
23. Pospiech A NB. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends Genet 11:217-218.
24. Green MR, Sambrook J. 2017. Precipitation of DNA with Isopropanol. Cold Spring Harb Protoc 2017:pdb prot093385.
25. Martínez FL, Anton BP, DasSarma P, Rajal V, Irazusta V, Roberts RJ, DasSarma S. 2019. Complete genome sequence and methylome analysis of *Micrococcus luteus* SA211, a halophilic, lithium-tolerant actinobacterium from Argentina. Microbiol Resour Announc 8:e01557-18.
26. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, C opeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. Nat Methods 10:563–569.
27. Sánchez-Romero MA, Cota I, Casadesús J. 2015. DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. Curr Opin Microbiol 25:9-16.
28. Besemer J, Borodovsky M. 2005. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses. Nucleic Acids Res 33:W451-4.
29. Lowe TM, Chan PP. 2016. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. Nucleic Acids Res 44:W54W57.

30. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. Nucleic Acids Res 44:6614-6624.
31. Edwards DJ, Holt KE. 2013. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. Microb Inform Exp 3(2):1-9. doi:10.1186/2042-5783-3-2
32. Lukashin AV, Borodovsky M. 1998. GeneMark.hmm: New solutions for gene finding. Nucleic Acids Res 26:1107-1115.
33. Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. 2001. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes: Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. Nucleic Acids Res 29:26072618.
34. Borodovsky M, Mills R, Besemer J, Lomsadze A. 2003. Prokaryotic Gene Prediction Using GeneMark and GeneMark.hmm. Curr Protoc Bioinformatics 1(1):4-5.
35. Chua HN, Liu G, Wong L. 2011 Protein Function Prediction Using Protein–Protein Interaction Networks. In: Kihara D. (eds) Protein Function Prediction for Omics Era. Springer, Dordrecht. pp 243-270
36. Putonti C, Cudone E, Kalesinskas L, Engelbrecht KC, Koenig DW, Wolfe AJ. 2017. Draft genome sequence of *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn (ATCC 12698). Genome Announc 5:e00576-17. https://doi.org/10.1128/genomeA.00576-17.
37. Dhanarani TS, Shankar C, Park J, Dexilin M, Kumar RR, Thamaraiselvi K. 2009. Study on acquisition of bacterial antibiotic resistance determinants in poultry litter. Poult Sci 88(7):1381-1387.
38. NCBI Database Accession: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_003071525.1 *Micrococcus luteus* SGAir0127. Fecha de último acceso: 27 de Julio de 2018
39. Payelleville A, Legrand L, Ogier JC, Roques C, Roulet A, Bouchez O, Mouammine A, Givaudan A, Brillard J. 2018. The complete methylome of an entomopathogenic bacterium reveals the existence of loci with unmethylated Adenines. Sci Rep 8(1):12091.
40. Casadesús J. 2016. Bacterial DNA methylation and methylomes. In DNA Methyltransferases-Role and Function (pp. 35-61). Springer, Cham.
41. Methylome Analysis Technical Note. 2017. https://github.com/PacificBiosciences/Bioinformatics-Training/wiki/Methylome-Analysis-Technical-Note. Fecha de ultimo acceso: 30 de Enero de 2019.

42. Cohen NR, Ross CA, Jain S, Shapiro RS, GutierrezA, Belenky P, Li H, Collins JJ. 2016. A role for the bacterial GATC methylome in antibiotic stress survival. Nature Genet 48(5):581.
43. DasSarma S, DasSarma P. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. Curr Opin Microbiol 25:120-126.
44. Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. Genome Res 14:1394–1403.
45. Casillo A, Lanzetta R, Parrilli M, Corsaro M. 2018. Exopolysaccharides from marine and marine extremophilic bacteria: structures, properties, ecological roles and applications. Mar Drugs 16(2):69.
46. Kennedy SP, NgWV, Salzberg SL, Hood L, DasSarma S. 2001. Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. Genome Res 11(10):1641-1650.
47. Farhoud MH, Wessels HJ, Steenbakkers PJ, Mattijssen S, Wevers RA, Van Engelen BG, Jetten MSM, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Keltjens JT. 2005. Protein complexes in the archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus* analyzed by blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 4(11):1653-1663.
48. Reed CJ, Lewis H, Trejo E, Winston V, Evilia C. 2013. Protein adaptations in archaeal extremophiles. Archaea 2013:1-14.

Capítulo 7: Análisis proteómico de bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto

7.1. Introducción

Las herramientas de biología molecular, tal como se expresó en el capítulo anterior, son muy útiles para determinar tanto las potencialidades de los microorganismos como la manera en la que ellos responden a factores ambientales. Por su parte, la proteómica facilita el estudio de los mecanismos, rutas metabólicas, enzimas etc., utilizados por los microorganismos bajo diferentes condiciones, lo que permite entender la respuesta de los microorganismos frente a variaciones ambientales (1).

Aunque ambas son herramientas complementarias, la gran ventaja de la proteómica frente a la genómica radica en que, a pesar de la potencialidad de los genes que presenta un organismo, ellos se expresan solo cuando se requiere su función. Conocer cuándo se sintetizan determinadas proteínas es la clave para comprender muchos procesos de adaptación. Por otra parte, la síntesis de proteínas es un proceso muy regulado que utiliza diferentes sistemas y además se lleva a cabo a costas de un gran gasto de energía de la célula (2).

En particular los microorganismos halófilos, poseen proteínas y enzimas adaptadas a las altas concentraciones de sales que les permiten mantener sus funciones, mientras que las proteínas no adaptadas a dichas condiciones se desnaturalizan, agregan y precipitan (3, 4). Por su lado, los microorganismos halotolerantes pueden regular su metabolismo tanto en condiciones de altas concentraciones de sales como en ausencia de éstas. Las propiedades de esos microorganismos son realmente interesantes, entre ellas destacan la capacidad que tienen algunos de acumular poli-β-hidroxibutirato en su interior, además de biodegradar compuestos xenobióticos, como es el caso de *Oceanimonas* sp. GK1 (5). Se han encontrado, además, actinobacterias halotolerantes con resistencia elevada a radiación gamma y a la desecación (5).

Entre las adaptaciones celulares y enzimáticas destacan aquellas que les permiten mantener la presión osmótica de las células con respecto al ambiente (4,6). Como se vio en el Capítulo 6, unas de las adaptaciones más estudiadas son las cargas negativas que presentan las enzimas de arqueas y de muchas bacterias halófilas y/o halotolerantes como consecuencia de un exceso de residuos ácidos, alterando su hidrofobicidad y permitiendo que permanezcan solubles y activas en condiciones de alta salinidad (3, 4, 7). Además, se han encontrado modificaciones a nivel de composición de aminoácidos, teniendo los halófilos, proteínas con una mayor proporción de glutamato y aspartato en la superficie y una disminución de residuos básicos, principalmente lisina (4, 8, 9, 10). La estructura general de las proteínas de microorganismos halófilos y no-halófilos se mantiene a pesar del cambio en su composición aminoacídica (8). Las proteínas de halófilos son más estables que sus correspondientes de no-halófilos debido a sus características poliextremófilas, lo que las hace muy interesantes para ser utilizadas en industrias alimenticia, textil y en detergentes, por ejemplo (4). Existe un gran número de enzima de microorganismos halotolerantes que permanecen activas en rangos amplios de concentraciones de NaCl, sin dependencia específica de la sal. La actividad de enzimas halotolerantes a concentraciones altas de sales dependería de las estructuras terciarias de las proteínas, ya que mantienen su actividad en presencia y en ausencia de sales, al contrario de lo que ocurre con enzimas halófilas, que pierden actividad en ambientes desprovistos de sales (10). La modificación hacia la síntesis de proteínas con una mayor proporción de residuos ácidos es una estrategia relativamente sencilla a través de la cual se incrementa la tolerancia a sales (10). Además, como se ha informado en el análisis del genoma de la cepa *Micrococcus luteus* SA211 (Capítulo 6), a pesar de tener este microorganismo la capacidad de crecer en ausencia de sal, las proteínas codificadas en su genoma presentan un mayor porcentaje de residuos ácidos, permitiendo su crecimiento en ambientes de elevada salinidad.

Los microorganismos no poseen un mecanismo activo de transporte de agua, por lo que la turgencia de la célula es controlada por la concentración de solutos en el interior celular (11). Los microorganismos halófilos han desarrollado dos mecanismos para sobrevivir en ambientes salinos. Uno es el "*salt-in*", en el que la bioquímica intracelular está adaptada a funcionar en concentraciones altas de sal, y el otro es llamado "*salt-out*", donde la estrategia es la acumulación de solutos orgánicos que mantienen el citoplasma libre de sales y les permiten mantener la presión osmótica en ambientes salinos (12, 13, 14). Los compuestos que se sintetizan tienen como función proteger a los componentes intracelulares cuando las fluctuaciones de sales en al

ambiente son muy rápidas, permitiendo la supervivencia de los microorganismos al regular la salida de agua de la célula (4, 11). Un típico ejemplo del primer mecanismo está asociado a Haloarchaea, mientras que el segundo es más utilizado por microorganismos de los dominios Bacteria y Eukarya (3, 4, 6). Además, cabe destacar que algunos microorganismos halófilos tienen la capacidad de utilizar una combinación de ambos (7).

