

Optimización de factores fisicoquímicos en la biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1, en biorreactor aireado

Optimization of physicochemical factors in cyanide biodegradation by *Klebsiella* sp. ART1, in aerated bioreactor

¹Ana Beatriz Copari Mamani

^{2*}Milena Carpio Mamani

³César Julio Cáceda Quiroz

ORCID: 0000-0002-2090-4694

ORCID: 0000-0002-1405-6924

ORCID: 0000-0002-8822-5954

RESUMEN

El cianuro es una sustancia altamente tóxica que representa un problema para el ambiente. Además es letal para muchos organismos vivos. El objetivo fue optimizar parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura y cianuro libre [CN⁻] en el proceso de biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1, en condiciones alcalinas y en biorreactores aireados, utilizando la metodología superficie respuesta (MSR). El modelo se ajustó mediante el diseño de Box- Behnken. La medición de cianuro libre y carga microbiana se realizaron cada 12 horas y la producción de amonio cada 24 horas. Además, se monitoreó constantemente el pH por un periodo de evaluación de 108 horas. Se obtuvo una tolerancia de 400 ppm de cianuro libre con un inóculo inicial de 2×10^8 cél/ml, alcanzando una eficiencia de biodegradación del 98 % en 60 horas de evaluación, el mismo que fue confirmado con el crecimiento bacteriano y con la producción de amonio. En el proceso de optimización solo el pH y [CN⁻] fueron estadísticamente significativos. Después del ajuste del modelo, se determinó que los parámetros óptimos de degradación de cianuro en condiciones alcalina fueron a una temperatura de 30 °C, pH 10 y [CN⁻] 250 ppm, logrando una eficiencia de biodegradación de cianuro del 99 %. Se concluyó que *Klebsiella* sp. ART1 fue capaz de degradar cianuro en productos menos tóxicos; esto sugiere que podría ser utilizada como una alternativa de tratamiento en procesos de biorremediación.

Palabras clave: Biodegradación, Cianuro, Optimización, *Klebsiella* sp. ART1.

ABSTRACT

Cyanide is a highly toxic substance that represents a problem for the environment, it is also lethal for many living organisms. The objective was to optimize physicochemical parameters of pH, temperature and free cyanide [CN⁻] in the cyanide biodegradation process by *Klebsiella* sp. ART1 in alkaline conditions and in aerated bioreactors using the surface response (RSM) methodology, the model was adjusted using the Box-Behnken design. The measurement of free cyanide, microbial load was carried out every 12 hours and the production of ammonia every 24 hours, in addition the pH was constantly monitored for an evaluation period of 108 hours. A tolerance of 400 ppm of free cyanide was obtained with an initial inoculum of 2×10^8 cells / ml that reached a 98% free cyanide biodegradation efficiency in 60 hours of evaluation that was confirmed with bacterial growth and ammonium production. In the optimization process, only the pH and [CN⁻] were statistically significant. After the model adjustment, it was determined that the optimal parameters of cyanide degradation in alkaline conditions were at a temperature of 30 °C, pH 10 and [CN⁻] 250 ppm, achieving a cyanide biodegradation efficiency of 99%. It was concluded that *Klebsiella* sp. ART1 was able to degrade cyanide in less toxic products; this suggests that it could be used as a treatment alternative in bioremediation processes.

Keywords: Biodegradation, Cyanide, Optimization, *Klebsiella* sp. ART1.

^{1,2,3}Laboratorio de Biorremediación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, 23000, Tacna-Perú.

* Autor de correspondencia: anelim.877@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El cianuro es usado en diversos procesos industriales del aluminio y acero (Gessner et al., 2005; Mondal et al., 2019), en la agricultura, en la producción de químicos orgánicos, plásticos, pinturas e insecticidas (Nyamunda, 2017), en la industria minera y joyería. También está presente en los residuos de galvanoplastia (Luque-Almagro et al., 2016), generando grandes volúmenes de aguas residuales que contienen cianuro proveniente de las industrias. Representan un riesgo para muchas formas de vida, debido a que el cianuro es un compuesto altamente tóxico, siendo el cianuro de hidrógeno (HCN) y el cianuro libre (CN⁻) los más tóxicos (Lottermoser, 2010; Ram, 2010). Todos los residuos líquidos cianurados deben contar con un tratamiento óptimo para minimizar el riesgo de contaminación por cianuro para el ambiente, la salud de la vida silvestre y los seres humanos (Luque-Almagro et al., 2016; Lovasoa et al., 2017). Para ello, una posible alternativa es el tratamiento biológico, que a través de la biodegradación resulta ser eficaz, confiable, ecológico y económicamente viable, siendo más rentables que los tratamientos químicos (Dash et al., 2009; Lovasoa et al., 2017). Además, podría ser utilizado con éxito en operaciones a gran escala (Ackil, 2003).

A pesar de la alta toxicidad de estos compuestos cianurados, existen microorganismos capaces de transformar el cianuro a compuestos menos tóxicos. Algunos de estos lo utilizan como fuente de carbono y/o nitrógeno para su crecimiento, que mediante diferentes enzimas, lo convierten en amoníaco y carbonato (Karamba et al., 2015; Kumar et al., 2017) a través de diferentes rutas metabólicas (Gupta et al., 2010, Luque-Almagro et al., 2018). Algunas bacterias como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Luque-Almagro et al., 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Kunz et al., 1992; Dursun et al., 2000), *Bacillus* sp. (Javaheri et al., 2017), *Klebsiella oxytoca* (Chen et al., 2008), hongos como *Fusarium oxysporum* (Akinpelu et al., 2017) y algas como *Scenedesmus obliquus* (Lovasoa et al., 2017), se han utilizado en la degradación de cianuro. Sin embargo, no solo se debe tener en cuenta las condiciones de degradación del compuesto; sino también, las condiciones óptimas en el que se desarrolla el microorganismo, debido a que los procesos pueden alterarse por la composición del medio, concentración inicial de cianuro, materia orgánica, pH, adición de sustratos, temperatura y

condiciones de cultivo. En el caso de biorremediación de agua, las condiciones óptimas de temperatura oscilan entre 25 a 50 °C; pero la mayoría está alrededor de 30 °C para bacterias y 43 °C para hongos. El valor de pH oscila entre 5.2 a 10.5 para bacterias y 6 a 8.5 para hongos (Lovasoa et al., 2017).

