

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología-Microbiología

**Aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de una cepa  
bacteriana degradadora de cianuro de la Planta de Tratamiento  
de Aguas Residuales de Magollo, Tacna - Perú**

TESIS

Presentada por:

Jesús Miguel Calisaya Calderón

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL-JORGE BASADRE GROHMANN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA**

**Acta de sustentación de tesis N° 290**

En la ciudad de Tacna, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, siendo las 10:00 horas del día 11 de enero del 2017, estando presente el jurado calificador designado por Resolución de Facultad N° 8708-2017 FACI-UNJBG, conformado por los siguientes docentes:

Blgo. VICTOR HUGO CARBAJAL ZEGARRA

Dra. ROSA CAFFO MARRUFFO

Dr. CÉSAR CÁCEDA QUIROZ

Acto seguido se dio lectura a la Resolución Correspondiente y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias. A continuación el Presidente del Jurado invitó al Bachiller JESÚS MIGUEL CALISAYA CALDERÓN a exponer la tesis titulada: Aislamiento y caracterización molecular del ARN 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna – Perú.

Siendo las 11:00 horas, el tesista concluyó su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso, se invitó a los miembros del jurado calificador emitan su calificación de acuerdo al reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado: Aprobado por UNANIMIDAD, con el calificativo de 14 (CATORCE) de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 11:35 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los señores miembros del Jurado Calificador, en señal de conformidad.

  
Blgo. VICTOR HUGO CARBAJAL ZEGARRA  
(PRESIDENTE)

  
Dra. ROSA CAFFO MARRUFFO  
(MIEMBRO)

  
Dr. CÉSAR CÁCEDA QUIROZ  
(SECRETARIO)

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida, protegerme durante todo mi camino y darme voluntad para superar los obstáculos a lo largo de mi vida, por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Melitón y Dominga que con su apoyo y consejos me han enseñado a no rendirme ante nada y siempre tener una actitud perseverante. A mis hermanos Gilberto y Fredy por su apoyo incondicional y por la confianza que tienen en mi persona.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme voluntad de espíritu de no rendirme a pesar de todos los problemas que se me presentaron en el camino. Por darme el más grande de todos los pilares, mi familia.

A mi casa de estudios, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann por formarme como profesional.

A todos los profesores que compartieron sus conocimientos y formaron parte de este desarrollo.

A los laboratorios de Microbiología, Química Analítica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann por permitir ampliar mis conocimientos en estas áreas, por todo el apoyo obtenido que he recibido y especialmente al personal técnico que labora en los laboratorios mencionados.

## CONTENIDO

Abreviaturas	
Glosario de términos	
Resumen	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Hipótesis.....	4
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general.....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Marco teórico.....	6
1.5.1. El cianuro.....	6
1.5.1.1. Cianuro y la salud.....	7
1.5.1.2. El cianuro en el medio ambiente.....	9
1.5.1.3. Biorremediación.....	12
1.5.2. El gen ARNr 16S.....	21
1.5.2.1. Identificación bacteriana usando del gen ARNr 16S.....	21
1.5.2.2. Aproximaciones moleculares.....	23
1.5.2.3. Análisis bioinformático.....	24
1.5.2.4. Herramientas bioinformáticas, softwares.....	25
a. Herramienta, CLC Main Workbench.....	25
b. Herramienta, MEGA 6,06 (Análisis genético evolutivo molecular).....	26

II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.1 Ubicación y delimitación del área de estudio.....	27
2.2 Población y muestra.....	27
2.3 Lugar de experimentación.....	29
2.4 Diseño de la investigación.....	29
2.5 Metodología.....	30
2.5.1 Colección de las muestras.....	30
2.5.2 Adaptabilidad y aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	31
2.5.3 Caracterización de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	33
2.5.4 Actividad cuantitativa de la remoción de cianuro en condiciones específicas establecidas.....	34
a. Cultivo.....	34
b. Determinación química de la capacidad degradadora de cianuro.....	34
2.5.5 Procesamiento y envío de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	37
2.5.6 Identificación bioinformática del ARNr 16S de una cepa bacteriana.....	38
2.5.7 Caracterización filogenética del ARNr 16S de una cepa bacteriana.....	39
III. RESULTADOS.....	41
3.1 Adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro.....	41
3.2 Aislamiento y caracterización de una cepa bacteriana	43

degradador de cianuro.....	
3.3 Actividad cuantitativa de la remoción de cianuro.....	46
3.3.1 Determinación de la curva patrón de cianuro libre.....	46
3.3.2 Determinación de la actividad de remoción de cianuro.....	48
3.4 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S.....	51
3.4.1 Identificación molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	51
3.4.2 Análisis filogenético del ARNr 16S de la cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	54
IV. DISCUSIÓN.....	56
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
VIII. ANEXOS.....	67

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Constituyentes del cianuro total.....	7
<b>Cuadro 2</b>	Concentración de cianuro presentes en plantas de manera natural.....	9
<b>Cuadro 3</b>	Organismos cianogénicos.....	10
<b>Cuadro 4</b>	Degradación de compuestos cianurados, especies responsables y la reacción que se lleva a cabo.....	20
<b>Cuadro 5</b>	Ubicación y características fisicoquímicas de los puntos de muestreo.....	28
<b>Cuadro 6</b>	Variables de estudio.....	30
<b>Cuadro 7</b>	Elementos constituyentes para la determinación de cianuro libre, utilizando el método del ácido pícrico.....	35
<b>Cuadro 8</b>	Procesamiento de las muestras para la determinación de la capacidad degradadora de cianuro libre.....	36
<b>Cuadro 9</b>	Designación de secuencias del ARNr 16S para el análisis filogenético.....	40
<b>Cuadro 10</b>	Proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro libre.....	41
<b>Cuadro 11</b>	Proceso de adaptabilidad de un subcultivo de bacterias degradadoras de cianuro libre.....	42
<b>Cuadro 12</b>	Datos analizados de la curva patrón para la determinación de cianuro libre, utilizando el método del ácido pícrico.....	47

<b>Cuadro 13</b>	Datos analizados de la remoción de cianuro por la cepa bacteriana JCC16.....	49
<b>Cuadro 14</b>	Datos analizados del recuento de células bacterianas y la cantidad de cianuro libre presente en ppm.....	50
<b>Cuadro 15</b>	Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del NCBI .....	51
<b>Cuadro 16</b>	Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del EBI - EMBL (Europe Bioinformatic Institute of Europe Molecular Biology Laboratory).....	52
<b>Cuadro 17</b>	Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del DDBJ (DNA Data Bank of Japan)	52
<b>Cuadro 18</b>	Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en SeqMatch del RDB (Ribosomal Database Project).....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Características culturales: colonias cianuro positivo, formas circulares ovaladas, bordes uniformes, color transparente, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 3 días.....	44
<b>Figura 2</b>	Características culturales del cultivo puro: colonias cianuro positivo forma circulares ovaladas, bordes uniformes, color transparentes, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 3 días.....	44
<b>Figura 3</b>	Análisis microscópico de luz visible del cultivo puro: bacterias Gram negativas, formas cocobacilares bien definido, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 2 días.....	45
<b>Figura 4</b>	Análisis microscópico de luz visible del cultivo puro: bacterias Gram negativas, formas bacilares, cultivado en medio agar nutritivo al 2,4 %, temperatura ambiente por 1 día.....	45
<b>Figura 5</b>	Método de espectrofotometría de luz visible 520 nm, un nivel de correlación entre la concentración de cianuro y la absorbancia de 0,974, siendo muy bueno, utilizando el método del ácido pícrico .....	46

<b>Figura 6</b>	El efecto de la remoción de cianuro libre ( $\text{CN}^-_{\text{Libre}}$ ) por la cepa bacteriana. El experimento fue repetido dos veces y evaluado por 4 días a pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente.....	48
<b>Figura 7</b>	Conteo de las células bacterianas a partir de una biomasa determinada. El experimento fue repetido dos veces y evaluado por 4 días a pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente.....	50
<b>Figura 8</b>	Árbol filogenético de la cepa bacteriana JCC16, se utilizaron 16 secuencias de ARNr 16S. El árbol filogenético fue construido usando el método Neighbour-joining, paquete Mega 6.06 (Tamura et al. 2011). El número en cada ramificación indica un porcentaje por encima del 50 % dando fiabilidad en la reconstrucción del árbol utilizando un valor de bootstrap de 1000 replicaciones.....	55

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	Ubicación geográfica de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.....	67
<b>Anexo 2</b>	Características culturales de la cepa bacteriana degradadora de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.....	68
<b>Anexo 3</b>	Medio de cultivo líquido buffer cianurado específico (MLBC).....	68
<b>Anexo 4</b>	Proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro.....	69
<b>Anexo 5</b>	Flujogramas del proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro.....	70
<b>Anexo 6</b>	Recuento en cámara de Neubauer, el recuento se hará en 25 cuadrados o 5 (la de los extremos y la central), y con las fórmula correspondiente.....	71
<b>Anexo 7</b>	Aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	71
<b>Anexo 8</b>	Flujograma del proceso de aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.....	72
<b>Anexo 9</b>	Curva patrón para la determinación de cianuro libre utilizando el método del ácido pícrico .....	73
<b>Anexo 10</b>	Evaluación de la remoción de cianuro utilizando el método del ácido pícrico.....	74
<b>Anexo 11</b>	Evaluación microscópica e incubación de las muestras....	74

<b>Anexo 12</b>	Flujograma del proceso para la determinación de la capacidad degradadora de cianuro por una cepa bacteriana.....	75
<b>Anexo 13</b>	Flujograma del procesamiento para el envío de la muestra y la posterior caracterización del ARNr 16S de una cepa bacteriana.....	76
<b>Anexo 14</b>	Secuencia del gen ARNr 16S, 907R.....	77
<b>Anexo 15</b>	Secuencia del gen ARNr 16S, 785F.....	78
<b>Anexo 16</b>	Reporte de análisis del gen ARNr 16S, 907R por Macrogen, Korea del Sur.....	79
<b>Anexo 17</b>	Reporte de análisis del gen ARNr 16S, 785F por Macrogen, Korea del Sur.....	80

## ABREVIATURAS

ARNr	:	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	:	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	:	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
$C_6H_3N_3O_7$	:	Ácido pícrico
°C	:	Grado centígrado
DDBJ	:	DNA Data Bank of Japan
D.O.	:	Densidad óptica
EBI - EMBL	:	Europe Bioinformatic Institute of Europe Molecular Biology Laboratory
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
g	:	Gramo
h	:	Hora
KCN	:	Cianuro de potasio.
L	:	Litro
mg	:	Miligramo
mM	:	Milimolar
m	:	Metro
MEGA	:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mm	:	Milímetro
ml	:	Mililitro
msnm	:	Metros sobre el nivel del mar
MLBC	:	Medio líquido buffer cianurado
MSBC	:	Medio sólido buffer cianurado

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	:	Carbonato de sodio anhidro
$\text{NaCl}$	:	Cloruro de sodio
$\text{NaOH}$	:	Hidróxido de sodio
$\text{Pb}$	:	Pares de bases
Ppm	:	Partes por millón
pH	:	Potencial de hidrógeno
p/v	:	Peso por volumen
RBD	:	Ribosomal Database Project
SSU	:	Small subunit
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	:	Sulfato de Níquel
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	:	Tetraborato de sodio anhidro
U	:	Unidades

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

1. **Ácido ribonucleico (ARN).**- Un ácido nucleico de una sola cadena, compuesto de adenina, guanina, citosina, uracilo, ribosa y fosfato.
2. **Ácido ribonucleico ribosomal (ARNr).**- Un ácido ribonucleico que participa en la formación de los ribosomas.
3. **Biomasa.**- Cantidad de materia producida o existente en un ser vivo y que se encuentra en forma de proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos orgánicos.
4. **E – value.**- Representa el número de hits con el mismo o similar puntuación que se puede esperar de encontrar al azar.
5. **Hit.**- Secuencia de nucleótidos de ADN, ARN o proteínas, previamente caracterizada, presente en una determinada base de datos de un programa informático.
6. **Match.**- Homología de la secuencia problema de nucleótidos (query) con la secuencia previamente caracterizada en la base de datos (hit), siendo los nucleótidos que coinciden en el alineamiento.
7. **Query.**- Secuencia problema de nucleótidos de ADN, ARN y proteínas, la cual va a ser alineada con otras secuencias en una base de datos determinada, como por ejemplo BLAST.

## RESUMEN

El objetivo del trabajo fue aislar y caracterizar molecularmente el ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro de muestras de sedimento que provinieron de residuos líquidos domésticos, municipales e industriales de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

Se hizo una etapa de adaptabilidad de las comunidades microbianas presentes a pH 9,5 y 10 con concentraciones del ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) de 400 ppm y 500 ppm en un medio líquido buffer cianurado (MLBC) a temperatura ambiente, teniendo al tercer día un recuento celular de  $1 \times 10^8$  cel.  $\text{ml}^{-1}$ .

El cultivo bacteriano adaptado a condiciones de pH 10 con concentración del ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) de 500 ppm, se sigue con la etapa de aislamiento y caracterización en un medio sólido buffer cianurado (MSBC) a temperatura ambiente por 2 días, teniendo como resultado un cocobacilo Gram negativo.

Se evaluó la capacidad degradadora del ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) por la cepa bacteriana, el resultado fue una remoción de cianuro de  $3,04 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$  a pH 10 con concentración del ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) de 500 ppm en un medio líquido buffer cianurado (MLBC) a temperatura ambiente y evaluado por 4 días.

La cepa seleccionada y asignado como JCC16, posterior al secuenciamiento y resecuenciamiento del ARNr 16S con partidores universales del Dominio Bacteria: 785F y 907R por la Empresa Macrogen, Korea se sometió a la etapa de caracterización bioinformática presentando un nivel de identidad del 99,6 % con el gen ARNr 16S de la especie *Klebsiella* sp. ALL-1.

## I. INTRODUCCIÓN

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 utilizado 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, inactivando el sistema respiratorio (Chena y Liu, 1999),

La protección del medio ambiente y cuerpos de agua, 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 son principalmente tratados por métodos de 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 comparado con otras técnicas. En investigaciones encontradas demuestran que algunos organismos resisten y pueden permanecer activos incluso en concentraciones arriba de 1 mM de cianuro. (Chena y Liu., 1999)

Varios mecanismos para la eliminación del cianuro del medio ambiente son objetos de investigación, entre ellos el uso de microorganismos, muchos estudios demuestran la susceptibilidad del cianuro para ser metabolizado por mecanismos biológicos con el fin de satisfacer los criterios ambientales de descarga (Watanabe *et al.*, 1998).

En estudios anteriores el cianuro fue biológicamente tratado por los géneros bacterianos: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y fijado dentro de sistemas aeróbicos y anaeróbicos, siendo el sistema aeróbico más favorable que el sistema anaeróbico (Watanabe *et al.*, 1998). El valor ambiental se genera utilizando esta alternativa biológica, logrando así mejorar y proteger el medio ambiente.

