



# Aislamiento y capacidad degradadora de cianuro de *Klebsiella* sp. de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna – Perú

Isolation and cyanide degrading capacity of *Klebsiella* sp. of the Magollo Wastewater Treatment Plant, Tacna - Peru

<sup>1</sup> Jesús Calisaya Calderón

ORCID: 0000-0002-4945-5546

<sup>2</sup> Daladier Castillo Cotrina

ORCID: 0000-0003-0133-5921

## RESUMEN

Se tuvo como objetivo aislar y evaluar la capacidad degradadora de cianuro de *Klebsiella* sp. de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna, Perú. Se colectó sedimento y se enriqueció mezclándolo con medio líquido buffer cianuro, pH 10, e incubó a temperatura ambiente durante 7 días. Este enriquecimiento se repitió seis veces tomando como nueva muestra la suspensión enriquecida y como diluyente el medio líquido buffer cianuro. Se tomó inóculos de 0,1 ml del último enriquecimiento y se sembró sobre la superficie del medio agar buffer cianuro contenido en placas Petri e incubó a temperatura ambiente durante 3 días. Las colonias fueron caracterizadas macro y microscópicamente. A la colonia aislada se le evaluó su capacidad degradadora de cianuro, sembrándola en un medio líquido buffer cianuro, pH 10, con una concentración de cianuro de 0,168 ppm e incubó a temperatura ambiente durante 4 días. Finalmente, se hizo la identificación molecular. El resultado fue el aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro con capacidad de degradación de cianuro de 68,45 %, identificada molecularmente como *Klebsiella* sp.

**Palabras clave:** Biodegradación, cianuro, *Klebsiella* sp.

## ABSTRACT

The objective was to isolate and evaluate the cyanide degrading capacity of *Klebsiella* sp. of the Magollo wastewater treatment plant, Tacna, Peru. Sediment was collected and enriched by mixing it with cyanide buffer liquid medium, pH 10, and incubated at room temperature for 7 days. This enrichment was repeated six times taking the enriched suspension as a new sample and as a diluent the cyanide buffer liquid medium. 0,1 ml inoculums of the last enrichment were taken and seeded on the surface of the cyanide buffer medium contained in Petri dishes and incubated at room temperature for 3 days. The colonies were characterized macro and microscopically. The isolated colony was evaluated for its cyanide degrading capacity by sowing it in a liquid cyanide buffer medium, pH 10, with a cyanide concentration of 0,168 ppm and incubated at room temperature for 4 days. Finally the molecular identification was made. The result was the isolation of a cyanide-degrading bacterial strain with a cyanide degradation capacity of 68,45%, molecularly identified as *Klebsiella* sp.

**Keywords:** Biodegradation, cyanide, *Klebsiella* sp.

## INTRODUCCIÓN

<sup>1</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. E-mail: [jesusbm2016@gmail.com](mailto:jesusbm2016@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú. E-mail: [dcastilloc@unjbg.edu.pe](mailto:dcastilloc@unjbg.edu.pe)

Una gran cantidad de cianuro es usado en actividades industriales, farmacéuticas, fibras sintéticas, etc. (Kjeldsen, 1999). Generalmente se piensa que el cianuro es una sustancia mortal, en realidad es una sustancia química ampliamente utilizada por el mundo moderno (Logsdon et al., 2001). El cianuro de hidrógeno por encima de los valores normales es altamente tóxico para los organismos vivos, inactiva el sistema respiratorio (Chena y Liu, 1999).

La protección del medio ambiente y cuerpos de agua involucra que las plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen cianuro deben ser tratadas antes de ser descartadas al medio ambiente.

Actualmente, las plantas de tratamiento de aguas residuales que contienen cianuro emplean métodos físicos, químicos y biológicos para la descontaminación (Griffiths et al., 2014; Kaita et al., 2018; Copari, 2019). En los métodos químicos principalmente se emplea la oxidación química utilizando cloruros e hipoclorito de sodio (Watanabe et al., 1998); sin embargo, estas técnicas no degradan completamente todo el cianuro (Figueria et al., 1996). El tratamiento biológico tiene un costo bajo y es un método aceptado ambientalmente para remover cianuro. Algunos organismos resisten y pueden permanecer activos en concentraciones por arriba de 1 mM de cianuro (Chena y Liu, 1999). En los métodos biológicos entre los microorganismos que se usan para degradar cianuro se encuentran *Pseudomonas putida*, *Rhodococcus* sp., *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* sp., que son capaces de metabolizar el cianuro en compuestos menos tóxicos como amoníaco, metano, CO<sub>2</sub>, entre otros (Lottermoser, 2010; Lovosoa et al., 2017; Copari, 2019), asimismo de fijar el cianuro dentro de sistemas aeróbicos y anaeróbicos, siendo el sistema aeróbico más favorable que el sistema anaeróbico (Watanabe et al., 1998). El método biológico para degradar cianuro genera un valor ambiental que mejora y protege el medio ambiente.