Cabe señalar que, los microorganismos halófilos y halotolerantes muchas veces no sintetizan los osmolitos compatibles *de novo*, sino que los toman, o toman precursores, del ambiente que los rodea (13). Esto implica que poseen transportadores transmembrana cuya síntesis y/o actividad está regulada por la presencia de sales. Los microorganismos no halófilos, por su parte, pueden aumentar su osmotolerancia mediante este tipo de mecanismos (13).

Muchos de los microorganismos presentes en ambientes extremos están expuestos a fluctuaciones en la concentración salina debido a variaciones de distintos factores, por ejemplo a la humedad del suelo, o como consecuencia de lluvias. Por ello, deben adaptarse rápidamente a los cambios en el ambiente a través de la regulación de la concentración de los solutos orgánicos u osmolitos que sintetizan en el interior celular (15, 16). Es por esta razón que, los microorganismos halotolerantes tienen la capacidad de proliferar en un amplio rango de concentraciones salinas, mientras los halófilos requieren altas concentraciones de sal para su crecimiento.

7.2. Objetivos

- Estudiar la síntesis diferencial de proteínas de *Micrococcus luteus* SA211, *Bacillus licheniformis* FAMB1, *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Bacillus atrophaeus* HA120A en ausencia y presencia de distintas concentraciones de cloruro de litio.

- Determinar si existen diferencias en las síntesis de proteínas en *Micrococcus luteus* SA211 cuando crece en LiCl o en NaCl.

- Estudiar el proteoma de *Micrococcus luteus* SA211 en ausencia y en presencia de litio en busca de las proteínas y rutas metabólicas involucradas en la tolerancia y resistencia a LiCl.

7.3. Materiales y métodos

7.3.1. Selección de cepas y extracción de proteínas totales

Para el análisis de síntesis diferencial de proteínas se seleccionaron las bacterias previamente aisladas e identificadas como *Brevibaterium halotolerans* SX139, *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Bacillus licheniformis* FAMB1. Estas se cultivaron en Erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo definido preparado sin (DM) y con 10 (D10) o 30 g/L (D30) (sección 3.4.3.2.), a 30 °C y 200 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria.

La extracción de proteínas se llevó a cabo mediante ruptura mecánica de las células. Para ello, las células se cosecharon mediante centrifugación a 4 °C y 10.000 rpm durante 15 min (Centrífuga Sorval ST 16R). Los pellets celulares se resuspendieron en 120 µL de buffer de lisis (Urea 8 M, Tris-HCl 25 mM pH 8 e inhibidor de proteasas cocktail I -Calbiochem-) y se les agregaron aproximadamente 0,1 g de perlas de vidrio (Glass beads, Sigma, G-8893, diámetro de perla ≤ 106 µm). Luego, se sometieron las células resuspendidas a 30 ciclos de 1 minuto de agitación a máxima velocidad en vórtex alternando con 1 minuto en baño de hielo. Mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C se recuperó el sobrenadante correspondiente al extracto de proteínas totales y se mantuvo a 4 °C hasta su uso. Las proteínas totales se cuantificaron utilizando el kit de Fluorómetro Qubit® 2.0 (Qubit® *Protein Assay Kit*) y se separaron mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida desnaturalizante.

7.3.1.1. Cultivo de *Micrococcus luteus* SA211 y extracción de proteínas totales

La cepa *Micrococcus luteus* SA211 se utilizó para realizar comparaciones sobre la síntesis de sus proteínas en medio de cultivo definido (DM) suplementados con 10 y 30 g/L de cloruro de litio (D10 y D30, respectivamente) y con 14 y 42 g/L de cloruro de sodio (Na1 y Na2, respectivamente). Para la preparación de los medios con sodio se mantuvieron constantes las concentraciones de ion cloruro, aunque se reemplazaron los iones litio por sodio, sin alterar la molaridad final de sal. Los inóculos se prepararon según lo descripto en el Capítulo 4 (Sección 4.3.2). Los cultivos se incubaron a 30 °C y 200 rpm y las proteínas se extrajeron según lo descripto en el punto anterior, con una modificación en el protocolo. En lugar de utilizar perlas de vidrio, se utilizó arena estéril y se realizaron 60 ciclos de 1 minuto de agitación a máxima velocidad en vórtex alternando con 1 minuto en baño de hielo. Posteriormente, se realizó un agujero en el fondo del tubo que contenía el lisado de células y la arena y se colocó un tubo colector

por debajo. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min a 4 °C y se recuperó el extracto con proteínas totales en el tubo inferior. Por último, se realizó una nueva centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante del tubo que contenía el extracto proteico.

Los extractos de proteínas totales se cuantificaron utilizando el kit de Fluorómetro Qubit® 2.0 y se separaron mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida desnaturalizante.

7.3.2. Sistemas electroforéticos

7.3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes monodimensionales (1D SDS PAGE)

Este tipo de técnica permite la separación de las proteínas en un sistema discontinuo desnaturalizante utilizando el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS), donde las proteínas se separan según su tamaño. Se utilizó la cuba *Mini Protean3* (Bio-Rad) y la fuente de poder Bio-Rad (PowerPac™ Basic) y se emplearon geles separador y concentrador (Tabla 7.1). Una vez preparadas las soluciones de los geles, se colocó el gel separador hasta aproximadamente 1 cm desde el límite superior del soporte (tiene la función de retener a las proteínas durante su migración y de esta manera separarlas de acuerdo a su tamaño). Se agregó agua destilada para formar un límite definido y evitar que el límite superior esté en contacto con el aire, ya que el oxígeno afecta negativamente la polimerización de la poliacrilamida. Posteriormente se extrajo el agua, se secó esa área y se agregó la solución del gel concentrador al soporte (la función de este gel es concentrar las proteínas en un mismo punto de partida, desde donde comienzan a separarse). Sobre esta solución se colocó el peine y se dejó polimerizar.

Tabla 7.1 Composición de los geles separador y concentrador.

Componente	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	10%	5%
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	0,1%	0,1%
Persulfato de amonio (PSA)	0,04%	0,04%
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	0,2%	0,2%
Buffer Tris-HCl	0,375 M (pH 8,8)	0,125 M (pH 6,8)

Las proteínas presentes en los extractos proteicos se solubilizaron utilizando 7 µL del buffer A (SDS al 15%, EDTA 30 mM, ditiotreitol (DTT) 10 mM), se incubó durante 3 minutos a 100 °C y se agregaron 4 µL de buffer B (20% sacarosa, 0,0125% azul de bromofenol). Se utilizó un buffer de electroforesis compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM y SDS al 0,1%. La electroforesis se desarrolló a 15 mA, al alcanzar la muestra la zona del gel separador la intensidad se aumentó a 30 mA, y finalizó 1 cm antes de que el frente de corrida alcanzara el borde del gel.

7.3.2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes bidimensionales (2D SDS PAGE)

La electroforesis bidimensional (2D) separa las proteínas a partir de una mezcla según sus propiedades de masa y de carga, bajo la acción de un campo eléctrico. En la primera dimensión la separación ocurre de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI) de cada proteína y se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF). En la segunda dimensión la separación ocurre según el peso molecular de las proteínas y se realiza utilizando un sistema SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida.

Para este análisis de utilizó la cepa *Micrococcus luteus* SA211 cultivada en DM, D10 y D30 a 30 °C durante 72 h a 200 rpm.

Para la primera dimensión se utilizaron tiras con gradiente de pH inmovilizado (*immobilized pH gradient* - IPG) 4,0 a 7,0 de 7 cm (GE Healthcare Life Sciences). La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE de 8 x 8 cm. Para cada condición 300 µg (aproximadamente 25 µL de extracto) de proteínas obtenidas según el apartado 7.3.1.1, se resuspendieron en un volumen final de 150 µL de solución de rehidratación (RHB, Tabla 7.2). Se cargó dicho volumen en cada tira y la hidratación se desarrolló durante toda la noche. Posteriormente se realizó el isoelectroenfoque utilizando el equipo Ettan™ IPGphor3 (GE Healthcare Life Sciences) con el programa: lineal 300 V, 150 V h; lineal 500 V, 500 V h; gradiente 1.000 V, 750 V h; gradiente 3.000, 2.000 V h, gradiente 10.000 V, 16.500 V h; lineal 10.000 V, 9.000 V h; lineal 500 V, 24 h con una acumulación total de 28.900 V h. Una vez finalizado el isoelectroenfoque, las tiras se almacenaron a -20 °C en tubos de vidrio hasta su uso.

Tabla 7.2: Composición de la solución de rehidratación.