En el presente trabajo se aisló con técnicas microbiológicas y se caracterizó molecularmente el gen ARNr 16S con herramientas bioinformáticas de una cepa bacteriana degradadora de cianuro, por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

## 1.1 Planteamiento del problema

En la región de Tacna no existe publicaciones científicas que informen sobre el aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de bacterias degradadoras de cianuro por encima de las condiciones naturales de plantas de tratamiento de aguas residuales. En Tacna no hay reportes de cepas aisladas e identificadas de ambientes alcalinos que presentan capacidad de remoción de cianuro, adicionalmente hay poco desarrollo en biotecnológica (biorremediación), mediante el uso de microorganismos con capacidad de biodegradar el cianuro en ambientes contaminados y también no cuenta con cepas microbianas o modelos microbianos que puedan ser aplicados por las Universidades o para ser usadas por las empresas o industrias.

Generar información básica sobre los microorganismos del cianuro y el cual es de importancia para posteriores investigaciones, entonces se plantea la siguiente interrogante: **¿Existe una cepa bacteriana con capacidad degradadora de cianuro y qué características presenta el ARNr 16S, evaluado por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna?**

## **1.2 Hipótesis**

De acuerdo al problema planteado, se presenta a continuación la siguiente hipótesis:

Existe una cepa bacteriana y que presenta un ARNr 16S de 1500 pb del género *Klebsiella* de la familia taxonómica *enterobacteriaceae*, con capacidad degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

## **1.3 Justificación**

La región de Tacna constituye uno de los ambientes que requiere enormes esfuerzos y recursos para poder estudiar, investigar y desarrollar tecnología. En virtud a ello el proyecto se enmarca en la línea de investigación de biotecnología, puesto que se pretende aislar y caracterizar molecularmente el ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo.

En las PTAR habitan comunidades microbianas que viven en ambientes extremos y presentan gran versatilidad de adaptarse a diferentes ambientes las cuales servirán para ser aplicados en la biotecnología (biorremediación), mediante el uso de bacterias con capacidad de biodegradar ambientes específicos contaminados con

cianuro. Por estas razones el objetivo de este trabajo es aislar y caracterizar molecularmente el ARNr 16S de una cepa bacteriana con capacidad degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro.

Logrando así aislar y caracterizar el ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro, la cual servirá para enmarcar emprendimiento e interacciones multisectoriales entre la Universidad-Empresa-Sociedad permitiendo llegar el intercambio y transferencia de conocimiento.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

- Aislar y caracterizar molecularmente el ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentraciones de cianuro en la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Aislar microbiológicamente una cepa bacteriana degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro.

- Determinar la capacidad degradadora de cianuro de una cepa bacteriana por encima de las condiciones naturales establecidas de pH y concentración de cianuro.
- Caracterizar por técnicas moleculares y bioinformáticas la secuencia del gen ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.

## 1.5 Marco teórico

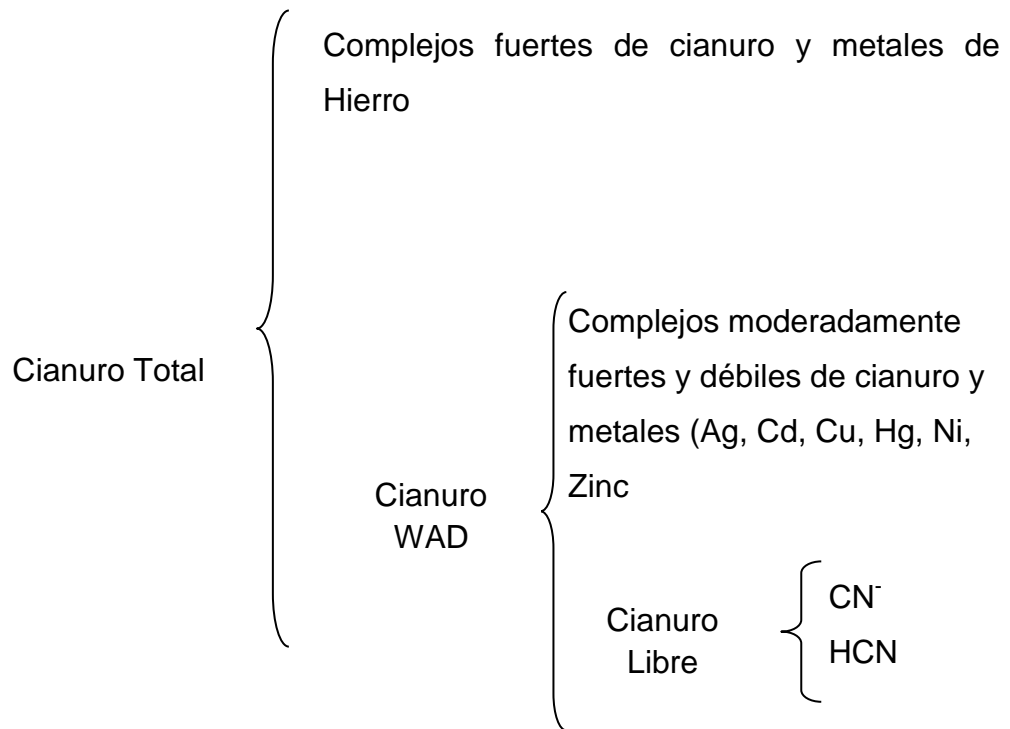
### 1.5.1. El cianuro

El cianuro encierra los elementos carbono-nitrógeno que están presentes en compuestos cianurados que se puedan determinar, como el ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ). El cianuro se caracteriza por la presencia de un átomo de carbono enlazado a un átomo de nitrógeno mediante un enlace triple ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ). El cianuro total se clasifica en cianuros simples y complejos (Cuadro 1). (Smit y Mudder, 1991)

En el caso de compuestos orgánicos que contienen este grupo se les denomina nitrilos. El carbono y el nitrógeno son los dos elementos que forman el cianuro y se encuentran omnipresentes en nuestro entorno, juntos forman casi el 80 % del aire que respiramos y ambos están presentes en las moléculas

orgánicas que son la base de todas las formas de vida.  
(Guerrero, 2005)

**Cuadro 1.** Constituyentes del cianuro total



Fuente. Smit y Mudder, 1991

**1.5.2.1. El cianuro y la salud**

Existe una justificable preocupación por el uso del cianuro en ambientes industriales ya que el cianuro es

considerado una sustancia tóxica. El cianuro es un veneno de acción rápida capaz de matar a una persona en cuestión de minutos si está expuesta a una dosis suficientemente elevada. (Logsdon *et al.*, 2001)

Actualmente hay muchas fuentes diarias de exposición al cianuro (escapes de los automóviles, humo de tabaco, incendios, etc.), el cianuro no se acumula en el cuerpo porque este lo transforma en un compuesto menos tóxico llamado tiocianato, que luego se excreta. (Logsdon *et al.*, 2001)

La Conferencia Norteamericana de Higienistas Industriales Gubernamentales establece el límite umbral tope de cianuro de hidrógeno (HCN) en el aire en 4,7 ppm. La muerte ocurre en pocos minutos con concentraciones por encima de los 250 ppm de HCN en el aire. (Docente H., 2001)

La toxicidad de una sustancia está expresada como la concentración o dosis que resulta letal para el 50 % de los individuos expuestos. (LC<sub>50</sub> o LD<sub>50</sub>). La concentración letal de cianuro de hidrógeno gaseoso (LC<sub>50</sub>) es de 100-300 partes por millón. (Logsdon *et al.*, 2001)

### 1.5.1.2. El cianuro en el medio ambiente

Existen ciertas bacterias, algas y hongos que producen cianuro en forma natural y también muchas especies vegetales, como los granos (*Coffea arabica*, *Cicer arietinum*), las frutas (*Pyrus malus*, *Prunus avium*, *Pyrus communis*, *Prunus armeniaca*, *Prunus persica* y *Prunus domestica*), las almendras y nueces decajú y las raíces (*Manihot esculenta*, *Solanum tuberosum* y *Raphanus sativus*). (Logsdon et al., 2001)

**Cuadro 2.** Concentración de cianuro presente en plantas de manera natural.

Concentración de cianuro en plantas	
Especies de plantas	Concentración (mg/kg)
<i>Manihot esculenta</i> (variedades dulces)	
Hojas	377 – 500
Raíces	138
Raíces desecadas	46 < 100
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2100
<i>Prunus amygdalus var.amara</i>	280 – 2500
<i>Sorghum bicolor</i>	Max. 2500

Fuente. Luque, 2005

En el reino animal de algunos centípedos, milípedos e insectos (coleópteros, heterópteros, lepidópteros) son capaces de producir cianuro. (Nahrstedt, 1988)

**Cuadro 3.** Organismos cianogénicos.

Bacterias	<i>Chormobacterium violaceum</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas chloraphilis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Algas	<i>Chlorella vulgaris</i>
	<i>Nostoc muscorum</i>
	<i>Anacystis nidulans</i>
Hongos	<i>Marasmius oreades</i>
	<i>Stemphyllium loti</i>
	<i>Gloeocercospora sorghii</i>
Plantas	<i>Prunus amygdalus var.amara</i>
	<i>Pyrus malus</i>
	<i>Pyrus communis</i>
	<i>Prunus avium</i>
	<i>Prunus domestica</i>
	<i>Prunus pérsica</i>

Fuente. Eisler, 1991.

## **Organismos y animales marinos**

Los peces y los invertebrados marinos son especialmente sensibles a la exposición al cianuro. Las concentraciones de cianuro libre en el ambiente marino oscilan entre 5 a 7,2 microgramos por litro. El cianuro es mortal para una gran cantidad de especies en concentraciones que superen los 200 microgramos por litro.

Las algas y las macrófitas son capaces de tolerar concentraciones de cianuro aún más altas que las que toleran los peces y los invertebrados y no demuestran efectos adversos a 160 microgramos por litro o más. La sensibilidad de los organismos marinos al cianuro es específica de cada especie y se ve afectada por el pH, temperatura y los niveles de oxígeno del agua, así como también por la etapa de vida y la condición del organismo.

## **Mamíferos**

Los efectos tóxicos del cianuro en los mamíferos son relativamente comunes debido a la vasta cantidad de plantas de forraje que contienen cianuro como: el sorgo, la hierba del Sudán y el maíz. Las zonas áridas y el aumento en el uso de estas plantas como forraje

favorecen la acumulación de glucósidos cianogénicos en ciertos vegetales. (Logsdon y col., 2001)

El valor LD<sub>50</sub> para los mamíferos oscila entre 2,1 miligramos por kilogramo de peso y 6-10 miligramos por kilogramo de peso (ratones blancos de laboratorio). Entre los diez primeros minutos luego de la ingestión se comienzan a detectar los síntomas de envenenamiento: Excitación acompañada por temblores musculares, salivación, etc. (Logsdon y col., 2001)

### **1.5.1.3. Biorremediación**

La biorremediación puede definirse como el uso de organismos vivos, componentes celulares o enzimas libres con el fin de realizar una mineralización, transformación parcial o humificación de residuos o agentes contaminantes.

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar y transformar los contaminantes para retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, agua y aire para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. La biorremediación puede ser empleada para

atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo en la biodegradación de compuestos organoclorados o de hidrocarburos. Los métodos de biodegradación de cianuro es mucho mejor a los métodos físicos y químicos, siendo también más cómodo y rápido. (Adjei M., Ohta Y., 2000) (Naveen D., 2011)

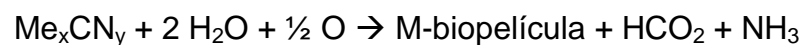
Entre los microorganismos se conoce la capacidad degradadora de muchos hongos (*Fusarium*, *Hasenula*, etc.) y bacterias (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter*, *Bacillus subtilis*, *Chromobacterium vialaceum* y especies de *Pseudomonas* entre otros) quienes asimilan cianuro y lo usan como fuente de nitrógeno y/o carbono, teniendo como intermediario al amoniaco (Dumestre, 1997)

Son diversos los mecanismos para romper la molécula de cianuro, uno de los mecanismos involucra a la enzima cianuro hidratasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en formamida, que finalmente es transformada en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> y el segundo mecanismo involucra a la cianoalanina sintetasa, que resulta en la conversión irreversible del cianuro en cianoalanina o en un aminonitrilo, seguida de la hidrólisis de los productos para liberar un ácido y NH<sub>3</sub>. (Guerrero, 2005)

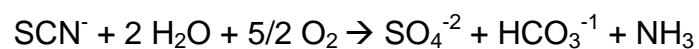
Una tercera ruta involucra la utilización de cianuro monoxigenasa para catalizar la conversión de HCN en cianato (HOCN), lo que lleva a una descomposición catalítica mediada por otra enzima, cianasa para producir el CO y el NH<sub>3</sub>. La cianasa es inducible con el cianato mientras que la enzima cianuro monoxigenasa no lo es. Algunas cepas bacterianas transforman directamente cianuro en CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> por medio de la cianurodioxigenasa, sin la formación de cianato como intermediario. (Carroll J., 1990)

Los tratamientos biológicos se han convertido en una alternativa interesante para la industria minera y ambientes contaminados de cianuro debido principalmente al éxito obtenido por Homestake Mining en su planta de Lead, South Dakota, Estados Unidos. En esta planta, un proceso aeróbico es empleado para remover cianuro, tiocianato, cianato, amonio y metales provenientes de soluciones cianuradas. (Guerrero, 2005)

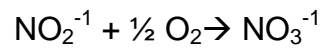
**Primera etapa:**



(Me: Fe, Cu, Zn)



### **Segunda etapa:**



Los microorganismos involucrados en el tratamiento biológico de cianuro y tiocianato incluyen una mezcla heterogénea de bacterias indígenas del suelo que se han adaptado a vivir en ambientes de cianuro luego de una constante y continúa exposición (Cuadro 4). Aunque el cianuro es fácilmente degradado por las bacterias aeróbicas, lo mismo no ocurre con el tiocianato que no puede ser removido fácilmente mediante procesos anaeróbicos (en ausencia de oxígeno). En suma, el tratamiento biológico anaeróbico es un proceso más lento y más susceptible a la presencia de productos tóxicos resultantes de la exposición de otros constituyentes en el efluente. (Guerrero, 2005)

Como en todo sistema biológico, los factores ambientales más críticos para una buena eficacia del tratamiento biológico incluyen: El pH, temperatura, niveles de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes. (Guerrero, 2005)

## Microorganismos en la biodegradación de cianuro

El tratamiento biológico se basa en la adaptación y el mejoramiento de los microorganismos indígenas tales como las bacterias, pero la mayoría de las veces las condiciones ambientales principalmente la composición química deberán ser previamente modificados (Logsdon y col., 2001). El tratamiento biológico de cianuro es un fenómeno relativamente nuevo en la industria minera (Logsdon y col., 2001). Las especies bacterias *Klebsiella* sp., *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT534, bajo condiciones alcalinas consumen el cianuro y lo transforman en amoníaco o productos finales no tóxicos. (Luque V., 2005), (Igeño, M., 2007)

El cianuro es un compuesto altamente tóxico y actualmente son descargados aproximadamente entre 40 ppm a 100 ppm de cianuro en suelos, aguas y aire procedentes de diferentes actividades industriales (Gonzales, 2004) y también se encuentra en la naturaleza en gran variedad de formas. La gran diversidad y compleja naturaleza de los diferentes compuestos cianurados se puede explicar en función de las características químicas del grupo ciano ( $-C\equiv N$ ). (Luque, 2005), (Akcil, A., 2003)

Existen diferentes métodos químicos, físicos y biológicos para la degradación de cianuro a compuestos menos tóxicos. En el caso de la degradación biológica se han descrito tres tipos de reacciones enzimáticas para el metabolismo del cianuro por parte de los microorganismos. (Huertas, 2010)

a. **Substitución/transferencia:**

- Rhodanasa, descrita para *Thiobacillus denitrificans*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*.
- Ciancalina sintasa, descrita para *Bacillus megaterium*;

b. **Hidrolíticas:**

- Nitrilo hidratasa, descrita para *Klebsiella* sp. *Corynebacterium* y *Brevibacterium*.
- Nitrilasa, descrita para *Pseudomonas aeruginosa*.

c. **Oxidativa:**

- Cianuro monooxigenasa, descrito para *Klebsiella* sp.

