



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE  
PREGRADO

## “Biorrecuperación de litio desde óxido de litio-cobalto para su aplicación en reciclaje de baterías desechadas”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Enzo Mateo Galliani Henríquez**

Director del Seminario de Título: José Manuel Pérez Donoso  
Patrocinante: Francisco Chávez Espinosa

Junio 2020

Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el

**Sr Enzo Mateo Galliani Henríquez.**

“Biorrecuperación de litio desde óxido de litio-cobalto para su aplicación en el reciclaje de baterías desechadas”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Director Seminario de Título:** José Manuel Pérez Donoso

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, junio 2020

## BIOGRAFÍA

Nací el 8 de enero de 1997, en Santiago. Siempre fui curioso y bueno para leer. Mi educación básica y media la cursé en un colegio a las afueras de Santiago, en la comuna de Talagante, en donde mi padre hacía clases. Durante toda mi infancia me interesé por la ciencia, especialmente por la biología, de hecho, hasta el día de hoy mis padres me recuerdan mis “experimentos” con migas de pan mojado de cuando aún era un niño. Justo al terminar la enseñanza básica mis padres me motivaron a participar de los cursos académicos de verano de la Universidad de Chile, y a lo largo de la enseñanza media participé en 5 de estos cursos, por lo que se puede decir que siempre supe que la ciencia era lo mío. Al final de mi enseñanza media entré a la carrera que siempre quise: Biotecnología. Una vez en la educación superior conocí a un excelente grupo de amigos, con los cuales viajamos a Estados Unidos a participar de una competencia científica. Todo esto dio pie para que al término de mi educación superior fuera aceptado en el laboratorio de bionanotecnología del Dr. José Manuel Pérez, en donde realicé toda la investigación vinculada a este trabajo.



Aparte, me gusta escuchar música, tocar guitarra y ver y leer series de animación japonesa. También soy enemigo jurado de las pseudociencias, especialmente de los terraplanistas.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia. Especialmente a mi abuelo Hugo, que en paz descanse.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Manuel Pérez por su paciencia y confianza en mi trabajo desde el principio, por generar una relación cercana pero científicamente exigente, y por acompañarme durante el desarrollo de este bello proyecto. A Nicolás, Jessica, Matías, Sebastián, Giovanna, Nia, Javiera, Carolina Arriaza y Carolina Quezada por compartirme toda su experiencia y sabiduría, y por sobre todo por funcionar como inspiración en un ambiente de trabajo muy alegre y acogedor. También al Dr. Francisco Chávez por su confianza y la Dra. Marcela Urzúa y a María Luz Peña por su ayuda.

También a Felipe, Natalie, Vicente, Tatiana, Sebastián, Francisca y Alam, los mejores amigos, siempre presentes en los momentos más difíciles de nuestro paso por la universidad, y por supuesto por ser protagonistas de las mejores anécdotas en nuestros viajes y juntas. También agradezco especialmente a Paula, quien formó parte tanto de mi grupo de amigos de la universidad como de mi grupo de trabajo en el laboratorio.

Finalmente quiero agradecer a toda mi familia: mis tíos, tías, primos, primas, abuelos y abuelas, quienes me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida, permitiéndome llegar hasta aquí. Quiero agradecer especialmente a mis padres Carolina y Yerko por motivarme y darme todas las herramientas necesarias para dedicarme a lo que siempre fue mi pasión, a mi hermana Antonia por siempre mejorar mis días con su alegría, a mi primo Fabián por inspirarme constantemente a superarme y a mi pareja Constanza Delgado, por ser mi principal apoyo emocional durante todo este proceso y por motivarme a no rendirme nunca. Todos ustedes han contribuido a formar la persona que soy hoy día. Muchas gracias a todos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### Contenido

BIOGRAFÍA .....	ii
DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT .....	ii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Baterías de litio .....	1
1.2 Estrategias de solubilización .....	2
1.3 Utilización de microorganismos ambientales.....	4
1.4 Hipótesis .....	6
1.5 Objetivo general .....	6

1.6 Objetivos específicos .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
2.1 Preparación de medios .....	7
2.2 Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura .....	7
2.3 Tolerancia a LCO .....	8
2.4 Tolerancia a cobalto .....	9
2.5 Análisis bioinformático.....	10
2.6 Cuantificación del litio soluble .....	11
2.7 Visualización y cuantificación de biopelícula .....	12
2.8 Screening y cuantificación de tensoactivos .....	14
2.9 Efecto del biosurfactante sobre el crecimiento bacteriano .....	15
RESULTADOS .....	17
3.1 Determinación condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 .....	17
3.2.1 Determinación de la tolerancia a LCO de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 .....	19
3.2.2 Mecanismos de tolerancia a cobalto.....	21
3.3 Cuantificación de litio soluble en cultivos de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 con LCO ..	25

3.4.1 Mecanismos de solubilización: Proximidad espacial.....	27
3.4.1 Mecanismos de solubilización: Producción de biosurfactantes.....	34
DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES .....	41
4.1 Condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de Pseudomonas D1N5.1.....	41
4.2 Mecanismos de tolerancia a LCO y cobalto.....	41
4.3 Cuantificación de litio soluble en cultivos de Pseudomonas D1N5.1 con LCO ..	43
4.4.1 Proximidad espacial .....	43
4.4.2 Producción de biosurfactantes .....	45
CONCLUSIONES .....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXO .....	51



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias mínimas de cobalto.....	22
Tabla 2. Genes de resistencia a cobalto presentes en el genoma de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 .....	23
Tabla 3. Genes de resistencia a cobalto encontrados en microorganismos resistentes.....	24
Tabla 4. Resumen de genes de resistencia a cobalto en <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 .....	25
Tabla 5. Tensión superficial de los sobrenadantes.....	36
Tabla 6. Búsqueda de genes asociados a producción de biosurfactantes .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Optimización del crecimiento por temperatura .....	17
Figura 2. Optimización del crecimiento por pH .....	18
Figura 3. Efecto del LCO sobre crecimiento de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 y <i>E. coli</i> .	19
Figura 4. Efecto del LCO sobre la viabilidad de <i>Pseudomonas</i> D1N5.1 .....	20
Figura 5. Concentración de iones litio en solución y viabilidad celular .....	26
Figura 6. Observación macroscópica de biopelículas .....	28
Figura 7. Observación microscópica de biopelícula .....	30
Figura 8. Cuantificación de biopelícula en relación con la concentración de metales .....	32
Figura 9. Producción relativa de biopelícula .....	33
Figura 10. Screening de biosurfactantes .....	35
Figura 11. Efecto del biosurfactante sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> en presencia de Cobalto .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

CIM            Concentración Inhibitoria Mínima

Co            Cobalto

LCO           Óxido de litio-cobalto

Li            Litio

Rpm           Revoluciones por minuto

## RESUMEN

El rápido aumento de la demanda de aparatos tecnológicos portátiles genera una alta producción de baterías para estos dispositivos, donde las baterías más comúnmente utilizadas son las de óxido de litio cobalto (LCO), compuesto muy difícil de reciclar debido a su toxicidad e insolubilidad en agua. Para recuperar los metales de este compuesto se usa lixiviación, proceso que consta de aplicar temperaturas de más de 100 °C y soluciones ácidas ( $\text{pH} < 2$ ) o complejas mezclas eutécticas. En este sentido, la lixiviación con microorganismos (o biolixiviación) se posiciona como una alternativa viable para disminuir tanto las temperaturas requeridas como los desechos ácidos. Al utilizar microorganismos acidófilos se han reportado biolixiviaciones que recuperan una concentración de litio entre 16 y 25 mM a una temperatura de 30 °C en 40 días, pero se utilizan soluciones de pH entre 2 y 3. En este trabajo se utilizó una bacteria resistente a Li, Co y LCO del género *Pseudomonas* aislada desde el salar de litio de Atacama para obtener los metales presentes en LCO. Se obtuvo una concentración de litio en solución de aproximadamente 12 mM a una temperatura de 28 °C y pH 7 en un tiempo de 28 días. También se evaluaron mecanismos que puedan estar contribuyendo a esta solubilización, encontrando una alta tasa de producción de biopelícula y producción de tensoactivos (biosurfactantes). En conclusión, esta investigación muestra por primera vez una bacteria mesófila de origen desértico capaz de solubilizar litio desde LCO, por lo que abre la posibilidad a una búsqueda ambiental de microorganismos lixiviantes de este compuesto, capaces de llevar a cabo este proceso condiciones de pH neutro y temperatura ambiente. En este sentido, el entendimiento de los mecanismos de solubilización es crucial para potenciar el proceso y lograr una competitividad con las técnicas actuales solucionando los problemas ambientales asociados a la industria.

## ABSTRACT

The rapid increment in the demand of portable technological devices has strongly increased the necessity for batteries, being lithium cobalt oxide (LCO) based batteries the most commonly used to date. LCO is a compound very difficult to recycle due to its toxicity and water insolubility. To recover the metal elements from this compound, it is necessary to process it via leaching, a method involving temperatures above 100 ° C and acid solutions (pH < 2), or the use of complex eutectic mixtures. In this sense, leaching with microorganisms (or bioleaching) has been proposed as a viable alternative to lower both, the required temperatures and acid waste. When using acidophilic microorganisms for bioleaching, it has been reported a recovery of lithium near 16 - 25 mM after 40 days at 30 ° C and pH 2-3. In the present work, a lithium, cobalt and LCO resistant bacterium of the *Pseudomonas* genus isolated from the Atacama lithium salt flat was used to obtain the metals present in LCO. A lithium concentration near 12 mM was obtained after 28 days at 28 ° C and pH 7. Mechanisms that may be contributing to this solubilization were also evaluated, finding a high rate of biofilm production and surfactants (biosurfactants). In conclusion, this research shows for the first time the use of a mesophilic bacterium from a desertic environment in the lithium solubilization from LCO, thus opening the possibility of an environmental search for microorganisms that leach this compound at neutral pH and ambient temperature. In this sense, understanding the solubilization mechanisms is crucial to enhance the process and achieve competitiveness with current techniques, solving the environmental problems associated with the LCO leaching industry.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Baterías de litio

El rápido avance de la tecnología ha hecho que los dispositivos tecnológicos portátiles, como celulares, computadoras y cámaras, entre otros, sean cada vez más populares. Actualmente, todos estos dispositivos funcionan en base a baterías de óxidos de litio (Li-ion), siendo las más populares las que están compuestas específicamente de óxido de litio-cobalto (LCO) (Fergus, 2010) debido a la alta densidad energética (relación capacidad energética/peso), baja necesidad de mantención y seguridad para los consumidores (Qiao y Wei, 2012). Sin embargo, la desventaja más significativa que se ha identificado desde su popularización en el mercado de los dispositivos portátiles de uso no-industrial, es su reducida vida útil en cuanto a los ciclos de carga y descarga (Bhanvase y Pawade, 2018). Esto trae como consecuencia que cada año se desechen miles de toneladas de baterías de Li-ion gastadas. En este momento no hay países que cuantifiquen la cantidad de baterías de Li-ion que se desechan en sus mercados, pero China ha proyectado una cantidad de desechos de alrededor de 500.000 toneladas de baterías gastadas durante el 2020 sólo en su país (Zeng y col., 2014). Dado que la gran mayoría de las baterías de Li-ion contienen aleaciones con metales tóxicos como el cobalto, y en menor medida el manganeso, es necesario tratar adecuadamente estos desechos.

Es por esto que se han buscado distintas alternativas para reciclar las baterías de Li-ion. Este proceso no parte desde cero, pues desde hace décadas que países como Estados Unidos reciclan sobre el 90% de las baterías de ácido-plomo (Gaines, 2014), y por tanto se puede asumir que, aunque las baterías de Li-ion no son parte de este

proceso de reciclaje actualmente, el mercado ya cuenta con los recursos logísticos para el eventual manejo y transporte de estas baterías. El desafío científico más urgente en este aspecto consiste en buscar estrategias para reciclar eficientemente los componentes de las baterías de Li-ion. Todas estas baterías tienen cubiertas de aluminio y cobre, y ánodos de litio, los cuales cuentan con procesos de reciclaje simples y poco costosos, pues se utilizan en estado metálico, y como tales se pueden someter a tratamientos térmicos para su reciclaje y posterior aplicación en otros procesos. Por otro lado, el litio de los cátodos de estas baterías se encuentra como una sal ternaria, en el caso de las baterías de LCO, como  $\text{LiCoO}_2$ , lo que transforma al cátodo en uno de los componentes más difíciles de reciclar, pues no basta solo con tratamientos térmicos para recuperar los elementos (Zhang y col., 2013). Es por esto que, últimamente, se ha vuelto necesario desarrollar métodos eficientes, baratos y ambientalmente amigables para reciclar este componente, aunque el incentivo para reciclar se ve altamente deteriorado por la dificultad técnica y los costos ambientales asociados, debido principalmente a la alta toxicidad del LCO y su insolubilidad en agua (Bozich y col., 2017).

El proceso de reciclaje de baterías de LCO incluye una serie de actividades desde la separación de los materiales hasta la recuperación de los compuestos útiles (Murillo, 2016). Lo que se explora en este trabajo y en los citados a continuación son estrategias específicamente para el proceso de solubilización del LCO.

## **1.2 Estrategias de solubilización**

El reciclaje de LCO se realiza a través de un proceso llamado lixiviación, el cual consiste en solubilizar los metales de este compuesto a través de diferentes estrategias, los

cuales quedan en estado iónico disponibles para ser utilizados en otras reacciones y procesos. Las estrategias se pueden clasificar a grandes rasgos en químicas y biológicas.