Los microorganismos degradadores de cianuro pueden encontrarse en ambientes de lixiviación con cianuro, especialmente en la recuperación de oro en la minería (López, 2015), asimismo, en los ambientes de aguas residuales considerando que allí se vierten sustancias químicas entre ellas cianuro (Garcés y et al., 2006).

La investigación de los microbios degradadores de cianuro es importante para introducirse en los procesos de biorremediación del cianuro, pero también para estudiar ambientes con comunidades microbianas a partir de los cuales se pueden identificar microbios degradadores de cianuro (López, 2015). La capacidad degradadora de cianuro de los microbios difieren uno de otros por lo cual su determinación es importante (Garcés et al., 2006; López, 2015).

El trabajo tuvo como objetivo aislar y evaluar la capacidad degradadora de cianuro de *Klebsiella* sp. de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna, Perú.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Ubicación y delimitación del área de estudio**

La planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo está ubicado en la provincia de Tacna, región Tacna a 13 km de la ciudad de Tacna en la zona límite de Magollo y la

Yarada, contigua a la carretera que va hacia la playa, 18° 06' 36,7" S y 70° 20' 28,6" W (Zegarra, 2012).

Esta planta cuenta con 12 módulos de lagunas de estabilización, cuatro de ellos construidos en una primera fase, los ocho restantes en una segunda fase; cada módulo está compuesto de una laguna primaria y una laguna secundaria (Zegarra, 2012).

### **Colección de muestra**

Se colectó 300 ml de sedimento por punto de muestreo, los puntos de muestreo fueron 3 de la laguna primaria del módulo N° 9, distanciadas a 5 m. Se tomó la muestra a una distancia alejada de la orilla (50 cm) con ayuda de una draga adaptada con un volumen de 5 L (fue sumergido completamente en posición invertida); una vez en contacto con la muestra, se giró la draga en sentido contrario para recolectar la muestra que luego fue depositada en un frasco estéril de 500 ml de boca ancha. Las muestras fueron codificadas como S1, S2 y S3, estas fueron transportadas cuidadosamente para su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **Enriquecimiento y aislamiento**

De cada uno de los frascos S1, S2 y S3 se extrajo 50 ml para ser añadidos y mezclados en otro frasco estéril de 500 ml de boca ancha, a partir del cual se extrajo dos veces 10 ml de muestra que fueron agregadas por separado a dos matraces que contuvieron 100 ml de medio líquido buffer cianuro, pH 10, e incubados a temperatura ambiente durante una semana para el enriquecimiento, el cual se repitió seis veces, tomando como nuevas muestras la suspensión enriquecida y como diluyente el medio líquido buffer cianuro. La composición del medio líquido buffer cianuro fue:  $K_2HPO_4$  4,35  $g L^{-1}$ ; NaOH 4  $g L^{-1}$ ; glucosa 0,1  $g L^{-1}$ ; 1 ml de soluciones trazas  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  300  $mg L^{-1}$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  180  $mg L^{-1}$ ;  $CoCl_2$  130  $mg L^{-1}$ ;  $CaCl_2$  40  $mg L^{-1}$ ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  40  $mg L^{-1}$  y concentración del ión cianuro de 500 ppm como única fuente de nitrógeno (Shabnam, 2014).

Para el aislamiento se preparó agar buffer cianuro, pH 10 (Chen et al., 2008), sobre el cual se sembró por diseminación en superficie 0,1 ml de muestra diluida de cada una de las diluciones preparada hasta  $10^{-3}$  de la muestra proveniente del último enriquecimiento, por duplicado, en placas Petri, las cuales fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 horas, tiempo en el cual aparecieron colonias bien definidas y aisladas. Estas colonias fueron subcultivadas hasta obtenerlas en estado puro.