**Géneros *Klebsiella* y *Pseudomonas***

El género *Klebsiella* son bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasas positivas y aeróbios estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones.

El género *Klebsiella* son los microorganismos más comúnmente reportados como degradadores de cianuro pues lo pueden convertir a amoníaco y fumarato bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Usualmente crecen en el suelo o en superficies de aguas. Por ejemplo *Klebsiella putida*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella* sp., etc. pueden emplear el cianuro como fuente de nitrógeno y metabolizarlo hasta amoníaco (Kao, *et al.* 2003). Una especie bacteriana capaz de utilizar el cianuro como la única fuente de nitrógeno y el acetato como fuente de carbono bajo condiciones alcalinas, ha sido aislado y clasificado como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, además, esta bacteria tolera hasta 30 mM de cianuro libre y también pueden usar varios complejos de metal cianurado incluso en presencia de amonio o nitrato.

El consumo de cianuro es un proceso de asimilación, ya que el crecimiento de bacterias fue concomitante y proporcional a la degradación del cianuro y la bacteria convierte estequiométricamente el cianuro en amonio en presencia de L-metionina-D y L-sulfoximina inhibidores de la sintetasa de glutamina. La bacteria fue capaz de crecer en medios alcalinos, hasta un pH inicial de 11,5, y tolera cianuro libre, concentraciones de hasta 30 mM, lo que hace un buen candidato para el

tratamiento biológico de residuos cianurados. (Luque, 2005)

Se han reportado enzimas producidas por el género *Klebsiella* que intervienen en el metabolismo del cianuro, tales como: la fumarasa, aconitasa y la malato quinona oxidoreductasa (Watanabe *et al.*, 1998). También hay reportes de actividad metabólica de cianuro nitrilasas y cianuro oxigenasas. (Kunz, Daniel A., 1992)

Las especies bacterianas *Klebsiella* spp. son organismos heterótrofos, utilizan parte de las sustancias metabolizadas ya sean orgánicas o inorgánicas para obtener energía que luego necesitarán para convertir la otra parte de la materia orgánica en células. Los procesos de síntesis se dan gracias a los donantes de electrones que son necesarios para obtener energía. (Gurbuz *et al.*, 2002)

**Cuadro 4.** Degradación de compuestos cianurados, especies responsables y la reacción que se lleva a cabo.

Condición	Compuesto degradado	Microorganismo	Reacción	Referencia
AEROBIA	HCN	<i>Stemphylium loti</i>	$\text{HCN} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCONH}_2$	Knowles, 1988
	HCN	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Indefinida en la literatura	Ingvorsen et al, 1991
	HCN	<i>P. putida</i>	Indefinida en la literatura	Chapatwala et al, 1995
	HCN	<i>Klebsiella stutzeri</i> AK61	Indefinida en la literatura	Watanabe et al, 1998
	HCN	<i>Bacillus pumilus</i> C1	Indefinida en la literatura	Meyers et al, 1993
	CIANURO ORGÁNICO	<i>Pseudomononas aeruginosa</i>	Indefinida en la literatura	Nawaz et al, 1991
	HCN vía HCNO	<i>P. fluorescens</i>	$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{HCN} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{HNCO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+$	Raybuck, 1992

Fuente. Guerrero, 2005

## **Degradación biológica de cianuro**

La degradación biológica, junto con la adsorción de compuestos tóxicos por la biomasa bacteriana ha demostrado ser capaz de eliminar el 92 % del cianuro total, más del 99 % del cianuro WAD y más de un 95 % de cobre y otros metales tóxicos. Además, los costos de establecimiento y operación del sistema son competitivos comparados con los métodos de oxidación química. (Kunz, Daniel A., 1992)

### **1.5.2. El gen ARNr 16S**

#### **1.5.2.1. Identificación bacteriana mediante la secuenciación del gen ARNr 16S**

Los ribosomas son orgánulos complejos, altamente especializados, que se utilizan para el proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande 50S y la subunidad pequeña 30S. Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico, constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes, mientras

que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas. (Rodicio & Mendoza, 2004)

El ARN ribosómico, ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADNr 16S, Los ácidos nucleicos y las proteínas, macromoléculas comunes a todos los seres vivos, cambian con el tiempo. El ARNr 16S fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo por las siguientes características:

- 1) Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
- 2) Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- 3) Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU (de la subunidad pequeña 30S) contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
- 4) Dado que resulta

relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento. (Woese, 1987)

#### **1.5.2.2. Aproximaciones moleculares**

Para conocer la cepa bacteriana con capacidad degradadora de cianuro de una comunidad microbiana se utilizan técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas para generar hipótesis filogenéticas basada en la identificación del ARNr 16S. (Woese, 1977)

El gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA) es muy utilizado como marcador molecular en estudios de filogenia y ecología microbiana (Liesack, 1997) debido a que: Está presente en todos los organismos.

- Su estructura primaria contiene regiones altamente conservadas, alternando con regiones variables
- Su estructura secundaria es altamente conservada
- Su longitud de 1500 pb hace posible que su amplificación sea relativamente sencilla

- Se cuenta con bases de datos actualizadas como la Ribosomal Data Project y SILVA. (Yarza y cols., 2008)

### **1.5.2.3. Análisis bioinformático**

El análisis del secuenciamiento y resecuenciamiento del gen ARNr 16S se realizó utilizando distintas plataformas bioinformáticas.

La secuencia procesada del gen ARNr 16S de la cepa bacteriana degradadora de cianuro se comparó con las secuencias disponibles en base de datos, utilizando la herramienta BlastN del NCBI, EBI, DDBJ y Ribosomal Database Project.

#### **NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE.UU)**

El Centro Nacional para la Información Biotecnológica o (NCBI) es parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (National Library of Medicine), un área del Instituto Nacional de Salud (National Institutes of Health o NIH), almacena y actualiza la información referente a secuencias genómicas en GenBank, un índice de artículos científicos

referentes a biomedicina, biotecnología, bioquímica, genética y genómica presentes en PubMed el cual destaca una recopilación de datos biotecnológicos de relevancia de todo el mundo.

Todas las bases de datos del NCBI están disponibles en línea de manera gratuita. El NCBI alberga genomas secuenciados y un índice de los artículos biomédicos de investigación en PubMed Central, así como información relevante en biotecnología y el cual es dirigido por David Lipman, uno de los autores originales del programa de alineación de secuencias BLAST.

#### **1.5.2.4. Herramientas bioinformáticas, softwares**

Los programas bioinformáticos incluyen herramientas de comando hasta programas gráficos mucho más complejos, como webs autónomas situadas en compañías de bioinformática, instituciones públicas y privadas en el mundo

##### **a. Herramienta bioinformática, CLC Main Workbench**

La herramienta bioinformática CLC Main Workbench que pertenece a la compañía CLC bio, a QIAGEN, Silkeborgvej, Denmark, Alemania. El programa CLC

Main Workbench es utilizado para el análisis de datos de ADN, ARN, secuencias de proteínas también para el análisis de la expresión génica, el diseño de partidores, clonación molecular, análisis filogenéticos y gestión de datos de secuencias.

El programa bioinformático CLC Workbench está en una continua actualización para mantenerse al día. El investigador científico puede personalizar la mesa de trabajo a través del Kit de desarrollo de software que le permite desarrollar características de su elección para la mesa de trabajo.

- b. Herramienta bioinformática, MEGA 6,06 (Análisis genético evolutivo molecular)

El programa es una herramienta integrada para la realización de alineamientos de secuencias, inferir árboles filogenéticos, la estimación de los tiempos de divergencia, la estimación de las tasas de evolución molecular e inferir secuencias ancestrales. MEGA 6.06 es utilizado por los biólogos en un gran número de laboratorios para reconstruir la historia evolutiva de las especies e inferir el alcance y la naturaleza de las fuerzas selectivas que determinan la evolución de los genes y especies. (Tamura K., Kumar S., 2013)

## **II. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 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 y contigua que va a la carretera a la playa,  $18^{\circ} 06' 36,7''$  S y  $70^{\circ} 20' 28,6''$ W. (Zegarra A., 2012)

Esta planta cuenta con 12 módulos de lagunas de estabilización, cuatro de ellas construidas en una primera fase, los ocho restantes en una segunda fase; cada módulo está compuesto de una laguna primaria y una laguna secundaria. (Zegarra A., 2012), (Anexo 1)

### **2.2. Población y muestra**

#### **2.2.1. Población**

La población estuvo compuesta por las bacterias mesófilas aerobias cultivables presentes en el pozo Nº 9 de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo.

### 2.2.2. Muestra

Las muestras fueron tomadas de 3 puntos de la laguna primaria del módulo 9 (pozo № 9), sus dimensiones son: largo 160 m, ancho 95 m y profundidad 2 m, es una laguna facultativa aerobia que presenta una colimetría alcanzada (NPM / 100ml) de  $1,4 \times 10^8$  y una producción de agua tratada de  $10,419 \text{ m}^3$  al año a diferencia de las lagunas secundarias que presenta una colimetría de  $9,0 \times 10^7$ . El módulo 9 realiza un tratamiento biológico de sólidos flotantes y sedimentados, son realizados por microorganismos vivos, cuyo metabolismo tiene lugar en presencia de oxígeno disuelto. Los productos finales son principalmente  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ .(Olga Del Carpio Velarde, 2002).

**Cuadro 5.** Ubicación y características físicoquímica de los puntos de muestreo.

Fuente	Coordenadas	Color de la fuente	Temperatura °C	pH	Muestra biológica
S1	18°06'36,1" S 70°20'40,1" W	Negro	23,5	7,9	Sedimento
S2	18°06'37,8" S 70°20'38,9" W	Negro	23,7	8,1	Sedimento
S3	18°06'39,4" S 70°20'37,5" W	Negro	23,4	8,0	Sedimento

Fuente: Elaboración propia.

### **2.3. Lugar de experimentación**

Laboratorio de Microbiología de la E.P. de Biología-Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Laboratorio de Química Analítica de la E.P. de Ingeniería Química de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **2.4. Diseño de la investigación**

El tipo de investigación es básica - descriptiva, donde el muestreo de bacterias mesófila degradadoras de cianuro se utilizó un diseño completamente al azar. Luego se procedió a la etapa de adaptabilidad de bacterias con capacidad degradadora de cianuro en pH 9,5 y 10 con concentraciones del ión cianuro de 400 ppm y 500 ppm en un medio de cultivo específico, luego se aisló una cepa con capacidad degradadora de cianuro en condiciones específicas establecidas de pH 10 y concentración del ión cianuro de 500 ppm. Luego se procedió a la determinación de la actividad cuantitativa de la remoción de cianuro por la cepa aislada en condiciones específicas establecidas.

Finalmente, se procede a la caracterización bioinformática del gen ARNr 16S (identificación y reconstrucción del árbol filogenético) de la cepa bacteriana degradadora de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

**Cuadro 6.** Variables de estudio

Variables	Variables	Rango	Instrumentos	Unidades de medida
Independiente	pH	Cuantitativo	pH Metro	H <sup>+</sup>
	Concentración de cianuro	Cuantitativo	Balanza analítica	mg
Dependiente	Actividad de la capacidad de remoción de cianuro	Cuantitativo	Espectrofotómetro	nm
	Crecimiento de células bacterianas	Cuantitativo	Cámara de Neubauer	Cel. ml <sup>-1</sup>

## 2.5. Metodología

### 2.5.1. Colección de las muestras

Se colectaron 600 g de sedimento en 3 puntos de muestreo del pozo Nº 9 a temperatura ambiental (Anexo 1). Se tomó la muestra a una distancia alejada de la orilla de 50 cm, muestreada 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 dio la vuelta en sentido contrario

para su recolección, luego llevado en un frasco estéril de 500 ml de boca ancha. Las muestras fueron transportadas cuidadosamente para su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

### **2.5.2. Adaptabilidad y aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro**

Para el proceso de adaptabilidad se preparó un medio líquido buffer cianurado (MLBC), las tres muestras fueron llevados a un frasco estéril de 500 ml de capacidad donde se depositaron 50 g de las muestras de los frascos: S1, S2 y S3.

Luego se preparó 100 ml de medio líquido buffer cianurado (MLBC), ajustado en un pH 9,5 con concentración de cianuro de 400 ppm en 2 matraces de Erlenmeyer de 250 ml y se autoclavó para su esterilización por 20 minutos a 15 psi y 121°C.

Posteriormente, se agregó 0,5 g de muestra de sedimento del frasco de 500 ml a cada matraz con medio líquido buffer cianurado y se incubó a temperatura de ambiente, campo oscuro por 3 días (Chen *et al.*, 2008).

