

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Microalgas y elementos químicos clave en la industria
energética: I. El caso del litio: captura y fraccionamiento.
II. Diversidad y adaptación exitosa: el caso del uranio**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Héctor Miguel Díaz-Alejo Guerrero

Directores

**Eduardo Costas Costas
Victoria López Rodas
María del Camino García Balboa**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

MICROALGAS Y ELEMENTOS QUÍMICOS CLAVE EN LA INDUSTRIA ENERGÉTICA:
I. EL CASO DEL LITIO: CAPTURA Y FRACCIONAMIENTO.
II. DIVERSIDAD Y ADAPTACIÓN EXITOSA: EL CASO DEL URANIO.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

HÉCTOR MIGUEL DÍAZ ALEJO GUERRERO

DIRECTORES

EDUARDO COSTAS COSTAS
VICTORIA LÓPEZ RODAS
CAMINO GARCÍA BALBOA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



TESIS DOCTORAL

**MICROALGAS Y ELEMENTOS QUÍMICOS CLAVE EN
LA INDUSTRIA ENERGÉTICA:**

**I. EL CASO DEL LITIO: CAPTURA Y
FRACCIONAMIENTO.**

**II. DIVERSIDAD Y ADAPTACIÓN EXITOSA: EL CASO
DEL URANIO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Héctor Miguel Díaz Alejo Guerrero

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Eduardo Costas Costas

Victoria López Rodas

Camino García Balboa

"Souvenez-vous que dans les champs de l'observation le
hasard ne favorise que les esprits préparés".

Louis Pasteur.

“La vida puede ser maravillosa...”

Andrés Montes.

Agradecimientos

Hay principalmente dos tipos de personas que están leyendo estas líneas. El primer tipo sois quienes realmente buscáis lo que se encuentra unas páginas más adelante, la memoria de la tesis propiamente dicha, y que, por azar, curiosidad o váyase a saber la razón, estáis leyendo ahora esto: bienvenidos.

El segundo tipo de personas sois todo lo contrario: esos lectores que me conocéis personalmente pero de modo ajeno al mundo de la investigación y, de una manera u otra, habéis abierto esto porque queréis enteraros por fin qué he estado haciendo estos últimos tres años y pico. Salvo con mis directores y algunas pocas personas más relacionadas con la investigación con las que he tenido la fortuna de relacionarme durante estos años, he sido bastante parco en palabras respecto a lo que aquí se presenta no solo por ahorrarme vuestras caras de estupefacción e incomprensión, sino porque en realidad la incertidumbre es una nube que se cierne sobre la investigación, sin saber si aclarará, lloverá o nevará.

Utilizaré estos párrafos de agradecimientos para aludir y que os sintáis identificadas las personas que me habéis acompañado durante este periodo, pero también, entre líneas, como recordatorio personal de cómo han transcurrido mis años de tesis, para poder retrotraerme a este tiempo de transición en todos mis ámbitos personales cada vez que lea el documento durante los decenios que aún espero vivir.

Empiezo dando las gracias a los servicios y entidades que nos han ayudado o financiado, colaborando para que esta tesis sea hoy una realidad:

- Al Centro de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Ciencias Geológicas de la UCM.
- Al Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).
- A la financiación por el proyecto de investigación con nº OTRI: 346-2017, titulado: "ESTUDIO DE LAS CIANOBACTERIAS TÓXICAS Y LAS CIANOTOXINAS, TANTO EN AGUAS DE ABASTECIMIENTO COMO EN AGUAS RECREATIVAS DE LA COMUNIDAD DE MADRID", modalidad de artículo 83 de la LOU entre la Dirección General de Salud Pública de la Comunidad de Madrid y la Universidad Complutense de Madrid.

Continúo mencionando a las personas y lugares que más relevancia han tenido para mí desde que empecé la tesis hasta hoy día:

- Mis directores el Dr. Eduardo Costas Costas y la Dra. Victoria López Rodas: porque me disteis la oportunidad cuando tan solo era un estudiante de veterinaria con las ideas poco claras y me habéis mostrado un camino a seguir en un mundo inesperado.
- Mi directora la Dra. Camino García Balboa: porque me diste tu apoyo incondicional y me has enseñado que, ante todo, la vida sigue.

- Paloma Martínez-Alesón García y la Dra. Beatriz Baselga Cervera: por ser una inestimable compañera y una entusiástica guía ejemplar, respectivamente.
- La facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, incluyendo (y destacando) su cafetería: porque ha sido mi casa desde el 2013 y sé que aquí nunca me sentiré como un extraño del todo.
- Mis alumnos de italki: porque son, literalmente, las personas con las que más he conversado en los últimos meses y han sido un verdadero apoyo.
- Las personas que conocí durante mis dos años de bachillerato en el instituto Dionisio Aguado de Fuenlabrada, así como a las sucesivas personas que han ido conformando el gran grupo que tenemos hoy día y cuyo nombre prefiero no mencionar: porque las conversaciones más profundas sobre las relaciones personales, el orden mundial y el sentido de la vida las he tenido vestido en chándal en un kebab de Fuenla, y seguiré reivindicándolo.
- Mi Erasmus, de Gran Canaria a León pasando por Málaga, pero verdaderamente impregnado de toda España, Italia y parte de Europa: tan lejano y tan presentes.
- Mi Equipo: porque juntos hemos pasado de estar vetados a darles vida a los pueblos, creciendo pero sintiendo que es algo que nunca se romperá.
- Misigodo: porque, con solo sentarte en mi regazo, me diste calor en los días fríos.
- Sandra, que apareció casi a la vez que empezó mi tesis: porque gracias a ti he descubierto Getafe, Toledo, Zaragoza, e incluso mi propio pueblo; porque hemos compartido confinamientos y viajes, ansiedades y fiestas, nuestros peores y nuestros mejores.
- Mis padres y hermanos: porque tengo parte de todos y todo lo que consiga también es mérito vuestro. Gracias por hacer que nunca me haya faltado de nada.

A María y Gonzalo

ÍNDICE

| | Página |
|---|---------------|
| 1. RESUMEN | 3 |
| 2. SUMMARY | 9 |
| 3. INTRODUCCIÓN | 15 |
| 3.1 Eras geológicas de la Tierra | 15 |
| 3.1.1 <u>Características del cambio global</u> | 15 |
| - Incremento de temperatura | 15 |
| - Acidificación de los océanos | 16 |
| - Eutrofización de aguas dulces | 16 |
| - Destrucción de hábitats | 16 |
| - Pérdida de diversidad | 17 |
| 3.2 Biosfera | 17 |
| 3.2.1 <u>Producción primaria</u> | 17 |
| 3.2.1.1 <i>Microalgas, características y evolución</i> | 18 |
| 3.2.1.1.1 Definición de microalga | 18 |
| 3.2.1.1.2 Características y evolución de las microalgas | 19 |
| - Importancia ecológica | 19 |
| - Diversidad | 19 |
| - Ubicuidad | 20 |
| 3.2.1.1.3 Cambio global y microalgas | 20 |
| 3.2.2 <u>Ciclos biogeoquímicos</u> | 22 |
| 3.2.2.1 <i>Ciclo de carbono y calentamiento global</i> | 22 |
| 3.2.3 <u>Aumento de población humana y demanda de energía</u> | 23 |
| 3.2.3.1 <i>Elementos químicos clave</i> | 25 |
| 3.2.3.1.1 Uranio y energía nuclear de fisión | 25 |
| 3.2.3.1.2 Litio | 27 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.3.1.3 | Importancia de los seres vivos con el Li y el U | 30 |
| 4. | OBJETIVOS | 35 |
| 5. | MATERIAL Y MÉTODOS | 39 |
| 5.1 | Muestreo de aguas impactadas por la minería de uranio | 39 |
| 5.1.1 | <u>Etiquetado y conservación de muestras</u> | 39 |
| 5.2 | Diseño experimental | 39 |
| 5.2.1 | <u>Estudio de las aguas residuales de minería de uranio</u> | 39 |
| 5.2.1.1 | <i>Análisis químico de muestras de agua de minería de uranio</i> | 39 |
| 5.2.1.2 | <i>Toxicidad por Microtox</i> | 41 |
| 5.2.1.3 | <i>Diversidad fitoplanctónica</i> | 41 |
| 5.2.2 | <u>Procedimientos experimentales con microalgas</u> | 42 |
| 5.2.2.1 | <i>Especies utilizadas</i> | 42 |
| 5.2.2.2 | <i>Medios y condiciones de cultivo</i> | 44 |
| 5.2.2.2.1 | Medios de cultivo | 44 |
| 5.2.2.2.2 | Mantenimiento de los cultivos | 46 |
| 5.2.2.3 | <i>Experimentos evolutivos con quemostato</i> | 46 |
| 5.2.2.3.1 | Diseño de biorreactor semi-continuo | 48 |
| 5.2.2.3.2 | Cálculos para el funcionamiento y estudio de las poblaciones en el biorreactor semi-continuo | 49 |
| 5.2.2.3.3 | Experimento con poblaciones microalgales en biorreactor semi-continuo y estimación de individuos resistentes por el método de conteo de puntos en placa | 49 |
| 5.2.2.4 | <i>Ensayo de captura y fraccionamiento</i> | 51 |
| 5.2.2.4.1 | Cálculos fraccionamiento | 52 |

| | |
|--|------------|
| 6. RESULTADOS | 55 |
| 6.1 Caracterización y selección de las aguas de estudio | 55 |
| 6.2 Diversidad fitoplanctónica | 55 |
| 6.3 Estudio de adaptación con biorreactor semi-continuo | 56 |
| 6.4 Captura de litio con microalgas | 57 |
| 6.5 Fraccionamiento de litio con microalgas | 58 |
| 6.6 Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles | 59 |
| 6.7 The Upcoming ⁶Li Isotope Requirements Might Be Supplied by a Microalgal Enrichment Process. | 72 |
| 6.8 Resultados adicionales: Cepas bacterianas y su uso para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo y óxido de difenilo (HTF). | 87 |
| 7. DISCUSIÓN | 91 |
| 7.1 Biodiversidad | 91 |
| 7.2 Adaptación | 97 |
| 7.2.1 <u>Evolución y quemostato</u> | 98 |
| 7.3 Biotecnología | 101 |
| 8. CONCLUSIONES | 117 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 121 |
| 10. ANEXO | 157 |
| 10.1 Documento de publicación de patente | 157 |

Lista de tablas

| | Página |
|---|---------------|
| Tabla 1. Información sobre las aguas residuales de minería de uranio estudiadas | 40 |
| Tabla 2. Composición química de 1L de medio BG-11 | 44 |
| Tabla 3. Metales traza incluidos en la solución de metales para la preparación del medio BG-11. | 45 |
| Tabla 4. Composición del medio Guillard's F/2 sin incluir las características químicas del agua marina utilizada. | 45 |
| Tabla 5. Componentes de la solución de vitaminas para la preparación de medio F/2. | 45 |
| Tabla 6. Componentes de la solución de metales traza para la preparación de medio F/2. | 46 |
| Tabla 7. Componentes del medio agar LB. | 46 |
| Tabla 8. Datos físicos, químicos y de toxicidad de las aguas de estudio. | 55 |
| Tabla 9. Contaje de especies e índices de diversidad para las diferentes aguas residuales de minería de uranio estudiadas. | 56 |
| Tabla 10. Proporción calculada de células resistentes o tolerantes a las diferentes aguas residuales de minería de uranio en función de cepa y número de generaciones. | 56 |
| Tabla 11. Captura de Li por parte de los diferentes cultivos de las tres cepas seleccionadas. | 57 |
| Tabla 12. Enriquecimiento del <i>pellet</i> en ${}^6\text{Li}$ (δ^6) en base a la relación isotópica en el medio. | 58 |

Lista de figuras

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Diagrama del ciclo del carbono. | 23 |
| Figuras 2.a., 2.b., y 2.c. | 43 |
| 2.a. Imagen de <i>Acutodesmus dimorphus</i> (Turpin) P.M.Tsarenko. | |
| 2.b. Imagen de <i>Desmodesmus communis</i> (E.Hegewald). | |
| 2.c. Imagen propia de la cepa CAFE. | |
| Figura 3. Posibles escenarios supuestos de adaptación de microalgas a un nuevo medio tóxico tras el crecimiento en un quemostato. | 47 |
| Figura 4. Representación esquemática del biorreactor semi-continuo. | 48 |
| Figura 5. Representación esquemática del sistema de conteo de puntos coincidentes en placa | 50 |
| Figura 6. Diagrama del experimento de captura y fraccionamiento de litio para cada una de las especies estudiadas. | 52 |



1. RESUMEN

1. RESUMEN

TÍTULO:

Microalgas y elementos químicos clave en la industria energética:

- I. El caso del litio: captura y fraccionamiento.
- II. Diversidad y adaptación exitosa: el caso del uranio.

INTRODUCCIÓN

La actividad humana ha creado interrupciones en los sistemas terrestres. Hay una gran pérdida de biodiversidad, acidificación de masas de agua, eutrofización y calentamiento global. Los cambios son tales que se ha acuñado el término “Antropoceno” para aludir al tiempo geológico actual. El futuro es incierto, pero se prevé que muchos ecosistemas se vean afectados. Los productores primarios son la base de los ecosistemas. Dentro de los productores primarios destacan las microalgas, los microorganismos fotosintetizadores, por su ubicuidad, diversidad e importancia ecológica. Además, suponen una gran ayuda a la hora de intentar paliar los efectos del calentamiento global al ser capturadores de dióxido de carbono. Desde la Revolución Industrial, la Humanidad ha emitido a la atmósfera cantidades ingentes de carbono, provocado por la quema de combustibles fósiles para obtener energía, y que ha originado desequilibrios que están desembocando en el calentamiento global. En la actualidad, se está apostando por la eliminación de los combustibles fósiles en la generación eléctrica y la movilidad, lo que no obstante lleva aparejado un incremento en la utilización de ciertos elementos químicos, como el uranio y el litio. Estos elementos cuentan a su vez con problemas medioambientales. El uranio es necesario para la energía nuclear de fisión, una fuente de energía eficiente y de bajas emisiones de CO₂. Pero la minería y el procesamiento del uranio producen largas masas de agua ácida tóxica, creando ambientes extremos al aire libre. El litio es un elemento clave en la fabricación de baterías, pero también en el desarrollo de la energía nuclear de fusión. Sin embargo, serán necesarias nuevas formas de obtener y reciclar el litio para poder responder a la demanda con el menor perjuicio a los ecosistemas. A su vez, también se requieren nuevos métodos de enriquecimiento isotópico que hagan el proceso de obtención del isótopo ⁶Li más eficiente y sostenible, donde las microalgas podrían tener un papel protagonista dada su amplia utilidad biotecnológica.

OBJETIVOS

Observar las características físicas y químicas de las aguas residuales de la minería de uranio y su relación con la diversidad de especies fitoplanctónicas, así como evaluar los mecanismos y la capacidad de adaptación de especies mesófilas a estos ambientes antropogénicos extremos.

Evaluar la capacidad de capturar litio y separar sus isótopos (^6Li y ^7Li) por parte de microalgas clorofitas y valorar su posible uso y potencial biotecnológico.

MATERIAL y MÉTODOS

En un primer momento, se analizaron las aguas de charcas originadas por la minería de uranio en la Península Ibérica y una charca prístina control, determinando el pH, la radiactividad y las concentraciones de cinco metales pesados (U, As, Pb, Cu, Zn), así como la toxicidad mediante un test *Microtox*.

Se estudió la adaptación de tres cepas de microalgas originarias de ambientes prístinos, *Dictyopshaerium chlorelloides* (DC1M), y *Chlamydomonas reinhardtii* A y B, a cinco de estas aguas residuales de minería de uranio, mediante el uso de un biorreactor semi-continuo basado en el quemostato diseñado por Novick y Szilard, y el muestreo periódico y exposición al agua tóxica. Así, se puede estudiar la aparición y mantenimiento en las poblaciones de mutaciones que confieran resistencia a las aguas tóxicas del estudio.

Para valorar la capacidad de las clorofitas para capturar y fraccionar isótopos de litio, se utilizaron tres cepas pertenecientes a las especies *Tetraselmis mediterranea*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Desmodesmus* sp. Se realizaron cuatro cultivos con litio por cada cepa, cada uno retirado para su centrifugación y análisis de los *pellets* a un tiempo diferente: tras la inoculación, 3 días después, 12 días después y tras 27 días. Las relaciones isotópicas obtenidas se compararon con un control químico para determinar el nivel de fraccionamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las aguas residuales de minería de uranio del estudio presentaron niveles de biodiversidad bajos, así como niveles de pH en torno a 5 o inferiores, salvo la charca de Castelejo. Las concentraciones de metales analizados variaron según la charca. Todas las aguas estudiadas resultaron más tóxicas que la charca prístina control. Las tres cepas utilizadas en el experimento del biorreactor se aclimataron al medio creado con las aguas de Mortórios y Castelejo, mientras que la adaptación a los medios de Quinta do Bispo y Saelices requirió de mutaciones aparecidas durante el experimento. No se observó adaptación al medio creado con agua de la charca de Villavieja.

El ensayo con el litio mostró la capacidad de capturar litio utilizando las tres especies de microalgas del estudio, con una mayor captura total de litio en los cultivos de 27 días, pero observando también una desorción de litio después del contacto inicial. En cuanto al fraccionamiento, se mostró posible y se alcanzaron algunas cifras de enriquecimiento muy altas, la máxima $\delta^6=85,39$ con *Desmodesmus* sp. Este enriquecimiento es mayor que el obtenido con otros métodos de enriquecimiento de litio propuestos, además de haberse obtenido con cepas que no tuvieron contacto previo con litio y en condiciones no optimizadas. Procesos de mejora genética y la búsqueda de las mejores condiciones ambientales para capturar el litio y fraccionar los isótopos podrían lograr que el proceso fuera aún más eficiente.

CONCLUSIONES

La biodiversidad de microorganismos fotosintéticos es baja en las charcas de aguas residuales de minería de uranio, aunque el experimento en el biorreactor semi-continuo desveló una posible vía de adaptación gracias a mutaciones pre-existentes.

El cultivo de microalgas puede ser un método de captura de litio desde matrices líquidas, pero también serviría para fraccionar isótopos de litio, lo que abriría la puerta a la biotecnología nuclear.



2. SUMMARY

2. SUMMARY

TITLE:

Microalgae and key chemical elements in energetic industry:

I. The case of lithium: capture and fractionation.

II. Diversity and successful adaptation: the case of uranium.

INTRODUCTION

Human activities have created disruptions in terrestrial systems. There is a great loss in biodiversity, water bodies acidification, eutrophication and global warming. The changes are such that the term “Anthropocene” was coined to refer to the current geological time. The future is unclear, but it is predicted that many ecosystems will be affected. Primary producers are the foundation of ecosystems. Within primary producers, microalgae - photosynthesizing microorganisms -, are relevant due to their ubiquity, diversity and ecological importance. Furthermore, with respect to climate change they are a great help since microalgae capture carbon dioxide while growing. Since the Industrial Revolution, humankind has emitted to the atmosphere massive amounts of carbon caused by the fossil fuel combustion to obtain energy, provoking an imbalance that results in global warming. At present, power generation and mobility are directed towards carbon-free sources. However, this means an increase in the utilization of certain chemical elements such as uranium and lithium. These elements have their own environmental concerns. Uranium is needed for nuclear fission energy, an efficient and low-carbon energy source. However, mining and uranium processing create great bodies of toxic acid water, causing extreme environments in the open air. Lithium is a key element in the manufacturing of batteries, but also in the nuclear fusion energy development. Nevertheless, new ways of obtaining and recycling lithium will be needed to respond to the demand with the least possible environmental damage. At the same time, new isotopic enrichment methods are required to make the process of ${}^6\text{Li}$ isotope obtainment more efficient and sustainable, where microalgae might have an important role given their broad biotechnological usefulness.

GOALS

To observe physical and chemical properties of uranium-mining impacted waters and its relationship with phytoplankton species diversity, as well as to evaluate the

mechanisms and adaptability of mesophile species to these anthropogenic extreme environments.

Evaluate the ability to capture lithium and to separate lithium isotopes (^6Li and ^7Li) by chlorophyte microalgae and assess their possible use and biotechnological potential.

MATERIALS AND METHODS

First of all, uranium-mining impacted waters from ponds located in the Iberian Peninsula and a pristine pond which served as control were analysed, determining the pH, radioactivity and five heavy metal concentrations (U, As, Pb, Cu, Zn), as well as toxicity by a *Microtox* test.

Adaptation to these five water bodies using three microalgae strains originating from pristine environments, *Dictyopshaerium chlorelloides* (DC1M), and *Chlamydomonas reinhardtii* A and B, was studied through the utilisation of a semi-continuous bioreactor based on the chemostat designed by Novick and Szilard and periodical sampling and exposure to the toxic waters. This way, we can study the emergence and maintenance in the populations of mutations that confer resistance to the toxic waters of this study.

To assess the ability of chlorophytes to capture and fractionate lithium isotopes, three strains belonging to the species *Tetraselmis mediterranea*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Desmodesmus* sp. were used. Four cultures with lithium for each strain were created, each one removed from the experiment just after culture inoculation, and after 3, 12 and 27 days, in order to centrifuge and analyse the pellet. Obtained isotopic relations were compared with a chemical control to determine the enrichment.

RESULTS AND DISCUSSION

Uranium-mining impacted waters present in this study showed low biodiversity levels, as well as pH levels around or below 5, except for the Castelejo pond. Metal concentrations were different for each pond. Every water body analysed resulted more toxic than the pristine control pond. The three strains used in the bioreactor experiment showed acclimation to the media prepared with water from Mortórios and Castelejo, while adaptation towards Quinta do Bispo and Saelices media required mutations that occurred during the experiment. No adaptation was observed for the media created with water from Villavieja.

The lithium assay showed that the three species used in our study were able to capture lithium, with the greatest total capture of lithium in the cultures on day 27, but also showing lithium-desorption after the initial contact. Fractionation was also possible and big levels of enrichment were reached, the greatest being $\delta^6=85.39$ with *Desmodesmus* sp. This enrichment is greater than the obtained with other proposed

lithium-enrichment methods. Furthermore, it was achieved with strains that had no previous contact with lithium and under non-optimal conditions. Processes such as genetic improvement and research on the best environmental conditions to capture and fractionate lithium isotopes could lead to an even more efficient process.

CONCLUSIONS

Biodiversity of photosynthetic microorganisms is low in uranium-mining impacted water bodies, although the experiment with the semi-continuous bioreactor unveiled a possible way of adaptation thanks to pre-existent mutations.

Microalgae culture can be a method to capture lithium from a liquid matrix, but it could also serve to fractionate lithium isotopes, which could be the beginning for a nuclear biotechnology.



3. INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Eras geológicas de la Tierra

La Tierra se estima que tiene una edad en torno a 4.600 millones de años. Para estudiar los diferentes eventos que han tenido lugar desde entonces, se realiza una división en eones, cuya separación vendría determinada por eventos naturales de relevancia geológica o biológica. Estos eones son, en orden del más remoto al más actual, el Hádico, el Arcaico, el Proterozoico y el Fanerozoico. En este último es donde se ha desarrollado la mayoría de la vida animal, y su inicio viene determinado *grosso modo* por la aparición de pequeños fósiles con concha. A su vez, los eones se subdividirían en eras. Las eras establecidas que dividen el eón Fanerozoico son el Paleozoico, Mesozoico y el Cenozoico. Sin embargo, dentro de esta última y actual era del Cenozoico, hay quienes sugieren que debería crearse una nueva división geológica llamada Antropoceno, caracterizada porque el evento inicial no es natural sino antrópico tales son los cambios provocados por los humanos [1].

El ser humano modifica el entorno para adecuarlo a sus necesidades, creando cambios que afectan al resto de agentes biológicos. La agricultura, ganadería, la quema de bosques, la industrialización, la urbanización o la construcción de presas, entre otros, son grandes motores de estos cambios [2]–[7]. En los últimos decenios, además, se han incluido nuevos cambios que agravan la situación como el uso de fertilizantes [8]. Aunque el principal motor del cambio es el aumento en la extensión de ciudades, zonas industriales, campos de cultivo y exigencias energéticas que han aumentado esta modificación del terreno. Además de cambios locales, el calentamiento global antropogénico está llevando a consecuencias globales, con un impacto en los ecosistemas de todo el planeta. Como ejemplo, se calcula que ya hay en la Tierra mayor masa de estructuras creadas por humanos que toda la masa biológica junta existente [9].

3.1.1 Características del cambio global

Hay cinco cambios identificados como los más relevantes, a saber:

- **Incremento de temperatura**

La temperatura global está aumentando debido a las emisiones de gases de efecto invernadero. La temperatura media global en 2020 fue 1,2°C mayor a niveles pre-industriales [10], y se espera que siga aumentando durante décadas.

Este aumento de la temperatura media global lleva aparejados una serie de efectos en la física terrestre, destacando el aumento de los fenómenos climáticos extremos tales

como tormentas torrenciales, olas de calor o sequías [11]. También aumentará el nivel del mar a causa del derretimiento de hielo polar y glacial y la expansión térmica del agua [12]. De momento, los océanos han absorbido el 90% del exceso de calor producido por el calentamiento global antropogénico [13], [14]. El aumento de la temperatura marina crea una mayor estratificación de las aguas y reducción en el oxígeno disuelto, además de favorecer eventos climáticos extremos como tormentas y ciclones [15].

- **Acidificación de los océanos**

Los océanos actúan como sumidero del CO₂ atmosférico a través de una reacción de equilibrio con HCO⁻³. Desde un punto de vista del calentamiento global, este efecto resulta beneficioso al absorber grandes cantidades de CO₂ atmosférico, el gas de efecto invernadero con más relevancia en la actualidad, lo que contribuye al control de la temperatura. Sin embargo, origina un aumento en la concentración de H⁺ en los océanos que provoca cambios físico-químicos, influyendo también en la biología de los organismos marinos [15]. Cabe destacar también que el aumento de la temperatura oceánica disminuye la capacidad de absorción de CO₂ [16].

- **Eutrofización de aguas dulces**

Como eutrofización se conoce al exceso de producción primaria causado por un incremento de nutrientes en el agua, principalmente nitrógeno y fósforo [17]. La biomasa originada eventualmente muere, aprovechando la materia orgánica organismos que la degradan y, a su vez, consumen el oxígeno disuelto en el agua. La eutrofización acarrea situaciones como pérdida de biodiversidad, muerte de peces o floraciones de cianobacterias tóxicas [18]–[20]. Además, como revisado por Li y col. [21], las masas de agua dulce eutrofizadas son una fuente de gases de efecto invernadero.

Aunque es un proceso que podría darse de forma natural, la actividad humana ha exacerbado este fenómeno, e.g [22], [23]. Las causas principales son la escorrentía de residuos de la industria agropecuaria [24] y de la vida humana en las grandes áreas urbanizadas [25].

- **Destrucción de hábitats**

El ser humano actual tiene un tamaño de población muy grande, requiriendo de amplias extensiones de terreno para poder llevar a cabo su modo de vida. Estas actividades humanas incrementan la presión sobre otros hábitats, causando su destrucción. En la actualidad, más del 38% de la tierra emergida libre de hielo en nuestro planeta se utiliza como pastos o cultivos agrícolas. Se trata de la actividad humana que más superficie ocupa. En los últimos años su extensión está aumentando en zonas tropicales, donde se encuentra la mayor diversidad de especies [26]. La

destrucción de hábitats también ocurre por otras actividades humanas como la minería, la extracción de hidrocarburos [27], extensión de áreas urbanas, contaminación o incendios forestales, entre otros; o por efecto humano indirecto, como el blanqueamiento de los corales o derretimiento de áreas polares por el calentamiento global. Las especies presentes en hábitats destruidos se enfrentan a la extinción o a migraciones forzadas.

- **Pérdida de diversidad**

Un concepto estrechamente ligado al término Antropoceno es el de “Sexta Gran Extinción”, también conocida como “Extinción masiva del Holoceno”. Según Ceballos y col. [28], en la actualidad, la tasa de extinción de vertebrados es más de 100 veces mayor que las tasas precedentes. Entre las causas humanas de la pérdida de biodiversidad se encuentran la pérdida y/o fragmentación de hábitats [29], [30], sobreexplotación [29], contaminación [31], introducción de especies foráneas [32]–[34], cambio climático [35] y extinciones secundarias (revisado en Brodie y col. [36]), entre otros.

La ocupación de grandes zonas y su transformación en zonas agrícolas o ganaderas determina la sustitución de la diversidad de los ecosistemas por la implantación de grandes áreas de monocultivos para la producción intensiva de alimentos. En estas zonas, además de técnicas como la labranza destinadas a eliminar especies no productivas, se suelen utilizar pesticidas que reducen aún más la diversidad de especies.

La pérdida de biodiversidad es uno de los mayores riesgos a los que se enfrenta la Humanidad. Los ecosistemas necesitan de un número mínimo de agentes para poder mantenerse en equilibrio y tener mayor resistencia y resiliencia ante injerencias externas. Como comentó Miguel Delibes de Castro, “las flores no podrían ser flores si no hubiera insectos que las polinizaran, y son así porque atraen a los polinizadores. A su vez, los insectos pueden vivir porque las flores les dan de comer, y así indefinidamente” [37]. La vida es interdependiente y la desaparición de uno o varios de sus agentes puede causar cambios en el resto del ecosistema, la mayoría de las veces de forma impredecible dado el escaso conocimiento actual en comparación con la vastedad de especies vivas.

3.2 Biosfera

El concepto de biosfera hace referencia a toda la parte de corteza y atmósfera terrestre donde se desarrolla la vida.

3.2.1 Producción primaria

El funcionamiento de la biosfera comienza con los productores primarios. Prácticamente toda la energía que llega a todos los estratos vivos procede en su inicio de la energía solar captada por los organismos fotosintéticos gracias a moléculas como la clorofila, con excepciones como los organismos quimiótrofos. El resto de seres vivos dependen de las moléculas orgánicas creadas por los productores primarios, por lo tanto los productores primarios también representan el eslabón inicial en la cadena trófica.

Los organismos fotosintéticos convierten la energía presente en los fotones en energía almacenada en moléculas de ATP y NADPH⁺. A su vez, los organismos fotosintéticos crean moléculas orgánicas a través del ciclo de Calvin, formando glucosa partiendo de carbono inorgánico (CO₂ presente en la atmósfera o disuelto en agua), agua y la energía contenida en las moléculas de ATP y NADPH⁺. En los ecosistemas terrestres, las plantas son el principal productor primario. Pero en ecosistemas acuáticos, que representan el 70% de la superficie de la Tierra, esa posición de productor primario corresponde fundamentalmente a microalgas.

3.2.1.1 Microalgas, características y evolución

Las microalgas no han sido objeto de estudio en microbiología al nivel de bacterias y levaduras, pero en las últimas décadas están teniendo un interés creciente. El interés está impulsado en gran parte por su utilidad en biotecnología, pero también hay investigaciones respaldadas por la importancia ecológica de las microalgas y el cambio global actual.

- **Definición de microalga**

El término microalga hace referencia a un grupo muy amplio y heterogéneo en el cual pueden enmarcarse todos los organismos unicelulares fotosintéticos [38]. Bajo esta definición entran seres filogenéticamente tan dispares que están representados dos de los tres dominios existentes: Bacteria y Eucarya, solo faltando en el dominio Archaea.

El origen de lo que llamamos coloquialmente microalgas es muy antiguo, remontándose a hace 2.800 millones de años, en el eón Arcaico, aproximadamente 1.000 millones de años después de la división entre Bacteria y Archaea [39]. Serían las cianobacterias, los primeros organismos con fotosíntesis oxigénica conocidos y agrupados en el dominio Bacteria. Esto dio lugar al evento conocido como “la Gran Oxidación”. La fotosíntesis iniciada por las cianobacterias cambió la atmósfera terrestre. La aparición de la fotosíntesis liberó oxígeno a la atmósfera, que pasó de ser reductora a oxidante. La atmósfera oxidante era perjudicial para la gran mayoría de organismos, provocando una gran extinción a partir de la cual ganaron en presencia los organismos capaces de hacer la respiración, la oxidación de moléculas orgánicas para

producir energía. Esto demuestra la gran importancia de los organismos fotosintetizadores en la historia de la vida en la Tierra.

- **Características y evolución de las microalgas**
 - **Importancia ecológica**

En la actualidad, las microalgas continúan teniendo gran importancia ecológica. Representan una parte importante de la producción primaria global [40]. La producción primaria neta (= el CO₂ fijado por los fotosintetizadores menos el liberado por su propia respiración) se estima en 65 Pg de carbono al año en los ecosistemas oceánicos y en 60 Pg de carbono al año para los terrestres [41]. En los ecosistemas terrestres, las plantas son el principal fijador de carbono, mayoritariamente en zonas tropicales, mientras que el fitoplancton es el responsable de más del 90% de la producción primaria en los océanos [42]. Además, la producción primaria neta global de los lagos se situaría en 1 Pg de carbono al año [43]. Solo las diatomeas (clase Bacillariophyceae) fijan alrededor del 20% del carbono terrestre anual [44]. En un entorno global, más del 75% de la producción planetaria de oxígeno es debido a las microalgas al tener una eficiencia foto-química entre 7 y 31 veces mayor que las plantas terrestres [45].

- **Diversidad**

Dada su característica de grupo polifilético y de origen antiguo, existe una amplia diversidad de especies microalgales. En AlgaeBase, la mayor base de datos sobre filogenia de algas, hay registradas 4.928 y 47.796 especies de cianobacterias y de algas eucariotas, respectivamente. Sin embargo es muy probable que este número subestime la diversidad real de microalgas en nuestro planeta, ya que algunos autores calculan que puede haber hasta un millón de especies de algas [46], de las cuales alrededor de 200.000 especies únicamente de diatomeas [38].

La diversidad de las microalgas está en parte basada en las endosimbiosis que teóricamente ocurrieron en especies ancestrales. McFadden revisó las pruebas en favor de la teoría endosimbiótica de los plástidos, mostrando que ocurrieron múltiples endosimbiosis y que también ocurrieron endosimbiosis secundarias, por lo que los organismos fotosintéticos actuales son un grupo polifilético [47]. Más allá de la endosimbiosis primaria (donde la célula “atrapada” es una cianobacteria), se han documentado una gran cantidad de casos de endosimbiosis secundarias (aquí la célula capturada sería un protista fotosintético); e incluso, endosimbiosis terciaria [48]. De esta forma, existen taxones eucariotas eminentemente fotosintéticos como Archaeplastida, donde se engloban las algas verdes (Chlorophyta), algas rojas (Rhodophyta), glaucofitas y plantas terrestres [49], [50]; pero también la aparición de taxones fotosintéticos muy inferiores, hasta nivel de género, con capacidad fotosintética pero con ascendencia heterótrofa, como los Euglenoides o los

Dinoflagelados. Dentro de los Dinoflagelados, por ejemplo, tan solo la mitad son fotosintéticos y entre éstos se ven diferencias en los cloroplastos, lo que parece indicar que hubo varios procesos de endosimbiosis de manera independiente incluso dentro del grupo [48]. Existen asociaciones mutualistas con microalgas que apoyan la teoría endosimbiótica [51].

La gran diversidad de especies y la antigüedad del grupo hacen que dentro de las microalgas se incluyan microorganismos con todo tipo de estrategias. Por ejemplo, *Chalmydomonas reinhardtii* es un organismo autótrofo fotosintético, pero en presencia de acetato puede sobrevivir sin realizar la fotosíntesis [52]. Algunas especies son productoras de toxinas. Al ser microorganismos, también suelen presentar tiempos de generación cortos y poblaciones de muchos individuos. Ambas características ligadas pueden producir altas concentraciones de toxinas en masas de agua en tiempos relativamente cortos. Esto repercute en los ecosistemas y en el modo de vida humano.

- **Ubicuidad**

La ubicuidad también es una característica de las microalgas. Las microalgas no están restringidas a ningún ambiente o zona geográfica específica, sino que pueden encontrarse en una gran variedad de espacios incluidos ambientes considerados extremos, como el suelo de desiertos cálidos [53] y páramos antárticos [54]. Las microalgas son los principales productores primarios en todos los ecosistemas acuáticos del planeta, desde charcas en latitudes tropicales al Océano Ártico.

• **Cambio global y microalgas**

Las consecuencias que los cambios globales antropogénicos provocarían en las microalgas son cruciales para la vida planetaria. El calentamiento global tendrá consecuencias en el fitoplancton marino [55], [56], algunas ya detectables como un descenso global en la concentración de diatomeas entre los años 1998 y 2012 [57]. Pueden generar cambios en la estratificación del agua que afecten a las microalgas al limitar el transporte de nutrientes [58]. Además, temperaturas más altas incrementan las floraciones de cianobacterias, principalmente tóxicas [59]. El aumento del CO₂ atmosférico también está causando la acidificación de las aguas [60], [61]. La viabilidad de numerosas especies de microalgas calcificadoras, como *Emiliania huxleyi*, está comprometida ya que al aumentar la concentración de protones aumenta la cantidad de CO₂ disuelto y disminuye la concentración del ion carbonato [CO₃²⁻], dificultando la creación de carbonato cálcico [CaCO₃] por parte de estos organismos [60], [62] y provocando cambios morfológicos en los cocolitos y disminución de la masa celular [63]. El aumento de la concentración de CO₂, al afectar a los productores primarios, también comporta cambios en la estructura de los ecosistemas [64].

El estudio de la adaptación de las microalgas a las nuevas condiciones es necesario para realizar buenas predicciones. *Hydrolithon reinboldii*, una especie simbiótica coralina muy susceptible a los cambios y cuyo pH óptimo es 8,0, logra tolerar un pH de 7,7 en tan solo seis generaciones [65]. Algunas especies de microalgas aumentaron su tasa de crecimiento en ambientes con mayores concentraciones de CO₂ a través de cambios fisiológicos [66]–[68]. En otros experimentos más dilatados en el tiempo, se dieron respuestas que cambiaron la composición genética de la población [69], [70]. Por ejemplo, el aumento del carbono inorgánico en el ambiente favorece la selección de determinados genotipos en floraciones de *Microcystis sp.*, actuando en favor del gen *bicA* que participa en la captura de bicarbonato del medio con poca afinidad pero alta actividad [71]. Baselga-Cervera y col. determinaron, con especies microalgales pertenecientes a cinco clases diferentes, la capacidad de adaptarse fisiológicamente a temperaturas más altas, pero también mediante mutaciones únicas a temperaturas previamente letales [72]. Incluso se han teorizado [73] y estudiado experimentalmente [70] poblaciones en las que hay una respuesta adaptativa fisiológica que aumenta la tasa de crecimiento para posteriormente aparecer cambios genéticos que, a largo plazo, den lugar a poblaciones con menor tasa de crecimiento pero mejor adaptadas al poseer mayor tolerancia y capacidad de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este último estudio observaron dos estrategias que aumentaban la tasa de crecimiento de la población en la respuesta fisiológica en el mismo ambiente con mayores niveles de CO₂ y luz: (1) las células engendraban más células hijas en detrimento de la velocidad de reproducción y (2) aumentaban la velocidad de división pero disminuyendo el número de descendientes por ciclo de división; siendo la respuesta utilizada dependiente del genotipo original. Estas dos estrategias pueden existir dado que *Chlamydomonas reinhardtii* puede tener divisiones binarias sucesivas dentro del mismo ciclo de división. Sin embargo, cuando las poblaciones son expuestas a ese medio durante 900 generaciones, la tasa de crecimiento disminuye en favor de una mayor calidad de las células hijas, ya que la población en el curso de la evolución poseía una mayor tolerancia y capacidad de detoxificación de ROS. Este último estudio ejemplifica lo compleja que puede ser la evolución de los microorganismos y lo precipitado de algunas conclusiones, como simplemente determinar que el mayor aporte de carbono en las aguas aumentará la tasa de crecimiento de algunas especies.

A esto hay que sumar la interacción entre especies que se da en los ambientes salvajes, un factor potencialmente influyente en la adaptación de las microalgas al cambio climático [74]. Otros cambios característicos del Antropoceno también han sido abordados en estudios de adaptación y ecología de microalgas, como la eutrofización. Este proceso antrópico genera una pérdida de diversidad de fitoplancton [75] y puede favorecer la floración de especies tóxicas [25], [76].

Un cambio antropogénico ampliamente difundido también es la contaminación de aguas, que en algunos casos pueden ocasionar ambientes antrópicos extremos.

Condiciones abióticas como alta concentración de metales pesados u otros elementos tóxicos, hidrocarburos, pH muy ácidos o básicos o radiación, son algunas de las más comunes en este tipo de ambientes geológicamente nuevos.

Se ha estudiado la adaptación de microalgas clorofitas (clase Chlorophyceae) a la contaminación con moléculas orgánicas como fármacos, pesticidas o hidrocarburos, mostrándose que las poblaciones pueden adaptarse rápidamente a concentraciones tóxicas gracias a mutaciones espontáneas [77]–[80].

La adaptación a contaminantes humanos no orgánicos también se ha estudiado con microalgas clorofitas. Destacan los ensayos de adaptación a concentraciones tóxicas de metales como uranio [81], samario [82], berilio [83] u osmio [84], confirmándose en todos los casos que las clorofitas utilizadas podían adaptarse a concentraciones de metal tóxicas para las cepas iniciales.

En definitiva, los cambios globales afectarán a las especies provocando que muchas de ellas deban adaptarse a las nuevas condiciones para sobrevivir. Además, supondrán una reestructuración de las poblaciones de productores primarios con posibles consecuencias en la cadena trófica, pero hay aún poco conocimiento y éste está limitado a unas pocas especies. El efecto del cambio global en las microalgas debe ser una prioridad en la investigación mundial [85].

3.2.2 Ciclos biogeoquímicos

Existen más factores a parte de la producción primaria que colaboran con el funcionamiento de la biosfera. Como describieron Lovelock y Margulis [86], la Tierra es una máquina en equilibrio donde hay múltiples ciclos y donde los seres vivos tienen un papel fundamental para su mantenimiento. Estos ciclos biogeoquímicos en la biosfera provocan el mantenimiento de unas condiciones físico-químicas ideales para la vida terrestre. Los organismos participan en los ciclos biogeoquímicos de moléculas y elementos, tales como el agua, el nitrógeno, el carbono o el fósforo, entre otros. Estas moléculas y elementos que entran en ciclos biogeoquímicos son esenciales para la vida. Los cambios producidos en el Antropoceno influyen directamente en la dinámica de la biosfera.

3.2.2.1 Ciclo de carbono y calentamiento global

En la actualidad, una de las características que describirían al Antropoceno y el causante principal del calentamiento global y la acidificación de los océanos es el desequilibrio en el ciclo del carbono.

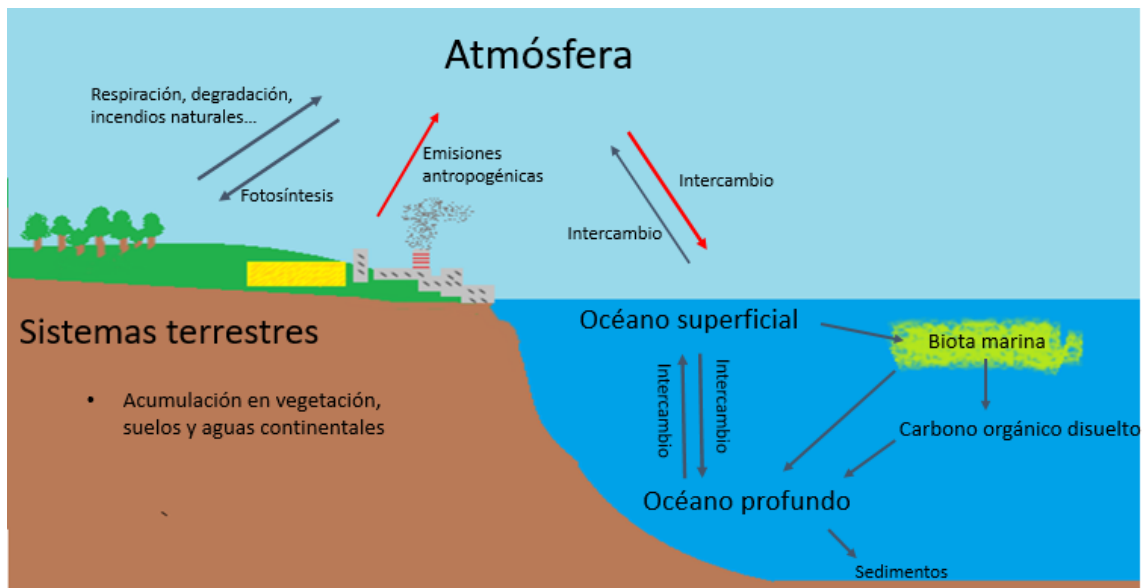


Figura 1. Diagrama del ciclo del carbono, con los principales movimientos y lugares de almacenaje. Las flechas en rojo señalan los cambios mayoritarios introducidos por la actividad humana, a saber: mayor emisión de CO_2 y metano a la atmósfera, lo que provoca un desequilibrio entre las concentraciones atmosféricas y oceánicas de CO_2 que conlleva una acumulación mayoritaria en los océanos. Imagen propia.

Se trata de un cambio sutil, pero suficiente como para desencadenar cambios en los procesos climáticos terrestres.

El CO_2 y otros gases de efecto invernadero como el metano (CH_4) o el óxido nitroso (N_2O) ocurren de forma natural. Actúan absorbiendo la radiación infrarroja procedente de la superficie terrestre y reemitiéndola, obstaculizando la emisión de energía desde la Tierra al espacio. Estos gases son necesarios para el mantenimiento de la temperatura media terrestre alrededor de 15°C [87]. No obstante, las emisiones descontroladas de gases de efecto invernadero por parte de los humanos están originando un calentamiento global, acarreando una disrupción en los patrones climáticos con efectos inciertos.

Las emisiones comenzaron a incrementarse exponencialmente durante la Revolución Industrial, pero en el presente continúan aumentando cada año las toneladas de CO_2 liberadas a la atmósfera (Revisado por Ritchie y Roser [88]). En la actualidad, la atmósfera cuenta con una concentración de CO_2 cercana a las 420 ppm, mientras que en 1750 se estimaba en 280 ppm [89].

3.2.3 Aumento de población humana y demanda de energía

Gran parte de los cambios antropogénicos están originados por la demanda de energía, pero el calentamiento global es el más directo. Al crecimiento demográfico de la Humanidad se une el cada vez mayor consumo energético per cápita.

La quema de combustibles fósiles ha sido y es la fuente principal de energía en el mundo. Mediante esta fuente de energía, el carbono almacenado durante eones bajo la superficie de la Tierra vuelve a liberarse a la atmósfera, ocasionando el cambio climático global. Se trata de una disrupción en el equilibrio de la biosfera que tiene consecuencias planetarias.

La utilización de hidrocarburos también origina un daño ambiental que pone en riesgo la biodiversidad. Como revisado por Harfoot y col. [27], la búsqueda, evaluación y extracción de hidrocarburos fracciona y contamina hábitats, muchos en zonas naturales protegidas. El ruido generado también provoca cambios en el comportamiento de especies animales.