Las estrategias químicas de lixiviación son las que mejores rendimientos obtienen, logrando eficiencias de hasta un 99% de recuperación de la masa original del litio en cuestión de horas, pero tienen la gran desventaja de ser contaminantes debido al uso de ácidos corrosivos y utilización de temperaturas sobre 200 °C (Zhang y col., 2013). El método químico de lixiviación con menor impacto ambiental desarrollado hasta la fecha no utiliza ácidos, sino que incluye una mezcla compleja de solventes eutécticos, donde la temperatura más baja utilizada es de 160°C, con una concentración de LCO de un 2% (m/v) y obteniendo una recuperación de litio de alrededor de un 50% (Tran y col., 2019).

Por otro lado, las estrategias biológicas de lixiviación (biolixiviación) se presentan como alternativas ambientalmente amigables, reduciendo las temperaturas utilizadas por debajo de los 100 °C. Por ejemplo, se han reportado métodos híbridos que utilizan ácido cítrico 1M y extractos biológicos (por lo que no incluyen células vivas) que son capaces de recuperar el 99% del litio en 2 horas a una temperatura de 60 °C. Sin embargo, se mantiene el problema de la generación de desechos ácidos (pH 3 o inferior) y la necesidad de mantener la temperatura varias decenas de grados por sobre la temperatura ambiente (Chen y col., 2015).

En cuanto a los métodos biolixivantes que utilizan microorganismos vivos (y no solamente extractos), se ha logrado acercar significativamente la temperatura del proceso a la temperatura ambiente, sin embargo, al ser procesos biológicos, el tiempo



en el que se logran solubilizar los componentes aumenta dramáticamente. Se ha reportado que microorganismos como *Aspergillus niger* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* son capaces de utilizar una temperatura de 30°C en un tiempo de 40 días. Si bien esto reduce el costo energético, ambos microorganismos necesitan una solución de pH entre 2 y 3, para lograr una eficiencia de lixiviación de entre un 66 y un 99%, por lo que aún se generan desechos ácidos (Biswal y col., 2018).

Es por esto que los agentes biológicos han demostrado ser una buena alternativa en términos de costos energéticos y ambientales. Sin embargo, ninguno de los trabajos previos utiliza concentraciones de LCO sobre el 0,8% (m/v) para realizar el proceso, pues, este compuesto es altamente tóxico para la mayoría de los microorganismos. De hecho, se ha reportado que después de un proceso de presión selectiva, se ha logrado adaptar a *A. niger* para sobrevivir a concentraciones de hasta un 1% (m/v) de LCO (Bahaloo-Horeh y col., 2018). También se han reportado intentos por solucionar este problema generando sistemas de instrumentación que permiten utilizar a los microorganismos vivos, pero sin que entren en contacto directo con el LCO (biolixiviación indirecta), logrando como máximo un rendimiento del 50% con *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, generando desechos de pH 1.8 (Boxall y col., 2018).

### **1.3 Utilización de microorganismos ambientales**

Si bien los microorganismos acidófilos han mostrado un gran potencial para biolixiviar el LCO, sus extremas condiciones de cultivo añaden dificultad al proceso, por lo que también se han buscado otro tipo de microorganismos para llevar a cabo esta tarea. Se ha reportado una estrategia de biolixiviación de LCO que no emplea ácidos ni microorganismos acidófilos, en la cual se utilizaron muestras ambientales extraídas

desde vertederos (Hartono y col., 2017). Esta técnica ha logrado reportar lixiviaciones de litio con un rendimiento de un 12% con una concentración de LCO de 0,4% (m/v), y aunque ni el rendimiento ni la tolerancia a LCO son particularmente destacables, es el único trabajo que ha reportado biolixiviaciones no ácidas y a temperatura ambiente, por lo que abre el camino a explorar el uso de bacterias ambientales aisladas desde otros nichos. En el trabajo anteriormente citado también se muestra un esfuerzo por caracterizar la relación del LCO con el factor biótico, obteniendo fotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) que muestran microorganismos adheridos a los cristales de LCO.

Con estos antecedentes, en este seminario de título se plantea evaluar el rendimiento de una biolixiviación no ácida a temperatura ambiente de LCO con un microorganismo aislado desde el salar de litio de Atacama, en Chile, que se encuentra a 2.200 metros sobre el nivel del mar y contiene concentraciones de litio en un rango entre 500 y 3000 mg/L (Troncoso y col., 2013). Para este trabajo se utilizará un aislado que después de ensayos preliminares ha reportado ser capaz de sobrevivir a concentraciones de más de 1% (m/v) de LCO. Este microorganismo pertenece a una cepa ambiental del género *Pseudomonas* bautizada como *Pseudomonas rhodesiae* D1N5.1 y ha mostrado capacidad de solubilizar diferentes sales ternarias de litio en ensayos no cuantitativos (Bruna, 2017).

Con base en estos antecedentes se plantea la posibilidad de utilizar al aislado *P. D1N5.1* para biorrecuperar litio desde el compuesto óxido de litio-cobalto a temperatura ambiente y pH neutro. Además, se evalúa la interacción entre este microorganismo y el compuesto LCO a través de formación de biopelículas y producción de biosurfactantes. Los biosurfactantes son moléculas orgánicas tensoactivas, es decir, capaces de

disminuir la tensión superficial del agua y se ha descrito que los microorganismos productores de estas sustancias pueden funcionar como biocatalizadores para transformar distintos metales hacia distintos estados de oxidación y/o generar complejos con dichos metales, solubilizándolos (Vigneshwaran y col., 2016).

#### **1.4 Hipótesis**

*Pseudomonas* D1N5.1 aislada de los depósitos de litio del salar de Atacama tolera altas concentraciones de LCO y solubiliza el litio a 28 °C y pH neutro.

#### **1.5 Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 a altas concentraciones de la sal LCO y su capacidad de solubilizarla a pH neutro y 28 °C.

#### **1.6 Objetivos específicos**

1. Determinar condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1.
2. Determinar la tolerancia de *Pseudomonas* D1N5.1 a LCO.
3. Cuantificar la solubilización de LCO en cultivos con *Pseudomonas* D1N5.1
4. Analizar la formación de biopelícula y producción de biosurfactantes como mecanismos de solubilización de LCO.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Preparación de medios**

Para todos los experimentos de crecimiento y solubilización de litio se utilizó medio M63 según descrito por Van der Ploeg y col., 1996. Las sales M63 10X se preparan añadiendo 17,6 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y 87,1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ , para luego ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio y autoclavar. Para preparar 1 litro de medio M63 se utilizaron:

- 100 mL de sales M63 10X autoclavadas

- 1 mL de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1M

- 3 mL de tiamina 0,1M

- 10 mL glucosa 20% (m/v)

- 4 mL de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

- 882 mL de  $\text{H}_2\text{O}$

Para el conteo de unidades formadoras de colonia se utilizó medio LB sólido con el método de siembra de diluciones seriadas.

### **2.2 Determinación de condiciones óptimas de pH y temperatura**

Para todas las condiciones se utilizaron tubos falcon de 15 mL adicionando un volumen de 7,5 mL de medio M63, y un inóculo 1:100 de un cultivo crecido durante la noche también en medio M63, por triplicado. Las condiciones de cultivo corresponden a

temperaturas de 9 °C sin agitación, 28 °C con agitación (160 rpm) y sin agitación, 37 °C con agitación (160 rpm) y sin agitación, y 60 °C sin agitación.

Para los experimentos de variación de pH se prepararon 4 medios M63 sin glucosa, a los cuales se les ajustó el pH con ácido clorhídrico hasta alcanzar valores de pH igual a 4, 5, 6 y 7. Estas soluciones fueron autoclavadas para finalmente agregar la glucosa filtrada estéril. Los ensayos se realizaron en tubos falcon de 15 mL con 7,5 mL de cada medio con un inóculo de 1:100 de un cultivo crecido durante la noche, en triplicado, y fueron crecidos a una temperatura de 28°C con agitación.

Para cuantificar el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 se midió la densidad óptica de 200 µL de los cultivos objetivos en una placa de 96 pocillos de fondo plano y transparente a una longitud de onda de 600 nm utilizando un lector de multiplacas Synergy H1.

### **2.3 Tolerancia a LCO**

El óxido de litio-cobalto empleado en todos los experimentos corresponde al reactivo comercializado por Sigma-aldrich (CAS Number 12190-79-3). Dada su insolubilidad en agua, el proceso de esterilización de esta sal corresponde a una irradiación de luz ultravioleta (UV-C) por 20 minutos.

En el ensayo de comparación de la tolerancia a LCO entre *Pseudomonas* D1N5.1 y *E. coli* se utilizó medio M63 suplementado con 1% (m/v) de LCO, en un volumen de 7,5 mL en tubos falcon de 15 mL, inoculando 1:100 (aproximadamente  $10^5$  bacterias) de un cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1 y *E. coli* crecido durante la noche, en triplicado.

En el ensayo de tolerancia de *Pseudomonas* D1N5.1 a concentraciones crecientes de LCO, cada tubo falcon de 15 mL fue suplementado con 0, 3, 6 y 9% (m/v) de LCO estéril, en triplicado, inoculando 1:100 de un cultivo de *P. D1N5.1* crecido durante la noche.

La cantidad de células vivas se determinó sembrando diluciones seriadas en placas de medio LB sólido.

#### **2.4 Tolerancia a cobalto**

El ensayo de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) fue realizado en medio LB, dada la alta precipitación de sales que se observó al mezclar el medio M63 con el cloruro de cobalto.

Para esto se prepararon 2 soluciones stock de LB suplementadas con 200 y 300 µg/mL de cloruro de cobalto respectivamente. Para obtener las concentraciones de 100 y 150 µg/mL de cloruro de cobalto se diluyeron las soluciones stock a la mitad agregando un volumen equivalente de medio LB sin cloruro de cobalto. Para obtener las concentraciones de 50 y 75 µg/mL de cobalto se repitió el proceso de dilución con las soluciones de 100 y 150 µg/mL de cloruro de cobalto respectivamente. Finalmente, cada solución, en triplicado, fue inoculada 1:100 con un cultivo crecido durante la noche de *Pseudomonas* D1N5.1, *Pseudomonas aeruginosa* o *E. coli* según cada caso.

El crecimiento bacteriano fue medido según el protocolo descrito en la sección 2.2. Para descartar alguna influencia del cloruro de cobalto sobre las mediciones de absorbancia a 600 nm se analizó el espectro de absorbancia de una solución 100 mM de cobalto (visiblemente coloreada), donde se encontró que su absorbancia no es significativa a una longitud de onda de 600 nm (ver Anexo figura 1).

## 2.5 Análisis bioinformático

Para la búsqueda de genes de resistencia a cobalto se utilizó una base de datos llamada BactMet, mantenida por la Universidad de Gothenburg, Suecia, específicamente la de datos experimentalmente confirmados. Una vez obtenida las secuencias FASTA de cada gen de interés se procedió a utilizar la herramienta básica de alineamiento local de secuencias aminoacídicas BLASTp, perteneciente al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) de la Librería Nacional de Medicina (NIH, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, para buscar alineamientos entre la secuencia FASTA extraída de BacMet y el genoma de la bacteria *Pseudomonas* D1N5.1.

Posteriormente se generó una base de datos propia con los nombres clave de los genes descritos en la literatura como cruciales para la resistencia a cobalto en microorganismos resistentes a este metal. Como algunos de estos genes no se encuentran completamente descritas o secuenciadas, se utiliza la herramienta RAST, también perteneciente al NCBI, para la asignación de nombres clave a los marcos de lectura abiertos en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1. De esta manera se buscan alineamientos entre las secuencias de la base datos generada y los marcos abiertos de lectura en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1 a través de la herramienta BLASTp.

Para el análisis de genes involucrados en producción de biosurfactantes se utilizó la base de datos UniProt, perteneciente una alianza entre el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EMI) y el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) para encontrar las secuencias FASTA aminoacídicas de distintos productos génicos asociados a producción de biosurfactantes encontrados en la literatura a través de sus nombres

clave. Las secuencias encontradas fueron sometidas a un alineamiento utilizando la herramienta bioinformática BLASTp contra el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1.

## **2.6 Cuantificación del litio soluble**

Este ensayo se realizó en 2 condiciones. La diferencia entre ambas condiciones es la cantidad de bacterias iniciales, donde en la condición “A” el ensayo comienza saturado de bacterias, y la condición “B” comienza el ensayo con una dilución 1:100 de la cantidad de bacterias en la condición “A”. En todos los casos

Los tubos etiquetados con un tiempo de incubación de 1 semana se mantuvieron herméticamente cerrados y en condiciones constantes de temperatura y agitación por esa cantidad de tiempo, abriéndose solo para terminar el ensayo y medir el litio en solución y la cantidad de unidades formadoras de colonias presentes. Ningún tubo se llena sobre el 50% de su capacidad para mantener la oxigenación durante la duración del ensayo. Este procedimiento se repitió con un tubo diferente para cada tiempo de incubación de 2, 3, 4 y 5 semanas. Se decidió generar un tubo diferente para cada tiempo por 2 razones, primero evitar la contaminación y mantener constantes todas las condiciones ambientales durante cada tiempo de incubación y segundo que la extracción de una gran cantidad de alícuotas de un mismo tubo para realizar cada medición de cantidad de bacterias y litio soluble se terminaría afectando la concentración del LCO, ya que esta sal es insoluble, por lo que al disminuir repetidamente el volumen del medio de cultivo aumentaría progresivamente la concentración relativa de LCO.

Para medir el litio en solución, cada cultivo se centrifugó a 10.000 rpm por 5 minutos y se recupera sólo el sobrenadante. Este sobrenadante pasa por un proceso de digestión



ácida, donde a cada muestra se le agregó un volumen equivalente de una solución 4:1 de peróxido de hidrógeno y ácido nítrico. Posteriormente, esta solución se diluyó 100 veces en agua ultra pura (Sigma-aldrich), para que la cantidad de litio en el sobrenadante se encuentre dentro del rango lineal de medición del equipo (Aliasgharpour y Hagani, 2009).