Se ha determinado los parámetros de optimización de degradación de cianuro para *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* (Karamba et al., 2015). Para *Klebsiella* sp. solo se conoce que presenta una excelente biodegradación de cianuro entre 25 a 35 °C, en concentraciones iniciales de cianuro de 100 a 500 ppm y que crece a un pH neutro y alcalino (Kao et al., 2006; Chen et al., 2009; Khamar et al., 2015; Razanamahandry et al., 2016). Sin embargo, no se han reportado las condiciones óptimas de degradación en condiciones alcalinas, ni la interacción de estos parámetros en el proceso de biodegradación (Kumar et al., 2017; Lovasoa et al., 2017). Por lo tanto, es importante la optimización en los procesos biotecnológicos para lograr una óptima degradación (Karamba et al., 2015). Además, cada mejora en el proceso puede resultar en un aumento significativo en el rendimiento de la producción y ahorro en el costo de producción (Chen et al., 2005). También podría mejorar el crecimiento y proliferación de un microorganismo para someterlo a adecuadas manipulaciones biotecnológicas (Karamba et al., 2015). De este modo, la optimización puede ayudar a comprender el poder predictivo de lo que se puede esperar de los seres vivos incorporados a diseños (Jhonson, 2013).

El objetivo de la investigación fue optimizar parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura y cianuro libre [CN⁻] en el proceso de biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1, en condiciones alcalinas y en biorreactores aireados, utilizando la metodología superficie respuesta (MSR) y el modelo se ajustó mediante el diseño de Box- Behnken (Box & Behnken, 1960; Montgomery, 2004).

MATERIAL Y MÉTODOS

Caracterización del microorganismo

La cepa de *Klebsiella* sp. ART1 fue aislada de las lagunas de estabilización de Magollo, Tacna-Perú. Para la reactivación de la cepa, se sembró en caldo nutritivo, incubado a 35 °C por 24 horas. Luego, se sembró en medio sólido de agar nutritivo y agar Mac Conkey incubado a 35 °C por

24 horas. Para la caracterización y visualización de la cepa, se realizó tinción diferencial Gram, tinción de cápsula (Erick et al. 2012) y pruebas bioquímicas de rojo de metilo, citrato de Simmons, Voges Proskauer, Indol, TSI y LIA (Garrity et al., 2010) para su confirmación.

Biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1

Para la adaptación de la bacteria se utilizó medio líquido mineral 9M que contenía (g/L): Na₂HPO₄·7H₂O (12.8); KH₂PO₄ (3); NaCl (0.5); MgSO₄·7H₂O (0.5); CaCl₂ (0.1); acetato de sodio 0.2 % (w/v) como fuente de carbono, extracto de levadura 0.2 % (w/v) como fuente de nitrógeno; y 1 % (v/v) de sales minerales que contenía (g/L): ZnSO₄·7H₂O (0.05); MnCl₂·4 H₂O (0.05); CuCl₂·2H₂O (0.005); Na₂MoO₄·2 H₂O (0.005); Na₂B₄O₇·10H₂O (0.002); CoCl₂·6H₂O (0.0003). Además, se ajustó el pH a 10.5 (Huertas et al., 2010, Khamar et al., 2015) y se esterilizó a 121 °C y 15 libras de presión por 15 minutos. El pH del medio se ajustó utilizando NaOH 2 M o HCl 1 M. La cepa fue inoculada en medio 9M con extracto de levadura y con diferentes concentraciones de cianuro, iniciando de 50 a 500 ppm de [CN⁻] y pH 10.5 (para evitar la volatilización del cianuro en forma de gas HCN). Luego se incubó a 30 °C por 24 h. Posteriormente, se inoculó la cepa en medio líquido 9M sin extracto de levadura y se incrementó la concentración de cianuro de 50 – 500 ppm de [CN⁻] en un pH 10.5, incubado también a 30 °C por 24 h (Khamar et al., 2015). La producción de inóculo se realizó en 2 matraces que contenían 250 ml de medio 9M con extracto de levadura y 500 ppm de [CN⁻], pH 10.5 e incubado a 30 °C hasta llegar a una concentración inicial de 1.1x10⁸ cél/ml. El análisis de crecimiento bacteriano se analizó mediante conteo en una cámara Petroff Hausser.

Optimización de las condiciones de degradación de cianuro utilizando MSR

La optimización se realizó según MSR, mediante el diseño de Box Behnken basado en bloques incompletos. Se utilizó para identificar los factores claves en la biodegradación de cianuro (Tabla 1), a partir de los cuales se determinaron los niveles óptimos de las variables significativas y los efectos de sus interacciones mutuas. Las variables independientes fueron la temperatura (25, 30 y 35 °C), pH (10, 10.5 y 11), concentración de cianuro libre [CN⁻] (200, 300 y 400 ppm) y la

variable respuesta fue la eficiencia de biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1. Según el diseño, se realizaron 16 operaciones (Tabla 2) que fueron monitoreados por un periodo de evaluación de 108 horas.