Aunque en los últimos años se haya avanzado significativamente hacia una producción energética más sostenible, lo cierto es que se sigue requiriendo un avance en la tecnología para continuar minimizando el impacto ambiental.

En la agenda futura de muchos de los países del mundo está la descarbonización para las próximas décadas. La obtención de energía térmica desde el petróleo, carbón y gas natural desaparecerá, pero para ello tendrán que sustituirse por energías que no emitan CO₂ como la mayoría de renovables (excepto biomasa) o la nuclear.

Todas las fuentes de energía tienen un impacto ambiental mayor o menor. De base, todas cuentan con puntos como el uso de suelo, la obtención de los materiales para su funcionamiento o el transporte y energía requerida para la construcción y mantenimiento de la infraestructura.

Las presas para energía hidroeléctrica crean una grave disrupción del flujo natural del agua, por lo que el impacto ambiental debe ser bien controlado antes de realizar cualquier infraestructura [90]. La construcción de presas afecta a la biodiversidad, incluyendo especies de interés para la pesca de algunas comunidades [91]. Los embalses, a su vez, suponen una fuente de gases de efecto invernadero producto de la descomposición de materia orgánica en el fondo [92]–[94].

Otras energías renovables, aunque son la apuesta mayoritaria por hacer de la energía una industria más sostenible, también tienen efectos dañinos sobre los ecosistemas [95]. Poseen una densidad energética menor que otras fuentes de energía, por lo que requieren de una superficie mayor [96]. También necesitan materiales extraídos por minería, por lo que tienen un impacto en la biodiversidad a este respecto [97]. La generación eólica de energía pone en peligro la fauna local, mermando especialmente las poblaciones de aves y quirópteros [98]. Las energías solares (termosolar y fotovoltaica) tienen como principal inconveniente el uso de grandes extensiones de terreno, a la vez que incrementan el riesgo de incendios y usan agua para la limpieza de las pantallas, pudiendo comprometer la salud de acuíferos [99]–[101].

La otra gran energía que, si bien no emite prácticamente gases de efecto invernadero, no se clasifica como renovable debido a la finitud del material que la alimenta es la energía nuclear. Está considerada como una de las fuentes de energía más sostenibles [102]. En la actualidad, además, existen modelos teóricos que probarían la práctica infinitud del combustible en la Tierra basados en los reactores reproductores (del inglés *Breeder reactors*) y la extracción de uranio de los océanos, convirtiéndola en una energía teóricamente renovable.

En la energía nuclear son dos los problemas principales en relación con su sostenibilidad, ambos ligados al combustible nuclear: la obtención y la disposición del combustible utilizado. La disposición de los residuos nucleares suele llevarse a cabo con grandes medidas de bioseguridad, enterrándolos a grandes profundidades donde no representen ningún peligro. Pero el combustible se obtiene por minería, la cual tiene un impacto ambiental local grande, creando ambientes extremos.

El número de centrales nucleares en el mundo está aumentando significativamente y para 2050 es posible que la potencia global obtenida de la energía nuclear llegue incluso a doblarse [103]. La importancia de esta fuente de energía como un pilar en el paso a energías sin emisiones de carbono se evidencia con ejemplos como la construcción de reactores nucleares en un país como Emiratos Árabes Unidos, un territorio rico en hidrocarburos y radiación solar, pero que apuesta también por esta fuente de energía. En la actualidad, un total de 19 países de todo el mundo están construyendo centrales nucleares de fusión [104].

3.2.3.1 Elementos químicos clave

Estos cambios en las fuentes de energía harán que varios elementos químicos adquieran importancia para el ser humano.

- **Uranio y energía nuclear de fisión**

El avance de la energía nuclear en todo el mundo aumentará la demanda de combustible nuclear. El uranio es el elemento principal implicado en ello. Durante el mes de septiembre de 2021, el uranio alcanzó su precio máximo en los últimos 9 años, y se espera que la tendencia sea ascendente [105]. La energía nuclear de fisión basa su funcionamiento en las propiedades fisibles de ciertos isótopos, isótopos capaces de desencadenar una reacción de fisión en cadena al reaccionar con un neutrón. En los reactores nucleares comerciales el proceso comienza cuando un isótopo fisible, ^{235}U o ^{239}Pu , captura un neutrón, haciendo ^{236}U o ^{240}Pu . Estos isótopos son inestables y acaban rompiéndose en dos átomos diferentes en un proceso de fisión nuclear que libera gran cantidad de energía y que es aprovechada por la industria civil – aunque también es la base para el funcionamiento de las armas nucleares. No se puede conocer con certeza en qué dos átomos se dividirán, pero ocurre una distribución del

peso atómico bimodal entre los productos de fisión, con un átomo cercano a una masa atómica de 95 y otro a 135, siendo comunes el Zr, Tc, Sr, I, Xe o Cs. A su vez, libera neutrones que llegarán a nuevos núcleos fisibles de U o Pu, volviendo a iniciar una reacción de fisión [106]. Se produce así la reacción de fisión en cadena, consiguiendo energía sin producción de gases de efecto invernadero.

Las desventajas ecológicas y sanitarias aparecen asociadas al combustible nuclear, tanto en su fase de obtención como en la de disposición de los residuos. Tal vez esta última sea el problema más conocido asociado a la energía nuclear [107], con la opinión pública en contra de situar espacios de almacenamiento de residuos nucleares cerca de sus comunidades [108]. Sin embargo, antes de su uso, el combustible nuclear debe ser obtenido siguiendo una serie de pasos que tienen una huella ecológica y acumulan residuos: (1) extracción del uranio natural mediante minería, (2) tratamiento del mineral de uranio y (3) enriquecimiento del uranio a niveles requeridos.

En las centrales nucleares de fisión comerciales el combustible es el uranio enriquecido en ^{235}U o el ^{239}Pu . Estos dos isótopos son fisibles y son de obtención relativamente sencilla. Ambos isótopos, ^{235}U y ^{239}Pu , se obtienen del uranio natural. El uranio encontrado en la naturaleza está principalmente compuesto por el isótopo ^{238}U , no fisible. El ^{235}U se encuentra en un porcentaje del 0,711% por masa, por lo que se requieren volúmenes grandes de uranio natural para alcanzar masas significativas de uranio enriquecido en este isótopo - concentraciones de aproximadamente 3,5-5% ^{235}U [109]. El ^{239}Pu no está presente en la naturaleza, pero se obtiene a partir de la transmutación de isótopos de ^{238}U .

El uranio natural, por lo tanto, es la fuente última de los combustibles nucleares. Se obtiene mediante minerías del mineral de uranio que dejan un residuo ácido, como gran parte de las minerías de metales. El uranio suele tener concentraciones bajas que hacen de muchos depósitos no viables para su extracción, e.g. un depósito con una concentración del 0,4% de U se considera que es de grado medio [110]. Existen tres tipos de minería de uranio en función de las características de la veta: a cielo abierto, minería profunda o lixiviación *in situ*. Cuando las vetas tienen un porcentaje relativamente alto de uranio, se prefiere realizar una minería estándar, extrayendo la roca directamente. La forma más común en la que se presenta el uranio en la uraninita, el mineral principal, es el dióxido de uranio (UO_2) [111]. Tras la obtención de la roca de las vetas, hay que molerlas y lixiviarlas para obtener el uranio más concentrado, el llamado *yellowcake*, una mezcla de óxidos de uranio, con uranio principalmente en forma U_3O_8 (sesquióxido de uranio). En las ocasiones donde no sea rentable excavar minas al uso como en vetas con una baja concentración, se lleva a cabo la lixiviación *in situ*, inyectando agua ácida al interior de la roca para después ser bombeada al exterior obteniendo el uranio disuelto en agua. Un 7% del U producido a nivel global es un subproducto de otras minerías como cobre o fosfato [112]. El último paso en la creación del combustible nuclear consiste en la formación de hexafluoruro de uranio (UF_6) para ser enriquecido en ^{235}U utilizando centrífugas o difusión de gases [113], [114].

La producción de *yellowcake* en todo el mundo fue de 64.566 toneladas en el año 2019 [112] y se estima que para obtener 1 kg de *yellowcake* se necesitan 907 kg de mineral [115], siendo el resto residuos de los que deben disponerse, a lo que hay que sumar el volumen de líquido utilizado. El método más utilizado para manejar estos residuos es el almacenamiento en charcas especialmente diseñadas para ello y que deben reunir una serie de características destinadas a minimizar el daño medioambiental [116].

Las charcas de nueva creación son un ambiente antropogénico extremo. Las características físicas y químicas de las aguas residuales de la minería de uranio son variadas en función del origen geológico y el procesamiento, pero suelen tener: (1) pH muy bajo, < 4,5, (2) concentraciones altas de metales pesados, con más de 1000 µg/g de Pb, V, o As en algunos casos, y (3) presencia de isótopos emisores de radiación como el ^{226}Rd , ^{222}Ra y ^{230}Th , por lo que se considera un ambiente poliextremo [109], [117].

Al crear charcas o embalses los riesgos y el daño medioambiental son menores que si las aguas se descargarán directamente en sistemas fluviales, pero no limita completamente el perjuicio que crea en las inmediaciones. Existen una serie de peligros que causarían el fallo agudo en la contención del agua como terremotos, erosión, debilidad de las laderas o rebosamiento por lluvias torrenciales, con consecuencias dañinas para el medio ambiente, salud humana y economía durante décadas [116]. Además, existen otros problemas crónicos como la emanación de gas radón [117], la dispersión del polvo con el viento o por filtración a aguas subterráneas, entre otros [109], [118]. Como ejemplo de esto último, en sedimentos de arroyos cerca de minas de uranio en Portugal se han encontrado los isótopos ^{238}U y ^{230}Th [119]. También se ha encontrado una correlación positiva entre la contaminación del suelo por U, Hg, As y Cd y la distancia existente a un embalse con aguas residuales de la minería de uranio [120]. Por ello es un ambiente que debe ser restaurado para devolverlo a un estado lo más inocuo posible.

- **Litio**

Otro elemento de gran importancia en el panorama energético presente y futuro es el litio. Para cumplir el objetivo global de descarbonización será necesario un cambio estructural en la forma de obtener energía y en el transporte, dos de los principales causantes de las emisiones de CO_2 [88]. No obstante, para lograr una mayor descarbonización se requerirá de tecnología nueva y más avanzada; así como de materiales que, para obtenerlos, se puede incurrir en un perjuicio medioambiental [97]. El elemento químico con más presencia en este escenario es el litio. El principal uso del litio en la actualidad está en la creación de baterías, estimándose que el 71% de la producción mundial se destina a este fin, seguido de su uso en cerámica (14%) [121].

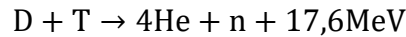
En el año 2020, Australia fue el mayor productor mundial de Li, con 40.000 toneladas, seguido de Chile (18.000 toneladas) y China (14.000 toneladas) [122]. A pesar de que la producción lleva desde 2018 reduciéndose, se espera que aumente significativamente en los próximos años, con proyectos para su minería en muchos más países, incluido España [122], y con una demanda estimada para 2030 de 2,2 millones de toneladas [123]. A pesar de la necesidad de este elemento para realizar la transición hacia un modelo industrial y de movilidad más sostenible, la minería de litio pone en riesgo los ecosistemas donde se realiza impulsando la pérdida de vegetación, el aumento de la temperatura superficial diurna local, o la pérdida de humedad del suelo, entre otros [124]. Acorde con esto, existen estudios encaminados al reciclaje del litio de baterías desechadas y otros residuos con varios fines: disminuir la necesidad de minería, remediar lugares contaminados con las baterías, y obtener beneficio económico a partir de residuos [125]–[127].

Algunos autores también proponen la obtención del litio desde el agua. En los mares y océanos el litio se encuentra disuelto con una concentración de entre 0,1 y 0,2 mg/L. Es una concentración relativamente pequeña para obtenerse de manera eficiente con las técnicas actuales, además de haber otros iones que dificultarían la extracción específica de litio, pero de desarrollarse métodos de captura eficaces desde esta fuente las reservas mundiales utilizables de litio se incrementarían muy notablemente. Z. Li y col. [128] han desarrollado un método para concentrar el litio marino de 0,21 mg/L a más de 9.000 mg/L, con una técnica que, concluyen, podría ser económicamente viable. En la actualidad, se estima que hay 86 millones de toneladas de litio en la corteza terrestre, de los cuales 21 millones de toneladas se consideran reservas [122]. Pero la masa de litio total presente disuelta en los mares es de 231.000 millones de toneladas [129], más de 2500 veces lo estimado en la corteza. Cabe señalar que una extracción industrial masiva de litio desde fuentes marinas podría tener otros impactos medioambientales aún no abordados.

El litio también será necesario en la energía nuclear de fusión. Ésta es una forma de obtención de energía aún en desarrollo, pero con un futuro prometedor. A diferencia de la energía nuclear de fisión, donde isótopos fisibles son divididos para obtener la energía que liberan, en la energía de fusión ocurre lo contrario: isótopos de bajo peso atómico en estado de plasma son unidos, liberando energía de esta manera. Es un proceso similar al que ocurre en las estrellas.

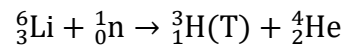
La investigación actual está enfocada en la fusión de dos isótopos pesados del hidrógeno, el deuterio (D) y el tritio (T), con uno y dos neutrones respectivamente, al ser la reacción energéticamente más eficiente en laboratorio [130], aunque hay otras formas de fusión teóricamente posibles [131], [132]. El litio tiene un papel fundamental en este proceso al ser necesario en la generación del tritio. Durante la

reacción de fusión de D y T, se crea un átomo de helio y se libera energía y un neutrón, ilustrado en la ecuación 1:



Ec. 1. Reacción de fusión del deuterio y el tritio.

El neutrón liberado sería el portador de gran parte de la energía de la reacción en forma de energía cinética, que se aprovecharía al transferirse a la envoltura del reactor en forma de calor. Además, la envoltura está cubierta de ${}^6\text{Li}$ - un isótopo estable del litio que se encuentra de forma natural en la Tierra con una frecuencia relativa del 7,59% [133] - con el objetivo de que el neutrón liberado impacte contra él, provocando su ruptura de acuerdo a la ecuación 2:



Ec. 2. Reacción de ruptura del isótopo ${}^6\text{Li}$ tras el impacto con un neutrón.

De conseguirse, los combustibles necesarios para mantener activa la reacción de fusión serían el D y el ${}^6\text{Li}$. De esta forma se evita la necesidad de contar con grandes cantidades de T, un isótopo muy costoso de conseguir y del cual en el mundo en la actualidad solo hay 20kg de reservas [134]. El D es un isótopo relativamente frecuente, con una concentración en el agua de mar de $33 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ [135], además de ser común la creación sintética. El ${}^6\text{Li}$ está presente en el litio natural, pero para llevar a cabo la reacción de fusión mantenida se requiere un enriquecimiento de entre el 30 y el 90% [136].

El litio cuenta con otro isótopo estable, ${}^7\text{Li}$, con una frecuencia relativa del 92,41%. Es utilizado en la industria nuclear de fisión en el control de la química del circuito primario en reactores nucleares de agua presurizada [137], y en los reactores nucleares de sal fundida, necesitando ambos de Li altamente enriquecido en ${}^7\text{Li}$ para evitar la producción de tritio al chocar neutrones con átomos de ${}^6\text{Li}$ [138]. También resultaría de interés para la industria de las baterías ya que conferiría mayor fuerza electromotriz [139]. No existen en la naturaleza más isótopos de Li, por lo que los procesos de fraccionamiento isotópico darán dos productos de valor superior al sustrato inicial: Li enriquecido en ${}^6\text{Li}$ y Li enriquecido en ${}^7\text{Li}$.

Además, la relativa urgencia por obtener estos isótopos ha provocado que en los últimos años la literatura científica sobre métodos de fraccionamiento del Li se esté expandiendo [140], con estudios de separación electroquímica [141], [142], utilizando láser [143], extracción con éteres de corona o sistemas de líquidos iónicos [144]–[147], cromatografía [148] y separación con membrana [149], [150]. En la actualidad, sin embargo, el método de amalgama (proceso COLEX) es el único de separación de isótopos de litio utilizado a escala industrial, una técnica que permanece prácticamente invariable desde hace décadas. Es un método medioambientalmente

peligroso ya que requiere de grandes cantidades de mercurio donde se acumula el ${}^6\text{Li}$. El mercurio puede liberarse al medio ambiente como residuo, por vertidos o por evaporación, y causó graves problemas en los ecosistemas cercanos a la planta Y-12 del Laboratorio Nacional Oak Ridge, el centro de mayor producción de Li enriquecido en ${}^6\text{Li}$ que hubo en Estados Unidos, el cual estaba destinado a la creación de la bomba de hidrógeno [137], [151]. En este centro se utilizaron 11 millones de kg de mercurio, de los cuales un 3% acabó en el medio ambiente [151]. Debido a esta problemática, el método de amalgama está prohibido en Estados Unidos. El enriquecimiento de ${}^6\text{Li}$ se restringe en su práctica totalidad a China, donde se usa este mismo proceso [137]. Desarrollar nuevos métodos de enriquecimiento de ${}^6\text{Li}$ más eficientes y con menos riesgos para el medio ambiente es un paso necesario para hacer de la industria energética nuclear de fusión (y, en parte, de fisión) una industria más sostenible.

- **Importancia de los seres vivos con el Li y el U**

La minería y los residuos del uso de uranio y litio harán aflorar estos elementos a la superficie, poniéndolos en contacto con los organismos vivos. Los organismos vivos entran en contacto con todos los elementos y moléculas presentes en la biosfera, la mayoría de las veces interactuando con ellos de diversas maneras.

En algunos casos, los elementos resultarían tóxicos para los seres vivos. Si hay una afectación grande en la producción primaria, como las microalgas, los ecosistemas podrían verse severamente dañados, agravando los efectos de pérdida de hábitats y biodiversidad del Antropoceno. La relación que pueda existir entre estos elementos de interés para los humanos, el litio y el uranio, con las microalgas es largamente desconocida.

Las características físicas y químicas de los drenajes ácidos de minería de uranio hacen de este ambiente un lugar extremo donde pocas especies proliferan. La pérdida de biodiversidad es una característica común en lugares contaminados y supone el mayor impacto en el mundo biológico [152], [153], determinándose además una correlación entre acidez y biodiversidad, pero también entre concentración de metales y biodiversidad [154]. La resiliencia de los ecosistemas frente a cambios ambientales depende en gran medida de su biodiversidad inicial [155]. Por lo tanto, estudiar la biodiversidad de especies en estos lugares puede resultar interesante para ver el impacto de estas aguas en los ecosistemas. En lo referente al estudio de los microorganismos productores primarios, se han aislado especies de microalgas presentes en ambientes extremos antropogénicos de este tipo, especies que han logrado proliferar en ambientes hostiles para la mayoría de la vida y que además han aparecido en lapsos de tiempo geológicamente cortos [153], [154] – desde la creación humana de estas charcas hace décadas. Esto podría ser debido a que los nuevos ambientes extremos fueron colonizados por especies extremófilas que, o bien estaban

presentes antes de la contaminación o bien alcanzaron el ambiente después de ella. Sin embargo, también se han identificado numerosas especies de microalgas mesófilas extremotolerantes en ambientes similares, apuntando hacia una gran capacidad de adaptación [156], [157].

Por otra parte, la interacción de ciertos elementos con los seres vivos puede acarrear movilización o cambios físico-químicos que sean de utilidad biotecnológica. Tal es el caso del uso de bacterias en la minería de cobre, por ejemplo [158].

Será necesario reciclar estos elementos para poder llevar a cabo la obtención de energía de una manera sostenible en el tiempo y con el planeta. Las baterías de litio, al acabar su vida útil se convierten en un residuo de difícil manejo. No obstante, el litio presente podría volver a utilizarse para la creación de nuevas baterías o para su uso en otras tecnologías.

Inspirándonos en los ciclos biogeoquímicos, podrían lograrse de forma análoga ciclos de elementos de relevancia humana, pudiéndonos valer, dándose el caso, de los propios seres vivos. Por lo tanto, ampliar el conocimiento en las relaciones organismos-elementos podría conducir a nuevas posibilidades que hagan del proceso aún más sostenible.



4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Los elementos químicos con importancia creciente en la situación de transición energética actual tienen, sin duda, su impacto en el medio ambiente y deberán ser obtenidos de la manera más sostenible posible. Estos cambios afectarán al fitoplancton, cuyo papel en el control del ciclo del carbono y de mantenimiento de los ecosistemas es a su vez crucial. Pero muchas especies de microorganismos fotosintéticos no solo tienen importancia ecológica, sino también características que hacen de ellos herramientas muy valiosas en biotecnología. Por estas razones, para la presente tesis se han planteado dos objetivos principales:

- 1- Estudiar las especies de microorganismos fotosintéticos presentes en diversas masas de agua residuales de minería de uranio presentes en la Península Ibérica y dilucidar la manera en que diferentes especies de clorofitas mesófilas pueden adaptarse a estos ambientes extremos antropogénicos.
- 2- Valorar la posibilidad de utilizar diferentes especies de clorofitas mesófilas para la obtención de litio en disolución de medio de cultivo, así como determinar si, al mismo tiempo, existe fraccionamiento isotópico biológico de los isótopos del litio que abriera las puertas a una posible biotecnología nuclear.



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestreo de aguas impactadas por la minería de uranio

Para este estudio se llevó a cabo un muestreo en charcas diferentes situadas en el centro-oeste de la Península Ibérica, en una zona con minería de uranio. En total trece masas de aguas residuales de la minería de uranio fueron recogidas y analizadas.

Se realizó una primera medición *in situ* de pH y conductividad con una sonda portátil multiparámetro YSI 600 QS de Yellow Springs Instruments, a modo de aproximación inicial para determinar si la charca poseía características típicas de agua impactada por la minería de uranio (i.e. pH bajo y conductividad alta). También se midió la dosis equivalente de radiación en cada una de las charcas mediante un contador Geiger (GAMMA-SCOUT w/ALERT, EE.UU.).

Por cada masa de agua se obtuvieron dos muestras, una para un estudio físico y químico y otra para el estudio ficológico.

5.1.1 Etiquetado y conservación de muestras

Cada muestra recogida se etiquetó, anotando el nombre del complejo minero al que pertenecía y el nombre de la charca, además de las coordenadas. Las muestras se guardaron en botes estériles y se conservaron en oscuridad a una temperatura alrededor de 4°C.

Para los experimentos evolutivos con microalgas se tomaron y guardaron nuevas muestras de agua con un volumen de aproximadamente 50L, previamente filtradas por un filtro de 0,22µm (BIOFIL, Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., China) y mantenidas hasta su utilización en oscuridad y a una temperatura de 4°C.

5.2 Diseño experimental

5.2.1 Estudio de las aguas residuales de minería de uranio

5.2.1.1 Análisis químico de muestras de agua de minería de uranio

Se realizó un primer análisis químico con las muestras recogidas para determinar la concentración de uranio disuelto en cada muestra. El total de muestras recogidas de las charcas se muestra en la Tabla 1. Para el estudio químico más amplio, el estudio de diversidad fitoplanctónica y la experimentación posteriores, se utilizaron las aguas de cinco charcas escogidas por presentar concentraciones de uranio superiores a 1000 µg L⁻¹ en la muestra. Las masas de agua seleccionadas fueron: (1) un lago de mina abierta en la mina de Mortórios (Portugal), (2) agua residual de lixiviación en la mina de

Castelejo (Portugal), (3) un lago de mina abierta en la mina de Quinta do Bispo (Portugal), (4) una charca de evaporación en Saelices el Chico (Salamanca) y (5) una charca de efluentes mineros en Villavieja de Yeltes (Salamanca). Además, se muestreó una charca considerada prístina para ser utilizada como control en Zamorra (Salamanca), localidad situada a unos 20km de la planta de operaciones de uranio de Saelices el Chico. En el agua de Zamorra se determinaron valores de concentración de uranio menores al límite de detección, indicando la idoneidad de la muestra para ejercer de control.

| Mina | Cuerpo de agua | Coordenadas | U ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| No aplica* | Charca de Zamorra | 40° 30' 48"N 6° 26' 41" W | Bajo límites de detección |
| Mina de Mortórios | Charca de Mortórios | 40° 53' 39"N 7° 15' 11" W | 1256 ± 75 |
| Mina de Castelejo | Lago minero de Castelejo | 40° 30' 41"N 7° 30' 29" W | 5866 ± 469 |
| Mina de Quinta do Bispo | Lago minero de Quinta do Bispo | 40° 33' 17"N 7° 44' 52" W | 1016 ± 61 |
| Mina de Fe | Charca de Saelices | 40° 38' 19"N 6° 35' 44" W | 25857 ± 1551 |
| Mina de Fe | Piscina de Villavieja | 40° 51' 23"N 6° 26' 26" W | 46574 ± 2794 |
| Mina de Prado Velho | Lago minero de Prado Velho | 40° 36' 25"N 7°06'22.9"W | 4,9 ± 0,3 |
| Antigua fábrica de U de Barracão | Piscina de la fábrica de Barracão | 40° 30' 45"N 7°14'23.8"W | 0.07±0,004 |
| Mina de Bica | Mina abierta de Bica | 40° 20' 28"N 7°12'51.0"W | 0.37±0,02 |
| Mina de Urgeiriça | Piscina de Urgeiriça | 40° 30' 49"N 7°53'40.3"W | 32 ± 2 |
| Mina de Urgeiriça | Charca de Urgeiriça | 40° 30' 49"N 7°53'40.3"W | 460 ± 28 |
| Mina de Espinho | Pozo de Espinho | 40° 34' 12"N 7°46'35.4"W | 8,6 ± 0,7 |
| Mina de Ervideira | Pozo de Ervideira | 40° 50' 0"N 7°32'18.6"W | 0,83 ± 0,05 |

Tabla 1. Información sobre las aguas residuales de minería de uranio estudiadas, incluida la concentración de uranio disuelto. Las aguas con una concentración superior a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ fueron las utilizadas para los experimentos. *Charca de Zamorra, masa de agua considerada prístina y utilizada como control.

En el análisis químico de las muestras consideradas para este estudio se determinaron los valores de pH, conductividad y concentración de los metales pesados arsénico, plomo, zinc y cobre, además de la ya conocida concentración de uranio. El análisis de la concentración de metales se realizó mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS VARIAN RedTop) en muestras de agua filtradas y acidificadas con 2% HNO_3 . Se realizó una nueva medición de pH y conductividad en laboratorio con un pH-metro y conductímetro Crison de Crison Instruments.

5.2.1.2 Toxicidad por Microtox

El ensayo Microtox® (Microtox® Model 500 Analyzer, AZUR Environmental, Carlsbad, California, EE.UU.) es un ensayo estandarizado para estimar la toxicidad de aguas, así como de otros sustratos. Consiste en el estudio de inhibición de la fluorescencia de *Aliivibrio fischeri*. Esta bacteria presenta una bioluminiscencia natural inducida por *quorum sensing* dependiente de la densidad de población bacteriana [159]. Cuando el metabolismo se reduce, se produce a su vez una reducción en la luminiscencia, pudiéndose utilizar como indicador de toxicidad [160]. Para estudios como el presente es muy adecuado, ya que es una forma de medir toxicidad no específica en microorganismos acuáticos (e.g. [161]–[165]) y ha sido ampliamente utilizado con muestras ambientales (e.g. [166]–[169]), además de tratarse de un ensayo normalizado en la legislación.

El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando como muestras para el ensayo las muestras de agua al 5% en un solvente provisto por el fabricante. Por cada muestra de agua se realizaron 10 replicados con sus respectivos controles sin tóxico, inoculando aproximadamente 1000 células de *A. fischeri* y midiendo la fluorescencia tras cinco minutos de contacto.

5.2.1.3 Diversidad fitoplanctónica

Se realizó una identificación y un recuento de especies de microalgas presentes en muestras de las cinco masas de agua estudiadas. La identificación se llevó a cabo con la guía de Bellinger y Sigeo [170] y de acuerdo a la base de datos online de AlgaeBase (algaebase.org). Para esta parte del estudio se utilizó un microscopio óptico invertido Axiovert 35 (Zeiss, Alemania), realizando los contajes en cámaras de conteo (Fast read; Biosigma, Italia).

Una vez identificadas las especies presentes y estimada la densidad de cada una, se calculó la diversidad α del fitoplancton en las muestras mediante los índices Simpson y Shannon [171], [172]. El índice Simpson se calcula mediante la ecuación 3.

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{N}\right)^2$$

Ec. 3. Índice Simpson. Siendo s el número de especies y n_i el número de células de la especie i por unidad de volumen y N el número total de células por unidad de volumen.

Por su parte, el índice Shannon se calcula de acuerdo a la ecuación 4:

$$H = - \sum_{i=1}^s \left(\frac{n_i}{N} \ln \left(\frac{n_i}{N} \right) \right)$$

Ec. 4. Índice de diversidad de Shannon.

Estos dos índices nos dan un número que permite valorar la diversidad α . En el caso del índice Simpson se da un gran peso a las especies con mayor densidad en la muestra, por lo que también se le denomina índice de Dominancia [173]. El valor resultante estará entre 0 y 1, siendo 0 el mínimo y 1 el máximo de diversidad. En el índice Shannon, por el contrario, da un mayor peso a la abundancia relativa de cada especie [173]. Los valores se comprenden entre 0,5 y 5, interpretándose el resultado de forma análoga.

5.2.2 Procedimientos experimentales con microalgas

5.2.2.1 Especies utilizadas

Los experimentos se realizaron con diferentes especies microalgales pertenecientes a la división Chlorophyta. Todas las cepas fueron aisladas en lugares donde no se esperarían concentraciones altas de metales.

- *Chlamydomonas reinhardtii* Dangerad (ChlaA y ChlaB)

Originarias de lagunas dentro del entorno del Parque Nacional de Doñana, ambiente prístino sin contaminación de metales y con pH 8. Se trata de una especie ampliamente utilizada como modelo en investigación de microalgas de agua dulce [174]. La forma de la célula es ovalada, midiendo aproximadamente 10 μ m de largo y 3 μ m de ancho. Cuenta con dos flagelos en la parte terminal y es utilizada como especie modelo en estudios sobre el funcionamiento flagelar [52].

Su reproducción puede ser tanto asexual como sexual, dependiendo de la presencia de *mating* positivo y negativo en el cultivo. Si el cultivo es únicamente de positivo o negativo (aquí llamados ChlaA o ChlaB), la reproducción será asexual. En cambio, cultivos con ambos *matings* establecerían reproducción sexual. En nuestros experimentos se han usado únicamente de manera separada, estableciendo líneas clonales.

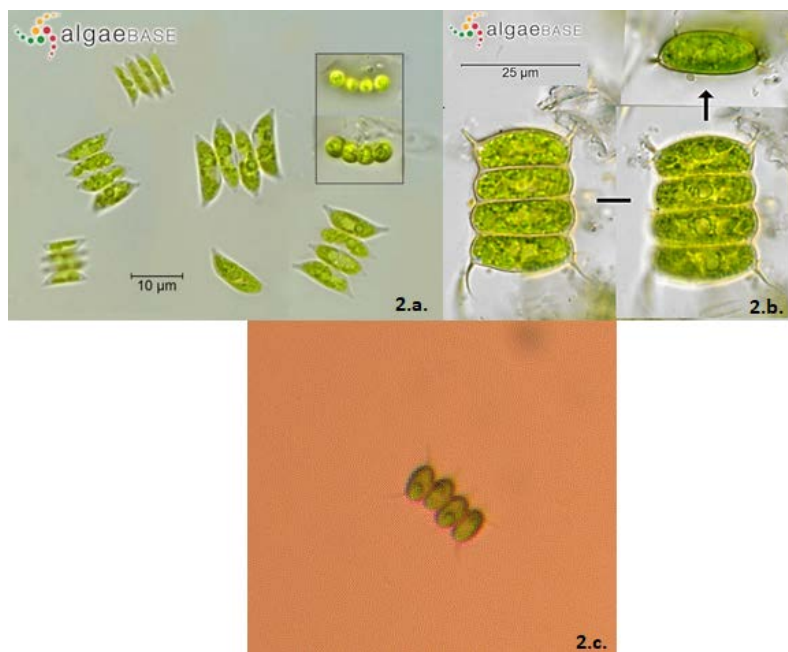
- *Dictyosphaerium chlorelloides* (Naumann) Komárek y Perman 1978 (DC1M)

Procedente de una laguna de montaña prístina en Sierra Nevada. De forma esférica y con un tamaño entre 2 μ m y 10 μ m. Taxonómicamente, pertenece a la familia Chlorellaceae, del orden Chlorellales y clase Trebouxiophyceae. Esta especie ha sido utilizada previamente en experimentos sobre toxicidad de metales en microalgas, así como resistencia y adaptación de estos microorganismos.

- *Desmodesmus sp.* (CAFE)

Cepa aislada de la charca Güelta de la Entreuka (Mauritania). Las células pueden encontrarse aisladas, con una forma más esférica, o en colonias de cuatro células con forma cilíndrica y prolongaciones puntiagudas en los extremos de no más de 1µm de longitud. El tamaño está entre 2µm y 10µm.

Esta cepa fue clasificada taxonómicamente por primera vez para las investigaciones de esta tesis. Para identificar esta cepa se realizó la extracción del ADN y amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) y del gen para la subunidad pequeña del ribosoma, el ARN 18s, con cebadores directos e inversos (*primers forward* y *reverse*), con posterior secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y unidas para cada región utilizando el programa BioEdit, a fin de aumentar el número de bases determinadas con seguridad y obtener una mejor comparación en la base de datos BLAST. Tras esta primera aproximación dos géneros compartían las mismas secuencias, *Acutodesmus* y *Desmodesmus*, ambos géneros recientemente separados del género *Scenedesmus* [175], [176]. La identificación como perteneciente al género *Desmodesmus* se realizó mediante observación de diferencias morfológicas basadas en imágenes en la base de datos AlgaeBase. Las secuencias pueden consultarse en la base de datos de GenBank bajo los números de acceso MT462646 y MW185780 para las regiones ITS y 18s, respectivamente.



Figuras 2.a., 2.b., y 2.c. 2.a. Imagen de *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) P.M.Tsarenko, especie tipo del género *Acutodesmus*, obtenida de la web AlgaeBase (© C.F.Carter). 2.b. Imagen de *Desmodesmus communis* (E.Hegewald), donde se observan las “espinas” típicas del género *Desmodesmus* (© C.F.Carter). 2.c. Imagen propia de la cepa CAFE utilizada en nuestros estudios e identificada como perteneciente al género *Desmodesmus*.

Se trata de un género no muy utilizado en biotecnología. *Desmodesmus* pertenece a la familia Scenedesmaceae, orden Sphaeropleales y clase Chlorophyceae.

- *Tetraselmis mediterranea* (Lucksch) R.E. Norris, Hori & Chihara (TmS1).

Aislada en aguas marinas en la costa este de Cerdeña (Italia). Tiene una forma ovalada, de aproximadamente 10µm de ancho y 14µm de largo. Las especies de su género se caracterizan por contar con cuatro flagelos en la parte apical. El género *Tetraselmis* es extensamente utilizado en investigación y biotecnología de microalgas de agua marina [177]. Se encuadra dentro de la familia Chlorodendraceae, orden Chlorodendrales y clase Chlorodendrophyceae.

5.2.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Desde su aislamiento, las cepas se mantuvieron en la colección de cultivos de microalgas de la Universidad Complutense de Madrid, desde donde se obtuvieron para los experimentos. La colección se mantiene de manera axénica y realizando pases seriados a medio de cultivo nuevo cada 20 días, a mitad de la fase de crecimiento exponencial.

- **Medios de cultivo**

- Medio BG11

El medio utilizado para el cultivo de las especies de microalgas de agua dulce fue el BG-11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution).

Para preparar el medio de cultivo se utiliza agua destilada enriquecida con medio BG-11 concentrado (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante (20mL de medio concentrado por cada litro de agua destilada) y posteriormente filtrado por un filtro Stericup (Stericup-VP Filter Unit, Merck Millipore) de 0.22µm. La composición química del medio de cultivo BG-11 se encuentra en la Tabla 2.

| | |
|--|--------|
| Agua destilada | 1L |
| NaNO ₃ | 1,5g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,04g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,075g |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,036g |
| Ácido cítrico | 6mg |
| Citrato amónico férrico | 6mg |
| EDTA | 1mg |
| Na ₂ CO ₃ | 0,02g |
| Solución de metales traza | 1mL |

Tabla 2. Composición química de 1L de medio BG-11.

A su vez, la composición de la solución de metales traza se muestra en la Tabla 3.

| | |
|--|--------|
| H ₃ BO ₃ | 2,86g |
| MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 1,81g |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,222g |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0,39g |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0,079g |
| Co(NO ₃) ₂ · 6 H ₂ O | 49,4mg |

Tabla 3. Metales traza incluidos en la solución de metales para la preparación del medio BG-11.

- Medio agar BG-11 modificado

Se crearon placas de agar BG-11 con agua de las cinco aguas contaminada del estudio. Por cada litro de agua experimental se añadieron 20mL de caldo de cultivo BG11, a lo que posteriormente se agregó una disolución de agarosa en agua (20 g/L) esterilizada en autoclave húmedo.

- Medio F/2

Para *T. mediterranea*, especie de agua salada, se preparó un medio Guillard's F/2 a partir de una solución concentrada (Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution, SigmaAldrich). Para su preparación se utilizó agua de mar filtrada con filtro Stericup (Stericup-VP Filter Unit, Merck Millipore) de 0,22µm, a la que se añadieron, en condiciones de esterilidad, 20mL de solución concentrada por cada litro de agua marina filtrada.

| | |
|---|--------|
| Agua marina filtrada | 1L |
| NaNO ₃ | 0,075g |
| NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | 0,006g |
| Na ₂ EDTA | 4,16g |
| Solución de vitaminas | 1mL |
| Solución de metales traza | 1mL |

Tabla 4. Composición del medio Guillard's F/2 sin incluir las características químicas del agua marina utilizada.

La solución de vitaminas contaba con los componentes mostrados en la tabla 5.

| | |
|-----------------|-------|
| Agua destilada | 1L |
| Tiamina | 0,2g |
| Cianocobalamina | 0,01g |
| Biotina | 0,01g |

Tabla 5. Componentes de la solución de vitaminas para la preparación de medio F/2.

Los compuestos para preparar la solución de metales traza se indican en la tabla 6.

| | |
|---|---------|
| Agua destilada | 1L |
| FeCl ₃ · 6 H ₂ O | 3,15g |
| CuSO ₄ · 5 H ₂ O | 0,01g |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,022g |
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,01g |
| MnCl ₂ · 4 H ₂ O | 0,18g |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0,006mg |

Tabla 6. Componentes de la solución de metales traza para la preparación de medio F/2.

- Medio agar LB

Utilizado para observar posibles contaminaciones bacterianas o fúngicas en los biorreactores. Para su preparación, se añadieron los componentes dispuestos en la Tabla 7, y posteriormente se esterilizó en autoclave húmedo a 121°C durante 15 minutos. Para la creación de las placas de cultivo sólidas, se llenaron placas Petri y se dejaron enfriar, todo ello en condiciones de esterilidad.

| | |
|----------------------|-----|
| Agua destilada | 1L |
| Peptona | 10g |
| NaCl | 10g |
| Extracto de levadura | 5g |
| Agar | 20g |

Tabla 7. Componentes del medio agar LB.

• **Mantenimiento de los cultivos**

Para mantener el cultivo se utilizan cajas de cultivo de 100mL (Greiner, Bio-One Inc., Longwood, EE.UU.), añadiendo 19mL de medio de cultivo nuevo y 1mL del cultivo anterior. Los cultivos - tanto de colección como los experimentales - se mantienen a 22±2°C, con iluminación continua con fluorescentes, con 80 μmol m⁻² s⁻¹ de radiación fotosintéticamente activa y con longitudes de onda entre 390 y 700nm.

Previamente a los experimentos evolutivos se quiso limitar la variabilidad genética de la población mediante la creación de cultivos con un número de células entre 100 y 1000, aproximadamente, obtenidas por dilución.

5.2.2.3 Experimentos evolutivos con quemostato

El quemostato es un aparato diseñado por Novick y Szilard [178] para el crecimiento continuo de poblaciones bacterianas a una densidad determinada y mediante el cual pueden realizarse estudios evolutivos. En el actual estudio se utilizó un biorreactor con condiciones similares a un quemostato para el crecimiento de especies microalgales, pero con una eliminación de medio semi-continua: cada día un volumen determinado de medio se retiraba en función del volumen total y la tasa de crecimiento de las microalgas.

Con un quemostato también se puede determinar si la población mutante tiene o no menor *fitness* que la original y el comportamiento de las diferentes poblaciones de mutantes que vayan surgiendo dentro de la metapoblación de microorganismos. Puede estudiarse esta dinámica mediante el muestreo periódico de las células que hay en el recipiente. Estas células al exponerse a un medio selectivo podrían dar lugar a diferentes escenarios:

1. Que el agente selectivo no suponga un gran estrés a las células y, por lo tanto, que éstas puedan adaptarse fisiológicamente al nuevo escenario. En este caso, desde el momento inicial las células serían capaces de sobrevivir con el agente, manteniéndose en el mismo nivel el número de células a lo largo de todos los muestreos.
2. Que el agente selectivo sea lo suficientemente fuerte como para no permitir una adaptación fisiológica, pero sí suficientemente débil como para que en cierto punto aparezcan mutaciones que confieran resistencia. En los sucesivos muestreos debería verse un incremento en la concentración de células resistentes. Más tarde, si las células mutantes tienen menor *fitness* en el ambiente del quemostato, se producirá un equilibrio mutación-selección, por lo que las concentración de células resistentes llegarán a una meseta con fluctuaciones pequeñas en su número.
3. Que el agente selectivo ejerza una presión de selección muy alta hasta el punto de no existir mutantes de la población que pudieran resistir esas condiciones. En tal caso en ninguno de los muestreos se observarían células capaces de resistir.

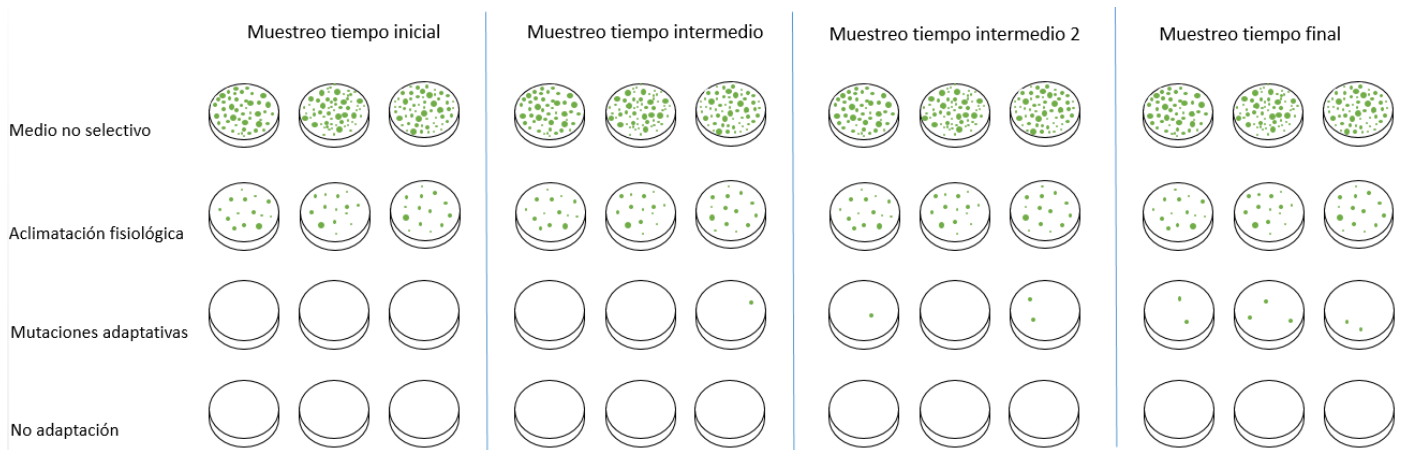


Figura 3. Posibles escenarios supuestos de adaptación de microalgas a un nuevo medio tóxico tras el crecimiento en un quemostato. Cada tiempo representa un momento de muestreo desde el quemostato y su inoculación en el medio de cultivo a estudiar.

- **Diseño de biorreactor semi-continuo**

El diseño consistía de un embudo decantador con capacidad de 2L como contenedor del cultivo. El embudo está conectado a un contenedor con medio de cultivo nuevo a través de un tubo con una válvula. A su vez, para asegurar la oxigenación, mantener una suspensión de células homogénea y disminuir el crecimiento de las microalgas en superficie, se bombea aire desde el fondo del embudo a través de un tubo que entra por la parte superior y está conectado a una bomba de aire Eheim 200. A la salida de la bomba de aire hay un filtro de jeringa de $0,22\mu\text{m}$ (BioFil Syringe Filter, Shanghai, China) para evitar contaminación. Para controlar la presión en el interior del contenedor del cultivo está situada también una salida de aire con un filtro de $0,22\mu\text{m}$. En la parte inferior hay una llave de paso que conecta con un tubo estéril. A la hora de retirar un volumen del cultivo se coloca otro tubo estéril y se recoge. El resto del tiempo se coloca un filtro de $0.22\mu\text{m}$ a la salida del primer tubo.

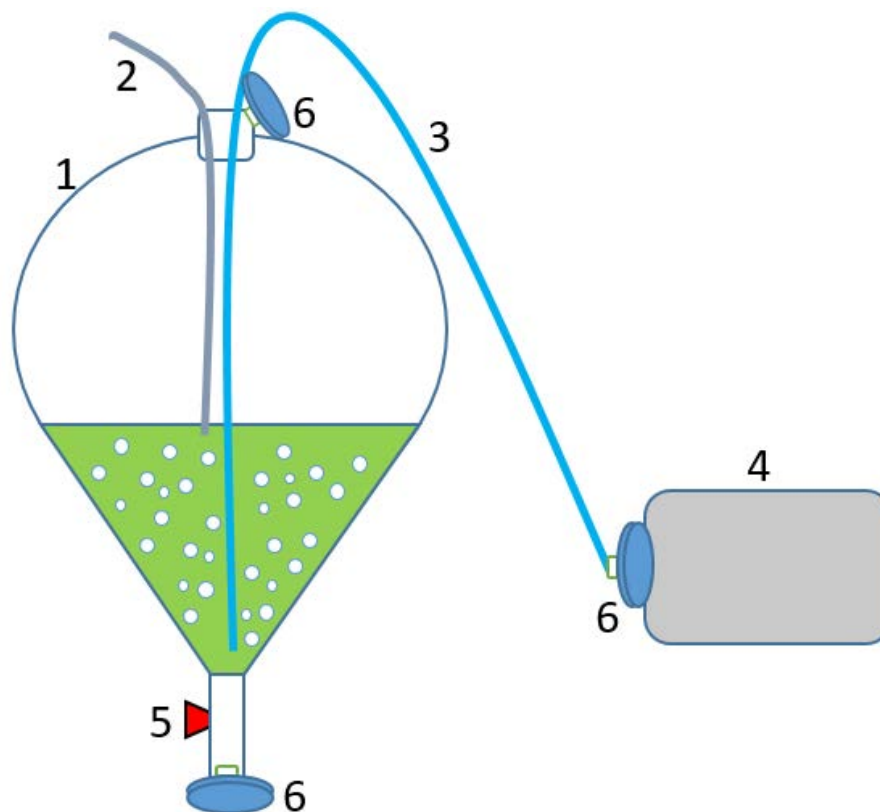


Figura 4. Representación esquemática del biorreactor semi-continuo. 1. Embudo decantador contenedor del cultivo. 2. Tubo de entrada de medio. 3. Tubo de entrada de aire filtrado. 4. Aireador Eheim 200. 5. Válvula para la salida de medio del decantador. 6. Filtros de $0,22\mu\text{m}$.