El equipo utilizado corresponde a un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Shimadzu Flame AA spectrophotometer modelo AA-7000). Cuando el equipo se configura para litio, se utiliza una longitud de onda de 670,8 nm, el cual corresponde al máximo de absorbancia para el litio iónico, por lo que el equipo es capaz de cuantificar la absorbancia de la muestra y, a través de una curva de calibración, obtener la concentración de iones litio en la solución analizada, y un ancho de rendija de 0,7 nm. Este método es muy sensible a contaminaciones, razón por la cual se utiliza un medio mínimo en los experimentos, evitando así una absorbancia indeseada por otros cationes presentes.

## **2.7 Visualización y cuantificación de biopelícula**

La primera observación de la generación de biopelícula se realizó incubando cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1, *P. aeruginosa* y *E. coli* suplementados con LCO en tubos falcon de manera horizontal, para luego fotografiarlos en orientación vertical, lo que permitió observar cristales de LCO adheridos a la superficie interior del tubo Falcon.

Para la observación microscópica se extrajeron cristales de LCO de los cultivos de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* D1N5.1, específicamente cristales en suspensión dentro del cultivo tomando aproximadamente 50  $\mu$ L con una micropipeta con la punta recortada. Los cristales fueron depositados sobre un portaobjetos para realizarles el procedimiento

de tinción de Gram. Posteriormente estos cristales fueron observados al microscopio con aumento de 400 y 1000X (ver Anexo Figuras 2 y 3). En los resultados se muestran campos de 1000X y también se muestran aumentos digitales alcanzando campos de hasta 3000X.

Se evaluó el efecto de la concentración de metales en solución en relación a la producción de biopelícula de los microorganismos seleccionados. En este caso se utilizan concentraciones variables de litio y cobalto en cultivos de 200  $\mu$ L de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* D1N5.1. Las concentraciones variables corresponden a un 8 y 80 % de la CIM de cada metal para cada bacteria con un tiempo de incubación de 24 horas. Esto corresponde a una concentración de 12 y 120  $\mu$ g/mL de cobalto para *P. aeruginosa* y de 24 y 240  $\mu$ g/mL de cobalto para *Pseudomonas* D1N5.1. Terminado este tiempo se mide la densidad óptica de cada cultivo y se procede a cuantificar la producción de biopelícula generada por cada microorganismo en cada condición.

Para la cuantificación de biopelícula se utilizó el protocolo descrito por Elkhatib, W. F. y cols., 2014. El protocolo consiste en que, una vez terminado el tiempo de incubación, la placa debe ser lavada con abundante agua, pero sin aplicarla directamente a los pocillos. Posteriormente se deja secar para luego añadir 200  $\mu$ L de cristal violeta 0,3% a cada pocillo, dejando actuar por 15 minutos, el cual tiñe la biopelícula presente en las paredes de cada uno de los pocillos. Después se lava el cristal violeta con abundante agua, cuidando de no aplicarla directamente dentro de los pocillos, y se deja secar. En este punto, la cantidad de cristal violeta presente en cada pocillo es proporcional a la cantidad de biopelícula encontrada en cada pocillo. Luego se utilizan 200  $\mu$ L de etanol absoluto, el cual disuelve la biopelícula y el cristal violeta. Finalmente se mide la absorbancia de cada pocillo a 600 nm, donde la absorbancia está directamente

relacionada a la cantidad de cristal violeta presente en cada pocillo y por tanto relacionada con la cantidad de biopelícula.

Posteriormente se utilizaron las mediciones de la densidad óptica obtenidas al final del ensayo para normalizar las mediciones de producción de biopelícula por cantidad de células.

## **2.8 Screening y cuantificación de tensoactivos**

El primer ensayo para la identificación de tensoactivos bacterianos fue el “ensayo de la gota” (Nayariseri y col., 2018). Este ensayo consiste en utilizar una superficie hidrofóbica en la cual se deposita una gota de sobrenadante de los cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1, *P. aeruginosa* y *E. coli* suplementados con 1% (m/v) de LCO obtenidos por centrifugación a 10.000 rpm por 5 minutos y se observa el ángulo de contacto entre la gota y la superficie. El ángulo de contacto de la gota del cultivo se ve disminuido en función de la cantidad de tensoactivos presentes en él, por lo que se puede relacionar directamente el ángulo de contacto con la cantidad de biosurfactantes producidos (Anexo Figura 4).

Posteriormente se realiza un segundo análisis a través de un ensayo de emulsificación (Nayariseri y col., 2018). Este ensayo consiste en tomar un volumen de 2 mL de sobrenadante del cultivo y ponerlo dentro de un tubo Falcon de 15 mL junto a un volumen de 3 mL de un solvente altamente apolar. Posteriormente los tubos se someten a una agitación en vórtex a máxima velocidad por 5 minutos. Este procedimiento genera una emulsificación en la interfase entre el cultivo acuoso y la fase apolar, en donde el tamaño de la emulsificación es proporcional a la cantidad de tensoactivos presentes en la fase acuosa. En este caso los sobrenadantes se obtuvieron centrifugando 7,5 mL de

cultivo suplementado con 1% (m/v) de LCO a 10.000 rpm durante 5 minutos, y el solvente apolar utilizado corresponde a diésel.

Para la cuantificación de tensoactivos se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1, *P. aeruginosa* y *E. coli* suplementados con 1% (m/v) de LCO a través de una centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos. Las mediciones se realizaron con un tensiómetro marca Kruss modelo K8 con un anillo de platino-iridio en el laboratorio de físicoquímica dirigido por la doctora Marcela Urzúa en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Para todos los ensayos de producción de biosurfactantes se utilizó como control negativo medio de cultivo M63 estéril y para las mediciones cuantitativas también se utilizó la misma agua destilada que se utilizó para preparar los medios.

## **2.9 Efecto del biosurfactante sobre el crecimiento bacteriano**

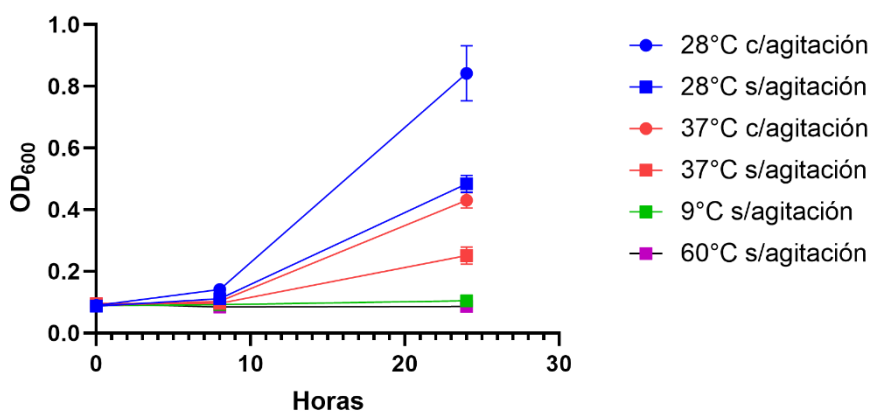
Para el ensayo del efecto del biosurfactante sobre el crecimiento bacteriano se utilizó el protocolo general de extracción de lipopéptidos biosurfactantes de *Pseudomonas* de Smyth, J. T. P. y col., 2010. Este protocolo consiste en mezclar y agitar un volumen de etilacetato con el sobrenadante del cultivo, en este caso de 20 mL, transferir cada fase a un recipiente distinto y repetir 2 veces más. En este caso los 3 volúmenes de etilacetato fueron recuperados en el mismo recipiente, donde se deja evaporar. Posteriormente, cuando el etilacetato ya está completamente evaporado, el contenido que queda en el fondo del tubo es resuspendido en 1 mL de agua, así se obtiene una solución acuosa con el biosurfactante concentrado. Esta solución es la que se utiliza en el ensayo de crecimiento.

Para estudiar el efecto de este biosurfactante sobre el crecimiento bacteriano se utilizó *E. coli*, por su incapacidad de producir tensoactivos evidenciado en la cuantificación anteriormente realizada. Se estudiaron 3 condiciones: i) *E. coli* en medio LB, ii) *E. coli* en medio LB suplementado con cobalto en concentraciones no inhibitorias (8% de su CIM) y iii) *E. coli* en medio LB suplementado con cobalto (8% de su CIM) y el biosurfactante extraído. Para cuantificar el crecimiento se midió la densidad óptica de los cultivos cada 1 hora durante 12 horas.

## RESULTADOS

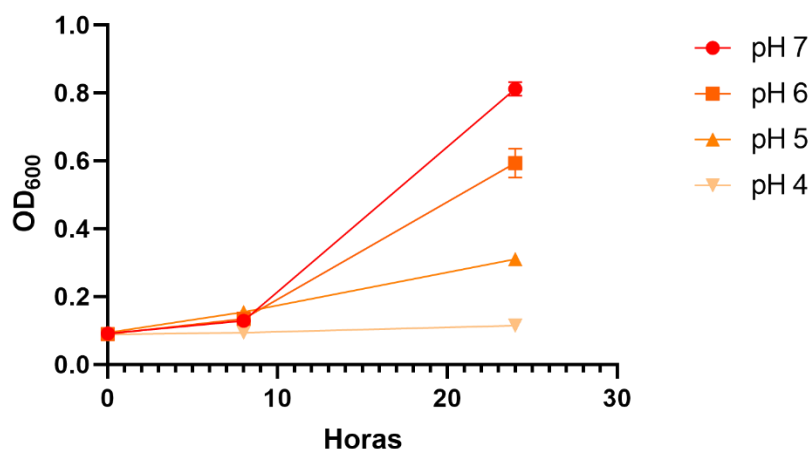
### 3.1 Determinación condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1

Primero se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento para este microorganismo aislado desde muestras ambientales del desierto de Atacama. Para esto se midió la densidad óptica de los cultivos en el tiempo cero, 8 y 24 horas bajo 6 condiciones diferentes, con temperaturas desde los 9 hasta los 60 °C, con y sin agitación.



**Figura 1. Optimización del crecimiento por temperatura.** Se muestran las mediciones a las cero, 8 y 24 horas de densidad óptica de los cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1 en diferentes condiciones de temperatura, donde la curva azul corresponde a los 28 °C, la curva roja a los 37 °C, la verde a 9 °C y la magenta a 60 °C. Además, las etiquetas circulares indican que el cultivo se mantuvo en agitación constante de 160 rpm durante la incubación, mientras que las etiquetas cuadradas indican que el cultivo no fue agitado.

Como se puede observar en la Figura 1, las condiciones de temperatura y agitación óptimas de crecimiento para *Pseudomonas* D1N5.1 corresponden a 28 °C con agitación. Esta condición es la que se utiliza para realizar el resto de los ensayos en este trabajo. Posteriormente se evaluó la capacidad de crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 en diferentes condiciones de acidez. Dado el objetivo del trabajo, las condiciones de estudiadas van desde pH 7 hasta pH 4. Se midió la densidad óptica de los cultivos en el tiempo cero y luego de transcurridas 8 y 24 horas.



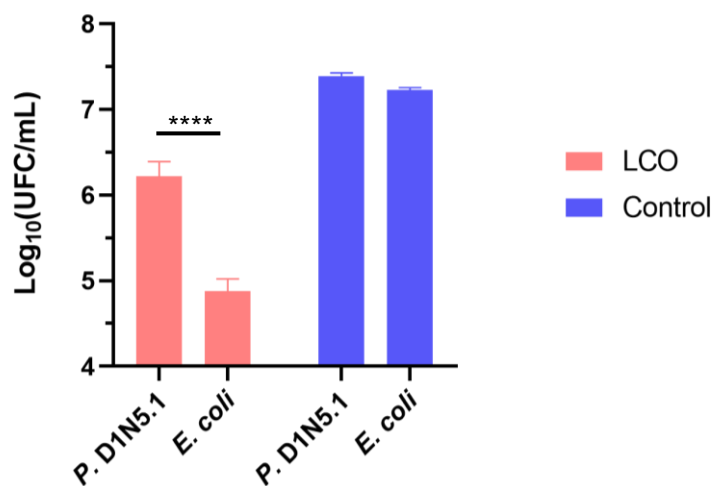
**Figura 2. Optimización del crecimiento por pH.** Se muestran los valores de densidad óptica a las 0, 8 y 24 horas de los cultivos de *P. D1N5.1* en diferentes condiciones de pH, donde la curva roja de etiqueta circular indica pH 7, la curva naranja de etiqueta cuadrada indica pH 6, la curva naranja de etiqueta triangular punta hacia arriba indica pH 5 y la curva beige de etiqueta triangular punta hacia abajo representa pH 4.

Como se observa en la Figura 2, la condición óptima de pH para el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 es un pH neutro, igual a 7. También es posible observar que a pH 6 y 5 aún se observa crecimiento, pero al utilizar un medio tan ácido como pH 4 la bacteria detiene su crecimiento.

Con esto se determinó que las condiciones óptimas de crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 son pH 7, 28 °C y agitación. Estas condiciones se utilizaron en todos los ensayos posteriores de este trabajo.

### 3.2.1 Determinación de la tolerancia a LCO de *Pseudomonas* D1N5.1

Se determinó la tolerancia a LCO de *Pseudomonas* D1N5.1 y también del organismo modelo *Escherichia coli*. Para esto se utilizó el método de conteo de unidades formadoras de colonias para determinar la supervivencia de estos microorganismos después de 3 días de incubación en presencia y ausencia de LCO al 1% (m/v).



