

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRESENTES EN LA
PLANTA DE TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS DEL ANTIGUO VERTEDERO
DE NAVARRO, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA**

**Ingrid Alejandra Pachón Soto
Maryory Vanessa Diazgranados Santos**

**Directoras
Alba Rocío Corrales Ducuara
Bióloga, M.Sc., PhD.**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2022**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRESENTES EN LA
PLANTA DE TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS DEL ANTIGUO VERTEDERO
DE NAVARRO, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA**

**Ingrid Alejandra Pachón Soto
Maryory Vanessa Diazgranados Santos**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Microbióloga**

**Directoras
Alba Rocío Corrales Ducuara
Bióloga, M.Sc., PhD.**

**Línea de Investigación:
Microbiología Ambiental**

**Grupo de Investigación:
Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA)**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Cali, Colombia
2022**

IMPACTOS

Relación de los impactos que presentó el Trabajo de Grado

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Científico	Apropiación social del conocimiento, presentaciones en eventos: Participación en la elaboración de una cartilla (Anexo 1) Participación en eventos de carácter nacional: 2 (Anexo 2) Participación en eventos de carácter internacional: 2 (Anexo 3)	Comunidad científica
Tecnológico	Elaboración de video ponencia disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=Et_DAGcLb2I	Comunidad científica
Ambiental	Destrezas para la toma de muestras de interés ambiental Contribución con el conocimiento de la biodiversidad bacteriana que está presente en la zona de estudio para futuras investigaciones	Estudiantes y comunidad científica
Social	Participación en el Semillero de Investigación en Microbiología Ambiental	Estudiantes

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PRESENTES EN LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS DEL ANTIGUO VERTEDERO DE NAVARRO, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

Ingrid Alejandra Pachón Soto ^{1,5}, Maryory Vanessa Diazgranados Santos ^{2,4}, Alba Rocío Corrales Ducuara ^{3,5}, Doris Amanda Rosero García ⁴

¹ Estudiante Microbiología, ingrid.pachon00@usc.edu.co

² Estudiante Microbiología, maryory.diazgranados00@usc.edu.co,

³ Bióloga, M.Sc., PhD., alba.corrales00@usc.edu.co

⁴ Microbióloga, M.Sc., PhD, doris.rosero00@usc.edu.co

⁵ Grupo de Investigación en Microbiología Industria y Ambiente (GIMIA). Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

El estudio de la ecología ambiental es importante para comprender las funciones, aplicaciones y aprovechamiento de bacterias con capacidades metabólicas para degradar compuestos orgánicos; por lo tanto es importante caracterizar las bacterias que se pueden encontrar en diversos ambientes contaminados, que por medio de la identificación molecular se puede aportar información más precisa a la biodiversidad microbiana. Por lo tanto el presente estudio se identificaron bacterias cultivables de importancia ambiental en seis lagunas y un lixiviado puro que hacen parte de una Planta de Tratamiento de Lixiviados (PTL) ubicada en el Antiguo Vertedero de Navarro (AVN) en la ciudad Santiago de Cali. Se aislaron 46 morfotipos y fueron evaluados a partir de la amplificación del gen 16S (ARNr 16S) con los cebadores universales U1/U2. Se realizó el análisis de secuencias utilizando programas bioinformáticos y se registraron 4 *Phylum* principales Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidete y Actinobacteria de los cuales Firmicutes fue el más abundante. Además, se realizó un análisis de asociación y se observó que dos morfotipos estaban presentes en todas las lagunas muestreadas: fueron identificados como *Bacillus* sp., y *Bacillus mycoides*. Este estudio representa un avance en el reconocimiento de la biodiversidad bacteria en las seis lagunas que hacen parte de la Planta de Tratamiento (PTL) del Antiguo Vertedero de Navarro del (AVN); permitiendo obtener y generar 27 secuencias ARNr 16S de bacterias aisladas a partir de muestras de lixiviados de la PTL del AVN. Debido a que existen pocos estudios sobre la identificación molecular de bacterias ambientales en muestras de lixiviados, el presente trabajo constituye un primer reporte de especies bacterianas presentes en las seis lagunas y el lixiviado puro que hacen parte de la PTL, contribuyendo al conocimiento de la biodiversidad de bacterias cultivables que están presentes en la zona de estudio para la realización de futuras investigaciones.

Palabras clave: ARNr 16S, bacterias, planta de tratamiento de Lixiviados, biodiversidad, Colombia

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIA PRESENT IN THE LEACHATE TREATMENT PLANT OF THE OLD NAVARRO LANDFILL, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

ABSTRACT

The study of environmental ecology is important to understand the functions, applications and use of bacteria with metabolic capacities to degrade organic compounds; therefore it is important to characterize the bacteria that can be found in various contaminated environments, which through molecular identification more accurate information can be obtained on microbial biodiversity. Therefore, the present study identified cultivable bacteria of environmental importance in six lagoons and a pure leachate that are part of a Leachate Treatment Plant (LTP) located in the Old Navarro Sanitary Landfill (AVN) in the city of Santiago de Cali. Forty six morphotypes were isolated and evaluated from the amplification of the 16S gene (16S rRNA) with the universal primers U1/U2. Sequence analysis was performed using bioinformatics programs and 4 main *Phylum* Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidete and Actinobacteria were recorded, of which Firmicutes was the most abundant. In addition, an association analysis was performed and it was shown that two morphotypes were present in all the sampled ponds: they were identified as *Bacillus* sp., and *Bacillus mycoides*. This study represents an advance in the recognition of bacterial biodiversity in the six lagoons that are part of the Treatment Plant (PTL) of the Old Navarro Sanitary Landfill (AVN); Obtaining and generating 27 16S rRNA sequences from bacteria isolated from AVN PTL leachate samples. Because there are few studies on the molecular identification of environmental bacteria in leachate samples, this work constitutes a first report of bacterial species present in the six lagoons and pure leachate that are part of the PTL, contributing to the knowledge of biodiversity. Of cultivable bacteria that are present in the study area for future research

Keywords: 16S rRNA, bacteria, Leachate treatment plant, biodiversity, Colombia

1. INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos domiciliarios, hospitalarios e industriales concentrados en los vertederos generan una problemática ambiental; la mayoría de los residuos sólidos se tardan años en descomponerse y al momento de su descomposición el agua se filtra a través de estos, generando un líquido oscuro denominado lixiviado [1]. Este líquido contiene una gran carga de contaminantes y microorganismos patógenos, llegando a afectar los suelos, aguas y alterar la fauna; por ello se debe dar un tratamiento previo de los lixiviados. Actualmente, existen plantas de tratamiento de lixiviados que ayudan a amortiguar el impacto de estos contra el ambiente, estas implementan sistemas que conducen a almacenar y tratar aguas llevando a cabo diversos procesos [2], [3]. Los residuos de un vertedero se descomponen a través de las fases anaeróbicas y aerobias para ellos las plantas de tratamiento recurren a reacciones biológicas utilizando principalmente bacterias en la degradación de materia orgánica, ya que pueden adaptarse y colonizar cualquier ecosistema gracias a su capacidad metabólica para la degradación de compuestos orgánicos [2], [4]–[6].