- **Cálculos para el funcionamiento y estudio de las poblaciones en el biorreactor semi-continuo**

Se preparó un biorreactor por cada una de las especies de microalgas para realizar el experimento de adaptación a aguas residuales de la minería de uranio. El volumen diario de medio de cultivo a renovar se calcula según la ecuación 5:

$$w = Vr$$

Ec. 5. Cálculo del volumen de cultivo a renovar (w). V indica el volumen total del cultivo y r es la tasa de crecimiento de cada cepa.

A su vez, la tasa de crecimiento de cada cepa (r) se calcula de acuerdo con la ecuación 6:

$$N_t = N_0 e^{rt}$$

Ec. 6. Cálculo de la tasa de crecimiento de microorganismos. r es la tasa de crecimiento; N_t el número de células en un tiempo (t); y N_0 el número de células a $t=0$.

Por lo tanto, para calcular el volumen de medio a retirar por cada tiempo t se puede aplicar la ecuación 7:

$$w_t = V \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{t}$$

Ec. 7. Cálculo del volumen de cultivo a renovar por cada tiempo t .

El volumen de cultivo en el biorreactor fue de 1,5L. Para calcular el número de células en cada tiempo se estimó la densidad con un conteo ciego en cámaras de conteo (Fast read; Biosigma, Italia) en un microscopio óptico invertido Axiovert 35 (Zeiss, Alemania).

- **Experimento con poblaciones microalgales en biorreactor semi-continuo y estimación de individuos resistentes por el método de conteo de puntos en placa**

Para comenzar el experimento, se añadió un inóculo inicial de 10^5 células procedente de poblaciones clonales, un número no superior a la tasa de mutación habitual en clorofitas (10^{-5} - 10^{-6}) [79]. El cultivo se dejó crecer durante al menos 22 generaciones, tiempo durante el cual se calcularon las tasas de crecimiento. Tras ello se comprobó cada tres días la densidad celular hasta alcanzar un equilibrio en el número de células, considerado éste como una variación menor al 20% entre densidades estimadas consecutivas. Se extrajeron alícuotas de las cepas del biorreactor antes del inicio del experimento, al tiempo de estabilización, y tras haber transcurrido aproximadamente 30, 40, 50 y 60 generaciones, a fin de estudiar la aparición de células resistentes a las aguas residuales de la minería de uranio de nuestro estudio. La vigilancia de posibles

contaminaciones de bacterias u hongos en el biorreactor se realizó periódicamente mediante observación en el microscopio y siembra en placas de medio Luria-Bertani sólido (agar LB) [179].

Se estimó la proporción de microalgas resistentes dentro de la población del cultivo a diferentes tiempos para ver la dinámica de los mutantes resistentes a las cinco charcas dentro de las tres especies de microalgas diferentes. De las alícuotas extraídas a diferentes generaciones se inocularon 10^6 células en las placas de agar BG-11 modificado con las diferentes aguas. A su vez, se inocularon en placas de BG11 agar hechas con agua destilada. Por cada especie, tiempo y agua se realizaron triplicados.

Se calculó la proporción de células resistentes a través del conteo de puntos en placa descrito por Weibel y col., 1966 [180]. Se creó una plantilla donde el área de la placa se encuadró en un cuadrado, para posteriormente crear 20 segmentos paralelos a cada a la base y 20 paralelos a la altura del cuadrado y equidistantes con los segmentos paralelos contiguos. Esto hizo un total de 356 puntos donde los segmentos se cortaban, como se muestra en la Figura 5. El cálculo de proporción de células resistentes se hizo a través de las medias del número de puntos sobre el que se observaba presencia de colonias en los cultivos en agua tóxica y en el control con BG11 agar.

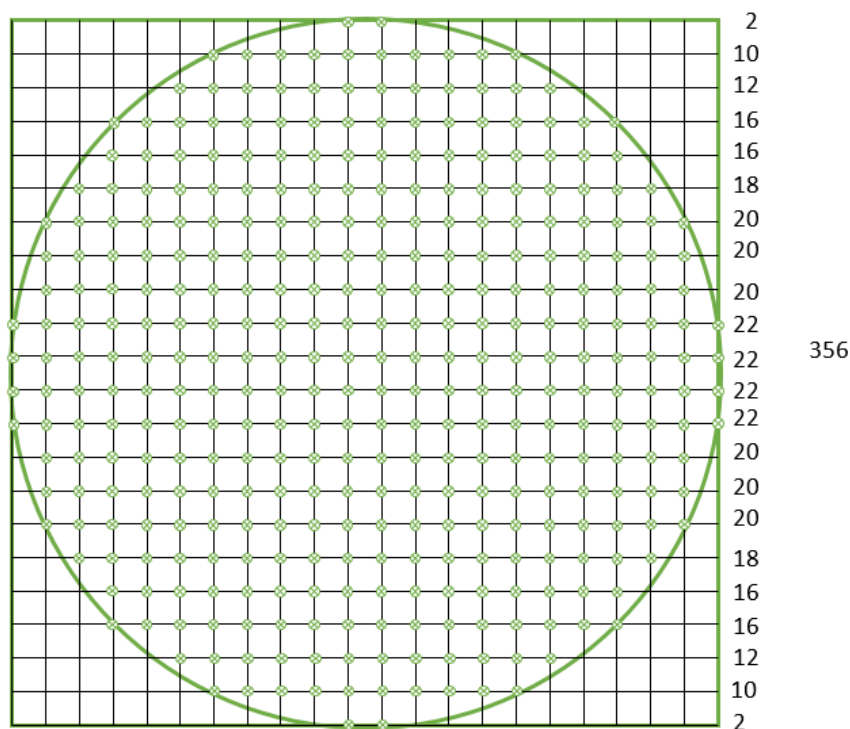


Figura 5. Representación esquemática del sistema de conteo de puntos coincidentes en placa. Utilizando una plantilla similar en una placa Petri se realizó un contaje de los puntos donde había presencia de colonias de microalgas.

5.2.2.4 Ensayo de captura y fraccionamiento

Se realizó un experimento para analizar la captura y fraccionamiento isotópico de Li por parte de tres especies microalgales en cultivos expuestos a diferentes tiempos. El ensayo del fraccionamiento isotópico se basa en que algunos procesos naturales pueden separar los diferentes isótopos del mismo átomo. El paso a través de membranas de un ion, por ejemplo, podría provocar un efecto isotópico cinético donde el isótopo más liviano atravesaría ligeramente más rápido la membrana ya que necesita una menor cantidad de energía para su transporte. Por ello, sería plausible que durante la captura de un elemento las microalgas produjeran a su vez un fraccionamiento isotópico del mismo.

Las especies utilizadas para estos ensayos fueron *Chlamydomonas reinhardtii* (ChlaA), *Desmodesmus sp.* (CAFE) y *Tetraselmis mediterranea* (TmS1).

Se crearon cuatro cultivos experimentales por especie con 4,2 mg/L de Li en el medio BG-11 (utilizado para el cultivo de ChlaA y CAFE) y 2,5 mg/L en el medio F/2 (utilizado para el cultivo de TmS1), con inóculos de 7×10^5 células para ChlaA y 8×10^5 para CAFE y TmS1 estimados utilizando cámaras de conteo celular (Fast Read; Biosigma, Venecia, Italia) mediante conteo en microscopio (Zeiss 47 30 12 – 9902, Alemania). El pH de los medios permaneció invariable tras la adición del LiCl. Además se crearon cuatro controles químicos para cada medio, a modo de “cultivo” sin inóculo celular.

Cada cultivo se detuvo a un tiempo determinado para estudiar las posibles diferencias de captura y fraccionamiento respecto al tiempo por cada especie. De los cuatro cultivos experimentales, uno se detuvo justo después de la inoculación y el resto a los 3, 12 y 27 días. Para ello, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, separando el *pellet* del sobrenadante. Los *pellets* fueron congelados para posteriormente realizar su análisis. Los controles químicos fueron retirados al mismo tiempo que los cultivos experimentales.

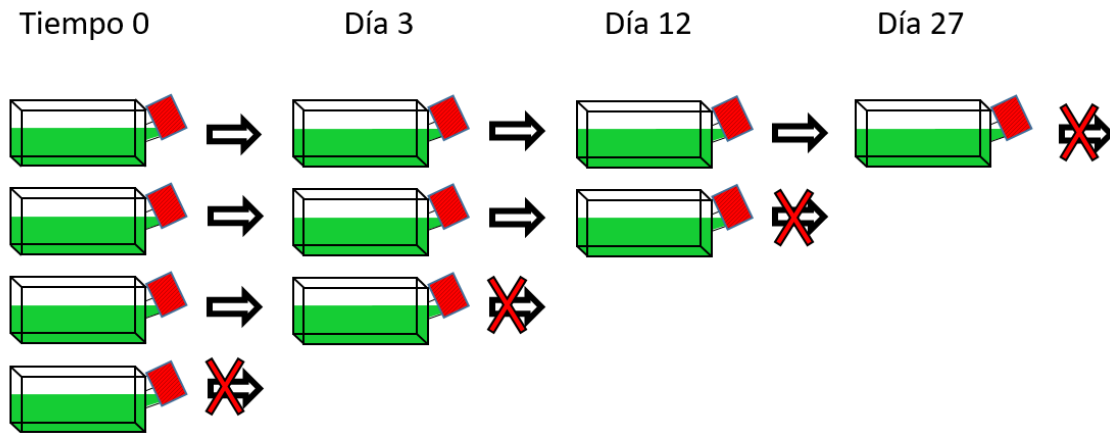


Figura 6. Diagrama del experimento de captura y fraccionamiento de litio para cada una de las especies estudiadas.

La cuantificación de Li en los *pellets* y la relación isotópica se realizaron en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT).

• Cálculos fraccionamiento

Los análisis isotópicos en el *pellet* de los cultivos de microalgas aportaron la relación isotópica de ${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$. Para una mejor visualización y comprensión de los datos, generalmente se utiliza la unidad δ , detallada en la ecuación 8, en los procesos donde existe fraccionamiento isotópico, como estudios en geología.

$$\delta = [(R_{medida} - R_{referencia}) / (R_{referencia})] \times 1000$$

Ec. 8. Cálculo de δ . R_{medida} es la relación isotópica medida de un isótopo al final de un proceso que pueda causar variaciones en su abundancia relativa. $R_{referencia}$ indica la relación isotópica medida de referencia.

Esta ecuación se calcula con respecto a un isótopo y permite ver el enriquecimiento en ese isótopo en unidades por mil (‰). Como relación isotópica de referencia se utilizó la abundancia relativa obtenida en el mismo tiempo de los controles químicos. Valores positivos indican un enriquecimiento en el isótopo, mientras que valores negativos muestran reducción relativa del isótopo en la matriz medida. En nuestro estudio se calculó δ^6 , el enriquecimiento del isótopo ${}^6\text{Li}$, dado que presenta una menor abundancia en la naturaleza y su importancia económica es mayor. No obstante, muchos autores han calculado en sus artículos los valores con respecto al ${}^7\text{Li}$ ya que es habitual utilizar el isótopo más pesado. Al ser el litio un elemento con únicamente dos isótopos estables, y basados en la ecuación 8, es fácilmente comparable ya que el valor de δ^7 será el número opuesto del valor de δ^6 .



6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización y selección de las aguas de estudio

Para el estudio solo se eligieron las aguas que presentaron una concentración de U mayor a 1mg L^{-1} , además de la charca control en Zamarra. Las charcas que cumplían este requisito son las mismas que en el momento del estudio no habían pasado por, o estaban en proceso de restauración. Se analizó la concentración de U, As, Pb, Zn y Cu, así como el pH, la radiactividad y la conductividad. A su vez se hizo un ensayo *Microtox* para evaluar la toxicidad de las aguas. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

| Charca | Zamarra (control) | Mortórios | Castelejo | Quinta do Bispo | Saelices | Villavieja |
|--|-------------------|-----------|-----------|-----------------|----------|------------|
| U (mg L^{-1}) | b.l.d. | 1,256 | 5,866 | 1,016 | 25,857 | 46,574 |
| As ($\mu\text{g L}^{-1}$) | <5,0 | <5,0 | <5,0 | <5,0 | 80,79 | 1567,18 |
| Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$) | <5,0 | <5,0 | 19,7 | <5,0 | 5,71 | 9,64 |
| Zn (mg L^{-1}) | <0,05 | 0,21 | 0,86 | 1,68 | 20,40 | 84,28 |
| Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$) | <0,5 | 20,43 | <5,0 | 99,64 | 603,81 | 11,213 |
| pH | 6,98 | 5,1 | 6,3 | 3,6 | 3,7 | 2,7 |
| Radioactividad ($\mu\text{Sv h}^{-1}$) | <0,1 | 1,1 | 0,8 | 0,6 | 4,0 | 4,1 |
| Conductividad (mS cm^{-1}) | 0,2 | 6,3 | 7,2 | 6,8 | 10,7 | 11,1 |
| % inhibición <i>Microtox</i> | <0,5 | >95 | >95 | >95 | >95 | >95 |

Tabla 8. Datos físicos, químicos y de toxicidad de las aguas de estudio. b.l.d.: Bajo límite de detección.

En la charca control de Zamarra todos los parámetros analizados se encontraban en rangos normales, pudiéndose considerar un ambiente prístino. Las características de concentración de metales pesados, pH y conductividad se corresponden con los valores esperados para aguas residuales de la minería de metales, con la característica añadida de presentar valores por encima de los normales de radiación ionizante al ser minería de uranio.

6.2 Diversidad fitoplanctónica

La Tabla 9 muestra los resultados de la identificación y densidad de especies, así como de los índices de diversidad α .

| | Mortórios | Castelejo | Quinta do Bispo | Saelices | Villavieja |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------------|----------|------------|
| Número de especies fitoplanctónicas | 7 | 8 | 5 | 4 | 4 |
| Índice Shannon (<i>H</i>) | 1,09 | 1,34 | 0,63 | 1,16 | 0,66 |
| Índice Simpson (<i>D</i>) | 0,49 | 0,61 | 0,32 | 0,63 | 0,39 |

Tabla 9. Contaje de especies e índices de diversidad para las diferentes aguas residuales de minería de uranio estudiadas.

6.3 Estudio de adaptación con biorreactor semi-continuo

| Cepa | Charca | Ancestral | Inicial | ~ 30 gen. | ~ 40 gen. | ~ 50 gen. | ~ 60 gen. |
|-------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ChlaA | Mortórios | 8,05 ± 0,71 | 9,69 ± 0,40 | 12,45 ± 0,43 | 14,84 ± 0,59 | 19,62 ± 0,73 | 19,30 ± 0,67 |
| | Castelejo | 7,02 ± 0,56 | 9,41 ± 0,35 | 13,20 ± 0,74 | 13,91 ± 0,51 | 15,11 ± 0,65 | 14,21 ± 0,56 |
| | QdB | No | 8,15 ± 0,73 | 9,21 ± 0,41 | 13,30 ± 0,36 | 14,72 ± 0,71 | 14,80 ± 0,63 |
| | Saelices | No | No | 3,36 ± 0,37 | 8,02 ± 0,48 | 11,28 ± 0,42 | 11,32 ± 0,46 |
| | Villavieja | No | No | No | No | No | No |
| ChlaB | Mortórios | 4,49 ± 0,74 | 10,39 ± 0,56 | 9,11 ± 0,32 | 13,96 ± 0,41 | 16,71 ± 0,37 | 17,01 ± 0,43 |
| | Castelejo | 13,29 ± 0,58 | 11,71 ± 0,91 | 10,63 ± 0,32 | 13,61 ± 0,36 | 19,27 ± 0,33 | 19,10 ± 0,24 |
| | QdB | No | 10,39 ± 0,49 | 9,51 ± 0,36 | 14,01 ± 0,28 | 13,71 ± 0,43 | 14,08 ± 0,43 |
| | Saelices | No | No | 7,69 ± 0,42 | 10,20 ± 0,27 | 11,11 ± 0,37 | 11,21 ± 0,54 |
| | Villavieja | No | No | No | No | No | No |
| DC1M | Mortórios | 4,96 ± 0,43 | 11,33 ± 0,58 | 15,76 ± 0,45 | 21,71 ± 0,56 | 23,01 ± 0,71 | 23,60 ± 0,70 |
| | Castelejo | 4,86 ± 0,86 | 11,42 ± 0,81 | 12,42 ± 0,28 | 15,77 ± 0,62 | 16,01 ± 0,41 | 16,06 ± 0,42 |
| | QdB | No | No | 10,77 ± 0,46 | 11,32 ± 0,38 | 12,16 ± 0,28 | 11,92 ± 0,65 |
| | Saelices | No | No | 3,92 ± 0,26 | 8,97 ± 0,26 | 9,33 ± 0,61 | 9,23 ± 0,42 |
| | Villavieja | No | No | No | No | No | No |

Tabla 10. Proporción calculada de células resistentes o tolerantes a las diferentes aguas residuales de minería de uranio en función de cepa y número de generaciones. Inicial hace referencia al momento de estabilización de la población dentro del biorreactor semi-continuo. En la primera columna se muestran las aguas utilizadas. QdB: Quinta do Bispo.

Para las diferentes aguas tóxicas y especies se observan diferentes resultados. Las tres cepas de microalgas ancestrales, previo al inicio del experimento, se adaptaron a las aguas de Mortórios y Castelejo de forma fisiológica. No requirieron de mutaciones que les confirieran resistencia para habitar ese ambiente. Sin embargo, una vez iniciado el experimento, con el paso de las generaciones la proporción de células que pueden crecer aumenta hasta llegar a un equilibrio entorno a las 40 generaciones, lo que indica que aumentan dentro de la población los individuos mutantes que facilitan la adaptación al medio.

En las tres aguas restantes, i.e. Quinta do Bispo, Saelices y Villavieja, la presión selectiva inicial es suficiente como para no permitir la adaptación fisiológica. En Quinta do Bispo y Saelices aparecieron mutantes resistentes a las 10 generaciones, mientras que en los medios agar con agua de Villavieja no crecieron colonias en ninguna fase del estudio.

Las mutaciones que han permitido la adaptación a las charcas de Quinta do Bispo y Saelices tienen menor *fitness* en ambientes no selectivos ya que alcanzan un equilibrio mutación-selección.

6.4 Captura de litio con microalgas

Las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio mostraron captura de litio, al determinarse en el *pellet* una concentración de litio mayor que en el medio líquido de partida en el que se encontraba disuelto este elemento. En términos absolutos, la masa de litio capturada fue mayor en el cultivo analizado tras 27 días para las tres especies, pero en términos relativos a la biomasa total obtenida hubo variaciones según la especie. TmS1 y ChIA presentaron la mayor concentración de litio en el *pellet* en el día 27, mientras que CAFE, justo tras la inoculación. Los resultados más detallados se presentan en la Tabla 11.

| Cepa | Duración del cultivo (Días) | Masa <i>pellet</i> (g) | Masa de Li en <i>pellet</i> (ng) | Masa de Li/biomasa (µg/g) |
|------|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| TmS1 | 0 | 0,1273 | 887 | 6,96 |
| TmS1 | 3 | 0,2861 | 1946 | 6,8 |
| TmS1 | 12 | 0,1542 | 1113 | 7,21 |
| TmS1 | 27 | 0,4174 | 3447 | 8,26 |
| CAFE | 0 | 0,0971 | 850 | 8,76 |
| CAFE | 3 | 0,1888 | 1265 | 6,7 |
| CAFE | 12 | 0,2261 | 1512 | 6,69 |
| CAFE | 27 | 0,5786 | 4597 | 7,94 |
| ChIA | 0 | 0,1214 | 885 | 7,29 |
| ChIA | 3 | 0,1432 | 784 | 5,48 |
| ChIA | 12 | 0,3876 | 1641 | 4,23 |
| ChIA | 27 | 0,1926 | 6098 | 31,66 |

Tabla 11. Captura de Li por parte de los diferentes cultivos de las tres cepas seleccionadas.

6.5 Fraccionamiento de litio con microalgas

| Cepa | Tiempo (días) | Relación isotópica (${}^6\text{Li}/{}^7\text{Li}$) | | δ^6 |
|------|---------------|--|---------|------------|
| | | <i>Pellet</i> | Medio | |
| TmS1 | 0 | 0,08227 | 0,08239 | -1,45 |
| | 3 | 0,08247 | 0,08201 | 5,58 |
| | 12 | 0,08269 | 0,08229 | 4,80 |
| | 27 | 0,08276 | 0,08207 | 8,35 |
| CAFE | 0 | 0,0897 | 0,08264 | 85,39 |
| | 3 | 0,08303 | 0,08218 | 10,39 |
| | 12 | 0,08447 | 0,08232 | 26,12 |
| | 27 | 0,08556 | 0,08193 | 44,32 |
| ChIA | 0 | 0,0826 | 0,08264 | -0,44 |
| | 3 | 0,08313 | 0,08218 | 11,54 |
| | 12 | 0,08214 | 0,08232 | -2,19 |
| | 27 | 0,08508 | 0,08193 | 38,40 |

Tabla 12. Enriquecimiento del *pellet* en ${}^6\text{Li}$ (δ^6) en base a la relación isotópica en el medio.

De acuerdo a la Tabla 12, existe fraccionamiento isotópico de Li, mayoritariamente enriquecimiento en ${}^6\text{Li}$, en los tres cultivos de microalgas. La δ^6 varía con el tiempo del cultivo y la especie. La mayor δ^6 se obtuvo con CAFE en el momento de la inoculación, coincidiendo también con la mayor captura relativa de Li en esta cepa. Esta situación se da también con ChIA y TmS1.

6.6 Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles.

DOI: [10.1007/s00248-019-01431-6](https://doi.org/10.1007/s00248-019-01431-6)



Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles

Beatriz Baselga-Cervera^{1,2} · Camino García-Balboa¹ · Héctor M. Díaz-Alejo¹ · Eduardo Costas¹ · Victoria López-Rodas¹

Received: 1 May 2019 / Accepted: 19 August 2019 / Published online: 29 August 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Anthropogenic extreme environments are emphasized as interesting sites for the study of evolutionary pathways, biodiversity, and extremophile bioprospection. Organisms that grow under these conditions are usually regarded as extremophiles; however, the extreme novelty of these environments may have favor adaptive radiations of facultative extremophiles. At the Iberian Peninsula, uranium mining operations have rendered highly polluted extreme environments in multiple locations. In this study, we examined the phytoplankton diversity, community structure, and possible determining factors in separate uranium mining-impacted waters. Some of these human-induced extreme environments may be able to sustain indigenous facultative extremophile phytoplankton species, as well as alleged obligate extremophiles. Therefore, we investigated the adaptation capacity of three laboratory strains, two *Chlamydomonas reinhardtii* and a *Dictyosphaerium chlorelloides*, to uranium-polluted waters. The biodiversity among the sampled waters was very low, and despite presenting unique taxonomic records, ecological patterns can be identified. The microalgae adaptation experiments indicated a gradient of ecological novelty and different phenomena of adaptation, from acclimation in some waters to non-adaptation in the harshest anthropogenic environment. Certainly, phytoplankton extremophiles might have been often overlooked, and the ability to flourish in extreme environments might be a functional feature in some neutrophilic species. Evolutionary biology and microbial biodiversity can benefit the study of recently evolved systems such as uranium-polluted waters. Moreover, anthropogenic extremophiles can be harnessed for industrial applications.

Keywords Uranium mining impacted waterbodies · Phytoplankton · Anthropogenic extreme environments · Microbial biodiversity · Facultative extremophiles · Adaptation

Introduction

Despite the ubiquity of microbial life, basic ecological and biogeographical patterns still under dispute [1]. Ecosystems are expected to host microorganisms adapted to the range of conditions imposed by the ecosystems themselves. In the particular

case of extreme environments, endemic organisms could be considered extreme-lovers and be confined to extreme habitats. Most well-known extremophiles, mainly Archaea, are obligate extremophiles unable or “ill-equipped” to grow in mesophilic conditions [2–4]. There are nevertheless species flourishing in a mild environment that thrive in extreme conditions (e.g. [5, 6]). Low-Décarie et al. [5] mentioned several processes to explain the presence of extremophiles in “benign” environments, either separately or in combination: (i) dispersion in different environments (the premise that we can find microorganisms everywhere and the environment selects, so-called Bass-Becking hypothesis [7–9]), (ii) that the environments present broader conditions than those estimated, wider range (multiple microhabitats), and/or (iii) that the cost of adapting to the extreme does not pose a decisive disadvantage in average non-extreme environments (constitutive or present in the population genome). The unique features of microorganisms play a role in the generation and sustenance of genetic variability, influencing the

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00248-019-01431-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Camino García-Balboa
camino@ucm.es

¹ Animal Science (Genetics), School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain


² Present address: Ecology, Evolution and Behavior Department, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA

6.7 The Upcoming ^6Li Isotope Requirements Might Be Supplied by a Microalgal Enrichment Process.

DOI: [10.3390/microorganisms9081753](https://doi.org/10.3390/microorganisms9081753)



Article

The Upcoming ${}^6\text{Li}$ Isotope Requirements Might Be Supplied by a Microalgal Enrichment ProcessHéctor M. Díaz-Alejo ¹ , Victoria López-Rodas ¹, Camino García-Balboa ¹, Francisco Tarín ², Ana I. Barrado ³, Estefanía Conde ³ and Eduardo Costas ^{1,*}¹ School of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; hectormd@ucm.es (H.M.D.-A.); vlrodas@ucm.es (V.L.-R.); camino@ucm.es (C.G.-B.)² ENUSA Advanced Industries S.A., S.M.E., Santiago Rusiñol 12, 28040 Madrid, Spain; ftg@enusa.es³ Spanish Research Centre for Energy, Environment and Technology (CIEMAT), Av. Complutense 40, 28040 Madrid, Spain; anaisabel.barrado@ciemat.es (A.I.B.); estefania.conde@ciemat.es (E.C.)

* Correspondence: ecostas@ucm.es

Abstract: Lithium isotopes are essential for nuclear energy, but new enrichment methods are required. In this study, we considered biotechnology as a possibility. We assessed the Li fractionation capabilities of three Chlorophyte strains: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tetraselmis mediterranea*, and a freshwater Chlorophyte, *Desmodesmus* sp. These species were cultured in Li containing media and were analysed just after inoculation and after 3, 12, and 27 days. Li mass was determined using a Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, and the isotope compositions were measured on a Thermo Element XR Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer. The maximum Li capture was observed at day 27 with *C. reinhardtii* (31.66 $\mu\text{g/g}$). *Desmodesmus* sp. reached the greatest Li fractionation, ($\delta^6 = 85.4\%$). All strains fractionated preferentially towards ${}^6\text{Li}$. More studies are required to find fitter species and to establish the optimal conditions for Li capture and fractionation. Nevertheless, this is the first step for a microalgal nuclear biotechnology.

Keywords: lithium; fractionation; microalgae; biotechnology; stable isotopes



Citation: Díaz-Alejo, H.M.; López-Rodas, V.; García-Balboa, C.; Tarín, F.; Barrado, A.I.; Conde, E.; Costas, E. The Upcoming ${}^6\text{Li}$ Isotope Requirements Might Be Supplied by a Microalgal Enrichment Process. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1753. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081753>

Received: 20 July 2021

Accepted: 13 August 2021

Published: 17 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

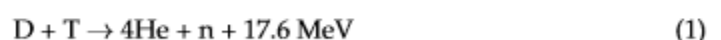


Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

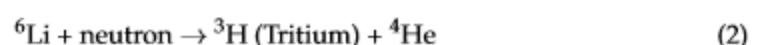
1. Introduction

Future prospects for energy demand make it necessary to provide humans with an important ratio of KJ/(person \times day) to satisfy the daily consumption all over the world. In 2019, energy consumption was over 160,000 TWh [1]. Additionally, the energy requirements must be supplied without posing a threat to human life and under environmentally sustainable criteria.

In that respect, fusion energy has become one of the most promising future sources of energy [2]. A project as relevant as ITER implies that researchers and engineers from different countries are approaching this challenge, aiming to obtain positive net energy from fusion reactions. To accomplish this, two reactants are required: two heavy hydrogen isotopes—deuterium, and tritium—as shown in Equation (1):



Deuterium may be obtained from seawater, where it is present at a concentration of 33 g/m³ [3]. Tritium is an isotope that is not abundant in nature but can be obtained from ${}^6\text{Li}$ as in the process shown in Equation (2).



Thus, lithium is a key element in the search for a green, efficient energy. From an isotopic point of view, lithium consists of two isotopes whose natural relative abundance is 7.59% for ${}^6\text{Li}$ and 92.41% for ${}^7\text{Li}$ [4]. Both lithium isotopes are strategic for the nuclear

technology since ^7Li is used to control the chemistry of the primary circuit in pressurized water nuclear reactors, while ^6Li is used as neutron shield and detector in neutron beam facilities. Additionally, the advancement of nuclear fusion projects will create a high demand for this isotope to regenerate tritium. For this purpose, the enrichment needed in the ^6Li isotope is around 30 to 90%, far above what is found naturally (7.59%) [5–7].

Since vast amounts of ^6Li are required for fusion projects, the resultant ^7Li is perfectly usable for battery production and nuclear fission reactors as an acidic control in pressurized water-moderated reactors (PWR) or as a coolant in GEN IV molten salt reactors since no tritium generation is desired in these systems [5]. The electric transportation sector is also interested in ^7Li since it confers greater electromotive force, recharging speed, and useful life to batteries [8]. These synergistic demands for each of the lithium isotopes justify and reinforce the interest in developing efficient and scalable technologies of isotopic separation technologies [8].

To achieve fractionation, different methods based on physicochemical approaches have been developed, such as chemical, electrochemical, displacement chromatography, and laser-based methods [9]. Most of them have been proven at a laboratory scale and are very costly in terms of scaling and energy consumption. To our knowledge, however, Li fractionation has so far only been used industrially with the amalgam method [10], a chemical exchange process that uses high quantities of mercury that must be disposed of, posing an environmental and health risk [11,12].

Furthermore, nowadays, the majority of ^6Li comes from a limited source and is produced in Oak Ridge [9], so envisioning the proximal future demand for ^6Li , the implementation of plants to obtain huge amounts of enrichment must be achieved.

For these new plants to be more sustainable, green and more efficient technologies would be required [9]. To achieve this, nature could provide us with powerful knowledge since isotopes may be naturally fractionated during different biogeochemical processes.

Excluding hydrogen, the two isotopes of Li, ^6Li , and ^7Li , have the biggest relative mass difference (~16.6%) of any isotope pair, providing itself an advantage towards fractionation. Lithium fractionation in nature varies in geological and natural samples, with values for δ^7 ($[(R_{\text{measured}} - R_{\text{reference}})/R_{\text{reference}}] \times 1000$) that range between around 30‰ in seawater to negative values in weathered soils and in soil solutions [13]. Taylor and Urey (1938) found an isotopic fractionation of 250‰ when Li-solutions percolate through a zeolite [14]. During weathering, fractionation occurs due to the primary dissolution of silicate rocks like granites and the formation of secondary minerals [15–18]. This can lead to producing large isotopic fractionation in terrestrial systems, with the variation of $^7\text{Li}/^6\text{Li}$ ranging from –20 to +40‰ [19,20] up to 80‰ [21].

Another possible fractionation mechanism is through biological systems. In mammals, including humans, Li isotopic fractionation process has been widely spotted [22–24]. The isotope relevance escalates to the point that they even exhibit different toxicity and lethality for ^6Li and ^7Li [25,26]. To show isotopic fractionation, a Li–organism interaction must exist. Many of the effects that Li can cause in living organisms may be explained by its competition with sodium, potassium, calcium, and magnesium due to its similar charge and size [27–30]. Because of its ubiquity in our environment, the ingestion of lithium in at least trace amounts is unavoidable [27]. Some plants have increased growth rates in the presence of lithium, but in other cases, lithium can also be toxic at high concentrations, so an optimal Li concentration for some organisms is likely to exist (as reviewed by Shahzad et al. [31]). Experiments conducted with bacteria such as *E. coli* or *Salmonella typhimurium* showed that Li^+ ions as well as Na^+ ions can be co-transported with trimethylglycine [32]. Additionally, Li^+ could have a stimulating effect on proline transport in *E. coli* [33]. As such, the relationship between lithium and living organisms is, even if not essential, existent.

Among the living beings that can potentially be used in biotechnological processes, microorganisms have a predominant role. The fractionation ability of microorganisms has been widely demonstrated [34–40]. Lithium, albeit not widely studied, is no exception, as one study testing different bacteria found Li isotopic fractionation with different rates

between species [41]. However, to our knowledge, no further studies on microbiological fractionation were found to be related to this element.

Microalgae have great acceptance and usefulness for biotechnological applications due to their properties: their ability to adapt to extreme environments [42–49], their ubiquity, their relatively easy culture conditions, and their ability capture CO₂ while growing, helping to alleviate ongoing climate change (reviewed by Kumar et al. [50]). Additionally, related to our subject, they are well suited for metal uptake processes, either as dead biomass or while using them alive [51–57]. Previous studies allowed us to prove the fractionation of ²³⁵U and ²³⁸U employing a microalga isolated from a polluted extreme uranium mining environment with a maximum δ^{235} of 540‰ [58]. Additionally, some studies revealed the possible use of microalgae to recover lithium from a solution [54,59], but no further studies deepening this field have been found. Considering the valuable and promising properties of microalgae in terms of biotechnology, this study aimed to determine whether these microorganisms can fractionate lithium isotopes in laboratory conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae Strains and Growth Conditions

A total of three Chlorophyta microalgae strains were used, two freshwater wildtype strains, an unidentified Chlorophyta (CAFE strain), and *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard (ChlA strain) and one marine wildtype strain, *Tetraselmis mediterranea* (Lucksch) R.E. Norris, Hori & Chihara (strain TmS1), was also used. The three strains were obtained from the Universidad Complutense de Madrid microalgae culture collection. The CAFE strain was isolated from the Entreuka Guelta (SE Mauritania); the ChlA strain was isolated from Doñana National Park (SW, Spain), and the TmS1 strain was isolated from waters off the eastern coast of Sardinia (Italy). The ChlA and TmS1 strains were selected as they belong to Chlorophyte genera used as model systems for freshwater and marine eukaryotic microalgae [60,61]. The CAFE strain was identified in this study, described in CAFE strain identification as *Desmodesmus* sp. and was chosen as a random strain to increase basic knowledge in the field.

Under laboratory conditions, strains were grown in 100 mL cell culture flasks (Greiner; Bio-One Inc., Longwood, NJ, USA) with 20 mL of BG-11 medium (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) for the freshwater algae, and filtered seawater enriched with Guillard's F/2 broth (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) was used for the TmS1 strain. Culture media was prepared according to the manufacturers' instructions. To keep a mid-log-exponential growth, the strains were transferred to a new culture flask within 20 days of its prior transfer. Cultures were maintained at 22 °C with continuous illumination at 80 $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ within the wavelength of 400–700 nm. For the experiments, LiCl (Sigma-Aldrich, BioXtra, $\geq 99.0\%$ purity) was dissolved in the freshwater and marine media.

2.2. CAFE Strain Identification

An isolated CAFE culture was sent to Secugen S.L. (Madrid, Spain) for DNA extraction, amplification of 18S RNA and ITS genes, and sequencing from both ends. These genes have been successfully used in previous Chlorophyte identifications.

The DNA for the PCR was extracted by centrifuging 100 μL of liquid culture and inserting the pellet in an FTA[®] Card. Forward and reverse gene sequences were amplified using the primers indicated in Table 1.

Table 1. Target genes and primers used for the 18S [62] and ITS [63] regions.

| Gene | Primer Name | Primer Sequence |
|------|-------------|-------------------------------|
| 18S | 18SF1 | GGT TGA TYC TGC CAG TAG |
| | 18SR1 | GMW ACC TTG TTA CGA CTT |
| ITS | ITSu1 | GGA AGK ARA AGT CGT AAC AAG G |
| | ITSu4 | RGT TTC TTT TCC TCC GCT TA |

The 18S gene PCR was conducted under the following conditions: 95 °C 15 min + (95 °C 30 s + 55 °C 40 s + 72 °C 2 min) × 35 + 72 °C 10 min. For the ITS region, the following protocol was applied: 95 °C 15 min + (95 °C 30 s + 53 °C 40 s + 72 °C 1 min) × 35 + 72 °C 10 min. For both protocols, the TaqGold (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) polymerase was used. PCR products were checked by visualization in agarose gel. DNA sequencing from both ends was conducted using the reactant BigDye 3.1 followed by capillary electrophoresis in an automatic sequencer ABI 3730xl. The obtained sequences were assembled and edited using the BioEdit software. A consensus sequence conducted for 18S and the ITS genes was compared using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), a National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

The final strain identification was based on the 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer (ITS), and by morphological comparison with the AlgaeBase (www.algaebase.org) (accessed date: 10 September 2020) [64–66]. Internal transcribed spacer (ITS) and 18S ribosomal RNA genes obtained from the CAFE isolate were assembled, edited, and deposited in GenBank.

2.3. Lithium Uptake and Isotope Fractionation Trials

The lithium uptake and Li-isotope fractionation behaviour of the three Chlorophytes was conducted in a bioassay. Cultures were prepared in flasks containing 20 mL of the respective culture media. Lithium reached a concentration of 4.2 mg/L in BG-11 culture medium and a concentration of 2.5 mg/L in F2 medium. Additionally, one control without cells for each medium was established. The initial cellular inoculum was of approximately 8×10^5 cells for TmS1 and CAFE and approximately 7×10^5 cells for ChlA. Cell densities were estimated by counting with counting chambers (Fast Read; Biosigma, Venice, Italy) under a microscope Zeiss 47 30 12-9902 (Zeiss, Oberkochen, Germany).

The bioassay was conducted in aerobic conditions at 22 °C and pH 8.11 for F/2 and at 5.82 for BG/11 cultures. A total of four cultures were prepared for each strain, and each culture was to be centrifuged at a specific time: immediately after inoculation (considered 0 days) or after 3, 12, or 27 days. The whole volume of each culture was centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The pellets were frozen until analysis. Solutions of BG-11 and F/2 enriched with lithium were also analysed during the experimental times to serve as chemical control. Isotopic analysis and total Li quantifications were performed at CIEMAT (Spanish Research Centre for Energy, Environment, and Technology). Li isotopic relationship results were obtained by averaging the data obtained from two pseudo-replicate analyses of each sample.

2.4. Analytical Procedure

2.4.1. Sample Dissolution and Lithium Separation

Algal pellets (mg) were subjected to acid digestion with 5 mL of a HNO₃-H₂O₂ mixture (4:1 v/v) in Teflon beakers and gentle heating on a hotplate until a transparent solution was achieved. Sample solutions were then evaporated until almost dry, and the residues were dissolved in 3 M HNO₃. One millilitre of this solution was brought to a final volume of 10 mL with MilliQ water to quantify the Li by quadrupole-based ICP-MS (Q-ICP-MS) using the external calibration and internal standard method. The drying operation was repeated,

with the remaining volume and the residue being dissolved in 2 mL of HCl 0.2 M, which was used for lithium isotopic analysis after lithium purification through chromatography.

2.4.2. Chromatography

The separation of lithium from other matrices is crucial for precise Li isotope measurement. This step was conducted in a single-step chromatographic separation using 1.5 cm polypropylene columns (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) packed with cation-exchange resin, Dowex 50W-X8 (50–100 mesh size).

Prior to sample loading, the columns were pre-washed with 20 mL of 6 M HCl and were then conditioned with 10 mL of 0.2 M HCl. Samples in 0.2 M HCl medium were loaded and were subsequently eluted with 40 mL of 0.2 M HCl, with the eluate volume ranging from 20 mL to 32 mL of the corresponding to lithium fraction. These 12 mL were collected and were gently evaporated until dry, after which the residue was dissolved in 5 mL of 2% HNO₃ (*v/v*).

The lithium solution of each sample was quantified, and its concentration was adjusted by dilution in 2% HNO₃ to an approximate concentration of 1 ppb before isotopic mass spectrometry analysis.

2.4.3. Mass Spectrometry

The lithium concentration in samples was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) using a quadrupole instrument equipped with a collision cell (iCAP Q, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and by applying the external calibration quantification method and internal standardization. The standard calibration solutions were prepared daily by dilution from a 1000 mg/L Li stock solution. According to the concentration obtained in each sample, these were diluted to a Li content of 1–2 ng/mL.

Isotope compositions were measured on an Element 2 ICP-MS (Thermo Fisher Scientific). Tuning parameters are adjusted before the analyses to maximize instrument sensitivity and stability.

The ⁶Li/⁷Li ratio was measured using a sample-standard bracketing method, where a blank and a certified isotopic standard (IRMM-016, Joint Research Centre European Commission) were measured before and after each sample to correct for the instrumental drift and mass bias. The isotope standard was prepared by matching its concentration with that of the sample, that is, 1 µg/L, because an uneven concentration between the sample and the bracketing standards affects the accuracy of the Li isotope analysis. Additionally, blanks were systematically determined and were negligible. The uncertainty associated with the measurement of all ⁶Li/⁷Li isotopic ratios was less than their variation between samples.

3. Results

3.1. CAFE Strain Identification

The CAFE strain was identified as belonging to the genus *Desmodesmus*. The identification was based both on the ITS and 18S RNA gene sequences, and on morphological comparison with the AlgaeBase (algaebase.org) (accessed date: 10 September 2020).

Under the BLAST search, both the *Desmodesmus* and *Acutodesmus* genera showed an identity over 99% with the sequenced regions. The final classification of CAFE as *Desmodesmus* and not *Acutodesmus* was determined by morphological comparison with the AlgaeBase. Species-level identification was not reached. The obtained sequences were uploaded to GenBank with the accession numbers MT462646 for the ITS region and with the number MW185780 for the small subunit ribosomal RNA gene.

3.2. Lithium Uptake

Lithium concentrations in the culture media were analysed, showing 4.2 mg/L of Li in BG-11 + Li and 2.5 mg/L in F2 + Li.

The measure of the Li concentration in the assay confirms that the three microalgae that were tested were apt for lithium uptake (Table 2).

Table 2. Li-mass quantification in each experimental pellet.

| Strain | Day | Pellet Mass (g) | Li Mass in the Pellet (ng) | Li Mass/Biomass (µg/g) |
|--------|-----|-----------------|----------------------------|------------------------|
| TmS1 | 0 | 0.1273 | 887 | 6.96 |
| TmS1 | 3 | 0.2861 | 1946 | 6.8 |
| TmS1 | 12 | 0.1542 | 1113 | 7.21 |
| TmS1 | 27 | 0.4174 | 3447 | 8.26 |
| CAFE | 0 | 0.0971 | 850 | 8.76 |
| CAFE | 3 | 0.1888 | 1265 | 6.7 |
| CAFE | 12 | 0.2261 | 1512 | 6.69 |
| CAFE | 27 | 0.5786 | 4597 | 7.94 |
| ChIA | 0 | 0.1214 | 885 | 7.29 |
| ChIA | 3 | 0.1432 | 784 | 5.48 |
| ChIA | 12 | 0.3876 | 1641 | 4.23 |
| ChIA | 27 | 0.1926 | 6098 | 31.66 |

3.3. Isotope Fractionation Trials

The enrichment factor δ^6 was calculated according to Equation (3), considering $R_{\text{reference}}$ as the isotopic ratio measured in each specific control media. The calculated enrichment factor for each alga is detailed in Table 3.

$$\delta = [(R_{\text{measured}} - R_{\text{reference}}) / (R_{\text{reference}})] \times 1000 \quad (3)$$

Table 3. ^6Li relative abundance and enrichment factor (δ^6) in the experimental cultures.

| Strain | Time (Days) | $^6\text{Li}/^7\text{Li}$ Relative Abundance | | δ^6 |
|--------|-------------|--|-----------------------------|------------|
| | | Pellet (\pm Uncertainty) | Medium (\pm Uncertainty) | |
| TmS1 | 0 | 0.08227 \pm 0.00063 | 0.08239 \pm 0.00098 | −1.45 |
| | 3 | 0.08247 \pm 0.00027 | 0.08201 \pm 0.00061 | 5.58 |
| | 12 | 0.08269 \pm 0.00065 | 0.08229 \pm 0.00036 | 4.80 |
| | 27 | 0.08276 \pm 0.00031 | 0.08207 \pm 0.00010 | 8.35 |
| CAFE | 0 | 0.0897 \pm 0.00068 | 0.08264 \pm 0.00049 | 85.39 |
| | 3 | 0.08303 \pm 0.00085 | 0.08218 \pm 0.00018 | 10.39 |
| | 12 | 0.08447 \pm 0.00096 | 0.08232 \pm 0.00071 | 26.12 |
| | 27 | 0.08556 \pm 0.00087 | 0.08193 \pm 0.00048 | 44.32 |
| ChIA | 0 | 0.0826 \pm 0.00074 | 0.08264 \pm 0.00049 | −0.44 |
| | 3 | 0.08313 \pm 0.00092 | 0.08218 \pm 0.00018 | 11.54 |
| | 12 | 0.08214 \pm 0.00070 | 0.08232 \pm 0.00071 | −2.19 |
| | 27 | 0.08508 \pm 0.00057 | 0.08193 \pm 0.00048 | 38.40 |

4. Discussion

4.1. Lithium Capture

The three strains captured the most in the culture at day 27, but huge differences were found among strains and, arguably, the maximum Li capture was not reached during the period in question. ChIA showed the greatest capture followed by CAFE. According to Li mass relative to wet biomass, TmS1 and CAFE showed a similar uptake without great differences between them. ChIA again proved to be the most effective in incorporating lithium from solution, with a sharp change from day 12 to 27. For this strain, even if no great biomass increase occurred between days 3 and 27, the total Li mass incremented almost eight-fold. According to our results, the optimal moment for biomass recovery would be at day 27. However, further studies need to be conducted to determine on which day the maximum uptake is achieved.

