



Aislamiento y caracterización molecular de *Halomonas* degradadores de cianuro provenientes de efluentes mineros en el Perú

Isolation and molecular characterization of cyanide degrading *Halomonas* from mining effluents in Peru

Favio Calixto¹; Jorge Del Rosario¹; Claudio Quiñones^{1,*}; Heber Robles¹; Juan Vega²; Mario Esparza³

- 1 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II S/N- Ciudad universitaria, Perú
- 2 Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II S/N Ciudad universitaria, Perú
- 3 Universidad Nacional de Moquegua, Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental. Urb. Ciudad Jardín S/N Ilo-Perú

*Autor correspondiente: claudioqc24@gmail.com (C. Quiñones).

ID ORCID de los autores:

F. Calixto:  <https://orcid.org/0000-0002-9702-3844>

J. Del Rosario:  <https://orcid.org/0000-0003-0794-1260>

C. Quiñones:  <https://orcid.org/0000-0002-9703-974X>

H. Robles:  <https://orcid.org/0000-0003-2967-7595>

J. Vega:  <https://orcid.org/0000-0001-8413-8792>

M. Esparza:  <https://orcid.org/0000-0003-3604-6054>

RESUMEN

Los efluentes cianurados de minerías es un problema ambiental, que viene siendo tratado por métodos físicos o químicos, sin embargo, estos procesos no son sostenibles para el medio ambiente. Por ello, una de las alternativas es la aplicación de tratamientos biológicos por microorganismos autóctonos. Se aislaron dos cultivos microbianos tolerantes hasta 800 ppm NaCN del género de *Halomonas sp* denominados JM1 y JM3. Se caracterizaron su fisiología por pruebas bioquímicas, y molecular mediante secuenciación del gen 16S ARNr. Se evaluó su capacidad biodegradativa de 150 ppm de cianuro libre (CN-) de un efluente cianurado por 7 días en medio mínimo de sales 9M de pH 10,67 en condiciones de agitación de 130 rpm a 23 °C. Se encontró que JM1 y JM3 mostraron un porcentaje de biodegradación del CN- de 24,732% ± 1,210 y 33,996% ± 1,335, respectivamente. Esto les convierte buenos candidatos para el tratamiento biológico de residuos contaminados con cianuro como alternativa a las técnicas convencionales en el Perú.

Palabras claves: Biorremediación; cianuro; efluente; *Halomonas*; minería.

ABSTRACT

Cyanide effluent from mining is an environmental problem, which has been treated by physical or chemical methods, however, these processes are not sustainable for the environment. Therefore, one of the alternatives is the application of biological treatments by autochthonous microorganisms. Two microbial cultures tolerant up to 800 ppm NaCN of the genus *Halomonas sp* named JM1 and JM3 were isolated. Their physiology was characterized by biochemical tests, and molecular by 16S rRNA gene sequencing. Its biodegradation capacity of 150 ppm of free cyanide (CN-) from a cyanide effluent for 7 days in a minimum medium of 9M salts of pH 10.67 under stirring conditions of 130 rpm at 23 °C, was evaluated. It was found that JM1 and JM3 showed a percentage of biodegradation of the CN- of 24.732% ± 1.210 and 33.996% ± 1.335 CN-, respectively. This makes them good candidates for the biological treatment of waste contaminated with cyanide as an alternative to conventional techniques in Peru.

Keywords: Bioremediation; cyanide; effluent; *Halomonas*; mining.

Recibido: 17-10-2020.
Aceptado: 02-12-2020.

INTRODUCCIÓN

El cianuro es un compuesto de alta toxicidad, que es utilizado en la industria de la metalurgia para la fabricación del acero, joyas y en la minería para la obtención de oro, a través de lixiviación química, a su vez esto ocasiona grandes impactos en los ecosistemas ambientales, debido a los efluentes de cianuro derramados en ríos, lagunas y suelos; siendo un peligro potencial para el hombre, la flora y fauna (Cardona-Giraldo, 2015). Los principales métodos para eliminar al cianuro son de naturaleza físico-químico como la oxidación química, uso de carbón activado, precipitación por hierro, etc. (Nyamunda, 2017). Alternativamente, se ha probado la capacidad de biodegradar el cianuro elemental e inorgánico por organismos eucariotas y procariotas de distintos taxones, por una variedad de rutas metabólicas como sustitución hidrolítica, oxidación, reducción y transferencia de reacciones (Luque-Almagro *et al.*, 2016).