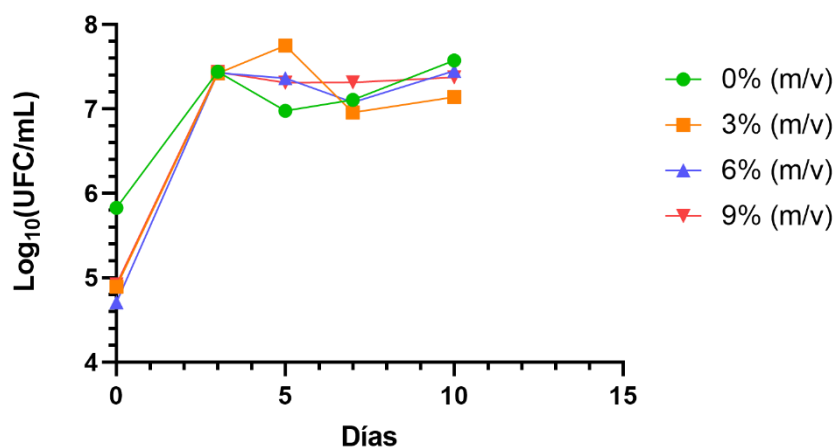
**Figura 3. Efecto del LCO sobre crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 y *E. coli*.** Se muestran la cantidad de bacterias vivas expresadas en unidades formadoras de colonias por mililitro a un tiempo de 3 días de incubación. Las barras rosadas representan los cultivos bacterianos suplementados con 1% (m/v) de LCO y las barras azules representan las condiciones de ausencia de LCO. Todos los cultivos partieron con una cantidad de células de aproximadamente  $10^5$ . (Two-way ANOVA,  $p$ -value<0.0001)

Como se puede observar en la Figura 3, en un medio mínimo sin LCO tanto *Pseudomonas* D1N5.1 como *E. coli* aumentan su número de unidades formadoras de



colonia hasta superar las  $10^7$  UFC, obteniendo una diferencia estadística no significativa. Por otro lado, en el mismo medio mínimo suplementado con un 1% (m/v) de LCO, *E. coli* presenta un número de células vivas de más de 2 órdenes de magnitud por debajo del caso anterior, llegando a menos de  $10^5$ , mientras que *Pseudomonas* D1N5.1 se mantiene por sobre las  $10^6$ . La diferencia entre la cantidad de células vivas es significativa ( $p < 0.0001$ ) y estaría indicando que *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de tolerar mejor la presencia de este compuesto que *E. coli*.

Posteriormente se determinó la tolerancia de *Pseudomonas* D1N5.1 a concentraciones más altas de LCO dentro del rango de concentraciones desde 3 hasta 9% (m/v) según el objetivo del trabajo.



**Figura 4. Efecto del LCO sobre la viabilidad de *Pseudomonas* D1N5.1.** Se muestra la cantidad de células vivas expresadas en cantidad de unidades formadoras de colonia por mililitro de cultivo. La curva verde de etiqueta circular representa ausencia de LCO, la curva naranja de etiqueta cuadrada indica una concentración de 3% (m/v) de LCO, la azul de etiqueta triangular punta hacia arriba indica 6% (m/v) de LCO y la roja de etiqueta triangular hacia abajo indica 9% m/v de LCO. Se realizaron mediciones a los tiempos de 0, 3, 5, 7 y 10 días.

Como se aprecia en la Figura 4, *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de tolerar concentraciones de hasta 9% (m/v) de LCO manteniendo su cantidad de células vivas alrededor de  $10^7$  hasta 10 días después de inoculado el medio.

### **3.2.2 Mecanismos de tolerancia a cobalto**

De los 2 elementos metálicos que componen la sal ternaria de óxido de litio-cobalto, esta bacteria ha mostrado una concentración inhibitoria mínima de crecimiento de 5000 mg/L para litio (Bruna, N., 2017). Sin embargo, por la literatura (Bozich y col., 2017) sabemos que en estado iónico el cobalto es mucho más tóxico que el litio. Debido a esto es necesario determinar la tolerancia a iones cobalto por parte de *Pseudomonas* D1N5.1, ya que necesita tolerar concentraciones crecientes de este ion a medida que el LCO se solubiliza.

Para esto se realizó un ensayo de concentración inhibitoria mínima para *Pseudomonas* D1N5.1 y dos microorganismos modelos. En este caso se utilizaron *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que esta última es filogenéticamente más cercana a *Pseudomonas* D1N5.1. Se utilizó medio LB suplementado con cloruro de cobalto, y se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas del crecimiento para cada microorganismo.

**Tabla 1. Concentraciones inhibitorias mínimas de cobalto (24 horas).**

Microorganismo	CIM de Cobalto (µg/mL)
<i>Pseudomonas</i> D1N5.1	300
<i>E. coli</i> BW25113	150
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	100

Como se ve en la Tabla 1, *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de resistir el doble de concentración de cobalto que *E. coli* y el triple que *P. aeruginosa*.

Como se mencionó, uno de los grandes problemas en los sistemas de biorrecuperación actuales corresponde a la baja resistencia que tienen los microorganismos a los metales presentes en el LCO. Sabemos que el aislado *Pseudomonas* D1N5.1 fue aislado de un nicho con altas concentraciones de sales, lo cual se refleja en la alta concentración inhibitoria mínima que tiene este microorganismo para litio y cobalto. Es por esto que en base a estos resultados y con miras a una posible aplicación tecnológica se realizó un análisis genómico que permitiera explicar (y posteriormente explotar) la diferencia entre este aislado y los otros microorganismos modelo en base a la presencia de genes de resistencia. Primero, se utilizó la base de datos BacMet, la cual cuenta con un repositorio de genes presentes en distintos organismos modelo que confieren resistencia a distintos metales pesados. En este caso, se seleccionaron las secuencias aminoacídicas de los genes de resistencia a cobalto presentes en la base de datos experimentalmente confirmados de *BacMet* y se utilizó la herramienta de alineamiento básico de secuencias *BLASTp* para buscar su presencia en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1. En la Tabla 2 se muestran los genes encontrados.

**Tabla 2. Genes de resistencia a cobalto presentes en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1.** Se muestra en la primera columna el nombre clave de cada uno de los productos génicos de resistencia a cobalto encontrados en la base de datos BacMet. En las columnas 2, 3 y 4 se muestran los resultados de los parámetros de cobertura, *e-value* e identidad de estos genes con la mejor coincidencia en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1. La última columna muestra la anotación de nombre clave de esa mejor coincidencia anotada en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1.

Descripción del producto en <i>BacMet</i>	Cobertura	<i>E-value</i>	Identidad	Descripción del producto en D1N5.1
<b><i>CorA</i></b>	100%	0.0	88.40%	<b><i>Magnesium and cobalt transport protein CorA</i></b>
<b><i>CorB</i></b>	96%	4.00e-125	77.52%	<b><i>Putative membrane protein YfjD</i></b>
<b><i>ApaG</i></b>	100%	1.00e-69	74.40%	<b><i>ApaG protein</i></b>
<b><i>FieF</i></b>	97%	6.00e-179	79.18%	<b><i>Ferrous-iron efflux pump FieF</i></b>
<b><i>Magnesium-transporting ATPase, P-type 1</i></b>	99%	0.0	71.02%	<b><i>Mg(2+) transport ATPase, P-type (EC 3.6.3.2)</i></b>
<b><i>Magnesium-transporting ATPase, P-type 1</i></b>	99%	0.0	70.75%	<b><i>Mg(2+) transport ATPase, P-type (EC 3.6.3.2)</i></b>
<b><i>MntH</i></b>	98%	0.0	79.06%	<b><i>Manganese transport protein MntH</i></b>

Se lograron identificar 7 de estos genes de resistencia a cobalto descritos en BacMet en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1. Por un lado, BacMet es un buen acercamiento por ser una base de datos revisada y curada, sin embargo, todos estos genes han sido descritos en organismos modelo, razón por la que también se optó por buscar en la literatura más genes de resistencia descritos en organismos específicamente resistentes a cobalto. En este caso se genera una base de datos propia con los datos de la literatura y se utiliza la herramienta *RAST* para obtener anotaciones de los marcos

de lectura abiertos de *Pseudomonas* D1N5.1 y buscar estos genes u operones por sus nombres clave. Los genes encontrados a través de esta estrategia se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Genes de resistencia a cobalto encontrados en microorganismos resistentes.** Se muestra en la primera columna los nombres clave de los genes encontrados en la literatura, acompañados en la segunda columna por la función descrita en el mismo trabajo. La tercera columna muestra los nombres clave y cantidad de copias encontradas en el genoma de *Pseudomonas* D1N5.1 y la cuarta columna muestra la referencia de la cual se extrajeron estos datos.

Gen u operón	Descripción	Genes encontradas en <i>Pseudomonas</i> D1N5.1	Referencia
<b>suf</b>	Mutantes deletéreos presentan hipersensibilidad a cobalto	sufA, sufB, sufC, sufD, sufE y sufS	<i>Ranquet, C. y cols., 2007</i>
<b>czc</b>	Transportador de iones Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> and Co <sup>2+</sup>	czcA (2 copias); czcC (2 copias), czcB, czcD	<i>Intorne, A. C. y cols, 2012</i>
<b>isc</b>	Operón de resistencia a cobalto	iscR, iscS, iscA, iscU, iscX, Frataxin homolog cyaY	<i>Von Rozycki T. y Nies D. H., 2009</i>

Además de encontrar todos los genes que se han descrito como críticos para la resistencia a cobalto, *Pseudomonas* D1N5.1 cuenta en algunos casos con más de una copia de algunos de estos genes analizados (información anotada entre paréntesis). Finalmente, para explicar el resultado de las concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas experimentalmente se realizó una tabla resumen donde se muestra la presencia o ausencia de cada uno de los genes encontrados en todas las bacterias estudiadas.

**Tabla 4. Resumen de genes de resistencia a cobalto en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Pseudomonas D1N5.1*.** Se muestran los nombres clave de cada uno de los genes o familias de genes analizadas anteriormente y se anotan si es que están o no presentes en el genoma del microorganismo indicado. La etiqueta “parcialmente presente” indica que menos de la mitad de los genes de esa familia fueron encontrados.

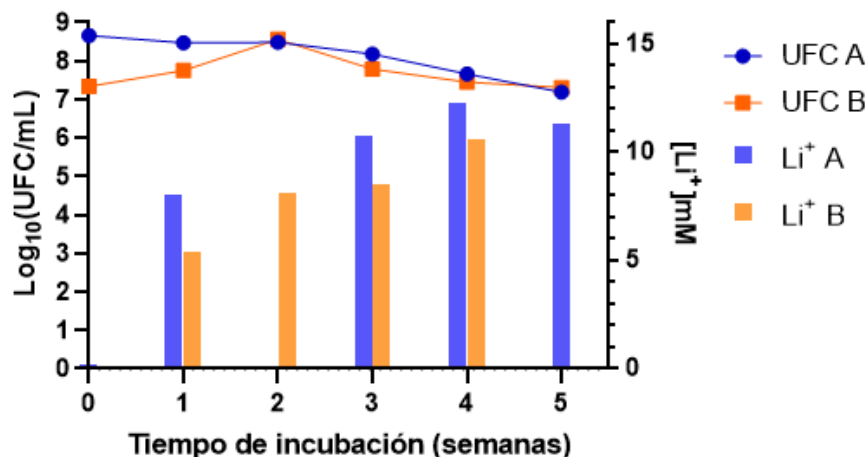
<b>Gen u operón</b>	<b><i>E. coli</i> (MIC=150 µg/mL)</b>	<b><i>P. aeruginosa</i> PAO1 (MIC=100 µg/mL)</b>	<b><i>Pseudomonas</i>. D1N5.1 (MIC=300 µg/mL)</b>
<b>SUF</b>	Presente	No presente	Presente
<b>Czc</b>	No presente	No presente	Presente
<b>Isc</b>	Presente	Parcialmente presente	Presente
<b>CorA</b>	Presente	Presente	Presente
<b>CorB</b>	Presente	No presente	Presente
<b>ApaG</b>	Presente	Presente	Presente
<b>FieF</b>	Presente	Presente	Presente
<b>MntH</b>	Presente	Presente	Presente

Como muestra la Tabla 4, la cantidad y variedad de los genes descritos en bases de datos y literatura presentes en cada una de las bacterias se relaciona directamente con la resistencia de los microorganismos estudiados a cobalto.

### **3.3 Cuantificación de litio soluble en cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1 con LCO**

Para cuantificar la solubilización de litio se realizaron 6 cultivos diferentes en fase estacionaria de crecimiento (saturado) con *Pseudomonas* D1N5.1 y con una concentración de LCO de 9% (m/v). A cada cultivo se le midió la viabilidad celular a través del conteo de unidades formadoras de colonia (UFC/mL) y también la

concentración molar de iones litio en solución (liberados desde LCO) mediante espectroscopía de absorción atómica.



**Figura 5. Concentración de iones litio en solución y viabilidad celular.** Se muestra el resultado de las mediciones de las concentraciones molares de iones litio al término de la incubación de cada uno de los cultivos suplementados con 9% (m/v) de LCO, graficadas en el eje vertical derecho. También se muestra el logaritmo en base 10 de la cantidad de bacterias vivas presentes en este mismo instante de tiempo (eje vertical izquierdo). Los datos coloreados azules y etiquetados como condición "A" inician el ensayo con una saturación de bacterias en el medio, mientras que los datos coloreados en naranja y etiquetados como "B" inician el ensayo en una dilución de bacterias 1:100 del cultivo saturado (ver materiales y métodos). Por problemas técnicos el punto de la incubación por 2 semanas de la condición "A" y el de las 5 semanas de la condición "B" no pudieron ser medidos.