Previous studies conducted with Chlorophytes demonstrated that microalgae can be a potent tool for Li removal from Li polluted waters [59] or from wastewater where Li and Rb are both present [54]. El Naggat et al. [59] evaluated the conditions that yielded the maximum Li capture using the Chlorophyte *Oocystis solitaria*, considering pH, lithium concentration, and temperature the most influential factors. A maximum of 99.95% Li removal was achieved in that assay. Presumably, the maximal uptake conditions would highly depend on the microorganisms used, as each strain has its peculiarities. In our assay, the experimental environment was the same as the conditions in which the culture collection was maintained, thus not causing stress.

Lithium uptake was observed in the three strains within minutes from inoculation, but differences existed. On days 3 and 12, a slight Li-content decline was detected in the CAFE strain, while ChIA depletion was stronger. TmS1 did not show evidence of Li loss. During the last days of the trial, a slight increase in Li capture was observed in CAFE, but it was not enough to restore the initial levels (Figure 1). ChIA took up a total of 6.098 μg , which represents 31.66 ng/g of lithium in wet biomass. That amounts to around four times more lithium than the maximum taken up in the case of CAFE or TmS1.

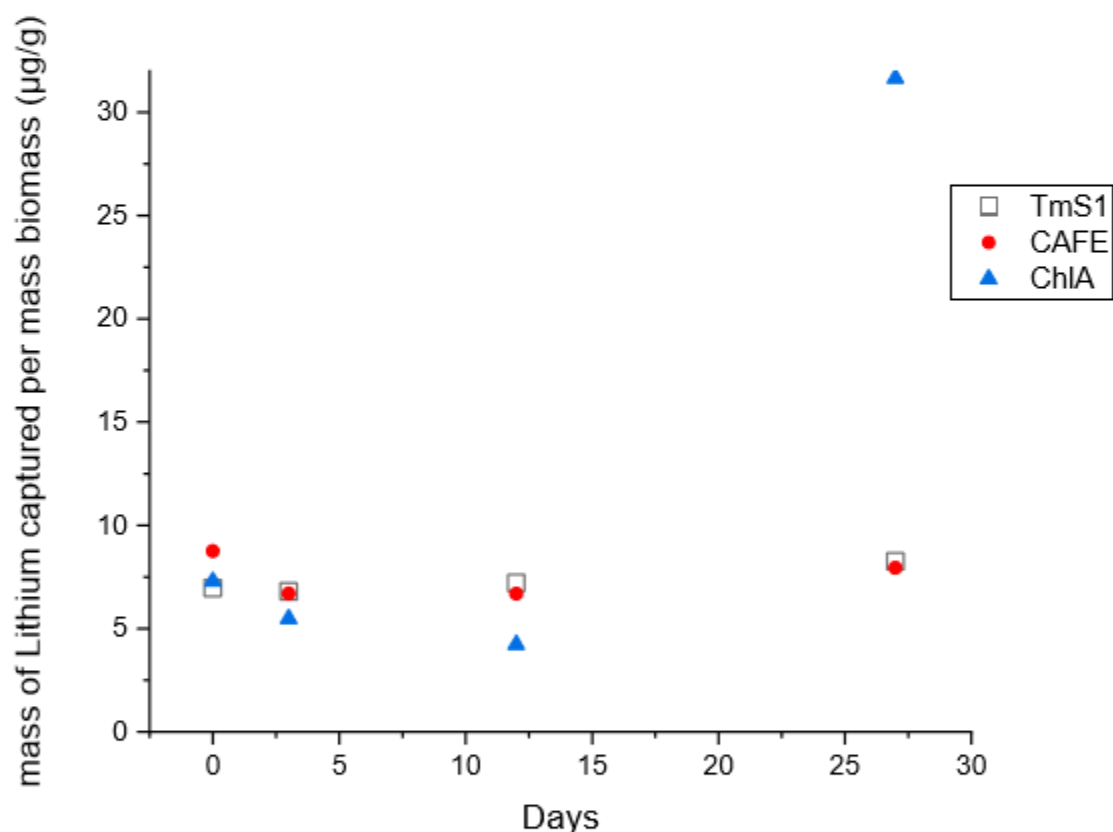


Figure 1. Li capture relative to total biomass in the experimental cultures with additional Li.

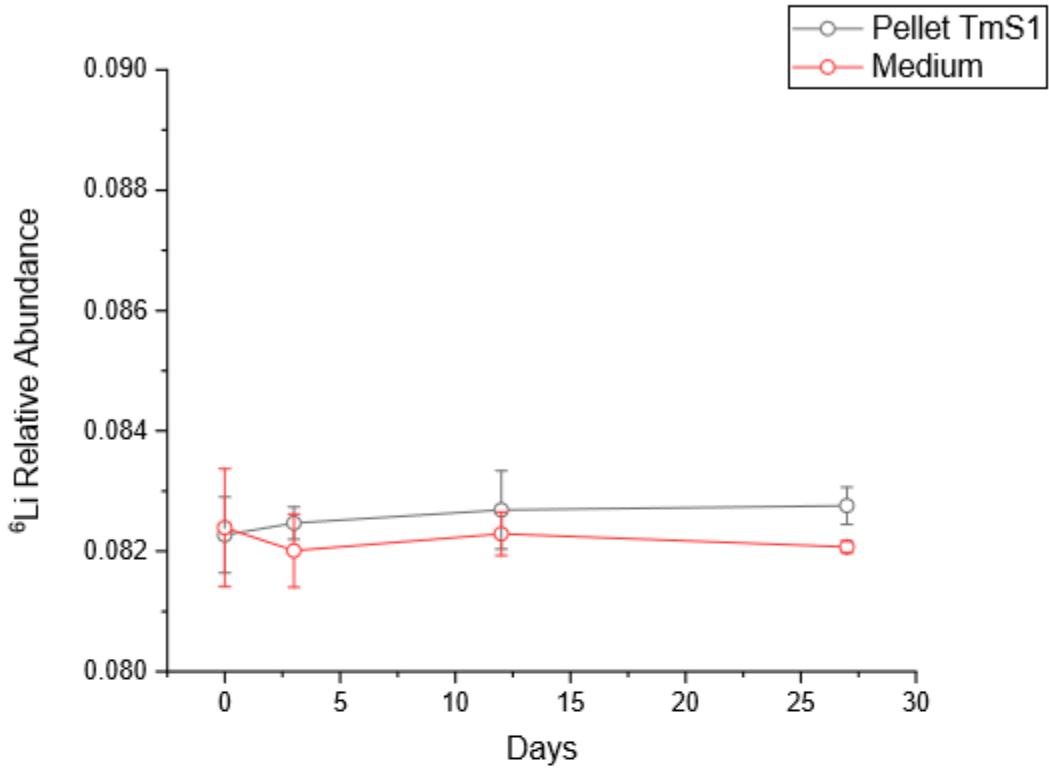
According to Jakobsson et al. [27], lithium uptake may be explained by its competition with sodium, using the same entrance mechanisms; most of its biological effects can be attributed to competition with Na, Mg, and K sites. Na and Li ions have similar properties such as small size, the same acid-base behaviour, and the same number of electrons in the last electron shell [67], which accounts for their similar behaviour in biological systems. High salt concentrations may result in being toxic to microalgae, so the species thriving in saline environments may keep sodium ions away from the cells relying on active transport or may conceal the ions in vacuoles far from metabolic processes as well [68]. Li^+ ions in cells could follow a similar path. A recent study also showed that in *Chlorella vulgaris*, the K^+ concentration affected Li uptake [54]. In this latter study, Li biosorption was observed

followed by desorption in the following days as well as a trend where a decrease in the K^+ medium concentration increased the Li uptake in a media where Rb^+ was also present. The total Li uptake when K^+ concentration was reduced to 60% was 4.70 mg/g dry mass, a 4.48-fold increase compared to the medium with non-altered K^+ concentration. This observation, if further studies are conducted, could lead towards the design of culture media for biotechnological Li capture purposes. Furthermore, this observation extends the idea of the Li behaviour in microbial systems as an incidental substitute for biological ions, such as K^+ , in microalgae.

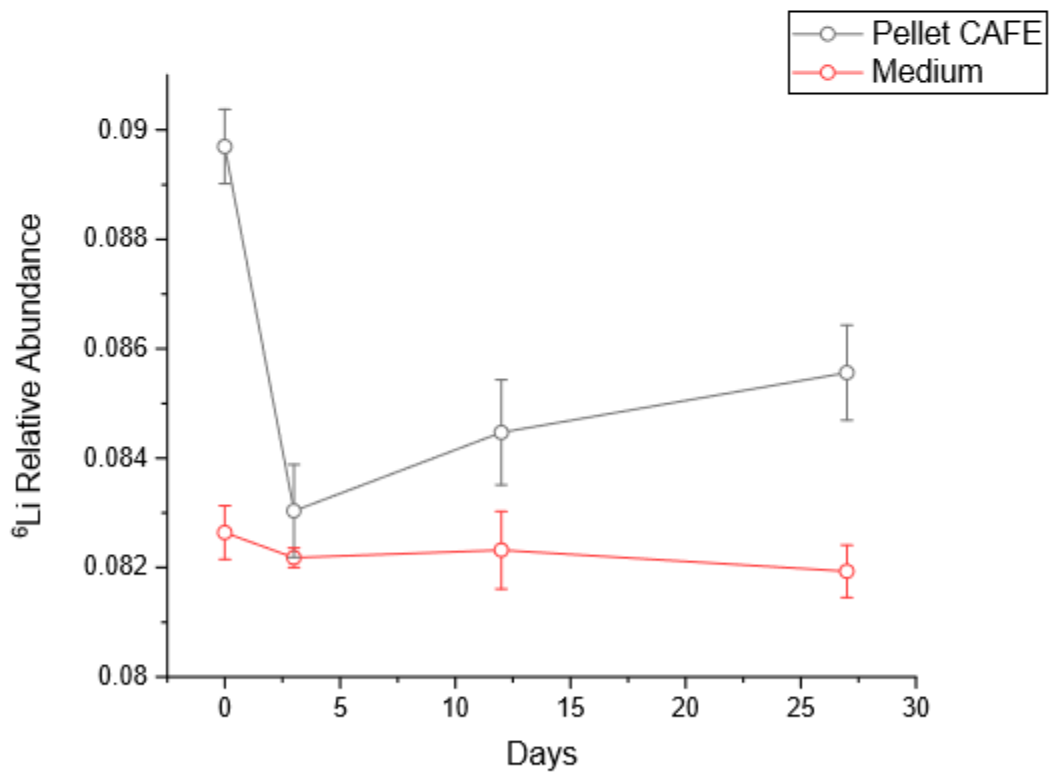
4.2. Fractionation

Since biological isotopic fractionation is a relatively frequent natural process [40], we aimed to obtain lithium isotopic fractionation by taking advantage of microalgae properties. Lithium isotopic fractionation based on the activity of bacteria was already published by Sakaguchi and Tomita (2000) [41], where a maximum δ^6 of 58.7‰ was obtained using the bacteria *Bacillus megaterium*. However, from that point on, little effort and resources have been dedicated to advancing the field of microbial lithium fractionation, as we have not encountered any other publications respecting this topic, particularly in terms of microalgal lithium fractionation. Furthermore, until recently, neither the growth of plants [69] nor phytoplankton [70] had shown a significant Li fractionation ability in naturally occurring lithium concentrations. Nevertheless, a recent study revealed that plants are indeed capable of fractionating 6Li with, e.g., an observed δ^7 of 12.2‰ in rhizomes from a humid region, whereas the δ^7 observed in the grass blades was 6.2‰ [71]. In our study we extended this knowledge, confirming that, under laboratory conditions, some microalgae, or, more precisely, our three strains belonging to the phylum Chlorophyta, can differentiate between lithium isotopes. On the contrary, one study conducted in the Laxa river in Iceland pinpointed that microalgae did not affect Li fractionation in this natural environment [70]. Many different variables could affect the different observed outcomes such as natural and laboratory conditions, Li concentration, algae species, biomass, or geochemical processes that may be involved in natural environments.

Our three strains showed diverse behaviours in Li fractionation, with a preference for 6Li , as shown in Figure 2a–c. As stated by Balter and Vigier (2014) [22], 6Li has a more relevant role in biological systems than 7Li due to the greater diffusion rate of 6Li resulting from the difference in relative mass. Thus, a kinetic isotope effect during Li uptake by our microalgae could explain their preference towards the lighter Li isotope. However, our study does not delve deep into the reasons for Li fractionation, so we cannot ascertain that the kinetic isotope effect is the only process taking place. Opposite results should not be considered abnormal, as algae have previously shown a preference for ^{41}K [72]—the heavier stable K isotope—with K being an element biologically related to Li. Additionally, studies in the different animal cells in mammals evidenced that Li isotopic fractionation varies depending on which organ each cell type belongs to [22]. Some species-specific characteristics are required to fully explain the different behaviours that have been observed, such as the composition of the cell wall, which is species-dependent [73], or the presence of transporters with isotopic differentiation capacity both for influx and efflux from cells. More research is required in this field to understand the reasons hidden behind this phenomenon and to expand the knowledge of each cell physiology and thus to predict possible fractionation outcomes.



(a)



(b)

Figure 2. Cont.

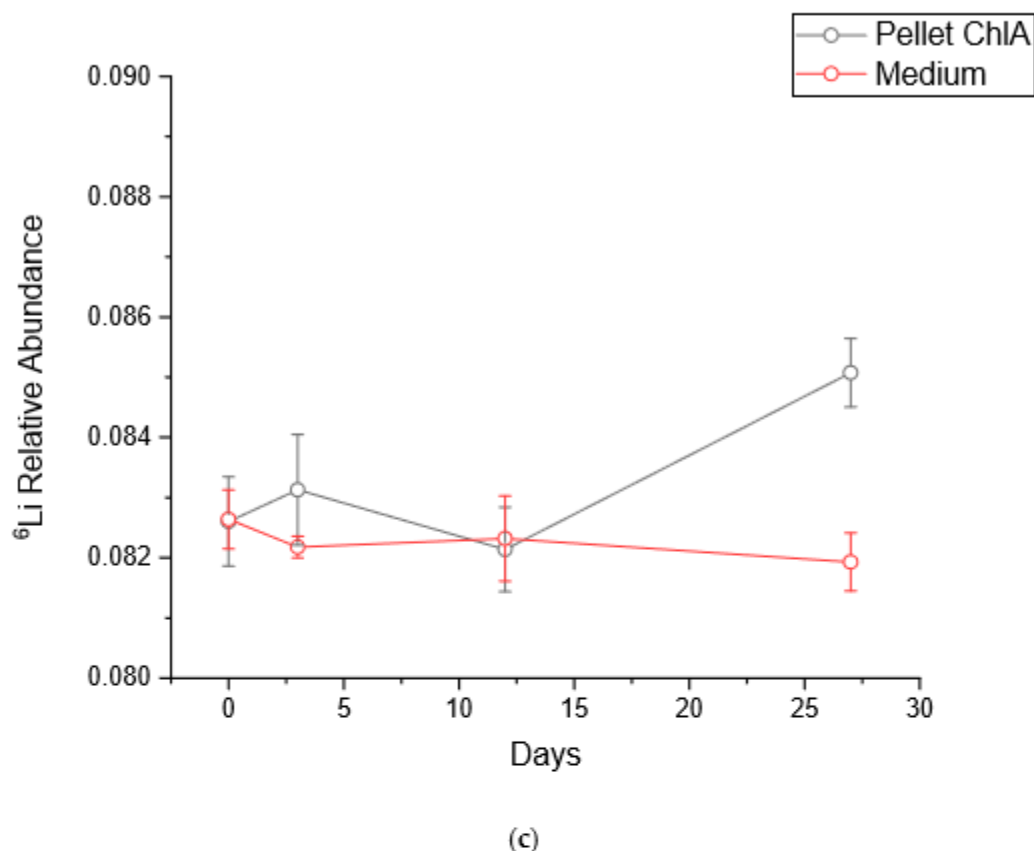


Figure 2. Isotopic relations for ^6Li analysed in the trials with strains (a) TmS1, (b) CAFE, and (c) ChIA, and the observed fractionation on days 0, 3, 12, and 27, respectively. Black circles correspond to the pellet's isotopic relation, while red circles correspond to the media.

4.3. Biotechnological Perspectives

The experimental species were not selected, nor were they in previous contact with high Li concentrations. The two freshwater strains, ChIA and CAFE, were isolated from pristine environments where only trace Li levels are expected. TmS1 was isolated from the Mediterranean Sea, where Li concentrations around $200 \mu\text{g/L}$ are found [74], which are well below our experimental levels. Despite this, Li was captured and isotopically fractionated.

An artificial selection process could be conducted to obtain more efficient Li-capturing strains, which, in turn, could amplify—or not—the δ^6 . For instance, microalgae have been previously selected with the purpose of improving uranium uptake [64]. In our case, an artificial selection towards the obtainment of microalgae strains capable of greater Li capture could be achieved by selecting high-salinity resistant species that avoid the toxic effects of the ions by accumulating them in the vacuoles. However, artificial selection towards the obtainment of high-salinity resistant microalgae cells will not always correlate with an increase in ion capture, as some of the mechanisms are directed towards the ion efflux [68]. Another way to obtain microalgae with such properties could be through bioprospection in environments with high Li concentrations, such as in the Lithium Triangle. In this hypersaline region between Bolivia, Chile, and Argentina, some microalgae species have been detected [75,76]. Recently, a microalga isolated from the Atacama Desert (Chile), part of the Lithium Triangle, has been proposed as a tool for mining waste bioremediation [77]. Extremophile and extremotolerant species living there may possess mechanisms that could lead to increased capture or fractionation. Nevertheless, it must be stated that an almost perfect capture would not be desirable for fractionation purposes as the δ^6 would be close to 0‰.

The fractionation outcomes, as long as the enrichment factor is high enough, would always be beneficial for biotechnological enrichment purposes, whether the microorganisms favour the lighter or heavier isotope. Given that the aim of the present research was to obtain ^6Li , our three species provided this possibility. ^6Li is concentrated in the cellular pellet, so with the removal of the microalgae, we would obtain ^6Li -enriched lithium. With our CAFE strain, a δ^6 of 85.4‰ was obtained moments after inoculation, which also had the maximum relative Li capture (8.76 μg per g of biomass), so this strain biomass could prove to be suitable as an enrichment tool. ChlA also showed a high δ^6 of 38.4‰ at day 27, with an even greater Li relative capture than CAFE (31.66 μg per g of biomass). Complementarily, the liquid media would be enriched in ^7Li . On the contrary, if the species took up ^7Li preferentially, it would be the liquid matrix the one enriched in ^6Li , whereas the pellet would contain concentrated ^7Li .

For industrial up-scale, more species and times as well as other parameters such as light intensity, Li concentration, or culture media composition could be screened to reach optimal capture and fractionation.

5. Conclusions

Microalgae have the potential to become useful for Li enrichment. Though no great capture was achieved during this assay, the vast number of microalgae species and ample environmental conditions for the biotechnological process ensure that an optimal capture will eventually be detected. Additionally, if the Li pathways in microalgae are more widely studied, other approaches such as genetic engineering may be used for the obtainment of high-capturing high-fractionating microalgae strains. Nevertheless, as the Li capture approaches 100%, logically, the Li enrichment nears $\delta^6 = 0\text{‰}$, so a complete Li removal would not be desired for fractionation purposes.

In our assay, the maximum δ^6 was observed with CAFE, a randomly chosen strain, thus pointing to the importance of extensive trials to detect biotechnologically valuable species.

In conclusion, even if knowledge is still limited, our results demonstrate that microalgae are capable of capturing Li and, in doing so, fractionate Li isotopes. Advances in this field might lead the way towards future nuclear biotechnology that will be able to fuel a future mix of electric generation with reliable nuclear (fission or/and fusion) reactors and variable renewables as a perfect combination of CO_2 free emissions sources combined with advanced batteries for electric transportation that are urgently needed to fight climate change. The development of these technologies will require the massive use of Li isotopes, and Gaia could give us the cleanest and more sustainable tool for this fractionation.

Author Contributions: Conceptualization, H.M.D.-A., V.L.-R., C.G.-B., F.T. and E.C. (Eduardo Costas); formal analysis, A.I.B. and E.C. (Estefanía Conde); investigation, H.M.D.-A., V.L.-R. and C.G.-B.; methodology, V.L.-R., C.G.-B., A.I.B. and E.C. (Estefanía Conde); writing—original draft, H.M.D.-A., C.G.-B., A.I.B. and E.C. (Estefanía Conde); writing—review and editing, V.L.-R., F.T. and E.C. (Eduardo Costas). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Fondo Específico de Investigación (FEI-UCM), Fundación General, Universidad Complutense, Madrid (Spain).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Special thanks to Paloma Martínez-Alesón for her technical support and to Beatriz Baselga-Cervera, University of Minnesota, for commentary on the manuscript. Thanks are also given to Secugen S.L. for the 18S and ITS gene sequencing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. International Energy Agency. *World Energy Outlook 2020*; International Energy Agency: Paris, France, 2020.
2. Ongena, J.; Van Oost, G. Energy for future centuries: Prospects for fusion power as a future energy source. *Fusion Sci. Tech.* **2012**, *61*, 3–16. [\[CrossRef\]](#)
3. ITER-The Way to New Energy. Available online: <https://www.iter.org/> (accessed on 3 March 2020).
4. Meija, J.; Coplen, T.B.; Berglund, M.; Brand, W.A.; De Bièvre, P.; Gröning, M.; Holden, N.E.; Irrgeher, J.; Loss, R.D.; Walczyk, T.; et al. Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2016**, *88*, 293–306. [\[CrossRef\]](#)
5. Bradshaw, A.M.; Hamacher, T.; Fischer, U. Is nuclear fusion a sustainable energy form? *Fusion Eng. Des.* **2010**, *86*, 2770. [\[CrossRef\]](#)
6. Nishio, S.; Ohmori, J.; Kuroda, T.; Tobita, K.; Enoeda, M.; Tsuru, D.; Hirose, S.; Sato, Y.; Kawamura, H.; Nakamura, M.; et al. Consideration on blanket structure for fusion DEMO plant at JAERI. *Fusion Eng. Des.* **2006**, *81*, 1271–1276. [\[CrossRef\]](#)
7. Tobita, K.; Nishio, S.; Tanigawa, H.; Enoeda, M.; Isono, T.; Nakamura, H.; Tsuru, D.; Suzuki, S.; Hayashi, T.; Tsuchiya, K.; et al. Torus configuration and materials selection on a fusion DEMO reactor, SlimCS. *J. Nucl. Mater.* **2009**, *386–388*, 888–892. [\[CrossRef\]](#)
8. Herranz García, J.L. *Viabilidad Técnica para la Explotación y Separación Isotópica de Li y Prospectiva en el Mercado de Baterías de ION-7Li y de 6Li como Material Base de Diseño en Reactores de Fusión Nuclear*; E.T.S.I. Minas (UPM): Madrid, Spain, 2013.
9. Giegerich, T.; Battes, K.; Schwenzler, J.C.; Day, C. Development of a viable route for lithium-6 supply of DEMO and future fusion power plants. *Fusion Eng. Des.* **2019**, *149*, 111339. [\[CrossRef\]](#)
10. Cui, L.; Yang, X.; Wang, J.; He, H.; Guo, Y.; Cheng, F.; Zhang, S. Theoretical prediction of 6 Li/ 7 Li separation in solvent extraction system using Urey model. *Chem. Eng. J.* **2019**, *358*, 435–445. [\[CrossRef\]](#)
11. Brooks, S.C.; Southworth, G.R. History of mercury use and environmental contamination at the Oak Ridge Y-12 Plant. *Environ. Pollut.* **2011**, *159*, 219–228. [\[CrossRef\]](#)
12. Zhang, P.; Wang, M.; Sun, J.; Shao, F.; Jia, Y.; Jing, Y. Lithium Isotope Green Separation Using Water Scrubbing. *Chem. Lett.* **2019**, *48*, 1541–1543. [\[CrossRef\]](#)
13. Burton, K.W.; Vigier, N. Lithium Isotopes as Tracers in Marine and Terrestrial Environments. In *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry. Advances in Isotope Geochemistry*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 41–59. [\[CrossRef\]](#)
14. Taylor, T.I.; Urey, H.C. Fractionation of the Lithium and Potassium Isotopes by Chemical Exchange with Zeolites. *J. Chem. Phys.* **1938**, *6*, 429. [\[CrossRef\]](#)
15. Pistiner, J.S.; Henderson, G.M. Lithium-isotope fractionation during continental weathering processes. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2003**, *214*, 327–339. [\[CrossRef\]](#)
16. Huh, Y.; Chan, L.H.; Edmond, J.M. Lithium isotopes as a probe of weathering processes: Orinoco River. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2001**, *194*, 189–199. [\[CrossRef\]](#)
17. Vigier, N.; Gislason, S.R.; Burton, K.W.; Millot, R.; Mokadem, F. The relationship between riverine lithium isotope composition and silicate weathering rates in Iceland. *Earth Planet. Sci. Lett.* **2009**, *287*, 434–441. [\[CrossRef\]](#)
18. Pogge von Strandmann, P.A.E.; Kasemann, S.A.; Wimpenny, J.B. Lithium and Lithium Isotopes in Earth's Surface Cycles. *Elements* **2020**, *16*, 253–258. [\[CrossRef\]](#)
19. Hoefs, J.; Sywall, M. Lithium isotope composition of Quaternary and Tertiary biogenic carbonates and a global lithium isotope balance. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1997**, *61*, 2679–2690. [\[CrossRef\]](#)
20. Rudnick, R.L.; Tomascak, P.B.; Njo, H.B.; Gardner, L.R. Extreme lithium isotopic fractionation during continental weathering revealed in saprolites from South Carolina. *Chem. Geol.* **2004**, *212*, 45–57. [\[CrossRef\]](#)
21. Rudnick, R.L.; Nakamura, E. Preface to "Lithium isotope geochemistry". *Chem. Geol.* **2004**, *212*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
22. Balter, V.; Vigier, N. Natural variations of lithium isotopes in a mammalian model. *Metallomics* **2014**, *6*, 582–586. [\[CrossRef\]](#)
23. Sherman, W.R.; Munsell, L.Y.; Wong, Y.-H.H. Differential Uptake of Lithium Isotopes by Rat Cerebral Cortex and Its Effect on Inositol Phosphate Metabolism. *J. Neurochem.* **1984**, *42*, 880–882. [\[CrossRef\]](#)
24. Lieberman, K.; Alexander, G.J.; Sechzer, J.A. Stable isotopes of lithium: Dissimilar biochemical and behavioral effects. *Experientia* **1986**, *42*, 985–987. [\[CrossRef\]](#)
25. Stoll, P.M.; Stokes, P.E.; Okamoto, M. Lithium isotopes: Differential effects on renal function and histology. *Bipolar Disord.* **2001**, *3*, 174–180. [\[CrossRef\]](#)
26. Lieberman, K.W.; Alexander, G.J.; Stokes, P. Dissimilar effects of lithium isotopes on motility in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1979**, *10*, 933–935. [\[CrossRef\]](#)
27. Jakobsson, E.; Argüello-Miranda, O.; Chiu, S.W.; Fazal, Z.; Kruczek, J.; Nunez-Corrales, S.; Pandit, S.; Pritchett, L. Towards a Unified Understanding of Lithium Action in Basic Biology and its Significance for Applied Biology. *J. Membr. Biol.* **2017**, *250*, 587–604. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Shahzad, B.; Mughal, M.N.; Tanveer, M.; Gupta, D.; Abbas, G. Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 103–115. [\[CrossRef\]](#)
29. Dolara, P. Occurrence, exposure, effects, recommended intake and possible dietary use of selected trace compounds (aluminium, bismuth, cobalt, gold, lithium, nickel, silver). *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *65*, 911–924. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Tanveer, M.; Hasanuzzaman, M.; Wang, L. Lithium in Environment and Potential Targets to Reduce Lithium Toxicity in Plants. *J. Plant. Growth Regul.* **2019**, *38*, 1574–1586. [\[CrossRef\]](#)
31. Shahzad, B.; Tanveer, M.; Hassan, W.; Shah, A.N.; Anjum, S.A.; Cheema, S.A.; Ali, I. Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities—A review. *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *107*, 104–115. [\[CrossRef\]](#)

32. Lopilato, J.; Tsuchiya, T.; Wilson, T.H. Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethylgalactoside transport by the melibiose transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1978**, *134*, 147–156. [[CrossRef](#)]
33. Kayama-Gonda, Y.; Kawasaki, T. Role of lithium ions in proline transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1979**, *139*, 560–564. [[CrossRef](#)]
34. Granger, J.; Sigman, D.M.; Lehmann, M.F.; Tortell, P.D. Nitrogen and oxygen isotope fractionation during dissimilatory nitrate reduction by denitrifying bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **2008**, *53*, 2533–2545. [[CrossRef](#)]
35. Kritee, K.; Blum, J.D.; Johnson, M.W.; Bergquist, B.A.; Barkay, T. Mercury stable isotope fractionation during reduction of Hg(II) to Hg(0) by Mercury resistant microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1889–1895. [[CrossRef](#)]
36. Macko, S.A.; Fogel, M.L.; Hare, P.E.; Hoering, T.C. Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms. *Chem. Geol. Isot. Geosci. Sect.* **1987**, *65*, 79–92. [[CrossRef](#)]
37. Penger, J.; Conrad, R.; Blaser, M. Stable carbon isotope fractionation of six strongly fractionating microorganisms is not affected by growth temperature under laboratory conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2014**, *140*, 95–105. [[CrossRef](#)]
38. Chambers, L.A.; Trudinger, P.A. Microbiological fractionation of stable sulfur isotopes: A review and critique. *Geomicrobiol. J.* **1979**, *1*, 249–293. [[CrossRef](#)]
39. Pokrovsky, O.S.; Viers, J.; Emnova, E.E.; Kompantseva, E.I.; Freydier, R. Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hydr)oxides: Possible structural control. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2008**, *72*, 1742–1757. [[CrossRef](#)]
40. Wiederhold, J.G. Metal stable isotope signatures as tracers in environmental geochemistry. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 2606–2624. [[CrossRef](#)]
41. Sakaguchi, T.; Tomita, O. Bioseparation of Lithium Isotopes by Using Microorganisms. *Resour. Environ. Biotechnol.* **2000**, *3*, 173–182.
42. García-Balboa, C.; Baselga-Cervera, B.; García-Sánchez, A.; Igual, J.M.; Lopez-Rodas, V.; Costas, E. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquat. Toxicol.* **2013**, *144–145*, 116–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. López-Rodas, V.; Marvá, F.; Rouco, M.; Costas, E.; Flores-Moya, A. Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations. *Chemosphere* **2008**, *72*, 703–707. [[CrossRef](#)]
44. Vadlamani, A.; Viamajala, S.; Pendyala, B.; Varanasi, S. Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 7284–7294. [[CrossRef](#)]
45. Abinandan, S.; Subashchandrabose, S.R.; Cole, N.; Dharmarajan, R.; Venkateswarlu, K.; Megharaj, M. Sustainable production of biomass and biodiesel by acclimation of non-acidophilic microalgae to acidic conditions. *Bioresour. Technol.* **2019**, *271*, 316–324. [[CrossRef](#)]
46. Baselga-Cervera, B.; García-Balboa, C.; Díaz-Alejo, H.M.; Costas, E.; López-Rodas, V. Rapid Colonization of Uranium Mining-Impacted Waters, the Biodiversity of Successful Lineages of Phytoplankton Extremophiles. *Microb. Ecol.* **2020**, *79*, 576–587. [[CrossRef](#)]
47. McGraw, V.E.; Brown, A.R.; Boothman, C.; Goodacre, R.; Morris, K.; Sigee, D.; Anderson, L.; Lloyd, J.R. A novel adaptation mechanism underpinning algal colonization of a nuclear fuel storage pond. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kottuparambil, S.; Jin, P.; Agusti, S. Adaptation of Red Sea Phytoplankton to Experimental Warming Increases Their Tolerance to Toxic Metal Exposure. *Front. Environ. Sci.* **2019**, *7*. [[CrossRef](#)]
49. Sánchez-Alvarez, E.L.; González-Ledezma, G.; Bolaños Prats, J.A.; Stephano-Hornedo, J.L.; Hildebrand, M. Evaluating *Marinichlorella kaistiae* KAS603 cell size variation, growth and TAG accumulation resulting from rapid adaptation to highly diverse trophic and salinity cultivation regimes. *Algal Res.* **2017**, *25*, 12–24. [[CrossRef](#)]
50. Suresh Kumar, K.; Dahms, H.U.; Won, E.J.; Lee, J.S.; Shin, K.H. Microalgae- A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *113*, 329–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Mehta, S.K.; Gaur, J.P. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2005**, *25*, 113–152. [[CrossRef](#)]
52. Monteiro, C.M.; Castro, P.M.L.; Malcata, F.X. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 299–311. [[CrossRef](#)]
53. Sandau, E.; Sandau, P.; Pulz, O. Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnol.* **1996**, *16*, 227–235. [[CrossRef](#)]
54. Kaštánek, P.; Kronusová, O.; Kaštánek, F.; Brányiková, I.; Prochazková, G.; Jandová, J.; Brányik, T.; Bišová, K. Selective bioaccumulation of rubidium by microalgae from industrial wastewater containing rubidium and lithium. *J. Appl. Phycol.* **2018**, *30*, 461–467. [[CrossRef](#)]
55. Levy, J.L.; Angel, B.M.; Stauber, J.L.; Poon, W.L.; Simpson, S.L.; Cheng, S.H.; Jolley, D.F. Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species. *Aquat. Toxicol.* **2008**, *89*, 82–93. [[CrossRef](#)]
56. Saavedra, R.; Muñoz, R.; Taboada, M.E.; Vega, M.; Bolado, S. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresour. Technol.* **2018**, *263*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Terry, P.A.; Stone, W. Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*. *Chemosphere* **2002**, *47*, 249–255. [[CrossRef](#)]
58. Baselga-Cervera, B.; García-Balboa, C.; López-Rodas, V.; Fernández Díaz, M.; Costas, E. Evidence of microalgal isotopic fractionation through enrichment of depleted uranium. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. El-Naggar, N.E.A.; Hamouda, R.A.; Rabei, N.H.; Mousa, I.E.; Abdel-Hamid, M.S. Phycoremediation of lithium ions from aqueous solutions using free and immobilized freshwater green alga *Oocystis solitaria*: Mathematical modeling for bioprocess optimization. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 19335–19351. [[CrossRef](#)]
60. Scaife, M.A.; Nguyen, G.T.D.T.; Rico, J.; Lambert, D.; Helliwell, K.E.; Smith, A.G. Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *Plant J.* **2015**, *82*, 532–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Gutiérrez, C.L.; Muñoz, C.; San Martín, M.; Cadoret, J.P.; Henríquez, V. Chloroplast Dual Divergent Promoter Plasmid for Heterologous Protein Expression in *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae, Chlorodendrales). *J. Phycol.* **2020**, *56*, 1066–1076. [[CrossRef](#)]
62. Wang, Y.; Tian, R.M.; Gao, Z.M.; Bougouffa, S.; Qian, P.-Y. Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S/18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e90053. [[CrossRef](#)]
63. Cheng, T.; Xu, C.; Lei, L.; Li, C.; Zhang, Y.; Zhou, S. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Mol. Ecol. Resour.* **2016**, *16*, 138–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Baselga-Cervera, B.; Romero-López, J.; García-Balboa, C.; Costas, E.; López-Rodas, V. Improvement of the uranium sequestration ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChlSP strain) isolated from extreme uranium mine tailings through selection for potential bioremediation application. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 523. [[CrossRef](#)]
65. Zhao, Z.; Rasool, M.A.; Chen, C.; Ma, S.; Wang, L.; Huang, G. Identification and screening of multiple tropical microalgal strains for antioxidant activity in vitro. *Food Biosci.* **2020**, *36*, 100649. [[CrossRef](#)]
66. Jeong, D.; Jang, A. Exploration of microalgal species for simultaneous wastewater treatment and biofuel production. *Environ. Res.* **2020**, *188*, 109772. [[CrossRef](#)]
67. Litio y Sodio-Propiedades. Available online: <https://elementos.org.es/litio-y-sodio> (accessed on 20 January 2021).
68. Hagemann, M. Coping with High and Variable Salinity: Molecular Aspects of Compatible Solute Accumulation. In *The Physiology of Microalgae*; Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., Eds.; Springer International Publishing: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; pp. 359–372. [[CrossRef](#)]
69. Clergue, C.; Dellinger, M.; Buss, H.L.; Gaillardet, J.; Benedetti, M.F.; Dessert, C. Influence of atmospheric deposits and secondary minerals on Li isotopes budget in a highly weathered catchment, Guadeloupe (Lesser Antilles). *Chem. Geol.* **2015**, *414*, 28–41. [[CrossRef](#)]
70. Pogge von Strandmann, P.A.E.; Burton, K.W.; Opfergelt, S.; Eiríksdóttir, E.S.; Murphy, M.J.; Einarsson, A.; Gislason, S. The effect of hydrothermal spring weathering processes and primary productivity on lithium isotopes: Lake Myvatn, Iceland. *Chem. Geol.* **2016**, *445*, 4–13. [[CrossRef](#)]
71. Li, W.; Liu, X.M.; Chadwick, O.A. Lithium isotope behavior in Hawaiian regoliths: Soil-atmosphere-biosphere exchanges. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2020**, *285*, 175–192. [[CrossRef](#)]
72. Li, W. Vital effects of K isotope fractionation in organisms: Observations and a hypothesis. *Acta Geochim.* **2017**, *36*, 374–378. [[CrossRef](#)]
73. Alhattab, M.; Kermanshahi-Pour, A.; Brooks, M.S.L. Microalgae disruption techniques for product recovery: Influence of cell wall composition. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 61–88. [[CrossRef](#)]
74. Morozov, N.P. (Table 2d) Lithium and rubidium concentrations in waters of the Mediterranean Sea. *PANGAEA* **1968**. [[CrossRef](#)]
75. Hayashida, G.; Schneider, C.; Espindola, L.; Arias, D.; Riquelme, C.; Wulff-Zottele, C.; Díaz-Palma, P.; Rivas, M. Characterization of a Chlorophyta microalga isolated from a microbial mat in Salar de Atacama (northern Chile) as a potential source of compounds for biotechnological applications. *Phycol. Res.* **2017**, *65*, 202–211. [[CrossRef](#)]
76. Hernández, K.L.; Yannicelli, B.; Olsen, L.M.; Dorador, C.; Menschel, E.J.; Molina, V.; Remonsellez, F.; Hengst, M.B.; Jeffrey, W.H. Microbial Activity Response to Solar Radiation across Contrasting Environmental Conditions in Salar de Huasco, Northern Chilean Altiplano. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1857. [[CrossRef](#)]
77. Martínez, M.; Leyton, Y.; Cisternas, L.; Riquelme, C. Metal Removal from Acid Waters by an Endemic Microalga from the Atacama Desert for Water Recovery. *Minerals* **2018**, *8*, 378. [[CrossRef](#)]

6.8 Resultados adicionales: Cepas bacterianas y su uso para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo y óxido de difenilo (HTF).

Nº publicación: ES 2 841 973 A1

El documento de la patente publicada puede encontrarse en el Anexo.



7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Las actividades humanas tienen un peso importante en el destino de los ecosistemas terrestres y acuáticos. La demanda de energía mundial continúa creciendo. Esto, sumado a los objetivos de descarbonización globales en aras de limitar el calentamiento planetario, está repercutiendo en las formas de obtener energía por las que apuestan los diferentes gobiernos de todo el mundo. La energía nuclear de fisión es una energía en alza. Su ciclo productivo no emite gases de efecto invernadero, es una energía eficiente y aporta energía a la red de forma ininterrumpida – al contrario que la mayoría de las renovables como las solares o la eólica. Además existen nuevas tecnologías, como los reactores modulares pequeños, que, previsiblemente, harán de la implantación de centrales nucleares un proceso más sencillo y menos costoso.

De cara a un futuro medio-lejano se espera el mayor desarrollo de la energía nuclear de fusión. Aunque no se haya logrado aún obtener energía neta con ella, está avanzando rápidamente y se prevé que existan reactores comerciales en pocas décadas. Esta fuente de energía combinaría una gran eficiencia energética con la ausencia de residuos peligrosos.

A su vez, una manera de lograr una mejor distribución de la energía es mediante baterías. Las baterías son un componente esencial en los aparatos tecnológicos actuales, pero también en la movilidad de presente y futuro para permitir su electrificación. El plan es también colocar baterías adheridas a centrales de producción intermitente, como las solares, para poder aportar energía a la red de manera continuada.

Estos procesos tan determinantes para el futuro energético están basados mayoritariamente en dos elementos: el uranio y el litio. Ambos son el metal más pesado y el más ligero, respectivamente, que se encuentran de manera natural en la corteza terrestre, con una concentración estimada de 2,7ppm para el uranio y 20ppm para el litio [181].

Sin embargo y a pesar de que son cruciales para lograr el objetivo de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en la Tierra, la minería para obtener estos elementos de interés tiene un impacto medioambiental que no debe despreciarse, más teniendo en cuenta las futuras previsiones de demanda.

7.1. Biodiversidad

La minería de uranio lleva aparejada la creación de charcas de contención de aguas residuales. El proceso de lixiviación requiere grandes cantidades de agua ácida que arrastra consigo metales pesados. Estas charcas de nueva creación, entonces,

presentan características que pueden resultar tóxicas para los productores primarios. En este estudio se ha mostrado que los valores de diversidad α de microorganismos fotosintéticos en las charcas estudiadas están alejados de los valores que se encontrarían en un ecosistema normal [182]. La diversidad de los microorganismos encontrados en estas charcas se corresponde con la encontrada en otros lugares con altas concentraciones de metales [183], [184], encontrando pocas especies que tengan densidades altas a lo largo de los muestreos analizados en el macizo que incluye Portugal (Castelejo, Mortórios y Quinta do Bispo) y España (Saelices y Villavieja).

Según las estimaciones por conteo realizadas, Villavieja es la charca que menos células por mililitro mantiene (poco más de 1000). Pese a ello, Quinta do Bispo tiene unos índices de diversidad inferiores debido al desequilibrio en la concentración de células de las diferentes especies que allí habitan (más de 30.000 céls/mL de *Schroederia* sp.), factor de pesada influencia en las ecuaciones. El ejemplo de lo contrario sería Saelices, que con una especie menos que Quinta do Bispo y un mucho menor número de células totales por mililitro, obtiene valores para los índices Shannon y Simpson superiores ya que las densidades de las especies están más equilibradas (Para Saelices se calculó un índice Shannon de 1,16 y un índice Simpson de 0,63, mientras que para Quinta do Bispo el índice Shannon fue 0,63 y el índice Simpson, 0,32).

Dentro de las especies encontradas y analizadas hay taxones más sensibles a las condiciones presentes en las charcas residuales de minería de uranio: la presencia de cianobacterias en las charcas de estudio se restringe a las aguas de Castelejo y Mortórios, aquellas con un pH más alto, en relación con la exigua tolerancia a la acidez de las cianobacterias [185], [186]. Aunque también se han identificado cianobacterias en drenajes ácidos de minas con pH muy bajo (≤ 3) [187]–[189]. En Villavieja, se encontraron cuatro especies de microalgas: tres pertenecientes al filo Chlorophyta y una al filo Euglenozoa. Se corresponden con géneros ya encontrados en ambientes ácidos extremos [184], [190]–[192], especialmente los géneros *Chlamydomonas* y *Euglena* [154], [193]. De hecho, *Euglena mutabilis* es una especie utilizada como indicador de aguas residuales de minería [194], habiendo también especies relacionadas como *E. gracilis* apenas presentes en aguas ácidas pero que toleran pH ácidos [195]. Dentro del género *Chlamydomonas* está la especie *Chlamydomonas acidophila*, con un pH óptimo para su proliferación entre 3 y 5 [196], pero resistiendo a pH inferiores a 1 [197]. También en minas ácidas, pero de carbón, habitaba la especie *Chlamydomonas pitschmannii* [198].

En todas las aguas salvo en Villavieja también hay diatomeas como *Nitzschia* sp. y *Pleurosigma acuminatum*. Las diatomeas ya se habían detectado previamente en ambientes ácidos, aunque relativamente pocas especies aguantan pH por debajo de 3,5, los géneros *Nitzschia*, *Navicula* y la especie *Frustulia rhomboides* entre ellas (revisado por DeNicola [199]); pero no hemos encontrado en la literatura constancia

previa del género *Pleurosigma* habitando ambientes tales. En Castelejo y Mortórios, aparte de ser las únicas localizaciones para cianobacterias, también lo fueron para las conjugadas *Spirogyra* sp. y *Cosmarium parvulum* (Zygnematophyceae).

El ensayo *Microtox* indicó además que las cinco aguas eran altamente tóxicas, con una inhibición de la luminiscencia de *A. fischeri* superior al 95% en todos los casos, mientras que en el agua de Zamorra, la charca prístina control, la inhibición fue menor al 5%. Esta toxicidad va acorde a lo encontrado en otras aguas residuales de minería de uranio donde las aguas resultaron tóxicas a la clorofita *Raphidocelis subcapitata* [200] y a organismos multicelulares como peces cebrá [201] o *Daphnia magna* y *Daphnia longispina* [200], [202].

Por lo tanto, la minería de uranio crea ambientes acuáticos extremos donde la biodiversidad de productores primarios se ve reducida. Esto se debe a las propiedades físicas y químicas del agua: altas concentraciones de metales pesados, pH bajo y radiactividad [202], [203]. En nuestro estudio, las cinco charcas analizadas presentaron valores superiores a la charca prístina control en estas categorías de parámetros, aunque también existían diferencias entre ellas. No todas las charcas resultantes de la minería de uranio son iguales ni entrañan los mismos riesgos ecológicos [200], [201]. Existen diferencias en la toxicidad de las aguas de una charca situada en una anterior mina a cielo abierto y una charca de tratamiento de efluentes dentro de la misma mina [202]. Esta característica podría ser una razón subyacente de las diferentes características físicas y químicas de las charcas de estudio. Cabe destacar que Antunes y col. [200] determinaron diferencias considerables en el pH y concentración de metales en las aguas de minería de uranio -y una correlación con la toxicidad- según la muestra se tomara en primavera u otoño, siendo más tóxica el agua de otoño. Esta situación fue achacada a la elevación del nivel freático, arrastrando contaminación al agua de la charca procedente de la escorrentía de los suelos circundantes.

Cuando analizamos las aguas residuales del proceso de lixiviación de la minería de uranio, la característica más relevante es su extraordinaria acidez. En el fitoplancton, en general, la acidez, y por lo tanto las concentraciones altas del ion H^+ , incrementan las especies reactivas de oxígeno y provoca inestabilidad en moléculas como la clorofila o el ADN [186]. Los microorganismos capaces de vivir en ambientes ácidos (acidófilos y acidotolerantes) mantienen el pH intracelular a niveles normales, entre 5 y 8,5 [204]–[207]. Para conseguir la tolerancia o resistencia, las células presentan mecanismos que limitan la entrada de protones y/o bombas de protones que expulsan H^+ del interior. *Dunaliella acidophila* cuenta con una pared celular con carga positiva, lo que ayuda a repeler los protones del exterior, además de la bomba ATP- H^+ para expulsar protones [197]. Se ha observado que algunas microalgas también utilizan vacuolas para capturar en ellas ácido sulfúrico, aislándolo del resto de la célula [208]. La mayoría de las especies tienen un pH óptimo para su crecimiento alrededor de 7,

pero cuentan con un rango de adaptación fisiológica amplio y las excepciones son numerosas [209]. A pH entre 5 y 8, el crecimiento de *Chlorella* sp. variaba, pero no pueden considerarse concentraciones de protones tóxicas [209].