Tabla 1. Variables incluidas en los experimentos de Box Behnken y niveles de concentración

| Variable | Escala | Nivel Mínimo | Nivel Medio | Nivel Máximo |
|---|----------------|--------------|-------------|--------------|
| Temperatura (°C) | X ₁ | 25 | 30 | 35 |
| pH | X ₂ | 10 | 10.5 | 11 |
| Concentración de [CN ⁻] (ppm) | X ₃ | 200 | 300 | 400 |

Tabla 2. Diseño Box-Behnken usando tres variables

| N° | Variables | | | | | [CN ⁻] ppm |
|----|----------------|----------------|----------------|--------|------|------------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | T (°C) | pH | |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 25 | 10 | 300 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 35 | 10 | 300 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 25 | 11 | 300 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 35 | 11 | 300 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 25 | 10.5 | 200 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 35 | 10.5 | 200 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 25 | 10.5 | 400 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 35 | 10.5 | 400 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 30 | 10 | 200 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 30 | 11 | 200 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 30 | 10 | 400 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 30 | 11 | 400 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 30 | 10.5 | 300 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 30 | 10.5 | 300 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 30 | 10.5 | 300 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 30 | 10.5 | 300 |

Nota: X₁, X₂, X₃ representa el nivel codificado

La ecuación de regresión para este modelo es:

$$Y = a_0 + a_1T + a_2pH + a_3[CN^-] + a_4T^2 + a_5pH^2 + a_6[CN^-]^2 + a_7TpH + a_8T[CN^-] + a_9pH[CN^-]$$

Ec. 1

Donde:

Y = La degradación final de cianuro

a = coeficiente del modelo

T, pH, [CN⁻] = variables

Determinación de cianuro libre y amonio

El cianuro libre se determinó con el método titulométrico (Estándar Methods 4500-CN-D. EEUU). Para cuantificar la concentración de cianuro libre se utilizó una proporción propuesta por Carrillo (2000). El método se basa en la reacción del AgNO_3 con el ión cianuro en solución alcalina para formar el complejo soluble $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$. Se utilizó 10 ml de muestra y se agregó 3 gotas de Ioduro de potasio IK. Posteriormente, se tituló con AgNO_3 . La proporción para obtener la concentración de cianuro libre fue:

$$1 \text{ ml de gasto de } \text{AgNO}_3 = 20 \text{ ppm de } \text{CN}^-$$

Para determinar la concentración de amonio, se utilizó el método colorimétrico (Merck) que indica la cantidad de nitrógeno amónico ($\text{NH}_4\text{-N}$), que se presenta en forma de iones amonio y amoniaco.

Determinación de la eficiencia de biodegradación de cianuro

La eficiencia de degradación (ED) de la bacteria degradadora de cianuro se calculó con la siguiente fórmula (Kandasamy et al., 2015):

$$DE (\%) = \left(\frac{I_c - F_c}{I_c} \right) \times 100$$

Donde:

I_c = Concentración inicial de cianuro (mg/L)

F_c = Concentración final de cianuro (mg/L)

Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA), para establecer si existe diferencia significativa entre los tratamientos para la máxima biodegradación de cianuro. El modelo se ajustó mediante el diseño Box Behnken. Los análisis de datos se realizaron utilizando el paquete estadístico Statistica v. 13.0.

RESULTADOS

Crecimiento de la bacteria en presencia de cianuro

La colonia de *Klebsiella* sp. ART1 en agar nutritivo era de color blanco cremoso, cóncavas, lisas y de borde circular bien definido (Fig. 1a). Por otro lado, en medio Mac Conkey (Fig. 1b), fueron colonias plano convexas, de borde

ondulado, de aspecto mucoso y brillante. La cepa era un bacilo Gram negativo con cápsula y según las pruebas bioquímicas (Tabla 3), se confirma que corresponde a *Klebsiella* sp. ART1. Para la adaptación, se cultivó la cepa en medio mínimo 9M con extracto de levadura, y posteriormente en medio 9M con cianuro hasta llegar a 400 ppm de $[\text{CN}^-]$. La cepa fue capaz de degradar el cianuro, lo que indica que tuvo la capacidad de utilizar este compuesto como única fuente de nitrógeno, la adición de una mínima cantidad de extracto de levadura facilitó el crecimiento de la bacteria.

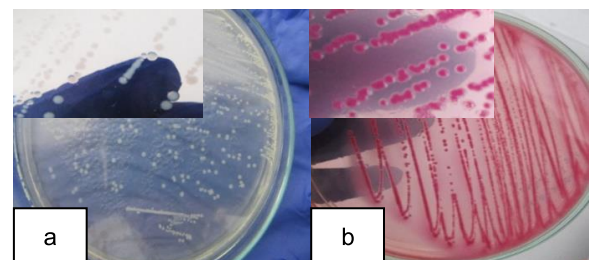


Figura 1. Crecimiento de *Klebsiella* sp. ART1: a) en Agar nutritivo y b) en Mac Conkey

Tabla 3. Caracterización bioquímica de *Klebsiella* sp. ART1

| Bioquímica | <i>Klebsiella</i> sp. ART1 |
|------------|----------------------------|
| TSI | A/A (g), |
| LIA | K/K |
| Citrato | + |
| Indol | + |
| VP | + |
| RM | - |

Determinación de la eficiencia de degradación de cianuro

El efecto de la biodegradación de cianuro se realizó agregando 200, 300 y 400 ppm de cianuro al medio 9M, a diferentes condiciones de temperatura y pH. Los resultados indican que en la mayoría de tratamientos, *Klebsiella* sp. ART1 obtuvo una alta eficiencia de biodegradación, logrando eliminar más del 98 % de cianuro en 108 horas. Sin embargo, la mayor degradación se obtuvo a las 60 horas (Tabla 4). En el tratamiento 9 fue donde se tuvo la mayor tasa de biodegradación (98 %). La producción de amonio fue incrementándose de 0 a 1 mg NH_4^+ /L durante la evaluación. Esto indicaría que, mientras aumenta la producción de amonio, disminuye la cantidad de cianuro; y por lo tanto aumenta la eficiencia de degradación.