En Colombia, son pocos los reportes asociados a la diversidad microbiana en Plantas de Tratamiento de Lixiviados. Estudios microbiológicos realizados en plantas de tratamiento de lixiviados han logrado identificar géneros y/o especies de interés ambiental, que han aportado información valiosa para la realización de futuras investigaciones, que permitan conocer cuál es el papel de estas bacterias en el hábitat donde se encuentran [2]. En este contexto la taxonomía bacteriana en estudios de diversidad, requieren el apoyo de otras técnicas de identificación que permitan visualizar diferentes caracteres como: los morfológicos, los ecológicos y los moleculares [7], [8]. Para desarrollar este tipo de estudios, se ha propuesto la amplificación del gen ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) de bacterias que ha generado un impacto significativo en la taxonomía bacteriana [6], [9], [10]. Permitiendo la identificación y registro de bacterias de importancia clínica por su patogenicidad a los humanos y ambiental por su capacidad de biosorción, bioacumulación y biotransformación tales como: *Klebsiella* sp. *Bacillus* sp. *Escherichia* sp. *Serratia* sp. *Enterobacter* sp [6], [11], [12] .

Por lo anterior, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo Caracterizar molecularmente bacterias cultivables en seis lagunas de la Planta de Tratamiento de Lixiviados (PTL) en el Antiguo Vertedero de Navarro (AVN), Santiago de Cali, Valle del Cauca. Este estudio representa un avance en el reconocimiento de la biodiversidad bacteria en estos ambientes.

2. MATERIALES Y METODOS

2.2 Área de muestreo

Las muestras fueron colectadas en el Antiguo Vertedero de Navarro (AVN) ubicado a 43 kilómetros de la ciudad de Cali (3°22'54"N 76°29'18"W). Para ello se realizó un muestreo en las lagunas 3, 4, 5, 6, 7, 8 y en una laguna de lixiviado puro de la PTL. El muestreo de lixiviados se llevó a cabo en tres etapas en los meses de septiembre y octubre del año 2019 y febrero del año [13].

2.3 Aislamiento de bacterias cultivables

Para el aislamiento de bacterias cultivables se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , tomando 10 uL del lixiviado puro más 90 mL de agua destilada estéril (10^{-1}). Posteriormente, se tomó 1mL más 9 mL de agua destilada estéril en cinco tubos de ensayo para obtener las diluciones 10^{-2} - 10^{-6} . Para el cultivo, se sembraron 100 uL en superficie de los tubos con diluciones 10^{-3} - 10^{-6} en Agar Nutritivo y se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de obtener el crecimiento se realizó la identificación de morfotipos bacterianos mediante caracteres de la taxonomía bacteriana tradicional, siendo parte de otro proyecto macro [14]. Evaluando el color, la textura, el borde, la forma, el tamaño y la superficie [15]. A cada morfotipo identificado se le asignó un número consecutivo para su registro en una base de datos elaborada en el programa Microsoft® Excel v. 2019. Adicionalmente, se realizaron caracterizaciones microscópicas, por medio de la coloración de Gram para clasificar los morfotipos en Gram positivos, Gram negativos o Gram variables [16] y se realizó tinción de esporas a las bacterias de morfología bacilar Gram positivas [17]. Los morfotipos bacterianos fueron conservados en 1 mL de caldo nutritivo y en medio Skim Milk almacenados a -20°C .

2.4 Identificación molecular a partir del gen ARNr 16S

La identificación molecular se realizó a partir de la extracción de ADN total usando, el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Se amplificó el ARNr 16S, utilizando los cebadores universales U1- 5CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3- U2 5-ATCGG(C/T) TACCTTGTTACGACTTC-3 [18]. El programa de amplificación se realizó a partir de una desnaturalización inicial a $95^{\circ}\text{C}/5'$, posteriormente una desnaturalización a $95^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, una alineación a $55^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, una extensión a $72^{\circ}\text{C}/2'$ (30 ciclos), finalmente se terminó con una extensión final a $72^{\circ}\text{C}/10$. El producto de amplificación se visualizó en geles de agarosa al 1% teñido con GelRed. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 60V. Posteriormente, los productos de PCR fueron enviados al servicio de secuenciación a Psomagen, New York, EE.UU Las secuencias obtenidas fueron editadas y evaluadas con el programa Geneious Pro9.1 [19].

2.5 Análisis de secuencias.

El análisis filogenético se realizó a partir de la comparación en las bases de datos GenBank y Ribosomal Database Project (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>) de las secuencias obtenidas que tuvieran un porcentaje de identidad superior al 97% [11]. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo ClustalW y se realizó un análisis filogenético con el mejor modelo utilizando el método estadístico Maximum likelihood, con el programa Mega 5.0 [20]. Se construyó un diagrama de Venn con la herramienta en línea, jvenn (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) y se visualizaron los morfotipos identificados para determinar qué especies predominan en cada laguna.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización molecular de bacterias cultivables del Antiguo Vertedero de Navarra

En total se obtuvieron 311 morfotipos, a partir de cada laguna se seleccionaron y se evaluaron 46 morfotipos con características morfológicas en común (Tabla 1) para el análisis molecular (Tabla 2). De estos, 20 morfotipos se encuentran asociados al género *Bacillus* sp. (60%), cuatro morfotipos corresponden al género *Pseudomonas* sp. (12%), cinco morfotipos corresponden al género *Exiguobacterium* sp. (16%), el 6% comprende los géneros *Alishewanella* sp. *Brevundimonas* sp. *Castellaniella* sp. *Serratia* sp., *Vibrio* sp. Y el 3% para otros géneros.

Tabla 1. Caracterización morfológica de los morfotipos presentes en las seis lagunas y un lixiviado puro del (AVN)

Morfotipo	Color	Textura	Borde	Forma	Tamaño	Superficie	Elevación	Coloración Gram	Temperatura	Humedad	pH
6	Blanco	Cremosa	Filamentoso	Rizoide	Grande	Rugosa	Plana	Estreptobacilos Grampositivos	27°C,30°C	55%,70%	8,9
7	Blanco	Cremosa	Filamentoso	Rizoide	Grande	Rugosa	Plana	Estreptobacilos Grampositivos	30°C	55%	9
13	Amarillo	Cremosa	Ondulado	Circular	Pequeño	Rugosa	Convexa	Bacilos Grampositivos	29°C	59%	9
17	Blanco	Cremosa	Regular	Circular	Mediano	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	30°C,32°C	55%	8.12
33	Blanco	Algodonosa	Filamentoso	Irradiada	Mediano	Rugosa	Convexa	Bacilos Gram variables	29-31°C	49-59%	9,10
36	Indeterminado	Cremosa	Regular	Circular	Mediano	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	22°C-33°C	49%-94%	8-12
38	Blanco	Cremosa	Ondulado	Irregular	Mediano	Rugosa	Plana	Bacilos Grampositivos	22-32°C	52-94%	8-12
39	Rosado	Cremosa	Regular	Circular	Pequeño	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	22°C-30°C	55-94%	8-10
40	Blanco	Cremosa	Filamentoso	Rizoide	Mediano	Lisa	Convexa	Cocos Grampositivos	32°C	50%	11
42	Blanco	Cremosa	Irregular	Circular	Grande	Lisa	Convexa	Bacilos Gram variables	31°C,32°C	50%,50%	10,11
43	Incoloro	Cremosa	Ondulado	Circular	Grande	Lisa	Convexa	Cocos Grampositivos	32°C	50%	11
46	Amarillo	Cremosa	Regular	Circular	Pequeño	Lisa	Convexa	Bacilos Gram variables	23-33°C	49-89%	8-12
50	Blanco	Algodonosa	Irradiado	Circular	Grande	Rugosa	Convexa	Bacilos Grampositivos	23-30°C	55%-70%	8-12
55	Amarillo	Cremosa	Regular	Circular	Pequeño	Lisa	Convexa	Cocos Grampositivos	26°C,32°C	50%,75%	9,11
56	Amarillo	Cremosa	Regular	Puntiforme	Pequeño	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	22°C-32°C	55%-94%	8-12
63	Blanco	Cremosa	Entero	Puntiforme	Pequeño	Lisa	Plana	Bacilos Grampositivos	23-33°C	49-89%	8-12
65	Blanco	Cremosa	Regular	Puntiforme	Pequeño	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	29-32°C	50-59%	8-11
97	Rojo	Cremosa	Entero	Circular	Pequeño	Lisa	Plana	Bacilos Grampositivos	32°C	60%	9
107	Blanco	Algodonosa	Ondulado	Circular	Pequeño	Lisa	Plana	Estafilococos Grampositivos	31°C	52%	10
120	Amarillo	Cremosa	Irregular	Circular	Mediano	Lisa	Convexa	Bacilos Gram variables	29°C	59%	9
133	Incoloro	Cremosa	Regular	Puntiforme	Pequeño	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	22°C, 32°C	50%-94%	8-11
202	Beige	Cremosa	Entero	Circular	Mediano	Lisa	Convexa	Bacilos Gramnegativos	32°C	60%	9
265	Blanco	Cremosa	Filamentoso	Rizoide	Grande	Lisa	Convexa	Bacilos Grampositivos	22°C	94%	10
298	Beige	Cremosa	Entero	Circular	Pequeño	Lisa	Plana	Bacilos Grampositivos	29°C,28°C	67%,69%	10
53	Naranja	Cremosa	Regular	Circular	Pequeño	Lisa	Convexa	Cocobacilos Grampositivos	22°C.33°C	49%,94%	10
275	Blanco	Cremosa	Entero	Circular	Mediano	lisa	Plana	Estreptococos Grampositivos	32°C	55%	8
99	Blanco	Cremosa	Indeterminado	Indeterminado	Mediano	Lisa	Plana	Estreptobacilos Grampositivos	27°C	69%	9