Componente	Concentración
Urea	8 M
Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS)	4%
Anfolitos	0,50%
Azul de bromofenol	0,00125%
Ditiotreitol (DTT)	50 mM

Para la segunda dimensión, las tiras se descongelaron durante 15 min y se equilibraron con 5 mL de solución equilibradora I (Tabla 7.3) durante 15 min. Posteriormente se desechó esta solución, se reemplazó por 5 mL de la solución equilibradora II y se incubó durante 15 min más. Finalizado este tiempo, las tiras se colocaron en la parte superior de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se fijaron con solución de agarosa (agarosa al 0,5%, azul de bromofenol al 0,002 % ,1 X de buffer de electroforesis).

Tabla 7.3 Composición de las soluciones equilibradoras I y II.

Componente	Solución equilibradora I	Solución equilibradora II
Tris-HCl pH 8,8	0,375 M	0,375 M
Urea	6 M	7 M
SDS	2%	2%
Glicerol	20%	20%
DTT	130 mM	-
Iodoacetamida (IAA)	-	135 mM

Los geles se corrieron en buffer de electroforesis a 15 mA hasta que el frente de corrida alcanzó 1 cm antes del final del gel.

7.3.3. Tinción de los geles

Se utilizaron dos tinciones de azul de Coomassie diferentes para los geles de poliacrilamida. A los geles monodimensionales se los incubó en una solución colorante compuesta por Coomassie Blue Brilliant (CBB) G250 al 0,1%, ácido acético al 10%, e isopropanol al 25% durante 30 min (17). Transcurrido ese tiempo, se colocaron los geles en una solución decolorante (ácido acético al 10%, isopropanol al 10%) hasta

observar bandas nítidas y el fondo del gel transparente. Finalmente, se colocaron en agua destilada y se conservaron a 4 °C hasta obtener su imagen.

Para los geles bidimensionales se utilizó la tinción de Coomassie Coloidal, la cual es compatible con la técnica de identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (18). La tinción consistió en fijar las proteínas con una solución fijadora (etanol al 30%, ácido fosfórico al 2%) durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los geles tres veces durante 30 min cada vez, utilizando agua destilada y se colocaron en una solución de tinción compuesta por metanol al 10%, sulfato de amonio al 17% y ácido fosfórico al 2%. Los geles se incubaron durante una hora y posteriormente se agregó el Coomasie Blue Brilliant G250 en polvo a una concentración final de 0,5 g/L y se mantuvieron en agitación por dos días. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada, se escanearon para obtener una imagen digital (Gel scanning III Image Scanner, GE Healthcare Life Sciences) y se conservaron a 4 °C hasta el corte de los *spots* seleccionados.

7.3.4. Análisis de los geles e identificación de proteínas

Los geles, realizados por triplicado para cada condición, se analizaron en búsqueda de las bandas (en el caso de los geles 1D) y de los puntos o *spots* (en los geles 2D) de proteínas que mostraran diferencias en sus intensidades. Para ello se utilizó el programa QuantityOne (Bio-Rad). Los *spots* que mostraron diferencias en sus intensidades al comparar las tres situaciones (DM, D10 y D30) se cortaron de los geles, utilizando un bisturí estéril, y se los colocó en tubos de plástico. Estos *spots* se enviaron a CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires) donde se realizó su identificación mediante huella peptídica utilizando espectrometría de masas tipo MALDI TOF/TOF (MatrixAssisted Laser Desorption/Ionization, Time Of Flight). Las proteínas fueron identificadas en la base de Swiss-Prot utilizando MASCOT (http://www.matrixscience.com) como herramienta de búsqueda.

7.4. Resultados y discusión

La síntesis diferencial de proteínas en microorganismos halotolerantes en presencia y ausencia de sales permitió establecer diferencias en la respuesta de los microorganismos frente a diferentes estreses.

7.4.1. Síntesis diferencial de proteínas en presencia de diferentes concentraciones de litio (1D SDS PAGE)

Se evaluaron las proteínas sintetizadas por tres de los microorganismos aislados del Salar del Hombre Muerto *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Brevibacterium halotolerans* SX139 y *Bacillus licheniformis* FAMB1 y se determinaron las diferencias existentes entre las producidas cuando los mismos crecieron en dos concentraciones distintas de cloruro de litio (10 y 30 g/L) (Figura 7.1).

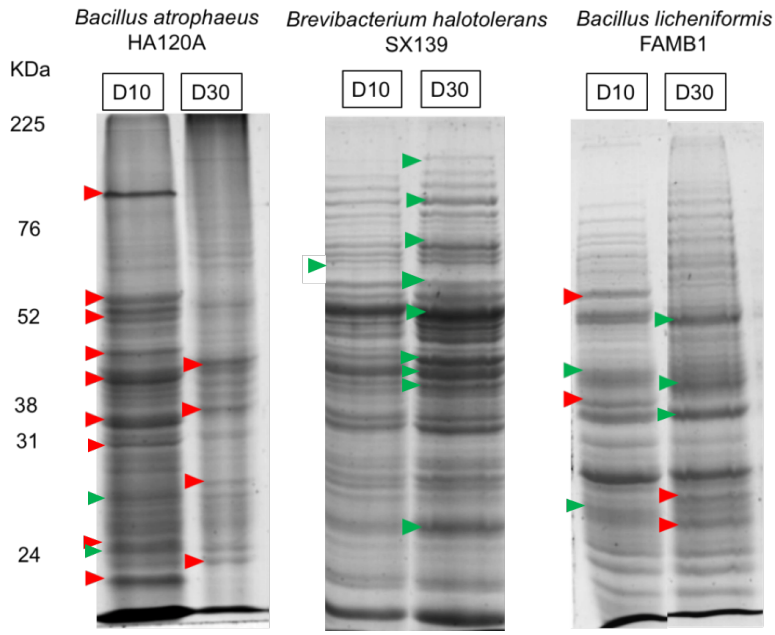


Figura 7.1 Síntesis diferencial de proteínas en geles monodimensionales de las cepas *Bacillus atrophaeus* HA120A, *Brevibacterium halotolerans* SX139 y *Bacillus licheniformis* FAMB1 cultivadas en medio definido con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de cloruro de litio. Las flechas rojas señalan las bandas presentes en solo una de las condiciones evaluadas para cada cepa y las verdes señalan proteínas presentes en ambas concentraciones de LiCl pero sobresintetizadas en la situación señalada.

En el caso de *Bacillus atrophaeus* HA120A, se detectó que la síntesis de proteínas es muy diferente en las dos condiciones evaluadas. Por ejemplo, se detectó la desaparición de una banda de alto peso molecular en la condición de mayor concentración de litio y que está presente en D10. Lo mismo sucede entre los pesos moleculares de 60 y 30 KDa aproximadamente, donde se encontraron bandas que corresponden a proteínas sintetizadas solo en D10. También es llamativa una banda de bajo peso molecular presente en la situación de 10 g/L y no en la de 30 g/L de LiCl. Del mismo modo, hay bandas que están presentes solo en la calle correspondiente a las proteínas sintetizadas en la situación de mayor concentración de litio. En este caso

las bandas presentan pesos de entre 40 y 20 KDa. La marcada diferencia en la síntesis de proteínas podría indicar que la respuesta de estas células involucra mecanismos y rutas metabólicas distintas dependiendo de la concentración de LiCl presente en el medio de cultivo.

Las proteínas involucradas en la respuesta a estreses (ambiental, químico, físico, etc.) han sido ampliamente evaluadas en diferentes modelos y organismos. Entre las más estudiadas están por ejemplo, las *heat shock proteins* (Hsp), otras chaperonas moleculares y enzimas específicas como la superóxido dismutasa y la catalasa (19). Probablemente la banda de 90 KDa obtenida en D10 (Figura 7.1) corresponda a las Hsp denominadas HSP90, las cuales están involucradas en la respuesta a estrés por metales (20). En el caso de especies del género *Bacillus*, se ha detectado una respuesta diferente en la síntesis de sus proteínas dependiendo del tipo de estrés al que se someten (21). Dicha síntesis involucra a proteínas típicas de respuesta a estrés general con funciones de eliminación de radicales libres (superóxido dismutasa, catalasa y tiorredoxinas), pero también a aquellas involucradas en la reparación y/o eliminación de biomoléculas dañadas como las chaperonas de plegamiento y las proteasas (21). Por otro lado, se informó un incremento en el contenido de hierro y manganeso debido a un sistema de captación de manganeso, resultando en un desbalance en la concentración de dichos iones en las células a favor del manganeso, el cual puede generar protección contra el estrés producido por el peróxido de hidrógeno (22). La presencia de altas concentraciones de sales lleva a la inducción de genes de catalasa y a una actividad aumentada de esta enzima (23).

Por su parte, *Brevibacterium halotolerans* SX139 presentó perfiles proteicos similares cuando la cepa creció en las dos concentraciones de litio evaluadas. En este caso no se detectaron bandas que solo correspondan a una de las concentraciones sino cambios en su intensidad (flechas verdes, Figura 7.1). Es importante recordar que, cada banda de proteína en los geles representa un conjunto o mezcla de proteínas que tiene el mismo peso molecular. Por lo tanto, el cambio en la intensidad de una banda puede representar la sobresíntesis o la inhibición de una o de más de una proteína.