Luego se realizó un subcultivo, se preparó 100 ml de medio líquido buffer cianurado, ajustado a un pH 10 con concentración

de cianuro de 500 ppm en 2 matraces de Erlenmeyer de 250 ml y se autoclavó para su esterilización por 20 minutos a 15 psi y 121°C. Posteriormente, fue agregado 5 ml del medio de cultivo anterior y se incubó a una temperatura ambiente, campo oscuro por 3 días. (Shabnam M., 2014)

El medio líquido buffer cianurado que fue usado como medio de estudio de adaptabilidad presenta:  $K_2HPO_4$  4,35 g L<sup>-1</sup>, NaOH 4 g L<sup>-1</sup>, glucosa 0,1 g L<sup>-1</sup>, 1 ml de soluciones trazas  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  300 mg L<sup>-1</sup>,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  180 mg L<sup>-1</sup>,  $CoCl_2$  130 mg L<sup>-1</sup>,  $CaCl_2$  40 mg L<sup>-1</sup>,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  40 mg L<sup>-1</sup> y concentraciones del ión cianuro de 400 ppm y 500 ppm como única fuente de nitrógeno (Anexo 5). (Shabnam M., 2014)

Luego se procedió al aislamiento por diseminación en un medio sólido buffer cianurado, agregándose 0,1 ml de muestra de forma directa y con diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  en las placas Petri de 100 x 20 mm y se incubó a temperatura ambiente, campo oscuro por 3 días. (Shabnam M., 2014) (Chen *et al.*, 2008)

El medio sólido buffer cianuro que fue usado como medio de estudio de aislamiento presenta:  $K_2HPO_4$  4,35 g L<sup>-1</sup>, NaOH 4 g L<sup>-1</sup>, glucosa 0,1 g L<sup>-1</sup>, 1 ml de soluciones traza  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  300 mg L<sup>-1</sup>,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  180 mg L<sup>-1</sup>,  $CoCl_2$  130 mg L<sup>-1</sup>,  $CaCl_2$  40 mg L<sup>-1</sup>,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  40 mg L<sup>-1</sup>, agar agar al 1,4 % a pH 10 con

concentración del ión cianuro de 500 ppm como única fuente de nitrógeno. (Shabnam M., 2014)

Luego se procede a realizar un subcultivo en medio sólido buffer cianurado a partir de la placa Petri crecidas con dilución  $10^{-4}$  para tener como resultado un cultivo puro (Anexo 8).

El criterio para aislar las colonias crecidas en medio sólido buffer cianurado (MSBC) en condiciones específicas establecidas, fue la diferenciación visual considerando: color, tamaño y aspecto.

### **2.5.3. Caracterización de una cepa bacteriana degradadora de cianuro**

Para la caracterización microscópica se realizó la técnica de la coloración Gram de un cultivo crecidas en agar nutritivo al 2,4 % por 24 horas, observándose en el microscopio Motic BA410 y fotografió con la cámara Canon 3000. Características generales de especies de – Bergey's manual of systematic bacteriology 2004.

#### **2.5.4. Actividad cuantitativa de la remoción de cianuro en condiciones específicas establecidas**

##### **a. Cultivo**

Se realizó un cultivo joven, se preparó 100 ml de agar nutritivo al 2,4 % y se autoclavó para su esterilización por 20 minutos a 15 psi y 121°C, luego de atemperarse se sirvió 10 ml en 3 placas Petri, se esperó a que solidifique y luego se realizó la siembra por estría luego se incubó a temperatura ambiente, campo oscuro durante 24 horas. (Potivichayanon S., & Kitleartpornpaioat R., 2010)

##### **b. Determinación química de la capacidad degradadora de cianuro**

Se midió la capacidad degradadora de cianuro de la cepa bacteriana en condiciones de pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm, utilizando el método del ácido pícrico. (Lamarino P., 1989)

Para ello previamente a la medición de la capacidad degradadora de cianuro, se realizó la curva estándar a partir de una solución de cianuro de potasio KCN ( $0,25 \text{ mg ml}^{-1}$ ) de la siguiente manera (Anexo 9) (Cuadro 6).

**Cuadro 7.** Elementos constituyentes para la determinación de cianuro libre, utilizando el método del ácido pícrico.

Soluciones	Sistema de fiolas				
	1	2	3	4	5
Sol. 1ml=50 µg CN <sup>-</sup>	0	1	2	4	8
Solución de Níquel (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solución de Ac. Pítrico (ml)	5	5	5	5	5
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 20 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente					
Agua desionizada (ml)	19,5	18,5	17,5	15,5	11,5
µg CN <sup>-</sup>	0	50	100	200	400
ppm CN <sup>-</sup>	0	0,50	1	2	4

Fuente. Lamarino P., 1989

Se mezcla bien las 5 fiolas y se lee las absorbancias en el espectrofotómetro Spectronic a una longitud de onda de 520 nm, previamente se mide el blanco (Fiola 1). Se grafica la curva de correlación entre la absorbancia y la concentración de cianuro libre, además resultó conveniente realizar una regresión lineal  $y = a + bx$ ; donde  $y$  = absorbancia,  $x$  = concentración de cianuro libre en ppm.

Para la determinación de la actividad de remoción de cianuro por la cepa bacteriana aislada, se preparó 100 ml de medio líquido buffer cianurado y se agregó 10 ml en c/u de los 4

viales con capacidad de 20 ml en condiciones específicas pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm, luego en 2 viales se agregó 2 asadas de un cultivo joven crecidas en agar nutritivo al 2,4 %, se incubó a una temperatura ambiente, campo oscuro durante 4 días.

Para la determinación de la concentración del nivel de remoción de cianuro primero se tomó 1 ml de los 4 viales con 500 ppm del ión cianuro (CN<sup>-</sup>) y se realizó una dilución de 10<sup>-1</sup> obteniéndose 0,5 ppm (50 µg/ml) y luego se agregó 1 ml a las 4 fiolas (Cuadro 7) y se procedió también a realizar un control de recuento bacteriano por 4 días por duplicado (Anexo 12).

**Cuadro 8.** Procesamiento de las muestras para la determinación de la capacidad degradadora de cianuro libre.

Soluciones	Sistema de fiolas			
	Reactivo blanco, F1	Control positivo, F2	Muestra, F3	Muestra, F4
Dilución 10 <sup>-1</sup> , 1ml=50 µg CN <sup>-</sup>	0	1	1	1
Solución de Níquel (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Solución de Ac. Pítrico (ml)	5	5	5	5
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 20 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente.				
Agua desionizada (ml)	19,5	18,5	18,5	18,5

Se agitó las 4 fiolas y se leyó las absorbancias a 520 nm, previamente se mide el blanco. Se calculó la concentración de cianuro libre del blanco, control positivo (sin bacteria) y las muestras respectivas (M), se calcula la concentración de cianuro libre utilizando la curva estándar de cianuro libre con la ecuación de regresión encontrada previamente.

La determinación del cianuro WAD de la muestra es determinada usando la siguiente fórmula. (Lamarino, P., 1989)

$$\text{CN} - \text{WAD} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{CN} - \right) = \frac{\text{mg de CN} - \text{ de la curva de calibración} \times 1000}{\text{ml de la muestra}}$$

### **2.5.5 Procesamiento y envío de una cepa bacteriana degradadora de cianuro**

Se repitió el procedimiento de cultivo, revisar página 32, subtítulo cultivo.

Luego se agregó 5 ml de agua destilada estéril a las 3 placas Petri con el cultivo joven puro y con ayuda de un asa de drigasgly se resuspendió las colonias suavemente y con ayuda de un micropipeta de 1000 µl se retiró 1000 µl de la suspensión a un tubo eppendorf con 500 µl de agua destilada estéril y 20 % de glicerina (99 % de pureza), realizar el mismo procedimiento en los 2 tubos eppendorf siguientes, luego se procedió a vortexear por 3

segundos x 2 pulsos (suavemente) y almacenar a – 20 °C (Anexo 13).

### **2.5.6 Identificación bioinformática del ARNr 16S de una cepa bacteriana**

Para el procesamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16S de la cepa bacteriana degradadora de cianuro, los productos de PCR de aproximadamente 1 400 pb se secuenciaron mediante el uso de 2 partidores (785 F y 907 R). La secuenciación se realizó mediante el uso del Kit “BigDye Terminator cycle sequencing” (Applied Biosystems, EE.UU.). Los productos de secuenciación se resolvieron en un sistema de “Applied Biosystems modelo ABI PRISM 3700 automated DNA sequencing” (Applied Biosystems, EE.UU.) en la empresa MacroGen Inc. En Seúl, Corea del Sur. (Mirizadeh., S. Yaghman., 2014)

Para el análisis de la secuenciación del gen ARNr 16S se usó los programas Bioinformáticos 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) (Anexo 13).

### **2.5.7 Caracterización filogenética del ARNr 16S de una cepa bacteriana**

Las secuencias del ARNr 16S posee un largo de 1400 – 1500 nucleótidos y fue determinado y ensamblado usando el programa bioinformático Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2013). Las secuencias fueron entonces comparadas con las disponibles en Genbank BLAST buscar ([www.ncbi.nlm.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.gov/blast/)), (Cuadro 8) todas las secuencias cargadas fueron alineadas usando Clustal W algorithm in Mega 6.06 (Tamura *et al.*, 2011). Un total de 16 secuencias fueron incluidas para el análisis filogenético.

El árbol filogenético fue reconstruido con el programa bioinformático Mega 6.06 usando los siguientes parámetros: Análisis (reconstrucción filogenética), método estadístico (Neighbor-Joining), test de Filogenia (Método bootstrap, número de replicaciones de bootstrap: 1000), modelo (Maximun composite likelihood) y sustituciones que incluyen (Transiciones + transversiones) (Anexo 13).

**Cuadro 9.** Designación de secuencias del ARNr 16S para el análisis filogenético

Nº	Especies	Cepas aislados	Nº Acceso	Fuente
1	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	JCM6096T	AJ251467	C
2	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	590681	Y17662	D
3	<i>Klebsiella planticola</i>	7444	Y17663	A
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NCTC10006T	AJ251468	C
5	<i>Klebsiella terrigena</i>	ATCC33257T	Y17658	ATCC
6	<i>Klebsiella terrigena</i>	SW4	Y17670	F
7	<i>Klebsiella</i> sp.	BEC441	Y17664	G
8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC13182T	Y17655	ATCC
9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5725y	Y17660	A
10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5884	Y17661	A
11	<i>Klebsiella oxytoca</i>	i128-94	Y17667	B
12	<i>Klebsiella</i> sp.	ALL-1 16S	KC211017-1	K
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC11296T	Y17654	ATCC
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NO7	AB968092	H
15	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	NA2	AB109012.1	I
16	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	14.1 KSS	NR-037000	J

ATCC; A) BROOKE, M S: *ibid* 28, 313 (1951); B) Aislado, serotipo O2:K47, C) Obtenido desde H Aucken, Laboratorio Central de Salud Pública, London, UK; D) J Courmont, 1981, obtenido de W Frederiksen, Instituto del suero Statens, Denmark; F) EDMUNDS, P N: *J. Infect. Dis.* 94, 65 (1954); G) obtenido desde D. F. Perry, BioEurope, Toulouse, France H) Colección Lianlai Li. I) Planta de procesamiento de agua, Egipto. J) Colección de cultivo LMG 1225 K) Aislado en China.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro

Fueron tres muestras de sedimento utilizados de la laguna № 9 de la PTAR para adaptar bacterias con capacidad degradadora de cianuro. El medio de cultivo específico utilizado es el MBLC (Medio buffer líquido cianurado), en condiciones específicas establecidas, pH 9,5 y concentración de cianuro de 400 ppm por 3 días.

Finalmente, se realizó un recuento bacteriano obteniendo los siguientes resultados por duplicado. (Cuadro 10)

**Cuadro 10.** Proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro libre.

Muestra	Tiempo h							
	0		24		48		72	
	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias
Muestra 1	9,72	+++	9,51	+++	9,21	+++	9,07	+++
Muestra 2	9,58	+++	9,41	+++	9,10	+++	8,95	+++

**Interpretación:** En el cuadro 10 se realiza un conteo del Nº de bacterias con la cámara Neubauer donde se observa la abundancia de bacterias designado como (+++) en condiciones específicas, pH 9,5 con concentración de cianuro de 400 ppm evaluados por 3 días.

Se realizó un subcultivo a partir de la muestra adaptada de pH 9,5 y concentración del ión cianuro de 400 ppm, retirándose un volumen de 5 ml y se llevó a 100 ml de medio líquido buffer cianurado en condiciones específicas, pH 10 y concentración del ión cianuro de 500 ppm por 3 días.

Finalmente, se realizó un recuento bacteriano obteniendo los siguientes resultados, por duplicado. (Cuadro 11)

**Cuadro 11.** Proceso de adaptabilidad de un subcultivo de bacterias degradadoras de cianuro libre.

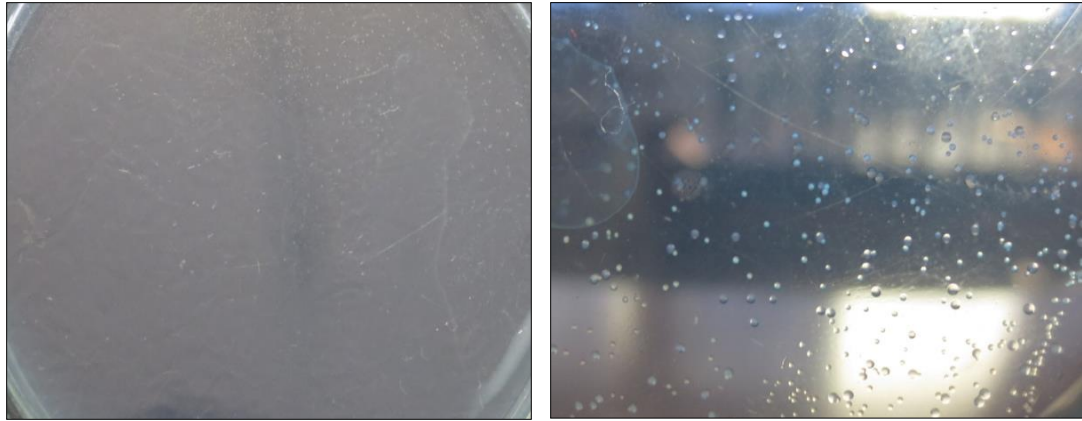
Muestra	Tiempo h							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias	pH	Nº de bacterias
Muestra 1	10,3	+++	10,1	+++	9,78	+++	9,53	+++
Muestra 2	10,05	+++	9,91	+++	9,7	+++	9,41	+++

**Interpretación:** En el cuadro 11 se realiza un conteo del Nº de bacterias con la cámara Neubauer donde se observa la abundancia de bacterias designado como (+++) en condiciones específicas de pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm evaluados por 3 días.