### **Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa bacteriana aislada**

Las colonias fueron caracterizadas macroscópicamente a través del color, tamaño, forma y aspecto. La caracterización microscópica se realizó haciendo preparados en seco coloreados con Gram de las colonias obtenidas previamente en agar nutritivo incubadas durante 24 horas a 28 °C. Los preparados fueron observados con el microscopio de campo claro Motic BA410 y las observaciones fotografiados con la cámara fotográfica Canon 3000.

## Actividad biodegradadora de cianuro

Para la fermentación de remoción de cianuro por la cepa bacteriana aislada se preparó y esterilizó en autoclave 100 ml de medio líquido buffer cianurado; pH 10; 0,168 ppm; a partir del cual se extrajo y agregó 10 ml a cada uno de los cuatro viales con capacidad de 20 ml empleados. En dos viales se adicionaron 2 asadas de un cultivo joven de la cepa aislada crecida en agar nutritivo 2.4 % y en los otros dos viales nada.

Se incubaron los viales a temperatura ambiente y en oscuridad durante 4 días. La evaluación de remoción de cianuro se realizó a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación utilizando el método del ácido pícrico (Lamarino, 1989).

Previo a la medición de la capacidad degradadora de cianuro, se determinó la curva estándar patrón de concentración de cianuro versus absorbancia a partir de una solución de cianuro de potasio KCN ( $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$ ) de la siguiente manera.

Se mezcló por agitación el contenido de cada una de las 5 fiolas empleadas para la determinación de la curva patrón (la primera fiola contuvo solo la solución amortiguadora, las otras cuatro contuvieron solución cianurada a diferentes concentraciones) y se les determinó sus absorbancias en el espectrofotómetro Spectronic a una longitud de onda de 520 nm. La Fiola 1, blanco, es la que se midió primero. Se graficó la curva patrón considerando la relación absorbancia y concentración de cianuro libre y se determinó por regresión lineal la ecuación de regresión  $y = a + bx$ ; donde  $y$  = absorbancia,  $x$  = concentración de cianuro libre en ppm.

Luego, se tomó 1 ml de cada uno de los cuatro viales, los cuales fueron diluidos en medio buffer a  $10^{-1}$ . A continuación, se extrajo y agregó de cada uno de los viales respectivamente 1 ml a 4 fiolas de 25 ml conteniendo solución buffer.

Se agitó las fiolas y se leyó las absorbancias en el espectrofotómetro a 520 nm, midiendo previamente el blanco que estuvo constituido por las fiolas sin bacteria. Se calculó la concentración de cianuro libre del blanco y de las muestras respectivas. Finalmente, se calculó la concentración de cianuro libre utilizando la curva patrón de cianuro con la ecuación de regresión encontrada previamente.

## Identificación molecular: proceso de envío para el secuenciamiento

La cepa bacteriana fue sembrada en agar nutritivo contenida en tres placas Petri e incubada durante 24 horas a 28 °C. La biomasa obtenida se cosechó con ayuda de una asa de Drigalsky agregando 5 ml de agua de estilada estéril sobre la superficie del medio de cultivo.

De cada placa Petri la suspensión obtenida se resuspendió suavemente y con ayuda de una micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$  se retiró 1000  $\mu\text{l}$  de la suspensión para ser agregado a un tubo eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril y 500  $\mu\text{l}$  de glicerina 20 % (99 % de pureza). Los tres tubos Eppendorf fueron agitados en un Vortex por 6 segundos y almacenados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta que se envió a Corea del Sur para la extracción, purificación y secuenciamiento del ADN.

## Uso de herramientas bionfórmicas para la identificación de especie

Recepcionadas las secuencias del ADN ribosomal 16 S enviado por la empresa Macrogen Inc. de Seúl, Corea del Sur, estas fueron analizadas usando las herramientas bioinformáticas de alineamiento de secuencias de tipo local BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en internet a partir del NCBI (National Center for Biotechnology Information), EBI-EMBL (Europe Bioinformatic Institute of Europe Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Dates Bank of Japan) y RDB (Ribosomal Database Project). Todas con el propósito de identificar a la especie bacteriana degradadora de cianuro.

## RESULTADOS

En la Figura 1 se observa la cepa microbiana aislada degradadora de cianuro de forma circular, ovalada, de bordes uniformes, claro, transparente.