Tabla 2. Identificación molecular a partir del gen ARNr 16S de los 46 morfotipos presentes en las seis lagunas y un lixiviado puro del (AVN)

Morfotipo	Laguna	Identificación Molecular	% similitud	Código GenBank
M6	L6-L8	<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	98.57%	MK530128.1
M7	L7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100.00%	CP076539.1
M13	L6	<i>Microbacterium barkeri</i>	98.71%	MT214325
M17	LP-L8	<i>Vibrio harveyi</i>	95.35%	FJ227111.1
M23	L3-L4-L8	<i>Bacillus sp.</i>	93.32%	KX099270.1
M33	L4-L5-L6	<i>Pseudomonas sp.</i>	87.94%	EF554921
M36	L3-L4-L7-LP	<i>Brevibacterium frigiditolerans</i>	95.65%	MT065803.1
M38	L3-L4-L5-L6-L7-L8-LP	<i>Bacillus mycooides</i>	96.49%	KP685409.1
M39	L6-L7-L8	<i>Bacillus infantis</i>	97.50%	KU922247
M40	L7	<i>Rheinheimera sp.</i>	90.91%	HM104373.1
M42	L5-L7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	97.66%	MN190172.1
M43	L7	<i>Alishewanella solinquinati</i>	97.26%	NR_125524.1
M44	L7	<i>Exiguobacterium sp.</i>	85.59%	X70316
M46	L3-L4-L6-L8-LP	<i>Pantoea eucrina</i>	96.89%	: MN889276.1
M50	L3-L6-L8	<i>Alishewanella aestuarii</i>	98.34%	NR_044344.1
M53	L4-L7	<i>Pedobacter cryoconitis</i>	95.13%	AM237384.1
M55	L7-L8	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99.08%	MT373550.1
M56	L3-L6-L7-L8-LP	<i>Exiguobacterium sp.</i>	85.91%	MT544587.1
M61	L4-L7-LP	<i>Bacillus sp.</i>	86.06%	KP119811.1
M63	L3-L4-L5-L7-L8-LP	<i>Serratia sp.</i>	93.89%	KY964302.1
M65	L5-L6-L7-LP	<i>Bacillus sp.</i>	92.03%	MT795778.1
M73	L4-L7-L8	<i>Bacillus sp.</i>	81.38%	KT150176.1
M75	L3-L5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	95.35%	MK007478.1
M90	L4	<i>Bacillus sp.</i>	85.03%	MN309835.1
M96	L4	<i>Bacillus sp.</i>	93.03%	MG988257.1
M97	LP	<i>Serratia marcescens</i>	97.44%	KJ626362.1
M99	L4	<i>Brevundimonas sp.</i>	92.18%	KM502881.1
M104	LP	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	96.08%	KT380509.1
M105	LP	<i>Bacillus sp.</i>	92.51%	MT795779
M107	L6	<i>Halomonas sp.</i>	93.69%	JQ946335.1
M117	L4	<i>Bacillus infantis</i>	98.00%	MH005066.1
M120	L6	<i>Bacillus cereus</i>	99.07%	KX146483
M123	L7	<i>Exiguobacterium sp.</i>	93.79%	KC699817
M133	L7-L4	<i>Castellaniella denitrificans</i>	97.04%	MN538892.1
M134	L7-LP-L3	<i>Bacillus sp.</i>	89.60%	MT542335.1
M137	L4	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	99.17%	MT373550.1
M151	LP	<i>Bacillus sp.</i>	88.96%	MT795778
M193	L8	<i>Bacillus sp.</i>	92.16%	FJ654442.2
M198	L3	<i>Bacillus sp.</i>	92.32%	MG984581.1
M202	LP	<i>Enterobacter sp.</i>	91.78%	KY271632.1
M250A	L8	<i>Bacillus sp.</i>	87.15%	MT795778.1
M262	L6-L7	<i>Castellaniella denitrificans</i>	98.32%	MN538892.1
M263A	L3-L4-L5-L7-L8-LP	<i>Bacillus sp.</i>	90.01%	MT795778.1
M265	L7	<i>Bacillus pumilus</i>	95.68%	MZ359964.1
M275	LP	<i>Morganella sp.</i>	85.32%	CP061513.1
M298	L6-L5	<i>Vibrio sp.</i>	85.65%	MH298567.1

L: Laguna Lp: Lixiviado puro

3.2 Abundancia relativa de *Phylum* de bacterias en cada laguna

El estudio de abundancia mostro cuatro *Phylum* bacterianos característicos en estos ambientes como; (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidete y Actinobacteria), teniendo en cuenta la abundancia promedio (\bar{x}) de cada *Phylum*, se observó que Firmicutes fue el más abundante ($\bar{x} = 50\%$); seguido Proteobacteria ($\bar{x} = 43\%$), Bacteroidete ($\bar{x} = 2\%$) y Actinobacteria ($\bar{x} = 5\%$). Con base a la abundancia relativa a nivel taxonómico de *Phylum* por cada laguna del AVN, se determinó que la laguna 8 presenta el mayor porcentaje con una abundancia del 71% de Firmicutes, le sigue la laguna 5 con un porcentaje de 67% de Proteobacteria. Por otro lado las lagunas 3, 4, 6, 7 y el Lixiviado Puro, presentaron especies asociadas al *Phylum* Actinobacteria, y las lagunas 4 y 7 fueron las únicas lagunas que presentaron especies del *Phylum* de Bacteroidete. (Figura 1).