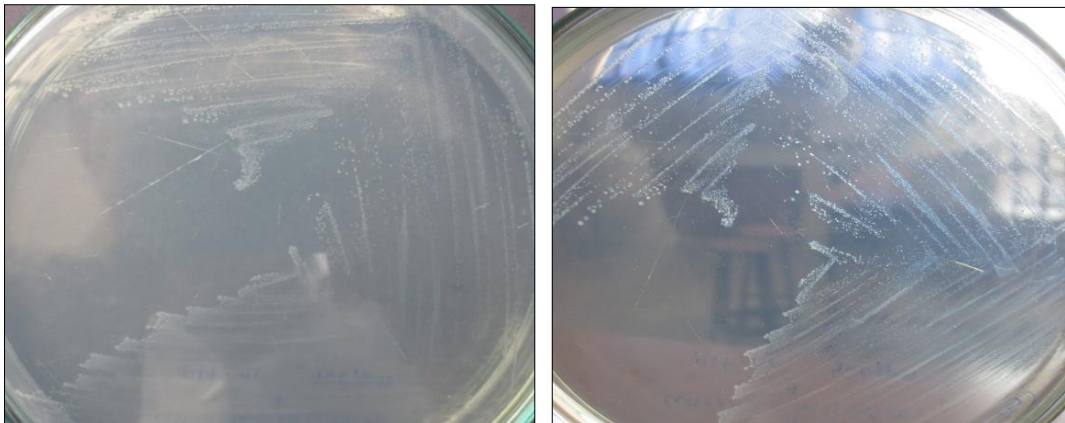
### **3.2 Aislamiento y caracterización de una cepa bacteriana degradadora de cianuro**

Las tres muestras de sedimento de la planta de tratamiento de aguas residuales se utilizaron para aislar bacterias degradadoras de cianuro, utilizando el medio de cultivo MSBC (medio sólido buffer cianurado).

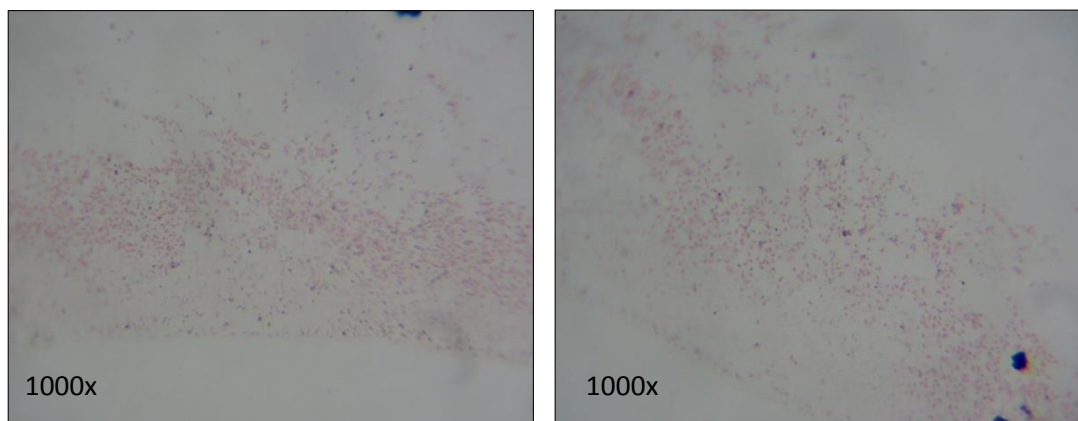
En base a las diferencias en la morfología, se aisló y caracterizó microbiológicamente un cultivo de la placa Petri con dilución  $10^{-4}$  y el que mayor población presentó (Figura 1), luego se procedió a realizar la caracterización cultural de un subcultivo puro del medio sólido buffer cianurado (Figura 2), luego se realizó la caracterización microscópica del subcultivo puro del medio sólido buffer cianurado (Figura 3) y del subcultivo puro del medio agar nutritivo al 2,4 % (Figura 4).



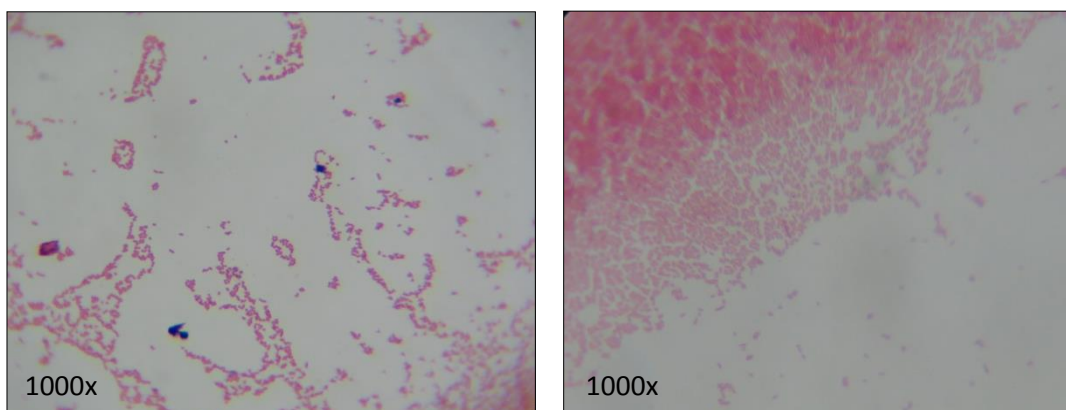
**Figura 1.** Características culturales: colonias cianuro positivo, formas circulares ovaladas, bordes uniformes, color transparente, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 3 días.



**Figura 2.** Características culturales del cultivo puro: colonias cianuro positivo forma circulares ovaladas, bordes uniformes, color transparentes, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 3 días.



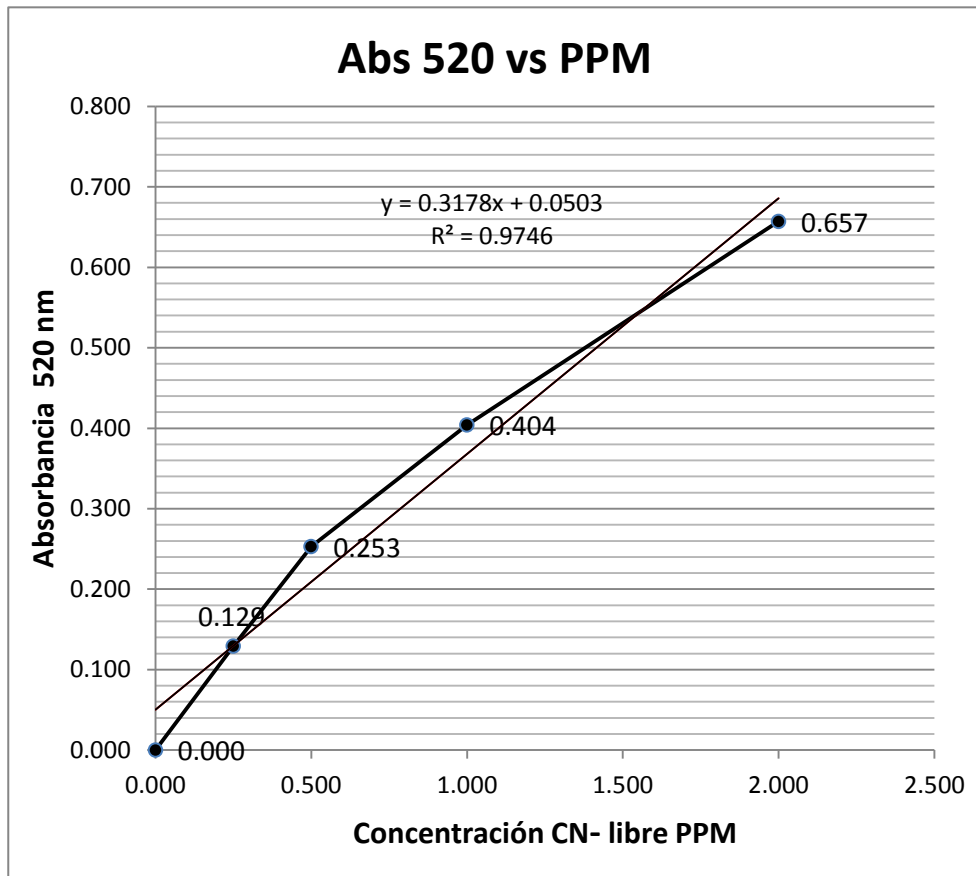
**Figura 3.** Análisis microscópico de luz visible del cultivo puro: bacterias Gram negativas, formas cocobacilares bien definido, cultivado en medio sólido buffer cianurado, pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente por 2 días.



**Figura 4.** Análisis microscópico de luz visible del cultivo puro: bacterias Gram negativas, formas bacilares, fue cultivado en medio agar nutritivo al 2,4 %, temperatura ambiente por 1 día.

### 3.3 Actividad cuantitativa de la remoción de cianuro

#### 3.3.2 Determinación de la curva patrón de cianuro libre



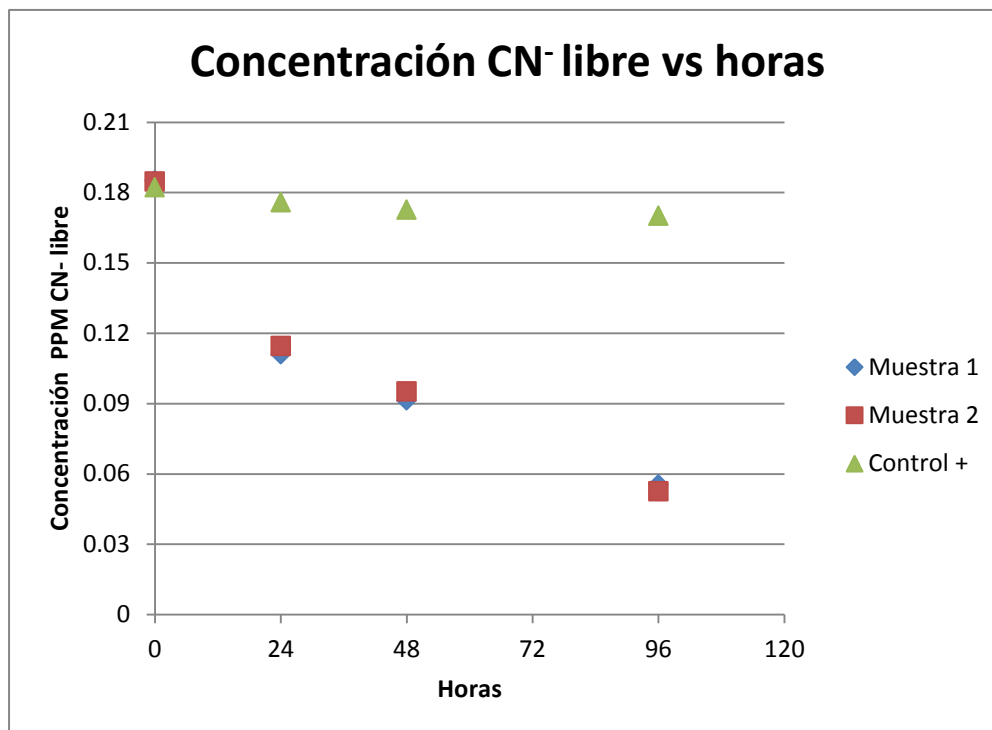
**Figura 5.** Método de espectrofotometría de luz visible 520 nm, presenta un nivel de correlación entre la concentración de cianuro y la absorbancia de 0,974, siendo muy bueno, utilizando el método del ácido pícrico.

**Cuadro 12.** Datos analizados de la curva patrón para la determinación de cianuro libre, utilizando el método del ácido pícrico.

Características	Sistema de fioles				
	F1	F2	F3	F4	F5
Medidas, Abs. 520nm	0	0,124	0,247	0,394	0,635
Medidas, Abs. 520nm	0	0,132	0,256	0,409	0,640
Medidas, Abs. 520nm	0	0,130	0,257	0,409	0,695
Media Abs. 520 nm	0	0,129	0,253	0,404	0,657
µg CN <sup>-</sup>	0	25	50	100	200
ppm CN <sup>-</sup>	0	0,25	0,50	1	2

**Interpretación:** En la figura 5 el nivel de correlación entre la concentración de cianuro libre en ppm y la absorbancia es 0,97, el cual indica que es muy bueno para establecer una curva de correlación. En el cuadro 12 se enumeran las mediciones de las absorbancias realizadas por triplicado a diferentes concentraciones de cianuro libre.

### 3.3.2 Determinación de la actividad de remoción de cianuro



**Figura 6.** El efecto de la remoción de cianuro libre (CN<sup>-</sup><sub>Libre</sub>) por la cepa bacteriana. El experimento fue repetido dos veces y evaluado por 4 días a pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente.

**Cuadro 13.** Datos analizados de la remoción de cianuro por la cepa bacteriana JCC16

Muestras	Tiempo h							
	0 h		24 h		48 h		96 h	
	Abs.	ppm CN <sup>-</sup> <sub>libre</sub>	Abs.	ppm CN <sup>-</sup> <sub>libre</sub>	Abs.	ppm CN <sup>-</sup> <sub>libre</sub>	Abs.	ppm CN <sup>-</sup> <sub>libre</sub>
M1	0,424	0,185	0,191	0,111	0,129	0,091	0,016	0,055
M2	0,423	0,186	0,202	0,114	0,141	0,095	0,007	0,052
C <sup>+</sup>	0,430	0,182	0,395	0,175	0,410	0,172	0,405	0,168

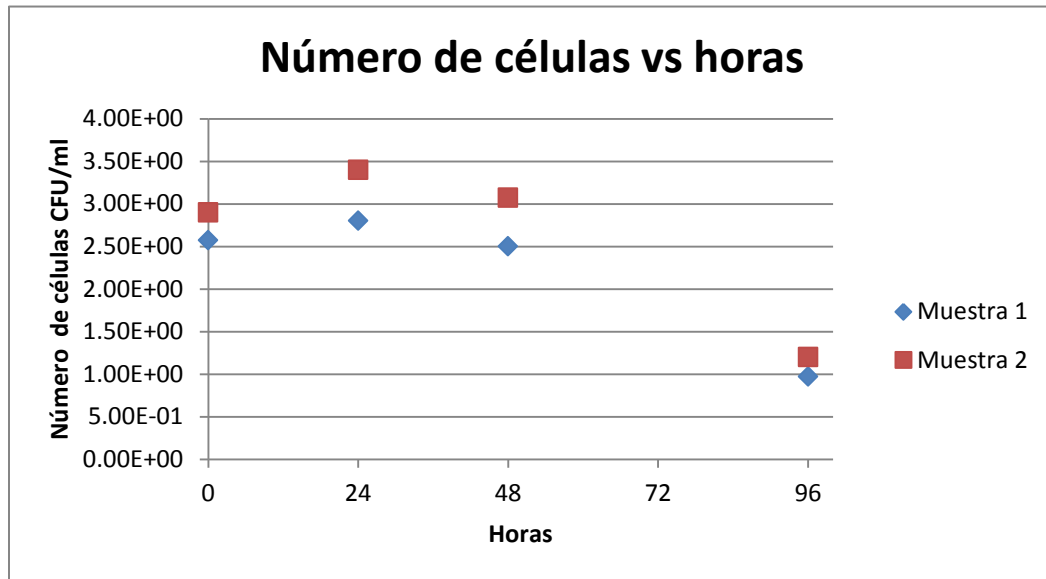
M1= Muestra 1

M2= Muestra 2

C<sup>+</sup> = Control

### Interpretación:

En la figura 6 y el cuadro 13, se observó la actividad específica sobre el cianuro de la cepa JCC16, indicando la disminución clara de la concentración final de cianuro al cuarto día de evaluación, muestra 1 de 0,055 ppm y la muestra 2 de 0,052 ppm y siendo constante el control positivo C<sup>+</sup>= 0,168 ppm.