Se ha logrado usar el tratamiento biológico del cianuro por una variedad de microorganismos como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, hongos filamentosos y nitrificantes, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (Sharma *et al.*, 2019; Park *et al.*, 2017). Así mismo, otros estudios posteriores realizados por

Razanamahandry *et al.* (2016), aplicaron un consorcio bacteriano para remover el 95 % de cianuro en muestras de aguas contaminadas. Al-Badri *et al.* (2020) aislaron *Bacillus subtilis* (BEB1) endofítico, capaz de biodegradar el 53,8 % en un medio con 5 mM de NaCN en 72 h a 28 °C en condiciones de agitación. Así mismo, Ofori-Sarpong *et al.* (2020) aplicaron *Phanerochaete chrysosporium* logrando una degradación del 85 % al poner en contacto 100 mg/L de cianuro con 0,5 g de masa del cultivo a un pH 11,5 por 24 h a 37 °C. Por lo tanto, la búsqueda de microorganismos nuevos con potencial en la biodegradación del cianuro de una diversidad cultivable, es una tema controversial de estudio en la investigación actualmente (Sernaque-Aguilar *et al.*, 2019).

Así mismo, no existen hallazgos sobre miembros del género *Halomonas* degradadores de cianuro encontrados en ambientes contaminados con cianuro en el Perú, siendo por primera vez reportados por Khamar *et al.* (2015) en Irán, denominados BN1 y DNB, aisladas de estanques de relaves mineros. Por lo tanto, la presente investigación radica en la caracterización de dos cepas de *Halomonas* aisladas de efluentes cianurados producto de la actividad minera artesanal de la región de La Libertad – Perú.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo de efluentes cianurados

Se recolectó cuatro litros de efluentes cianurados de las pozas de remediación de una minería artesanal de la localidad de La Libertad, Perú (7°49'43,8"S 78°00'28,5"W) y se midieron in situ el pH y la temperatura. Éstas se almacenaron en un recipiente oscuro y se conservaron a 4 °C para su transporte al laboratorio.

Aislamiento y selección de los microorganismos degradantes de cianuro

Se enriqueció 5 ml de efluentes cianurados en 45 ml de caldo nutritivo: peptona (5,0 g/L); cloruro de sodio (8,0 g/L) y extracto de carne (3,0 g/L) a pH 10 con una solución de NaOH 1 N y se incubó a 30°C por 4 días. De los matraces con crecimiento microbiano, se extrajo 1,5 ml y se sembró por estría en placas de petri con agar glutamato: fosfato mono potásico (0,5 g/L); sulfato de magnesio heptahidratado (1,0 g/L), glicerina (5,0 ml/L), glutamato monosódico (5,0 g/L) y agar 15 g/L a pH 11 por 4 días a 30 °C.

Posteriormente, se realizó un estudio de selección de tolerancia al cianuro a través del método de la microgota en placa (Truhlar *et al.*, 2018). De los cultivos aislados, se inocularon alícuotas en diferentes concentraciones de 200, 400, 600 y 800 ppm de NaCN en medio base 9M (g/L): fosfato disódico (12,8); fosfato monopotásico (3,0); cloruro de sodio (0,5) ; sulfato de magnesio heptahidratado (0,5); cloruro de calcio (0,1); acetato de sodio (2,0), extracto de levadura (2,0) y

sales de agua de mar (10 ml/L), a pH 12 y se incubaron a 30 °C por 72 h (Karamba *et al.*, 2016).

Caracterización morfológica y bioquímica

Se determinó su morfología microscópica a través de tinción de Gram y se realizó pruebas bioquímicas utilizando agar hierro triple azúcar (TSI), agar lisina hierro (LIA), agar motilidad-indol-ortinina (MIO), agar citrato, agar urea, agar almidón y la prueba de catalasa (Bergey, 2009).