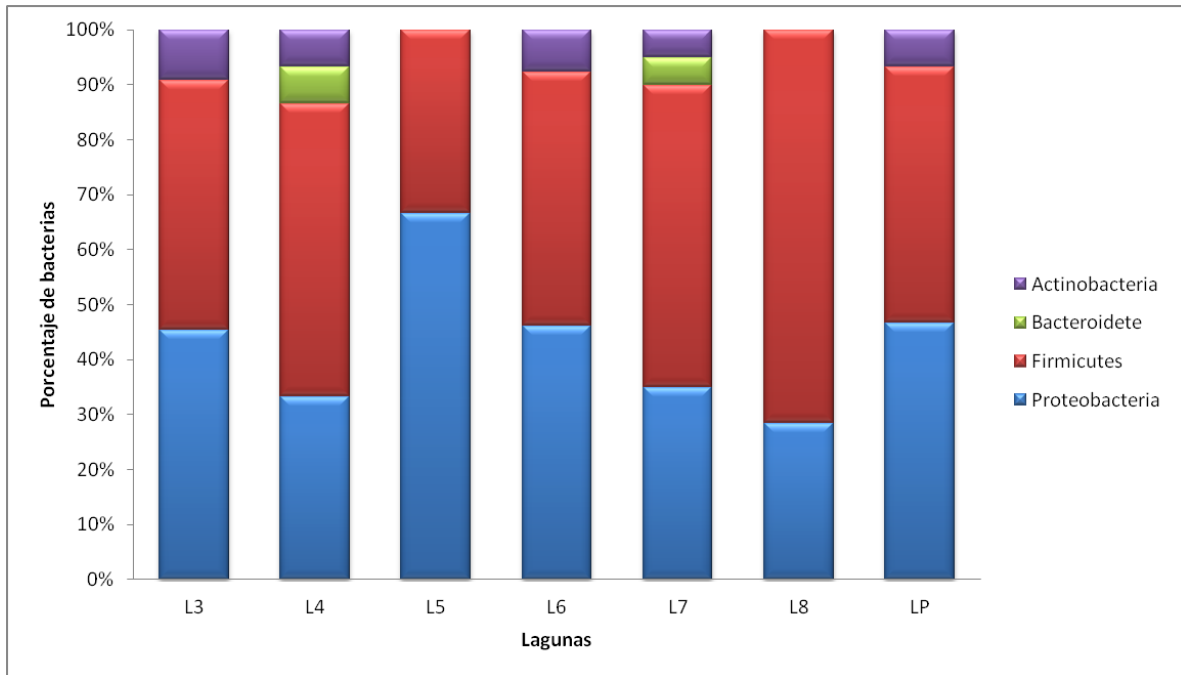


Figura 1. Abundancia relativa (%) promedio por cada laguna del Antiguo Vertedero de Navarra

3.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético de las especies identificadas en la diferentes lagunas mostro siete clados principales dentro de los cuales fueron agrupados en cuatro *Phylum* (Proteobacterias, Firmicutes, Actinobacteria y Bacteroidete). El *Phylum* Proteobacteria incluye los géneros *Serratia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Rheinheimera*, *Alishewanella*, *Castellaniella*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Morganella* y *Vibrio*; por otra parte, el grupo perteneciente al *Phylum* Firmicutes presentó morfotipos representativos del género *Bacillus*, y *Exiguobacterium*. El *Phylum* Actinobacteria correspondió a representante del género *Brevundimonas*, y *Microbacterium*; y por el último Bacteroidete albergó un representante *Pedobacter*.

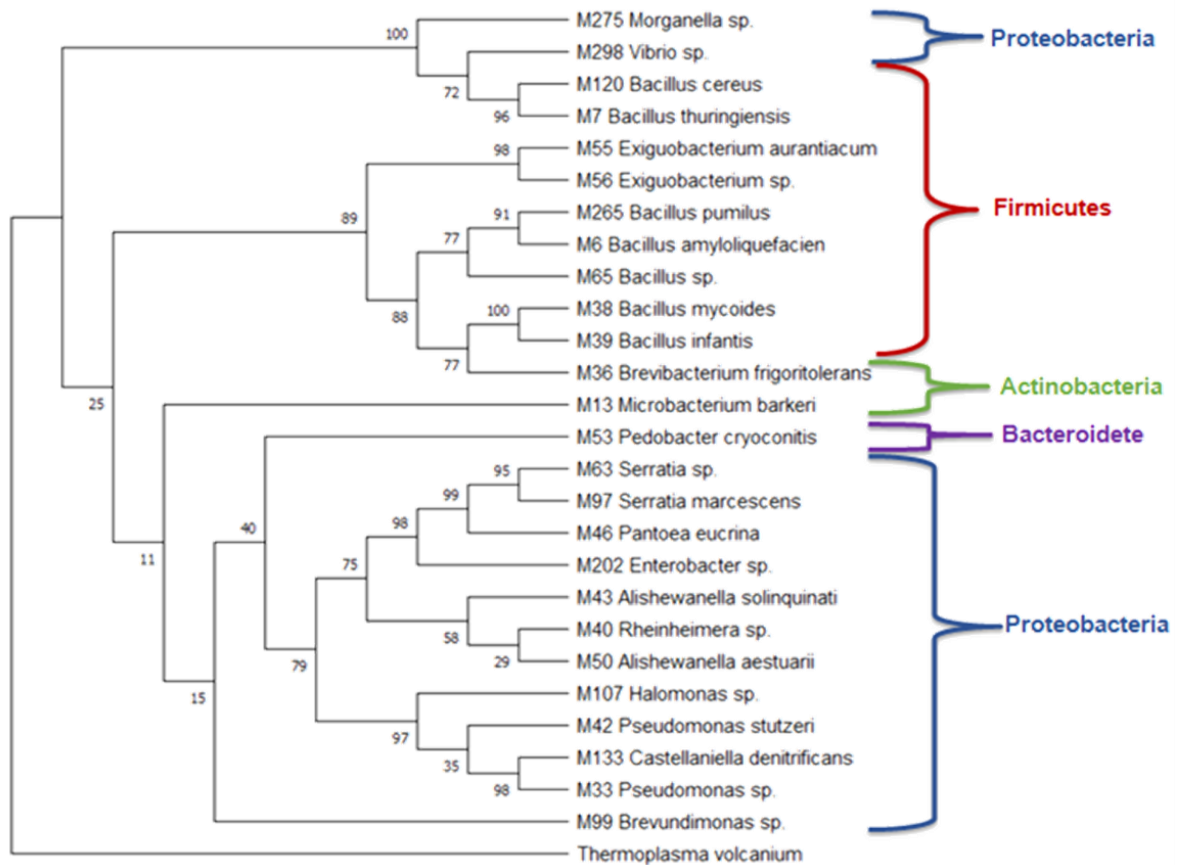


Figura 2. Árbol filogenético de especies bacterianas identificadas en seis lagunas y lixiviado puro de la Planta de Tratamiento de Lixiviado del AVN. El árbol fue realizado con 27 secuencias amplificando el gen ARNr 16S por el método estadístico Máximum likelihood.

3.4 Análisis de correlación

Para determinar la correlación entre la diversidad microbiana identificada en cada una de las lagunas se realizó un análisis a partir de diagramas de Venn, de las 27 secuencias evaluadas se encontraron cuatro géneros y 11 especies bacterianas (Figura 3). Se destacó un género y una especie en las seis lagunas la cual fue *Bacillus mycoides* y *Bacillus* sp. Por otra parte se determinaron los géneros; *Brevundimonas*, *Vibrio*, *Rheinheimera*, *Halomonas*, y las especies: *Pedobacter cryoconitis*, *Bacillus cereus*, *microbacterium barkeri*, *Alishewanella solinquinati*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Vibrio harveyi*, *Bacillus amyloliquefacien*; representantes que predominan en cada laguna y en más de una laguna (Tabla 3).