Tabla 4. Biodegradación experimental de cianuro

| Tratamiento | [CN ⁻] res. (ppm) 60h | [CN ⁻] exp. Biode. (%)*60h |
|-------------|--------------------------------------|---|
| 1 | 50 | 83.33 |
| 2 | 16 | 94.67 |
| 3 | 144 | 52.00 |
| 4 | 122 | 59.33 |
| 5 | 28 | 86.00 |
| 6 | 68 | 66.00 |
| 7 | 176 | 56.00 |
| 8 | 204 | 49.00 |
| 9 | 4 | 98.00 |
| 10 | 28 | 86.00 |
| 11 | 24 | 94.00 |
| 12 | 202 | 49.50 |
| 13 | 62 | 79.33 |
| 14 | 56 | 81.33 |
| 15 | 66 | 78.00 |
| 16 | 58 | 80.67 |

Tabla 5. Análisis de varianza de la tasa de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella* sp. ART1

| Fuente | SC | df | CM | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------|---------|----|----------|----------|---------|
| A: T | 8.67 | 1 | 8.674 | 3.9699 | 0.1403 |
| B: pH | 1896.36 | 1 | 1896.356 | 867.9671 | 0.0001* |
| C: [CN ⁻] | 957.03 | 1 | 957.031 | 438.0357 | 0.0002* |
| AA | 631.27 | 1 | 631.266 | 288.9319 | 0.0004* |
| AB | 4.02 | 1 | 4.020 | 1.8400 | 0.2680 |
| AC | 42.25 | 1 | 42.250 | 19.3379 | 0.0218* |
| BB | 102.52 | 1 | 102.516 | 46.9217 | 0.0064* |
| BC | 264.06 | 1 | 264.063 | 120.8621 | 0.0016* |
| CC | 36.48 | 1 | 36.482 | 16.6977 | 0.0265 |
| Falta de ajuste | 278.93 | 3 | 92.976 | 42.56 | 0.0059* |
| Error total | 6.55 | 3 | 2.185 | | |
| Total (corr.) | 4228.14 | 15 | | | |

p* (<0.05) = estadísticamente significativo; A= temperatura, B= pH, C= concentración de cianuro libre [CN⁻], AA= interacción entre las temperaturas, AB= interacción entre la temperatura y pH, AC= interacción entre la temperatura y [CN⁻], BB= interacción entre los pH, BC= interacción entre el pH y la [CN⁻], y CC= interacción entre las [CN⁻] y [CN⁻]. R² = 93.25 %; R² (ajustada) = 83.12 %

Optimización mediante el diseño superficie respuesta

El efecto de los factores B, C y las interacciones AA, AC, BB, BC, CC fueron significativos. Sin embargo, el factor A y la interacción AB no fueron significativas, por lo que se podría asumir que estas interacciones actuaron independientemente (Tabla 5). El valor de R² ajustado fue 83.12 %, lo que implica que la variabilidad obtenida puede ser explicada correctamente mediante el modelo. Por lo tanto, el modelo puede ser empleado para realizar predicciones del proceso y optimizar los parámetros de operación. Según el ajuste del

modelo de regresión, la ecuación polinómica fue:

$$\begin{aligned} \%[CN^-] &= 1615.66 + 33.202T - 395.263pH \\ &+ 1.583[CN^-] - 0.503T^2 - 0.401TpH \\ &+ 0.006T[CN^-] + 20.25TpH^2 \\ &- 0.162pH[CN^-] \\ &+ 0.000 [CN^-]^2 \end{aligned} \quad \text{EC. 2}$$

Donde:

%[CN⁻] = Porcentaje de biodegradación de cianuro libre

T=Temperatura

[CN⁻] = Concentración de cianuro libre

Tabla 6. Coeficiente de regresión para la eficiencia de biodegradación de cianuro

| Coefficiente | Estimado |
|-----------------------|----------|
| constante | 1615.66 |
| A: T | 32.202 |
| B: pH | -395.263 |
| C: [CN ⁻] | 1.583 |
| AA | -0.503 |
| AB | -0.401 |
| AC | 0.006 |
| BB | 20.25 |
| BC | -0.162 |
| CC | 0.000 |

El diagrama de Pareto se determinó para descubrir las variables que afectan en la degradación (Fig. 2), que son las que tienen mayor influencia sobre la variable respuesta. Los factores significativos fueron el pH, la concentración de CN⁻ y las interacciones AA, BC, BB, AC, CC (Fig. 2). En

cambio, la temperatura, interacción AB resultaron ser las de menor efecto sobre la variable respuesta.

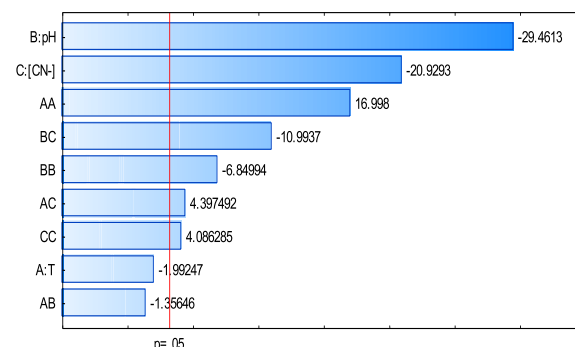


Figura 2. Diagrama de Pareto, selección de variables por diseño Box-Behnken. Los factores seleccionados deben tener un valor $p < 0.05$

Las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro libre fueron a una temperatura de 30 °C, pH 10 y 250 ppm [CN⁻]. Según los valores predichos, la máxima remoción de cianuro fue de 99.06%, con las variables experimentales a 30 °C, pH 10 y 200 ppm [CN⁻] (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados estimados para la biodegradación de cianuro utilizando el modelo de Regresión Lineal

| TRAT. | VARIABLE INDEPENDIENTE | | | VARIABLE. DEPENDIENTE | |
|-------|------------------------|-------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------|
| | A: T (°C) | B: pH | C: [CN ⁻] inicial (ppm) | Eficiencia de remoción % Observado | Predicho |
| 1 | 25 | 10.0 | 300 | 83.33 | 92.66 |
| 2 | 35 | 10.0 | 300 | 94.67 | 83.68 |
| 3 | 25 | 11.0 | 300 | 52.00 | 83.71 |
| 4 | 35 | 11.0 | 300 | 59.33 | 49.90 |
| 5 | 25 | 10.5 | 200 | 86.00 | 89.77 |
| 6 | 35 | 10.5 | 200 | 66.00 | 79.88 |
| 7 | 25 | 10.5 | 400 | 56.00 | 96.16 |
| 8 | 35 | 10.5 | 400 | 49.00 | 68.24 |
| 9 | 30 | 10.0 | 200 | 98.00 | 99.06 |
| 10 | 30 | 11.0 | 200 | 86.00 | 95.24 |
| 11 | 30 | 10.0 | 400 | 94.00 | 78.29 |
| 12 | 30 | 11.0 | 400 | 49.50 | 91.44 |
| 13 | 30 | 10.5 | 300 | 79.33 | 83.29 |
| 14 | 30 | 10.5 | 300 | 81.33 | 83.29 |
| 15 | 30 | 10.5 | 300 | 78.00 | 83.29 |
| 16 | 30 | 10.5 | 300 | 80.67 | 83.29 |