Respecto a la concentración de iones metálicos, las vetas de metales como el uranio rara vez contienen un único metal. El proceso de lixiviación arrastra los metales presentes en la roca hasta alcanzar concentraciones de diferentes metales pesados que pueden resultar tóxicas a las microalgas. En general, el efecto tóxico de metales pesados en especies modelo de microalgas está ampliamente estudiado. Los metales pesados provocan toxicidad en los microorganismos principalmente mediante (revisado por Kaplan [210]): (a) la unión y consiguiente bloqueo de grupos funcionales en moléculas biológicamente importantes como enzimas o proteínas transportadoras; (b) la sustitución o desplazamiento de iones esenciales en moléculas biológicas y (c), el favorecimiento en la generación de ROS; aunque la toxicidad específica dependerá del organismo y del metal (e.g. Levy y col. [211], Koppel y col. [212]). La resistencia a los metales estará entonces encaminada a defenderse de posibles daños oxidativos mediante la síntesis de enzimas antioxidantes [213]–[216] y/o evitar que los metales interactúen con biomoléculas relevantes mediante mecanismos como transportadores de membrana [217], formación de complejos con fitoquelatinas [218]–[220], secuestro de los metales en vacuolas intracelulares [221], entre otros [222]–[225].

En muchas ocasiones, como en las aguas residuales de minería de uranio, concentraciones altas de metales pesados disueltos en el agua van acompañadas de altas concentraciones de pH ácido. Las clorofitas *Desmodesmus* sp. MAS1 y *Heterochlorella* sp. MAS3 adaptadas a medio ácido (pH = 3,5) tienen cambios fenotípicos y mayor tiempo de generación al pasar a drenajes ácidos de minas [226], indicando cambios en la toxicidad. El pH y la dureza del agua afectan a la toxicidad de los metales [227]–[234]. Con pH ácido, los iones H⁺ compiten con los iones metálicos por su unión a las estructuras celulares. Conforme se incrementa el pH – disminuye la concentración de protones - también aumentan las cargas negativas en la superficie celular, lo que facilita la adsorción de iones metálicos [235]. Por otra parte, un pH más ácido también aumenta la concentración de los iones metálicos disueltos [236].

El Zn resulta tóxico a concentraciones altas, a pesar de ser un oligoelemento necesario como cofactor enzimático en microalgas [237]. Con concentraciones entre 0,5 y 1,5 mg/L, el zinc estimula el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* [238]. Pero en este último estudio también determinaron que con 8 mg/L se reducía un 24% el crecimiento de la misma especie, resultado similar al obtenido por Monteiro y col. [237], que determinaron una Concentración Efectiva 50 (EC₅₀) del Zn a 96 horas de 4,87 mg/L para *Desmodesmus pleiomorphus* y 16,99 mg/L para *S. obliquus*. Según estos artículos, en nuestro estudio se encontrarían concentraciones altamente tóxicas de Zn

para el fitoplancton estudiado en las charcas de Saelices y Villavieja, por lo que podría ser uno de los parámetros que afectarían a la capacidad de adaptación y biodiversidad de las microalgas a las charcas. Hay autores que señalan el límite de toxicidad del Zn para *Scenedesmus* sp. en límites inferiores [239], por lo que el Zn presente en otras charcas también actuaría como agente selectivo. Sin embargo, el pH se relaciona positivamente con la toxicidad del Zn, factor del cual no se estimó la influencia en los artículos citados. El Zn resultó hasta 50 veces más tóxico en *Chlorella* sp. con pH 8.0 que a pH 5.5, con una Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) de 2,7 mg/L a pH 5.5 [227]. Con las concentraciones obtenidas para los diferentes pH de las charcas de estudio, es probable que el zinc sea un agente selectivo en Saelices (20,4 mg/L) y Villavieja (84,28 mg/L) a pesar de contar con pH muy inferior a 5.5.

El cobre cuenta con un papel importante en el transporte de electrones en la respiración y fotosíntesis [70], pero también llega a resultar tóxico para las microalgas. De manera general, el cobre es más interiorizado que el zinc en células del *phylum* Chlorophyta, lo que tal vez influya en la mayor toxicidad de este metal [240]. Dependiendo de la concentración de Zn y Cu en el medio, las clorofitas bioacumulan o bioadsorben diferentes cantidades relativas. A concentraciones bajas, la bioadsorción es mayoritaria, mientras que el porcentaje de metal bioacumulado aumenta conforme aumenta la concentración exterior [240], lo que afectaría a la toxicidad. La toxicidad del cobre en el fitoplancton también es dependiente del pH [228], [241]. De acuerdo con Wilde y col. [227], la recta de regresión entre las variables pH y la IC₅₀ de cobre (μmol/L) es $R^2=0,99$; altamente dependiente. De acuerdo a la recta extraída de ese mismo estudio ($y=0,0083x + 0,0023$), la IC₅₀ (μg/L) de cobre con el pH de Villavieja estaría muy próxima a la concentración analizada, por lo que la concentración de cobre en la charca de Villavieja sería un agente selectivo. Con el pH de las charcas de Saelices y Quinta do Bispo, la IC₅₀ sería mucho mayor que la concentración de cobre observada. No obstante, cabe mencionar que el pH de estas tres charcas está por debajo del límite inferior calculado para esta recta, por lo que la extrapolación no debe considerarse una conclusión definitiva. Para el pH de Castelejo y Mortórios, la IC₅₀ estaría alrededor de 3 μg/L y 44,7 μg/L respectivamente, por lo que probablemente la concentración de cobre sea un agente selectivo ($[Cu] < 5 \mu\text{g/L}$ para Castelejo y 20,43 μg/L para Mortórios).

En cuanto al arsénico, se trata de un semi-metal muy tóxico en su forma inorgánica [242]. En su forma As(V), la más común en el medio ambiente, compite con el ion fosfato (PO₄³⁻) en reacciones enzimáticas, inhibiendo la fotofosforilación y la fosforilación oxidativa [242], [243]. También inhibe el metabolismo del fósforo al unirse a moléculas fosforiladas. La célula cuenta con mecanismos para reducir la toxicidad del arsénico, pero si estos se saturan aumenta la concentración de ROS y se inhibe la división celular [244]. El As(III) es una especie química con niveles tóxicos similares, actuando a través de la unión a grupos tiol en moléculas como al glutatión

[244]. Dependiendo de la especie de microalga, será más tóxico el As(III) o As(V), con *Chlorella* sp. CE-35 siendo más sensible al As(III) ($EC_{50} = 27$ mg/L) que al As(V) ($EC_{50} = 1,15$ mg/L) [245]. En el agua de Villavieja la concentración de arsénico fue de 1,567 mg/L, por lo que probablemente sea un factor selectivo. Sin embargo, se ha observado que la co-ocurrencia de arsénico y cobre en el medio facilitarían la detoxificación del arsénico por parte de las microalgas al incrementarse la producción de especies volátiles de arsénico por biometilación [246].

El plomo en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus acutus* tiene un impacto negativo en el fotosistema II, con diferentes efectos en las dos especies con la misma concentración [247]. En cuatro géneros de clorofitas, concretamente en las especies *Chlorella pyrenoidosa*, *C. ellipsoidea*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *S. obtusiusculus*, *Ankistrodesmus* sp. y *Selenastrum capricornutum*, las concentraciones tóxicas de plomo se encontraban entre 0,5 mg/L y 3 mg/L [248], lejos de las concentraciones encontradas en cualquiera de las charcas de estudio. Los resultados de estos trabajos indican que el plomo podría no ser un factor determinante en la presión selectiva de estas aguas.

Respecto al uranio, a pH 5 la EC_{50} en *C. reinhardtii* del ion uranilo (UO_2^{2+}), la forma de uranio más común disuelta en agua, es de $1,2 \times 10^{-7}$ M [249]. En masa de U se correspondería a 28 $\mu\text{g/L}$, por lo que la concentración de uranio en las cinco aguas de estudio (por encima de 1000 $\mu\text{g/L}$), muy probablemente sea una fuerza selectiva. También en *C. reinhardtii* se determinó que afecta al rendimiento fotosintético [250]. De nuevo, la toxicidad del uranio en microalgas es dependiente del pH del medio. En *Chlorella* sp., la concentración tóxica crónica (a 4 días) de uranio a pH 6,5 y 5,7 fue, respectivamente, 13 $\mu\text{g/L}$ y 34 $\mu\text{g/L}$ [228]. De seguir una recta lineal en función del pH con los dos datos obtenidos, la concentración tóxica a pH 2,7 (pH de Villavieja, el valor más bajo registrado en las charcas), sería de 112,745 $\mu\text{g/L}$. Y en función de la concentración de ion H^+ , sería de 19962 $\mu\text{g/L}$. Ambas concentraciones por debajo del valor de concentración de uranio encontrado en Villavieja.

Una de las particularidades de la minería de uranio es la presencia de isótopos radiactivos dada la naturaleza del metal que se quiere obtener. Los tres isótopos naturales del uranio son radiactivos: ^{234}U , ^{235}U y ^{238}U . Además, en las minas de uranio hay radionucleidos como el radón o isótopos del plomo, bismuto o polonio. Estos isótopos radiactivos presentes en las charcas de uranio (y en otros lugares tanto antropogénicos como naturales), emiten radiación ionizante que puede comprometer la vida de los microorganismos en ese ambiente [233]. La radiación ionizante puede dañar directamente múltiples componentes celulares importantes como proteínas o el material genético hereditario (ADN). Pero también podría causar estrés oxidativo, provocando un daño indirecto [251]–[253] y causa modificaciones en el fotosistema II [253], [254]. Los mecanismos de resistencia o tolerancia de microorganismos a dosis

de radiación altas irán destinados a bloquear o sobreponerse a estos daños, como poseer varias copias del genoma, tener unos mecanismos de reparación del ADN extremadamente eficientes, contar con proteínas específicas que protegen el ADN de la radiación o, nuevamente, producción de moléculas antioxidantes [255]–[257]. La relación entre el Mn y el Fe intracelular también está relacionada con la resistencia a dosis de radiación ionizante [258]. En cuanto a *Chlamydomonas reinhardtii*, posee una fuerte adaptación, con mecanismos inducidos de reparación de ADN [259]. Se ha aislado en tanques de agua utilizados para almacenar residuos nucleares una clorofita perteneciente al género *Coccomyxa* [260], cuya Dosis Letal 50 (LD₅₀) de radiación ionizante se encontraba en los 10.000Gy, pero con capacidad de aguantar dosis de radiación de hasta 20.000Gy, recuperándose la población en menos de dos semanas tras la exposición a la dosis radiactiva. Como referencia, *Chlamydomonas reinhardtii* presenta una LD₅₀ de 500Gy [261] y los humanos una LD₁₀₀ de 10Gy [262]. Villavieja presenta una radiactividad de 4,1 $\mu\text{Sv h}^{-1}$, lo que en un año equivaldría a 0,035 Sv, muy lejos de dosis dañinas para *C. reinhardtii*.

Hecha esta revisión, podría decirse que las características particulares de cada charca crean una presión selectiva diferente, pero que los efectos se deben principalmente a la acidez y a la concentración de uranio, con particularidades. En Mortórios y Castelejo el pH no está en valores extremos, por lo que la toxicidad por acidez no sería un factor principal. Sí lo sería, no obstante, la concentración de metales. Mayoritariamente uranio, pero también podría afectar el cobre en Mortórios. En Quinta do Bispo, por el contrario, el factor fundamental sería el pH, que a su vez limitaría la toxicidad del U, el Zn y el Cu. En Saelices las variables previsiblemente más influyentes son el pH, el uranio y el zinc. Y en Villavieja, el pH, el uranio, el arsénico, el zinc y el cobre. Como la tolerancia o sensibilidad es una característica inherente a las especies (incluso cepas), no es posible confirmar que los comentados sean los principales factores selectivos para todas las especies de microalgas.

7.2 Adaptación

Las cinco charcas del estudio cuentan con características que las convierten en ambientes extremos de los ecosistemas acuáticos naturales de aguas continentales. Los ambientes extremos antropogénicos ejercen una presión selectiva sobre los microorganismos. Solo aquéllos que estén adaptados a las condiciones que presentan podrán proliferar. Además, una de las diferencias con los ambientes extremos naturales es el tiempo geológicamente corto que ha transcurrido desde su aparición hasta el presente (con ambientes extremos antrópicos nuevos originándose cada día), limitando la cantidad de microorganismos que han entrado en contacto con ese medio y el número de generaciones transcurridas. A pesar de estas limitaciones, las características de los microorganismos -como poblaciones con número de individuos muy grande, tiempos de generación muy cortos y ubicuidad- permiten que en muchos

de estos ambientes extremos de nueva aparición haya presencia de microorganismos muy bien adaptados. El origen de estos microorganismos puede estar en las poblaciones que habitaran el ecosistema previamente a la contaminación o pueden haber aparecido por migración. En ambos hipotéticos casos, el origen estará en microorganismos extremófilos o extremotolerantes. Dentro de esta definición entrarían poblaciones mesófilas capaces de aclimatarse fisiológicamente al nuevo ambiente a pesar de ser extremo. Otra posibilidad es que aparecieran mutaciones pre-adaptativas que confirieran resistencia en poblaciones sin contacto previo con el nuevo ambiente.

7.2.1 Evolución y quemostato

El estudio de cómo funciona la adaptación del fitoplancton a estos ambientes es clave para predecir cambios en ecosistemas. La adaptación de las poblaciones a nuevos ambientes estará determinada por la plasticidad de la especie - la capacidad de cambios fenotípicos sin cambiar el genoma (epigenética) - y los cambios genéticos que puedan ocurrir. Los mecanismos evolutivos de las especies elegidas no son muy diferentes de otros microorganismos, pero debiendo tener en consideración que se han utilizado cepas sin reproducción sexual. La transferencia genética horizontal también está presente en microalgas [207], [263]–[266]. Pero, nuevamente, en haploides las mutaciones son la causa final de toda diversidad genética y por ello las causas que se encuentran tras las mutaciones han sido objeto de muchos estudios teóricos y experimentales. La existencia de mutaciones pre-adaptativas en microorganismos, mutaciones aparecidas en una población que pueden resultar beneficiosas en condiciones estresantes posteriores, fue comprobada ya en 1943 por el magníficamente diseñado análisis de fluctuación de Luria y Delbrück [267]. El análisis de fluctuación se rediseñó para poder llevarse a cabo en medios líquidos y demostrar la existencia de estas mutaciones también en organismos unicelulares fotosintéticos acuáticos [79]. Pero mediante el análisis de fluctuación no solo se ha demostrado la existencia de mutaciones pre-adaptativas, preselectivas y generales en todos los experimentos realizados, también permite calcular la tasa de mutación y puede ser utilizado como herramienta para realizar aproximaciones que permitan conocer la capacidad de la adaptación de diferentes especies a medios concretos [268] e, incluso, para obtener cepas biotecnológicamente interesantes [82].

Otro de los experimentos que ayudaron a dilucidar el comportamiento de las mutaciones en poblaciones de microorganismos fue el ideado por Novick y Szilard [178]. En 1950 publicaron un artículo donde describían un mecanismo para el control del crecimiento de microorganismos: el quemostato. Cuando una población de microorganismos crece en un medio con un factor limitante, un flujo continuo de entrada de medio de cultivo nuevo y un flujo idéntico de salida de cultivo crearían una población que acabaría por estabilizar su número en el punto donde la tasa de

crecimiento de los microorganismos es igual a la tasa de eliminación de los que escapan del recipiente, además de contar con tamaños poblacionales muy grandes y controlables mediante el cambio en la concentración de nutrientes aportados. En un ambiente tal se pueden observar las dinámicas de mutación-selección sin la influencia de otros factores externos. Las mutaciones, al ser un proceso aleatorio, aparecerán en la población del quemostato siempre que permanezca un tiempo suficiente en relación al tamaño de población.

Novick y Szilard teorizaron tres posibles escenarios respecto a la *fitness* de las poblaciones mutantes que ocurrieran dentro del quemostato.

En el caso de tener una *fitness* mayor respecto a la población original, la abundancia relativa de la población mutante aumentaría linealmente y la población del quemostato en su práctica totalidad acabaría por ser mutante al sustituir a la población original, aunque una completa sustitución es poco probable que ocurra [269], [270].

Si la mutación es neutra, con una *fitness* prácticamente igual a la cepa original, la abundancia relativa de la población mutante también aumentaría linealmente y podría llegar a sustituir la población original. Esto se debe a que en la población original continuarán apareciendo mutantes. No obstante, también podrían aparecer mutantes dentro de la población mutante, revirtiéndose.

Si la mutación acarrea una reducción de *fitness* respecto a la cepa ancestral, se alcanza un equilibrio en su número determinado por la tasa de mutación y la menor *fitness* del mutante. Al tener una menor *fitness* la selección tenderá a disminuir la presencia de estos mutantes. Sin embargo, al haber también una aparición constante de ellos, se alcanzaría un equilibrio.

En este estudio, además, no se utilizó ningún factor limitante dentro del cultivo ya que la tasa de crecimiento de las microalgas es mucho menor que en bacterias y permite un control adecuado del flujo de entrada y salida de medio, por lo que la selección ocurrida dentro del biorreactor será más inespecífica.

Es, por lo tanto, un experimento que permite aproximarnos al comportamiento de las poblaciones de microorganismos en ambientes confinados y la aparición de mutantes, por lo que es de utilidad a la hora de explorar cómo aparecen poblaciones de microorganismos capaces de habitar en ambientes extremos de nueva creación.

Las charcas con aguas residuales de minería de uranio estudiadas son un ejemplo de ambiente antropogénico extremo, lugares con origen humano aparecidos en tiempos geológicamente cortos y donde la mayoría de las especies no proliferarían. El experimento llevado a cabo con el biorreactor semi-continuo permite observar cómo las microalgas mesófilas del estudio se adaptan a estos ambientes hostiles. Se observa

una gradación en la toxicidad de las aguas, en parte relacionada con la diversidad encontrada. Las tres cepas microalgales estudiadas se adaptaron fisiológicamente a las aguas de Mortórios y Castelejo, además de contar con un mayor número de especies con respecto al resto de charcas (7 y 8 especies, respectivamente). Las aguas de Quinta do Bispo y Saelices, con 5 y 4 especies respectivamente, se situarían con una toxicidad intermedia dentro de las cinco charcas del estudio. Dentro de estas dos, se alcanzó un equilibrio mutación-selección. El equilibrio apareció antes para Quinta do Bispo, teniendo también una mayor densidad de mutantes respecto a Saelices, lo que indicaría una mayor tasa de mutación que confiere resistencia o mejor *fitness* de los mutantes en condiciones no selectivas. El agua de la charca de Villavieja ejerce una presión selectiva tal de no aparecer cepas resistentes a lo largo de 60 generaciones, por lo que muy probablemente las especies estudiadas requieran de más de una mutación para proliferar en este hábitat.

En el Río Tinto, en el suroeste de la Península Ibérica, también encontramos un ambiente extremo [271]. Este río, pese a tener un pH en torno a 2 y muy altas concentraciones de metales (3-20g de Fe por litro de agua), cuenta con una gran biodiversidad microbiana donde los protistas fotosintéticos suponen el 60% de la biomasa y gran parte de las especies encontradas son especies mesófilas cosmopolitas, lo que sugiere capacidad de adaptación rápida al medio [156], [272]. Esta capacidad fue demostrada por Costas y col. [273] mediante un análisis de fluctuación, observando que la clorofita *Dictyosphaerium chlorelloides* (Naumann) adquiría la resistencia a las aguas de Río Tinto gracias a mutaciones espontáneas ocurridas en poblaciones sin contacto previo con el agua tóxica. Estudios con diferentes aguas ácidas y con metales pesados de todo el mundo muestran que hay múltiples especies fitoplanctónicas capaces de habitar estas aguas, ya sea porque se han observado en ellas [153], [154], [157], [274] o porque se ha comprobado la capacidad de adaptación rápida de cepas en laboratorio a las aguas [157], [191], [275]. El estudio aquí expuesto aporta más datos apoyando la idea de que las especies aquí estudiadas tienen gran capacidad de adaptación y de que ésta puede lograrse mediante mutaciones pre-selectivas, en contra de otras teorías que apoyan la adaptación gradual. Como expuesto por Low-Décaire y col. [157], tal vez la capacidad para habitar ambientes extremos esté ampliamente difundida entre comunidades de microorganismos mesófilos.

La hipótesis de que en el mundo microbiano “todo está en todas partes y el ambiente selecciona” ha sido generalmente descartada con evidencias de patrones biogeográficos [276]. Las microalgas identificadas en las charcas tendrían su origen en poblaciones mesófilas anteriores que lograron adaptarse a las nuevas condiciones o en poblaciones extremotolerantes o extremófilas (o que simplemente tuvieran algún mutante posteriormente exitoso) que colonizaron el medio procedentes de otros lugares. La diversidad de taxones dentro de los nuevos ecosistemas dependería de la

llegada de especies y de la extinción, relacionado a su vez con la distancia hasta el lugar de origen de los microorganismos y el tamaño del nuevo ambiente [277]. Sobre estas poblaciones actuarán las fuerzas de selección, especiación/mutación, deriva y migración [278], [279] y donde habría que añadir particularidades de microorganismos como su pequeño tamaño y corto tiempo de generación, que influyen en su respuesta a cambios en el ambiente como fragmentaciones [277]. Además, la composición de comunidades planctónicas es particularmente difícil de interpretar y, a pesar de que “la Paradoja del plancton” fue formulada en 1961 [280], es aún hoy motivo creador de investigación y literatura científica [281], [282], aunque la dinámica de las comunidades microalgales queda fuera del ámbito de este estudio, requiriéndose para ello una investigación más dilatada en el tiempo.

En base a esto y al experimento de adaptación en biorreactor, es plausible que las especies encontradas en Castelejo, Mortórios, Quinta do Bispo y Saelices procedan de especies mesófilas que en un inicio pudieron habitar las charcas por adaptación fisiológica o por tener una mutación previa al contacto que confiera resistencia, de manera similar a la adaptación en biorreactor. En Villavieja el mecanismo podría ser otro. Las mismas tres clorofitas encontradas en Villavieja se encontraron en Saelices. Teniendo en cuenta la distancia y la presión selectiva que ejerce la charca de Villavieja, podría hipotetizarse que las especies primero se adaptaron a Saelices, y después dieron el salto a la charca de Villavieja; aunque también podría haberse facilitado mediante la reproducción sexual en poblaciones totalmente sensibles [81]. De todas formas, tan solo son hipótesis aquí planteadas para cuya confirmación se requeriría mayor estudio: el objetivo de esta investigación no era determinar el origen específico de las cepas encontradas en las charcas, sino aportar información sobre las especies que en ellas habitan y sobre la adaptación de especies mesófilas a las aguas residuales de minería de uranio.

En definitiva, la minería de uranio crea ambientes extremos donde la diversidad de microorganismos fotosintéticos es menor que en ambientes no contaminados, siendo un efecto más que el cambio global tiene sobre las poblaciones de los microorganismos.

7.3 Biotecnología

Una posibilidad para aliviar los efectos perjudiciales que tiene la minería en el medio ambiente sería la utilización de microalgas en procesos biotecnológicos relacionados.

De cara a una biorremediación de aguas residuales de minería de uranio, las microalgas aisladas de las charcas serían una buena opción. Cuentan con mecanismos propios que les permiten sobrevivir en estos ambientes, los cuales a su vez podrían permitir una mayor captura de metales. La idea está ampliamente propuesta con bacterias [283]–[285], pero también hay estudios con microalgas [286]–[290]. Se ha

estudiado la captura de uranio con especies como *Chlamydomonas reinhardtii* [249], [291] o *Spirogyra* sp. [292] y la cepa *Chlamydomonas saelices* de este estudio también ha demostrado esta capacidad [293]. Sería de esperar que también exista captura del resto de iones metálicos.

La captura de los iones metálicos podría adscribirse a dos mecanismos, bioadsorción y bioacumulación. La bioadsorción se trata de un proceso físico-químico pasivo mediante el cual los cationes metálicos se adhieren a los lugares de la pared celular con carga negativa, por lo que serviría para la captación incluso con biomasa muerta. La bioacumulación, por su parte, es la interiorización activa de los iones metálicos mediante enzimas como fitoquelatinas [294].

Mediante la fotosíntesis se incrementa el pH del medio acuático, pero el crecimiento de microalgas también elevaría el pH al capturar nitratos [295], [296], colaborando con la biorremediación doblemente: disminuye la acidez y baja la solubilidad de los iones metálicos.

La gran ventaja de las microalgas en biorremediación consiste en que además captan CO₂ de la atmósfera para la fotosíntesis, contribuyendo a que el proceso sea neutro o incluso negativo en emisiones de carbono, además de ser las responsables del 75% de la producción de oxígeno global [45].

Como beneficio adicional del uso de microalgas, está la valorización de la biomasa. Los restos de biomasa pueden servir para múltiples propósitos en función de las propiedades bioquímicas de la especie utilizada. Como ejemplo, de algunas microalgas se extraen compuestos utilizados en nutrición humana, como el ácido γ -linoleico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA) [297]–[299]; o carotenoides como β -carotenos, utilizados en colorantes alimentarios y como antioxidante, y astaxantina, también con propiedades antioxidantes [265]. Pero el espectro es más amplio, utilizándose también para la producción de antibióticos y antifúngicos [300]–[304], en la preparación de cosméticos [305], [306] e incluso en la producción de bioplásticos [307]. Y, por supuesto, las microalgas pueden utilizarse como biodiésel para obtener energía [308], mejorando la producción de energía neta de las industrias energéticas implicadas.

Algunos procesos biotecnológicos aplicados al litio también podrían resultar de interés industrial. Un gran aliciente es que el litio interactúa mediante diversos mecanismos bioquímicos con las estructuras vivas, lo que tal vez conllevaría una mejor eficiencia de procesos biotecnológicos. La minería y el uso de litio también pueden tener efectos adversos sobre los ecosistemas. Grandes cantidades de este metal que estaban previamente enterradas y lejos de los seres vivos son expuestas en la superficie terrestre en zonas como vertederos tecnológicos, por ejemplo. Es importante estudiar

las posibilidades para el reciclaje de este elemento y los efectos que podría tener en la biosfera.

A pesar de no contar con funciones claras y específicas dentro de los seres vivos, hay autores que proponen el Li como un elemento esencial en fauna ya que la fertilidad disminuye en animales privados de Li en su dieta [309], [310], aunque también hay quien lo señala como lo contrario: un elemento que en la mayoría de organismos no es utilizado biológicamente [311]. En forma de sales se utiliza en medicina humana como tratamiento del trastorno bipolar y para aumentar el efecto de tratamientos antidepresivos [312] y hay evidencias de su influencia en el desarrollo de cáncer [313]. A pesar de ello, la concentración de los iones Li^+ en los fluidos animales no está regulada, lo que es indicativo de que no cumple funciones específicas [314]. En plantas, los efectos del Li son muy variados según especie y concentración (revisado por Shahzad y col. [315]). De manera general, puede decirse que el ion Li^+ interacciona con los seres vivos debido a su similitud con los cationes Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} [316], [317], aunque según E. Jakobsson y col. [314], los efectos biológicos principales del ion Li^+ se deben más específicamente a la competición con iones Na^+ -el catión monovalente con peso atómico más parecido- y con iones Mg^{2+} - el cual cuenta con un radio iónico casi idéntico. En el tratamiento del trastorno bipolar, el ion Li^+ actúa sustituyendo iones Mg^{2+} en determinadas proteínas relacionadas con la enfermedad, pero no en otras metaloproteínas vitales [318]. El ion Li^+ puede unirse a moléculas de Mg-ATP, creando un complejo (Li-Mg)-ATP [319], a enzimas donde el Mg es un cofactor, como la 3'(2'), 5'-bisfosfato nucleotidasa de levaduras, que se inhibe con presencia de Li con una IC_{50} de 0,1mM [320], o a la inositol monofosfatasa [321]. Actualmente está planteada la hipótesis, apoyada por estudios como los citados y más (revisado por Birch [322]), de que el Li es capaz de inhibir enzimas dependientes de Mg ya que lo desplaza de sus sitios de unión, alterando las propiedades de la enzima.

Respecto a la relación entre Na y Li, en aguas con el mismo origen pero que sufrieron un tratamiento en el que pasaron de tener una alta concentración en NaCl y baja en LiCl a concentraciones inversas, se han encontrado diferentes grupos de procariontes, lo que hace pensar que los mecanismos de tolerancia frente al Na y el Li puedan ser diferentes [323]. Por contra, un estudio proteómico en *Rhodococcus* sp. A5_{wh} - procarionte capaz de proliferar a concentraciones de Li 1M- reveló que en presencia de Li se activaban proteínas metabólicas que sintetizan metabolitos osmóticos orgánicos intracelulares como el glicerol - que otorga tolerancia a sales-, proteínas relacionadas con la respuesta a estrés y con la transcripción y traducción [324], una respuesta acorde con toxicidad por sal.

En algas los efectos del ion Li^+ también apuntan a estar relacionados con el catión Na^+ y con el catión K^+ . El Li^+ inhibe el crecimiento de *Chara ceratophylla* a concentraciones de 0,7 mM, pero en presencia de Na^+ la tolerancia aumenta. Sin embargo, el Li^+

aumenta su toxicidad en presencia de K^+ , a pesar de que el K^+ sin Li^+ estimula el crecimiento del alga (revisado en Wissocq y col. [325] citando a Strauss [326]). Se han estudiado los efectos del ion Li^+ en la diatomea *Skeletonema costatum*, mostrando que a concentraciones de 0,5 mM de Li^+ el periodo circadiano se alargaba, y a concentraciones de 2 mM se inhibía el crecimiento [327]. El flagelo de *Chlamydomonas reinhardtii* pierde la motilidad a concentraciones de Li^+ 5mM y se alarga hasta 1,4 veces su tamaño en presencia de Li^+ 50mM, inhibiendo a su vez la síntesis de proteínas para su regeneración [328]. El Li^+ en *C. reinhardtii* inhibe la enzima glucógeno sintasa quinasa 3, relacionada con el flagelo [329] y aumenta varios ARNm flagelares [330], pero hasta aquí se limita el conocimiento en la acción del Li^+ en esta clorofita modelo. En *Chlorella vanniellii* se produce una inhibición en el crecimiento del 48% tras 12h con 1000 mg/L de Li en el medio [331] y en *Ankistrodesmus gracilis* provoca cambios en la estructura polisacárida de la pared celular [332].

El transporte del ion Li^+ entre membranas también se vale de los mecanismos que utilizan otros cationes, principalmente el Na^+ . La permeabilidad del Na^+ y Li^+ en canales de sodio dependientes de voltaje en procariontas es muy similar [333]. En plantas, el Li^+ utiliza los mismos transportadores que el K^+ [334]. En canales KcsA – un tipo de canales de potasio - el Li^+ y el Na^+ se unen a un mismo sitio de unión específico dentro del canal [335]. Y en levaduras y bacterias los canales NHA (Sodium-proton antiporters) que expulsan Na^+ a través de membrana también pueden expulsar Li^+ [336], [337]. La sobreexpresión de *sod2* en levadura, un gen que codifica para un NHA, confiere tolerancia a concentraciones altas de Na^+ , pero también de Li^+ [338]. También en levaduras está la familia de canales ENA que es capaz de expulsar Li^+ [339], pero en *S. cerevisiae* se ha observado que el Li^+ se acumula en las células siguiendo una estequiometría 1:1 con el ion K^+ [340]. A su vez, en bacterias, el Li^+ puede ser un sustituto del Na^+ en el cotransporte de aminoácidos como prolina [341] y azúcares [342], [343].

Respecto a las microalgas, cuando son expuestas a altas concentraciones extracelulares de Na^+ , las células capturan intracelularmente el ion en primera instancia, para luego expulsarlo activamente, manteniendo concentraciones intracelulares en órdenes de magnitud inferiores [344]–[347]. Este comportamiento se explica porque la presencia de cationes, entre ellos el Li^+ , pero también y con más eficacia Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , estimula H^+ -ATPasas que expulsan iones H^+ [348]. Por su parte, los iones H^+ son necesarios en el espacio extracelular para uno de los principales mecanismos de expulsión de iones Na^+ conocidos en microalgas, el antiportador Na^+/H^+ [349]. Una vez aumenta la concentración de protones en el espacio extracelular, se expulsa el Na^+ fuera de la célula. Sin embargo, con el Li^+ en la microalga *Dunaliella* sp. no ocurre así ya que el Li^+ es un inhibidor competitivo que bloquea el antiportador Na^+/H^+ sin comportar un intercambio Li^+/H^+ , determinándose que la actividad de estos canales disminuye en células adaptadas a Li^+ [350]. Esto va en contra

de lo observado en *E. coli*, donde el Li^+ favorece la actividad del antiportador y se ha demostrado la capacidad de transportar Li^+ [351]. El Li^+ en algunas especies microalgales logra alcanzar el citoplasma y compartimentos intracelulares [352], pero al no ser sustrato del antiportador Na^+/H^+ en especies fitoplanctónicas eucariotas podría hipotetizarse que el Li^+ se mantendría en el interior celular. No obstante, es probable que existan mecanismos de expulsión aún desconocidos.

En el caso de la clorofita *Hydrodictyon reticulatum* en presencia de luz, el Li^+ es el ion que más compete con los iones K^+ para entrar en la célula, por encima de Na^+ , Rb^+ y Cs^+ ; y con evidencias de la existencia de un transporte activo de K^+ que tenga mayor afinidad por el ion Li^+ [353]. Es un hecho relevante para la captura de Li ya que, mientras que existe una tendencia a eliminar el Na^+ en algunas clorofitas, el catión más abundante en su interior es generalmente el K^+ [354], manteniendo activamente concentraciones de K^+ en el interior celular como por ejemplo en *Tetraselmis subcordiformis* [355]. En *Dunaliella* sp. en condiciones de estrés aumenta el Na^+ y disminuye el K^+ intracelular, probablemente debido a que el mantenimiento del K^+ intracelular y la eliminación de Na^+ requieren energía para llevarse a cabo [349], existiendo también intercambiadores Na^+/K^+ dependientes de energía [356]–[358]. Se requieren estudios más profundos para confirmar este comportamiento, pero si existieran especies de clorofitas donde el Li^+ se valiera de los mecanismos de entrada del ion K^+ , éstas serían una herramienta muy útil en la captura del ion Li^+ .

Existen más hipótesis respecto a la existencia de más mecanismos de control iónico en el fitoplancton. Por ejemplo, se piensa en la dificultad de obtener en aguas alcalinas (como el mar) los H^+ necesarios para eliminar Na^+ mediante el antiportador Na^+/H^+ [354]. Estudios genómicos también han revelado la existencia de P-ATPasas en diferentes especies de clorofitas con función en la homeostasis de iones, aunque no se ha estudiado su influencia en la concentración de Li^+ [359]. Y en la clorofita *Tetraselmis subcordiformis* existe un mecanismo de entrada de los aminoácidos alanina y serina dependiente de Na^+ [360], que, de funcionar como el cotransportador de $\text{Na}^+/\text{prolina}$ en *E. coli*, captaría también Li^+ [341].

Aún quedan muchos interrogantes en los mecanismos por los que la concentración de Li^+ varía en el interior celular, pero se ha demostrado que algunas microalgas interiorizan Li^+ presente en el medio, siendo necesarios mayores estudios para determinar exactamente la naturaleza bioquímica de la movilización del Li^+ entre membranas.

Además de mecanismos de internalización y posible expulsión, las clorofitas poseen una pared con cargas negativas donde se unen cationes. La biomasa de *Dunaliella salina* tiene capacidad de capturar Li^+ en solución por la electronegatividad de la pared celular [361], característica común de algunas microalgas también vivas. Por su parte, en la clorofita *Oocystis solitaria* se vio que los grupos involucrados en la adsorción de

litio eran principalmente alcanos, fenoles y amidas [362]. Esta propiedad, unida a la demostrada internalización del litio, evidencia la utilidad biotecnológica de algunas de estas clorofitas en la captura de litio en solución.

En el experimento de esta tesis, las tres especies de microalgas utilizadas mostraron captura de Li, al determinarse en el *pellet* una concentración de Li mayor que en el medio líquido. En términos absolutos, la masa de Li capturada fue mayor en el cultivo analizado tras 27 días para las tres especies, pero en términos relativos a la biomasa del *pellet* hubo variaciones según la especie. TmS1 y ChlaA presentaron la mayor concentración de Li en el *pellet* en el día 27, mientras que CAFE justo tras la inoculación. De cara a su aplicación sería necesario adecuar el tiempo de contacto entre solución y biomasa al óptimo para el cual la especie captura.

La captura de Li ya se ha estudiado en microorganismos mediante experimentos enfocados al uso biotecnológico como el nuestro. En un *screening* utilizando decenas de especies entre las que se incluyen bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, hongos filamentosos y levaduras, se observó una gran variabilidad en la captura de Li entre especies muy similares, por lo que deben existir características específicas que lo favorezcan [363]. También se han descrito variaciones en la captura con *biofilms* bacterianos, encontrando diferencias en la adsorción de Li a *biofilms* en invierno y en primavera debido a que cambiaban los componentes del *biofilm*, y con ello la cantidad de sitios de unión a cationes, con la estación [364]. Cabe mencionar que en *Saccharomyces cerevisiae* el Li⁺ se acumula preferentemente en vacuolas [340]. Un comportamiento similar en algunas microalgas sería adecuado de cara a la captura del ion de soluciones. En general, en los eucariotas fotosintéticos no embriofitas existe una tendencia a que las células con mayores vacuolas tengan mayor concentración iónica que las células con vacuolas pequeñas [365], por lo que éstas podrían ser de utilidad a la hora de capturar Li⁺.

En la captura de Li influyen múltiples variables que podrían ser la razón de las diferencias encontradas. En un primer lugar estaría la concentración de Li en el medio. La macroalga *Chara ceratophylla* es capaz de capturar Li en concentraciones entre 0,05 y 100 mM de manera proporcional a la concentración externa, pero no de manera lineal. Concentraciones 10 veces mayores de Li⁺ en el medio de cultivo tan solo suponía tres veces más concentración intracelular [366]. En *Oocystis solitaria* la captura relativa a la masa total de Li se maximizaba en 220 mg/L de Li en el medio [362]. Por lo tanto, sería esperable que la concentración de Li en el medio extracelular sea un factor que influya en la captura de Li.

El tiempo de cultivo también afecta, sea por el tiempo de contacto con el ion o por el cambio en la cantidad de biomasa. En un cultivo de *Chlorella vulgaris* con 54 mg/L de Li ($\approx 7,8$ mM), se observó una disminución en la concentración de Li disuelto en el medio tras la fundación del experimento, pero progresivamente aumentó hasta llegar a

niveles cercanos a los 54 mg/L iniciales a los 10 días del cultivo y a pesar de un aumento importante de la biomasa [367]. Es indicativo de una desorción del ion. Un comportamiento similar podría argumentarse con ChlaA, en la cual disminuyó la concentración de Li en el *pellet* desde el día 0 al día 12, aunque en este caso tras 27 días esta concentración aumentó enormemente. Sin embargo, nuevamente en la macroalga *Chara ceratophylla*, al exponer las algas tras la captura de Li a medio nuevo sin Li no se detectó expulsión de este elemento [366], señalando que existen comportamientos diferentes frente al Li en solución. Con los resultados obtenidos en este estudio podría argumentarse que existe desorción en las tres especies: ligera en TmS1 el día 3, mayor en CAFE el día 3 y también acusada hasta el día 12 en ChlaA.

El pH también debe ser tenido en cuenta. Si hay altas concentraciones de H^+ , existirá una mayor competencia por los sitios de unión en la pared y la bioadsorción será previsiblemente menor, por lo que al aumentar el pH también aumentan los sitios de unión a metales [235]. Por el contrario, existen mecanismos de transporte de iones dependientes de la concentración de H^+ que favorecerían la unión de más cationes [350]. En la clorofita *Oocystis solitaria* el pH óptimo para la captura de Li se estimó en 5 [362], mientras que en otros microorganismos como la levadura *Kluyveromyces marxianus*, el pH óptimo fue 9 [368], y en la bacteria *Arthrobacter nicotianae*, la máxima captura es a pH 6 [363]. Además, en biomasa microalgal seca (*Dunaliella salina*), donde tan solo tendría lugar bioadsorción, el pH óptimo para la captura se sitúa en valores básicos [361]. La captura de Li en función del pH también sería especie-dependiente. A parte de los protones, la presencia en el medio de otros cationes también influye. Se ha señalado la influencia del ion K^+ en la captura de *Chlorella vulgaris* de Li^+ , utilizando medios con la misma concentración de Li^+ pero con concentraciones variables de K^+ . Se apunta a que concentraciones menores de K^+ en el medio aumentan la captura de Li^+ [367].

Como punto general, todas estas variables podrían ajustarse para alcanzar la máxima captura posible. En el estudio *O. solitaria* determinaron los valores que permitían una captura óptima de Li en solución para diferentes variables, alcanzando una retirada del 99,95% de Li disuelto a pH 5, 30°C, 60 minutos de contacto en agitación, una concentración de Li de 200 mg/L y una biomasa algal de 1 g/L [362]. Se necesitarían estudios similares para averiguar cuáles son las condiciones que permitirían una mayor captura de Li con las tres especies del estudio de esta tesis.

Estas investigaciones dan indicios claros de que las especies estudiadas podrían utilizarse para capturar Li^+ desde soluciones acuosas a pesar de no conocer los mecanismos precisos mediante los cuales interaccionan con el ion Li^+ .

Las posibilidades de estas tres especies con respecto al litio podrían ir más allá. El litio es un elemento crucial en la industria energética no solo por sus propiedades como metal, sino por las propiedades nucleares que tienen sus dos isótopos, el 6Li y el 7Li .

Determinadas tecnologías no solo requieren elementos específicos, sino isótopos de estos elementos. La medicina nuclear sería una de estas áreas, donde la mayoría de isótopos requeridos son radioisótopos, como el ^{99m}Tc , utilizado en el 80% de procesos de diagnóstico por imagen en medicina nuclear [369] o el ^{177}Lu en terapia dirigida con radioisótopos [370]. También en campos de investigación muy variados, como por ejemplo estudiar los mecanismos de reacciones químicas, la captura de fertilizantes por parte de cultivos [371] o en estudios del metabolismo [372]. El otro gran campo donde se requieren isótopos precisos es el sector nuclear. La energía nuclear requiere de relaciones isotópicas que no se encuentran en la naturaleza. En los reactores de fisión nuclear son necesarios isótopos fisibles, principalmente el ^{235}U , ^{233}U y ^{239}Pu , como combustible nuclear. Pero no son los únicos isótopos necesarios en la industria nuclear ya que, en ocasiones, dependiendo del tipo de reactor, se utilizan isótopos para hacer de moderador nuclear, tales como el deuterio (formando agua pesada) [373] o el ^7Li en los reactores de sal fundida [374]. La pureza o el grado de abundancia de los isótopos es crucial para poder llevar a cabo estas reacciones. En el caso del ^{235}U , el único isótopo fisible presente en la naturaleza, tiene una abundancia natural del 0,711%, mientras que para hacer funcionar un reactor nuclear de agua ligera se necesita entre el 3% y el 5% de abundancia de ^{235}U [375]. Debido a su amplio uso, los métodos para enriquecer uranio se han perfeccionado, descartándose otros como la separación electromagnética o la difusión térmica [376], y en la actualidad la práctica totalidad del uranio enriquecido del mundo se obtiene mediante centrifugación de gases, un método con un requerimiento energético bajo y no contaminante [377]. El mismo mecanismo se lleva a cabo para empobrecer el Zn en ^{64}Zn [378]. La utilización de Zn empobrecido (con una abundancia de ^{64}Zn menor al 5%, teniendo una abundancia natural del 48%) disminuye la cantidad de ^{60}Co (altamente radiactivo) producida en un reactor. En este caso el producto deseado sería la matriz empobrecida en el isótopo ^{64}Zn , al contrario que con el ^{235}U donde el valor reside en el enriquecimiento de este isótopo, mostrando la doble cara de los procesos de fraccionamiento.

Sin embargo, el enriquecimiento no siempre está optimizado para todos los isótopos (o relaciones isotópicas) que puedan resultar de interés para la industria energética. En ocasiones puede suponer un gasto energético demasiado alto, derivando en una disminución de la energía neta producida. Y también hay métodos de enriquecimiento contaminantes y cuya utilización comprometería los objetivos de sostenibilidad del proceso de obtención de energía: al fin y al cabo, el enriquecimiento no deja de ser otro paso más dentro del funcionamiento de la industria energética nuclear, por lo que debe tenerse en cuenta a la hora de valorar su impacto ambiental. Este es el caso de los isótopos de litio, obtenidos por el método de amalgama o COLEX, durante el cual se utilizan grandes cantidades de mercurio de difícil manejo y que pueden provocar perjuicios a la salud medioambiental y humana. La mejora de los procesos existentes y

el desarrollo de nuevos métodos de enriquecimiento siguen estando a la orden del día a fin de lograr mayor eficiencia energética y sostenibilidad.

La biotecnología está en auge y está demostrado que los organismos vivos serían de utilidad también en este campo. Los seres vivos discernimos entre isótopos al interactuar con átomos y moléculas. En los microorganismos en particular, se ha demostrado que existe fraccionamiento con elementos esenciales para la vida como el oxígeno [379], el carbono [380]–[383], el nitrógeno [379], [381], el azufre [384], [385] o el hidrógeno [382], [383]; con oligoelementos como zinc [386], cobre [387], [388] o hierro [389], [390], y elementos sin funciones biológicas como el mercurio [391].

La causa del fraccionamiento reside principalmente en las diferencias en masa de cada isótopo. Debido a esto, pueden darse dos fenómenos que fraccionen generalmente en favor del isótopo más ligero: efecto isotópico de equilibrio y efecto isotópico cinético [392]. El efecto isotópico de equilibrio ocurre cuando existe una reacción química en equilibrio, tal y como podría ser el intercambio de carbono entre CO₂ atmosférico y ácido carbónico disuelto en agua. En estas situaciones de equilibrio no perturbado, el isótopo más pesado tiende a concentrarse en la molécula que tenga una unión química más fuerte. Sin embargo, situaciones de equilibrio tales no son comunes en sistemas biológicos, por lo que es probable que la razón principal del fraccionamiento isotópico con microorganismos se deba a un efecto isotópico cinético. Este efecto se da cuando los átomos pasan de una molécula a otra o se difunden a través de una barrera, por ejemplo. Se basa en la diferencia de energía cinética que requieren los diferentes isótopos para completar esta reacción o movimiento. De esta forma, los isótopos más ligeros necesitan menos energía, por lo que completarían el paso con mayor velocidad [392], [393]. Si el movimiento es incompleto, es decir, si no todos los átomos del sustrato pasan a formar parte del producto o no todos los átomos atraviesan la barrera de difusión, el producto contendría una abundancia relativa de isótopos ligeros superior a aquella encontrada en el sustrato.

