

Aislamiento y caracterización de  
microorganismos halófilos de  
salmuera del Salar de Cauchari

Isolation and characterization of  
halophilic microorganisms from Salt  
lake Cauchari

Paula Castro  
Elizabeth Cáceres

---

Laboratorio de Biominería del Cipromin (Centro de Procesamiento de Minerales),  
Intemin – SEGEMAR, Secretaría de Minería, Ministerio de Energía y Minería, Av. Gral  
Paz 5445, Parque Tecnológico Miguelete, edificio 14 (B1650WAB) San Martín, Pcia  
de Buenos Aires, paula.castro@segemar.gov.ar

## RESUMEN

Los microorganismos halófilos son considerados microorganismos extremófilos, y como tales, son de especial interés debido a que poseen un gran potencial de aplicación biotecnológico. La característica de estos microorganismos es su capacidad de crecer en ambientes con concentraciones elevadas de sales, de hasta 30%p/v.

En el presente trabajo se utilizó una salmuera proveniente del Salar de Cauchari (provincia de Jujuy, Argentina) teniendo como primer objetivo aislar y caracterizar microorganismos halófilos, en particular aquellos que crecieran en ambientes con altas concentraciones de litio.

Se incubaron distintas alícuotas de salmuera en LB (NaCl, extracto de levadura, triptona) como medio de cultivo nutritivo en agitación, a 30°C durante 10 días. Se lograron aislar cuatro cepas denominadas B, C, N y M, que, si bien hasta el momento no fueron identificadas, fueron sometidas a diferentes estudios de caracterización: observación de forma, consistencia, elevación y pigmentación de las colonias; tinción con azul de metileno; tinción de Gram y observación al microscopio electrónico. Se observó que la cepa B está formada por cocos G-; la cepa C por cocobacilos G+; la cepa N por cocobacilos G- y la M por bacilos G+.

Por otro lado, se realizaron pruebas de crecimiento de las cuatro cepas, en las que se ensayó resistencia/tolerancia a diferentes concentraciones de litio. En este caso, se empleó como medio de cultivo un LB con la mitad de NaCl pero adicionado con concentraciones crecientes de LiCl. Hasta el momento, las cuatro cepas crecen hasta 4% LiCl, que es la concentración máxima ensayada.

**Palabras Clave:** biohidrometalurgia, bacterias halófilas, litio.

## ABSTRACT

Halophilic micro-organisms are considered extremophile, and that

is why they are of special interest in biotechnology. Their principal characteristic is that they are able to grow in environments with high concentrations of salts, up to 30%w/v.

In this work, we used a brine from the Cauchari Salt Mine (Jujuy-Argentina) having as primary objective the isolation and characterization of halophilic microorganisms, particularly those which tolerate high lithium concentrations.

Brine was inoculated in nutritive broth LB (NaCl, yeast extract, tryptone) in a rotary shaker at 30°C for 10 days. We isolated four strains named B, C, N and M; and examined each of them morphology by metilene blue and Gram staining, and by electronic microscopy. We observed that Strain B is formed by gram-negative coccus, strain C by gram-positive coccobacillus, strain N by gram-negative coccobacillus and M by gram-positive bacillus.

All strains were tested for tolerance/resistance in nutritive broth additionated with different concentrations of LiCl, finding positive results for all of them up to the maximum concentration tested of 4% LiCl.

**Keywords:** biohidrometalurgia, halophilic bacteria, lithium.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos extremófilos son aquellos capaces de crecer en ambientes con condiciones completamente adversas para la vida, es así como se los ha encontrado en lugares como volcanes, lagunas hipersalinas, zonas con radiación solar extrema, etc. Según el ambiente en el que se desarrollan se clasifican en distintos grupos: termófilos, acidófilos, alcalófilos, halófilos, psicrofilos. Los microorganismos halófilos, habitan zonas donde la concentración de sales puede ser de hasta diez veces la del océano, como ocurre en el Mar Muerto [1].

La región de la Puna (Perú, Bolivia, Argentina y Chile) es un vasto altiplano de baja presión atmosférica, menor difusión de oxígeno en

el aire, escasas precipitaciones y clima gélido. Se trata de una zona en la que se encuentran gran variedad de salares, que contienen más del 80% de las salmueras ricas en litio del planeta [2].

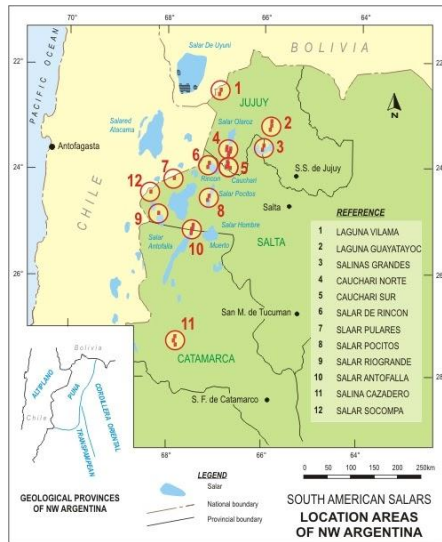


Figura 1. Distribución de salares en la puna argentina.