Interacción entre factores

A medida que se incrementó el pH, disminuyó el porcentaje de biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1. A su vez, a medida que se incrementó la concentración de cianuro libre, se observó una disminución en la biodegradación de cianuro (Fig. 3). A medida que se incrementó la

concentración de cianuro libre, disminuyó la biodegradación de cianuro; a su vez, a medida que se incrementó la temperatura se incrementó la biodegradación de cianuro (Fig. 4). A medida que se incrementó el pH, disminuyó la biodegradación de cianuro y al incrementar la temperatura, aumentó la biodegradación (Fig. 5).

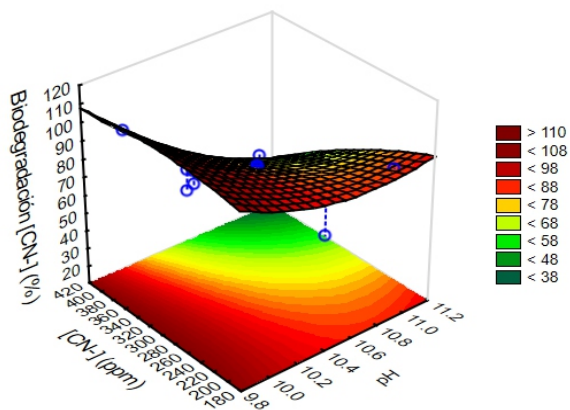


Figura 3. Gráfico de superficie respuesta de pH y concentración de cianuro libre con el porcentaje de cianuro biodegradado.

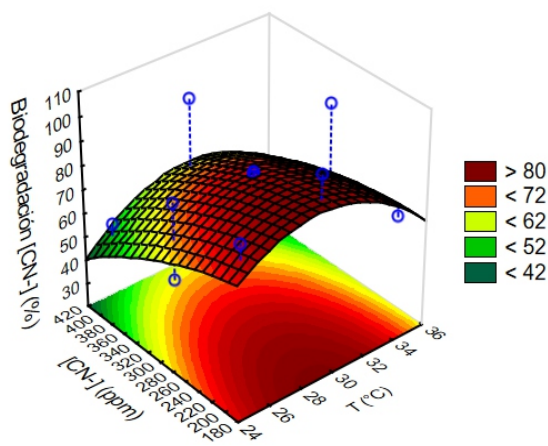


Figura 4. Gráfico de superficie respuesta de temperatura y concentración de cianuro con el porcentaje de cianuro biodegradado.

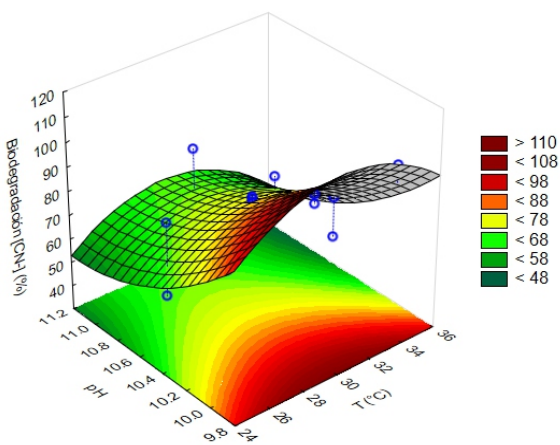


Figura 5. Gráfico de superficie respuesta de temperatura y pH con el porcentaje de cianuro biodegradado.

Las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro libre fueron a una 30 °C, pH 10 y [CN⁻] de 250 ppm.

DISCUSIÓN

Crecimiento de la bacteria en presencia de cianuro

De acuerdo a la caracterización y pruebas bioquímicas realizadas, estas indican que la cepa corresponde al género *Klebsiella* sp. (Garrity et al., 2010). La capacidad de crecimiento de *Klebsiella* sp. ART1 fue debido a que tuvo la capacidad de degradar cianuro y pudo utilizarlo como única fuente de nitrógeno, similar a lo descrito por Kao et al. (2003) y Chen et al. (2008), quienes indican que *Klebsiella oxytoca* puede utilizar KCN como la única fuente de nitrógeno. Además, se ha utilizado para la degradación hidrocarburos, tetracianoniquelato y nitrilo (Kao et al., 2003; Chen et al., 2009; Liu et al., 2017). Por lo tanto, tiene un alto potencial para ser utilizado en el tratamiento de aguas residuales que contienen cianuro (Chen et al., 2009).

En este estudio probablemente *Klebsiella* sp. utilizó la ruta hidrolítica, mediante la enzima nitrilo hidratasa o nitrilasas, que posteriormente lo convierten a amonio, metano, CO₂, ácido fórmico y/o ácido carboxílico (Gupta et al., 2010; Luque-Almagro et al., 2018), debido a que no se utilizó ninguna fuente adicional de nitrógeno.

Desde el punto de vista químico, el tratamiento biológico de efluentes cianurados requiere un pH alcalino (Das & Santra, 2011). Sin embargo, estudios realizados por —Lovasoa et al., (2017) Chen et al. (2009); y Kao et al. (2006) indican que las condiciones óptimas de biodegradación de cianuro libre por *Klebsiella* sp. son en pH neutros. No obstante, Suzuki et al. (2014) indica que también tiene la capacidad de crecer en condiciones alcalinas.