En cuanto a *Bacillus licheniformis* FAMB1 se observaron tanto bandas únicas para cada condición como algunas que varían es su intensidad (flechas rojas y verdes en la Figura 7.1, respectivamente). En el caso de la condición de 10 g/L las bandas sintetizadas únicamente en esta condición corresponden a los pesos de 60 y 40 KDa, mientras que, para la condición 30 g/L las dos bandas observadas presentan un peso de 30 KDa aproximadamente. Algunas bandas de pesos intermedios mostraron

proteínas como sobresintetizadas en una de las dos concentraciones de litio ensayadas. Ambas cepas de *Bacillus* son muy cercanas filogenéticamente (Sección 3.4.4.5.); sin embargo, el perfil proteico de ambas difirió significativamente así como los pesos moleculares de las proteínas sintetizadas diferencialmente.

Un estudio interesante se realizó con la cepa *Bacillus licheniformis* SSA 61 en busca de las proteínas diferencialmente sintetizadas en presencia de dos concentraciones de NaCl (10 y 15%) (15). Entre las proteínas identificadas como asociadas a la respuesta al estrés salino se detectaron enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, así como con la glicólisis, con el ciclo TCA, y con la generación de poder reductor (15). Resulta interesante que, en dicho trabajo se identificó una proteína de peso molecular de 60 KDa como superóxido dismutasa en la condición de estrés salino. Probablemente la banda correspondiente a dicho peso en los geles de FAMB1 de este trabajo, también corresponda a la misma proteína.

7.4.2. Síntesis diferencial de proteínas de la cepa *Micrococcus luteus* SA211 en presencia de litio y de sodio

Con el fin de conocer si los cambios en la síntesis de proteínas en los microorganismos estudiados se debieron a la presencia de Li^+ o del Cl^-, se realizó un ensayo donde además de evaluar las dos concentraciones de LiCl también se evaluaron las concentraciones equivalentes de NaCl. El microorganismo seleccionado para dicho estudio fue *Micrococcus luteus* SA211. A pesar de que la concentración final de sales en los medios de cultivo D10 y Na1 (10 g/L de LiCl y 14 g/L de NaCl, respectivamente) fueron equivalentes, los perfiles proteicos fueron diferentes (Figura 7.2). La misma situación ocurrió en los medios de cultivo D30 y Na2 (Figura 7.2). Esta situación permitió determinar que el microorganismo es capaz de reaccionar de manera distinta en presencia de dos cationes diferentes, y que la respuesta no se debe únicamente a los iones cloruro, sino que cada catión estimula una respuesta específica.

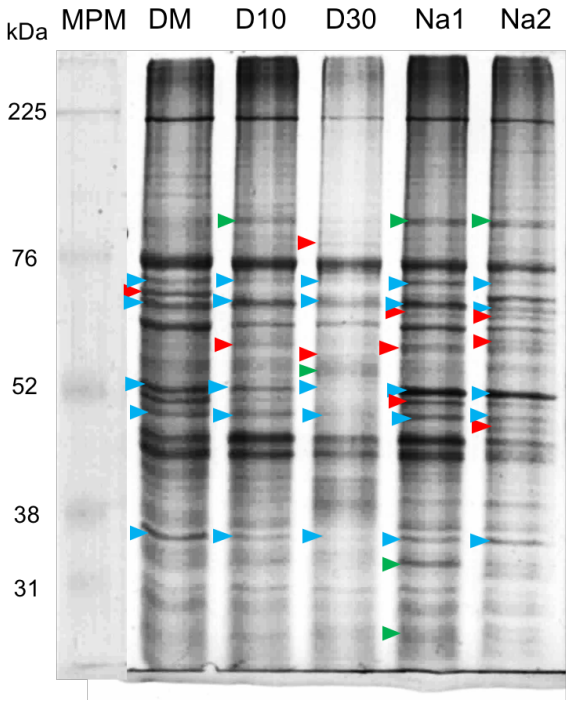


Figura 7.2 Síntesis diferencial de proteínas en geles monodimensionales producidas por *Micrococcus luteus* SA211 cultivada en medio definido sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl y con 14 (Na1) y 42 g/L (Na2) de NaCl. Las flechas rojas indican bandas detectadas sólo en esa condición, las verdes indican sobresíntesis con respecto a DM y las celestes señalan proteínas que están presentes en todas las condiciones en distintas intensidades.

Asimismo, la cepa en estudio también responde de manera diferente cuando se encuentra en presencia de diferentes concentraciones de las dos sales evaluadas. Se puede ver que existen variaciones en la cantidad de proteínas sintetizadas, así como también en las bandas detectadas.

Otros autores, trabajando con distintos microorganismos, como *Debaryomyces hanseni* y *Saccharomyces cerevisiae* han determinado que la presencia de KCl, NaCl y LiCl tienen efectos diferentes sobre las células (24). Mientras que NaCl y KCl produjeron estrés osmótico, el LiCl mostró un efecto inhibitorio específico sobre el crecimiento de los cultivos (24). Esto permite afirmar que, en los microorganismos la respuesta a los iones presentes en el ambiente puede ser específica, induciendo respuestas diferentes y produciendo alteraciones particulares en el crecimiento celular. Entre las proteínas que participan en la respuesta se encuentran desde sensores en la membrana hasta enzimas que participan en la síntesis de osmolitos o transportadores de precursores desde el exterior celular (25). En principio, el osmosensor dispararía una respuesta como consecuencia de la detección de sales en el ambiente (25). Posteriormente, y a través de un transporte activo, se acumularían los osmolitos en el exterior celular o bien se daría comienzo a su síntesis en el interior (23).

7.4.3. Estudio del proteoma de *Micrococcus luteus* SA211 en ausencia y presencia de dos concentraciones de litio

Micrococcus luteus SA211 sintetizó proteínas diferentes en presencia de los distintos medios de cultivo evaluados (Figura 7.3).

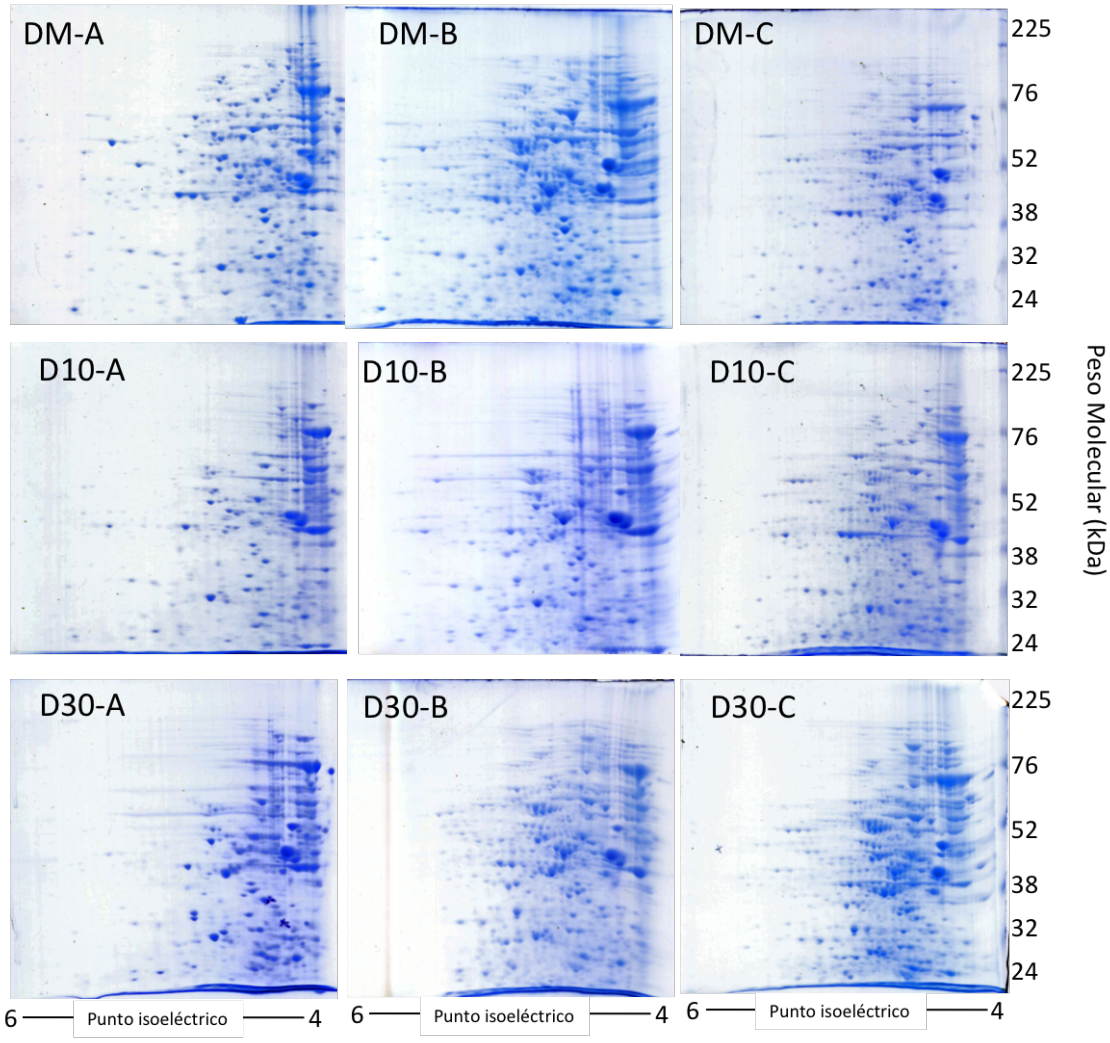


Figura 7.3 Geles bidimensionales mostrando las proteínas sintetizadas por *Micrococcus luteus* SA211 cultivado en medio definido sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl. Los geles con las letras A, B y C corresponden a tres experimentos independientes (kDa: kilodalton).