Caracterización molecular por análisis de secuenciación del gen 16S ARNr

Los cultivos microbianos se enriquecieron en caldo 9M y se incubaron a 30 °C por 24 h. La amplificación del gen 16S ARNr se realizaron de acuerdo al método de Tang *et al.* (2017), usando cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler Nexus Gradient). Se realizó la extracción del ADN genómico por lisis térmica y los productos del PCR fueron visualizados con SYBR Safe en gel de agarosa mediante un corrido electroforético a 90 V por 40 min a través de un transiluminador de luz UV (Analytik Jena, UVSTAR). Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el banco de datos GenBank mediante la herramienta BLAST (National Centre for Biotechnology Information) y se identificaron las cepas JM1 y JM3 pertenecientes al género *Halomonas* (99% de similitud). Se construyó un árbol filogenético mediante software

MEGA X y las secuencias para el análisis se recuperaron de la base de datos del NCBI.

Ensayo de biodegradación de cianuro

Se prepararon 100 ml del medio 9M a pH 10,5, con una concentración inicial de 150 ppm (CN)⁻ y se esterilizó por filtración a 0,2 μ m. Se inoculó al 12×10^8 UFC/ml del cultivo puro aislado de 24 h de crecimiento. Se incubaron a 23 °C y por 130 rpm a 7 días. Se realizó 5 repeticiones y dos controles.

Determinaciones analíticas

El crecimiento bacteriano se determinó por densidad óptica (DO₆₂₅) a través de un espectrofotómetro (UviLine 9400) y la concentración de cianuro libre por titulación con nitrato de plata (Alonso-González *et al.*, 2017).

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a pruebas de análisis de varianza (ANOVA) usando Microsoft Excel con un nivel de significancia de 0,05 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efluentes cianurados recolectados, presentaron un pH de 12 y 150 ppm de cianuro libre (CN)⁻, valores que coinciden con los reportes de Dash (2009) y condiciones que permiten la proliferación de microorganismos resistentes al cianuro libre (Mekuto *et al.*, 2016). De los efluentes cianurados, presentaron un enriquecimiento positivo en el crecimiento microbiano en caldo nutritivo sin cianuro y a pH 10 en un tiempo que osciló entre 3-4 días, que posteriormente se realizó consecutivamente enriquecimientos para adaptarse a pH 12, debido que el cianuro de sodio es por su naturaleza volátil a pH menor de 10 (Gurbuz *et al.*, 2009). Se aislaron un total de 10 cultivos microbianos resistentes a pH 12, las cuales fueron sometidas a concentraciones entre 200 - 800 ppm de NaCN por el método de la microgota en placa. Se seleccionaron dos cultivos microbianos denominados JM1 y JM3, con una resistencia hasta 800 ppm NaCN (Figura 1). Este reporte difiere a las diversas cantidades de tolerancia del cianuro investigadas, como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* que mostró crecimiento hasta 780 mg/L a pH de 11,5 y *Pseudomonas putida* de hasta 500 ppm de cianuro (Luque-almagro *et al.*, 2005; Moradkhani *et al.*, 2018).

De los cultivos puros JM1 y JM3 se obtuvieron secuencias de nucleótidos del gen 16S ARNr con 1688 y 1712 pares de bases, respectivamente (Figura 2). El análisis filogenético (Figura 3) fue comparado con 11 secuencias del gen 16S ARNr de algunas especies más estrechamente relacionadas del género de *Halomonas* y un grupo externo de control, los resultados indicaron que JM1 exhibe

una similitud de 98 % en la secuencia del gen 16S ARNr con la cepa *Halomonas johnsoniae* T68687^T (AM941399) reportado por Kim (2010) y JM3 del 99 % con la cepa *Halomonas* YT2 (Chen *et al.*, 2017); a su vez, los resultados de las pruebas bioquímicas son descritas en la Tabla 1 que coinciden con las investigaciones de Wang *et al.* (2014) que lograron identificar *Halomonas* sp aislado de suelo de mina; además, JM1 y JM3 presentaron una morfología bacilar y Gram negativa, que son las características típicas del grupo del género *Halomonas*.

Los resultados (Figura 4) de los ensayos de biodegradación del CN⁻ por JM1 y JM3 mostraron una eficiencia de remoción del 24,732% \pm 1,210 y 33,996% \pm 1,335, respectivamente, a una concentración inicial de 150 ppm y tolerantes a pH 10,5 \pm 0,2 por un tiempo de 7 días, a diferencia del control que no tenía inóculo microbiano y en condiciones de incubación similares. Por lo tanto, la biodegradación del CN⁻ se confirma mediante la reducción del cianuro en el medio debido a la acción de los microorganismos, a su vez que JM1 y JM3 mostraron un incremento de biomasa celular de DO₆₂₅ a 0,786 y 0,727, respectivamente. Estos resultados obtenidos difieren con los ensayos de Karamba *et al.* (2016), que obtuvieron el 30 % de degradación de 200 ppm NaCN a 32,5 °C suplementado con 5,5 g/L de glucosa en condiciones de laboratorio. Similarmente, Khamar *et al.* (2015) lograron aislar dos cepas de *Halomonas* BN1 y DNB, que mostraron un 66 % y 50 % de remoción de CN⁻ respectivamente, a pH 9,5, a 25 °C sobre 50 ppm CN⁻ durante cinco días.