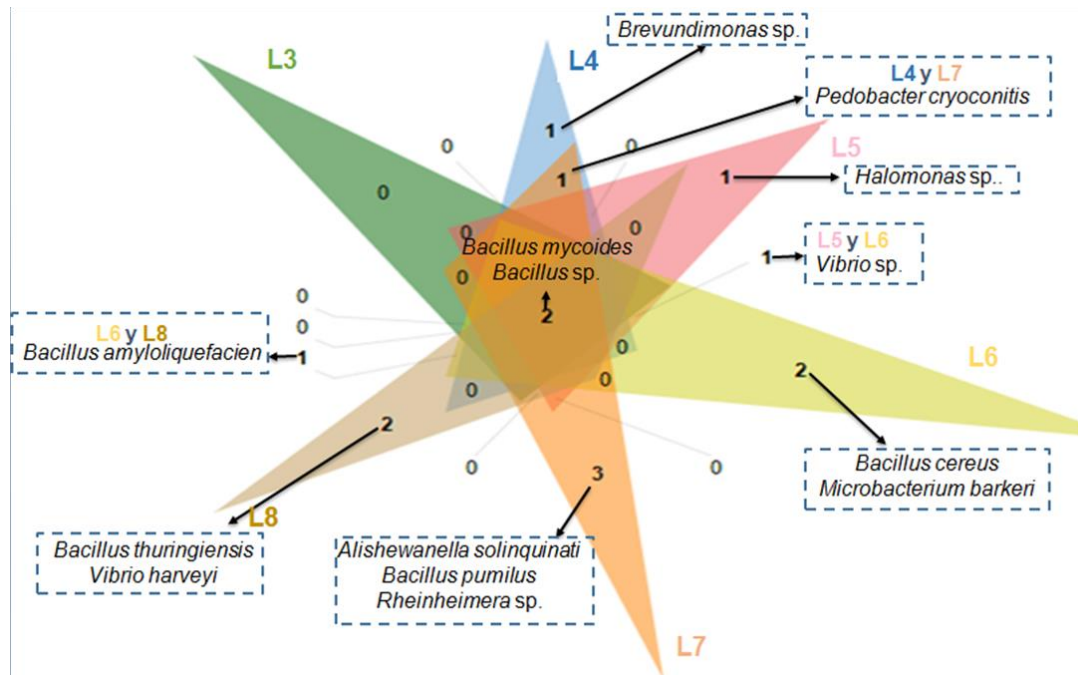


Figura 3. Diagrama de Venn de especies bacterianas identificadas en seis lagunas de la Planta de Tratamiento de Lixiviado del AVN. Los valores representan la distribución en abundancia relativa. Este análisis fue realizado por medio de la herramienta en línea Jvenn.

Tabla 3. Bacterias asociadas a cada laguna de la PTL del AVN

Lagunas	Bacterias más relevantes en cada laguna
L4	<i>Brevundimonas sp.</i>
L5	<i>Halomonas sp.</i>
L6	<i>Bacillus cereus</i> <i>Microbacterium barkeri</i>
L7	<i>Alishewanella solinquinati</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Rheinheimera sp.</i>
L8	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Vibrio harveyi</i>
Lagunas	Bacterias más relevantes en más de una laguna
L4 y L7	<i>Pedobacter cryoconitis</i>
L5 y L6	<i>Vibrio sp.</i>
L 6 y L8	<i>Bacillus amyloliquefacien</i>
L3,L4,L5,L6,L7,L8	<i>Bacillus mycooides</i> <i>Bacillus sp.</i>

4. DISCUSIÓN

El estudio de la biodiversidad microbiana juega un papel clave para poder comprender funciones, aplicaciones y aprovechamiento de los microorganismos; existen lugares donde pueden crecer bacterias con capacidad de tolerar ambientes extremos, siendo de gran importancia la identificación de bacterias en zonas contaminadas [5], [7], [21]. Colombia, es uno de los países megadiversos del mundo, pero a pesar de abundancia biológica. Sin embargo, carecemos de datos robustos asociados a la diversidad microbiana. Existen lugares en donde aún se desconoce cuáles son los géneros y/o especies que están presentes, para el caso particular de Colombia de acuerdo con lo reportado en el sistema de información sobre biodiversidad Colombiana (SiB Colombia) el número de bacterias identificadas es de 100 especies [22]. Pero esta información encontrada en el SiB Colombia no contiene la amplia biodiversidad bacteriana. Específicamente para el Valle del Cauca, se conoce un listado de especies del Distrito Regional de Manejo Integrado-DRMI realizado para la Laguna de Sonso y corresponde a nueve registros de bacterias con interés ambiental, pero solo identificados hasta el nivel de género, correspondientes a la Clase Cyanophyceae distribuidos en los Órdenes Chroococcales, Nostocales y Oscillatoriales y en las Familias Chroococcaceae, Nostocaceae y Oscillatoriaceae respectivamente [23]. Por lo tanto es de importancia identificar qué géneros y especies de bacterias habitan en los diferentes ambientes para contribuir a estudios de ecología bacteriana, biorremediación y otros; en el presente estudio se evidenció la biodiversidad de bacterias que habitan en zonas contaminadas como lo es la PTL del AVN.

El análisis de abundancia a nivel *Phylum*, se observó que en mayor abundancia predominan, Firmicutes y Proteobacterias y en menor abundancia, Actinobacteria y Bacteroidete. Generalmente cuando se hacen estudios de biodiversidad en ambientes contaminados estos cuatro *Phylum* son los más comunes asociadas a la descomposición y remoción de materia orgánica [24], [25].

En la comparación de la abundancia en cada laguna, el porcentaje más alto de abundancia lo tiene la laguna 8 con el 71% de Firmicutes, esta laguna tiene como función realizan el proceso de extracción y purificación de los diferentes componentes de todos los lixiviados de las demás lagunas, siendo este *Phylum* bacteriano el más común en ambientes extremos, agrupando géneros bacterianos con capacidad de tolerar y metabolizar diferentes compuestos [5], [26]. La laguna 5 tiene un 63% de proteobacterias, esta laguna tiene como función recolectar los lixiviados sin tratamiento; el *Phylum* proteobacteria es posible encontrarlo en este ambiente debido a su alta eficiencia en degradar materia orgánica [27], [28]. En cuanto al *Phylum* Bacteroidete, está presente solo en la laguna 4 y 7, la laguna 4 realiza el proceso de cristalización y remoción, y la laguna 7 tiene como función colectar los lixiviados; el *Phylum* Bacteroidete, asociados principalmente con la degradación de materia orgánica pero existen pocos estudios de este *Phylum* en ambientes contaminados siendo de importancia para futuras investigaciones. El *Phylum* Actinobacteria se ha reportado por tener una gran capacidad de formar una amplia variedad de metabolitos bioactivos, encontrados en diversos ambientes [29], [30]. Este *Phylum* estuvo presente en las lagunas 3, 4, 6, 7, y LP teniendo cada una funciones diferentes; para las lagunas 3, LP y la laguna 7 son las encargadas de recolectar los lixiviados sin tratamiento, para las laguna 4 realiza el proceso de cristalización y remoción, y la laguna 6 tiene un proceso de evaporación.

El análisis filogenético mostro cuatro clados principales, dentro de estos los *Phylum* más predominantes fueron Proteobacterias y Firmicutes . Dentro del *Phylum* Proteobacteria se destacan miembros del género *Serratia*, *Halomonas*, *Pseudomonas* [31], [32] reportadas como bacterias desnitrificantes [31], [33], [34]. Para el *Phylum* Firmicutes, se observó miembros del género *Bacillus* y *Exiguobacterium* están asociados principalmente a la bioacumulacion de metales pesados [35], [36]. Con respecto a los *Phylum* Actinobacteria y Bacteroidete mostraron una menor abundancia, asociándose a géneros como *Brevibacterium* y *Microbacterium* que han sido utilizados en biorremediación de metales pesados de cadmio (cd), cromo (cr) y mercurio (hg) [37]. Al igual que el género *Pedobacter* que es considerado un género psicrófilo y ha sido identificado como biodegradador de hidrocarburos [38]

Estudios de diversidad bacteriana en zonas con alta producción de lixiviados han mostrado que especies como; *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. Capaces de producir biosurfactantes por lo tanto participan en procesos de remoción de contaminantes, también en procesos de nitrificación y desnitrificación en fases termófilas [35], [39]. Por otra parte, especies como *Serratia* sp; *Halomonas* sp. han mostrado que estas especies juegan un papel importante en *degradación y mineralización de compuestos orgánicos gracias a que también cuentan con la* capacidad de producir biosurfactantes estimulando su adaptabilidad y el potencial para degradarlos, son bacterias desnitrificantes, bioacumula y biotransforma metales pesados, remoción de nitratos y metabolización de cianuro [5] .