**Figura 7.** Conteo de las células bacterianas a partir de una biomasa determinada. El experimento fue repetido dos veces y evaluado por 4 días a pH 10 con concentración de cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente.

**Cuadro 14.** Datos analizados del recuento de células bacterianas y la cantidad de cianuro libre presente en ppm

M.	Tiempo h							
	0 h		24 h		48 h		96 h	
	Nº Cel. UFC/ml	ppm CN <sub>libre</sub>	Nº Cel. UFC/ml	Ppm CN <sub>libre</sub>	Nº Cel. UFC/ml	ppm CN <sub>libre</sub>	Nº Cel. UFC/ml	ppm CN <sub>libre</sub>
M1	2,57x10 <sup>7</sup>	0,185	2,8x10 <sup>7</sup>	0,111	2,5x10 <sup>7</sup>	0,091	0,97x10 <sup>7</sup>	0,055
M2	2,9 x10 <sup>7</sup>	0,186	3,4x10 <sup>7</sup>	0,114	3,0x10 <sup>7</sup>	0,095	1,2x10 <sup>7</sup>	0,052

M1= Muestra 1

M2= Muestra 2

## Interpretación

En la Figura 7 y el cuadro 14, se observa el crecimiento y la disminución progresiva del número de células bacterianas por los 4 días evaluados y tiene una relación común con la disminución del cianuro como sustrato y única fuente de nitrógeno.

### 3.4. Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

#### 3.4.1. Identificación molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro

El resultado del secuenciamiento del gen ARNr 16S informa sobre la identidad de la bacteria con la depositada en la base de datos de GenBank (búsqueda en BLAST), que mayor similitud presenta con la bacteria problema,

**Cuadro 15.** Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del NCBI

Muestra Cepa	Pariente más cercano en BLASTN				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
JCC16	<i>Klebsiella</i> sp. ALL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0,0	99	KC211017.1

Fuente: Elaboración propia.

**Cuadro 16.** Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del EBI - EMBL (Europe Bioinformatic Institute of Europe Molecular Biology Laboratory)

Muestra Cepa	Pariente más cercano en BLASTN				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
JCC16	<i>Klebsiella</i> sp. ALL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,5	0,0	99,5	EM_PRO:KC211017

Fuente: Elaboración propia.

**Cuadro 17.** Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en BLASTN del DDBJ (DNA Data Bank of Japan).

Muestra Cepa	Pariente más cercano en BLASTN				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
JCC16	<i>Klebsiella</i> sp. ALL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0,0	99	KC211017.1

Fuente: Elaboración propia.

**Cuadro 18.** Similitud de la secuencia del ARNr 16S para la cepa JCC16 en SeqMatch del RDB (Ribosomal Database Project).

Muestra Cepa	Pariente más cercano en SeqMatch				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
JCC16	<i>Klebsiella</i> sp. ALL-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99	0,0	99	KC211017.1

Fuente: Elaboración propia.

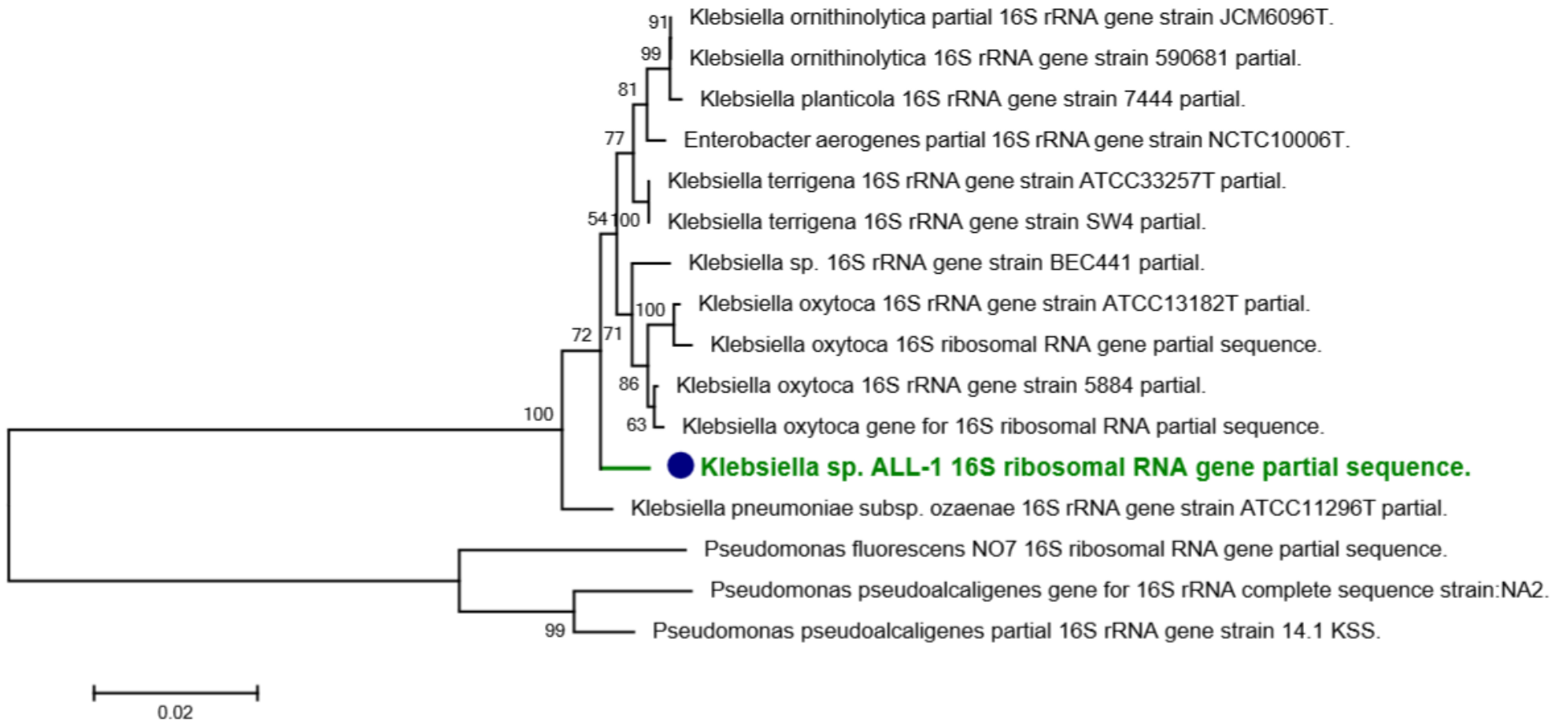
### Interpretación

Los cuadros 15, 16, 17 y 18 consultados en las diferentes bases de datos NCBI, EBI – EMBL, DDBJ y RDB se observa que el 99 % del query secuenciado de la cepa JCC presenta matches con el hit de la cepa *Klebsiella* sp. ALL-1 16S depositada en la base de datos (identidad) y un 99,6 % de la secuencia del query fue alineado con dicho hit (cobertura). Además, se obtuvo para el alineamiento un valor de E - value menor a 0,02; lo cual indica que es un alineamiento muy confiable.

Los score de los hits seleccionados para el alineamiento con la secuencia problema son los más altos como se observa en el árbol filogenético de la cepa JCC16, donde el score es convertido en distancias a mayor score más cercana la distancia en el árbol no enraizado (sin hacer suposiciones en cuanto a sus antecesores), el

cual fue construido por el método del vecino más próximo “Neighbor - joining”, empleando técnicas generales de aglomeración de datos para el análisis de secuencias, sirviéndose de la distancia genética como un medidor de aglomeración.

#### **3.4.2. Análisis filogenético del ARNr 16S de la cepa bacteriana degradadora de cianuro.**



**Figura 8.** Árbol filogenético de la cepa bacteriana JCC16, se utilizaron 16 secuencias de ARNr 16S. El árbol filogenético fue construido usando el método Neighbour-joining, paquete Mega 6.06 (Tamura et al. 2011). El número en cada ramificación indica un porcentaje por encima del 50 % dando fiabilidad en la reconstrucción del árbol utilizando un valor de bootstrap de 1000 replicaciones.

Fuente. Elaboración propia

## IV. DISCUSIÓN

### Adaptabilidad y aislamiento

Las muestras de sedimento extraídas de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, en la primera etapa de adaptabilidad presenta un crecimiento favorable en un medio de cultivo específico MBLC (pH 9,5; 10 y concentraciones de cianuro de 400 y 500 ppm), por que las características fisicoquímicas del medio son favorables para el desarrollo de microorganismos degradadores de cianuro y además, la naturaleza de la muestra tipo sedimento se caracteriza por presentar altas densidades de poblaciones de microorganismos.

Los sedimentos microbianos además de presentar en su mayoría comunidades organótrofos también poseen comunidades de quimioorganótrofos, característico de los microorganismos degradadores de cianuro y su capacidad de adaptabilidad. En estudios previos el cianuro fue tratado biológicamente por: *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Klebsiella*. (Watanabe *et al.*, 1998)

Además se debe recalcar que el medio utilizado para el proceso de adaptabilidad y aislamiento de una cepa degradadora de cianuro es un medio de cultivo específico MLBC (medio líquido buffer cianurado), obteniendo actividades considerables tal como lo indica (Shabnam M., 2014) quien utilizó un medio buffer obteniendo cepas degradadoras de cianuro.

El aislamiento realizado corresponde a una especie, la cual está en concordancia con los trabajos de bacterias cianuradas, *Klebsiella oxytoca* aislado desde aguas residuales industriales cianuradas y que es capaz de biodegradar cianuro a productos finales no tóxicos, siendo el cianuro utilizado como la única fuente de nitrógeno. (Kao *et al.*, 2003)

Así mismo la cepa bacteria aislada presenta forma cocobacilar, Gram negativo como lo reportado (Chen *et al.*, 2008), quién indicó que las muestras aisladas, las características predominantes de microorganismos observables degradadores de cianuro son: Gram negativas y cocobacilares.

### **Actividad de la remoción de cianuro**

La cepa bacteriana muestra un crecimiento favorable en un medio de aislamiento selectivo, medio sólido buffer cianurado (MLBC), se debió a la capacidad biológica de degradar cianuro en condiciones de pH 10 y concentración del ión cianuro de 500 ppm a temperatura ambiente.

*Klebsiella oxytoca* es una especie bacteriana relacionada con la cepa bacteriana trabajada, es capaz de biodegradar el cianuro en subproductos no tóxicos en medio sólido buffer cianurado teniendo como única fuente de nitrógeno el cianuro. (Kao *et al.*, 2005)

La cepa bacteriana pura seleccionada JCC16 es considerada con capacidad removedora de cianuro, mostrando una actividad específica promedio de  $3,04 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$  en un medio líquido buffer cianurado (MLBC) a pH 10 con concentración del ión cianuro de 500 ppm, temperatura ambiente por 4 días.

### **Análisis fenotípico y molecular**

Los productos de PCR amplificados por los oligonucleótidos universales, 785 F y 907 R coincidieron con el tamaño del ARNr 16S.

La cepa JCC16 presentó una similitud con el género *Klebsiella* respectivamente, lo cual es apoyado con los criterios fenotípicos de (Chen *et al.*, 2007), se observan colonias transparente ovaladas de bacterias Gram negativas y de formas cocobacilares.

Así mismo, la cepa JCC16 presenta un 99 % de identidad con la cepa *Klebsiella* sp. ALL-1, aislado en China, lo cual indica su naturaleza adaptativa a diferentes ambientes. Los valores hallados de identidad entre el gen ARNr 16S son mayores o iguales a 97 %, lo cual es aceptado para ejercer relación entre la cepa a nivel de especie. (Stackebrandt & Göebel, 1994)

## V. CONCLUSIONES

- La planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna, presenta una cepa bacteriana degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas (pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm).
- Se logró determinar la capacidad degradadora de cianuro por encima de las condiciones naturales establecidas (pH 10 y concentración de cianuro de 500 ppm) cuya actividad promedio de remoción de cianuro es de  $3,04 \text{ mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ .
- Se logró la identificación molecular del ARNr 16S de la cepa bacteriana JCC16 con una similitud del 99 % con *Klebsiella* sp. ALL-1 respectivamente. Se logró la reconstrucción del árbol filogenético con un nivel de confiabilidad mayor al 50 % con las especies mas cercanas del género *Klebsiella*.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Cultivar en un medio líquido buffer cianurado, cultivo selectivo específico, (sin glucosa) siendo el cianuro la única fuente de nitrógeno y carbono.
- Usar consorcios bacterianos para mejorar la eficacia de biodegradación de cianuro.
- Aplicar un método que permita la detección y cuantificación de cianuro total.
- Realizar un continuo control del pH para evitar que los iones cianuro se volatilicen y así determinar con mayor exactitud el cianuro libre.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adjei, M. D., & Ohta, Y.** (2000). *Factors Affecting the Biodegradation of Cyanide by Burkholderia cepacia Strain C-3*, 89(3), 274–277.
2. **Akcil, A.** (2003). *Biological treatment of cyanide by natural isolated bacteria (Pseudomonas sp.)*, 16, 643-649.
3. **Carroll, J. E.** (1990). *A Look at Chemical Degradation vs. Biodegradation of Cyanide and Metal-Complexed Cyanides Found in Industrial Wastewater Generated by the Mining Industry* Jason E. Carroll, 1–10.
4. **Carpio, V.** (2002). *Proyecto Regional Sistemas Integrados de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales en América Latina: Realidad y Potencial Convenio IDRC – OPS/HEP/CEPIS 2000–2002*, Estudio complementario del caso Tacna-Perú.
5. **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..2007.
6. **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.

7. **Docente, H. P., Lora, S., & Cianuro, P. O. R.** (2001). *Hospital Provincial Docente "Saturnino Lora" intoxicación por cianuro*, 5(4), 103–107.
8. **Dumestre, A.** (1997). *Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of Fusarium solani isolated from contaminated soils*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2729–2734.
9. **Figueria, M.M., Ciminelli, V.S.T., De Andrade, M.C., Linardi, V.R.** (1996), *Cyanide degradation by an Escherichia coli strain*. *Can. J. Microbiol.* 42, 519–523.
10. **Gonzalez, S.** (2004). *El Cianuro es Tóxico y Letal*. Por La Séptima, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
11. **Guerrero, J.** (2005). *Toxicidad y destrucción biológica del cianuro*, *Rev. Ingeniería de Minas*, 35, 22-25.
12. **Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K.** (2010). *Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review*, 176, 1–13.
13. **Gurbuz, F., Karahan, A., Akcil, A., Ciftci, H.** (2002). *Degradation of cyanide by natural algae species*. In: *Extended Abstracts of the Third International Congress Environmental, Micropaleontology, Microbiology and Metobentholog*, EMMM, Vienna, Austria, p. 93.