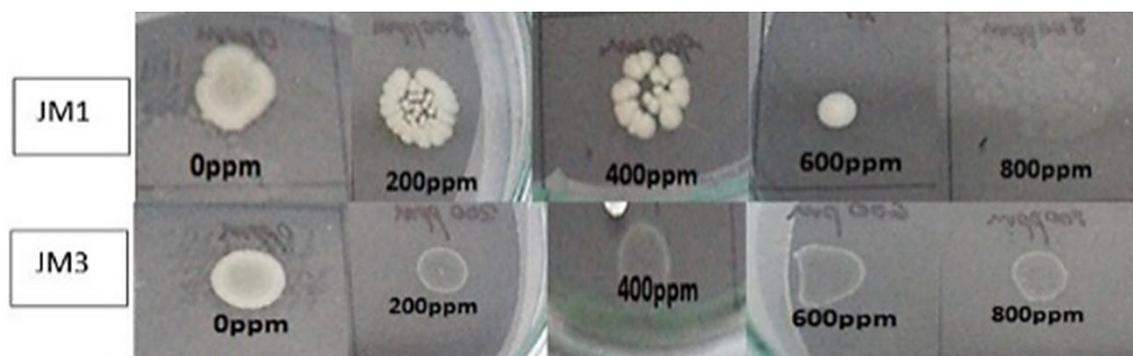


Figura 1. Determinación de la tolerancia del crecimiento de JM1 y JM3 a 30°C por 72 horas después de ser sometido a concentraciones de 200 - 800 ppm NaCN en el medio 9M, por el método de microgota en placa.

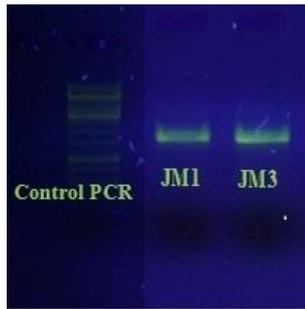


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de los cultivos JM1 y JM3, revelado en cámara de luz UV (ANALYTIK JENA, UVSTAR).

Tabla 1. Características bioquímicas de los cultivos JM1 y JM3.

Tinción de Gram		JM1	JM3
		Negativo	Negativo
TSI	Glucosa	-	-
	Sacarosa	-	-
	Lactosa	-	-
	H ₂ S	-	-
	Gas	-	-
MIO	movilidad	+	+
	Ornitina	+	+
	Indol	-	-
SIM	movilidad	+	+
	H ₂ S	-	-
	Indol	-	-
Citrato		+	+
Urea		-	-
Amilasa		-	-
Catalasa		+	+

Por lo tanto, los resultados obtenidos nos permiten seleccionar a JM1 y JM3 como candidatos degradadores de cianuro, sin embargo, es importante optimizar la capacidad biodegradativa frente otras condiciones físicas o químicas, para mejorar su rendimiento en la biorremediación de efluentes cianurados.

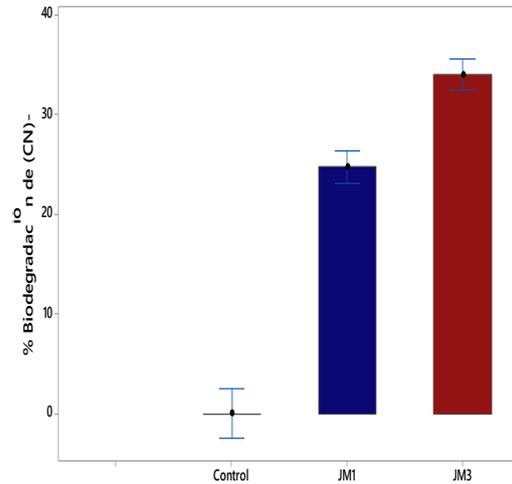


Figura 4. Biodegradación del CN- por *Halomonas* JM1 al 24,732% ± 1,210 y JM3 al 33,996% ± 1,335, a 23 °C con pH 10,5 ± 0,2, en agitación a 130 rpm y a una concentración inicial de 150 ppm CN- por 7 días, con una diferencia significativa de p < 0,05.