En estas diferencias de masas isotópicas y sus consecuentes efectos se basan la mayoría de los métodos de enriquecimiento actuales, como la centrifugación (donde la diferencia en masa es aprovechada directamente) o la difusión (donde la diferencia en masa provoca el efecto isotópico cinético). Pero, por lo general, el fraccionamiento que ocurre en un único proceso de este tipo es ínfimo, obteniéndose dos productos, uno enriquecido y otro empobrecido, que difieren muy ligeramente en abundancia isotópica relativa. Para alcanzar las relaciones isotópicas buscadas en una cantidad adecuada, se requieren de pasos consecutivos donde el producto enriquecido en el paso anterior sirve de sustrato para el paso siguiente. El resto de elemento empobrecido volvería a ser utilizado al principio de la cadena para enriquecerlo. Este diseño se conoce como cascada.

Teniendo esto en mente, sería posible utilizar microorganismos con el objetivo de enriquecer isótopos. Una posibilidad sería el diseño de cultivos líquidos en biorreactores en cascada con microorganismos que hayan probado capturar preferentemente un isótopo. Cada tiempo establecido, se retiraría el cultivo y separaría la fase acuosa de la biomasa. Aquella matriz más enriquecida en el isótopo deseado pasaría a una nueva fase de enriquecimiento, previo tratamiento químico para separar el elemento del resto de biomasa y componentes del cultivo.

Una tecnología así sería ecológicamente limpia y los subproductos –la biomasa- serían valorizables con fines muy diferentes dependiendo de los microorganismos que se utilizaran. Sin embargo, el desarrollo de esta tecnología es nulo y apenas se encuentran referencias sobre ello en la literatura científica.

En esta tesis se ha realizado un *screening* en tres especies microalgales para valorar el fraccionamiento isotópico que conlleva su interacción con litio. Se ha demostrado que existe fraccionamiento isotópico de Li, mayoritariamente enriquecimiento en ^6Li , en cultivos de microalgas. La δ^6 varía con el tiempo del cultivo y la especie. La mayor δ^6 se obtuvo con CAFE en el momento de la inoculación, coincidiendo también con la mayor captura relativa de Li en esta cepa. Esta situación se da también con ChlaA y TmS1.

Estos resultados son la primera evidencia de la existencia de fraccionamiento isotópico de litio con microorganismos fotosintéticos eucariotas. Previamente con otros organismos también se observó fraccionamiento isotópico biológico del litio, principalmente en mamíferos [394] incluyendo humanos [395], sugiriendo y demostrando que el ^6Li tiene un efecto mayor en el organismo que el ^7Li al tener más capacidad de paso entre barreras biológicas [396]–[399]. En vegetales en medio natural también se puede producir fraccionamiento isotópico, con el trabajo de Li y col. [400] mostrando que hay un transporte preferencial de ^6Li desde la raíz al follaje. Respecto a fraccionamiento isotópico de litio con otros microorganismos, Sakaguchi y Tomita [401], demostraron la preferencia de bacterias hacia la captura de ^6Li . Sin embargo, estudios ambientales previos determinaron que los *blooms* de microalgas no afectan a la relación isotópica del Li [402]. Este estudio tomó muestras de agua del único río que efluye del lago Myvatn (Islandia) durante un año, obteniendo una δ^6 que oscilaba entre -16,7158 y -21,5264, sin poder adscribir la fluctuación a los *blooms* que se daban en el lago. Existen multitud de variables diferentes entre ambos estudios que podrían explicar los resultados discordantes. En primer lugar, las especies son diferentes. Los *blooms* del lago Myvatn son de diatomeas, mientras que las microalgas utilizadas en el experimento de captura y fraccionamiento son clorofitas. En cualquier caso, esto no quiere decir que las diatomeas no fraccionaran isótopos de Li dadas otras condiciones. En segundo lugar, podría mencionarse la diferencia en la concentración de Li entre los dos ambientes. En el lago Myvatn las concentraciones medidas de Li rondaban los 150 nM, mientras que los experimentos estaban dos órdenes de

magnitud por encima: 0,61 mM y 0,36 mM para BG-11 y F/2, respectivamente. La captura de Li podría ser tan pequeña que la variación en la relación isotópica cayera por debajo de los límites detectables. Otras variables serían la temperatura, la biomasa o procesos geoquímicos contemporáneos que también causen fraccionamiento isotópico, entre otros. En principio, en los cultivos experimentales no deberían existir otros procesos que fraccionaran isótopos de Li. En aguas naturales, no obstante, sí que existen procesos así, tales como la formación de minerales secundarios, que enriquece el agua en Li^7 [403], [404], o la erosión [405], [406].

En este estudio no se han determinado las rutas ni los procesos intracelulares del Li, por lo que no puede determinarse si el fraccionamiento se debe a un efecto isotópico cinético o a un efecto isotópico de equilibrio. Para que se diera éste último, el Li captado por la célula debería estar presente formando otra molécula y existir un equilibrio químico con el medio donde el elemento fuera intercambiable. Con los datos de captura obtenidos en nuestro estudio parece poco probable que se haya alcanzado un equilibrio químico, además de haber cambios en el número de células que dificultarían dicho equilibrio. Sin embargo, es muy probable que la captura se deba a la unión con estructuras celulares y a la difusión entre membranas, por lo que el efecto isotópico esperable sería el cinético. Éste también es dependiente de la masa del isótopo, realizando las reacciones con mayor velocidad el isótopo más ligero. Por lo general, los resultados de nuestro estudio con las tres especies clorofitas van en el sentido que se esperaría de un fraccionamiento isotópico al tener la biomasa preferencia por el isótopo ligero. En cualquier caso, el enriquecimiento del *pellet* en uno u otro isótopo también dependerá del camino del Li en la célula. Si la única interacción de Li es la adsorción a la pared celular o la entrada por difusión, cabría esperar un enriquecimiento del *pellet* en 6Li ya que requiere menos energía para llevar a cabo el movimiento –el efecto isotópico cinético. Pero por este mismo efecto, si una vez interiorizado el Li existieran otros mecanismos de expulsión, se favorecería la expulsión del 6Li , enriqueciéndose así el interior celular en 7Li . Esta misma hipótesis explicaría por qué en las algas marinas comestibles *Laminaria japonica* y *Porphyra* sp. se detectó enriquecimiento en ^{41}K , el isótopo más pesado del K [407] y por qué en TmS1 a tiempo 0, y ChlaA a 0 y 12 días el *pellet* está enriquecido (aunque ligeramente) en 7Li .

Por el momento, todos los experimentos relacionados con seres vivos y los isótopos del litio tenían como objetivo la investigación básica. Únicamente la investigación desarrollada en esta tesis y el estudio de Sakaguchi y Tomita [401] proponen la idea de enriquecer isótopos de Li con seres vivos. Estos últimos probaron la captura de Li en siete levaduras, cinco especies del género *Streptomyces* y otras 16 especies bacterianas, con diferencias en la captura muy acusadas entre especies donde las levaduras destacaron por su poca capacidad de captura de Li. Después se analizó la relación isotópica del Li de seis de las especies que más Li capturaron, alcanzando una

δ^6 máxima de 58,7‰. A pesar de estos buenos resultados, no existen en la bibliografía registros de mayores investigaciones concernientes al enriquecimiento de ^6Li utilizando microorganismos. De una manera análoga, en el ensayo de enriquecimiento isotópico con tres especies microalgales diferentes en medio de cultivo con Li^+ sugieren fraccionamiento isotópico. Las δ^6 obtenidas se encuentran en el mismo orden de magnitud que en el experimento con bacterias de Sakaguchi y Tomita, aunque la δ^6 máxima es superior en nuestras especies: 85,39‰, con la cepa CAFE en tiempo 0. Con esta cepa de *Desmodesmus* sp. se podrían llevar a cabo mayores estudios para determinar las condiciones que permitan una captura y fraccionamiento idóneos, pero solo con lo analizado en este ensayo esta cepa enriquece más comparada con otros métodos de enriquecimiento de ^6Li . A su vez, la cepa ChlaA también resultaría interesante dada la gran captura de litio observada en el cultivo retirado el día 27 (31,66 μg de litio/g de biomasa) junto a una δ^6 de 38,8‰, cifra ésta última superior a la mayoría de los métodos de enriquecimiento de litio convencionales a pesar de ser inferior a la obtenida con la cepa CAFE. Zhang y col. [144] han desarrollado un método sostenible y eficaz de enriquecimiento de Li, mediante un *scrubbing* con agua destilada - pasando preferentemente isótopos de ^7Li desde una fase orgánica a una acuosa - con el cual han conseguido pasar de un 7,61% de abundancia relativa de ^6Li en la fase orgánica a un 9,42% en 20 pases. Utilizando la cepa microalgal CAFE en tiempo 0 - contacto de biomasa con solución de Li y posterior separación de fases -, se logró pasar de un % de ^6Li de 7.633% a 8.232% en un único pase. De mantenerse la δ^6 en pases sucesivos con CAFE, en tan solo tres pases se alcanzaría una abundancia relativa de ^6Li del 9,56%, mientras que se lograría una abundancia relativa del 30% (relación isotópica de $\approx 0,428$) con 20-21 pases, siendo ésta la cantidad relativa mínima de ^6Li para reactores de fusión nuclear [408]. La δ^6 obtenida con las especies microalgales estudiadas, especialmente CAFE, es mayor que la obtenida por otros métodos recientemente publicados (e.g. en Wang y col. [408] $\delta^6 = 21.97$, en Shi y col. [409] $\delta^6 = 16.26$).

A este respecto, las posibilidades de fraccionamientos isotópicos mayores utilizando otras especies podrían ser altísimas, ya que si utilizando una cepa aleatoria a modo de *screening* - que solo había tenido contacto previo con concentraciones traza de Li - se ha obtenido una δ^6 máxima de 85,39‰, sería esperable que existieran otras cepas cuyo fraccionamiento sea aún mayor y, tal vez, acompañadas de una mayor captura que hiciera del proceso aún más eficiente. Para encontrar cepas con mayor capacidad de enriquecer ^6Li o ^7Li podrían ensayarse cepas salvajes o laboratoriales aleatorias, como se ha hecho en este estudio; o podría hacerse una búsqueda de especies adaptadas a vivir en ambientes con concentraciones altas de Li. Las especies presentes en estos hábitats es probable que cuenten con mecanismos celulares específicos para el movimiento del Li entre barreras u otras maneras de interactuar con el ion, lo que podría conllevar una mayor captura y enriquecimiento. Ya se han llevado a cabo

procesos de bioprospección similares con Li y microorganismos: con bacterias aisladas de salares con alta concentración de Li se ha conseguido realizar una captura eficaz de Li en solución [410], [411]. Existe también la posibilidad nada desdeñable de realizar una selección artificial o de conseguir capturas mayores de litio mediante ingeniería genética. Un experimento introduciendo el gen *nhaAv* -que codifica para un antiportador Na^+/H^+ en *Vibrio alginolyticus*- en la cianobacteria *Synechococcus sp.* PCC 7942 mostró que no confería tolerancia al Na^+ , pero sí al Li^+ [352], lo que, según los autores, puede deberse a una mayor toxicidad del Li^+ en el citoplasma respecto al Na^+ ya que el antiportador Na^+/H^+ se expresaba mayormente en los tilacoides. Este antiportador, por lo tanto, hizo que la cianobacteria acumulara litio en los tilacoides, lo que tal vez aumentaría la captura y el fraccionamiento al pasar por dos procesos donde habría efecto isotópico cinético: entrada al citoplasma y paso a los tilacoides. A su vez, también sería necesario encontrar las condiciones de cultivo óptimas como realizaron [362], determinando también más variables relevantes como la concentración de K^+ [362], [367].

De cara a una implementación industrial cabe señalar que, al ser los dos isótopos de valor, el enriquecimiento de las especies utilizadas hacia uno u otro sería beneficioso. Además solo existen estos dos isótopos, por lo que el enriquecimiento en una de las fases en isótopo ^6Li implicaría el enriquecimiento de la otra fase en ^7Li .

Sin embargo, la cantidad absoluta de Li presente en los *pellets* está varios órdenes de magnitud por debajo de la concentración en el medio, por lo que, aunque el enriquecimiento sea grande, se requerirían muchos pases para alcanzar masas significativas de isótopo purificado. Se podrían conseguir cantidades mayores de isótopos puros a través de enriquecimientos paralelos y secuenciales.

Es muy probable que exista un amplio margen de mejora respecto a la cantidad de litio presente en el *pellet*. La optimización de las condiciones de cultivo y la elección de cepas encaminadas a aumentar la captación de Li – incluyendo posibles cepas mejoradas genéticamente- harían que la concentración de litio en la biomasa aumentase. Pero al ser un proceso con dos objetivos, captura y fraccionamiento, hay que tener en consideración que la captura total del elemento implica que no existirá fraccionamiento. En el otro extremo, si únicamente se capturase un átomo de Li, el enriquecimiento sería absoluto, pero la masa insignificante. Con más ensayos y análisis podría calcularse el óptimo de captura de Li a fin de tener una masa significativa del elemento enriquecido. El objetivo final sería obtener la mayor masa de isótopo puro en el menor tiempo posible.

La ventaja del fraccionamiento con microalgas frente a otros métodos, además de la mayor δ^6 obtenida, es que la biomasa puede reutilizarse. Tras la captura y fraccionamiento de Li en biorreactor con microalgas, se realizarían los procesos químicos oportunos encaminados a la recuperación del Li, sea desde la biomasa, desde

la fase acuosa o desde ambas. La recuperación del Li no debería ser un problema, ya que existen diversos métodos, como el uso de medios ácidos [412], y están más en estudio encaminados a recuperar Li de forma eficiente y sostenible desde matrices diferentes (e.g. [413]–[415]).



8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

- 1- La minería de uranio origina grandes volúmenes de agua ácida con altas concentraciones de metales pesados que son almacenados en charcas superficiales y crean un ambiente extremo donde la biodiversidad de microorganismos fotosintéticos es mucho menor de los valores considerados adecuados para un ecosistema sano. Esto se debe a las propiedades físicas y químicas del agua: pH bajo y altas concentraciones de metales pesados.

- 2- Las especies de microalgas clorofitas mesófilas estudiadas, *Dictyosphaerium chlorelloides* (DC1M) y *Chlamydomonas reinhardtii* A y B, lograron adaptarse a cuatro de las cinco aguas estudiadas, aunque con diferencias en función de la naturaleza de las aguas. El valor del pH y la concentración de metales determinaron la existencia de una gradación de toxicidad en las diferentes aguas residuales de la minería de uranio.

- 3- En dos de las charcas, Mortórios y Castelejo, las de mayor diversidad y menor toxicidad, los resultados indican una aclimatación fisiológica, pero no podemos descartar la existencia de mutaciones que permitieran una mejor adaptación en las aguas residuales de minería de uranio.

- 4- En las dos charcas restantes donde hubo adaptación, Quinta do Bispo y Saelices, se produjo exclusivamente por la aparición de mutaciones pre-adaptativas en las poblaciones dentro del biorreactor semi-continuo. Estas mutaciones confieren la capacidad de resistir y proliferar en el nuevo ambiente extremo. Los mutantes presentan una disminución de *fitness* y la población está en equilibrio mutación-selección.

- 5- Las cepas estudiadas pertenecientes a las especies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Tetraselmis mediterranea* y *Desmodesmus* sp., son capaces de capturar litio desde una disolución. A su vez, se comprobó que estas especies son capaces de discriminar los dos isótopos del litio y de llevar a cabo el fraccionamiento isotópico de este elemento, con un valor de δ^6 (85,39‰) superior al que se consigue con las técnicas de fraccionamiento que han sido utilizadas industrialmente o que se están desarrollando en los últimos años basadas en procesos físico-químicos. La obtención de estos resultados bajo condiciones no optimizadas, con cepas sin adaptar y originarias de lugares prístinos hace pensar que las microalgas clorofitas tienen gran potencial en la captura y fraccionamiento isotópico de isótopos de litio.



9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P. J. Crutzen, “The ‘Anthropocene,’” in *Earth System Science in the Anthropocene*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, pp. 13–18.
- [2] T. S. De Carvalho *et al.*, “Land use intensification in the humid tropics increased both alpha and beta diversity of soil bacteria,” *Ecology*, vol. 97, no. 10, pp. 2760–2771, Oct. 2016.
- [3] E. D. C. Jesus, T. L. Marsh, J. M. Tiedje, and F. M. D. S. Moreira, “Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils,” *ISME J.*, vol. 3, no. 9, pp. 1004–1011, 2009.
- [4] J. L. M. Rodrigues *et al.*, “Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 3, pp. 988–993, Jan. 2013.
- [5] A. D. Barnes *et al.*, “Direct and cascading impacts of tropical land-use change on multi-trophic biodiversity,” *Nat. Ecol. Evol.*, vol. 1, no. 10, pp. 1511–1519, Aug. 2017.
- [6] A. S. Kaptanoglu and A. Namli, “Wildfire and harvesting effects on carbon dynamics in an oak-pine mixed forest,” *iForest - Biogeosciences For.*, vol. 13, no. 5, p. 435, 2020.
- [7] H. Wu *et al.*, “Effects of dam construction on biodiversity: A review,” *J. Clean. Prod.*, vol. 221, pp. 480–489, Jun. 2019.
- [8] J. W. Leff *et al.*, “Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 35, pp. 10967–10972, Sep. 2015.
- [9] E. Elhacham, L. Ben-Uri, J. Grozovski, Y. M. Bar-On, and R. Milo, “Global human-made mass exceeds all living biomass,” *Nature*, vol. 588, no. 7838, pp. 442–444, Dec. 2020.
- [10] W. M. O. (WMO), “State of the Global Climate 2020,” WMO, Geneva, 2021.
- [11] E. M. Fischer and R. Knutti, “Anthropogenic contribution to global occurrence of heavy-precipitation and high-temperature extremes,” *Nat. Clim. Chang.*, vol. 5, no. 6, pp. 560–564, Apr. 2013.
- [12] A. Levermann *et al.*, “The multimillennial sea-level commitment of global warming,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 34, pp. 13745–13750, Aug. 2013.
- [13] L. Cheng *et al.*, “Record-Setting Ocean Warmth Continued in 2019,” *Adv. Atmos. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 137–142, Jan. 2020.

-
- [14] M. Oppenheimer *et al.*, “Sea Level Rise and Implications for Low-Lying Islands, Coasts and Communities,” in *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*, H. O. Pörtner, D. C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintebek, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, and N. M. Weyer, Eds. 2019.
- [15] N. L. Bindoff *et al.*, “Changing Ocean, Marine Ecosystems, and Dependent Communities,” in *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate*, H. O. Pörtner, D. C. Roberts, V. Masson-Delmotte, P. Zhai, M. Tignor, E. Poloczanska, K. Mintebek, A. Alegría, M. Nicolai, A. Okem, J. Petzold, B. Rama, and N. M. Weyer, Eds. 2019.
- [16] U. Riebesell, A. K. Rtzinger, and A. Oschlies, “Sensitivities of marine carbon fluxes to ocean change,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 49, pp. 20602–20609, Dec. 2009.
- [17] D. Harper, “The nutrients causing eutrophication, and their sources,” in *Eutrophication of Freshwaters*, Dordrecht: Springer, 1992, pp. 29–59.
- [18] P. M. Glibert, “Eutrophication, harmful algae and biodiversity — Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 124, no. 2, pp. 591–606, Nov. 2017.
- [19] S. R. Carpenter, “Phosphorus control is critical to mitigating eutrophication,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 32, pp. 11039–11040, Aug. 2008.
- [20] R. J. Diaz and R. Rosenberg, “Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems,” *Science (80-)*, vol. 321, no. 5891, pp. 926–929, Aug. 2008.
- [21] Y. Li *et al.*, “The role of freshwater eutrophication in greenhouse gas emissions: A review,” *Sci. Total Environ.*, vol. 768, p. 144582, May 2021.
- [22] M. C. Pant, A. P. Sharma, and P. C. Sharma, “Evidence for the increased eutrophication of lake nainital as a result of human interference,” *Environ. Pollut. Ser. B, Chem. Phys.*, vol. 1, no. 2, pp. 149–161, Apr. 1980.
- [23] C. Huang *et al.*, “Satellite data regarding the eutrophication response to human activities in the plateau lake Dianchi in China from 1974 to 2009,” *Sci. Total Environ.*, vol. 485–486, no. 1, pp. 1–11, Jul. 2014.
- [24] J. de Anda, J. de J. Díaz-Torres, M. S. Gradilla-Hernández, and L. M. de la Torre-Castro, “Morphometric and water quality features of Lake Cajititlán, Mexico,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 191, no. 2, pp. 1–12, Feb. 2019.
- [25] O. Díaz-Torres *et al.*, “Rapid Changes in the Phytoplankton Community of a Subtropical, Shallow, Hypereutrophic Lake During the Rainy Season,” *Front. Microbiol.*, vol. 12, p. 415, Mar. 2021.
- [26] J. A. Foley *et al.*, “Solutions for a cultivated planet,” *Nature*, vol. 478, no. 7369,

- pp. 337–342, Oct. 2011.
- [27] M. B. J. Harfoot *et al.*, “Present and future biodiversity risks from fossil fuel exploitation,” *Conserv. Lett.*, vol. 11, no. 4, p. e12448, Jul. 2018.
- [28] G. Ceballos, P. R. Ehrlich, A. D. Barnosky, A. García, R. M. Pringle, and T. M. Palmer, “Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction,” *Sci. Adv.*, vol. 1, no. 5, Jun. 2015.
- [29] H. F. Yan *et al.*, “Overfishing and habitat loss drives range contraction of iconic marine fishes to near extinction,” *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 7, p. 6026, Feb. 2021.
- [30] T. Newbold *et al.*, “Global effects of land use on local terrestrial biodiversity,” *Nat. 2015 5207545*, vol. 520, no. 7545, pp. 45–50, Apr. 2015.
- [31] W. Cristiano, C. Giacoma, M. Carere, and L. Mancini, “Chemical pollution as a driver of biodiversity loss and potential deterioration of ecosystem services in Eastern Africa: A critical review,” *S. Afr. J. Sci.*, vol. 117, no. 9–10, pp. 1–7, 2021.
- [32] A. C. Grice, “The impacts of invasive plant species on the biodiversity of Australian rangelands,” *Rangel. J.*, vol. 28, no. 1, pp. 27–35, May 2006.
- [33] J. L. Molnar, R. L. Gamboa, C. Revenga, and M. D. Spalding, “Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity,” *Front. Ecol. Environ.*, vol. 6, no. 9, pp. 485–492, Nov. 2008.
- [34] T. S. Doherty, A. S. Glen, D. G. Nimmo, E. G. Ritchie, and C. R. Dickman, “Invasive predators and global biodiversity loss,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 40, pp. 11261–11265, Oct. 2016.
- [35] D. L. Murray *et al.*, “Continental divide: Predicting climate-mediated fragmentation and biodiversity loss in the boreal forest,” *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0176706, May 2017.
- [36] J. F. Brodie *et al.*, “Secondary extinctions of biodiversity,” *Trends Ecol. Evol.*, vol. 29, no. 12, pp. 664–672, Dec. 2014.
- [37] M. Delibes de Castro, “Biodiversidad un enfoque global,” in *Ciclo seminarios Análisis y Prospectiva II*, 2007.
- [38] A. Hopes and T. Mock, “Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine Ecosystems,” *eLS*, pp. 1–9, Oct. 2015.
- [39] Q. Zhu *et al.*, “Phylogenomics of 10,575 genomes reveals evolutionary proximity between domains Bacteria and Archaea,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, Dec. 2019.
- [40] P. G. Falkowski, R. T. Barber, and V. Smetacek, “Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production,” *Science (80-.)*, vol. 281, no. 5374, pp. 200–206, Jul. 1998.
-

-
- [41] F. I. Woodward, "Global primary production," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 8, pp. R269–R273, Apr. 2007.
- [42] E. Chassot *et al.*, "Global marine primary production constrains fisheries catches," *Ecol. Lett.*, vol. 13, no. 4, pp. 495–505, Apr. 2010.
- [43] W. M. Lewis, "Global primary production of lakes: 19th Baldi Memorial Lecture," *Int. Waters*, vol. 1, no. 1, pp. 1–28, Apr. 2011.
- [44] V. Villanova and C. Spetea, "Mixotrophy in diatoms: Molecular mechanism and industrial potential," *Physiol. Plant.*, 2021.
- [45] R. P. Rastogi, D. Madamwar, H. Nakamoto, and A. Incharoensakdi, "Resilience and self-regulation processes of microalgae under UV radiation stress," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 43. Elsevier, p. 100322, 01-Jun-2020.
- [46] M. D. Guiry, "HOW MANY SPECIES OF ALGAE ARE THERE?," *J. Phycol.*, vol. 48, no. 5, pp. 1057–1063, Oct. 2012.
- [47] A. Tomitani, "Origin and early evolution of chloroplasts," in *Paleontological Research*, 2006, vol. 10, no. 4, pp. 283–297.
- [48] Ø. Moestrup, "Algae: Phylogeny and Evolution," in *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, UK, 2006.
- [49] S. M. Adl *et al.*, "The Revised Classification of Eukaryotes," *J. Eukaryot. Microbiol.*, vol. 59, no. 5, pp. 429–514, Sep. 2012.
- [50] C. F. Delwiche and R. E. Timme, "Plants," *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 11, pp. R417–R422, Jun. 2011.
- [51] Z. Y. Du, K. Zienkiewicz, N. Vande Pol, N. E. Ostrom, C. Benning, and G. M. Bonito, "Algal-fungal symbiosis leads to photosynthetic mycelium," *Elife*, vol. 8, Jul. 2019.
- [52] J. D. Rochaix, "Chlamydomonas reinhardtii," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, Academic Press, 2013, pp. 521–524.
- [53] I. Perera, S. R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, R. Naidu, and M. Megharaj, "Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 17, pp. 7351–7363, Jul. 2018.
- [54] R. J. Arnold, P. Convey, K. A. Hughes, and D. D. Wynn-Williams, "Seasonal periodicity of physical factors, inorganic nutrients and microalgae in Antarctic fellfields," *Polar Biol.*, vol. 26, no. 6, pp. 396–403, 2003.
- [55] M. J. Behrenfeld, S. C. Doney, I. Lima, E. S. Boss, and D. A. Siegel, "Annual cycles of ecological disturbance and recovery underlying the subarctic Atlantic spring

- plankton bloom," *Global Biogeochem. Cycles*, vol. 27, no. 2, pp. 526–540, Jun. 2013.
- [56] M. J. Behrenfeld, "Climate-mediated dance of the plankton," *Nat. Clim. Chang.*, vol. 4, no. 10, pp. 880–887, Sep. 2014.
- [57] C. S. Rousseaux and W. W. Gregg, "Recent decadal trends in global phytoplankton composition," *Global Biogeochem. Cycles*, vol. 29, no. 10, pp. 1674–1688, Oct. 2015.
- [58] M. J. Behrenfeld *et al.*, "Climate-driven trends in contemporary ocean productivity," *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 752–755, Dec. 2006.
- [59] P. M. Visser *et al.*, "How rising CO₂ and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms," *Harmful Algae*, vol. 54, pp. 145–159, Apr. 2016.
- [60] J. C. Orr *et al.*, "Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms," vol. 437, no. 7059, pp. 681–686, Sep. 2005.
- [61] N. Gruber *et al.*, "The oceanic sink for anthropogenic CO₂ from 1994 to 2007," *Science (80-.)*, vol. 363, no. 6432, pp. 1193–1199, Mar. 2019.
- [62] U. Riebesell, I. Zondervan, B. Rost, P. D. Tortell, R. E. Zeebe, and F. M. M. Morel, "Reduced calcification of marine plankton in response to increased atmospheric CO₂," *Nature*, vol. 407, no. 6802, pp. 364–367, Sep. 2000.
- [63] M. Hermoso and F. Minoletti, "Mass and Fine-Scale Morphological Changes Induced by Changing Seawater pH in the Coccolith *Gephyrocapsa oceanica*," *J. Geophys. Res. Biogeosciences*, vol. 123, no. 9, pp. 2761–2774, Sep. 2018.
- [64] V. R. Johnson, C. Brownlee, R. E. M. Rickaby, M. Graziano, M. Milazzo, and J. M. Hall-Spencer, "Responses of marine benthic microalgae to elevated CO₂," *Mar. Biol.*, vol. 160, no. 8, pp. 1813–1824, Nov. 2011.
- [65] C. E. Cornwall *et al.*, "A coralline alga gains tolerance to ocean acidification over multiple generations of exposure," *Nat. Clim. Chang.*, vol. 10, no. 2, pp. 143–146, Jan. 2020.
- [66] J. Pardew, M. Blanco Pimentel, and E. Low-Decarie, "Predictable ecological response to rising CO₂ of a community of marine phytoplankton," *Ecol. Evol.*, vol. 8, no. 8, pp. 4292–4302, Apr. 2018.
- [67] E. Schaum, B. Rost, A. J. Millar, and S. Collins, "Variation in plastic responses of a globally distributed picoplankton species to ocean acidification," *Nat. Clim. Chang.*, vol. 3, no. 3, pp. 298–302, Mar. 2013.
- [68] C. E. Hare *et al.*, "Consequences of increased temperature and CO₂ for phytoplankton community structure in the Bering Sea," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 352, pp. 9–16, Dec. 2007.

- [69] S. Collins and G. Bell, "Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga," *Nature*, vol. 431, no. 7008, pp. 566–569, Sep. 2004.
- [70] R. T. Lindberg and S. Collins, "Quality–quantity trade-offs drive functional trait evolution in a model microalgal 'climate change winner,'" *Ecol. Lett.*, vol. 23, no. 5, pp. 780–790, May 2020.
- [71] G. Sandrini *et al.*, "Rapid adaptation of harmful cyanobacteria to rising CO₂," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 33, pp. 9315–9320, Aug. 2016.
- [72] E. Costas, E. Huertas, B. Baselga-Cervera, C. García-Balboa, and V. López-Rodas, "Phytoplankton Ability to Physiological Acclimatization and Genetic Adaptation to Global Warming," *Int. J. Biol.*, vol. 6, no. 4, Jul. 2014.
- [73] S. Collins, "Growth rate evolution in improved environments under Prodigal Son dynamics," *Evol. Appl.*, vol. 9, no. 9, p. 1179, Oct. 2016.
- [74] M. Tseng, J. R. Bernhardt, and A. E. Chila, "Species interactions mediate thermal evolution," *Evol. Appl.*, vol. 12, no. 7, pp. 1463–1474, Aug. 2019.
- [75] H. Hillebrand and U. Sommer, "Diversity of benthic microalgae in response to colonization time and eutrophication," *Aquat. Bot.*, vol. 67, no. 3, pp. 221–236, Jul. 2000.
- [76] E. Granéli, M. Weberg, and P. S. Salomon, "Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication," *Harmful Algae*, vol. 8, no. 1, pp. 94–102, Dec. 2008.
- [77] S. Sánchez-Fortún, F. Marva, M. Rouco, E. Costas, and V. Lopez-Rodas, "Toxic effect and adaptation in *Scenedesmus intermedius* to anthropogenic chloramphenicol contamination: genetic versus physiological mechanisms to rapid acquisition of xenobiotic resistance," *Ecotoxicology*, vol. 18, no. 5, pp. 481–487, Mar. 2009.
- [78] F. Marva *et al.*, "Adaptation of green microalgae to the herbicides simazine and diquat as result of pre-selective mutations," *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, no. 2, pp. 130–134, Jan. 2010.
- [79] V. Lopez-Rodas *et al.*, "Resistance of microalgae to modern water contaminants as the result of rare spontaneous mutations," *Eur. J. Phycol.*, vol. 36, no. 2, pp. 179–190, May 2001.
- [80] D. Carrera-Martinez, A. Mateos-Sanz, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, "Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 2, pp. 342–350, Jan. 2011.
- [81] C. Garca-Balboa, B. Baselga-Cervera, A. Garca-Sanchez, J. M. Igual, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, "Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with

- extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 144–145, pp. 116–123, Nov. 2013.
- [82] P. Martínez-Alesón García, C. García-Balboa, J. Romero-López, V. López-Rodas, E. Costas, and B. Baselga-Cervera, “Fluctuation analysis to select for Samarium bio-uptaking microalgae clones the repurposing of a classical evolution experiment,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 215, p. 112134, Jun. 2021.
- [83] B. Baselga-Cervera, E. Costas, E. Bustillo-Avenidaño, and C. García-Balboa, “Adaptation prevents the extinction of *Chlamydomonas reinhardtii* under toxic beryllium,” *PeerJ*, vol. 2016, no. 3, p. e1823, Mar. 2016.
- [84] F. Marva, C. Garca-Balboa, B. Baselga-Cervera, and E. Costas, “Rapid adaptation of some phytoplankton species to osmium as a result of spontaneous mutations,” *Ecotoxicology*, vol. 23, no. 2, pp. 213–220, Mar. 2014.
- [85] R. Cavicchioli *et al.*, “Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 9, pp. 569–586, Jun. 2019.
- [86] J. Lovelock, *Gaia: a new look at life on earth*. Oxford University Press, 1979.
- [87] J. F. B. Mitchell, “The ‘Greenhouse’ effect and climate change,” *Rev. Geophys.*, vol. 27, no. 1, pp. 115–139, Feb. 1989.
- [88] H. Ritchie and M. Roser, “CO₂ and Greenhouse Gas Emissions,” *Our World Data*, 2020.
- [89] CO2Levels, “CO₂ Levels: Current & Historic Atmospheric Carbon Dioxide / Global Temperature Graph & Widget,” 2020. [Online]. Available: <https://www.co2levels.org/>. [Accessed: 16-Nov-2021].
- [90] R. A. McManamay, E. S. Parish, C. R. DeRolph, A. M. Witt, W. L. Graf, and A. Burtner, “Evidence-based indicator approach to guide preliminary environmental impact assessments of hydropower development,” *J. Environ. Manage.*, vol. 265, p. 110489, Jul. 2020.
- [91] S. Chen, B. Chen, and B. D. Fath, “Assessing the cumulative environmental impact of hydropower construction on river systems based on energy network model,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 42, pp. 78–92, Feb. 2015.
- [92] J. W. M. Rudd, R. E. Hecky, R. Harris, and C. A. Kelly, “Are hydroelectric reservoirs significant sources of greenhouse gases,” *J. Hum. Environ. Res. Manag.*, vol. 22, no. 4, pp. 246–248, 1993.
- [93] N. Barros *et al.*, “Carbon emission from hydroelectric reservoirs linked to reservoir age and latitude,” *Nat. Geosci.*, vol. 4, no. 9, pp. 593–596, Jul. 2011.
- [94] S. Lu, W. Dai, Y. Tang, and M. Guo, “A review of the impact of hydropower reservoirs on global climate change,” *Sci. Total Environ.*, vol. 711, pp. 134996–

- 134996, Nov. 2019.
- [95] D. Serrano *et al.*, “Renewables in Spain threaten biodiversity,” *Science* (80-.), vol. 370, no. 6522, pp. 1182–1183, Dec. 2020.
- [96] J. van Zalk and P. Behrens, “The spatial extent of renewable and non-renewable power generation: A review and meta-analysis of power densities and their application in the U.S.,” *Energy Policy*, vol. 123, pp. 83–91, Dec. 2018.
- [97] L. J. Sonter, M. C. Dade, J. E. M. Watson, and R. K. Valenta, “Renewable energy production will exacerbate mining threats to biodiversity,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–6, Sep. 2020.
- [98] C. B. Thaxter *et al.*, “Bird and bat species’ global vulnerability to collision mortality at wind farms revealed through a trait-based assessment,” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 284, no. 1862, Sep. 2017.
- [99] D. Turney and V. Fthenakis, “Environmental impacts from the installation and operation of large-scale solar power plants,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 15, no. 6, pp. 3261–3270, Aug. 2011.
- [100] B. Corona, D. Ruiz, and G. S. Miguel, “Life Cycle Assessment of a HYSOL Concentrated Solar Power Plant: Analyzing the Effect of Geographic Location,” *Energies*, vol. 9, no. 6, p. 413, May 2016.
- [101] K. Ilse *et al.*, “Techno-Economic Assessment of Soiling Losses and Mitigation Strategies for Solar Power Generation,” *Joule*, vol. 3, no. 10, pp. 2303–2321, Oct. 2019.
- [102] B. W. Brook and C. J. A. Bradshaw, “Key role for nuclear energy in global biodiversity conservation,” *Conserv. Biol.*, vol. 29, no. 3, pp. 702–712, Jun. 2015.
- [103] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, *Energy, Electricity and Nuclear Power Estimates for the Period up to 2050, Reference Data Series No. 1, IAEA, Vienna (2018).*, no. 1. 2012.
- [104] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, “Nuclear Share of Electricity Generation in 2014,” *International Atomic Energy Agency*, 2014. [Online]. Available: <https://pris.iaea.org/PRIS/WorldStatistics/NuclearShareofElectricityGeneration.aspx>. [Accessed: 16-Nov-2021].
- [105] “Uranium,” *TRADING ECONOMICS*, Jan-. [Online]. Available: <https://tradingeconomics.com/commodity/uranium>. [Accessed: 16-Nov-2021].
- [106] Australian Uranium Association, “Some Physics of Uranium,” Jun-2007. [Online]. Available: <https://web.archive.org/web/20070717070625/http://www.uic.com.au/uicphys.htm>. [Accessed: 19-May-2020].
-

- [107] P. Slovic, J. H. Flynn, and M. Layman, "Perceived Risk, Trust, and the Politics of Nuclear Waste," *Science* (80-.), vol. 254, no. 5038, pp. 1603–1607, Dec. 1991.
- [108] E. A. Rosa *et al.*, "Nuclear Waste: Knowledge Waste?," *Science* (80-.), vol. 329, no. 5993, Aug. 2010.
- [109] A. Abdelouas, "Uranium mill tailings: Geochemistry, mineralogy, and environmental impact," *Elements*, vol. 2, no. 6, pp. 335–341, Dec. 2006.
- [110] *World Distribution of Uranium Deposits (UDEPO)*, no. 1843. Vienna: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2018.
- [111] J. Janeczek and R. C. Ewing, "Structural formula of uraninite," *J. Nucl. Mater.*, vol. 190, no. C, pp. 128–132, Aug. 1992.
- [112] World Nuclear Association, "World Uranium Mining Production ," 2020. [Online]. Available: <https://www.world-nuclear.org/information-library/nuclear-fuel-cycle/mining-of-uranium/world-uranium-mining-production.aspx>. [Accessed: 08-Jul-2021].
- [113] C. Frejacques, O. Bilous, J. Dixmier, D. Massignon, and P. Plurien, "Main results obtained in France in the development of the gaseous diffusion process for uranium isotope separation." 1958.
- [114] T. D. Reilly, E. R. Martin, J. L. Parker, L. G. Speir, and R. B. Walton, "A Continuous In-Line Monitor for UF₆ Enrichment," *Nucl. Technol.*, vol. 23, no. 3, pp. 318–327, 2017.
- [115] L. N. Larson, "Long-Term Federal Management of Uranium Mill Tailings: Background and Issues for Congress," 2021.
- [116] D. Kossoff, W. E. Dubbin, M. Alfredsson, S. J. Edwards, M. G. Macklin, and K. A. Hudson-Edwards, "Mine tailings dams: Characteristics, failure, environmental impacts, and remediation," *Appl. Geochemistry*, vol. 51, pp. 229–245, Dec. 2014.
- [117] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, "Measurement and Calculation of Radon Releases from Uranium Mill Tailings," Vienna, 1992.
- [118] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, "Environmental Contamination from Uranium Production Facilities and their Remediation," Vienna, 2003.
- [119] P. Duarte, L. Machado, and M. Reis, "Radon survey in old uranium mines in the region of Sabugal, Portugal," 2005.
- [120] Z. Lu and Z. Liu, "Pollution characteristics and risk assessment of uranium and heavy metals of agricultural soil around the uranium tailing reservoir in Southern China," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 318, no. 2, pp. 923–933, Aug. 2018.
- [121] U.S. Geological Survey, "Mineral Commodity Summaries 2020," 2020.
-

- [122] U.S. Geological Survey, “Mineral Commodity Summaries 2021,” 2021.
- [123] R. B. Kaunda, “Potential environmental impacts of lithium mining,” *J. Energy Nat. Resour. Law*, vol. 38, no. 3, pp. 237–244, Jul. 2020.
- [124] W. Liu, D. B. Agusdinata, and S. W. Myint, “Spatiotemporal patterns of lithium mining and environmental degradation in the Atacama Salt Flat, Chile,” *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.*, vol. 80, pp. 145–156, Aug. 2019.
- [125] L. Zhang *et al.*, “Lithium recovery from effluent of spent lithium battery recycling process using solvent extraction,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 398, p. 122840, Nov. 2020.
- [126] T. Huang, L. Liu, and S. Zhang, “Recovery of cobalt, lithium, and manganese from the cathode active materials of spent lithium-ion batteries in a bio-electro-hydrometallurgical process,” *Hydrometallurgy*, vol. 188, pp. 101–111, Sep. 2019.
- [127] K. Yoo, S. M. Shin, D. H. Yang, and J. S. Sohn, “Biological treatment of wastewater produced during recycling of spent lithium primary battery,” *Miner. Eng.*, vol. 23, no. 3, pp. 219–224, Feb. 2010.
- [128] Zhen Li *et al.*, “Continuous electrical pumping membrane process for seawater lithium mining,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 3152–3159, May 2021.
- [129] M. S. Diallo, M. R. Kotte, and M. Cho, “Mining Critical Metals and Elements from Seawater: Opportunities and Challenges,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 16, pp. 9390–9399, Apr. 2015.
- [130] T. Donné, “Challenges on the road towards fusion electricity,” *Europhys. News*, vol. 47, no. 5–6, pp. 20–24, Sep. 2016.
- [131] R. Cowen, “Two-laser boron fusion lights the way to radiation-free energy,” *Nature*, Oct. 2013.
- [132] H. Hora *et al.*, “Road map to clean energy using laser beam ignition of boron-hydrogen fusion,” *Laser Part. Beams*, vol. 35, no. 4, pp. 730–740, Dec. 2017.
- [133] J. Meija *et al.*, “Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report),” Walter de Gruyter GmbH, Mar. 2016.
- [134] E. Gibney and Elizabeth, “Fuel for world’s largest fusion reactor ITER is set for test run,” *Nature*, vol. 591, no. 7848, pp. 15–16, Mar. 2021.
- [135] J. P. Holdren, “Fusion energy in context: its fitness for the long term. A rationale for long term energy sources suggests that some forms of fusion may be worth the wait,” *Science (80-.)*, vol. 200, no. 4338, pp. 168–180, 1978.
- [136] A. M. Bradshaw, T. Hamacher, and U. Fischer, “Is nuclear fusion a sustainable energy form?,” *Fusion Eng. Des.*, vol. 86, no. 9–11, Oct. 2011.
- [137] T. Ault, K. Brozek, L. Fan, M. Folsom, J. Kim, and J. Zeisner, “Lithium Isotope

- Enrichment: Feasible Domestic Enrichment Alternatives,” May 2012.
- [138] M. K. M. Ho, G. H. Yeoh, and G. Braoudakis, “Molten salt reactors,” in *Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments*, 1st ed., A. Méndez-Vilas, Ed. Formatex Research Center, 2008.
- [139] J. L. Herranz García, “Viabilidad técnica para la explotación y separación isotópica de Li y prospectiva en el mercado de baterías de ION-7Li y de 6Li como material base de diseño en reactores de fusión nuclear,” E.T.S.I. Minas (UPM), Madrid, 2013.
- [140] T. Giegerich, K. Battes, J. C. Schwenzer, and C. Day, “Development of a viable route for lithium-6 supply of DEMO and future fusion power plants,” *Fusion Eng. Des.*, vol. 149, p. 111339, Dec. 2019.
- [141] Z. Zhang, A. Murali, P. K. Sarswat, and M. L. Free, “High-efficiency lithium isotope separation in an electrochemical system with 1-butyl-3-methylimidazolium dicyanamide, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, and diethyl carbonate as the solvents,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 253, p. 117539, Dec. 2020.
- [142] Z. Zhang, P. K. Sarswat, A. Murali, and M. L. Free, “Investigation on Lithium Isotope Fractionation with Diffusion, Electrochemical Migration, and Electrochemical Isotope Effect in PEO-PC Based Gel Electrolyte,” *J. Electrochem. Soc.*, vol. 166, no. 6, p. E145, Mar. 2019.
- [143] V. K. Saini, S. Talwar, V. V. V Subrahmanyam, R. K. Mishra, P. K. Saini, and S. K. Dixit, “Laser isotope separation scheme of lithium by three-color photoionization,” *Phys. Scr.*, vol. 95, no. 7, p. 075403, May 2020.
- [144] P. Zhang, M. Wang, J. Sun, F. Shao, Y. Jia, and Y. Jing, “Lithium Isotope Green Separation Using Water Scrubbing,” *Chem. Lett.*, vol. 48, no. 12, pp. 1541–1543, 2019.
- [145] X.-L. Sun, L. Gu, D. Qiu, D.-H. Ren, Z.-G. Gu, and Z. Li, “The solid–liquid extraction separation of lithium isotopes by porous composite materials doped with ionic liquids and 2,2'-binaphthyldiyl-17-crown-5,” *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 303, no. 3, pp. 2271–2282, Nov. 2014.
- [146] J. Xiao *et al.*, “Lithium isotopes separation by using benzo-15-crown-5 in eco-friendly extraction system,” *J. Mol. Liq.*, vol. 241, pp. 946–951, Sep. 2017.
- [147] Z. Zhang *et al.*, “Study on behavior of lithium ion in solvent extraction and isotope separation,” *J. Mol. Liq.*, vol. 324, p. 114709, Feb. 2021.
- [148] Y. Tachibana, V. V. Nair, S. Mohan, and T. Suzuki, “Chromatographic fractionation of lithium isotope in aqueous solution using bifunctional ion-exchange resin,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 55, no. 12, pp. 2183–2192, Aug. 2019.
-