### Figura 1

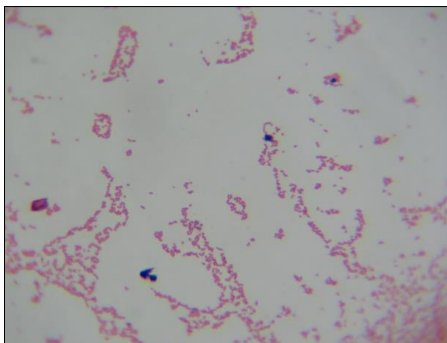
*Características macroscópicas de la cepa microbiana aislada degradadora de cianuro.*



En la Figura 2 se observa microscópicamente la cepa microbiana aislada degradadora de cianuro en un preparado en seco, coloreada con Gram de forma bacilar y Gram negativa.

### Figura 2

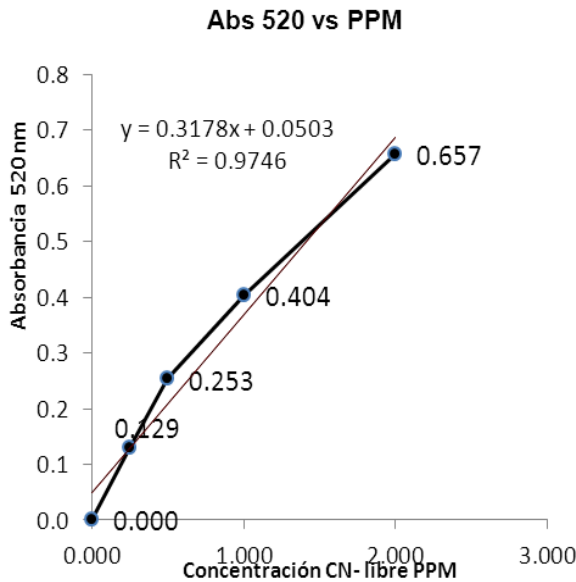
*Características microscópicas de la cepa microbiana, aislada, degradadora de cianuro coloreada con Gram*



En la Figura 3 se muestra la curva patrón en el que se obtuvo concentración de cianuro con una correlación muy buena entre la concentración de cianuro y la absorbancia, 0,974.

**Figura 3**

*Curva patrón obtenida para determinar la concentración de cianuro*



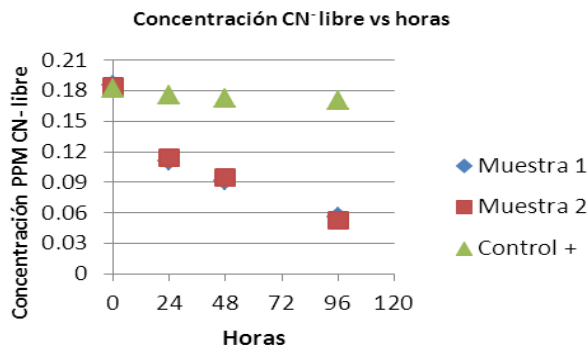
En la figura 4 se observa por duplicado la curva de remoción de cianuro por la cepa microbiana aislada.

En la primera repetición la remoción de cianuro llega hasta 0,055 ppm, llegando la segunda a 0,052 ppm; las dos al cuarto día. Siendo el control constante hasta el cuarto día, manteniéndose a 0.168 ppm.

Por lo que la cepa microbiana en total removió 0,115 ppm (68,45%) de cianuro en 96 horas trabajando a temperatura ambiente.

**Figura 4**

*Curva de remoción de cianuro por duplicado por la cepa microbiana aislada*



Por análisis molecular a la cepa microbiana aislada degradadora de cianuro se le identificó como *Klebsiella* sp. en base a las secuencias obtenidas producto del secuenciamiento del ADN de la cepa microbiana aislada.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de los microorganismos en el enriquecimiento de las muestras de sedimento es probable que se deba a que las muestras tienen una población microbiana alta, asimismo, porque las características fisicoquímicas del medio de cultivo son favorables para el desarrollo de los microorganismos degradadores de cianuro.

En los sedimentos de plantas de tratamiento de aguas residuales se presentan en su mayoría comunidades organótrofos como quimioorganótrofos, característico de los microorganismos degradadores de cianuro que tienen gran capacidad de adaptabilidad, lo cual explica el que se haya encontrado en los sedimentos de una planta de tratamiento de desagüe una bacteria degradadora de cianuro. Existen estudios que el cianuro puede ser tratado biológicamente por *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*, estos microorganismos se encuentran en los sedimentos (Watanabe et al., 1998).

El aislamiento de la cepa microbiana degradadora de cianuro en gran parte es debido al medio de cultivo empleado, medio líquido buffer cianuro “MLBC”, este es un medio de cultivo específico, permite obtener resultados satisfactorios (Shabnam, 2014).