En particular, en la puna argentina, en la provincia de Jujuy, se encuentra el Salar de Cauchari, que es un depósito salino actual con salinas enriquecidas en litio; en un ambiente de clima árido, localmente relacionado con fuentes termales. [3].

El objetivo de este trabajo es la búsqueda de bacterias halófilas, y en particular, aquellas que sean capaces de crecer en ambientes con altas concentraciones de litio.

## PARTE EXPERIMENTAL

Los ensayos se realizaron con salmuera natural proveniente de un pozo de 120m de profundidad del Salar de Cauchari (Figura 1), ubi-

cado a aprox 4000m.s.n.m. en la provincia de Jujuy- Argentina. La muestra fue mantenida a temperatura ambiente hasta su tratamiento en el laboratorio.

### **Análisis químico**

La determinación de litio, potasio, sodio, magnesio y boro se llevó a cabo siguiendo el método 3120 B del Standard Methods, 23<sup>rd</sup> Edition; la de cloruros se realizó por potenciometría de precipitación y titulación con nitrato de plata; los sulfatos se determinaron por Espectrofotometría empleando un equipo HACH y la alcalinidad se determinó siguiendo el método 2320 B del Standard Methods, 23<sup>rd</sup> Edition.

### **Aislamiento y conservación**

La salmuera se incubó en medio de cultivo nutritivo LB (1g NaCl, 1g peptona, 0,5g extracto de levadura en 100ml) a 30°C, en agitación, durante unos diez días. El crecimiento se determinó por turbidez en el medio líquido y se verificó con la aparición de colonias en las placas de agar.

Las cepas reconocidas como diferentes se sembraron por separado en el mismo medio nutritivo, sólido, con el objetivo de purificarlas y aislarlas. Una vez purificadas, las cepas obtenidas fueron conservadas en glicerol 40% a -80°C.

### **Caracterización de las cepas**

Las bacterias aisladas se clasificaron teniendo en cuenta su morfología. También se realizó tinción con azul de metileno y tinción de Gram [4], empleando un microscopio binocular LABMED XSZ 107 BN para ver los preparados.

Por último, se realizó observación por microscopía electrónica empleando un microscopio modelo Philips XL 30 ESEM.

### **Pruebas de crecimiento.**

Se analizó para cada una de las cepas aisladas el crecimiento en el medio nutritivo, pero suplementado con concentraciones crecientes de cloruro de litio. Se empleó medio LB levemente modificado (0,5g NaCl, 0,5g extracto de levadura, 1g peptona en 100ml) al que se le

adicionó de 0,5 a 4 % de LiCl. Cada bacteria se inoculó en medio líquido, se incubó a 30°C, en agitación; verificando su crecimiento por turbidez del medio y formación de colonias en placas de agar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se presentan los resultados del análisis químico de la salmuera.

	Concentración (mg/l)
Boro	1374,5
Litio	741
Sodio	138200
Potasio	6487
Magnesio	1401,5
Cloruros	203428
Sulfatos	31770
Alcalinidad total (como CaCO <sub>3</sub> )	891,5
Bicarbonatos (como CaCO <sub>3</sub> )	890,5

Tabla 1. Análisis químico de la salmuera

La temperatura de la salmuera en la zona de muestreo era de 19,9°C y el pH=6,8. Es importante resaltar que, en particular, el magnesio y el potasio, son esenciales para el crecimiento bacteriano, ya que ayudan a regular la presión osmótica con el medio, lo cual les permite a las bacterias soportar las altas concentraciones de sal [5].

Se lograron aislar cuatro cepas que se identificaron según su pigmentación en N (naranja), B (blanco), M (marrón), C (beige); como se puede ver en la Figura 2. Todas ellas presentaron características morfológicas similares en cuanto a que todas eran de borde redondo, forma plana, consistencia mucosa y elevación convexa.

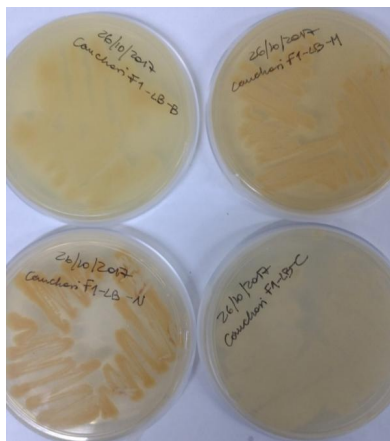


Figura 2. Bacterias aisladas en LB.

La observación al microscopio electrónico nos permitió identificar a la cepa M como bacilos o cocobacilos de un tamaño inferior a  $2\mu\text{m}$  (Figura 3, izquierda); y la cepa B formada por cocos (Figura 3, derecha). No nos fue posible la observación clara de las otras dos cepas en este microscopio; sin embargo, sí se pudo ver que la cepa N también tenía un tamaño menor a  $2\mu\text{m}$ .