- [149] H. Pei *et al.*, "Formoxylbenzo-15-crown-5 ether functionalized PVA/NWF composite membrane for enhanced 7Li^+ enrichment," *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, vol. 97, pp. 496–502, Apr. 2019.
- [150] Y. Zeng *et al.*, "Chitosan-graft-benzo-15-crown-5-ether/PVA Blend Membrane with Sponge-Like Pores for Lithium Isotope Adsorptive Separation," *ACS Omega*, vol. 3, no. 1, pp. 554–561, Jan. 2018.
- [151] S. C. Brooks and G. R. Southworth, "History of mercury use and environmental contamination at the Oak Ridge Y-12 Plant," *Environ. Pollut.*, vol. 159, no. 1, pp. 219–228, Jan. 2011.
- [152] P. Gomes, T. Valente, D. Geraldo, and C. Ribeiro, "Photosynthetic pigments in acid mine drainage: Seasonal patterns and associations with stressful abiotic characteristics," *Chemosphere*, vol. 239, p. 124774, Jan. 2020.
- [153] B. Nixdorf, U. Mischke, and D. Leßmann, "Chrysophytes and chlamydomonads: pioneer colonists in extremely acidic mining lakes (pH <3) in Lusatia (Germany)," *Hydrobiologia*, vol. 369, no. 0, pp. 315–327, 1998.
- [154] A. P. Dean *et al.*, "Metabolic adaptation of a *Chlamydomonas acidophila* strain isolated from acid mine drainage ponds with low eukaryotic diversity," *Sci. Total Environ.*, vol. 647, pp. 75–87, Jan. 2019.
- [155] T. H. Oliver *et al.*, "Biodiversity and Resilience of Ecosystem Functions," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 30, no. 11, pp. 673–684, Nov. 2015.
- [156] L. A. A. Zettler, F. Gómez, E. Zettler, B. G. Keenan, R. Amils, and M. L. Sogin, "Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire," *Nature*, vol. 417, no. 6885, pp. 137–137, May 2002.
- [157] E. Low-Décarie, G. F. Fussmann, A. J. Dumbrell, and G. Bell, "Communities that thrive in extreme conditions captured from a freshwater lake," *Biol. Lett.*, vol. 12, no. 9, Sep. 2016.
- [158] H. A. Schnell, "Bioleaching of Copper," in *Biomining*, D. E. Rawlings, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997, pp. 21–43.
- [159] C. Lupp and E. G. Ruby, "*Vibrio fischeri* uses two quorum-sensing systems for the regulation of early and late colonization factors," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 11, pp. 3620–3629, Jun. 2005.
- [160] V. da S. Nunes-Halldorson and N. L. Duran, "Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 34, no. 2, pp. 91–96, 2003.
- [161] J. Park *et al.*, "Potential Impact of Seawater Uranium Extraction on Marine Life," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 55, no. 15, pp. 4278–4284, Apr. 2016.
- [162] E. Fulladosa, J. C. Murat, and I. Villaescusa, "Study on the toxicity of binary

- equitoxic mixtures of metals using the luminescent bacteria *Vibrio fischeri* as a biological target," *Chemosphere*, vol. 58, no. 5, pp. 551–557, Feb. 2005.
- [163] S. Girotti, L. Bolelli, A. Roda, G. Gentilomi, and M. Musiani, "Improved detection of toxic chemicals using bioluminescent bacteria," *Anal. Chim. Acta*, vol. 471, no. 1, pp. 113–120, Oct. 2002.
- [164] V. Di Nica, S. Villa, and A. Finizio, "Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Experimental results for single compounds and considerations of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 36, no. 3, pp. 807–814, Mar. 2017.
- [165] G. Tóth, J. Háhn, B. Kriszt, and S. Szoboszlay, "Acute and chronic toxicity of herbicides and their mixtures measured by *Aliivibrio fischeri* ecotoxicological assay," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 185, p. 109702, Dec. 2019.
- [166] J. C. Chang, P. B. Taylor, and F. R. Leach, "Use of the microtox[®] assay system for environmental samples," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 26, no. 1, pp. 150–156, 1981.
- [167] G. T. Ankley, R. A. Hoke, J. P. Giesy, and P. V. Winger, "Evaluation of the toxicity of marine sediments and dredge spoils with the Microtox bioassay," *Chemosphere*, vol. 18, no. 9–10, pp. 2069–2075, Jan. 1989.
- [168] M. Mirjani, M. Soleimani, and V. Salari, "Toxicity assessment of total petroleum hydrocarbons in aquatic environments using the bioluminescent bacterium *Aliivibrio fischeri*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 207, p. 111554, Jan. 2021.
- [169] O. C. Calvo, G. Quaglia, A. Mohiley, M. Cesarini, and A. Fangmeier, "Assessing potential aquatic toxicity of airport runoff using physicochemical parameters and *Lemna gibba* and *Aliivibrio fischeri* bioassays," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 27, no. 32, pp. 40604–40617, Jul. 2020.
- [170] E. Bellinger and D. Sigeo, *Freshwater algae: identification, enumeration and use as bioindicators*. John Wiley and Sons, 2015.
- [171] C. E. Shannon, "A Mathematical Theory of Communication," *Bell Syst. Tech. J.*, vol. 27, no. 3, Jul. 1948.
- [172] E. H. Simpson, "Measurement of Diversity," *Nature*, vol. 163, no. 4148, pp. 688–688, 1949.
- [173] A. Aslam, S. R. Thomas-Hall, T. A. Mughal, and P. M. Schenk, "Selection and adaptation of microalgae to growth in 100% unfiltered coal-fired flue gas," *Bioresour. Technol.*, vol. 233, pp. 271–283, Jun. 2017.
- [174] M. A. Scaife, G. T. D. T. Nguyen, J. Rico, D. Lambert, K. E. Helliwell, and A. G. Smith, "Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology

- host," *Plant J.*, vol. 82, no. 3, pp. 532–546, May 2015.
- [175] S. S. An, T. Friedl, and E. Hegewald, "Phylogenetic relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons," *Plant Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 418–428, Jul. 1999.
- [176] E. Hegewald, C. Bock, and L. Krienitz, "A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of Pectinodesmus and the new genera Verrucodesmus and Chodatodesmus (Chlorophyta, Chlorophyceae)," *Fottea*, vol. 13, no. 2, pp. 149–164, 2013.
- [177] C. L. Gutiérrez, C. Muñoz, M. S. Martín, J.-P. Cadoret, and V. Henríquez, "Chloroplast Dual Divergent Promoter Plasmid for Heterologous Protein Expression in Tetraselmis suecica (Chlorophyceae, Chlorodendrales)," *J. Phycol.*, vol. 56, no. 4, pp. 1066–1076, Aug. 2020.
- [178] A. Novick and L. Szilard, "Experiments with the Chemostat on Spontaneous Mutations of Bacteria," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 36, no. 12, p. 708, 1950.
- [179] M. MacWilliams and M. Liao, "Luria broth (LB) and Luria agar (LA) media and their uses protocol," *Am. Soc. Microbiol.*, 2016.
- [180] E. R. Weibel, G. S. Kistler, and W. F. Scherle, "PRACTICAL STEREOLOGICAL METHODS FOR MORPHOMETRIC CYTOLOGY," *J. Cell Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 23–38, Jul. 1966.
- [181] W. M. Haynes, D. R. Lide, and T. J. Bruno, Eds., *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*, 97th ed. CRC Press, 2017.
- [182] R. Pal and A. Choudhury, *An introduction to phytoplanktons: diversity and ecology*. New Delhi: Springer India, 2014.
- [183] L. K. Pandey, "In situ assessment of metal toxicity in riverine periphytic algae as a tool for biomonitoring of fluvial ecosystems," *Environ. Technol. Innov.*, vol. 18, p. 100675, May 2020.
- [184] K. Wolowski, K. Turnau, and F. S. Henriques, "The algal flora of an extremely acidic, metal-rich drainage pond of Sao Domingos pyrite mine (Portugal)," *Cryptogam. Algal.*, vol. 29, no. 4, p. 313, 2008.
- [185] C. E. W. Steinberg, H. Schäfer, and W. Beisker, "Do Acid-tolerant Cyanobacteria Exist?," *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 26, no. 1, Jan. 1998.
- [186] J. Seckbach and A. Oren, "Oxygenic Photosynthetic Microorganisms in Extreme Environments," pp. 3–25, 2007.
- [187] C. Hao, L. Zhang, L. Wang, S. Li, and H. Dong, "Microbial Community Composition in Acid Mine Drainage Lake of Xiang Mountain Sulfide Mine in

- Anhui Province, China," *Geomicrobiol. J.*, vol. 29, no. 10, pp. 886–895, Dec. 2012.
- [188] V. Mesa *et al.*, "Bacterial, Archaeal, and Eukaryotic Diversity across Distinct Microhabitats in an Acid Mine Drainage," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. SEP, p. 1756, Sep. 2017.
- [189] I. Kamika, S. Azizi, and M. Tekere, "Microbial profiling of South African acid mine water samples using next generation sequencing platform," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 13, pp. 6069–6079, Mar. 2016.
- [190] I. Ñancucheo and D. Barrie Johnson, "Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. SEP, p. 325, Sep. 2012.
- [191] V. López-Rodas, F. Marva, M. Rouco, E. Costas, and A. Flores-Moya, "Adaptation of the chlorophycean *Dictyosphaerium chlorelloides* to stressful acidic, mine metal-rich waters as result of pre-selective mutations," *Chemosphere*, vol. 72, no. 5, pp. 703–707, Jun. 2008.
- [192] T. M. Valente and C. L. Gomes, "The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites," *J. Iber. Geol.*, vol. 33, no. 2, pp. 283–294, 2007.
- [193] H. D. Bennett, "Algae in Relation to Mine Water," *Castanea*, vol. 34, no. 3, pp. 306–328, 1969.
- [194] D. Halter *et al.*, "In situ proteo-metabolomics reveals metabolite secretion by the acid mine drainage bio-indicator, *Euglena mutabilis*," *ISME J.*, vol. 6, no. 7, pp. 1391–1402, Jan. 2012.
- [195] M. M. Olaveson and C. Nalewajko, "Effects of acidity on the growth of two *Euglena* species," *Hydrobiologia*, vol. 433, no. 1, pp. 39–56, 2000.
- [196] A. Gerloff-Elias, E. Spijkerman, and T. Proschold, "Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negoro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6)," *Plant, Cell Environ.*, vol. 28, no. 10, pp. 1218–1229, Oct. 2005.
- [197] U. Pick, "Dunaliella Acidophila — A Most Extreme Acidophilic Alga," in *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*, J. Seckbach, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999, pp. 465–478.
- [198] E. V. Gruzdev *et al.*, "Diversity of Eukaryotic Microorganisms in the Drainage Waters of a Coal Open-Cast Mine," *Microbiology*, vol. 89, no. 5, pp. 641–646, Oct. 2020.
- [199] D. M. DeNicola, "A review of diatoms found in highly acidic environments," *Hydrobiologia*, vol. 433, no. 1, pp. 111–122, 2000.
- [200] S. C. Antunes, D. R. de Figueiredo, S. M. Marques, B. B. Castro, R. Pereira, and F.
-

- Gonçalves, "Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays," *Sci. Total Environ.*, vol. 374, no. 2–3, pp. 252–259, Mar. 2007.
- [201] F. Geng *et al.*, "Evaluation of the toxic effect on zebrafish (*Danio rerio*) exposed to uranium mill tailings leaching solution," *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 292, no. 1, pp. 453–463, Oct. 2011.
- [202] S. C. Antunes, R. Pereira, and F. Gonçalves, "Acute and Chronic Toxicity of Effluent Water from an Abandoned Uranium Mine," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 53, no. 2, pp. 207–213, Jun. 2007.
- [203] M. F. Hamza, I. E. El-Aassy, and E. Guibal, "Integrated treatment of tailing material for the selective recovery of uranium, rare earth elements and heavy metals," *Miner. Eng.*, vol. 133, pp. 138–148, Mar. 2019.
- [204] J. Beardall and L. Entwisle, "Internal pH of the obligate acidophile *Cyanidium caldarium* Geitler (Rhodophyta?)," *Phycologia*, vol. 23, no. 3, pp. 397–399, Sep. 1984.
- [205] J. Seckbach, "Acidophilic Microorganisms," in *Journey to Diverse Microbial Worlds: Adaptation to Exotic Environments*, J. Seckbach, Ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000, pp. 107–116.
- [206] A. E. Lane and J. E. Burris, "Effects of Environmental pH on the Internal pH of *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus quadricauda*, and *Euglena mutabilis*," *Plant Physiol.*, vol. 68, no. 2, pp. 439–442, Aug. 1981.
- [207] S. Hirooka *et al.*, "Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 39, pp. E8304–E8313, Sep. 2017.
- [208] T. Sasaki, "Development of vacuoles and vacuolar H⁺-ATPase activity under extremely high-CO₂ conditions in *Chlorococcum littorale* cells.," *Plant Biol.*, vol. 1, pp. 68–75, 1999.
- [209] M. Sakarika and M. Kornaros, "Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga *Chlorella vulgaris* grown heterotrophically under sulfur limitation," *Bioresour. Technol.*, vol. 219, pp. 694–701, Nov. 2016.
- [210] D. Kaplan, "Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae," *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol. Second Ed.*, pp. 602–611, Jan. 2013.
- [211] J. L. Levy, J. L. Stauber, and D. F. Jolley, "Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity," *Sci. Total Environ.*, vol. 387, no. 1–3, pp. 141–154, Nov. 2007.
- [212] D. J. Koppel, F. Gissi, M. S. Adams, C. K. King, and D. F. Jolley, "Chronic toxicity of five metals to the polar marine microalga *Cryothecomonas armigera* –

- Application of a new bioassay," *Environ. Pollut.*, vol. 228, pp. 211–221, Sep. 2017.
- [213] E. Pinto, T. C. S. Sigaud-Kutner, M. A. S. Leitão, O. K. Okamoto, D. Morse, and P. Colepicolo, "Heavy metal-induced oxidative stress in algae," *J. Phycol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1008–1018, Dec. 2003.
- [214] A. K. Upadhyay, S. K. Mandotra, N. Kumar, N. K. Singh, L. Singh, and U. N. Rai, "Augmentation of arsenic enhances lipid yield and defense responses in alga *Nannochloropsis* sp.," *Bioresour. Technol.*, vol. 221, pp. 430–437, Dec. 2016.
- [215] M. A. Hossain, P. Piyatida, J. A. Teixeira Da Silva, and M. Fujita, "Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation," *J. Bot.*, vol. 2012, p. 37, 2012.
- [216] M. R. Gauthier, G. N. A. Senhorinho, and J. A. Scott, "Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants," *Algal Res.*, vol. 52, p. 102104, Dec. 2020.
- [217] S. Tripathi and K. M. Poluri, "Heavy metal detoxification mechanisms by microalgae: Insights from transcriptomics analysis," *Environ. Pollut.*, vol. 285, p. 117443, Sep. 2021.
- [218] C. S. Cobbett, "Phytochelatin and Their Roles in Heavy Metal Detoxification," *Plant Physiol.*, vol. 123, no. 3, pp. 825–832, Jul. 2000.
- [219] C. Cobbett and P. Goldsbrough, "PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 53, pp. 159–182, Nov. 2003.
- [220] V. Gómez-Jacinto, T. García-Barrera, J. L. Gómez-Ariza, I. Garbayo-Nores, and C. Vílchez-Lobato, "Elucidation of the defence mechanism in microalgae *Chlorella sorokiniana* under mercury exposure. Identification of Hg-phytochelatin," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 238, pp. 82–90, Aug. 2015.
- [221] E. Heuillet, A. Moreau, and S. Halpern, "Cadmium binding to a thiol-molecule in vacuoles of *Dunaliella bioculata* contaminated with CdCl₂: Electron probe microanalysis," *Biol. Cell*, vol. 58, no. 1, pp. 79–86, 1986.
- [222] J. P. Gaur and L. C. Rai, "Heavy Metal Tolerance in Algae," in *Algal Adaptation to Environmental Stresses*, Springer Berlin Heidelberg, 2001, pp. 363–388.
- [223] G. M. Gadd, "Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation," *Microbiology*, vol. 156, no. 3, pp. 609–643, Mar. 2010.
- [224] K. K. I. U. Arunakumara and Z. Xuecheng, "Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae," *J. Ocean Univ. China*, vol. 7, no. 1, pp. 60–64, Feb. 2008.
-

- [225] H. V. Perales-Vela, J. M. Peña-Castro, and R. O. Cañizares-Villanueva, "Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae," *Chemosphere*, vol. 64, no. 1, pp. 1–10, Jun. 2006.
- [226] S. Abinandan, I. A. Perera, S. R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, N. Cole, and M. Megharaj, "Acid-adapted microalgae exhibit phenotypic changes for their survival in acid mine drainage samples," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 96, no. 11, Nov. 2020.
- [227] K. L. Wilde, J. L. Stauber, S. J. Markich, N. M. Franklin, and P. L. Brown, "The Effect of pH on the Uptake and Toxicity of Copper and Zinc in a Tropical Freshwater Alga (*Chlorella* sp.)," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 51, no. 2, pp. 174–185, Mar. 2006.
- [228] N. M. Franklin, J. L. Stauber, S. J. Markich, and R. P. Lim, "pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 275–289, Mar. 2000.
- [229] K. A. C. De Schamphelaere *et al.*, "Toward a biotic ligand model for freshwater green algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu²⁺-ion activity when pH is varied," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 7, pp. 2067–2072, Apr. 2005.
- [230] R. R. Goulet, P. A. Thompson, K. C. Serben, and C. V. Eickhoff, "Impact of environmentally based chemical hardness on uranium speciation and toxicity in six aquatic species," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 34, no. 3, pp. 562–574, Mar. 2015.
- [231] A. L. Charles, S. J. Markich, J. L. Stauber, and L. F. De Filippis, "The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 60, no. 1–2, pp. 61–73, Oct. 2002.
- [232] N. Paquet *et al.*, "Toxicity of tailing leachates from a niobium mine toward three aquatic organisms," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 176, pp. 355–363, Jul. 2019.
- [233] S. C. Sheppard, M. I. Sheppard, M. O. Gallerand, and B. Sanipelli, "Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium," *J. Environ. Radioact.*, vol. 79, no. 1, pp. 55–83, Jan. 2005.
- [234] E. Bautista-Chamizo, M. R. De Orte, T. Á. DelValls, and I. Riba, "Simulating CO₂ leakages from CCS to determine Zn toxicity using the marine microalgae *Pleurochrysis roscoffensis*," *Chemosphere*, vol. 144, pp. 955–965, Feb. 2016.
- [235] R. H. Crist, K. Oberholser, D. Schwartz, J. Marzoff, D. Ryder, and D. R. Crist, "Interactions of metals and protons with algae," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 22, no. 7, pp. 755–760, Jul. 1988.
- [236] M. R. De Orte *et al.*, "Metal mobility and toxicity to microalgae associated with acidification of sediments: CO₂ and acid comparison," *Mar. Environ. Res.*, vol.

- 96, pp. 136–144, May 2014.
- [237] C. M. Monteiro, S. C. Fonseca, P. M. L. Castro, and F. X. Malcata, “Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 23, no. 1, pp. 97–103, Jun. 2010.
- [238] H. H. Omar, “Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 50, no. 2, pp. 95–100, Sep. 2002.
- [239] B. N. Tripathi and J. P. Gaur, “Physiological behavior of *Scenedesmus* sp. during exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress,” *Protoplasma*, vol. 229, no. 1, pp. 1–9, Nov. 2006.
- [240] Z. Novák, S. Harangi, E. Baranyai, S. Gonda, V. B-Béres, and I. Bácsi, “Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (Chlorophyceae) species,” *Phycol. Res.*, vol. 68, no. 3, pp. 227–235, Jul. 2020.
- [241] H. G. Peterson, F. P. Healey, and R. Wagemann, “Metal Toxicity to Algae: A Highly pH Dependent Phenomenon,” *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 41, no. 6, pp. 974–979, Jun. 2011.
- [242] Y. Y. Wang *et al.*, “Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae,” *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*, vol. 14, no. 3, pp. 427–451, Jul. 2015.
- [243] H. Bhattacharjee, R. Mukhopadhyay, S. Thiyagarajan, and B. P. Rosen, “Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids,” *J. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1–6, Nov. 2008.
- [244] J. L. Levy, J. L. Stauber, M. S. Adams, W. A. Maher, J. K. Kirby, and D. F. Jolley, “Toxicity, biotransformation, and mode of action of arsenic in two freshwater microalgae (*Chlorella* sp. and *Monoraphidium arcuatum*),” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 24, no. 10, pp. 2630–2639, Oct. 2005.
- [245] M. A. Rahman *et al.*, “Toxicity of arsenic species to three freshwater organisms and biotransformation of inorganic arsenic by freshwater phytoplankton (*Chlorella* sp. CE-35),” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 106, pp. 126–135, Aug. 2014.
- [246] Z. Huang *et al.*, “Absorption and speciation of arsenic by microalgae under arsenic-copper Co-exposure,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 213, p. 112024, Apr. 2021.
- [247] L. H. T. Dao and J. Beardall, “Effects of lead on two green microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*: photosystem II activity and heterogeneity,” *Algal Res.*, vol. 16, pp. 150–159, Jun. 2016.
-

- [248] T. J. Monahan, "LEAD INHIBITION OF CHLOROPHYCEAN MICROALGAE," *J. Phycol.*, vol. 12, no. 3, pp. 358–362, Sep. 1976.
- [249] M. Lavoie, S. Sabatier, J. Garnier-Laplace, and C. Fortin, "Uranium accumulation and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is modulated by pH," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 33, no. 6, pp. 1372–1379, Jun. 2014.
- [250] O. Herlory, J. M. Bonzom, and R. Gilbin, "Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry," *Aquat. Toxicol.*, vol. 140–141, pp. 288–294, Sep. 2013.
- [251] J. A. LaVerne, "OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water," *Radiat. Res.*, vol. 153, no. 2, pp. 196–200, Feb. 2000.
- [252] I. Shuryak and D. J. Brenner, "A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in *Deinococcus radiodurans*," *J. Theor. Biol.*, vol. 261, no. 2, p. 305, Nov. 2009.
- [253] T. Gomes *et al.*, "Sensitivity of the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* to gamma radiation: Photosynthetic performance and ROS formation," *Aquat. Toxicol.*, vol. 183, pp. 1–10, Feb. 2017.
- [254] G. Rea *et al.*, "Ionizing radiation impacts photochemical quantum yield and oxygen evolution activity of Photosystem II in photosynthetic microorganisms," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 84, no. 11, pp. 867–877, 2009.
- [255] P. Gabani and O. V. Singh, "Radiation-resistant extremophiles and their potential in biotechnology and therapeutics," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 3, pp. 993–1004, Dec. 2012.
- [256] V. E. McGraw *et al.*, "A novel adaptation mechanism underpinning algal colonization of a nuclear fuel storage pond," *MBio*, vol. 9, no. 3, May 2018.
- [257] L. Foster *et al.*, "Radiation Tolerance of *Pseudanabaena catenata*, a Cyanobacterium Relevant to the First Generation Magnox Storage Pond," *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 515, Apr. 2020.
- [258] M. J. Daly *et al.*, "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance," *Science (80-.)*, vol. 306, no. 5698, pp. 1025–1028, Nov. 2004.
- [259] S. G. Chankova and P. E. Bryant, "Acceleration of DNA-double strand rejoining during the adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii*," *Radiatsionnaya Biol. Radioekol.*, vol. 42, no. 6, pp. 600–603, Nov. 2002.
- [260] C. Rivasseau *et al.*, "*Coccomyxa actinabiotis* sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a new green microalga living in the spent fuel cooling pool of a nuclear reactor," *J. Phycol.*, vol. 52, no. 5, pp. 689–703, Oct. 2016.
- [261] C. Rivasseau *et al.*, "An extremely radioresistant green eukaryote for

- radionuclide bio-decontamination in the nuclear industry,” *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 1230–1239, Mar. 2013.
- [262] C. Rivasseau, D. de Gouvion Saint Cyr, A. Atteia, M. Gromova, and E. Farhi, *Biological decontamination of radionuclides in industrial and environmental water using a new highly radioresistant microalga*. 2015.
- [263] G. L. A. Barker, B. A. Handley, P. Vacharapiyasophon, J. R. Stevens, and P. K. Hayes, “Allele-specific PCR shows that genetic exchange occurs among genetically diverse *Nodularia* (Cyanobacteria) filaments in the Baltic Sea,” *Microbiology*, vol. 146, no. 11, pp. 2865–2875, 2000.
- [264] K. Rudi, O. M. Skulberg, and K. S. Jakobsen, “Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains,” *J. Bacteriol.*, vol. 180, no. 13, pp. 3453–3461, 1998.
- [265] M. Cecchin *et al.*, “*Chlorella vulgaris* genome assembly and annotation reveals the molecular basis for metabolic acclimation to high light conditions,” *Plant J.*, vol. 100, no. 6, pp. 1289–1305, Dec. 2019.
- [266] D. R. Nelson *et al.*, “Large-scale genome sequencing reveals the driving forces of viruses in microalgal evolution,” *Cell Host Microbe*, vol. 29, no. 2, pp. 250–266.e8, Feb. 2021.
- [267] S. E. Luria and M. Delbrück, “MUTATIONS OF BACTERIA FROM VIRUS SENSITIVITY TO VIRUS RESISTANCE,” *Genetics*, vol. 28, no. 6, pp. 491–511, Nov. 1943.
- [268] P. D. Sniegowski, “Linking mutation to adaptation: overcoming stress at the spa,” *New Phytol.*, vol. 166, no. 2, pp. 360–362, May 2005.
- [269] T. Ferenci, “The spread of a beneficial mutation in experimental bacterial populations: The influence of the environment and genotype on the fixation of rpoS mutations,” *Heredity*, vol. 100, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 446–452, 12-Dec-2008.
- [270] T. Ferenci, “Bacterial Physiology, Regulation and Mutational Adaptation in a Chemostat Environment,” *Adv. Microb. Physiol.*, vol. 53, pp. 169–315, Jan. 2007.
- [271] A. I. López-Archilla, I. Marín, and R. Amils, “Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Río Tinto, Spain,” *Geomicrobiol. J.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 223–233, Jul. 1993.
- [272] L. A. A. Zettler, M. A. Messerli, A. D. Laatsch, P. J. S. Smith, and M. L. Sogin, “From Genes to Genomes: Beyond Biodiversity in Spain’s Río Tinto,” *Biol. Bull.*, vol. 204, no. 2, pp. 205–209, Sep. 2016.
- [273] E. Costas *et al.*, “How eukaryotic algae can adapt to the Spain’s Río Tinto: a neo-Darwinian proposal for rapid adaptation to an extremely hostile ecosystem,”
-

- New Phytol.*, vol. 175, no. 2, pp. 334–339, Jul. 2007.
- [274] H.-S. Yun *et al.*, “Isolation of novel microalgae from acid mine drainage and its potential application for biodiesel production,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 173, no. 8, pp. 2054–2064, Jun. 2014.
- [275] R. Baos, L. García-Villada, M. Agrelo, V. López-Rodas, F. Hiraldo, and E. Costas, “Short-term adaptation of microalgae in highly stressful environments: an experimental model analysing the resistance of *Scenedesmus intermedius* (Chlorophyceae) to the heavy metals mixture from the Aznalcóllar mine spill,” *Eur. J. Phycol.*, vol. 37, no. 4, pp. 593–600, Nov. 2002.
- [276] R. J. Telford, V. Vandvik, and H. J. B. Birks, “Dispersal Limitations Matter for Microbial Morphospecies,” *Science (80-.)*, vol. 312, no. 5776, pp. 1015–1015, May 2006.
- [277] C. Mony, P. Vandenkoornhuyse, B. J. M. Bohannan, K. Peay, and M. A. Leibold, “A Landscape of Opportunities for Microbial Ecology Research,” *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 2964, Nov. 2020.
- [278] M. Vellend and A. Agrawal, “Conceptual Synthesis in Community Ecology,” *Q. Rev. Biol.*, vol. 85, no. 2, pp. 183–206, Jul. 2015.
- [279] C. A. Hanson, J. A. Fuhrman, M. C. Horner-Devine, and J. B. H. Martiny, “Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 7, pp. 497–506, May 2012.
- [280] G. E. Hutchinson, “The Paradox of the Plankton,” *Am. Nat.*, vol. 95, no. 882, pp. 137–145, Oct. 1961.
- [281] M. Yamamichi and A. D. Letten, “Rapid evolution promotes fluctuation-dependent species coexistence,” *Ecol. Lett.*, vol. 24, no. 4, pp. 812–818, Apr. 2021.
- [282] A. Zufiaurre, M. Felip, P. Giménez-Grau, S. Pla-Rabès, L. Camarero, and J. Catalan, “Episodic nutrient enrichments stabilise protist coexistence in planktonic oligotrophic conditions,” *J. Ecol.*, vol. 109, no. 4, pp. 1717–1729, Apr. 2021.
- [283] S. Selenska-Pobell, K. Flemming, T. Tzvetkova, J. Raff, M. Schnorpfel, and A. Geißler, “Bacterial communities in uranium mining waste piles and their interaction with heavy metals,” *Uranium Aquat. Environ.*, pp. 455–464, 2002.
- [284] K. Pollmann, J. Raff, M. Merroun, K. Fahmy, and S. Selenska-Pobell, “Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 24, no. 1, pp. 58–68, Jan. 2006.
- [285] I. Sánchez-Castro *et al.*, “Screening of bacterial strains isolated from uranium mill tailings porewaters for bioremediation purposes,” *J. Environ. Radioact.*, vol.

- 166, pp. 130–141, Jan. 2017.
- [286] N. J. Tucci, “Algal bioremediation of the Berkeley Pit Lake System, Butte, MT: An in-situ experiment using limnocorrals,” University of Montana, 2006.
- [287] B. K. Das, A. Roy, M. Koschorreck, S. M. Mandal, K. Wendt-Potthoff, and J. Bhattacharya, “Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization,” *Water Res.*, vol. 43, no. 4, pp. 883–894, Mar. 2009.
- [288] A. S. Sheoran and S. Bhandari, “Treatment of Mine Water by a Microbial Mat: Bench-scale Experiments,” *Mine Water Environ.*, vol. 1, no. 24, pp. 38–42, Mar. 2005.
- [289] S. Abinandan, S. R. Subashchandrabose, K. Venkateswarlu, and M. Megharaj, “Microalgae–bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 102, no. 3, pp. 1131–1144, Dec. 2017.
- [290] M. del R. Martínez-Macias *et al.*, “Uptake of copper from acid mine drainage by the microalgae *Nannochloropsis oculata*,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 6311–6318, Jan. 2019.
- [291] C. Fortin, L. Dutels, and J. Garnier-Laplace, “Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation: The importance of the free uranyl ion,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 23, no. 4, pp. 974–981, Apr. 2004.
- [292] K. Aleissa, E.-S. Shabana, and F. Al-Masoud, “Accumulation of uranium by filamentous green algae under natural environmental conditions,” *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 260, no. 3, pp. 683–687, Nov. 2004.
- [293] B. Baselga-Cervera, J. Romero-López, C. García-Balboa, E. Costas, and V. López-Rodas, “Improvement of the Uranium Sequestration Ability of a *Chlamydomonas* sp. (ChISP Strain) Isolated From Extreme Uranium Mine Tailings Through Selection for Potential Bioremediation Application,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. MAR, p. 523, Mar. 2018.
- [294] C. M. Monteiro, P. M. L. Castro, and F. X. Malcata, “Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, no. 2, pp. 299–311, Mar. 2012.
- [295] R. P. Van Hille, G. A. Boshoff, P. D. Rose, and J. R. Duncan, “A continuous process for the biological treatment of heavy metal contaminated acid mine water,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 27, no. 1–2, pp. 157–167, Jul. 1999.
- [296] M. Koschorreck, R. Frömmichen, P. Herzsprung, J. Tittel, and K. Wendt-Potthoff, “Functions of Straw for In Situ Remediation of Acidic Mining Lakes,” *Water, Air Soil Pollut. Focus*, vol. 2, no. 3, pp. 97–109, 2002.
-

- [297] M. Hirano, H. Mori, Y. Miura, N. Matsunaga, N. Nakamura, and T. Matsunaga, "γ-linolenic acid production by microalgae," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 24, no. 1, pp. 183–191, Mar. 1990.
- [298] X.-J. Ji, L.-J. Ren, and H. Huang, "Omega-3 Biotechnology: A Green and Sustainable Process for Omega-3 Fatty Acids Production," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, no. OCT, p. 158, Oct. 2015.
- [299] G. Su *et al.*, "Enhancing total fatty acids and arachidonic acid production by the red microalgae *Porphyridium purpureum*," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 3, no. 1, Dec. 2016.
- [300] M. A. Borowitzka, "Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds," *J. Appl. Phycol.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–15, Feb. 1995.
- [301] H. Al-Wathnani, I. Ara, R. R. Tahmaz, T. H. Al-Dayel, and M. A. Bakir, "Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 18, pp. 3425–3433, May 2012.
- [302] M. K. Agrawal, "Antimicrobial Activity of *Nostoc calcicola* (Cyanobacteria) Isolated from Central India Against Human Pathogens," *Asian J. Pharm.*, vol. 10, no. 04, Dec. 2016.
- [303] F. A. Pagnussatt, E. M. Del Ponte, J. Garda-Buffon, and E. Badiale-Furlong, "Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp.," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 108, no. 1, pp. 21–26, Jan. 2014.
- [304] P. T. Scaglioni and E. Badiale-Furlong, "Can Microalgae Act as Source of Preservatives in Food Chain?," *J. Food Sci. Eng.*, vol. 7, pp. 283–296, 2017.
- [305] S. (Malis) Arad and A. Yaron, "Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 3, no. C. Elsevier, pp. 92–97, 01-Jan-1992.
- [306] M. L. Mourelle, C. P. Gómez, and J. L. Legido, "The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy," *Cosmetics*, vol. 4, no. 4, p. 46, Nov. 2017.
- [307] A. Rahman and C. D. Miller, "Microalgae as a Source of Bioplastics," in *Algal Green Chemistry: Recent Progress in Biotechnology*, Elsevier, 2017, pp. 121–138.
- [308] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and N. Dubois-Calero, "Biofuels from Microalgae," *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 4, pp. 815–820, Jul. 2008.
- [309] E. E. Pickett and B. L. O'Dell, "Evidence for dietary essentiality of lithium in the rat," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 34, no. 3, pp. 299–319, Sep. 1992.

- [310] R. Mueller, M. Anke, and L. Betz, "Essentiality of the ultra trace element lithium to the nutrit..|INIS," in *Proceedings of the 30. Scientific symposium of industrial toxicology*, 2010.
- [311] L. P. Wackett, A. G. Dodge, and L. B. M. Ellis, "Microbial Genomics and the Periodic Table," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 647–655, Feb. 2004.
- [312] K. Sakrajda and A. Szczepankiewicz, "Inflammation-Related Changes in Mood Disorders and the Immunomodulatory Role of Lithium," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, p. 1532, Feb. 2021.
- [313] W. Ge and E. Jakobsson, "Systems Biology Understanding of the Effects of Lithium on Cancer," *Front. Oncol.*, vol. 9, no. APR, p. 296, Apr. 2019.
- [314] E. Jakobsson *et al.*, "Towards a Unified Understanding of Lithium Action in Basic Biology and its Significance for Applied Biology," *J. Membr. Biol.*, vol. 250, no. 6, pp. 587–604, Dec. 2017.
- [315] B. Shahzad *et al.*, "Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms and remediation possibilities – A review," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 107, pp. 104–115, Oct. 2016.
- [316] A.-M. Sapse and P. von R. Schleyer, *Lithium chemistry: a theoretical and experimental overview*. New York: Wiley, 1995.
- [317] B. Shahzad, M. N. Mughal, M. Tanveer, D. Gupta, and G. Abbas, "Is lithium biologically an important or toxic element to living organisms? An overview," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 103–115, 2017.
- [318] T. Dudev and C. Lim, "Competition between Li⁺ and Mg²⁺ in Metalloproteins. Implications for Lithium Therapy," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 24, pp. 9506–9515, Jun. 2011.
- [319] K. T. Briggs, G. G. Giulian, G. Li, J. P. Y. Kao, and J. P. Marino, "A Molecular Model for Lithium's Bioactive Form," *Biophys. J.*, vol. 111, no. 2, pp. 294–300, Jul. 2016.
- [320] Murguia, J. Belles, and R. Serrano, "A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation," *Science (80-.)*, vol. 267, no. 5195, pp. 232–234, Jan. 1995.
- [321] A. Haimovich, U. Eliav, and A. Goldbourt, "Determination of the Lithium Binding Site in Inositol Monophosphatase, the Putative Target for Lithium Therapy, by Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 12, pp. 5647–5651, Mar. 2012.
- [322] N. J. Birch, "Possible mechanism for biological action of lithium," *Nature*, vol. 264, no. 5587. Nature Publishing Group, p. 681, 1976.
- [323] C. F. Cubillos, P. Aguilar, M. Grágeda, and C. Dorador, "Microbial Communities From the World's Largest Lithium Reserve, Salar de Atacama, Chile: Life at High

- LiCl Concentrations," *J. Geophys. Res. Biogeosciences*, vol. 123, no. 12, pp. 3668–3681, Dec. 2018.
- [324] C. Belfiore, M. V. Curia, and M. E. Farías, "Characterization of *Rhodococcus* sp. A5wh isolated from a high altitude Andean lake to unravel the survival strategy under lithium stress," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 311–322, Nov. 2018.
- [325] J. C. Wissocq, J. Attias, and M. Thellier, *Exotic effects of lithium*. Elsevier, 1991.
- [326] R. Strauss, "LITHIUM ABSORPTION AND INTERACTIONS BETWEEN ALKALINE IONS IN *CHARA FRAGILIS* DESVAUX," *Comptes rendus Hebd. des seances l'Academie des Sci. Ser. D*, vol. 266, no. 24, p. 2249, 1968.
- [327] K. Østgaard, A. Jensen, and A. Johnsson, "Lithium ions lengthen the circadian period of growing cultures of the diatom *Skeletonema costatum*," *Physiol. Plant.*, vol. 55, no. 3, pp. 285–288, Jul. 1982.
- [328] S. Nakamura, H. Takino, and M. K. Kojima, "Effect of Lithium on Flagellar Length in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Cell Struct. Funct.*, vol. 12, no. 4, pp. 369–374, 1987.
- [329] N. F. Wilson and P. A. Lefebvre, "Regulation of flagellar assembly by glycogen synthase kinase 3 in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Eukaryot. Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 1307–1319, Oct. 2004.
- [330] G. Periz, D. Dharia, S. H. Miller, and L. R. Keller, "Flagellar elongation and gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*," *Eukaryot. Cell*, vol. 6, no. 8, pp. 1411–1420, Aug. 2007.
- [331] E. P. Karlander and R. W. Krauss, "Absorption and toxicity of beryllium and lithium in *Chlorella vanniellii* Shihira and Krauss," *Chesap. Sci.*, vol. 13, no. 4, pp. 245–253, Dec. 1972.
- [332] C. S. F. Nordi, T. G. W. F. Cavagliere, A. A. H. Vieira, and O. R. Nascimento, "Efeito caotrópico do íon lítio na permeabilidade da cápsula polissacarídica da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae)," *Acta Bot. Brasílica*, vol. 20, no. 2, pp. 449–454, Apr. 2006.
- [333] C. E. Naylor *et al.*, "Molecular basis of ion permeability in a voltage-gated sodium channel," *EMBO J.*, vol. 35, no. 8, pp. 820–830, Apr. 2016.
- [334] A. Kabata-Pendias and A. B. Mukherjee, *Trace elements from soil to human*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [335] A. N. Thompson, I. Kim, T. D. Panosian, T. M. Iverson, T. W. Allen, and C. M. Nimigean, "Mechanism of potassium-channel selectivity revealed by Na⁺ and Li⁺ binding sites within the KcsA pore," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 1317–1324, Nov. 2009.

- [336] E. Padan, "The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na⁺-H⁺ antiporter," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 33, no. 9, pp. 435-443, Sep. 2008.
- [337] J. Ariño, J. Ramos, and H. Sychrová, "Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 1, pp. 95-120, Mar. 2010.
- [338] Z. P. Jia, N. McCullough, R. Martel, S. Hemmingsen, and P. G. Young, "Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast," *EMBO J.*, vol. 11, no. 4, pp. 1631-1640, Apr. 1992.
- [339] E. Zörgö *et al.*, "Ancient Evolutionary Trade-Offs between Yeast Ploidy States," *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 3, p. e1003388, 2013.
- [340] J. Perkins and G. M. Gadd, "Accumulation and intracellular compartmentation of lithium ions in *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 107, no. 2-3, pp. 255-260, Mar. 1993.
- [341] C.-C. Chen, T. Tsuchiya, Y. Yamane, J. M. Wood, and T. H. Wilson, "Na⁺ + (Li⁺ +)-proline cotransport in *Escherichia coli*," *J. Membr. Biol.*, vol. 84, no. 2, pp. 157-164, Jun. 1985.
- [342] J. Stock and S. Roseman, "A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 44, no. 1, pp. 132-138, Jul. 1971.
- [343] T. Tsuchiya, M. Oho, and S. Shiota Niiya, "Lithium ion-sugar cotransport via the melibiose transport system in *Escherichia coli*. Measurement of Li⁺ transport and specificity," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 21, pp. 12765-12767, Nov. 1983.
- [344] R. H. Reed, S. R. C. Warr, D. L. Richardson, D. J. Moore, and W. D. P. Stewart, "Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 28, no. 3, pp. 225-229, Jul. 1985.
- [345] M. Weiss and U. Pick, "Transient Na⁺ Flux Following Hyperosmotic Shock in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*: a Response to Intracellular pH Changes," *J. Plant Physiol.*, vol. 136, no. 4, pp. 429-438, Jul. 1990.
- [346] J. R. Blackwell and D. J. Gilmour, "Physiological response of the unicellular green alga *Chlorococcum submarinum* to rapid changes in salinity," *Arch. Microbiol.*, vol. 157, no. 1, pp. 86-91, Dec. 1991.
- [347] I. G. Strizh, L. G. Popova, and Y. V. Balnokin, "Physiological Aspects of Adaptation of the Marine Microalga *Tetraselmis (Platymonas) viridis* to Various Medium Salinity," *Russ. J. Plant Physiol.*, vol. 51, no. 2, pp. 176-182, Mar. 2004.
- [348] M. Smahel, A. Hamann, and D. Gradmann, "The prime plasmalemma ATPase of

- the halophilic alga *Dunaliella bioculata*: purification and characterization," *Planta*, vol. 181, no. 4, pp. 496–504, Jul. 1990.
- [349] U. Pick, "ATPases and ion transport in *Dunaliella*," in *Dunaliella: Physiology, Biochemistry, and Biotechnology*, M. Avron and A. Ben-Amotz, Eds. CRC Press, 1992.
- [350] A. Katz, U. Pick, and M. Avron, "Modulation of Na⁺/H⁺ Antiporter Activity by Extreme pH and Salt in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*," *Plant Physiol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1224–1229, Nov. 1992.
- [351] S. Niiya, K. Yamasaki, T. H. Wilson, and T. Tsuchiya, "Altered cation coupling to melibiose transport in mutants of *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 15, pp. 8902–8906, Aug. 1982.
- [352] N. Kaku, T. Hibino, Y. Tanaka, T. T. Takabe, T. Nakamura, and T. T. Takabe, "Expression of *nhaA* Gene Encoding Na⁺/H⁺ Antiporter from *Vibrio alginolyticus* in a Freshwater Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 Confers Lithium Tolerance, but not Sodium Tolerance," *Plant Cell Physiol.*, vol. 40, no. 5, pp. 557–564, Jan. 1999.
- [353] L. Nespůrková, R. Rybová, and K. Janáček, "Parallel pathways of potassium transport in the alga *Hydrodictyon reticulatum*. Effects of calcium," *Gen. Physiol. Biophys.*, vol. 6, no. 3, pp. 263–270, Jun. 1987.
- [354] M. A. Borowitzka, J. Beardall, and J. A. Raven, *The Physiology of Microalgae*. Springer International Publishing, 2016.
- [355] D. M. J. Dickson and G. O. Kirst, "The role of β-dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*," *Planta*, vol. 167, no. 4, pp. 536–543, Apr. 1986.
- [356] Y. Hara, Y. Mikami, M. Shono, and M. Wada, "Na⁺,K⁺-ATPase in the Marine Alga *Heterosigma akashiwo*," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 986, no. 1, pp. 628–629, Apr. 2003.
- [357] J. Barrero-Gil, B. Garciadeblás, and B. Benito, "Sodium, potassium-ATPases in algae and oomycetes," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 37, no. 4, pp. 269–278, Aug. 2005.
- [358] T. Uji, R. Hirata, K. Mikami, H. Mizuta, and N. Saga, "Molecular characterization and expression analysis of sodium pump genes in the marine red alga *Porphyra yezoensis*," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, no. 8, pp. 7973–7980, Apr. 2012.
- [359] L. G. Popova *et al.*, "In silico Analyses of Transcriptomes of the Marine Green Microalga *Dunaliella tertiolecta*: Identification of Sequences Encoding P-type ATPases," *Mol. Biol.*, vol. 52, no. 4, pp. 520–531, Aug. 2018.
- [360] M. Qafaiti and G. C. Stephens, "Sodium-dependent amino acid transport in the

- chlorophyte *Platymonas subcordiformis*," *Mar. Biol.*, vol. 101, no. 4, pp. 437–441, Dec. 1989.
- [361] H. Günan Yücel, S. Ertuğrul Karatay, Z. Aksu, and G. Dönmez, "Lithium (I) biofortified *Dunaliella salina* as a potential functional nutrition supplement," *Algal Res.*, vol. 56, p. 102257, Jun. 2021.
- [362] N. E.-A. El-Naggar, R. A. Hamouda, N. H. Rabei, I. E. Mousa, and M. S. Abdel-Hamid, "Phycoremediation of lithium ions from aqueous solutions using free and immobilized freshwater green alga *Oocystis solitaria*: mathematical modeling for bioprocess optimization," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 26, no. 19, pp. 19335–19351, 2019.
- [363] T. Tsuruta, "Removal and recovery of lithium using various microorganisms," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 5, pp. 562–566, Nov. 2005.
- [364] A. Kurniawan and T. Yamamoto, "Biosorption of Lithium Using Biofilm Matrix of Natural Microbial Consortium," *Microbiol. Indones.*, vol. 9, no. 3, pp. 2–2, Sep. 2015.
- [365] G. O. Kirst, "Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae," *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 41, no. 1, pp. 21–53, Nov. 1990.
- [366] R. Collander, "Permeabilitätsstudien an Characeen," *Protoplasma*, vol. 33, no. 1, pp. 215–257, Sep. 1939.
- [367] P. Kaštánek *et al.*, "Selective bioaccumulation of rubidium by microalgae from industrial wastewater containing rubidium and lithium," *J. Appl. Phycol.*, vol. 30, no. 1, pp. 461–467, 2018.
- [368] H. Günan Yücel, Z. Aksu, G. B. Yalçınkaya, S. E. Karatay, and G. Dönmez, "A comparative investigation of lithium(I) biosorption properties of *Aspergillus versicolor* and *Kluyveromyces marxianus*," *Water Sci. Technol.*, vol. 81, no. 3, pp. 499–507, Feb. 2020.
- [369] K. Charlton, "The Supply of Medical Radioisotopes, 2019. Medical Isotope Demand and Capacity Projection for the 2019-2024 Period," *Nucl. Technol. Dev. Econ.*, 2019.
- [370] A. Dash, M. R. A. Pillai, and F. F. Knapp, "Production of ¹⁷⁷Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options," *Nucl. Med. Mol. Imaging (2010)*, vol. 49, no. 2, pp. 85–107, Feb. 2015.
- [371] A. S. Bateman and S. D. Kelly, "Fertilizer nitrogen isotope signatures," *Isotopes Environ. Health Stud.*, vol. 43, no. 3, pp. 237–247, Sep. 2007.
- [372] W. Wiechert and A. A. De Graaf, "Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: I. Modeling and Simulation of Carbon Isotope Labeling Experiments," *Biotechnol Bioeng.*, vol. 55, pp. 101–117, 1997.
-