Con respecto al crecimiento de las bacterias, se puede observar en la Figura 5 que los cultivos que inician los ensayos con un menor número de células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento cuando se incuban por al menos 2 semanas, momento en el cual alcanzan la misma cantidad de bacterias que el cultivo que inicia el ensayo saturado. Esto indica que si bien la presencia de LCO disminuye la velocidad con la que las bacterias se dividen, estas son capaces de crecer en estas condiciones, igualando la viabilidad del cultivo saturado. Esta característica diferencia inmediatamente a este

aislado de los organismos actualmente utilizados en los trabajos de biorrecuperación de litio desde LCO, los cuales no pueden cumplir con sus funciones metabólicas en concentraciones menores a 1% (m/v).

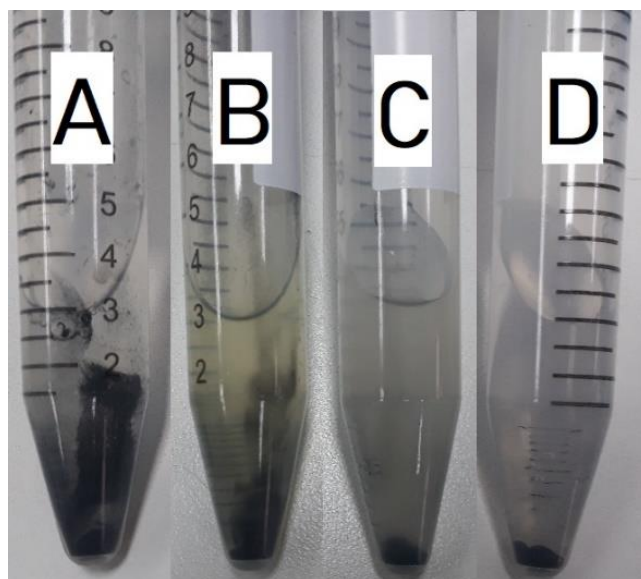
Por otro lado, al comparar las curvas de la condición “A” y “B” se observa que los cultivos que parten con menor número de células solubilizan un poco menos de litio desde LCO que los cultivos que comienzan con un mayor número de células, esto se observa claramente a las semanas 1, 3 y 4 de incubación. De todas formas, en ambas curvas se puede observar una tendencia que indica que la liberación de litio en solución es proporcional a la cantidad de semanas que se incuba el cultivo con el LCO, volviéndose más lenta esta solubilización al acercarse a las 5 semanas de incubación, y alcanzando en ambos casos concentraciones de alrededor de 10 mM de iones litio liberado. Este es un comportamiento usual en las curvas de recuperación presentes en los trabajos que utilizan *A. thiooxidans* o *A. niger*, sin embargo, en ninguno de esos trabajos se evalúa la cantidad de células presentes en los distintos puntos, por lo que no se puede realizar una comparación en ese sentido (Boxall y col., 2018). Por problemas técnicos el punto de la incubación por 2 semanas de la condición “A” y el de las 5 semanas de la condición “B” no pudieron ser medidos.

#### **3.4.1 Mecanismos de solubilización: Proximidad espacial**

Como fue mencionado en la introducción, existen trabajos que intentan mostrar la proximidad del agente biológico empleado en la lixiviación y los cristales de LCO (Hartono y col, 2017). El primer acercamiento en este trabajo surge en base a la observación macroscópica de los cultivos. Para esto los tubos fueron incubados de manera horizontal, así el LCO insoluble se mantiene en la pared del tubo mientras el



cultivo crece. Transcurridos 3 días del inicio del cultivo los tubos se sacan y se orientan de manera vertical, y de esta forma se fotografiaron. Los cultivos utilizados corresponden a *Pseudomonas* D1N5.1 (A), *P. aeruginosa* (B), *E. coli* (C) y el control abiótico (D), todos suplementados con 1% (m/v) de LCO. No se utilizó la concentración de 9% (m/v) ya que en este ensayo se requería que los microorganismos modelo se mantuvieran vivos.

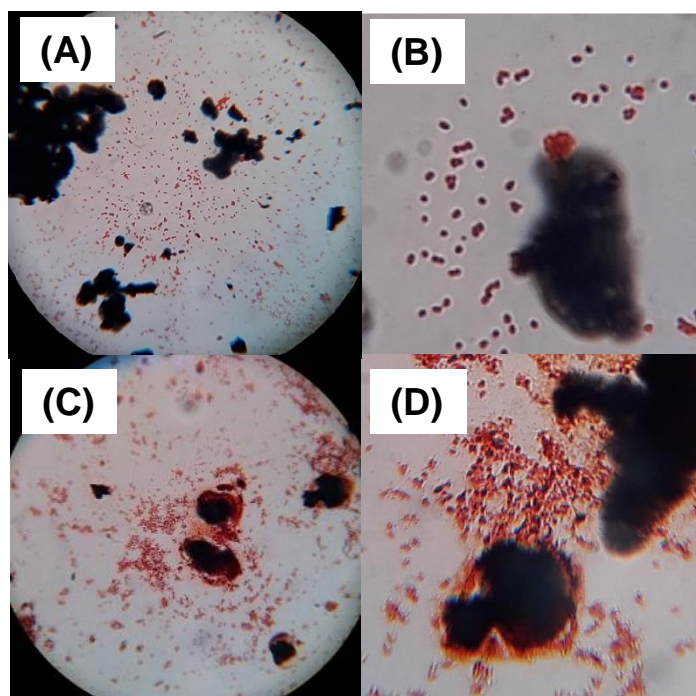


**Figura 6. Observación macroscópica de biopelículas.** Se muestra en la figura los tubos Falcon incubados de manera horizontal (derecha de la foto hacia abajo), dispuestos de manera vertical para tomar la fotografía luego de 3 días de incubación. El compuesto negro que se observa en el fondo de todos los tubos y en la pared de algunos es el LCO suplementado al medio en una concentración de 1% (m/v). El tubo **(A)** corresponde al cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1, el tubo **(B)** corresponde al cultivo de *P. aeruginosa*, el tubo **(C)** corresponde al cultivo de *E. coli* y el tubo **(D)** corresponde al control, en este caso medio M63 estéril.

En los cultivos 6A y 6B se observa una gran cantidad de cristales de LCO adheridos a la pared interior del tubo, los cuales se mantienen en posición incluso al cambiar la orientación de los tubos en los que se realizaron los cultivos. Esto puede indicar que

tanto *Pseudomonas* D1N5.1 (A) como *P. aeruginosa* (B) son capaces de formar estructuras tipo biopelículas en presencia de LCO, o bien que existe una coprecipitación de los cristales de LCO y los microorganismos que estén interactuando con ellos. Cualquiera sea el caso, estos fenómenos parecieran estar ausente en el cultivo de *E. coli*, cuyo cultivo se parece mucho más al control abiótico, en donde no existe producción de biopelícula ni interacción con microorganismos.

Como tanto *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* D1N5.1 presentan este fenómeno asociado a la formación de biopelículas, se examinó microscópicamente la relación entre estos microorganismos y los cristales de LCO. Para esto, se extrajeron cristales de LCO de cada cultivo los cuales fueron teñidos con cristal violeta para posteriormente ser visualizados por microscopia. Los resultados se muestran en la Figura 7.

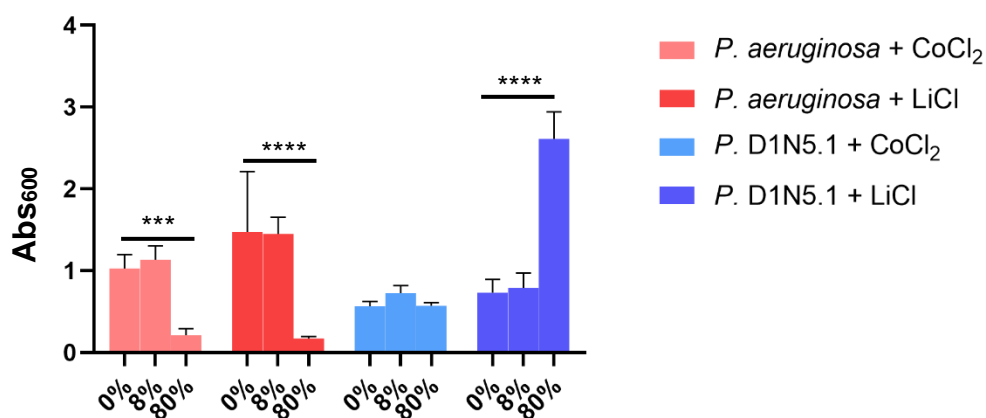


**Figura 7. Observación microscópica de biopelícula.** Se observan cristales de LCO (aspecto de piedras negras) extraídos desde los cultivos de *P. aeruginosa* y *Pseudomonas* D1N5.1 (coloreadas). El campo **(A)** corresponde al cultivo de *P. aeruginosa* con un aumento microscópico de 1000X, mientras que **(B)** corresponde al mismo cultivo con el mismo aumento microscópico, pero añadiendo un aumento digital hasta alcanzar 3000X. El campo **(C)** corresponde al cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1 con aumento microscópico 1000X y **(D)** muestra el mismo cultivo, pero con un aumento digital de 2000X. La biopelícula está teñida de un color rojizo producto del procedimiento de tinción de Gram utilizado para observar los cristales. Para más campos ver Anexo figuras 2 y 3.

Los campos 7A y 7B corresponden a los cristales de LCO extraídos desde el cultivo con *P. aeruginosa*, y los campos 7A y 7B corresponden a los cristales extraídos desde el cultivo con *Pseudomonas* D1N5.1 (para más campos ver Anexo Figuras 2 y 3). Se puede observar que en el caso de *P. aeruginosa* las bacterias se encuentran uniformemente distribuidas por el campo y no especialmente próximas a los cristales de LCO. En contraposición a esto los cristales del cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1 presentan un gran número de bacterias (en rojo) adheridas al cristal, además de observarse

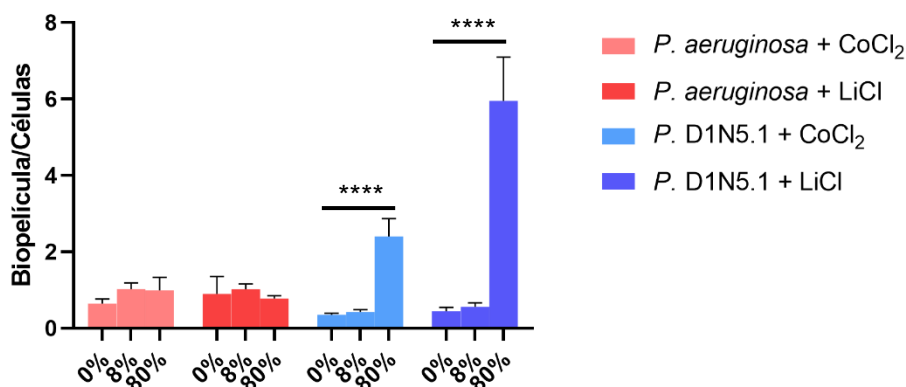
claramente una estructura extracelular teñida por el cristal violeta recubriendo los cristales de LCO (Figuras 7C y 7D). Estas observaciones sugieren que, si bien ambos microorganismos producen un fenotipo que resulta en la adherencia de cristales de LCO a la pared del tubo, la generación de biopelícula que se observa en *P. aeruginosa* pareciera no tener el objetivo de interactuar con el cristal, descartando la coprecipitación. Caso contrario, en *Pseudomonas* D1N5.1, se puede observar claramente esta estructura de tipo biopelícula recubriendo el cristal, por lo que el fenotipo observado puede haberse dado tanto por producción basal de biopelícula como coprecipitación, e incluso ambos. Por lo anterior, se plantea que la producción de biopelícula está ocurriendo en ambos microorganismos, pero con objetivos diferentes (ver discusión).

Posteriormente se cuantificó la producción de biopelícula por estas 2 bacterias en relación con la cantidad de metales disueltos en solución. Se utilizaron concentraciones variables de sales solubles de litio y cobalto y se cuantificó la cantidad de biopelícula generada en el plástico. Como cada bacteria presenta una tolerancia diferente a estos metales se utilizan concentraciones de 0, 8 y 80% de la CIM para cada metal según cada bacteria. Para esto se midió la absorbancia de la resuspensión en etanol de las biopelículas teñidas (ver materiales y métodos) y se graficó la producción absoluta de biopelícula en cada caso.



**Figura 8. Cuantificación de biopelícula en relación con la concentración de metales.** Se muestra la absorbancia obtenida luego del procesamiento de los cultivos, la cual está relacionada con la cantidad de biopelícula producida (ver materiales y métodos). Se utilizan concentraciones equivalentes al 8 y 80% de la CIM que cada bacteria presenta para cada metal. Rosado: *P. aeruginosa* en medio suplementado con cobalto; Rojo: *P. aeruginosa* en medio suplementado con litio. Celeste: *Pseudomonas* D1N5.1 en medio suplementado con cobalto; Azul: *Pseudomonas* D1N5.1 en medio suplementado con litio. Cada barra tiene una etiqueta de la concentración del metal utilizado como un porcentaje de la concentración inhibitoria mínima que tiene cada microorganismo para cada metal (*Two-way ANOVA*, \*\*\**p-value*<0,0002, \*\*\*\**p-value*<0,0001)

En la figura 8 se observa que la producción de biopelícula no varía significativamente al añadir una concentración baja (8% de la concentración inhibitoria mínima) ni de litio ni de cobalto. Sin embargo, cuando la concentración de metales en el medio aumenta y se acerca a la concentración inhibitoria mínima, *P. aeruginosa* no es capaz de seguir producir biopelícula ni en presencia de litio ni cobalto. En contraste, se puede observar que *Pseudomonas* D1N5.1, no varía significativamente su producción de biopelícula en presencia de altas concentraciones de cobalto, y también se puede observar que al suplementar el cultivo con altas concentraciones de litio aumenta significativamente la cantidad de biopelícula producida.