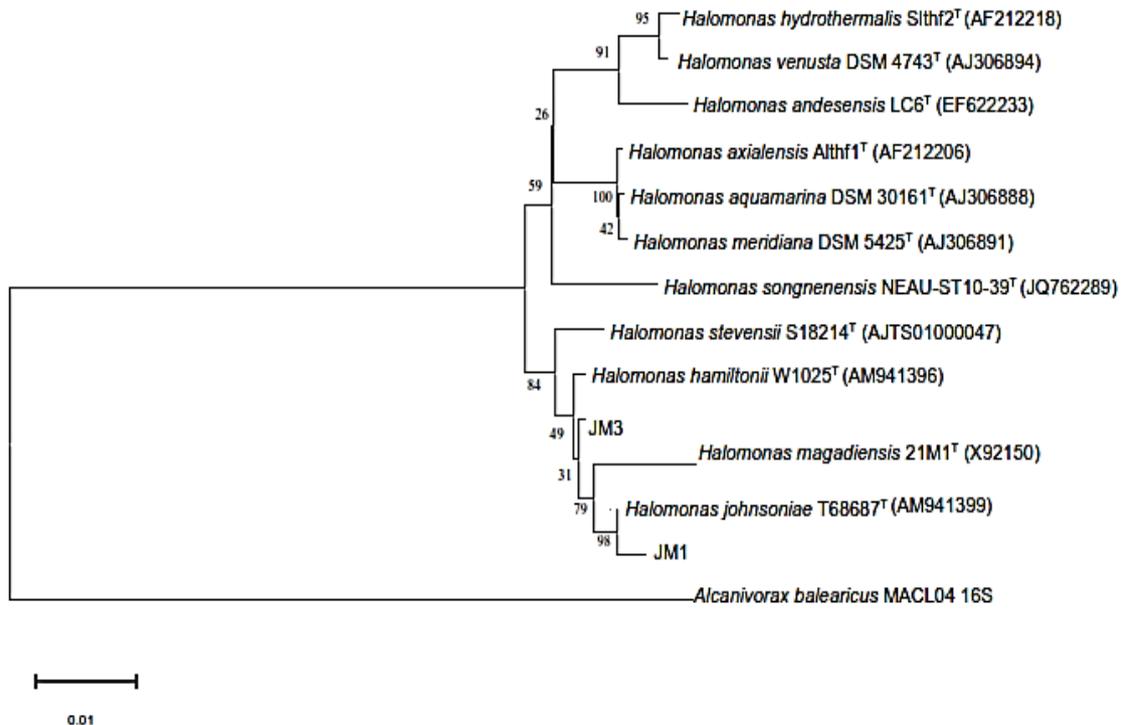


Figura 3. Árbol filogenético de las secuencias parciales del gen 16S ARNr obtenidas a partir de las bacterias aisladas de efluentes cianurados. *Alcanivorax balearicus* MACL04 16S fue usada como grupo externo.

CONCLUSIONES

Se aislaron dos nuevas cepas JM1 y JM3, a partir de efluentes cianurados de una minería artesanal, identificadas como *Halomonas spp.* y mostraron una eficiencia de remoción del 24,732 % y 33,996 % respectivamente, a 23°C en 130 rpm durante 7 días. JM1 y JM3 presentaron una tolerancia hasta

800 ppm de cianuro. Por lo tanto, las cepas JM1 y JM3 por su capacidad de biodegradativa y tolerancia al cianuro, amplía las oportunidades de su aplicación en biorremediación de entornos contaminados con cianuro en el Perú.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la dirección de la Universidad Nacional de Trujillo por facilitar la gestión y ejecución del desarrollo de esta investigación. Proyecto financiado con recursos de CANON