La cepa identificada molecularmente, *Klebsiella* sp., es una especie relacionada al de otros trabajos, identificada como degradadora de cianuro, por ejemplo *Klebsiella oxytoca* aislada de aguas residuales industriales cianuradas. Estas son capaces de biodegradar cianuro a productos finales no tóxicos, siendo que el cianuro utilizado es la única fuente de nitrógeno (Kao et al., 2003).

Esta cepa también se relaciona con las reportadas por otros autores porque presenta forma cocobacilar y es Gram negativo, características que son predominantes de los microorganismos degradadores de cianuro (Chen et al., 2008). El valor de identidad, hallado por bioinformática en la identificación molecular, para esta cepa con el gen ARNr 16S mayor o igual a 97 % es aceptado para ejercer relación entre la cepa a nivel de especie (Stackebrandt y Göebel, 1994).

La cepa bacteriana aislada se le puede considerar una cepa con una alta capacidad removedora de cianuro (degradando un 68,45 % de cianuro). Este valor es bastante superior al mostrado por *Microbacterium oxydans* (32,36 %) que fue encontrado como la mejor cepa microbiana degradadora de cianuro dentro de un grupo de microorganismos evaluados (López, 2015).

## CONCLUSIONES

A partir de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna, Perú se aisló una cepa microbiana degradadora de cianuro con una capacidad de degradación del 68,45 %.

## REFERENCIAS

- Chen, C. Y.; Kao, C. M. & Chen, S. C. (2008). Application of *Klebsiella oxytoca* immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater, 71, 133–139.
- Chena, S. C.; Liu, J.K. (1999). The responses to cyanide of a cyanide-resistant *Klebsiella oxytoca* bacterial strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 37–43.

- Copari, A. (2019). *Biodegradación de cianuro por Klebsiella sp. en condiciones diferentes de factores fisicoquímicos a nivel de biorreactor aireado* (tesis para título profesional) Universidad Nacional Jorge Bsadre Grohmann. Tacna. Perú.
- Figueria, M.M.; Ciminelli, V.S.T.; De Andrade M.C. y Linardi, V.R. (1996). Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Can. J. Microbiol.* 42, 519–523.
- Garcés, A.; Agudelo, L.; Macías, K.; Salinas, N. (2006). Aislamiento de consorcio de microorganismos degradadores de cianuro. *Revista Lasallista de investigación.* 3(1), 7-12.
- Griffiths, S. R.; Donato, D. B.; Coulson, G. & Lumsden, L. F. (2014). High levels of activity of bats AT gold mining water bodies: Implications for compliance with the International Cyanide Management Code. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), 7263–7275. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2651-z>
- Kao, C. M.; Liu, J. K.; Lou, H. R.; Lin, C. S. & Chen, S. C. (2003). Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*, 50, 1055–1061.
- Kaita, Y.; Tarui, T.; Shoji, T.; Miyauchi, H. & Yamaguchi, Y. (2018). Cyanide poisoning is a possible cause of cardiac arrest among fire victims, and empiric antidote treatment may improve outcomes. *American Journal of Emergency Medicine.* <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.01.054>
- Kjeldsen, P. (1999). Behaviour of Cyanides in Soil and Groundwater. *A Review. Water, Air, & Soil Pollution*, 279–307.
- Lamarino, P.F. (1989). The direct spectrophotometric determination of cyanide with picric acid reagent. Report 221, CANMET.
- Logsdon, M. J.; Hagelstein, K. & Mudder, T. (2001). *El manejo del cianuro en la extracción de oro*. International Council on Metals and the Environment.
- López, V. (2015). *Estudio de la diversidad microbiana en efluentes de una planta de beneficio de oro y evaluación de su posible actividad degradadora de cianuro* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Lottermoser, B. *Mine Wastes*. (2010). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12419-8>
- Lovaso, C. R.; Hela, K.; Harinaivo, A. A. & Hamma, Y. (2017). Bioremediation of soil and water polluted by cyanide: A review. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 272–291. <https://doi.org/10.5897/AJEST2016.2264>
- Shabnam, M. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *J Environ Health Sci Eng.*, 12, 85.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 846-849.
- Watanabe, A.; Yano, K.; Ikebukuro, K. & Karube, I. (1998). Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Applied microbiology and biotechnology*, 50 (1), 93-97.
- Zegarra, A. (2012). *Informe de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.*