14. **Huertas, & Blasco, R.** (2010). *Alkaline cyanide degradation by Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH*, 179, 72–78.
15. **Igeño, M. I., Orovengua, E., Guijo, M. I., & Merchán, F.** (2007). *Biodegradation of cyanide-containing wastes by Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344*, 100–107.
16. **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.
17. **Kjeldsen, P.** (1999). *Behaviour of Cyanides in Soil and Groundwater: A Review*. *Water, Air, & Soil Pollution* 279–307.
18. **Kunz, Daniel A.** (1992). *Utilization of Cyanide as a Nitrogenous Substrate by Pseudomonas Fluorescens NCIMB 11764: Evidence for Multiple Pathways of Metabolic Conversion*.
19. **Lamarino, P.F.** (1989). *The direct spectrophotometric determination of cyanide with picric acid reagent*, Report 221, CANMET.
20. **Liesack, W.** (1997). *Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques*. In: *Modern Soil Microbiology*, New York, pp: 375 – 439.

21. **Logsdon, M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T.** (2001). *El manejo del cianuro en la extracción de oro. International Council on Metals and the Environment*, p 3.
22. **Luque-almagro, M., Martí, 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*, 71(2), 940–947.
23. **Luque, V.** (2005). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 In: *Biochemical Society Transactions*. 33, 168-169.
24. **Mekuto, L., Jackson, V. A., Karabo, S., & Ntwampe, O.** (2013). *Biodegradation of Free Cyanide Using Bacillus Sp. Consortium Dominated by Bacillus Safensis , Lichenformis and Tequilensis Strains: A Bioprocess Supported Solely with Whey*, (18).
25. **Mirizadeh, S., Yaghmaei, S., & Nejad, Z. G.** (2014). Environmental health *Biodegradation of cyanide by a new isolated strain under alkaline conditions and optimization by response surface methodology (RSM)*, 12(1), 1–9.
26. **Nahrstedt, A.** (1988). *Cyanogenesis and the role of cyanogenic glycosides in insects, in Cyanide compounds in Biology*, Ciba Symposium Vol. 140, 131.

27. **Naveen, D., Majumder, C. B., Mondal, P., & Shubha, D.** (2011). *Biological Treatment of Cyanide Containing Wastewater*, 1(7), 15–21.
28. **Potivichayanon, S., & Kitleartpornpaioat, R.** (2010). *Biodegradation of Cyanide by a Novel Cyanide- degrading Bacterium*, 4(6), 1093–1096.
29. **Eisler R.** (1991). *Cyanide Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*, U.S. Fish and Wildlife Service, Biological Report 85 (1.23).
30. **Rodicio, M., Mendoza, M.** (2004). *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. pp; 22:238- 45.
31. **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.
32. **Smith, A., T. Mudder.** (1991). *The chemistry and treatment of cyanidation wastes*, Mining Journal Books, Londres, Reino Unido.
33. **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 pp. 846-849.
34. **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S.** (2013).

*MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6 .0*, 30(12), 2725–2729.

35. **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
36. **Woese, C.** (1987). *Bacterial evolution*. Review of Microbiology, 55 (2) pp. 221-271.
37. **Yarza, P., et al.** (2008). *The All-Species Living Tree project: A 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains*. Syst. Appl. Microbiol. 31, 241–250.
38. **Zegarra, A.** (2012). *Informe de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna*, pp: 3-4.

## VIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Ubicación geográfica de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.



Fuente. Elaboración propia

**Anexo 2.** Características culturales de la cepa bacteriana degradadora de cianuro de la planta de tratamiento de aguas residuales de Magollo, Tacna.

<b>Cepa</b>	<b>Forma</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Color</b>	<b>Tamaño (mm)</b>
JCC16	Circular	Cremosa	Transparente	3 mm

Fuente. Elaboración propia

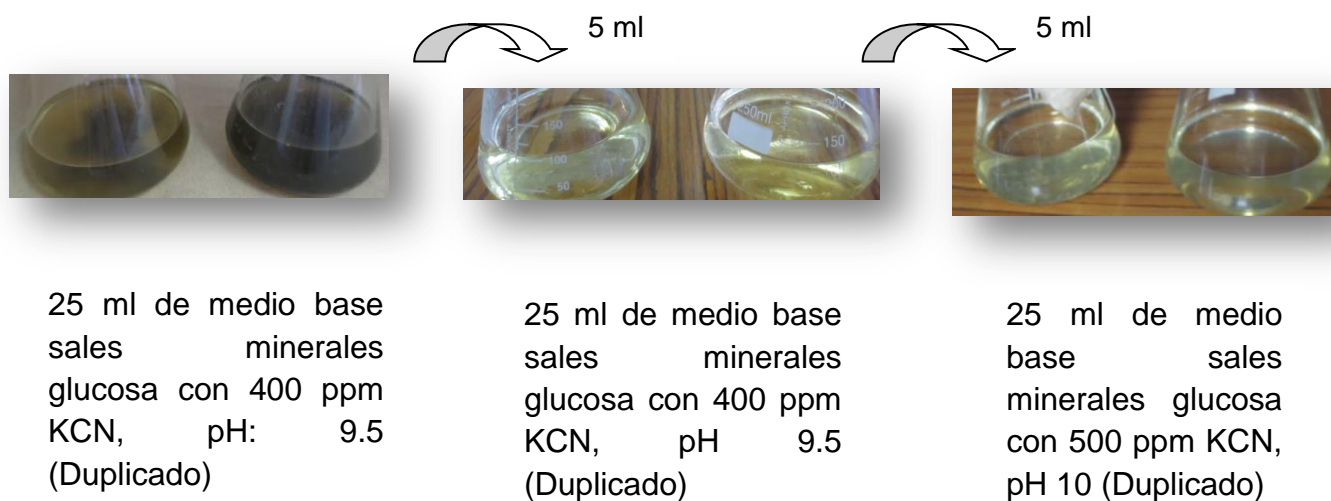
**Anexo 3.** Medio de cultivo líquido buffer cianurado específico (MLBC).

<b>Materiales 100 ml</b>	<b>Cantidad. g/100 ml</b>	<b>Cantidades pesadas g/100 ml</b>
$K_2HPO_4$	0,435	0,435
NaOH	0,4	0,4
Glucosa	0,1	0,1
Soluciones trazas adicionar (1 ml)	Cantidad. mg/100 ml	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	30	30,11
Sulfato de magnesio Heptahidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	18	20

Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2$	4	12,1
Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2$	13	14,6
Ajustar los dos Medios Buffer pH 9,5 y 10		
Cianuro de Potasio mg. (KCN)	100 y 125	

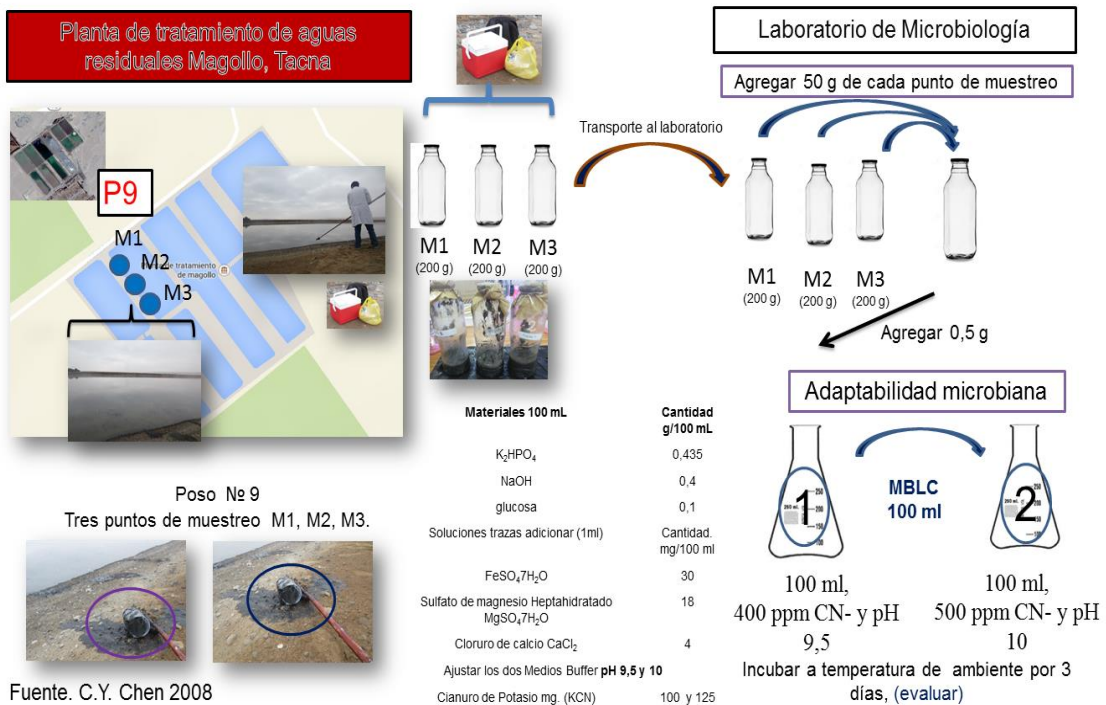
Fuente. Shabnam., 2014

**Anexo 4.** Proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro.

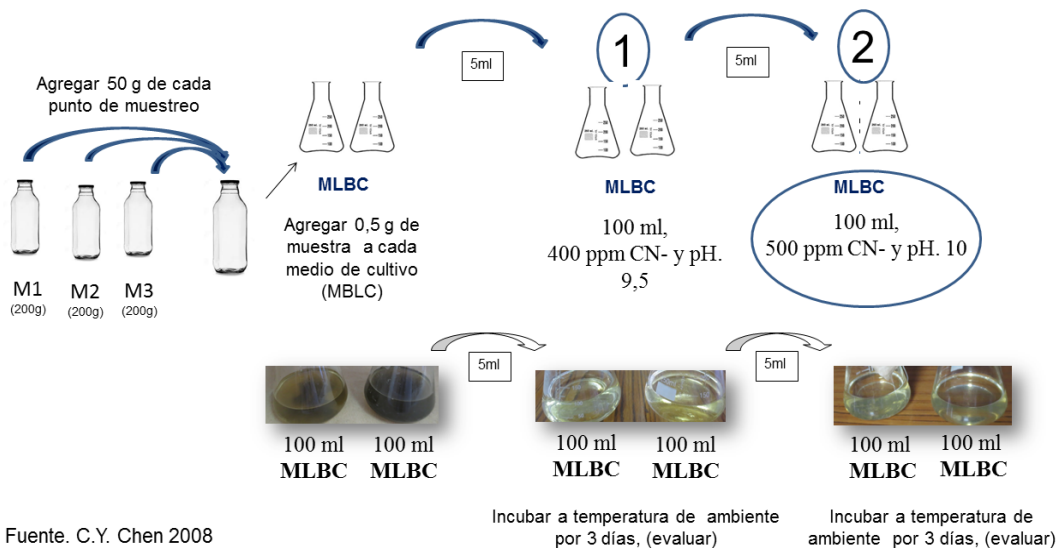


Fuente. Chen *et al.*, 2008.

## Anexo 5. Flujogramas del proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro.

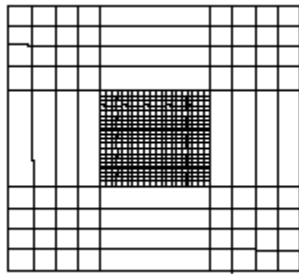


### Metodología del proceso de adaptabilidad de bacterias degradadoras de cianuro



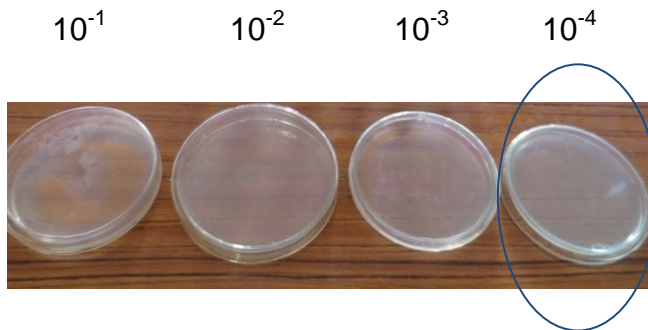
**Anexo 6.** Recuento en cámara de Neubauer, el recuento se hará en 25 cuadrados o 5 (la de los extremos y la central), y con la fórmula correspondiente

**Esquema de la cámara de Neubauer**



$$N = (X_{25})(25)(10^4)$$

**Anexo 7.** Aislamiento de una cepa bacteriana degradadora de cianuro.



Medio de cultivo sólido  
buffer cianurado, pH:  
10 y concentración de  
cianuro de 500 ppm



Fuente. C.Y. Chen., 2008



**Anexo 9.** Curva patrón para la determinación de cianuro libre utilizando el método del ácido pícrico.

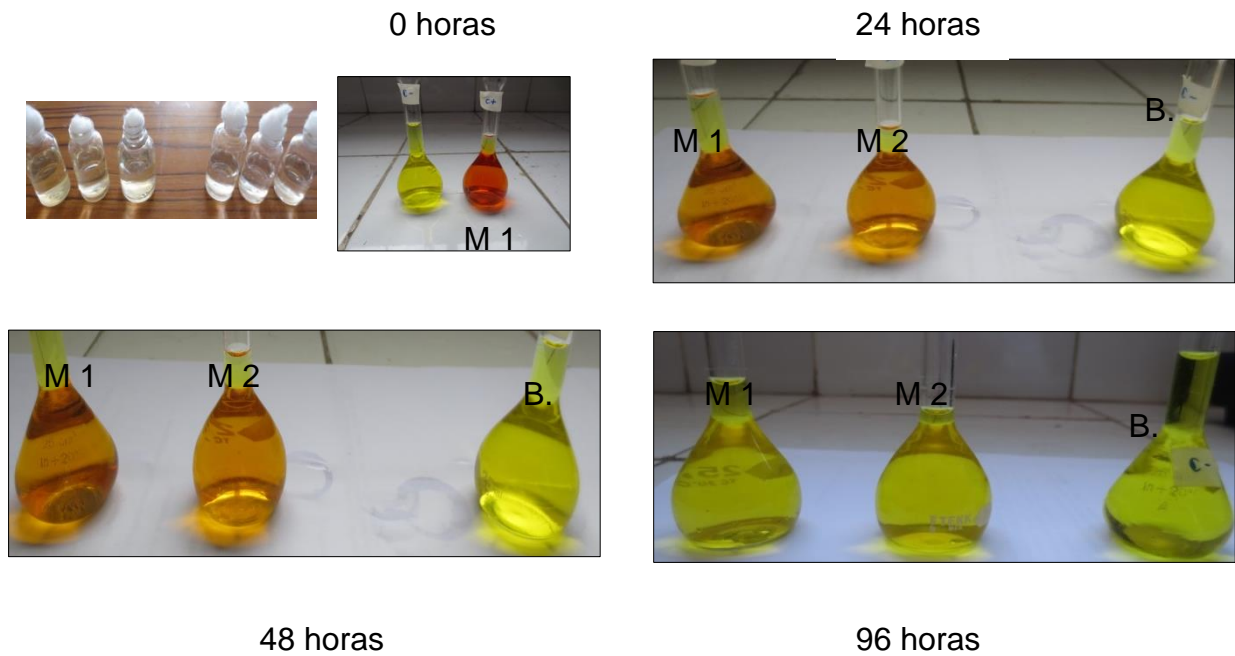
Soluciones	Fiola (M1)	Fiola (M2)	Fiola (M3)	Fiola (M4)
Sol. 2,7ml=25 $\mu\text{g CN}^-$	0	2,7	5,4	10,4
Solución de Níquel (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Solución de Ac. Pítrico (ml)	5	5	5	5
Agua desionizada (ml)	19,5	16,8	14,1	9,1
$\mu\text{g CN}^-$	0	25	50	100
ppm $\text{CN}^-$	0	0,25	0,50	1
Medidas de la Abs 520nm	0	0,191	0,351	0,614

0 $\mu\text{g}/25\text{ ml}$	25 $\mu\text{g}/25\text{ ml}$	50 $\mu\text{g}/25\text{ ml}$	100 $\mu\text{g}/25\text{ ml}$
------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	--------------------------------



Fuente. Lamarino. P.F., 1989.