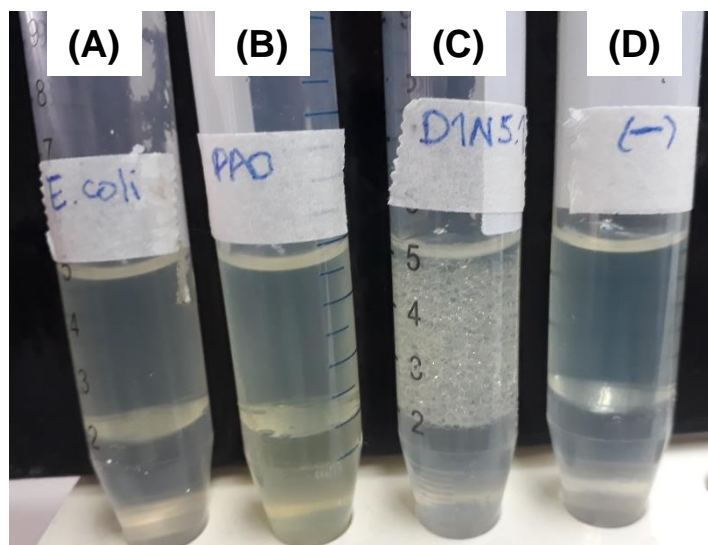
**Figura 9. Producción relativa de biopelícula.** Se muestra el cociente entre la absorbancia generada por la biopelícula y la densidad óptica de cada cultivo al momento de terminar el ensayo (antes de la tinción de la biopelícula). Rosado: *P. aeruginosa* en medio suplementado con cobalto; Rojo: *P. aeruginosa* en medio suplementado con litio. Celeste: *P. D1N5.1* en medio suplementado con cobalto; Azul: *P. D1N5.1* en medio suplementado con litio. Cada barra tiene una etiqueta de la concentración del metal utilizado como un porcentaje de la concentración inhibitoria mínima que tiene cada microorganismo para cada metal (*Two-way ANOVA*,  $p\text{-value} < 0.0001$ ).

En la figura 9 se analiza la producción de biopelícula normalizada por la cantidad de bacterias que presenta cada cultivo, donde se puede observar que *P. aeruginosa* mantiene constante la cantidad de biopelícula que produce independiente de la concentración de metales que exista en el medio, pues no se encuentran diferencias estadísticamente significativas. En este sentido *Pseudomonas D1N5.1* aumenta su producción de biopelícula por bacteria a altas concentraciones de metales. Es interesante observar el caso de las altas concentraciones de cobalto, donde al analizar la producción absoluta aparentemente no hay un aumento de producción de biopelícula, sin embargo, al normalizar esta producción por el número de bacterias presentes en el cultivo, se observa que esa misma cantidad de biopelícula es generada por un número

menor de bacterias. Si bien este comportamiento se repite para el litio, es más evidente en el caso del cobalto.

#### **3.4.1 Mecanismos de solubilización: Producción de biosurfactantes**

Se realizaron 2 ensayos de producción de biosurfactantes (ver Anexo Figura 4). A continuación, se muestra solo la prueba de emulsión, donde el sobrenadante de un cultivo con la bacteria de interés fue puesto en contacto con un volumen igual de un solvente apolar (diésel). Posteriormente se agitó a 10000 rpm por al menos 5 minutos, lo cual formará una emulsión. El tamaño de esta emulsión indica si el microorganismo fue capaz de producir cantidades significativas de estas biomoléculas. Se comparó *Pseudomonas* D1N5.1 con los microorganismos modelo *E. coli* y *P. aeruginosa*, y los resultados se muestran a continuación.



**Figura 10. Screening de biosurfactantes.** Se utilizó un ensayo de emulsificación para confirmar o descartar la producción de biosurfactantes por parte de cada microorganismo. La cantidad de biosurfactante producido por el microorganismo es proporcional al tamaño de la emulsificación en la interfase entre la fase acuosa (abajo, sobrenadante) y la fase apolar (arriba, diésel). El tubo **(A)** muestra el resultado para *E. coli*, el tubo **(B)** para *P. aeruginosa*, el tubo **(C)** para *Pseudomonas* D1N5.1 y el tubo **(D)** es el control negativo (medio M63 estéril).

En la Figura 10 se puede observar claramente la presencia de una emulsión en el caso del sobrenadante de *Pseudomonas* D1N5.1, la cual no se presenta en el control negativo, ni en el caso de *E. coli*. Esta emulsión muestra que *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de producir tensoactivos, los cuales son responsables de estabilizar las micelas que componen esta emulsión. Por otra parte, se incluyó *P. aeruginosa* como control positivo de este ensayo, sin embargo, bajo las condiciones de cultivo (presencia de LCO), esta no fue capaz de sintetizar biosurfactantes (ver Discusión).

Para cuantificar la producción de tensoactivos se utilizó un tensiómetro de anillo, con el cual se midió la tensión superficial de los sobrenadantes de cada uno de los cultivos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.



**Tabla 5. Tensión superficial de los sobrenadantes.** Se muestran las mediciones de tensión superficial de los sobrenadantes de cada cultivo obtenidas con un tensiómetro de anillo en milinewtons por metro.

Cultivo	Tensión superficial (mN/m)
Agua destilada	70,9
Medio de cultivo	70,8
<i>E. coli</i>	70,2
<i>P. aeruginosa</i>	69,8
<i>Pseudomonas</i> D1N5.1	59,9

Como se puede observar en la tabla, ni *E. coli* ni *P. aeruginosa* disminuyen en más de 1 mN/m la tensión superficial del medio de cultivo, mientras que *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de disminuir en más de 10 mN/m la tensión superficial del medio de cultivo, por lo que se demuestra que *Pseudomonas* D1N5.1 es capaz de sintetizar algún tipo de tensoactivo, en este caso, biosurfactante.

En un intento por dilucidar la naturaleza de este biosurfactante se buscaron genes asociados a producción de rhamnolípidos, principal biosurfactante descrito para el género de *Pseudomonas*, y surfactina, el cual, si bien está descrito para *Pseudomonas*, se ha estudiado y secuenciado mayormente desde el género *Bacillus*.

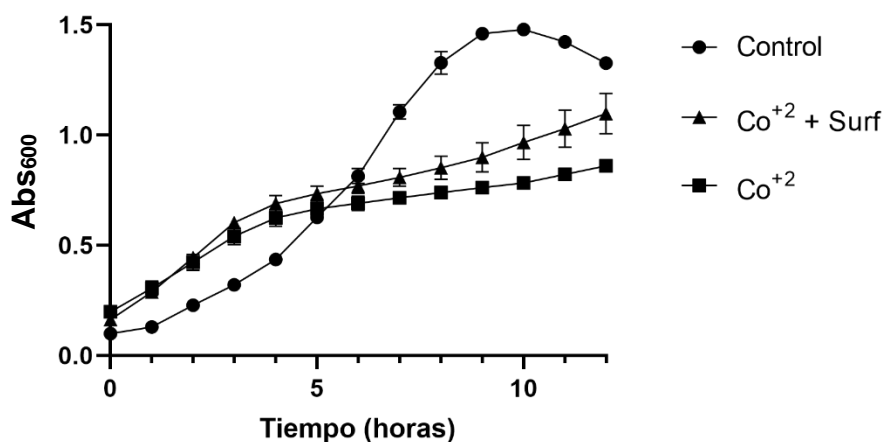
**Tabla 6. Búsqueda de genes asociados a producción de biosurfactantes.** Se muestran los tipos de biosurfactantes encontrados y el microorganismo para el cual se han secuenciado estos genes. Los nombres clave de los genes se encuentran en la tercera columna e inmediatamente después se encuentran los porcentajes de cubrimiento e identidad de cada uno de estos genes con la mejor coincidencia en el genoma de *P. D1N5.1*.

Tipo de biosurfactante	Organismo de origen	Gen	Cobertura (%)	Identidad (%)
Rhamnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	rhIAA	16	30.00
		rhIAB	11	32.69
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	rhIAA	36	27.03
		rhIAB	36	28.12
	<i>Pseudomonas koreensis</i>	rhIAA	36	24.46
		rhIAB	33	27.56
Surfactina	<i>Bacillus sp.</i>	srfAA	42	24,12
		srfAB	42	23,89
		srfAC	42	23,89
		srfAD	41	23,89
		spf	58	24.74
		comA	95	28.43
		comX	83	30.43
		comP	26	27.01

Se puede observar en la Tabla 6 que no se encontraron coincidencias en términos de cobertura o identidad relevantes para genes de producción de rhamnolípidos en el genoma de *Pseudomonas D1N5.1*. Con respecto a los genes de producción de surfactina, si bien se observan porcentajes mayores de cobertura, la identidad se mantiene por debajo del 30%. Esto sugiere que el tensoactivo sintetizado por la bacteria

podría tener una naturaleza diferente a los 2 más típicos para el género *Pseudomonas* o bien podría estar sintetizando alguno de estos tensoactivos a través de una ruta aún no descrita.

La producción de biosurfactante podría contribuir a la solubilización de LCO, principalmente a través de la formación de complejos con metales. Para evaluar esta posibilidad, se decidió estudiar el efecto de esta biomolécula sobre el crecimiento en presencia de cobalto de un organismo incapaz de sintetizarlos (*E. coli*). Se utilizó cobalto porque es más tóxico que el litio, y por lo tanto genera un efecto más claro en el crecimiento normal del microorganismo a bajas concentraciones. El ensayo consiste en incubar esta bacteria por 12 horas sin metales pesados, en presencia de concentraciones no inhibitorias de cobalto, y en presencia de la misma concentración de cobalto, pero incorporando al cultivo el surfactante producido por *Pseudomonas* D1N5.1. Se midió la densidad óptica de estos cultivos cada 1 hora para construir una curva de crecimiento para cada situación (Figura 11).



**Figura 11. Efecto del biosurfactante sobre el crecimiento de *E. coli* en presencia de Cobalto.** Se muestran 3 curvas de crecimiento de *E. coli*, la curva con etiquetas circulares corresponde al microorganismo en medio LB, la curva con etiquetas triangulares contiene medio LB suplementado con cobalto y biosurfactante y la curva con etiquetas cuadradas contiene medio LB suplementado únicamente con cobalto. El crecimiento se muestra en términos de densidad óptica en un tiempo de 12 horas con mediciones cada una hora. (*Two-way ANOVA*,  $p\text{-value} < 0,05$ )

En la Figura 11 se puede observar que el cobalto aumenta ligeramente la velocidad de reproducción de la bacteria durante las primeras 5 horas. Este fenómeno se ha descrito para concentraciones no inhibitorias de cobalto, donde durante las primeras 5 a 6 horas de incubación *E. coli* mantiene un crecimiento acelerado con respecto a la condición control (Majtan y col., 2011). Posterior a este tiempo se puede observar que el cobalto disminuye significativamente el crecimiento de *E. coli* en comparación a la curva control. Además, se observa que la presencia del surfactante disminuye el efecto del cobalto sobre el crecimiento. La diferencia entre la curva con y sin surfactante es estadísticamente significativa a partir de las 6 horas ( $p < 0.05$ ) y alcanza el intervalo de confianza de  $p < 0.0001$  desde las 9 horas en adelante. Este resultado sugiere que el biosurfactante protege a las bacterias de la acción de este metal pesado, posiblemente

al formar un complejo como ha sido descrito para otros biosurfactantes (Vigneshwaran, C. y col., 2016).

## DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES

### 4.1 Condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento de *Pseudomonas* D1N5.1

Cuando se trabaja con microorganismos aislados de ambientes extremos siempre es relevante conocer las condiciones óptimas de crecimiento. Debido a que este microorganismo fue aislado del desierto, nos enfocamos en determinar el pH y temperatura óptimas de crecimiento. Los parámetros de crecimiento determinados coinciden con los determinados en general para miembros del género *Pseudomonas*, (pH neutro y 28 °C) (LaBauve y Wargo, 2015).

El hecho que esta bacteria sea incapaz de reproducirse en pH 4 sugiere que los mecanismos que permiten la solubilización de LCO tendrían un funcionamiento diferente a los mecanismos de biolixiviación ácida presentados por los microorganismos *A. thiooxidans* y *A. niger* que han sido evaluados para la solubilización de desechos de baterías de litio (Biswal y col., 2018).

### 4.2 Mecanismos de tolerancia a LCO y cobalto

*Pseudomonas* D1N5.1 fue aislada desde un salar de litio, lugar que naturalmente presenta una alta cantidad de iones en el suelo. Se han reportado concentraciones entre 500 y 3000 mg/L de litio (Troncoso, O. y col., 2013), bastante por debajo de la concentración inhibitoria mínima de litio calculada para este microorganismo de aproximadamente 5000 mg/L (Bruna, N., 2018). Las concentraciones de litio soluble encontradas en la semana 4 y 5 de biorrecuperación en este trabajo no superan los 100

mg/L, por lo que podemos asumir que esta cantidad de litio no es relevante para determinar la supervivencia de este microorganismo en este medio.

Por otro lado, no se tiene información con respecto a la concentración de iones cobalto presentes en los suelos desde los cuales esta bacteria fue aislada. Sin embargo, se logró determinar que la tolerancia que la bacteria *Pseudomonas* D1N5.1 presenta frente al cobalto es el triple en comparación con *P. aeruginosa* y el doble en comparación con *E. coli*. Esto se explica al analizar los genes de resistencia a cobalto que las 3 bacterias analizadas presentan en su genoma.