En Colombia, son pocos los reportes asociados al estudio de la diversidad bacteriana en plantas de lixiviados. En el presente estudio se han identificado nuevos géneros bacterianos en los lixiviados de la PTL del AVN. pero debido a la falta de información de bacterias en este tipo de matrices ambientales se ha recurrido a los reportes

de investigaciones de diversidad bacteriana cultivable en aguas residuales ya que estas también son zonas contaminadas por actividades, industriales, mineras, agrícolas, domésticas entre otras, conteniendo desechos orgánicos e inorgánicos que pueden albergar consorcios bacterianos de interés ambiental. La mayoría de estudios se centran solo a la identificación de especies bacterianas, en zonas donde se presenta mayor concentración de aguas residuales donde se han reportado especies como; *Serratia* sp., *Halomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., (*Exiguobacterium* sp., *Alishewanella* sp., *Brevundimonas* sp., *Castellaniella* sp., *Vibrio* sp., *Microbacterium* sp., *Pantoea* sp., *Pedobacter* sp., *Morganella* sp., *Rheinheimera* sp., *Brevibacterium* sp). Adicionalmente, otras especies bacterianas se han reportado en proyectos de restauración ecológica, principalmente en procesos de biorremediación debido a su potencial metabólico, muchos de los géneros identificados tienen capacidad desnitrificante como *Alishewanella* sp, *Morganella* sp [40], [41]. fitobiorremediadoras: *Brevundimonas* sp [42]. Bioindicadores: *Vibrio* sp [43]. Capacidad de degradación de microplásticos: *Microbacterium* sp [44]. También se localizaron algunos géneros de bacterias donde se han utilizado en crecimiento vegetal: *Pantoea* sp [45]. Producción de anti-fúngicos: *Pedobacter* sp [46]. Productoras de lipopéptidos que tienen actividad antibacteriana contra gram-negativos: *Exigobacterium* sp [40]. Esta información permite tener una primera aproximación de las comunidades bacterianas cultivables presentes en estas zonas contaminadas, que podrían beneficiar y complementar proyectos que implementen procesos para la transformación de ambientes alterados, partiendo de la importancia de estudiar las funciones de estas bacterias en estos nichos, y sus posibles aplicaciones en biotecnología para el tratamiento de zonas afectadas por compuestos tóxicos.

Teniendo en cuenta los resultados del presente estudio, se encontró que el género que más predomina es *Bacillus* sp. Siendo uno de los géneros más utilizado en procesos de biorremediación gracias a la tolerancia a metales pesados, dada la capacidad que tienen de producir exopolisacáridos son capaces de quelar este tipo de metales, siendo útiles en la desintoxicación de ambientes contaminados [36], [47]. Otro resultado destaca que la especie *Bacillus mycoides* estuvo presente en todas las lagunas; estos microorganismos se ha utilizado en ensayos de biodegradabilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y en la biosolubilización del lignito gracias a la capacidad que tiene de producir biosurfactante principalmente a temperaturas elevadas [48]. También se han encontrado numerosas especies del género *Bacillus*, con lo cual se sugiere debería dividirse en al menos cinco géneros o grupos de ARNr, entre este grupo se encuentra la especie *Bacillus mycoides*, ya que posee secuencias de ARNr 16S y 23S muy similares, lo que indica que se ha separado recientemente de una línea evolutiva relativamente común [49]. Otros estudios consideran que posiblemente varias especies del género *Bacillus* podrían ser consideradas como una sola especie, entre estos *Bacillus mycoides* (*B. cereus* sensu stricto (s.s.), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*) [50]. Por lo cual junto con otras especies (*Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*,) del género *Bacillus*, *Bacillus mycoides*, ha sido clasificado dentro de un grupo denominado Grupo B [51]. Sin embargo son pocos los reportes de investigaciones de *Bacillus mycoides*, por ello se requieren estudios que permitan conocer su descendencia evolutiva, y función en nichos específicos, para futuros estudios donde se pueda emplear en diferentes procesos biotecnológicos.

Debido también a que existen pocos estudios sobre la identificación molecular de bacterias ambientales en muestras de lixiviados, los resultados obtenidos en este estudio constituyen un primer reporte de especies bacterianas presentes en las seis lagunas y el lixiviado puro que hacen parte de una PTL del ANV en la ciudad Santiago de Cali, aportando información valiosa para la realización de futuras investigaciones.

5. CONCLUSIÓN

El desarrollo de este trabajo permitió La identificación de cuarenta y seis bacterias provenientes de la PTL del AVN. Constituyendo un primer acercamiento para conocer cuáles y cuántas especies de bacterias cultivables están presentes en la zona de estudio teniendo en cuenta que en la literatura investigada son pocos los reportes de estos aislamientos en las PTL, por consiente este estudio implica un aporte importante de interés ambiental para futuras investigaciones

- Los cuatro *Phylum* con mayor predominancia en las seis lagunas fueron; Proteobacteria, Firmicutes Actinobacteria y Bacteroidete siendo los cuales fueron importantes ya que son los más comunes en estos ambientes contaminados
- El género *Bacillus* sp. presenta mayor abundancia, estando presente en todas las lagunas; estos géneros son los más tolerantes en ambientes hostiles y con capacidad de degradar hidrocarburos

- La especie *Bacillus mycoides* estuvo presente en todas las lagunas siendo un posible bioindicador de contaminación ambiental y morfotipo de referencia para este tipo de ambientes

Recomendaciones

Se sugiere secuenciar el genoma completo para obtener resultados precisos y de alta calidad a nivel de especie para este tipo de muestras ambientales

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Santiago de Cali, proyecto código: 934-621119-319. Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Minciencias, Colombia, Convocatoria 811-2018 estancia postdoctoral (DRG). Empresa de Servicio Público de Aseo de Cali-EMSIRVA E.S.P. en Liquidación por la autorización para el ingreso para la toma de muestras en el AVN. Agradecimiento a Isabella Vergara, María Alejandra Rentería, Alejandro Ortiz, Maryuris Machacado Salas, Diana Carolina Rache Arce, por el apoyo en la toma de muestra y trabajo en el laboratorio