La separación bidimensional de proteínas permitió verificar lo encontrado mediante el análisis de proteínas predichas a través del genoma (sección 6.4.2), ya que fue posible visualizar que las proteínas tienen una naturaleza ácida, estando la mayoría de ellas localizada en las zonas del gel que correspondieron a los valores de pH 4 y 5. Además las tres repeticiones del experimento dieron lugar a geles homogéneos que

mantuvieron la mayoría de las diferencias entre las condiciones analizadas (Figura 7.3).

A partir del análisis proteómico de la cepa SA211 se pudieron detectar 46 *spots* sintetizados diferencialmente en alguna de las tres condiciones en al menos dos repeticiones (Figura 7.4). Nueve proteínas fueron solo detectadas cuando las células crecieron en medio definido sin adición de litio. Once fueron los *spots* seleccionados en la condición de 10 g/L de LiCl (del *spot* 10 al 20, Figura 7.4). Por último, la mayor cantidad de *spots* (26 en total) fueron detectados cuando las células crecieron en la mayor concentración de litio ensayada (30 g/L).

De los 46 *spots* cortados y enviados a identificar, fueron efectivamente identificados a partir de huella peptídica un total de 37. Los restantes 9 *spots* no identificados, pueden haber resultado contaminados o pueden haber contenido una concentración muy baja de proteínas impidiendo su identificación. Cabe destacar que algunos *spots* que se recortaron del gel correspondiente a D10 también están sobre-sintetizados en la condición D30. Un ejemplo de ello son los *spots* 10 (D10) y 24 (D30) ó 13 (D10) y 31 (D30). Así también, se observaron *spots* presentes en ambas condiciones, pero con mayor intensidad en el gel correspondiente a D30 comparado con el de D10, como los *spots* 38 (D30) y 16 (D10). Es importante destacar que dichos *spots* permitieron identificar las mismas proteínas.

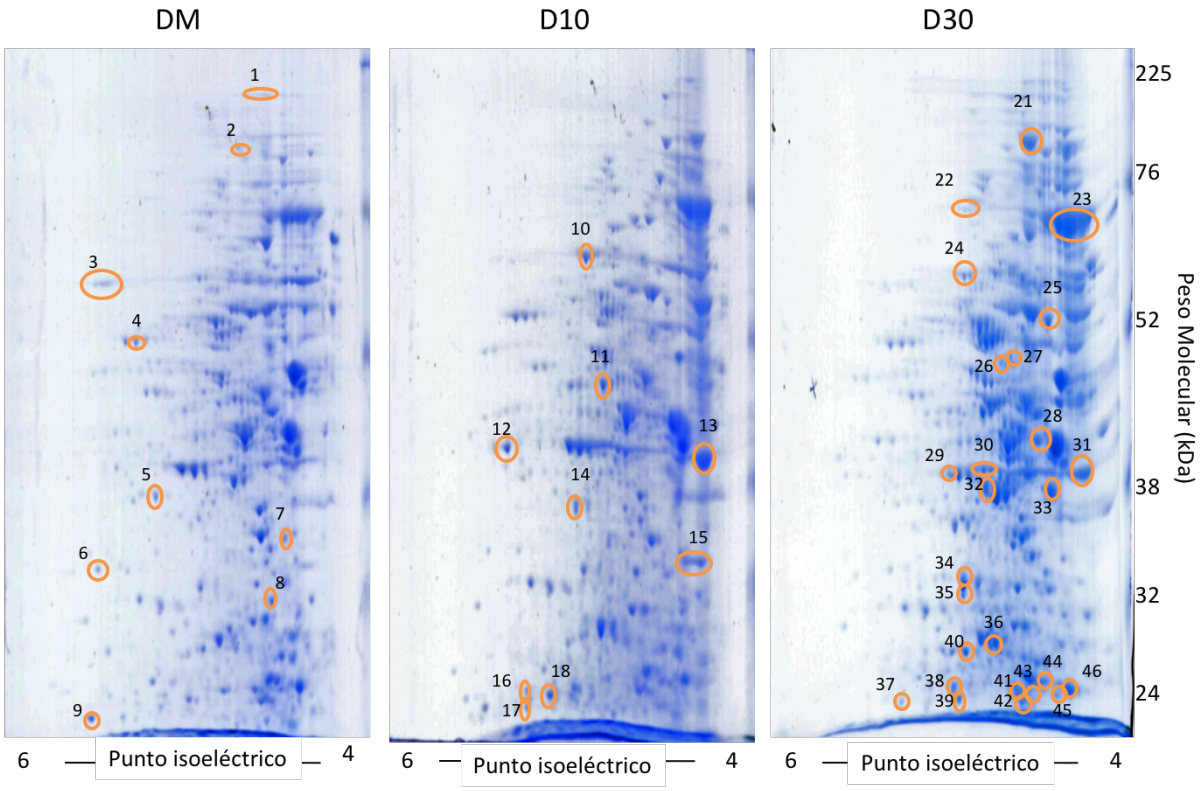


Figura 7.4 Análisis del proteoma de *Micrococcus luteus* SA211 cultivado en medios sin (DM) y con 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl. Los geles bidimensionales se tiñeron con Coomassie Coloidal y se evaluaron por triplicado. Los *spots* marcados con círculos, numerados del 1 al 46 para facilitar su localización, son los que mostraron diferencias en su intensidad, por lo que se cortaron del gel y se enviaron a secuenciar (kDa: kilodalton).

7.4.4. Identificación de los *spots* seleccionados

La identificación de los *spots* seleccionados permitió determinar cuáles son las proteínas involucradas en la respuesta al cloruro de litio. El análisis de los geles permitió conocer si los genes codificantes de proteínas que participan en esta respuesta fueron silenciados o inducidos. Con estas herramientas fue posible determinar que en cada condición de crecimiento evaluada se indujo la síntesis de proteínas que participan en procesos celulares involucrados tanto en diferentes aspectos del metabolismo celular como en la defensa de la célula frente al estrés (Tabla 7.4). Cabe destacar que, aunque la mayoría de las veces la identificación de cada proteína en el BLAST arrojó mayor similitud con *Micrococcus luteus*, en pocos casos mostró mayor similitud con microorganismos del filo Actinobacteria.

Tabla 7.4 Identificación de proteínas sintetizadas diferencialmente por *Micrococcus luteus* SA211 en medios de cultivo definido con 0 (DM), 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl.

Spot	**Proteína**	**Gen**	**MASCOT Score[A]**	**Función biológica**	**Sobre síntesis**
1	RNA polimerasa subunidad beta dirigida por ADN	*rpoB*	87	Transcripción	DM
2	Aminopeptidasa N	*pepN*	308	Actividad proteolítica	DM
3	Catalasa	*katE*	77	Defensa contra el estrés	DM
4	Dihidrolipoil deshidrogenasa	*ipdA*	162	Actividad oxidoreductasa	DM
5	Oxidoreductasa clase LLM flavina-dependiente	*limB*	228	Actividad oxidoreductasa	DM
8	Deshidrogenasa 3-hidroxibutiril-CoA	*fadB*	113	Metabolismo de los ácidos grasos	DM
9	Regulador transcripcional Familia Crp/Fnr	*crp*	216	Regulación de la transcripción	DM
10	F_0F_1 ATP sintasa subunidad alfa	*atpF*	246	Producción de ATP	D10/D30[B]
11	Acetil-CoA C-acetiltransferasa	*acat*	238	Procesos metabólicos	D10
12	Proteína con dominio de función desconocida DUF1852		256	Proteína de función desconocida	D10
13	Gliceraldehide-3-fosfato deshidrogenasa	*gaPDL3*	134	Actividad oxidorreductasa	D10/D30[B]
15	NLPA lipoproteína	*nlpA*	93	Proteína de membrana	D10
18	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	63	Actvidad oxidorreductasa	D10/D30[B]
19	Superóxido dismutasa	*sod1*	204	Defensa contra el estrés	D10
20	Superoxido dismutasa	*sod1*	200	Defensa contra el estrés	D10

[A]MASCOT Score: puntuación basada en probabilidad. Valores >71 en la identificación de las proteínas muestran significancia en su identificación ($p<0,05$).
[B]Las proteínas fueron sobresintetizadas en los dos medios indicados, siendo mayor en el medio escrito a la izquierda de la barra.

Tabla 7.4 Identificación de proteínas sintetizadas diferencialmente por *Micrococcus luteus* SA211 en medios de cultivo definido con 0 (DM), 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl *(Continuación)*.