Algunos de estos genes corresponden a transportadores inespecíficos de cationes divalentes (*corA*, *corB*, *apaG*, *fieF*, *mntH*) y se encuentran en todas las bacterias estudiadas, por lo que estos genes no son suficientes para explicar la diferencia entre las concentraciones inhibitorias mínimas. Los genes analizados que explican el hecho de que *E. coli* sea más resistente que *P. aeruginosa*, son *isc* y *suf*, los cuales corresponden a familias de chaperonas que se encargan de mantener la estructura (y reparación) de los centros hierro azufre en las proteínas intracelulares. Estos no están presentes en el genoma de *P. aeruginosa*, pero sí en *Pseudomonas* D1N5.1 y *E. coli* y, de hecho, han mostrado ser uno de los principales mecanismos por los cuales este último es capaz de tolerar altas concentraciones de cobalto (Ranquet y col., 2007).

Por otro lado, los genes *czc* se han descrito como los principales responsables de la tolerancia a cobalto, cadmio y zinc en variados géneros bacterianos como *Cupriavidus* (Monchy y col., 2007), *Caulobacter* (Hu y col., 2005), *Sinorhizobium* (Rossbach y col., 2008) y *Pseudomonas* (Hu y Zhao, 2007). Estos genes otorgan resistencia a los microorganismos portadores a través del exporte de estos iones. Se ha visto que al

haber mutaciones específicamente en el gen *czcA* se genera una sensibilidad a cobalto que puede reducir la CIM del microorganismo a menos de la mitad en comparación con el mismo microorganismo sin mutaciones (Intorne y col., 2012). Es por esto que se propone que estos transportadores son los que efectivamente están relacionados a la alta tolerancia a cobalto observada en *Pseudomonas* D1N5.1.

### **4.3 Cuantificación de litio soluble en cultivos de *Pseudomonas* D1N5.1 con LCO**

Para la cuantificación en este trabajo se utilizó una concentración de 9% (m/v), hasta 30 veces más alta de lo que se utiliza en la literatura actual. Hablando en términos de concentraciones molares, se encontraron cantidades de iones litio comparables con lo descrito. En el trabajo de biorrecuperación con *A. thiooxidans* y *A. niger* de Biswal y col., 2018, que corresponde a la biolixiviación de LCO más eficiente hasta la fecha se obtienen concentraciones desde 16,4 mM a 24,9 mM de litio, lo cual es similar a la concentración de 12,8 mM de litio encontrados luego de 4 semanas de incubación en este trabajo. Es por esto que, con miras a una posible aplicación tecnológica, el rendimiento de *Pseudomonas* D1N5.1 puede ser compensado por su resistencia al LCO, generando concentraciones molares de litio comparables a los trabajos actuales, pero en condiciones de pH neutro y temperatura ambiente.

#### **4.4.1 Proximidad espacial**

Se ha descrito que en biolixiviaciones con microorganismos ambientales se puede encontrar material biológico adherido a los cristales de LCO (Hartono y col., 2017), razón por la cual en este trabajo se exploró esa posibilidad. La observación macroscópica demuestra que tanto *Pseudomonas* D1N5.1 como *P. aeruginosa* son capaces de producir biopelícula, sin embargo, las observaciones microscópicas parecen indicar que



la generación de estas estructuras tiene objetivos diferentes en cada caso. En el caso de *P. aeruginosa* no se observó biopelículas en los cristales suspendidos en el cultivo, lo que puede significar que la biopelícula que forma este microorganismo, y que se observa en las paredes del tubo, tiene el objetivo de mantenerlo físicamente protegido de los cristales de LCO o de las pequeñas cantidades de litio o cobalto que se puedan estar liberando desde ahí. Esto se piensa porque la producción de biopelícula ha sido descrita como un mecanismo de protección ante la presencia de altas concentraciones de metales pesados (Chien y col., 2013), por lo que es muy probable que el LCO o las pequeñas cantidades de litio o cobalto que se liberen desde el cristal hacia el medio estén desencadenando esta respuesta en *P. aeruginosa*. Por el contrario, al mirar los cristales de LCO en suspensión en el cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1 se observan claramente estructuras extracelulares tipo biopelícula recubriendo los cristales de LCO, además de observarse la presencia de bacterias espacialmente próximas a dichos cristales.

Las consecuencias de generar estas biopelículas adheridas a los cristales deben ser analizadas desde un punto de vista más integral. Por una parte, se mostró que esta bacteria es tolerante a concentraciones de cobalto de hasta el doble o el triple que otros microorganismos (*E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente), razón por la cual, independiente de la razón por la que la biopelícula se forme, *Pseudomonas* D1N5.1 no se vería afectado al encontrarse tan próxima a los cristales considerando la concentración de iones litio medidas en el cultivo. Sin embargo, no se tiene una razón específica acerca de por qué esta bacteria genera estas estructuras alrededor de los cristales de LCO. Una posible explicación de este fenómeno tiene que ver con el nicho de origen de la bacteria, pues esta fue aislada desde regiones desérticas, por lo que

una alta tasa de formación de biopelículas estaría asociada a la protección ante los peligros típicos de un ambiente hostil desértico, como lo es la protección ante la radiación ultravioleta, mantención de la humedad debido a las altas temperaturas y protección ante daños mecánicos (Yin y col., 2019). Es por esto que se piensa que la producción de biopelícula que recubre los cristales de LCO por parte de *Pseudomonas* D1N5.1 podría estar asociada a una producción basal de biopelícula que recubre cualquier superficie sobre la que este microorganismo se pose, ya sean los cristales de LCO o el plástico del tubo Falcon, como se muestra en las observaciones macroscópicas. Esta hipótesis se apoya también en el hecho de que el ensayo de cuantificación de biopelícula mostró que en ausencia de metales este microorganismo es igualmente capaz de formar esta biopelícula en el plástico de los pocillos de la placa multipocillos, incluso cuando no hay metales presentes en el cultivo.

#### **4.4.2 Producción de biosurfactantes**

Se ha descrito en múltiples ocasiones la capacidad de *P. aeruginosa* para generar biosurfactantes, principalmente para solubilizar micronutrientes (Kiran y col., 2015). Sin embargo, en este trabajo no se detectó la presencia de biosurfactantes en los cultivos de *P. aeruginosa* suplementados con LCO. Una de las principales razones por las que se cree que esto ocurre es porque la producción de biosurfactantes por parte de *P. aeruginosa* ha demostrado estar asociada a la modificación de la arquitectura de su propia biopelícula (Davey y col., 2002), aumentando su porosidad y por tanto maximizando el área de contacto entre la estructura extracelular tipo biopelícula y el medio de cultivo. Como en este caso los medios de cultivo estaban suplementados con LCO, se puede sugerir que *P. aeruginosa* suprimiría su producción de biosurfactantes

para minimizar su contacto con el compuesto tóxico, razón por la cual no se detectó ningún tensoactivo en los ensayos realizados.

Los biosurfactantes han sido conocidos por sus capacidades para emulsificar sustancias insolubles (Desai y Banat 1997) y recientemente se han descrito distintos biosurfactantes que desadsorben micronutrientes y se acomplejan con cationes disueltos (Vigneshwaran y col., 2016). Estas características están relacionadas a la naturaleza del biosurfactante (Smyth y col., 2010) y aunque no se logró determinar la naturaleza exacta del biosurfactante producido por *Pseudomonas* D1N5.1 a través del análisis genómico, el experimento de su efecto sobre el crecimiento bacteriano en presencia de metales pesados parece indicar que es capaz de reducir la biodisponibilidad de éste, contribuyendo positivamente al crecimiento de *E. coli*.

Como *Pseudomonas* D1N5.1 es un aislado desértico, específicamente de los salares de litio en el desierto de Atacama, ha evolucionado en un ambiente deficiente en nutrientes por lo que es altamente probable que la constante producción de biosurfactante por parte de esta bacteria contribuya activamente a la solubilización de micronutrientes, aumentando sus posibilidades de supervivencia (Kiran y col., 2014). Además, *Pseudomonas* D1N5.1 cuenta con los mecanismos necesarios para protegerse de la solubilización de compuestos potencialmente tóxicos, como son los transportadores de cationes divalentes, las familias de chaperonas de mantención de los centros hierro azufre y los transportadores específicos para cationes divalentes de alto peso molecular. Como fue mencionado anteriormente, el biosurfactante también puede estar contribuyendo a la resistencia a cationes tóxicos en el medio, mientras que la producción de biopelícula le conferiría resistencia a diversos tipos de estrés ambiental.

## CONCLUSIONES

El aislado desértico *Pseudomonas rhodesiae* D1N5.1 se presenta como un buen candidato para solucionar los problemas actuales que enfrenta la industria de biolixiviación de baterías de LCO, como son los cultivos ácidos y temperaturas altas. Esto debido a su alta tolerancia a metales, permitiéndole resistir hasta 30 veces la concentración de LCO utilizada en la literatura disponible y alcanzando concentraciones de litio en solución de hasta 12 mM a las 4 semanas de incubación. Dadas las condiciones de cultivo de pH neutro y 28 °C se puede concluir que esta solubilización ocurre a través de un mecanismo diferente a los actualmente reportados (biolixiviación ácida), por lo que se abre un gran potencial para el estudio de biolixiviaciones con microorganismos ambientales. Una profundización en el estudio de estos mecanismos es clave para lograr una eficiencia competitiva con respecto a los microorganismos biolixivantes de LCO descritos hasta la fecha.

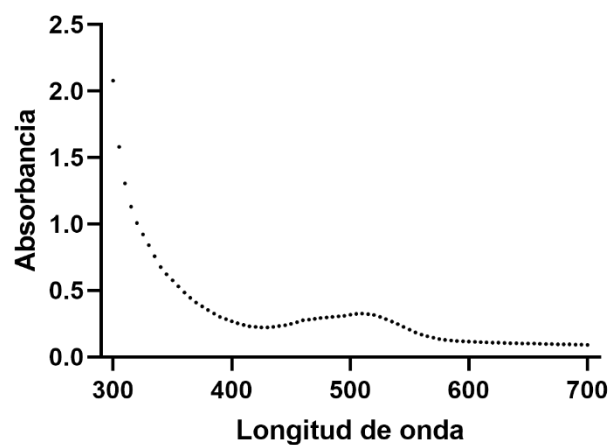
## BIBLIOGRAFÍA

- Aliasgharpour, M. y Hagani, H. 2009. Evaluation of lithium determination in three analyzers: flame emission, flame atomic absorption spectroscopy and ion selective electrode. *North American Journal of Medical Sciences*. 1(5): 244-246.
- Bahaloo-Horeh, N., Mousavi, S. M. y Baniyadi, M. 2018. Use of adapted metal tolerant *Aspergillus niger* to enhance bioleaching efficiency of valuable metals from spent lithium-ion mobile phone batteries. *Journal of Cleaner Production*. 197: 1546-1557
- Bao, Z., Qi, X., Hong, S., Xu, K., He, F., Zhang, M., Chen, J., Chao, D., Zhao, W., Li, D., Wang, J y Zhang, P. 2017. Structure and mechanism of a group-I cobalt energy coupling factor transporter. *Cell Res*. 27(5): 675-687.
- Bhanvase, B. A. y Pawade, V. B. 2018. Advanced nanomaterials for green energy: Current status and future perspectives. En Bhanvase, B. A., Pawade, V. B., Dhoble, S. J., Sonawane, S. H. y Ashokkumar, M. *Nanomaterials for green energy*. Pp 457-472. Elsevier.
- Biswal, B. K., Jadhav, U. U., Madhaiyan, M., Ji, L., Yang, E-H. y Cao, B. 2018. Biological leaching and chemical precipitation methods for recovery of Co and Li from spent Lithium-Ion batteries. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 6: 12343-12352.
- Bozich, J., Hang, M., Hamers, R. y Klaper, R. 2017. Core chemistry influences the toxicity of multi-component metal oxide nanomaterials, lithium nickel manganese cobalt oxide and lithium cobalt oxide to *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and Chemistry*. 36(9): 2493-2502
- Boxall, N. J., Cheng, K. Y., Bruckard, W. y Kaksonen, A. H. 2018., Application of indirect non-contact bioleaching for extracting metals from waste lithium-ion batteries. *Journal of Hazardous Materials*. 360: 504-511.
- Bruna, N. 2017. Búsqueda y aislamiento de bacterias capaces de biosintetizar nanopartículas y solubilizar litio. Tesis de magíster entregada a la Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello.
- Chen, X., Luo, C., Zhang, J., Kong, J. y Zhou, T. 2015. Sustainable recovery of metals from spent Lithium-Ion batteries: A green process. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 3: 3104-3113.
- Chien, C-C., Lin, B-C. y Wu, C-H. 2013. Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas* sp. *Biochemical Engineering Journal*. 78: 132-137.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C. y O'Toole, G. A. 2002. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 185(3): 1027-1036.
- Desai, J. D. y Banat, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 61(1): 47-64.