minero PIC8-2013, cód. 180313208 (RCU N°402-2013-/UNT), Proyecto Consorcios microbianos nativos para la biooxidación de minerales auríferos y tratamiento de efluentes cianurados La Libertad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Badri, B.; Al-Maawali, S.; Al-Balushi, Z.; Al-Mahmooli, I.; Al-Sadi, A.; Velazhahan, R. 2020. Cyanide degradation and antagonistic potential of endophytic *Bacillus subtilis* strain BEB1 from *Bougainvillea spectabilis* Willd. *All Life* 13(1): 92–98.
- Alonso-González, O.; Jiménez-Velasco, C.; Nava-Alonso, F.; Alvarado-Hernández, F.; González-Anaya, J. 2017. Free cyanide analysis by silver nitrate titration with sulfide ion as interference. *Minerals Engineering* 105: 19–21.
- Bergey, D. 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria* 1: 1771-1780.
- Cardona-Giraldo, E.A. 2015. *Microorganismos Potenciales degradadores de Cianuro en residuos de minería de oro. Tesis de Magister, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Colombia. 86 pp.*
- Chen, L.; Zhu, X.; Zhang, M.; Wang, Y.; Lv, T.; Zhang, S.; Yu, X. 2017. Profiling total viable bacteria in a hemodialysis water treatment system. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(5): 995–1004.
- 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.
- Gurbuz, F.; Ciftci, H.; Akcil, A. 2009. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Hazardous Materials* 162(1): 74–79.
- Karamba, K.I.; Ahmad, S.A.; Zulkharnain, A.; Syed, M.A.; Khalil, K.A.; Shamaan, N.A.; Dahalam, F.; Shukor, M.Y. 2016. Optimisation of biodegradation conditions for cyanide removal by *Serratia marcescens* strain AQ07 using one-factor-at-a-time technique and response surface methodology. *Rendiconti Lincei* 27(3): 533–545.
- Khamar, Z.; Makhdoumi-Kakhki, A.; Mahmudy, 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.
- Kim, K.K.; Lee, K.C.; Oh, H.M.; Lee, J.S. 2010. *Halomonas stevensii* sp. nov., *halomonas hamiltonii* sp. nov. and *halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(2): 369–377.
- Luque-almagro, M.; Marti, M.; Moreno-Vivia, C.; Rolda, M.D.; Jesu, L.; Castillo, F.; Blasco, R. 2005. Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2): 940–947.
- 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.
- Mekuto, L.; Ntwampe, S.K.; Akcil, A. 2016. An integrated biological approach for treatment of cyanidation wastewater. *Science of the Total Environment* 571: 711–720.
- 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.
- Nyamunda, B.C. 2017. Review of the Impact on Water Quality and Treatment Options of Cyanide Used in Gold Ore Processing. En: Hlanganani, T. (Comp.). *Water Quality. Intechopen. South Africa. Pp. 225- 244.*
- Ofori-Sarpong, G.; Adam, A.; Amankwah, R. 2020. Detoxification of Cyanide Wastewater by Cyanotrophic Organisms: the case of *Phanerochaete chrysosporium*. *Ghana Mining Journal* 20(1): 34–44.
- Park, J.M.; Trevor Sewell, B.; Benedik, M.J. 2017. Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(8): 3029–3042.
- 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.
- Sernaque-Aguilar, Y. A.; Cornejo-La Torre, M.; Regard, J. P.; Mialhe Matonnier, E. L. 2019. Caracterización molecular de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de pozas de lixiviación con cianuro. *Revista Peruana de Biología* 26(2): 275–282.
- Sharma, M.; Akhter, Y.; Chatterjee, S. 2019. A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(5): 1–14.
- Tang, X.; Zhai, L.; Lin, Y.; Yao, S.; Wang, L.; Ge, Y.; Liu, Y.; Zhang, X.; Zhang, T.; Zhang, L.; Liu, J.; Cheng, C. 2017. *Halomonas alkalicola* sp. nov., isolated from a household product plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67(5): 1546–1550.
- Truhlar, A.M.; Denes, T.G.; Cantilina, K.K.; Leung, S.K.; Todd Walter, M.; Hay, A.G. 2018. Absence of genetic selection in a pathogenic *Escherichia coli* strain exposed to the manure-amended soil environment. *PLoS ONE* 13(12): 1–14.
- Wang, Y.X.; Xiao, W.; Dong, M.H.; Zhao, Q.; Li, Z.Y.; Lai, Y.H.; Cui, X.L. 2014. *Halomonas qiaohouensis* sp. nov., isolated from salt mine soil in southwest China. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 106(2): 253–260.