Spot	**Proteína**	**Gen**	**MASCOT Score[A]**	**Función biológica**	**Sobre síntesis**
21	Aconitato hidratasa AcnA	*acnA*	269	Ciclo TCA-metabolismo de carbohidratos	D30
22	Proteína PaaZ	*paaZ*	120	Metabolismo de compuestos aromáticos	D30
23	Transportador ABC de unión a proteína	*pbp2*	209	Transporte transmembrana de cationes y compuestos	D30
24	F_0F_1 ATP sintasa subunidad alfa	*atpA*	187	Producción de ATP	D10/D30[B]
25	Leucil aminopeptidasa	*pepA*	132	Actividad proteolítica	D30
26	Aldehido deshidrogenasa	*AldhE*	126	Actividad oxidoreductasa	D30
27	Ferroquelatasa	*hemH*	183	Biosíntesis de grupos hemo	D30
28	Fosfoglicerato quinasa	*pgk*	223	Glicólisis	D30
30	Aldolasa de L-treonina de baja especificidad	*ltaE*	121	Biosíntesis de glicina	D30
31	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	*gaPDL3*	132	Actividad oxidorreductasa	D10/D30[B]
32	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	171	Actividad oxidorreductasa	D30
33	Proteína hipotética		202	Transportador de electrones	D30
34	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	194	Actividad oxidorreductasa	D30
35	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	202	Actividad oxidorreductasa	D30
36	Fe-S cluster ATPasaSufC	*sufC*	233	Actividad ATPasa	D30

[A]MASCOT Score: puntuación basada en probabilidad. Valores >71 en la identificación de las proteínas muestran significancia en su identificación ($p<0,05$).
[B]Las proteínas fueron sobresintetizadas en los dos medios indicados, siendo mayor en el medio escrito a la izquierda de la barra.

Tabla 7.4 Identificación de proteínas sintetizadas diferencialmente por *Micrococcus luteus* SA211 en medios de cultivo definido con 0 (DM), 10 (D10) y 30 g/L (D30) de LiCl *(Continuación).*

Spot	**Proteína**	**Gen**	**MASCOTScore[A]**	**Función biológica**	**Sobre síntesis**
38	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	113	Actividad oxidorreductasa	D30/D10[B]
39	Alcohol deshidrogenasa	*adhE*	135	Actividad oxidorreductasa	D30
40	3-oxoacil-ACP reductasa FabG	*fabG*	73	Metabolismo de los ácidos grasos	D30
42	MBL metalo-hidrolasa	*mbl*	89	Actividad hidrolasa	D30
44	Factor de elongación Tu	*tuf*	117	Biosíntesis de proteínas	D30
45	Factor de elongación Tu	*tuf*	118	Biosíntesis de proteínas	D30
46	Glutamina aminotransferasa	*gat*	80	Actividad proteolítica	D30

[A]MASCOT Score: puntuación basada en probabilidad. Valores >71 en la identificación de las proteínas muestran significancia en su identificación ($p<0,05$).
[B]Las proteínas fueron sobresintetizadas en los dos medios indicados, siendo mayor en el medio escrito a la izquierda de la barra.

De entre las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas, 7 se sobresintetizaron en ausencia de LiCl, 5 en 10 g/L de LiCl (D10), 19 en 30 g/L de LiCl (D30) y 6 fueron sobresintetizadas tanto en D10 como en D30 en comparación a las obtenidas en DM.

Micrococcus luteus SA211 sobresintetiza en ausencia de LiCl un conjunto de proteínas involucradas en la transcripción, actividades proteolíticas, de defensa al estrés y metabólicas. En ausencia de LiCl se detectó la síntesis de la enzima catalasa, involucrada generalmente en situaciones de protección de la célula contra el estrés oxidativo (23). En otro estudio se determinó la respuesta de la cepa bacteriana *Bacillus cereus* ATCC 14579 frente al estrés salino, determinando que en este caso se activan mecanismos de transportadores de iones y respuestas al estrés oxidativo en presencia de cloruro de sodio (5 y 10%) (23). En ambas concentraciones se detectó la actividad de la enzima catalasa, contrario a lo encontrado en el presente estudio con *Micrococcus luteus* SA211. Este es un indicativo de que la ausencia de la sal para SA211 genera un estrés oxidativo a la célula, activándose este mecanismo de defensa. Además, en la condición sin LiCl se detectó una mayor síntesis de enzimas

involucradas en la degradación de proteínas, con actividad de óxido-reducción y de metabolismo de ácidos grasos.

La respuesta al estrés producido por la presencia de LiCl implicaría un gasto de energía para la célula, ya que se puede detectar una mayor síntesis de proteínas involucradas en rutas metabólicas. En los dos medios de cultivo conteniendo litio se detectó la presencia de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*spots* 13 y 31 en D10 y D30, respectivamente) y alcohol deshidrogenasa (*spots* 18, 32, 34, 35, 38 y 39). La sobresíntesis de proteínas involucradas en la obtención de energía se ha descripto además para otros microorganismos estresados por la presencia de sales y metales pesados (15, 26). La enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es clave en la relación del metabolismo de carbohidratos con el de lípidos y también es el mayor contribuyente de electrones a la cadena transportadora de electrones (27). Por ejemplo, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha informado que la enzima en cuestión es clave para el crecimiento de la cepa en situaciones de estrés (27). Además, se ha caracterizado a esta enzima como sensor de estrés oxidativo en procesos de reparación de ADN y apoptosis (26), por lo que su sobresíntesis en SA211 en presencia de litio podría estar implicada en este tipo de procesos.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es muy importante en el metabolismo aeróbico ya que provee precursores biosínteticos y sus intermediarios son importantes en la obtención de compuestos indispensables para la célula (27). En el caso de SA211 se detectó además la síntesis de aconitato hidratasa en medio de cultivo D30, que participa en el ciclo mencionado ya que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato. Una situación similar ocurre con la cepa *Rhodococcus*sp. $A5_{wh}$, en la que se describió que esta proteína podría estar involucrada en las respuestas de la célula para resistir al estrés ocasionado por la presencia de litio (27). Además de las enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares, se detectaron en D30 enzimas que participan en la producción de energía tanto como consecuencia del transporte de electrones como por actividad de ATPasa (*spots* 24, 33, 36).

Asimismo, en SA211 se detectó en presencia de 30 g/L de LiCl la sobresíntesis de proteínas involucradas en la biosíntesis de polipéptidos. Esto permite determinar que la presencia de la sal de litio produce un estrés que requiere un gasto de energía y síntesis de nuevas proteínas (que podrían ser las de estrés, de reparación, transportadoras e involucradas en el metabolismo celular) (19).

En el caso de bacterias capaces de tolerar concentraciones elevadas de sales, los sistemas que permiten tomar osmolitos del ambiente son básicamente transportadores

del tipo ABC (ATP-*binding cassette*) o transportadores que consisten en una proteína única transmembrana (13). En SA211 se detectó la sobresíntesis de proteínas transportadoras ABC en el medio de cultivo D30, lo que indicaría la inducción de transporte desde el exterior celular de sustancias que pueden participar en la regulación de la osmolaridad. Asimismo, se conoce que en microorganismos capaces de sintetizar osmolitos compatibles, como lo son los halófilos y halotolerantes, la síntesis de transportadores de membrana se ve incrementada, como un mecanismo de recuperación de osmolitos que atraviesen la membrana hacia el exterior celular (13). El sistema ABC consiste en un dominio de unión al sustrato en el periplasma, una unidad transmembrana y una proteína citoplasmática, que permite el transporte a través de la hidrólisis del ATP y representa una manera mucho más económica para la célula de acumular osmolitos compatibles (13). Las proteínas involucradas en este transporte llevan a cabo la transferencia de ligandos a través de permeasas mediante la hidrólisis de ATP (28). En el análisis de proteínas sintetizadas por SA211 en el medio de cultivo D10, se detectó la de una lipoproteína de membrana. La estructura de estos dominios es similar a los de proteínas de unión periplasmáticas (responsables de interacciones con fosfatos, sulfatos, polisacáridos, aminoácidos) y están íntimamente relacionadas a los transportadores del tipo ABC. Estas proteínas de unión actúan como quimiorreceptores, osmosensores, en sistemas de transporte y como traductores de señales para vías celulares (29). La función de quimiorreceptores indica que su detección y la respuesta celular al estrés están ligadas estrechamente con el reconocimiento del ion en la superficie celular.

Además, en D30 se detectó la sobresíntesis de una proteína que participa en la producción de glicina. Muchos de los organismos expuestos a condiciones de hiperosmolaridad tienen la capacidad de sintetizar osmolitos para contrarrestar la pérdida de agua, como se mencionó previamente. La glicina-betaína es uno de los osmolitos más importantes para la supervivencia de microorganismos en condiciones de estrés abiótico (30). En general, la síntesis de este osmolito ocurre por oxidación de colina; sin embargo, existe un mecanismo alternativo en el que la síntesis ocurre a partir de glicina, en reacciones mediadas por metiltransferasas (30). Este podría ser el mecanismo utilizado por SA211 para tolerar el estrés salino producido por la presencia de cloruro de litio en el medio de cultivo.