Determinación de la eficiencia de degradación de cianuro

La cepa de *Klebsiella* sp. ART1 tuvo la capacidad de tolerar y degradar 400 ppm de cianuro libre en condiciones alcalinas; obteniéndose la degradación de cianuro y producción de amonio, este proceso fue similar al descrito por (Kao et al., 2003), que indica que la biodegradación de cianuro y la producción de amonio ocurre simultáneamente. Según la presente

investigación, podemos afirmar que mientras la concentración de cianuro disminuye la producción de amonio aumenta. Otros estudios, realizados en el mismo género, indican que *Klebsiella oxytoca* tiene la capacidad de tolerar y degradar cianuro (Chen et al., 2008), *Klebsiella pneumoniae* tuvo la capacidad de degradar tiocianato entre 500 a 2500 ppm a un pH de 6.0 y 37 °C (Chaudhari & Kodam, 2010); sin embargo, ambos procesos de degradación se realizaron en condiciones neutras.

Existen varios microorganismos implicados en el proceso de biodegradación de cianuro como *Pseudomonas fluorescens*, que obtuvo una eficiencia de degradación del 85 % de KCN en 6 h; el metabolismo de esta bacteria es dependiente de oxígeno, además de haber presencia de CO₂ y amoníaco como productos finales de la biodegradación (Kunz et al., 1992). Asimismo, *Pseudomonas aeruginosa* STK 03 tuvo una eficiencia de degradación de cianuro libre de 80 y 32 %, a partir de una concentración inicial de 250 y 450 mg CN/L respectivamente. Estos procesos de degradación se realizaron en condiciones alcalinas (Mekuto et al., 2016); mientras que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* W2 fue capaz de tolerar una concentración de cianuro de 39 mg/L (Tiong et al. 2015); *Azotobacter vinelandii* degradó un 84.4 % de cianuro con 3 mM de NaCN (Sarawut et al., 2013) y *Bacillus* tuvo una máxima degradación de cianuro de 700mg/L (Wu et al., 2014). Otras investigaciones realizadas por Razanamahandry et al., (2016) probaron la capacidad de degradar de cianuro libre a un pH 9.5, donde se obtuvo una degradación del 95 % en 25 h. Todos estos estudios confirman nuestros resultados y reafirman que esta cepa tiene un alto potencial de ser utilizada en procesos de biodegradación de cianuro debido a que obtuvo una eficiencia de degradación del 98 %, en un total de 60 h en condiciones alcalinas. Es importante considerar que la degradación se asoció con el crecimiento bacteriano y la producción de amonio. Sin embargo, concentraciones elevadas de cianuro pueden inhibir el crecimiento bacteriano y afectar la degradación de cianuro.

El proceso de biodegradación de cianuro se produce en condiciones ácidas, neutras y ligeramente alcalinas (Razanamahandry et al., 2016). Sin embargo, Hande & Seyis (2016) recomiendan trabajar en condiciones alcalinas, para evitar la volatilización de cianuro en forma de ácido cianhídrico en condiciones de pH neutras y ácidas —(Eisler & Wiemeyer, 2004; Kumar et

al., 2018; Luque-Almagro et al., 2016; Razanamahandry et al., 2018). Por lo tanto, en este tipo de procesos, es importante considerar el crecimiento de la bacteria en condiciones alcalinas.

Optimización mediante diseño superficie respuesta

El proceso de biodegradación de cianuro por *Klebsiella* sp. ART1 se optimizó utilizando el método de superficie respuesta con la finalidad de determinar la mejor condición para degradar este compuesto. Para ello, se consideró tres parámetros: la temperatura, pH y concentración de cianuro.

Los resultados de optimización por *Klebsiella* sp. ART1, en condiciones alcalinas, tuvieron una eficiencia de degradación de cianuro libre de 99.06 % a una temperatura de 30 °C, pH de 10 y una concentración de [CN] de 250 ppm, similares a las investigaciones realizadas por Moradkhani et al., (2018), en la que *Pseudomonas parafulva* tuvo una mayor eficiencia de degradación de cianuro (93.5 %) cuando la concentración inicial era de 200 ppm. Sin embargo, es importante considerar que concentraciones elevadas de cianuro tienen un efecto destructivo para los microorganismos que tienen la capacidad de eliminar cianuro, esto significa que el cianuro era utilizado como sustrato hasta 200 ppm, pero en concentraciones elevadas presentaba un efecto inhibidor de crecimiento. Entonces, al aumentar la concentración de cianuro, disminuye la eficiencia de degradación o el tiempo requerido para la degradación aumenta notablemente. Otra cepa bacteriana tuvo la capacidad de tolerar 500 ppm de cianuro libre. En este caso, la degradación del cianuro se relacionó con el crecimiento bacteriano y alcanzó un nivel máximo del 96 % de degradación durante la fase exponencial; en la cual, la tasa de crecimiento más alta fue de 1.23×10^8 cél/ml en 4 días de incubación. Entonces, podemos afirmar que mientras que la carga microbiana aumenta también aumenta la biodegradación de cianuro, y que el crecimiento bacteriano y la eliminación de cianuro están correlacionados (Mirizadeh et al., 2014).

La optimización del proceso de biodegradación se ha realizado en *Bacillus* sp., *Serratia marcescens*, entre otros (Javaheri et al., 2017, Karamba et al., 2015; Kumar et al., 2015; Mekuto et al., 2015; Mieizadeh et al., 2014, Moradkhari et al., 2018), pero la optimización de degradación de cianuro

mediada por de *Klebsiella* en condiciones alcalinas aún no se ha reportado, a excepción de la investigación realizada por Hande & Seyis (2016), que ha optimizado la degradación de cianuro por *Klebsiella pneumoniae* a un pH neutro.

En una investigación realizada por Javaheri et al., (2017), se indica que *Bacillus* sp. logra un 86 % de degradación cuando la concentración de CN⁻ fue 200 mg/l y que al reducir la concentración de cianuro libre se logra una mayor degradación (Wu et al. 2014). Igualmente para *Pseudomonas putida*, que crece en una concentración de cianuro 4 mM y se inhibió a 8 mM (Chapatwala et al. 1998). Otra investigación indica que la optimización en condiciones alcalinas fue a una temperatura de 34.2 °C, pH 10.3 y concentración de glucosa 0.44 (g/L), con una concentración de 500 ppm de cianuro (Mirizadeh et al., 2014).