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Zuluaga, "Evaluación del tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios mediante cavitación hidrodinámica," *Univ. Nac. Colomb. sede Manizales*, p. 97, 2019.
- [2] P. F. Garcia, "Manejo y Tratamiento de Lixiviados en Rellenos Sanitarios: Revisión bibliográfica y Experiencia en Planta de Tratamiento de Lixiviados de Navarro," pp. 1–15, 2019, [Online]. Available: https://repository.usc.edu.co/bitstream/handle/20.500.12421/677/MANEJO_Y_TRATAMIENTO.pdf;jsessionid=A73B0104E6C2880A2AEB29F2EA66FDCA?sequence=1.
- [3] S. de S. P. Domiciliarios, "Disposición Final de Residuos Sólidos Informe Nacional," 2017. [Online]. Available: https://www.superservicios.gov.co/sites/default/archivos/SSPD_Publicaciones/Publicaciones/2018/Oct/informedisposicionfinalano2015-sspd1.pdf.
- [4] S. Ríos, R. Agudelo, and L. Gutiérrez, "Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano," *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, vol. 35, no. 2, pp. 236–247, 2017, doi: 10.17533/udea.rfnsp.v35n2a08.
- [5] R. Castillo, F. More, M. Cornejo, J. Fernández, and E. Mialhe, "Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui – Amazonas – Perú," vol. 22, no. 3, pp. 215–225, 2020, [Online]. Available: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v22n3/2313-2957-ria-22-03-215.pdf>.
- [6] G. Ramírez, "Biodegradación de Residuos Industriales mediante la bacteria *Bacillus licheniformis*," 2017.
- [7] A. Maldonado, L. López, S. Lores, and E. Osorio, "Identificación morfológica de hongos y bacterias en lodos de extracción de gas natural y de tratamiento de aguas residuales," *Temas Cienc. Y Tecnol.*, vol. 21, no. 62, pp. 3–12, 2017, [Online]. Available: http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas62/index.html.
- [8] C. Molinares-Pacheco, J. M. Muñoz-Morales, A. Carbajal-Armenta, A. L. Hernández-Tenorio, A. Cueto-Becerra, and J. Muñoz-Rojas, "Métodos de identificación molecular para *Gluconacetobacter diazotrophicus*," *Alianzas y Tendencias BUAP*, vol. 6, no. 21, pp. 28–44, 2021, [Online]. Available: <https://www.aytbuap.mx/aytbuap-621/métodos-de-identificación-molecular-para-gluconacetobacter-diazotrophicus>.
- [9] L. Y. Suárez-Contreras and L. F. Yañez Meneces, "16S rRNA as an applied tool in the molecular characterization of genera and species of bacteria," vol. 25, pp. 127–136, doi:

<https://doi.org/10.22463/0122820X.2419>.

- [10] S. Valenzuela and J. Oswaldo, "Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador," *Cienc. ergo sum*, vol. 25, no. 1, pp. e4-1-e4-11, 2018, doi: 10.30878/ces.v25n1a5.
- [11] K. Bedoya, S. del pilar López, C. Peláez, and J. Acevedo, "The characterization of biosolids produced by the San Fernando wastewater treatment plant in Itagui, Antioquia, Colombia," *Rev. Salud Pública*, vol. 15, no. 5, pp. 778–790, 2013.
- [12] L. Silva, "Diversidad bacteriana asociada a una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) y estudio de microorganismos presentes involucrados en la degradación de ácidos grasos," pp. 1–78, 2015, [Online]. Available: <http://bdigital.unal.edu.co/51933/1/1130665970.2015.pdf>.
- [13] R. Baird, A. D. Eaton, E. W. Rice, and L. Bridgewater, *Standard methods for the examination of water and wastewater, 23rd edition*. 2017.
- [14] A. Ortiz, L. Vergara, and D. Rosero, "TAXONOMÍA INTEGRATIVA DE BACTERIAS AMBIENTALES ISOLADOS UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE LIXIVIADOS, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA," vol. 1, p. 2675, 2020.
- [15] C. Espinosa *et al.*, "Análisis del comportamiento de los lixiviados generados en un vertedero de residuos sólidos municipales de la ciudad de la Habana," vol. 26, no. 4, pp. 313–325, 2010.
- [16] A. C. Smith and M. A. Hussey, "Gram stain protocols," *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 1, no. September 2005, p. 14, 2005, [Online]. Available: <https://www.asm.org/getattachment/5c95a063-326b-4b2f-98ce-001de9a5ece3/gram-stain-protocol-2886.pdf>.
- [17] G. Bou, A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto, and S. Valdezate, "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 29, no. 8, pp. 601–608, 2011, doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
- [18] J. J. Lu, C. L. Perng, S. Y. Lee, and C. C. Wan, "Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 6, pp. 2076–80, Jun. 2000, doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2076-2080.2000>.
- [19] M. Kearse *et al.*, "Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data," *Bioinformatics*, vol. 28, no. 12, pp. 1647–1649, Jun. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- [20] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "Biología molecular y evolución." pp. 2731–2739, 2011.
- [21] V. Rinardo, "Microorganismos extremófilos. Psicrófilos y sus mecanismos de adaptación," *Publicaciones Didácticas*, vol. 96, pp. 622–628, 2018, [Online]. Available: <https://core.ac.uk/download/pdf/235852344.pdf>.
- [22] Biodiversidad en cifras, "SiB Colombia recuperado de [<https://cifras.biodiversidad.co/>]," 2016. .
- [23] M. Sarrias, s. Salazar, "Listado de especies del Distrito Regional de Maanejo-DRMI Laguna de Sonso, Valle del Cauca," *Corporación Autónoma Reg. del Val. del Cauca*, 2018, doi: 10.15472.
- [24] C. Fernández *et al.*, "Detection of sentinel bacteria in mangrove sediments contaminated with heavy metals," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 150, no. April 2019, p. 110701, 2020, doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.110701.
- [25] J. Gayo, "Respuesta de las poblaciones microbianas de los suelos contaminados con metales pesados a tratamientos de descontaminación con nanopartículas," UNIVERSIDAD DE OVIEDO, 2018.
- [26] B. Luna and L. Vergara-gonz, "Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua," vol. 30, no. 2, pp. 1–9, 2021.

- [27] E. Sforzaa, M. Pastorea, S. Santeufemia, and A. Bertuccob, "Bioresource Technology Reports Bioaugmentation as a strategy to enhance nutrient removal : Symbiosis between *Chlorella protothecoides* and *Brevundimonas diminuta*," *Bioresour. Technol. Reports*, vol. 4, no. October, pp. 153–158, 2018, doi: 10.1016/j.biteb.2018.10.007.
- [28] I. E. Paz Narváez and J. C. Menjivar Flores, "Efecto del compost en la diversidad de bacterias rizosféricas del cultivo de morera (*Morus alba*)," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 47–56, 2019, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.79971.
- [29] E. L. Revollo Escudero, O. D. Serna Daza, and J. Hernández Torres, "Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. 14, no. 2, pp. 70–80, 2012.
- [30] R. B. Parada, E. R. Marguet, and M. Vallejo, "Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes Isolation and partial characterization of soils actinomycetes with antimicrobial activity against multidrug-resistant bac," *Rev. Colomb. Biotecnol.*, vol. XIX, no. 2, pp. 15–23, 2017.
- [31] A. Rajta, R. Bhatia, H. Setia, and P. Pathania, "Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 128, no. 5, pp. 1261–1278, 2020, doi: 10.1111/jam.14476.
- [32] E. A. Romero-Salas *et al.*, "Changes in the bacterial community structure in soil under conventional and conservation practices throughout a complete maize (*Zea mays* L.) crop cycle," *Appl. Soil Ecol.*, vol. 157, no. October 2019, p. 103733, 2021, doi: 10.1016/j.apsoil.2020.103733.
- [33] V. López-Ramírez, M. A. Márquez-Godoy, and C. X. Moreno-Herrera, "Characterization of bacterial diversity and assessing the cyanide biodegradation potential of bacterial isolates from gold processing plants," *DYNA*, vol. 88, no. 216, pp. 136–144, 2021, doi: 10.15446/dyna.v88n216.87767.
- [34] K. Okaiyeto, U. U. Nwodo, L. V. Mabinya, and A. I. Okoh, "Characterization of a bioflocculant produced by a consortium of *Halomonas* sp. Okoh and *Micrococcus* sp. Leo," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 10, no. 10, pp. 5097–5110, 2013, doi: 10.3390/ijerph10105097.
- [35] N. Mayorca, "Reducción de la carga orgánica en lixiviado estabilizado del botadero Municipal de San Ramon mediante oxidación," *Univ. Nac. Agrar. I a selva*, p. 149, 2017.
- [36] A. Santana-flores, A. Sánchez-ayala, and Y. Romero-ramírez, "Aislamiento e identificación de bacterias tolerantes y bioacumuladoras de metales pesados , obtenidas de los jales mineros El Fraile , México Identification and isolation of heavy-metal tolerant and bioaccumulator bacteria obtained from El Fraile mine tai," pp. 67–75, 2019.
- [37] M. E. Beltrán-Pineda and A. M. Gómez-Rodríguez, "Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión," *Rev. Fac. Ciencias Básicas*, vol. 12, no. 2, pp. 172–197, 2016, doi: 10.18359/rfcb.2027.
- [38] R. Margesin, C. Spröer, P. Schumann, and F. Schinner, "*Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 53, no. 5, pp. 1291–1296, 2003, doi: 10.1099/ijs.0.02436-0.
- [39] U. Eleonora, H. Nájera, and R. Gutiérrez, "EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE CARGA ORGÁNICA EN LIXIVIADOS MADUROS MEDIANTE UN SISTEMA ACOPLADO: COAGULACIÓN-FLOCULACIÓN-OXIDACIÓN ANÓDICA EVALUATION," *Rev. aidis*, vol. 7, no. 2, pp. 170–178, 2014.
- [40] N. Setiani, W. Octaviyani, S. Hamdani, and I. Mardiah, "STUDIES ON BIOSURFACTANT PRODUCED USING *Exiguobacterium profundum*," pp. 1–6, 2020.
- [41] S. Singh, V. Kumar, P. Gupta, M. Ray, and A. Singh, "An implication of biotransformation in detoxification of mercury contamination by *Morganella* sp. strain ITISM23," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 28, no. 27, pp. 35661–35677, 2021, doi: 10.1007/s11356-021-13176-2.
- [42] P. Sharma, P. Chaturvedi, R. Chandra, and S. Kumar, "Identification of heavy metals tolerant *Brevundimonas*