La presencia de superóxido dismutasa, una enzima con actividad antioxidante, en los medios de cultivo D10 y D30 por la cepa SA211 indica la necesidad de la célula de defenderse del estrés inducido por la sal sobre el organismo (16). Esta es una enzima ampliamente conocida por estar involucrada en la respuesta a la presencia de

arsénico, cadmio, cobre, hierro y cromo en levaduras con tolerancia a metales pesados (19).

Cuando SA211 crece en el medio de cultivo D30 se detectaron proteínas involucradas en la formación de *clusters* de Fe-S, que podrían haber sido inducidas en parte debido al estrés oxidativo como consecuencia de la presencia de sales. Un efecto similar se encontró en una cepa de *Bacillus subtilis,* que mostró un incremento en la síntesis de estos *clusters* 10 minutos luego de ser sometida a estrés salino (31). Además, se ha demostrado que, en otros microorganismos, los *clusters* de Fe-S otorgan una mayor resistencia a la oxidación, pueden actuar como un factor "anti-muerte" y están asociados a la síntesis de proteínas (26). Mediante el análisis del genoma de SA211 (Capítulo 6) se han detectado proteínas que forman parte del *cluster* Fe-S. De esta manera es posible verificar los resultados obtenidos en el análisis proteómico, estimando que esta respuesta es activada en presencia de cloruro de litio para la supervivencia de la cepa.

El estudio de *Micrococcus luteus* sc1204, una cepa resistente a la radiación, permitió detectar que se produjo un cambio significativo en la síntesis de 24 proteínas luego de ser expuesta a radiación gamma (32). De las proteínas sobresintetizadas, 22 fueron clasificadas como involucradas en las categorías funcionales de metabolismo, producción de energía, traducción, estructura ribosomal y biogénesis (32). Entre estas proteínas, la leucil aminopeptidasa, involucrada en la síntesis de glutatión fue la más abundante durante la recuperación post exposición, indicando que su protección antioxidante era la defensa más importante de la cepa contra la radiación. También se encontró una síntesis aumentada de esta proteína en presencia de 30 g/L de LiCl, indicando que dicha enzima podría jugar un rol importante en la defensa antioxidante de la cepa halotolerante SA211. Además, también en D30 se observó la síntesis del factor de elongación termoinestable (*elongation factor thermo unstable*- Ef-Tu), como ocurre en la cepa resistente a la radiación luego de haber sido expuesta. Se ha determinado que el factor de elongación Tu tiene una doble funcionalidad, participando en la síntesis de proteínas y en la respuesta al estrés (27).

La detección de las proteínas mediante análisis de síntesis diferencial se corroboró por la presencia de los genes correspondientes mediante el estudio desarrollado del genoma bacteriano (Capítulo 6). Entre los genes que podrían estar involucrados en la respuesta al estrés salino se encontraron genes que codifican para transportadores de sodio/prolina, proteínas que participan en el transporte de estos elementos al interior celular. La prolina es conocida como osmoprotector en microorganismos expuestos al estrés salino (33, 34). Otro de los simportadores que se detectó mediante genómica

fue el de sodio/glutamato, y este último ha sido descripto también en procesos de osmoadaptación como osmolito compatible en bacterias (11). En general, diferentes transportadores de cationes se encontraron a través del análisis del genoma, además de los genes que codifican para las enzimas de respuesta al estrés oxidativo, como la catalasa y superóxido dismutasa, detectadas además mediante proteómica.

7.5. Conclusiones

El estudio de la síntesis diferencial de proteínas permitió determinar la manera en la que la presencia de sales de distinta naturaleza y en distintas concentraciones afecta a los microorganismos.

La respuesta frente a dos concentraciones de LiCl para las cepas *Brevibacterium halotolerans* SX139, *Bacillus atrophaeus* HA120A y *Bacillus licheniformis* FAMB1 mostró perfiles proteicos distintos para cada cepa y en cada condición de salinidad, indicando que cada cepa tiene una respuesta diferente a dicho estrés.

Micrococcus luteus SA211 es una cepa capaz de crecer en presencia de elevadas concentraciones de sales de litio y sodio. Mediante el análisis de la síntesis de proteínas en diferentes concentraciones de ambas sales fue posible determinar que la respuesta del microorganismo es específica para cada sal.

Los mecanismos utilizados para sobrevivir en presencia de cloruro de litio requieren energía, ya que se detectó la síntesis de proteínas que participan en procesos de obtención de energía, además de enzimas que participan en la biosíntesis de proteínas. Por otra parte, resulta indispensable para SA211 disponer de un sistema de defensa activo contra el estrés generado por el litio a través tanto de la síntesis de enzimas como de metabolitos específicos para dicho fin.

La detección de transportadores transmembrana permitió determinar que la cepa desarrolla un transporte de osmolitos desde el exterior celular y que además utiliza mecanismos que protegen al sistema celular de la oxidación. Asimismo, se detectaron enzimas que participan en la síntesis de solutos orgánicos, por lo que el principal mecanismo de tolerancia de la célula sería por la acumulación de osmolitos en el interior celular, tanto mediante el transporte desde el exterior como a través de la síntesis de estos compuestos.

7.6. Referencias

1. Tomanek L. 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. J Proteomics 105:92-106.
2. Brötz-Oesterhelt H, Bandow JE, Labischinski H. 2005. Bacterial proteomics and its role in antibacterial drug discovery. Mass Spectrom Rev 24(4):549-565.
3. DasSarma S, DasSarma P. 2015. Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. Curr Opin Microbiol 25:120-126.
4. Edbeib MF, Wahab RA, Huyop F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. World J Microbiol Biotechnol 2(8):135.
5. Safarpour A, Amoozegar MA, Ventosa A. 2018. Hypersaline Environments of Iran: Prokaryotic Biodiversity and Their Potentials in Microbial Biotechnology, p 265-298. *In* D. Egamberdieva, Birkeland NK, Panosyan H, Li WJ (ed), Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications, vol 8. Springer, Singapore.
6. Ortega G, Diercks T, Millet O. 2015. Halophilic Protein Adaptation Results from Synergistic Residue-Ion Interactions in the Folded and Unfolded States. Chem Biol 22:1597-1607.
7. DasSarma S, DasSarma P. 2017. Halophiles. *In* eLS. John Wiley & Sons, Ltd (ed), Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub4
8. Graziano G, Merlino A. 2014. Molecular bases of protein halotolerance. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 1844(4):850-858.
9. Madern D, Ebel C, Zaccai G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. Extremophiles 4(2):91-98.
10. Fukuchi S, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M, Nishikawa K. 2003. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. J Mol Biol 327(2):347-357.
11. Kempf B, Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch Microbiol 170(5):319-330.
12. Sleator RD, Hill C. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol Rev 26(1):49-71.
13. Kunte HJ, Trüper HG, Stan-Lotter H. 2002. Halophilic Microorganisms, p 185-199. *In* Horneck G, Baumstark-Khan C (ed), Astrobiology. Springer, Berlin, Heidelberg.

14. Gunde-Cimerman N, Plemenitas A, Oren A. 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. FEMS Microbiol Rev 42:353–375.
15. Paul S, Aggarwal C, Thakur JK, Bandeppa GS, Khan MA, Pearson LM, Babnigg G, Giometti CS, Joachimiak A. 2015. Induction of Osmoadaptive Mechanisms and Modulation of Cellular Physiology Help *Bacillus licheniformis* Strain SSA 61 Adapt to Salt Stress. Curr Microbiol 70:610–617.
16. Rubiano-Labrador C, Bland C, Miotello G, Guérin P, Pible O, Baena S, Armengaud J. 2014. Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. J Proteom 97:36-47.
17. Wang X, Li X, Li Y. 2007. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. Biotechnol Lett 29:1599-1603.
18. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, Electrophoresis 9:255-62.
19. Irazusta V, Bernal AR, Estévez MC, de Figueroa LI. 2018. Proteomic and enzymatic response under Cr (VI) overload in yeast isolated from textile-dye industry effluent. Ecotoxicol Environ Saf 148:490-500.
20. Irazusta V, Estévez C, Amoroso MJ, de Figueroa LI. 2012. Proteomic study of the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11 under copper stress. Biometals 25(3):517-527.
21. Mols M, Abee T. 2011. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. Environ Microbiol 13(6):1387-1394.
22. Zuber P. 2009. Management of oxidative stress in *Bacillus*. Annu Rev Microbiol 63:575–597.
23. Den Besten HM, Mols M, Moezelaar R, Zwietering MH, Abee T. 2009. Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. Appl Environ Microbiol 75(12):4111-4119.
24. Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias MC, Ramos J. 1997. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. Appl Environ Microbiol 63(10):4005-4009.
25. Wood JM. 2015. Bacterial responses to osmotic challenges. J Gen Physiol 145(5):381-388.