- Elkhatib, W. F., Khairalla, A. S. y Ashour, H. M. 2014. Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Future Microbiology*. 9(6): 725-735.
- Fazeli, M., Hassanzadeh, P. y Alei, S. 2011. Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum Exp Toxicol*. 30(2): 152-159.
- Fergus, J. W. 2010. Recent developments in cathode materials for lithium ion batteries. *Journal of Power Sources*. 195: 939-954.
- Ganes, L. 2014. The future of automotive lithium-ion battery recycling: charting a sustainable course. *Sustainable Materials and Technologies*. 1: 2-7
- Hartono, M., Astrayudha, M. A., Petrus, H. T. B. M., Budhijanto, W. y Sulisty, H. 2017. Lithium recovery of spent lithium-ion battery using bioleaching from local sources microorganism. *Rasayan J Chem* 10(3): 897-903.
- Hu, N. y Zhao, B. 2007. Key genes involved in heavy-metal resistance in *Pseudomonas putida* CD2. *FEMS Microbiol lett*. 267: 17-22
- Hu, P., Brodie, E. L., Suzuki Y., McAdams, H. H y Andersen, G. L. 2005. Whole- genome transcriptional análisis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J bacteriol*. 187: 8437-8449.
- Intorne, A. C, Oliveira, M. V., Pereira, L. M. y Souza Filho, G. A. 2012. Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15. *International Microbiology*. 15:96-78.
- Kiran, G. S., Ninawe, A. S., Lipton, A. N., Pandian, V. y Selvin J. 2015. Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Critical Reviews in Biotechnology*. *Early online*: 1-17.
- LaBauve, A. E. y Wargo, M. J. 2015. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol*. 6:1
- Majtan, T., Frerman, F. E y Kraus, J. P. 2011. Effect of cobalt on *Escherichia coli* metabolism and metalloporphyrin formation. *Biometals*. 24(2): 345-347
- Monchy, S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaes, T., Taghavi, S., Van der Lelie, D. y Mergeay M. 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J Bacteriol* 189: 7417-7425
- Murillo, J. Análisis de viabilidad de una planta de reciclado de baterías de Li-ion. 2016. Trabajo de fin de grado entregado al Dep. Ingeniería Química y Ambiental de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería de la Universidad de Sevilla.
- Nayariseri, A., Singh, P. y Singh, S. K. 2018. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus Subtilis* strain ANSKLAB03. *Bioinformation*. 14(6): 304-314

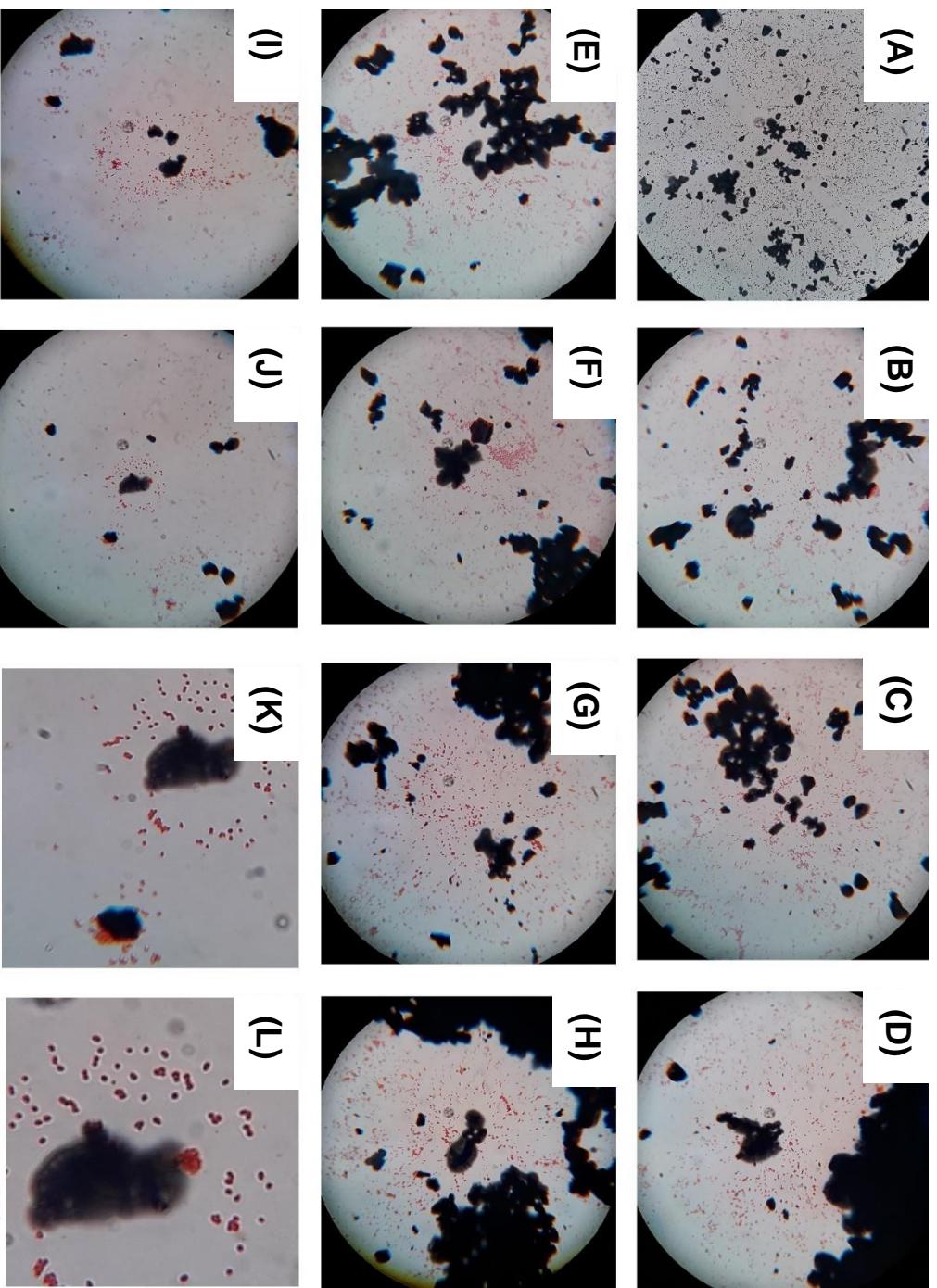
- Qiao, H. y Wei, Q. 2012. Functional nanofibers in lithium-ion batteries. En Wei, Q. (Ed), Fuctional nanofibers and their applications. Pp 197-208. Woodhead Publishing Limited.
- Ranquet, C., Ollagnier-de-Choudens, S., Loiseau, L., Barras, F y Fontecave, M. 2007. Cobalt stress in *Escherichia coli*. The effect on the iron-sulfur proteins. J Biol Chem. 282(42): 30442-30451.
- Roszbach, S., Mai, D. J., Carter, E. L., Sauviac, L., Capela, D., Bruand, C. y Bruijn, F. J. 2008. Response of *Sinorhizobium meliloti* to elevated concentrations of cadmium and zinc. Appl Environ Microbiol. 74: 4218-4221
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant., R. y Banat, I. M. 2010. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. En Timmis, K. N. (Ed). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Pp: 3687-3704. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tran, M. K., Rodrigues, M-T. F., Kato, K., Babu, G. y Ajayan, P. M. 2019. Deep eutectic solvents for cathode recycling of Li-ion batteries. Nature Energy. 4(4):1
- Troncoso, O., Ercilla, R. y Vivallo, W. 2013. Estudio del potencial de litio en salares del norte de Chile. SERNAGEOMIN.
- Van der Ploeg, J. R., Weiss, M. A., Saller, E., Nashimoto, H., Saito, N., Kertesz, M. A. y Leisinger, T. 1996. Identification of sulfate starvation-regulated genes in *Escherichia coli*: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source. Journal of Bacteriology, 178(18): 5438-5446.
- Vigneshwaran, C., Jerold, M., Vasantharaj K. y Sivasubramanian, V. 2016. A review on biosurfactants and its environmental applications. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology. 10(8): 152-160.
- Von Rozycki, T. y Nies, D. H. 2009. *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. Antonie Van Leeuwenhoek. 96(2): 115-139.
- Yin, W., Wang, Y., Liu, L. y He, J. 2019. Biofilms: The microbial "Protective Clothing" in extreme environments. Int J Mol Sci. 20(14): 3423.
- Zeng, X., Li, J. y Singh, N. 2014. Recycling of Spent Lithium-ion Battery: A critical review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 44: 1129-1165.
- Zhang, X., Xie, Y., Lin, X., Li, H. y Cao, H. 2013. An overview on the processes and technologies for recycling cathodic active materials from spent lithium-ion batteries. J Mater Cycles Waste Manag. 15: 420-430.

## ANEXO

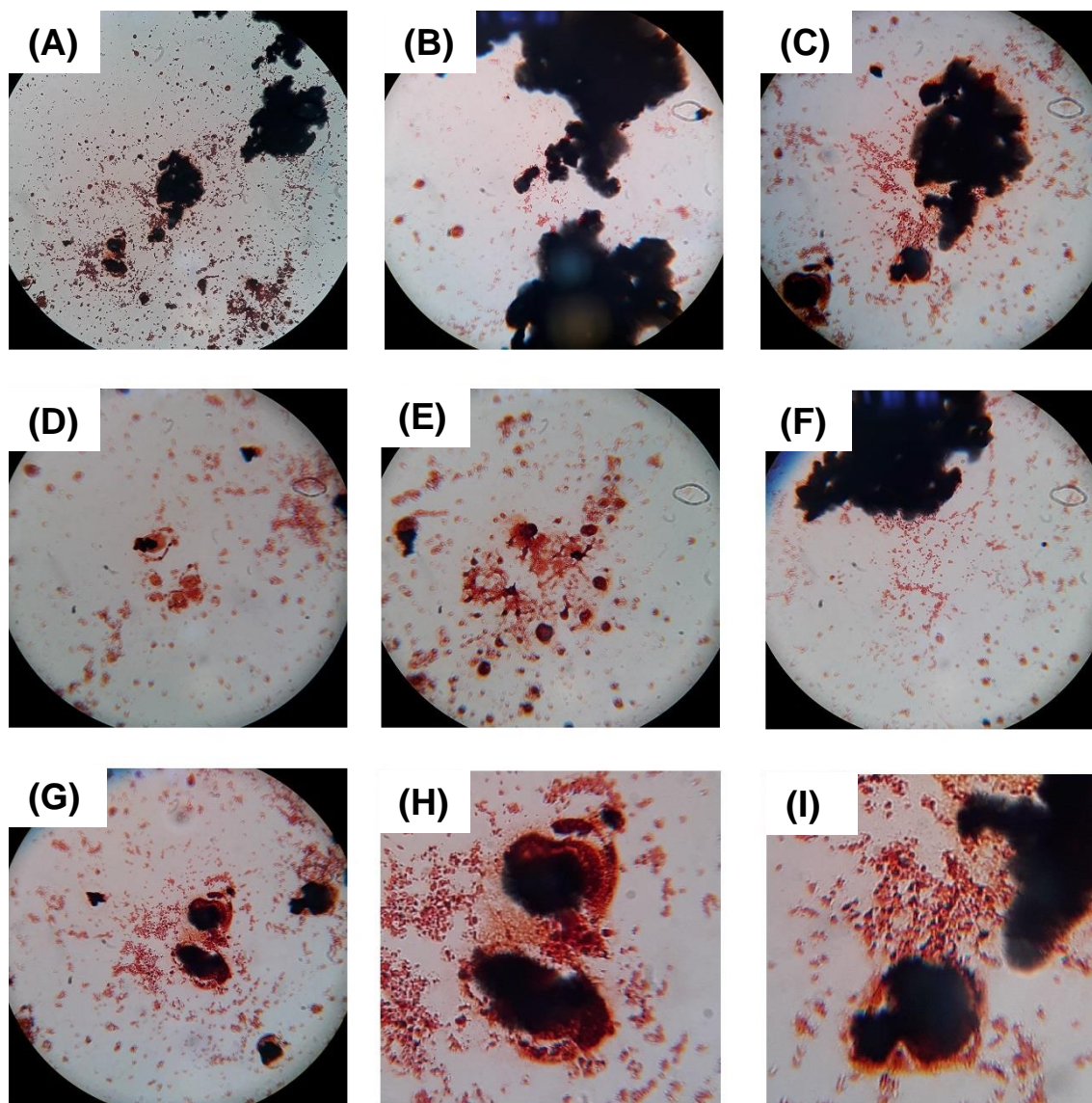


**Figura 1. Espectro de absorción cobalto.** Se muestran las unidades arbitrarias de absorbancia que una solución de medio mínimo M63 suplementada con 100 mM de Cloruro de cobalto tiene desde los 300 a los 700 nm en saltos de 5nm. Se puede observar que sobre los 550 nm su absorbancia es mínima.





**Figura 2. Cristales de LCO en cultivo de *P. aeruginosa*.** Se muestran 10 campos distintos correspondientes a la muestra de cristales de LCO en suspensión extraídos desde el cultivo de *P. aeruginosa*. Los aumentos son 400X en (A) y 1000X en los campos desde la (B) hasta la (J). Los campos (K) y (L) corresponden a aumentos digitales del campo mostrado en (J) de 2000 y 3000X respectivamente



**Figura 3. Cristales de LCO en cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1.** Se muestran 7 campos distintos correspondientes a la muestra de cristales de LCO extraída desde el cultivo de *Pseudomonas* D1N5.1. Los aumentos son de 400X en (A) y 1000X en los campos desde la (B) a la (G). Los campos (H) e (I) corresponden a un aumento digital 2000X de los campos (G) y (C) respectivamente.

Muestra	H <sub>2</sub> O	<i>P. D1N5.1</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	M63	1% SDS
Gota Completa						
Aumento						
1ra Medición	74°	54°	-	64°	66°	38°
2da Medición	68°	56°	67°	61°	61°	42°

**Figura 4. Screening ensayo de la gota.** Se muestran los resultados de la medición de ángulos de contacto entre las distintas muestras y la superficie hidrofóbica. El ensayo se realizó 2 veces, y para esquematizar la forma de medición se muestran las fotos tomadas a las gotas con sus respectivos aumentos solo del segundo ensayo. Como se puede observar, la variación entre muestras de una medición es en algunos casos menor que la variación entre mediciones. Aunque algunos patrones se repiten entre mediciones, se decide descartar este ensayo como indicador de producción de biosurfactantes