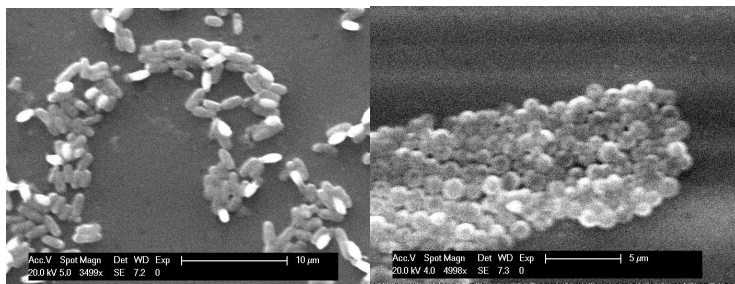


Figura 3. Observación al microscopio electrónico. A la derecha, cepa B; a la izquierda cepa M.

Se determinó que dos cepas son gram-positivas (C y M) y dos

cepas gram-negativas (N y B); como se puede ver en la Figura 4. Se corrobora que la cepa M son bacilos y la B cocos. Mientras que las cepas N y C estarían formadas por cocobacilos.

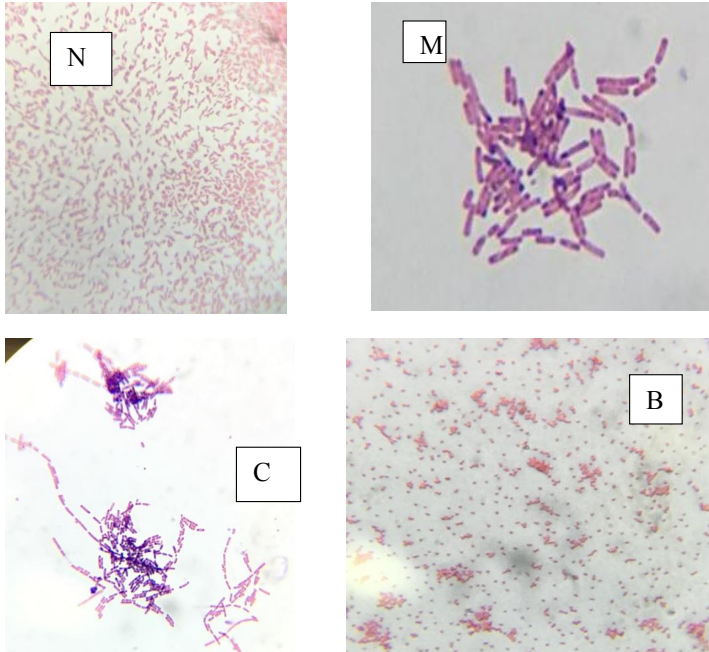


Figura 4. Tinción de Gram.

Las cuatro cepas por separado se hicieron crecer en medio nutritivo LB enriquecido en litio con concentraciones crecientes pudiendo verificar mediante placas de agar, que en todos los casos había crecimiento. Hasta el momento se evaluó la resistencia/tolerancia de las cuatro bacterias hasta una concentración de 4% de litio.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha cumplido con el objetivo principal del estudio, que era el aislamiento de bacterias halófilas de la salmuera del



Salar de Cauchari, del cual no se conocen estudios previos de su biodiversidad. Si bien estas bacterias aún no fueron identificadas, dada su adaptación al ambiente extremo, son de potencial interés biotecnológico. Por otro lado, también se adaptan a crecer en medios suplementados con litio, lo cual las hace aún más interesantes.

Se continuará trabajando para lograr la clasificación taxonómica de las bacterias aisladas, así como también se realizarán estudios sobre su metabolismo, y crecimiento en medios con mayores concentraciones de litio.

## REFERENCIAS

1. Aneela Roohi, Iftikhar Ahmed, Muhammad Iqbal and Muhammad Jamil. “preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak, Pakistan”. *Pak. J. Bot.*, Special Issue March 2012.
2. Mario A. Hernández, Isidoro B. Schalamuk y Nilda González. “La hidrogeología en la evaluación minera de salmueras de interés económico”. *Temas actuales de la hidrología subterránea*, 2013.
3. Martín Gozalvez, Víctor Bercheni y Eulogio Ramallo. “Carta Minero Metalogenética 2366-III, Provincias de Jujuy y Salta”, SEGEMAR, Buenos Aires, 2016.
4. Dra Diana L. Vullo; Dra Mónica Wachsmann; Dra Laura E. Alche. “Microbiología en práctica: Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica aplicada”. Editorial Atlante, Buenos Aires. 2000.
5. Vivian Marcela Garzón Rublano. “Aislamiento e identificación de bacterias halófilas con potencial bioactivo aisladas de las Salinas de Zipaquirá, Colombia”. Tesis, Universidad de La Sabana, Colombia, 2015.