26. Irazusta V, Michel L, de Figueroa LI. 2016. Disentangling metabolic pathways involved in copper resistance in *Candida fukuyamaensis* RCL-3 indigenous yeast. J Basic Microbiol 56(7):698-710.
27. Belfiore C, Curia MV, Farías ME. 2018. Characterization of *Rhodococcus* sp. A5wh isolated from a high-altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress. Rev Argent Microbiol 50(3):311-322.
28. Fukami-Kobayashi K, Tateno Y, Nishikawa K. 1999. Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history1. J Mol Biol 286(1):279-290.
29. Tam R, Saier MH. 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. Microbiol Rev 57(2):320-346.
30. Nyyssölä A, Kerovuo J, Kaukinen P, von Weymarn N, Reinikainen T. 2000. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. J Biol Chem 275(29):22196-22201.
31. Höper D, Bernhardt J, Hecker M. 2006. Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. Proteomics 6(5):1550-1562.
32. Deng W, Yang Y, Gao P, Chen H, Wen W, Sun Q. 2016. Radiation-resistant *Micrococcus luteus* sc1204 and its proteomics change upon gamma irradiation. Curr Microbiol 72(6):767-775.
33. Jung H. 2002. The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. FEBS Lett 529(1):73-77.
34. Burg MB, Ferraris JD. 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. J Biol Chem 283(12):7309-7313.

Conclusiones generales

- Argentina es un importante productor de litio en el mundo con la explotación de distintos salares, siendo uno de los más importantes el del Hombre Muerto, en la provincia de Catamarca, donde el mineral se obtiene de la salmuera.

- De muestras ambientales del Salar del Hombre Muerto se aislaron diversos microorganismos, principalmente del dominio Bacteria (que se caracterizaron y mostraron capacidad para producir biofilms y carotenoides). También se hicieron los primeros estudios, de los que se tiene registro, de comunidades microbianas.

- Entre las bacterias aisladas, numerosas fueron capaces de crecer en sales de sodio y de ellas muchas incluso en elevadas concentraciones de litio (hasta 60 g/L). Se verificó, en algunos cultivos, la remoción de litio durante el crecimiento y, a la vez que ensayos con células jóvenes mostraron la capacidad de adsorberlo. Estas bacterias representan así una alternativa prometedora en procesos de recuperación de litio soluble.

- Estudios realizados con arqueas halófilas extremas y moderadas provenientes de otros orígenes mostraron que, algunas de ellas, pueden crecer en medios con elevadas concentraciones de cloruro de litio, en niveles similares a los de las bacterias aisladas del Salar del Hombre Muerto.

- La cepa *Micrococcus luteus* SA211, seleccionada por su potencial biotecnológico, se estudió en profundidad. Se realizó la secuenciación del genoma completo y se identificaron proteínas que participan en la regulación de una gran variedad de procesos celulares y que le confieren protección frente a estreses ambientales.

- El crecimiento de tres cepas seleccionadas en distintas concentraciones de sales litio, y de *Micrococcus luteus* SA211 en presencia de sales de litio y de sodio, permitió obtener perfiles proteicos diferentes. De la identificación de las proteínas sintetizadas diferencialmente se pudo deducir que, para sobrevivir en concentraciones elevadas de cloruro de litio la bacteria necesita que ellas participen en diferentes procesos metabólicos, incluso de un sistema de defensa activo y funcional.

- Los ambientes extremos, como el Salar del Hombre Muerto, albergan comunidades microbianas desconocidas aún, aunque de gran potencial biotecnológico. Las herramientas disponibles actualmente en el campo de la microbiología, la biología molecular, la estadística y la bioinformática, hacen posible que nuevos conocimientos, como los que se presentan en este trabajo, queden a disposición de la comunidad científica para continuar con su estudio.

Perspectivas futuras

Si bien se alcanzaron los objetivos planteados, durante el desarrollo de esta tesis surgieron nuevos interrogantes que quedan planteados para posibles estudios futuros.

De forma general resulta de gran interés profundizar en el análisis de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los aislamientos obtenidos del Salar del Hombre Muerto. De manera particular se plantean las siguientes perspectivas:

- Caracterizar las sustancias poliméricas extracelulares de las cepas de acuerdo con su composición y propiedades físico-químicas, optimizar su producción en función de la recuperación de litio a partir de soluciones con diferentes composiciones y de elementos usados y desechados que contengan litio.

- Optimizar la recuperación de litio evaluando sistemas de células inmovilizadas y de células en suspensión.

- Optimizar la producción de pigmentos de cepas seleccionadas.

- Profundizar el estudio de los proteomas de cepas capaces de tolerar litio, en búsqueda de proteínas relacionadas con su tolerancia y adsorción.

- Aislar arqueas de las muestras del Salar del Hombre Muerto y determinar la capacidad de las cepas de recuperar litio soluble. Optimizar el proceso.

ANEXO

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fueron presentados en reuniones científicas nacionales e internacionales y fueron publicados en revistas científicas internacionales, como se detalla a continuación:

Artículos publicados en revistas internacionales

- Martínez FL, Orce GI, Rajal VB, Irazusta VP. 2018. Salar del Hombre Muerto, source of lithium-tolerant bacteria. Environ Geochem Health. pp 1-15. https://doi.org/10.1007/s10653-018-0148-2
- Martínez FL, Anton BP, DasSarma P, Rajal V, Irazusta V, Roberts RJ, DasSarma S. 2019. Complete genome sequence and methylome analysis of *Micrococcus luteus* SA211, a halophilic, lithium-tolerant actinobacterium from Argentina. Microbiol Resour Announc 8:e01557-18.

Capítulo de libro

- Martínez FL, Moraga NB, Romano-Armada, N, Yañez-Yazlle MF, Rajal VB, Irazusta V 2018. Stepwise Strategies for the Bioremediation of Contaminated Soils: From the Microbial Isolation to the Final Application. In *Approaches in Bioremediation* : The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology, Editor: Ram Prasad, Elisabet Aranda (Eds). Editorial Springer Nature, 1-28. ISBN 978-3-030-02369-0. DOI 10.1007/978-3-030-02369-0

Trabajos en eventos científicos tecnológicos publicados

- "Aislamiento de microorganismos tolerantes a sales a partir de muestras de aguas hipersalinas". X SAMIGE Congreso Argentino de Microbiología general. Martínez FL, López MF, Rajal V, Irazusta V. Mar del Plata 2-4 de julio de 2014
- "Tolerancia al cloruro de litio en microorganismos aislados del Salar del Hombre Muerto". SAPROBIO 3º Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. Martínez, FL; Irazusta, V; Moraga, NB; Rajal, VB. Santa Fe, 9-10 de diciembre de 2014.
- "Bacteria with tolerance against lithium-chloride and their differential growth through SEM observation". XI SAMIGE Congreso Argentino de Microbiología general. Martínez FL, Rajal VB, Irazusta V. Córdoba 5-7 de agosto de 2015.
- "Aislamiento, caracterización e identificación de microorganismos de salinas de altura" XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología (ALAM-CAM 2016)". Lopez M, Martínez FL, Orce I, Rajal VB, Irazusta V. Rosario de Santa Fe, 26-30 de septiembre de 2016.

- “Búsqueda y caracterización de moléculas de interés biotecnológico de microorganismos aislados del salar del Hombre Muerto”. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología (ALAM-CAM 2016)”. Lopez M, Martínez FL, Orce I, Yañez F, Rajal VB, Irazusta V. Rosario de Santa Fe, 26-30 de septiembre de 2016.
- “Utilización de la metodología RAPDs-PCR para la identificación de microorganismos aislados del Salar Hombre Muerto”. 46° Congreso Argentino de Genética. Orce, IG; Martínez, FL; Aparicio, M; Irazusta V; Rajal, VB. Catamarca. Journal of Basic & Applied Genetics, 28 (1) supp pag 70, 1-4 de octubre de 2017.
- “Search for Biological Surfactants in Halophilic Bacteria” XII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Lopez MF, Martínez FL, Rajal VB, Irazusta V. Tucumán, 2-4 de Agosto de 2017.
- “Identification and Analysis of Bacteria Isolated from El Salar Del Hombre Muerto”. XII Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. Martínez FL, Orce IG, Rajal VB, Irazusta V. Tucumán, 2-4 de Agosto 2017.
- “Differential protein synthesis of halotolerant microorganisms in presence of lithium chloride” 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 15th International Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology and 17th International Congress of Virology. Martínez FL; Rajal, VB; Irazusta, V. Singapur, 17-21 de Julio de 2017.
- “Efecto de la presencia de Litio sobre la Morfología Celular y Síntesis Diferencial de Proteínas en la Cepa halotolerante *Micrococcus* sp. SA211”. IV CAMAYA y I MICROGEN. Martínez, FL, Aparicio, M, Rajal, VB, Irazusta, V. Seleccionado para presentación Oral. Mar del Plata, Buenos Aires, 11-13 de Abril de 2018.
- “Carotenoides producidos por cepas aisladas del Salar del Hombre Muerto”. IV CAMAYA y I MICROGEN. Lopez, MF, Martínez, FL, Rajal, VB, Irazusta, V. Mar del Plata, Buenos Aires, 11-13 de Abril de 2018.