sp. from rhizospheric zone of *Saccharum munja* L. and their efficacy in in-situ phytoremediation,” *Chemosphere*, vol. 295, 2022, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.133823.

- [43] A. Zuleta Medina, *La ingeniería: motor de la ciencia*. 2021.
- [44] A. Ardila, F. D. Martínez, Y. Barraza, and Y. Guerrero, “AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DEGRADORA DE PLASTICOS DEL RELLENO SANITARIO ‘LOS CORAZONES’ EN LA CIUDAD DE VALLEDUPAR ISOLATION,” pp. 19–28.
- [45] G. (2019). U. biofertilizante para combatir la contaminación por nitratos: el caso de B. Mengual, C., & Vázquez, “Un biofertilizante para combatir la contaminación por nitratos: el caso de Bulhnova.,” 2019.
- [46] Y. S. Song, D. J. Seo, and W. J. Jung, “Characterization and antifungal activity of chitosanase produced by *Pedobacter* sp. PR-M6,” vol. 129, pp. 277–283, 2019.
- [47] S. Wajswol Martella, N. Bajsá, and D. Senatore, “Efecto de la aplicación de vinaza en cultivos de caña de azúcar. Estudio de la comunidad bacteriana.,” p. 57, 2018, [Online]. Available: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21386/1/uy24-19152.pdf>.
- [48] I. Romanowska, B. Strzelecki, and S. Bielecki, “Biosolubilization of Polish brown coal by *Gordonia alkanivorans* S7 and *Bacillus mycoides* NS1020,” *Fuel Process. Technol.*, vol. 131, no. March 2019, pp. 430–436, 2015, doi: 10.1016/j.fuproc.2014.12.019.
- [49] V. F. Dr. Vladimir, *ENCYCLOPEDIA OF FOOD SAFETY*, vol. 1, no. 69. 1967.
- [50] J. M. Occurrence L. Delbrassinne, “*Bacillus*,” in *Encyclopedia of Food and Health*, 2016.
- [51] X. L. Li, Q. Fang, W. L. Guo, R. Fei, X. M. Yu, and J. L. Zhang, *Assessment of genetic instabilities induced by tissue culture in alkaligrass*, vol. 63, no. 3. 2016.

ANEXOS

Anexo 1. Participación en la cartilla “Morfotipos bacterianos aislados en el Antiguo Vertedero de Navarro”. Disponible en: (<https://repository.usc.edu.co/bitstream/20.500.12421/3055/1/CartillaAVN.pdf>)



Morfotipos bacterianos aislados en el Antiguo Vertedero de Navarro.

© Universidad Santiago de Cali.

© **AUTORES:** Laura Isabella Vergara López, Maryory Vanessa Diazgranados Santos, Alejandro Ortiz Díaz, Maryuris Machacado Salas, Diana Carolina Rache Arce & Doris Rosero-García

Programa de Microbiología
Facultad de Ciencias Básicas

Grupo de Investigación en Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA)

Cali, Colombia - 2020

**Comité Editorial /
Editorial Committee**

Rosa del Pilar Cogua Romero
Doris Lilia Andrade Agudelo
Edward Javier Ordóñez
Luisa María Nieto Ramírez
Sergio Molina Hincapié
Alejandro Botero Carvajal
Sergio Antonio Mora Moreno
Luis Felipe Vélez Franco

Proceso De Arbitraje Doble Ciego:
"Double blind" peer-review

Recepción/Submission:
Marzo (March) de 2020

**Evaluación De Contenidos/
Peer-Review Outcome:**
Abril (April) de 2020

Aprobación/Acceptance:
June (June) de 2020



La editorial de la Universidad Santiago de Cali se adhiere a la filosofía de acceso abierto. Este libro está licenciado bajo los términos de la Atribución 4.0 de Creative Commons (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso, el intercambio, adaptación, distribución y reproducción en cualquier medio o formato, siempre y cuando se dé crédito al autor o autores originales y a la fuente <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Anexo 2. Certificado de participación en evento Science Tubers



Video ponencia disponible en: https://www.youtube.com/watch?v=Et_DAGcLb2I

Anexo 3 Certificados de participación en eventos de carácter nacional





V ENCUENTRO INTERNACIONAL
DE GRUPOS Y SEMILLEROS
DE INVESTIGACIÓN



Certifican que

Ingrid Alejandra Pachón Soto

Identificación No. 1151961616

Participó en calidad de

PONENTE

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS CULTIVABLES EN SEIS
LAGUNAS QUE HACEN PARTE DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
LIXIVIADOS, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

Realizado de manera virtual, en la ciudad de Santiago de Cali, Valle del Cauca,
los días 13 y 14 de mayo de 2020.

Sandra Patricia Valencia
Vicepresidenta Regional Pacífico de ACIET

Juan Carlos Cruz Ardila
Coordinador Mesa Sur Pacífico de Investigaciones



V ENCUENTRO INTERNACIONAL
DE GRUPOS Y SEMILLEROS
DE INVESTIGACIÓN



Certifican que

Maryory Vanessa Díazgranados Santos

Identificación No. 1107524528

Participó en calidad de

PONENTE

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS CULTIVABLES EN SEIS
LAGUNAS QUE HACEN PARTE DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
LIXIVIADOS, SANTIAGO DE CALI, VALLE DEL CAUCA

Realizado de manera virtual, en la ciudad de Santiago de Cali, Valle del Cauca,
los días 13 y 14 de mayo de 2020.

Sandra Patricia Valencia
Vicepresidenta Regional Pacífico de ACIET

Juan Carlos Cruz Ardila
Coordinador Mesa Sur Pacífico de Investigaciones