- [373] A. I. Miller, "Heavy Water: A Manufacturers' Guide for the Hydrogen Century," *Can. Nucl. Soc. Bull.*, vol. 22, no. 1, 2001.
- [374] J. Zhou, J. Chen, J. Wu, S. Xia, and C. Zou, "Influence of ⁷Li enrichment on Th-U fuel breeding performance for molten salt reactors under different neutron spectra," *Prog. Nucl. Energy*, vol. 120, p. 103213, Feb. 2020.
- [375] S. Hasegawa, "Isotope Separation Methods for Nuclear Fuel," *Nucl. Energy*, pp. 59–76, 2013.
- [376] M. G. Ragheb, "Isotopic separation and enrichment." 2007.
- [377] World Nuclear Association, "Uranium Enrichment | Enrichment of uranium - World Nuclear Association," 2020. [Online]. Available: <https://www.world-nuclear.org/information-library/nuclear-fuel-cycle/conversion-enrichment-and-fabrication/uranium-enrichment.aspx>. [Accessed: 06-Jul-2021].
- [378] A. N. Tchel'tsov, L. Y. Sosnin, Y. D. Shipilov, Y. P. Zaozersky, V. K. Khamylov, and T. S. Pochekutova, "Centrifugal enrichment of zinc isotopes, their application in medicine and in increasing radiation safety in nuclear power plants," *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip.*, vol. 561, no. 1, pp. 52–57, May 2006.
- [379] J. Granger, D. M. Sigman, M. F. Lehmann, and P. D. Tortell, "Nitrogen and oxygen isotope fractionation during dissimilatory nitrate reduction by denitrifying bacteria," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 53, no. 6, pp. 2533–2545, Nov. 2008.
- [380] J. Penger, R. Conrad, and M. Blaser, "Stable carbon isotope fractionation of six strongly fractionating microorganisms is not affected by growth temperature under laboratory conditions," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 140, pp. 95–105, Sep. 2014.
- [381] S. A. Macko, M. L. Fogel, P. E. Hare, and T. C. Hoering, "Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in the synthesis of amino acids by microorganisms," *Chem. Geol. Isot. Geosci. Sect.*, vol. 65, no. 1, pp. 79–92, Mar. 1987.
- [382] B. Morasch, H. H. Richnow, B. Schink, A. Vieth, and R. U. Meckenstock, "Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 10, pp. 5191–5194, Oct. 2002.
- [383] F. S. Kinnaman, D. L. Valentine, and S. C. Tyler, "Carbon and hydrogen isotope fractionation associated with the aerobic microbial oxidation of methane, ethane, propane and butane," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 71, no. 2, pp. 271–283, Jan. 2007.
- [384] L. A. Chambers and P. A. Trudinger, "Microbiological fractionation of stable sulfur isotopes: A review and critique," *Geomicrobiol. J.*, vol. 1, no. 3, pp. 249–

- 293, 1979.
- [385] M. S. Sim, S. Ono, and T. Bosak, "Effects of iron and nitrogen limitation on sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 23, pp. 8368–8376, 2012.
- [386] F. C. A. Kafantaris and D. M. Borrok, "Zinc isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria," *Chem. Geol.*, vol. 366, pp. 42–51, Feb. 2014.
- [387] O. S. Pokrovsky, J. Viers, E. E. Emnova, E. I. Kompantseva, and R. Freydier, "Copper isotope fractionation during its interaction with soil and aquatic microorganisms and metal oxy(hydr)oxides: Possible structural control," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 72, no. 7, pp. 1742–1757, Apr. 2008.
- [388] J. U. Navarrete, D. M. Borrok, M. Viveros, and J. T. Ellzey, "Copper isotope fractionation during surface adsorption and intracellular incorporation by bacteria," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 75, no. 3, pp. 784–799, Feb. 2011.
- [389] L. R. Croal, C. M. Johnson, B. L. Beard, and D. K. Newman, "Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 68, no. 6, pp. 1227–1242, Mar. 2004.
- [390] G. A. Icopini, A. D. Anbar, S. S. Ruebush, M. Tien, and S. L. Brantley, "Iron isotope fractionation during microbial reduction of iron: The importance of adsorption," *Geology*, vol. 32, no. 3, pp. 205–208, Mar. 2004.
- [391] K. Kritee, J. D. Blum, M. W. Johnson, B. A. Bergquist, and T. Barkay, "Mercury stable isotope fractionation during reduction of Hg(II) to Hg(0) by Mercury resistant microorganisms," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 6, pp. 1889–1895, Mar. 2007.
- [392] B. J. Peterson and B. Fry, "Stable isotopes in ecosystem studies," *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, pp. 293–320, Nov. 1987.
- [393] S. E. McGlynn, "BIOLOGICAL ISOTOPE FRACTIONATION AND EARTH HISTORY: FROM ENZYMES, TO CELLS, TO ECOSYSTEMS," in *Metals, Microbes, and Minerals - The Biogeochemical Side of Life*, M. Sosa Torres and P. Kroneck, Eds. De Gruyter, 2020, pp. 59–80.
- [394] V. Balter and N. Vigier, "Natural variations of lithium isotopes in a mammalian model," *Metallomics*, vol. 6, no. 3, pp. 582–586, 2014.
- [395] K. W. Lieberman, C. Chen, J. Mann, and R. Rubino, "Erythrocyte differentiation of naturally occurring isotopic lithium abundances," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 23, no. 1, pp. 145–146, Jul. 1985.
- [396] K. W. Lieberman, G. J. Alexander, and P. Stokes, "Dissimilar effects of lithium isotopes on motility in rats," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 10, no. 6, pp.
-

- 933–935, Jun. 1979.
- [397] G. J. Alexander, K. W. Lieberman, and P. Stokes, “Differential lethality of lithium isotopes in mice,” *Biol. Psychiatry*, 1980.
- [398] W. R. Sherman, L. Y. Munsell, and Y.-H. H. Wong, “Differential Uptake of Lithium Isotopes by Rat Cerebral Cortex and Its Effect on Inositol Phosphate Metabolism,” *J. Neurochem.*, vol. 42, no. 3, pp. 880–882, Mar. 1984.
- [399] P. M. Stoll, P. E. Stokes, and M. Okamoto, “Lithium isotopes: Differential effects on renal function and histology,” *Bipolar Disord.*, vol. 3, no. 4, pp. 174–180, Aug. 2001.
- [400] W. Li, X. M. Liu, and O. A. Chadwick, “Lithium isotope behavior in Hawaiian regoliths: Soil-atmosphere-biosphere exchanges,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 285, pp. 175–192, Sep. 2020.
- [401] T. Sakaguchi and O. Tomita, “Bioseparation of Lithium Isotopes by Using Microorganisms,” *Resour. Environ. Biotechnol.*, vol. 3, no. 2–3, pp. 173–182, 2000.
- [402] P. A. E. Pogge von Strandmann *et al.*, “The effect of hydrothermal spring weathering processes and primary productivity on lithium isotopes: Lake Myvatn, Iceland,” *Chem. Geol.*, vol. 445, pp. 4–13, Dec. 2016.
- [403] N. Vigier, A. Decarreau, R. Millot, J. Carignan, S. Petit, and C. France-Lanord, “Quantifying Li isotope fractionation during smectite formation and implications for the Li cycle,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 72, no. 3, pp. 780–792, Feb. 2008.
- [404] J. Wimpenny, S. R. Gíslason, R. H. James, A. Gannoun, P. A. E. Pogge Von Strandmann, and K. W. Burton, “The behaviour of Li and Mg isotopes during primary phase dissolution and secondary mineral formation in basalt,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 74, no. 18, pp. 5259–5279, Sep. 2010.
- [405] Y. Huh, L. H. Chan, and J. M. Edmond, “Lithium isotopes as a probe of weathering processes: Orinoco River,” *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 194, no. 1–2, pp. 189–199, Dec. 2001.
- [406] J. S. Pistiner and G. M. Henderson, “Lithium-isotope fractionation during continental weathering processes,” *Earth Planet. Sci. Lett.*, vol. 214, no. 1–2, pp. 327–339, Sep. 2003.
- [407] W. Li, “Vital effects of K isotope fractionation in organisms: observations and a hypothesis,” *Acta Geochim.*, vol. 36, no. 3, pp. 374–378, 2017.
- [408] M. Wang *et al.*, “Lithium isotope separation by electromigration,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 746, p. 137290, May 2020.
- [409] C. Shi, Y. Jia, J. Xiao, X. Wang, Y. Yao, and Y. Jing, “Lithium isotope separation by

- liquid-liquid extraction using ionic liquid system containing dibenzo-14-crown-4," *J. Mol. Liq.*, vol. 224, pp. 662–667, Dec. 2016.
- [410] F. L. Martínez, I. G. Orce, V. B. Rajal, and V. P. Irazusta, "Salar del Hombre Muerto, source of lithium-tolerant bacteria," *Environ. Geochem. Health*, vol. 41, no. 2, pp. 529–543, Jul. 2018.
- [411] F. L. Martínez, V. B. Rajal, and V. Irazusta, "Removal of lithium from aqueous solutions using halotolerant bacteria from El Salar del Hombre Muerto," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 9, no. 2, p. 105099, Apr. 2021.
- [412] H. Günan-Yücel and Z. Aksu, "Enhancing lithium ion capture by using a negatively overcharged biomass-based hybrid adsorbent," *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 7, no. 5, p. 103337, Oct. 2019.
- [413] Z. Ren, X. Wei, R. Li, W. Wang, Y. Wang, and Z. Zhou, "Highly selective extraction of lithium ions from salt lake brines with sodium tetraphenylborate as co-extractant," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 269, p. 118756, Aug. 2021.
- [414] P. Moazzam *et al.*, "Lithium bioleaching: An emerging approach for the recovery of Li from spent lithium ion batteries," *Chemosphere*, vol. 277, p. 130196, Aug. 2021.
- [415] G. Zhou, L. Chen, Y. Chao, X. Li, G. Luo, and W. Zhu, "Progress in electrochemical lithium ion pumping for lithium recovery," *J. Energy Chem.*, vol. 59, pp. 431–445, Aug. 2021.



10. ANEXO

10. ANEXO

10.1 Documento de publicación de la patente

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 841 973**

21 Número de solicitud: 202030005

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

B09C 1/10 (2006.01)

A62D 3/02 (2007.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/025 (2006.01)

C12R 1/385 (2006.01)

A62D 101/20 (2007.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.07.2021

71 Solicitantes:

ACCIONA ENERGÍA, S.A. (100.0%)
Avda. Ciudad de la Innovación, nº 5
31621 Sarriguren (Navarra) ES

72 Inventor/es:

REYES GARCÍA, Mari Luz;
BASAIL IZCUE, Pedro Miguel;
DÍAZ-ALEJO GUERRERO, Héctor Miguel;
MARTÍNEZ - ALESÓN GARCÍA, Paloma María y
MARTÍNEZ ESTEBAN, Paloma

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **CEPAS BACTERIANAS Y SU USO PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON BIFENILO Y ÓXIDO DE DIFENILO (HTF)**

57 Resumen:

Cepas bacterianas y su uso para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo y óxido de difenilo (HTF).

La invención se refiere a una cepa bacteriana de *Enterococcus* sp. depositada en la CECT bajo el número de depósito CECT30012 y a un consorcio bacteriano que la comprende en combinación con una cepa de *Achromobacter* sp. depositada en la CECT bajo el número de depósito CECT30013 y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* depositada en la CECT bajo el número de depósito CECT30014. La invención también se refiere al uso de dicha cepa y de dicho consorcio para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo y óxido de difenilo (HTF). Por último, la invención proporciona un método para la biorremediación de suelos contaminados con HTF en el que se emplea esta cepa o consorcio y un método para la producción de microorganismos útiles para degradar HTF.

ES 2 841 973 A1

DESCRIPCIÓN

CEPAS BACTERIANAS Y SU USO PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON BIFENILO Y ÓXIDO DE DIFENILO (HTF)

5

La presente invención se encuadra en el campo de la biotecnología aplicada al sector del medio ambiente, y en particular se refiere microorganismos útiles para la degradación *in situ* (biorremediación) de superficies, preferiblemente suelos, contaminados con los componentes del fluido calorportador HTF, bifenilo y óxido de difenilo (HTF).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las centrales termosolares se basan en la captación y concentración de la radiación solar. La captación tiene lugar a través de espejos y la concentración se lleva a cabo mediante fluidos caloportadores. Básicamente, la función del fluido caloportador es la de transferir la energía recogida por los captadores cilindro parabólicos (espejos) al bloque de potencia a través de un sistema de intercambio de calor. El vapor producido en los intercambiadores se utiliza en una turbina de vapor para generar energía mecánica de rotación que en último término se transformará en energía eléctrica.

15

20

Los fluidos caloportadores que dan mejores resultados son los fluidos orgánicos, que no cambian de estado aunque la temperatura se incremente mucho. Uno de los más utilizados es la mezcla eutéctica compuesta por un 73,5% en peso de difenil éter (óxido de difenilo) y un 26,5% de 1,1'-Bifenilo (bifenilo). A este fluido se le denomina habitualmente HTF (de sus siglas en inglés "Heat Transfer Fluid"). Así, la mayoría de las centrales termosolares del mundo utilizan el fluido calorportador HTF para transferir el calor desde las parábolas hasta las turbinas que generan la electricidad. Este fluido es un líquido altamente tóxico, viscoso, incoloro-amarillento y que presenta un punto de ebullición de 257 °C.

25

30

El HTF trabaja a temperaturas comprendidas entre unos 290°C, a la entrada de la línea en la que se concentra la radiación, y 390°C a la salida. Una mayor temperatura de salida supondría un mayor rendimiento global de la planta, pero las características químicas del fluido no hacen posible utilizarlo por encima de los 400°C: las reacciones de degradación aumentan exponencialmente de velocidad, originándose hidrocarburos

35

volátiles y pesados que modifican el comportamiento de la planta y que plantean problemas de seguridad. Por ello, las centrales termosolares tienen limitada la temperatura máxima de trabajo del fluido orgánico a unos 400°C. Además, requieren de sistemas que eliminen los productos originados en la degradación, normalmente
5 utilizando filtraciones y destilaciones sucesivas.

Sin embargo, y pese a que en las plantas termosolares existen muchas medidas de control de emisiones al aire, suelo y agua, es inevitable que puedan ocurrir cierto tipo de vertidos impredecibles e incontrolables, cuya magnitud puede variar desde unos
10 pocos litros en las juntas a toneladas si tuviera lugar un accidente de mayores dimensiones. Además, en ocasiones las tuberías de las centrales pierden la hermeticidad como consecuencia de los cambios de temperatura durante la operación de la planta, produciéndose fugas en los codos de unión de las mismas que contaminan el suelo de las centrales.

15 Por tanto, además de la contaminación del aire debido a la volatilidad de los componentes del HTF, la matriz receptora que sufre mayor impacto es el suelo.

El HTF tiene índices de ecotoxicidad y de toxicidad en humanos de importante magnitud.
20 Centrándonos en el medio ambiente, cuando sucede un derrame hay riesgos importantes de que el HTF afecte a las poblaciones de organismos que viven en el suelo, y eventualmente, también a los organismos acuáticos, ya que una filtración puede dar lugar a la contaminación de un acuífero, por ejemplo.

25 El impacto ambiental del vertido de HTF se debe de forma mayoritaria al bifenilo, siendo la ecotoxicidad del óxido de difenilo mucho menor.

Dado lo imprevisible de las pérdidas, y al hecho de que muchas veces los derrames pueden estar muy deslocalizados, esto es, ser de poca magnitud, pero de elevado
30 alcance (goteos en juntas muy separadas entre sí a lo largo de toda la superficie del campo de espejos), las opciones de tratamiento del suelo contaminado deben ser lo suficientemente flexibles para poder implementarse en distintas localizaciones y con unos costes moderados. Asimismo, las alternativas de tratamiento deben mantener la filosofía de las plantas termosolares: energía sostenible y soluciones amigables con el
35 medio ambiente.

Sin embargo, son muy escasos los estudios en relación a la biodegradación de HTF. Hasta el momento, dichos estudios se han centrado en evaluar la degradación de uno de los dos componentes por separado. Así, Gibson (Gibson *et al.*, 1973, Biochemical and Biophysical Research Communications, 50(2):211-219) estudió la degradación de bifenilo por medio de la bacteria *Beijerinckia*; Dodge empleó un hongo para el mismo compuesto (Dodge *et al.*, 1979, Biodegra, 178(1):223-230) y Fugihara describió la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC110665) para degradar bifenilo (Fugihara *et al.*, 2015; Genome Announc 3: e00517-15). También está descrita la biodegradación bacteriana de difenil éter por *Pseudomonas putida*, la cepa SS3 de *Sphingomonas* sp., y *Cupriavidus* sp. (Catelani *et al.*, 1971, Experientia, 27(10): 1173-1174; Schmidt *et al.*, 1992, Appl. Environ. Microbiol., 58(9):2744-2750; Wang *et al.*, 2015, Environ Sci Pollut Res, DOI 10.1007/s11356-015-4854-3).

En cuanto a la mezcla de ambos compuestos, es decir, al fluido HTF, hasta el momento no se ha descrito ningún microorganismo que pueda degradar simultánea y eficientemente los dos compuestos orgánicos presentes en esta mezcla eutéctica. Hay muy poco avanzado con la perspectiva de contemplar el efecto de la actividad degradadora bacteriana en el propio HTF. Únicamente se ha descrito una bacteria del género *Pseudomonas*, en particular la cepa *P. oleovorans* HBD2 CECT8969 (ES2641967), y un hongo, *Phlebia lindtneri*, (Mori *et al.*, 2002, FEMS Microbiol Lett, 213(1): 127-31), que son de utilidad para la degradación del fluido HTF.

Por ello, existe la necesidad de identificar microorganismos, o combinaciones de los mismos, resistentes a los dos componentes del HTF y a sus productos de degradación, que sean eficaces en la utilización y, por tanto, eliminación, simultánea de ambos compuestos. La aplicación de dichos microorganismos supondría una solución ecológica, económica y eficiente para el tratamiento *in situ* o biorremediación de suelos contaminados con HTF, como por ejemplo, en las centrales termosolares y en las proximidades de las mismas.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención supone una solución al problema anteriormente planteado, al proporcionar una cepa bacteriana de *Enterococcus* sp., aislada y caracterizada por los inventores, que es capaz de degradar eficientemente los dos componentes del fluido

35

calorportador HTF, es decir, bifenilo y óxido de difenilo. Así, dicha cepa puede ser irrigada en las zonas contaminadas donde haya habido vertidos del citado fluido para su biorremediación o degradación *in situ*.

- 5 La presente invención propone además el empleo de dicha cepa de *Enterococcus* sp. en combinación, es decir, como consorcio bacteriano, con una cepa de *Achromobacter* y una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, también aisladas y caracterizadas por los inventores, en las proporciones 64,5%, 6,9% y 28,6%, respectivamente. Este consorcio bacteriano mejora la capacidad de la cepa de *Enterococcus* sp. descrita en la presente
10 invención para degradar los componentes del HTF (bifenilo y óxido de difenilo), por lo que representa también una herramienta muy útil para la biorremediación de suelos contaminados con el mismo.

- Los ensayos mostrados más adelante demuestran que la cepa de *Enterococcus* sp. de
15 la presente invención es capaz de degradar bifenilo y óxido de difenilo, preferiblemente óxido de difenilo, con una mayor eficacia que otras bacterias, por ejemplo que las otras dos cepas de *Achromobacter* y *P. aeruginosa* descritas en la presente invención, cuando éstas se emplean de manera individual. Además, dichos ensayos ponen de manifiesto que la combinación o consorcio, en los porcentajes concretos indicados aquí, de las tres
20 cepas bacterianas aisladas en la presente invención presenta una capacidad de degradación de bifenilo y de óxido de difenilo muy superior a la capacidad de degradación de dichos compuestos de cada una de estas cepas por separado e incluso a la capacidad de degradación de dichos compuestos por parte de una combinación de estas mismas cepas pero en otras proporciones diferentes a la indicada en el párrafo
25 anterior (ver Tabla 1 de los ejemplos).

- Con el objetivo de encontrar y diseñar aquellos microorganismos y combinaciones de los mismos más eficientes en la degradación de HTF, en la presente invención se
30 aislaron las tres cepas bacterianas que se describen aquí de un suelo contaminado con HTF en territorio español, posteriormente fueron cultivadas *in vitro* mediante un procedimiento cuyas condiciones han sido optimizadas por los inventores para conseguir inducir la capacidad degradadora de HTF en dichas cepas y finalmente fueron caracterizadas.

Las ventajas asociadas a la presente invención son que permite la biorremediación de superficies, preferiblemente suelos, contaminados con cualquiera de los componentes del HTF (difenil éter o 1,1'-Bifenilo) o con la mezcla de ambos (el propio HTF), de una manera efectiva, ecológica y con bajo coste. Además, las cepas descritas en la presente
5 invención se adaptan a vivir en suelos de distinta naturaleza contaminados con HTF o con cualquiera de sus componentes, consiguiendo degradarlo *in situ* a un bajo coste y a través de un procedimiento sencillo. La aplicación de las cepas de la invención para esta finalidad no plantea ninguna complicación a nivel de infraestructuras, en particular, no se necesita restaurar o modificar las instalaciones existentes de las plantas
10 termosolares, lo que permite que el tratamiento se pueda implantar de manera inmediata en las infraestructuras existentes, y el coste de mantenimiento es mínimo. Además, en el proceso de biorremediación aquí descrito no se utilizan reactivos tóxicos ni sistemas que consuman energía, ya que es la propia actividad de las bacterias la que permite la degradación eficaz del HTF. Por último, las cepas de la presente invención admiten una
15 gran versatilidad en sus aplicaciones en biorremediación de suelos contaminados con HTF o con cualquiera de sus componentes, pudiéndose aplicar tanto en pequeños derrames del fluido (goteos) como en zonas contaminadas de mayor magnitud.

Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana de
20 *Enterococcus sp.* aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT30012 (también llamada HTF1).

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana de *Achromobacter sp.* aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de
25 depósito CECT30013 (también llamada HTF2).

Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT30014 (también llamada HTF3).

30 Como se ha indicado anteriormente, estas tres cepas, de ahora en adelante "cepas bacterianas de la invención" o "cepas de la invención", han sido aisladas de un suelo contaminado con HTF en territorio español y depositadas el 19 de noviembre de 2019 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad
35 Internacional de Depósito (con sede en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de

Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA).

Dentro del alcance de la presente invención también están contempladas aquellas bacterias que derivan de las cepas bacterianas de la invención y éstas pueden formar parte de la composición o consorcio bacteriano descrito posteriormente como alternativa a las cepas específicamente indicadas, siempre y cuando conserven la capacidad de degradar HTF o cualquiera de sus componentes. Ejemplos de bacterias derivadas de las cepas bacterianas específicamente indicadas en la invención pueden ser mutantes y organismos modificados genéticamente que presenten variaciones en su genoma respecto al genoma de las cepas descritas en la invención, pero donde dichas variaciones no afectan a la capacidad de las cepas de degradar HTF o cualquiera de sus componentes. Las bacterias derivadas de las cepas bacterianas de la invención pueden producirse de forma natural o de forma intencionada por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como, por ejemplo, pero sin limitarse, el crecimiento de la cepa original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés o mediante ingeniería genética dirigida a la mutación o mutaciones deseada/s. También se contemplan organismos genéticamente modificados derivados de las cepas bacterianas de la invención que conservan su capacidad de degradar HTF o cualquiera de sus componentes y, por lo tanto, de ser usados en el tratamiento o biorremediación de superficies, preferiblemente suelos, contaminados con dicho fluido o con cualquiera de sus componentes. Un ensayo para comprobar si un microorganismo tiene capacidad de degradar HTF o cualquiera de sus componentes se describe en los ejemplos que acompañan a la presente descripción.

Por otro lado, dentro de la presente invención también se contemplan los componentes celulares, extractos, metabolitos, compuestos bioactivos y/o moléculas secretadas por cualquiera de las cepas bacterianas de la invención o por el cocultivo de las mismas, así como las composiciones que comprenden dichos elementos y los usos de los mismos para el tratamiento o biorremediación de superficies, preferiblemente suelos, contaminados con HTF o con cualquiera de sus componentes.

Otro aspecto de la invención se refiere a un cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa de *Enterococcus sp.* CECT30012.

35

Los "compuestos bioactivos" son productos obtenidos a partir de las cepas de la presente invención, tanto sus componentes extracelulares como intracelulares. Dentro de dichos compuestos bioactivos se podrían incluir, pero sin limitarnos, componentes de la pared celular (como, por ejemplo, peptidoglicanos), ácidos nucleicos, ácidos orgánicos e inorgánicos, componentes de la membrana u otros, como proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones (como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas), vitaminas, sales, minerales, etc. También cualquier molécula producida o modificada por la bacteria, y/o secretada o liberada al exterior, como consecuencia de su actividad metabólica, durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante su almacenamiento.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "composición de la invención", que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa de *Enterococcus sp.* CECT30012, o el cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa de *Enterococcus sp.* CECT30012.

En una realización preferida, esta composición de la invención además comprende un vehículo y/o excipiente biológicamente aceptable.

El vehículo o excipiente biológicamente aceptable puede ser de origen natural o artificial, y debe ser compatible con el mantenimiento *in vitro* y almacenamiento de las cepas bacterianas de la invención, es decir, no debe comprometer su viabilidad y funcionalidad. Preferiblemente, el excipiente biológicamente aceptable es alginato.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende la cepa de *Enterococcus sp.* CECT30012, o el cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende dicha cepa, y además la cepa bacteriana de *Achromobacter sp.* CECT30013 y la cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* CECT30014, donde la proporción de cada una de las cepas en la composición, con respecto a la cantidad total de cepas bacterianas presentes en la composición, es de 6,9% de *Achromobacter sp.* CECT30013, 64,5% de *Enterococcus sp.* CECT30012 y 28,6% de *Pseudomonas aeruginosa* CECT30014.

La composición de la invención que comprende las cepas de *Achromobacter sp.*

CECT30013, *Enterococcus* sp. CECT30012 y *P. aeruginosa* CECT30014 en los citados porcentajes ha demostrado ser la más eficiente en la degradación de los dos componentes del fluido calorportador HTF de entre todas las cepas ensayadas individualmente y de entre todas las combinaciones de dichas cepas ensayadas en distintos porcentajes (ver Tabla 1 de los ejemplos mostrados más adelante).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente de la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, del cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, o de la composición de la invención, para la degradación, preferiblemente *in situ*, de bifenilo (1, 1'-Bifenilo), de óxido de difenilo (difenil éter) o de ambos (HTF).

Por "degradación de HTF", se entiende la degradación simultánea de los dos compuestos orgánicos presentes en esta mezcla eutéctica (bifenilo y óxido de difenilo).

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente de la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, del cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, o de la composición de la invención, para la biorremediación, tratamiento o descontaminación de superficies, preferiblemente suelos o agua, más preferiblemente suelos, contaminadas con bifenilo (1, 1'-Bifenilo), óxido de difenilo (difenil éter) o ambos (HTF).

Se entiende por "superficie" cualquier medio líquido, por ejemplo, agua, o sólido, por ejemplo, suelo, contaminados con HTF o con cualquiera de sus componentes químicos (bifenilo y óxido de difenilo).

Se entiende por "biorremediación" o "biocorrección" el empleo de organismos vivos, en el contexto de la presente invención las cepas de la invención solas o en combinación, o sus cultivos puros, extractos o compuestos bioactivos, para eliminar, degradar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. Se refiere al uso de estos elementos directamente en el foco de la contaminación, mediante su inoculación al medio contaminado que se pretende tratar.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método o procedimiento, de ahora en adelante "primer método de la invención", para la biorremediación, tratamiento o descontaminación de superficies, preferiblemente suelos o agua, más preferiblemente suelos, contaminadas con bifenilo (1, 1'-Bifenilo), óxido de difenilo (difenil éter) o ambos
5 (HTF), que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivar cualquiera de las cepas bacterianas de la invención, preferiblemente la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, el cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la
10 invención, preferiblemente la cepa *Enterococcus* sp. CECT30012, o la composición de la invención, preferiblemente hasta alcanzar una densidad de al menos $0,2 \times 10^9$ UFC/ml, más preferiblemente entre $0,5 \times 10^9$ y 1×10^9 UFC/ml, y
- b. dispensar, preferiblemente por irrigación, en la superficie, preferiblemente suelo,
15 contaminada a tratar el cultivo obtenido tras la etapa (a).

En la etapa (a) de este procedimiento el cultivo se debe llevar a cabo en un medio nutriente adecuado que tenga los componentes de HTF, es decir, bifenilo y óxido de difenilo, como única fuente de carbono, y en unas condiciones que favorezcan el
20 crecimiento de las bacterias de la invención. Así, preferiblemente las condiciones de dicho cultivo son entre 20-30°C de temperatura, más preferiblemente 22°C, con agitación orbital constante entre 120 y 250 r.p.m., y la presencia de un medio de cultivo constituido por una concentración mínima de sales y HTF en proporción de al menos 10% (vol/vol).

25 Este procedimiento se puede aplicar directamente en, por ejemplo, superficies contaminadas en centrales termosolares en las que se utilice HTF como fluido caloportador (la mayoría de las centrales termosolares en el mundo).

30 En otra realización preferida de este procedimiento, la irrigación de la etapa (b) se lleva a cabo en una relación de 5 ml de cultivo por gramo de suelo.

Como se ha explicado anteriormente, las cepas bacterianas de la invención, tras su aislamiento, fueron cultivadas bajo unas condiciones que favorecen la actividad
35 degradadora de HTF. Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método o

procedimiento, de ahora en adelante “segundo método de la invención”, para la producción de microorganismos, preferiblemente bacterias, útiles para la degradación de bifenilo, de óxido de difenilo o de ambos (HTF), que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. aislar una muestra de agua o suelo, preferiblemente de 1g de suelo, contaminada con bifenilo, óxido de difenilo o ambos,
- b. cultivar la muestra aislada en la etapa (a) en un medio de cultivo en presencia de bifenilo, de óxido de difenilo o de ambos, a una temperatura de entre 20 y 30°C y con agitación orbital entre 120 y 250 r.p.m., preferiblemente 120 r.p.m.,
- 10 c. realizar una o más transferencias del cultivo de la etapa (b) a medios frescos en los que se va reduciendo progresivamente la cantidad de medio de cultivo, preferiblemente sustituyéndolo por un medio mínimo de sales, y se mantiene la cantidad de bifenilo, óxido de difenilo o ambos, con el objeto de conseguir microorganismos que sean capaces de crecer en estos componentes y utilizarlos
- 15 como única fuente de carbono,
- d. repetir la etapa (c) hasta que el medio de cultivo sea eliminado por completo,
- e. inocular el cultivo obtenido tras la etapa (d) en un medio, preferiblemente en una muestra de suelo, comprendiendo una concentración conocida de bifenilo, óxido de difenilo o ambos, y
- 20 f. analizar qué concentración de bifenilo, óxido de difenilo o ambos ha desaparecido tras la etapa (e).

En una realización preferida de este segundo procedimiento, el medio de cultivo de la etapa (b) es Luria Bertani (medio LB).

25

En una realización más preferida, el medio de cultivo de la etapa (b) comprende bifenilo y óxido de difenilo a una concentración de al menos un 10% con respecto al volumen total del medio (vol/vol).

30 En otra realización preferida, las transferencias del cultivo en la etapa (c) se realizan con una frecuencia semanal.

En otra realización preferida, la reducción progresiva de la cantidad de medio de cultivo en la etapa (c) se consigue eliminando un 10% de medio de cultivo en cada transferencia

35

y sustituyéndolo por un medio mínimo de sales.

Las etapas (e) y (f) tienen como objeto comprobar que el/los microorganismo/s presentes en el cultivo obtenido tras la etapa (d) no solo son resistentes a los componentes del HTF sino que también son capaces de degradarlo. Para ello, preferiblemente, se compara el porcentaje de biodegradación en medios contaminados con HTF e inoculados con el cultivo resultante de la etapa (d) frente a un control (medio contaminado con la misma cantidad de HTF, pero sin la inoculación de dicho cultivo) y se analiza la concentración de los dos componentes del HTF al inicio del experimento (t=0) y a tiempo t (siendo t entre 7-15 días).

En otra realización preferida, el análisis de la etapa (f) se realiza transcurridos entre 7 y 15 días del inóculo de la etapa (e), preferiblemente 15 días.

En otra realización preferida del segundo procedimiento de la invención, se realizan paralelamente uno o varios controles negativos consistentes en medios, preferiblemente muestras de suelo, comprendiendo la misma concentración de bifenilo, óxido de difenilo o ambos que el medio empleado en la etapa (e), pero donde no se inocula el cultivo obtenido tras la etapa (d). Posteriormente, se analiza la concentración de bifenilo, óxido de difenilo o ambos que ha desaparecido en estos controles negativos y se compara con la obtenida en la etapa (f).

Si finalmente se comprueba que la concentración de HTF en los experimentos inoculados es significativamente inferior a la obtenida en el control negativo, se concluye que el cultivo empleado y obtenido tras la etapa (d) comprende microorganismos capaces de degradar HTF y se procederá al aislamiento e identificación de los mismos.

Posteriormente, se podrá opcionalmente proceder a determinar qué número de células, o volumen de cultivo, es necesario adicionar por gramo o kg o litro de superficie contaminada para una biorremediación eficiente. El tamaño de los inóculos, esto es, la relación entre el número de células (o unidades formadoras de colonias –UFC-) por unidad de peso de suelo (ejemplo, nº de células/g suelo) o litro de agua, variará en función del grado de contaminación de la superficie a tratar.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se

desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad de las cepas de la invención y su combinación (consorcio) en la degradación de HTF.

10

EJEMPLO 1. OBTENCIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A BIFENILO Y ÓXIDO DE DIFENILO (HTF).

La primera parte de la invención consistió en la obtención de bacterias resistentes a
15 bifenilo y óxido de difenilo (HTF). Para ello, se tomó una muestra de en torno a 1 g de suelo contaminado con HTF y se transfirió a 100 ml de un medio de cultivo preparado con medio LB (medio Luria Bertani), que es un medio generalista para el crecimiento de bacterias heterótrofas cuya composición es: 10 g/l de peptona; 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl, a pH 7. Además, se adicionó un 10% (vol/vol) de HTF. Este
20 cultivo se mantuvo en agitación orbital a 120 r.p.m. y temperatura ambiente (22°C aproximadamente).

Cuando se comprobó, al cabo de una semana aproximadamente, que había habido crecimiento de bacterias resistentes a los componentes del HTF en estas condiciones,
25 se transfirió un 10% de este cultivo a un nuevo medio en el que la proporción de LB se había reducido en un 10%, dejando de nuevo que el cultivo prosperase. El volumen de LB eliminado se sustituyó por un medio mínimo de sales. Este proceso se repitió sucesivamente hasta conseguir eliminar el LB y el cultivo final se preparó con un medio mínimo de sales y HTF al 10%, exclusivamente.

30

A continuación, se comprobó que las bacterias así obtenidas eran capaces de degradar los componentes del HTF y transformar el bifenilo y óxido de difenilo a compuestos sencillos de carbono (CO₂) y compuestos que las bacterias puedan asimilar. Para comprobar esta capacidad de biodegradación, se prepararon cultivos de concentración
35 conocida de HTF y se analizó qué concentración de HTF había desaparecido en cultivos

inoculados al cabo de un periodo de entre 7-15 días en comparación con controles sin inóculo. En el caso de que la degradación no fuera efectiva debería comenzarse de nuevo con la obtención de nuevas muestras de suelo.

5 EJEMPLO 2. ENSAYO DE BIORREMEDIACIÓN DE CONTAMINACIÓN POR HTF.

Se procedió a inocular una disolución preparada con HTF al 10% con el cultivo final obtenido en el Ejemplo 1. El tamaño del inóculo inicial fue de 1.000.000 células/ml. Paralelamente, se preparó otra disolución similar pero sin bacterias. Se tomaron
10 muestras de cada una de las disoluciones y se congelaron a la espera de su posterior análisis.

Al cabo de 15 días se tomaron sendas muestras de cultivo y control y se procedió a analizar la concentración de bifenilo y óxido de difenilo en estos cultivos y en los
15 preservados por congelación (representativos del tiempo $t = 0$). Así, se comprobó que el cultivo era capaz de eliminar la concentración de bifenilo y de óxido de difenilo con una eficacia del 95 y 92%, respectivamente.

Una vez comprobada la capacidad del cultivo para resistir y degradar HTF se procedió
20 a la identificación de las especies bacterianas presentes en el mismo mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, resultando que el cultivo estaba formado por cepas de *Achromobacter sp.*, *Enterococcus sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales fueron depositadas bajo el Tratado de Budapest como se ha indicado anteriormente.

Posteriormente, se realizó un inóculo con el cultivo de la invención en un suelo
25 contaminado artificialmente con 20.000 mg/l de HTF. La simulación se hizo en un volumen de 1 m³ de suelo. Se adicionaron 5 ml de cultivo/g de suelo que contenían 10⁹ UFC/g suelo, mediante un sistema de irrigación. Se tomó una muestra de suelo antes de realizar el inóculo y una vez adicionado éste, se dejó actuar a las bacterias por un
30 periodo de 15 días, al cabo de los cuales se tomó una muestra de suelo nuevamente, encontrándose que el porcentaje de eliminación de bifenilo y de óxido de difenilo fue de 97 y 94%, respectivamente.

35 EJEMPLO 3. ENSAYO PARA IDENTIFICAR LAS BACTERIAS MÁS EFECTIVAS EN LA BIORREMEDIACIÓN DE CONTAMINACIÓN POR HTF.

ES 2 841 973 A1

Finalmente, se realizó un ensayo para evaluar el porcentaje de degradación de los compuestos 1,1'- Bifenilo y difenil éter usando:

- 5 - Únicamente la cepa de *Enterococcus sp.* obtenida en los ejemplos previos y depositada en la CECT bajo el número de acceso CECT30012.
- Únicamente la cepa de *Achromobacter sp.* obtenida en los ejemplos previos y depositada en la CECT bajo el número de acceso CECT30013.
- 10 - Únicamente la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* obtenida en los ejemplos previos y depositada en la CECT bajo el número de acceso CECT30014.
- Consorcio bacteriano comprendiendo *Achromobacter sp.* CECT30013, 15 *Pseudomonas aeruginosa* CECT30014 y *Enterococcus sp.* CECT30012 en diferentes proporciones para determinar cuál de las combinaciones era la más eficaz.

20 Para los experimentos se partió de un medio (el mismo que se utilizó en los ejemplos previos) comprendiendo un medio mínimo de sales y una concentración de HTF al 10% (vol/vol). Posteriormente, se prepararon los cultivos indicados en la Tabla 1 más abajo (todos con 100 ml de este medio y un inóculo de 1.000.000 células/ml). Los cultivos se mantuvieron en agitación orbital a 120 r.p.m y a 30°C. Los resultados mostrados en la 25 Tabla 1 corresponden a la biodegradación de HTF a los 15 días.

Tabla 1:

| Bacterias presentes en el cultivo | <i>Achromobacter sp.</i> CECT30013 | <i>Enterococcus sp.</i> CECT30012 | <i>P. aeruginosa</i> CECT30014 | % degradación de bifenilo | % degradación de óxido de difenilo |
|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| % de cada cepa en el consorcio | 6,9 | 64,5 | 28,6 | 83 | 90 |
| | 80 | 10 | 10 | 27 | 7 |
| | 10 | 80 | 10 | 34 | 67 |
| | 10 | 10 | 80 | 24 | 31 |
| Monocultivos | 100 | 0 | 0 | 23 | 11 |
| | 0 | 0 | 100 | 26 | 18 |

ES 2 841 973 A1

| | | | | | |
|--|---|-----|---|----|----|
| | 0 | 100 | 0 | 48 | 77 |
|--|---|-----|---|----|----|

Se pudo comprobar que el monocultivo formado exclusivamente por *Enterococcus sp.* CECT30012 es el que mejor resultados proporcionó de entre todos los monocultivos ensayados, y que el consorcio que mejor funcionó fue aquel que estaba formado por la combinación de *Achromobacter sp.* CECT30013, *Enterococcus sp.* CECT30012 y *Pseudomonas aeruginosa* CECT30014 en proporciones 6,9%; 64,5% y 28,6%, respectivamente, es decir, un consorcio en el que predominaba la presencia de *Enterococcus sp.* CECT30012.

5

El consorcio que peor funcionó fue aquel en el que predominaba la especie *Achromobacter*. Cuando la especie que predominaba era *Pseudomonas*, se obtuvieron unos rendimientos intermedios.

10

15

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana de *Enterococcus* sp. aislada y depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT30012.
5
2. Un cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo que comprende la cepa según la reivindicación 1.
3. Una composición que comprende la cepa según la reivindicación 1, o el cultivo
10 bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2.
4. La composición según la reivindicación 3, que además comprende un vehículo y/o excipiente biológicamente aceptable.
- 15 5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, que además comprende una cepa bacteriana de *Achromobacter* sp. depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT30013 y una cepa bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de depósito CECT30014, donde la proporción de cada
20 una de las cepas en la composición, con respecto a la cantidad total de cepas bacterianas presentes en la composición, es de 6,9% de *Achromobacter* sp. CECT30013, 64,5% de *Enterococcus* sp. CECT30012 y 28,6% de *Pseudomonas aeruginosa* CECT30014.
- 25 6. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para la degradación de bifenilo, de óxido de difenilo o de ambos.
- 30 7. Uso de la cepa según la reivindicación 1, del cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2 o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo, óxido de difenilo o ambos.
- 35 8. Método para la biorremediación de suelos contaminados con bifenilo, óxido de

difenilo o ambos, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. cultivar la cepa según la reivindicación 1, el cultivo bacteriano puro, extracto o compuesto bioactivo según la reivindicación 2 o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, preferiblemente hasta alcanzar una densidad de al menos $0,2 \times 10^9$ UFC/ml, y
 - b. irrigar la superficie del suelo contaminado a tratar con el cultivo obtenido tras la etapa (a).
- 10 9. El método según la reivindicación 8, donde la irrigación de la etapa (b) se lleva a cabo en una relación de 5 ml de cultivo por gramo de suelo.
10. Método para la producción de microorganismos útiles para la degradación de bifenilo, de óxido de difenilo o de ambos, que comprende las siguientes etapas:
- 15
- a. aislar una muestra de agua o suelo contaminada con bifenilo, óxido de difenilo o ambos,
 - b. cultivar la muestra aislada en la etapa (a) en un medio de cultivo en presencia de bifenilo, de óxido de difenilo o de ambos, a una temperatura de entre 20 y 20 30°C y con agitación orbital entre 120 y 250 r.p.m.,
 - c. realizar una o más transferencias del cultivo de la etapa (b) a medios frescos en los que se va reduciendo progresivamente la cantidad de medio de cultivo y se mantiene la cantidad de bifenilo, óxido de difenilo o ambos,
 - d. repetir la etapa (c) hasta que el medio de cultivo sea eliminado por completo,
 - 25 e. inocular el cultivo obtenido tras la etapa (d) en un medio comprendiendo una concentración conocida de bifenilo, óxido de difenilo o ambos, y
 - f. analizar qué concentración de bifenilo, óxido de difenilo o ambos ha desaparecido tras la etapa (e).
- 30 11. El método según la reivindicación 10, donde el medio de cultivo de la etapa (b) es Luria Bertani.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde el medio de cultivo de la etapa (b) comprende bifenilo y óxido de difenilo a una concentración de 35 al menos un 10% con respecto al volumen total del medio.

ES 2 841 973 A1

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde las transferencias del cultivo en la etapa (c) se realizan con una frecuencia semanal.
- 5 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la reducción progresiva de la cantidad de medio de cultivo en la etapa (c) se consigue eliminando un 10% de medio de cultivo en cada transferencia.
- 10 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde el análisis de la etapa (f) se realiza transcurridos entre 7 y 15 días del inóculo de la etapa (e).

10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① N.º solicitud: 202030005
② Fecha de presentación de la solicitud: 07.01.2020
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | ES 2641967 A1 (UNIV DE CÓRDOBA UNIV CORDOBA) 14/11/2017, todo el documento. | 1-9 |
| A | HICKS P. et al. "In situ bioremediation of biphenyl and biphenyl ether". WEFTEC 2000. Annual Conference & Exposition on Water Quality and Wastewater Treatment, 73rd, Anaheim, CA, United States, Oct. 14-18, 2000. Páginas 1741-1753. todo el documento. | 1-9 |
| A | FUJIHARA HIDEHIKO et al. "Draft Genome Sequence of Pseudomonas aeruginosa KF702 (NBRC 110665), a Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacterium Isolated from Biphenyl-Contaminated Soil". Microbiology Resource Announcements MAY-JUN 2015. , 30/04/2015, Vol. 3, N° 3, Páginas Article No.: e00517-15, ISSN 2576-098X(print) ISSN 2576-098X(electronic), <DOI: doi:10.1128/genomeA.00517-15>. todo el documento. | 1-9 |
| A | CN 107058155 A (JIANGSU ACAD AGRICULTURAL SCI) 18/08/2017, todo el documento. | 1-9 |
| A | Biotecnología aplicada en la biorremediación de un suelo afectado por un vertido de fluido térmico mediante la formación de biopilas dinámicas.09/06/2014 [en línea][recuperado el 22/07/2020]. Recuperado de Internet <URL: https://www.kepler.es/biotecnologia-aplicada-en-la-biorremediacion-de-un-suelo-afectado-por-un-vertido-de-fluido-termico-mediante-la-formacion-de-biopilas-dinamicas/ >. todo el documento. | 1-9 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1-9

Fecha de realización del informe
30.07.2020

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
B09C1/10 (2006.01)
A62D3/02 (2007.01)
C12R1/01 (2006.01)
C12R1/025 (2006.01)
C12R1/385 (2006.01)
A62D101/20 (2007.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, B09C, A62D, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, XPESP, y Bases de Datos TXT