Teniendo en cuenta la concentración de cianuro y el tiempo, la degradación de 200 mg/L se efectuó en 90 horas con una concentración inicial de 400 ppm, similar a la optimización realizada por Mekuto et al., (2015), en la que las condiciones favorables fueron a 33.60 °C, pH 9.88 de 206.53 mg/l en 96 h, a partir de una concentración inicial de cianuro de 500 mg CN⁻/L. En el caso de *Serratia marcescens*, se observó que la bacteria degradaba el 95.6 % de 200 mg/L de KCN en las condiciones optimizadas, de pH 6, temperatura 32.5, tamaño de inóculo 20 %; y se informa que las bacterias degradan el cianuro en amoníaco, formamida o formiato y dióxido de carbono, subproductos menos tóxicos (Karamba et al., 2016). De acuerdo a nuestra investigación y otras realizadas en biodegradación, se observó que un el umbral máximo de biodegradación de cianuro era de 200 mg/L (Kuyucak & Akcil, 2013), pero en procesos similares debemos tener en cuenta la investigación realizara por Kao et al. (2003), que informa que una concentración de cianuro superior a 2.6 mg/l puede inducir una fase de retraso en el crecimiento bacteriano, y esto afecta en el proceso de biodegradación de cianuro, por lo que es importante determinar la tolerancia de los microorganismos antes de realizar la biodegradación de cianuro.

CONCLUSIONES

La cepa de *Klebsiella* sp. ART1 ha sido optimizada para la degradación de cianuro. Los valores óptimos fueron a pH 10, a una temperatura de 30 °C y con una concentración de 250 ppm de

cianuro libre, según el diseño de Box- Behnken; acuerdo a estas condiciones, se obtuvo una eficiencia de degradación de un 99 % en 60 horas. Con el desarrollo bacteriano se generó como producto final hasta 1.0 mg/L de amonio. Esto sugiere que la bacteria podría ser utilizada como una alternativa de tratamiento en procesos de biorremediación.

REFERENCIAS

- Akcil, A. (2003). Destruction of cyanide in gold mill effluents: Biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances*, 21(6), 501–511. doi: 10.1016/S0734-9750(03)00099-5
- Akinpelu, E. A., Adetunji, A. T., Ntwampe, S. K. O., Nchu, F., & Mekuto, L. (2017). Biochemical characteristics of a free cyanide and total nitrogen assimilating *Fusarium oxysporum* EKT01/02 isolate from cyanide contaminated soil. *Data in Brief*, 14, 84–87. doi:10.1016/j.dib.2017.07.023
- Box GEP, Behnken DW. (1960). Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. Taylor & Francis Group, Ltd. On behalf of american statistical Association and American Society for Quality. *Technometrics*. 1960;2(4):455–75. <http://www.jstor.org/stable/1266454>.
- Carrillo P., F. (2000). “*Estudio cinético de la oxidación de cianuro y tiocianato con ozono.*” Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Saltillo.
- Chapatwala, K. D., Babu, G. R. V., Vijaya, O. K., Kumar, K. P., & Wolfram, J. H. (1998). Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 28–33. doi: 10.1038/sj.jim.2900469
- Chaudhari, A. U., & Kodam, K. M. (2010). Biodegradation of thiocyanate using co-culture of *Klebsiella pneumoniae* and *Ralstonia* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1167–1174. doi: 10.1007/s00253-009-2299-7
- Chen L. Z.; Nguang S. K.; Chen X. D. (2005). *Modeling and Optimization of Biotechnological Processes*.
- Chen, C. Y., Kao, C. M., & Chen, S. C. (2008). Application of *Klebsiella oxytoca*

- immobilized cells on the treatment of cyanide wastewater. *Chemosphere*, 71(1), 133–139. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.10.058
- Chen, C. Y., Kao, C. M., Chen, S. C., & Chen, T. Y. (2009). Biodegradation of tetracyanonickelate by *Klebsiella oxytoca* under anaerobic conditions. *Desalination*, 249(3), 1212–1216. doi: 10.1016/j.desal.2009.06.036
- Das S., & Santra S.C. (2011). Cyanide degradation by *Aspergillus niger* strain isolated from steel-plant wastewater. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural, and Food Chemistry* 10(7):2516-2522.
- Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 1–11. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.051
- Dursun, A. Y. (2000). Biodegradation kinetics of ferrous (II) cyanide complex ions by immobilized *Pseudomonas fluorescens* in a packed bed column reactor. 35, 615–622.
- Eisler, R., & Wiemeyer, S. N. (2004). Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 183(1), 21–54. doi:10.1201/9781420037982-15
- Erick, M. V. Z., Fernandez, C., Gerardo, M. C. C., & Sosa, C. (2012). *Bacteriologia Y Micologia Veterinaria*.
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2B. In D. Brenner, N. Krieg, & J. Staley (Eds.), editorial board (second edi)*. doi: 10.1245/s10434-010-1229-3
- Gessner, T. P., Kadlec, R. H., & Reaves, R. P. (2005). Wetland remediation of cyanide and hydrocarbons. *Ecological Engineering*, 25(4), 457–469. doi:10.1016/j.ecoleng.2005.07.015
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 1–13. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.11.038
- Hande, N., & Seyis, I. (2016). Biological treatment of cyanide by using *Klebsiella pneumoniae* species. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 450–454. doi: 10.17113/ftb.54.04.16.4518
- Huertas, M. J., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Blasco, R., García-García, I. (2010). Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 72–78. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.059
- Javaheri Safa, Z., Aminzadeh, S., Zamani, M., & Motallebi, M. (2017). Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express*, 7(1). doi: 10.1186/s13568-017-0502-2
- Johnson, A. T. (2013). Teaching the principle of biological optimization. *Journal of Biological Engineering*. 1–7.
- Kandasamy, S., Dananjeyan, B., Krishnamurthy, K., & Benckiser, G. (2015). Aerobic cyanide degradation by bacterial isolates from cassava factory wastewater. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 659–666. doi: 10.1590/S1517-838246320130516
- 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*. *Chemosphere*, 50(8), 1055–1061. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00624-0
- Kao, C. M., Chen, K. F., Liu, J. K., Chou, S. M., & Chen, S. C. (2006). Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 228–233. doi: 10.1007/s00253-005-0129-0
- Karamba, K. I., Yasid, N. A., & Khalid, A. (2015). *Isolation, screening and characterisation of cyanide-degrading Serratia marcescens strain aq07*.
- Khamar, Z., Makhdoumi-Kakhki, A., & Mahmudy Gharaie, M. H. (2015). Remediation of cyanide from the gold mine tailing pond by a novel bacterial co-culture. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99, 123–128. doi: 10.1016/j.ibiod.2015.01.009
- Kunz, D. A., Nagappan, O., Silva-avalos, J., & Delongt, G. T. (1992). Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: Evidence for Multiple Pathways of Metabolic Conversion. 58(6), 2022–2029.
- Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2015). Statistical Enhancement of Cyanide Degradation Using Microbial Consortium.

- Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(06), 344–350. doi: 10.4172/1948-5948.1000237
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., & Jeon, B.-H. (2017). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 20(1), 28–40. doi: 10.1080/12269328.2016.1218303
- Kumar, V., Kumar, V., & Bhalla, T. C. (2018). Alkaline active cyanide dihydratase of *Flavobacterium indicum* MTCC 6936: Growth optimization, purification, characterization and in silico analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116(2017), 591–598. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.075
- Kuyucak, N., & Akcil, A. (2013). Cyanide and removal options from effluents in gold mining and metallurgical processes. *Minerals Engineering*, 50–51, 13–29. doi: 10.1016/j.mineng.2013.05.027
- Javaheri Safa, Z., Aminzadeh, S., Zamani, M., & Motallebi, M. (2017). Significant increase in cyanide degradation by *Bacillus* sp. M01 PTCC 1908 with response surface methodology optimization. *AMB Express*, 7(1). doi: 10.1186/s13568-017-0502-2
- Liu, C., Yuan, K., Chen, R. ping, Chen, M. jun, & Yu, L. (2017). Biodegradation kinetics of nitriles with easily degradable substrate by *Klebsiella oxytoca* GS-4-08. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 118, 95–101. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.01.028
- Lottermoser, B. (2010). *Mine Wastes*. Third ed. doi: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. doi: 10.5897/AJEST2016.2264
- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2011). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 269–274. doi: 10.1042/BST0390269
- Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 9–13. doi:10.1016/j.copbio.2015.12.004
- Luque-Almagro, V. M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2018). Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1067–1074. doi: 10.007/s00253-017-8678-6
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., & Jackson, V. A. (2015). Biodegradation of free cyanide and subsequent utilisation of biodegradation by-products by *Bacillus* consortia: Optimisation using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10434–10443. doi: 10.1007/s11356-015-4221-4
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., Kena, M., Golela, M. T., & Amodu, O. S. (2016). Free cyanide and thiocyanate biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* STK 03 capable of heterotrophic nitrification under alkaline conditions. *3 Biotech*, 6(1), 1–7. doi: 10.1007/s13205-015-0317-2
- Mirzadeh, S., Yaghmaei, S., & Ghobadi Nejad, Z. (2014). Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM). *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12(1), 85. doi: 10.1186/2052-336X-12-85
- Mondal, P., Balomajumder, C., & Dwivedi, N. (2017). Bioremoval of cyanide from aqueous solution using *Tectona grandis* leaves powder: a potential bioadsorbent. *International Journal of Environmental Technology and Management*, 19(3/4), 198. doi:10.1504/ijetm.2016.10003103
- Mongomery, D. (2004). *Diseño y Análisis de Experimentos*. (L. Wiley, Ed.) (segunda ed). New York: universidad estatal de Arizona.
- Moradkhani, M., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G. (2018). Biodegradation of cyanide under alkaline conditions by a strain of *Pseudomonas putida* isolated from gold mine soil and optimization of process variables through response surface methodology (RSM). *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62(3), 265–273. doi: 10.3311/PPch.10860
- Nyamunda, B. C. (2017). Review of the Impact on

- Water Quality and Treatment Options of Cyanide Used in Gold Ore Processing. *Water Quality*. <http://doi.org/10.5772/65706>
- Ram, A. V. (2010). Toxicidad del cianuro. Investigación bibliográfica de sus efectos en animales y en el hombre. *Revista de Medicina Del Perú*, 71(1), 54–61. doi:10.1016/S0166-445X(96)00815-6
- Razanamahandry, L. C., Andrianisa, H. A., Karoui, H., Kouakou, K. M., & Yacouba, H. (2016). Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere*, 157, 71–78. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.020
- Sarawat K., S., Vichitphan, S., Laopaiboon, L., Vichitphan, K., & Han, J. (2013). Growth and cyanide degradation of *Azotobacter vinelandii* in cyanide-containing wastewater system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 572–578. doi: 10.4014/jmb.1209.09026
- Suzuki, T., Nishikawa, C., Seta, K., Shigeno, T., & Nakajima-Kambe, T. (2014). Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *New Biotechnology*, 31(3), 246–253. doi:10.1016/j.nbt.2014.03.005
- Tiong, B., Bahari, Z. M., Irwan Shah Lee, N. S., Jaafar, J., Ibrahim, Z., & Shahir, S. (2015). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain W2 isolated from mining effluent. *Sains Malaysiana*, 44(2), 233–238. doi: 10.17576/jsm-2015-4402-10
- Wu, C. F., Xu, X. M., Zhu, Q., Deng, M. C., Feng, L., Peng, J., ... Wang, J. H. (2014). An effective method for the detoxification of cyanide-rich wastewater by *Bacillus* sp. CN-22. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3801–3807. doi: 10.1007/s00253-013-5433-5