**Anexo 10.** Evaluación de la remoción del cianuro utilizando el método del ácido pícrico.



Fuente. Lamarino. P.F., 1989.

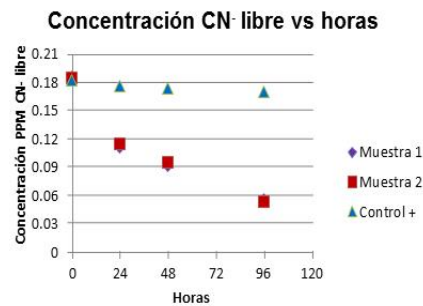
**Anexo 11.** Evaluación microscópica e incubación de las muestras



**Anexo 12.** Flujograma del proceso para la determinación de la capacidad degradadora de cianuro por una cepa bacteriana

**Metodología para la determinación de la capacidad degradadora de cianuro por la cepa bacteriana JCC16**

Curva de correlación concentración de cianuro y absorbancia



Espectrofotómetro UV 520 nm



Mediciones por espectrofotometría de ion CN-



Muestra, F3 Muestra, F4 Reactivo blanco, F1



Materiales

F3 F4 F3 F4 F2



15 ml, 500 ppm CN- y pH 10

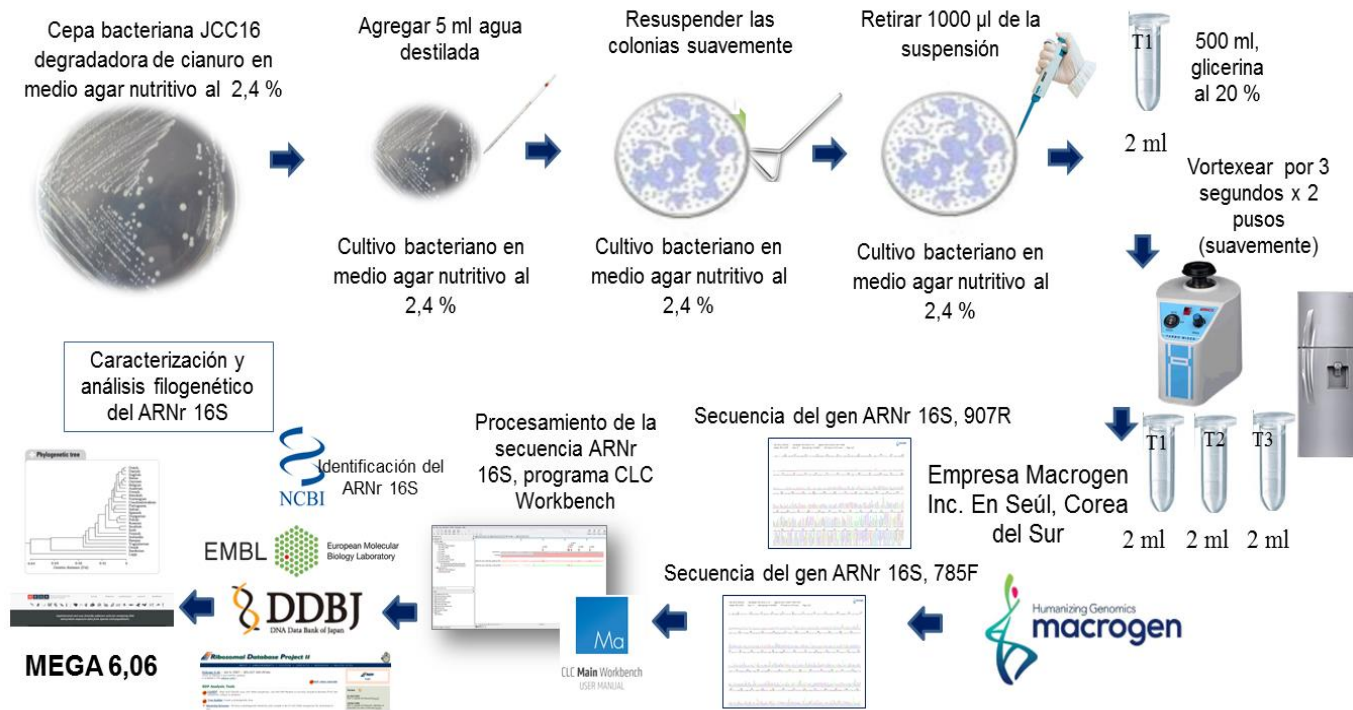


Soluciones	Sistema de fiolas			
	Muestra blanco, F1	Control positivo, F2	Muestra, F3	Muestra, F4
Dilución 10 <sup>-1</sup> , 1ml = 50 µg CN-	0	1	1	1
Solución de Niquel (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5
Solución de Ac. Pírico (ml)	5	5	5	5
Colocar los tubos en baño de agua hirviendo durante 20 minutos e inmediatamente enfriarlos en baño de agua corriente.				
Agua desionizada (ml)	19,5	18,5	18,5	18,5

Fuente. Lamarino. P.F., 1989

**Anexo 13.** Flujograma del procesamiento para el envío de la muestra y la posterior caracterización del ARNr 16S de una cepa bacteriana

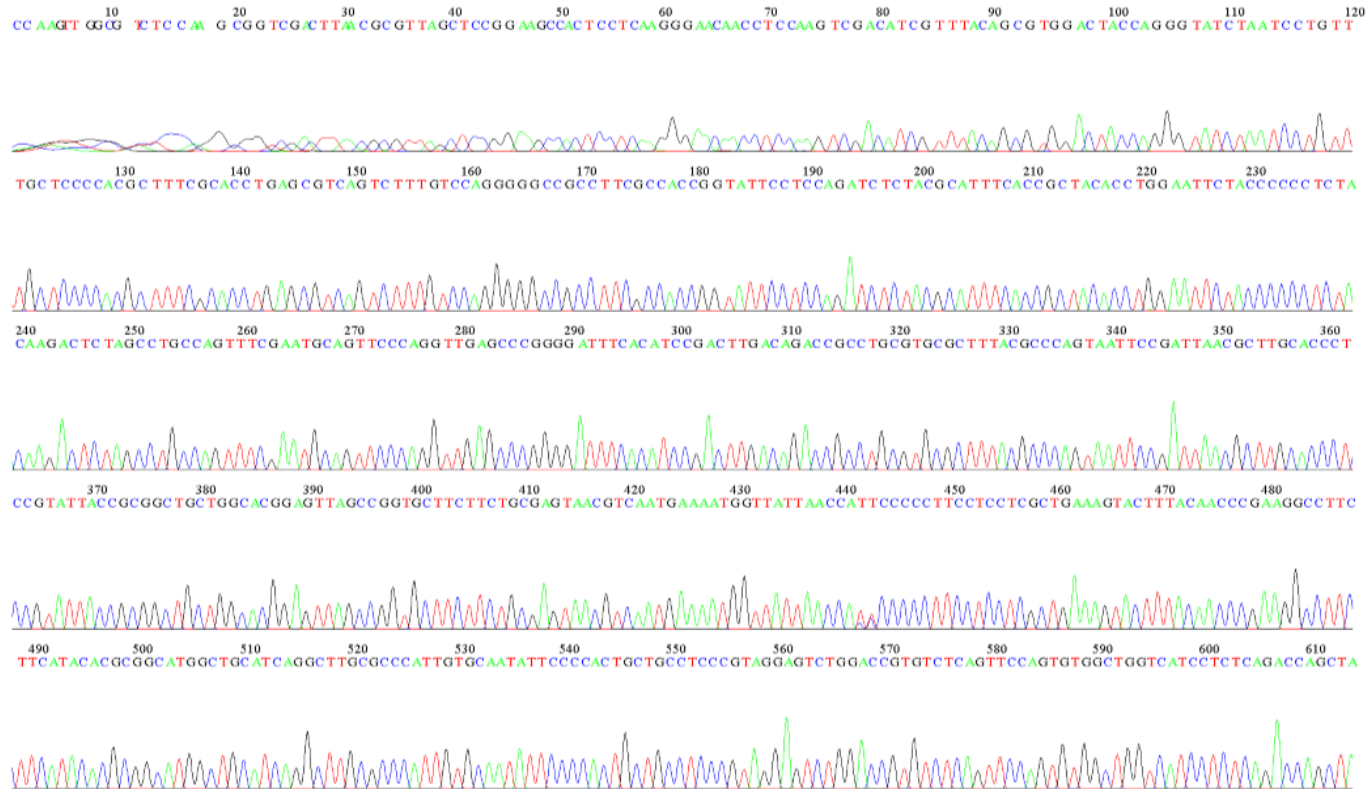
**Metodología del procesamiento para el envío de la muestra y la posterior caracterización del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro**



Fuente. Elaboración propia.

## Anexo 14. Secuencia del gen ARNr 16S, 907R

File: RC-8\_907R.ab1 Run Ended: 2015/10/28 4:1:28 Signal G:3341 A:2603 C:4760 T:3397  
 Sample: RC-8\_907R Lane: 74 Base spacing: 15.6144905 923 bases in 11233 scans Page 1 of 2



Fuente. Empresa MacroGen Inc. En Seúl, Corea del Sur.

## Anexo 15. Secuencia del gen ARNr 16S, 785F

File: RC-8\_785F.ab1 Run Ended: 2015/10/28 4:1:28 Signal G:4913 A:4054 C:4817 T:4098  
Sample: RC-8\_785F Lane: 76 Base spacing: 15.618603 1053 bases in 12413 scans Page 1 of 2



Fuente. Empresa MacroGen Inc. En Seúl, Corea del Sur

**Anexo 16.** Reporte de análisis del gen ARNr 16S, 907R por Macrogen, Korea del Sur

28/10/2015 *Macrogen* Macrogen Online Sequencing Order System

- Analysis Result X Close

**Basic Information**

Order #	151019FN-064
Req #	78

**Download**

abi	img	txt	pdf	phd
<a href="#">Download</a> (http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=robertcastel&n=151019FN-064&N=76&n=151027-53_G19_RC-8_907R.ab1&pref=151027-53_Q1&file=1446033253788)	<a href="#">Download</a> (http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=robertcastel&n=151019FN-064&N=76&n=151027-53_G19_RC-8_907R.g&file=151027-53_Q1&file=1446033253788)	<a href="#">Download</a> (http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=robertcastel&n=151019FN-064&N=76&n=151027-53_G19_RC-8_907R.txt&file=1446033253788)	<a href="#">Download</a> (http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=robertcastel&n=151019FN-064&N=76&n=151027-53_G19_RC-8_907R.pdf&file=151027-53_Q1&file=1446033253788)	<a href="#">Download</a> (http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=robertcastel&n=151019FN-064&N=76&n=151027-53_G19_RC-8_907R.ab1.phd.1&file=1446033253788)

**Chromatogram**

Order # 151019FN-064

**Analysis Report**

Req#	78	Read Length(Normal)	861
Label	RC-8_907R	Read Length(Q16)	860
Sample Name	RC-8	Read Length(Q20)	860
Kitset Name	907R	Signal strength(A)	2603
		Signal strength(T)	3307
Instrument	Macrogen3730X.04-1522-C07	Signal strength(G)	3341
Analysis	KB 1.4.0	Signal strength(C)	4760
DyeSet/Primer	KB_3730_POP7_HDTv3.Kit	GC content	55.0
Lane	74		
Run started	20151008 2:40		
Run ended	20151008 4:12		

**Anexo 17.** Reporte de análisis del gen ARNr 16S, 785F por Macrogen, Korea del Sur,

28/10/2015 Macrogen Online Sequencing Order System

• Analysis Result X Close

**Basic Information**

Order #	151019FN-064
Req #	75

**Download**

abi1	img	txt	pdf	phd
<a href="#">Download</a> <small>(http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=rstestcase&amp;oh=151019FN-064&amp;N=75&amp;h=151027-53_E19_RC-8_785F.ab1&amp;pref=151027-53_Q1chromat_dir&amp;ake=1446033204116)</small>	<a href="#">Download</a> <small>(http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=rstestcase&amp;oh=151019FN-064&amp;N=75&amp;h=151027-53_E19_RC-8_785F.g&amp;pref=151027-53_Q1ip1_dir&amp;ake=1446033204116)</small>	<a href="#">Download</a> <small>(http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=rstestcase&amp;oh=151019FN-064&amp;N=75&amp;h=151027-53_E19_RC-8_785F.ab1.seq&amp;pref=151027-53_Q1fasta_dir&amp;ake=1446033204116)</small>	<a href="#">Download</a> <small>(http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=rstestcase&amp;oh=151019FN-064&amp;N=75&amp;h=151027-53_E19_RC-8_785F.pdf&amp;pref=151027-53_Q1pdf_dir&amp;ake=1446033204116)</small>	<a href="#">Download</a> <small>(http://dna2.macrogen.com/eng/download.jsp?u=rstestcase&amp;oh=151019FN-064&amp;N=75&amp;h=151027-53_Q1phd_dir&amp;ake=1446033204116)</small>

**Chromatogram**

Order # 151019FN-064

**Analysis Report**

Req#	75	Read Length(Normal)	680
Label	RC-8_785F	Read Length(Q16)	679
Sample Name	RC-8	Read Length(Q20)	678
Primer Name	785F	Signal strength(A)	4054
		Signal strength(T)	4098
Instrument	MacrogenJ720X.04-1522-007	Signal strength(G)	4913
Analysis	KB 1.4.0	Signal strength(C)	4817
DyeSet/Primer	KB_3730_POPT_R0T.v3.mob	GC content	53.0
Lane	75		
Run started	2015/10/28 2:40		



**Bach. Jesús Miguel Calisaya Calderón**

**TESISTA**



**Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina**

**ASESOR**