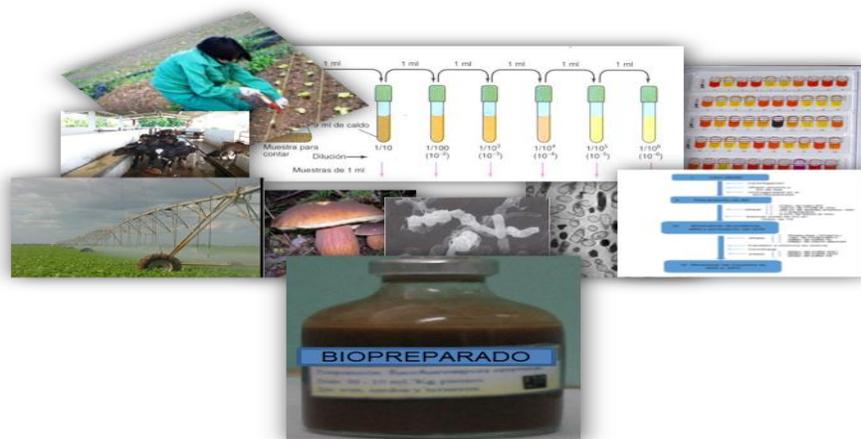


**TRABAJO DE DIPLOMA:**

**MODALIDAD PROPUESTA DE PROYECTO**

**OBTENCIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD  
BIORREMEDIADORA EN SISTEMAS AGROPECUARIOS**



**Autora:** Milena Lilianne Quintero Monet

**Tutoras:** Ing. Grethel Milián Florido, Dr. C  
Lic. Marlene María Martínez Mora, MS.c.  
Lic. Yadileiny Portilla Tundidor, MS.c

**Matanzas, 2018**

## *PENSAMIENTO*

*“El Estado protege al Medio Ambiente y los Recursos Naturales del país.*

*Reconoce su estrecha vinculación con el desarrollo económico y social sostenible para hacer más racional la vida humana y asegurar la supervivencia, el bienestar y la seguridad de las generaciones actuales y futuras.*

*Es deber de los ciudadanos contribuir a la protección del agua, la atmósfera, la conservación del suelo, la flora, la fauna y de todo el uso potencial de la naturaleza”.*



# *Nota de aceptación*

---

---

---

---

---

---

---

\_\_\_\_\_  
Presidente del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

\_\_\_\_\_  
Miembro del Tribunal Firma

Dado en Matanzas, el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año 2018.

“Año del 60 de la Revolución”

## *Declaración de Autoridad*

Declaro que yo: Milena Lilianne Quintero Monet soy la única autora de este Trabajo de Diploma, en calidad de lo cual autorizo a la Universidad de Matanzas, hacer uso del mismo con la finalidad que considere pertinente.

---

Milena Lilianne Quintero Monet

## *Dedicatoria*

- ∞ A mis padres por estar presente en mi vida y brindarme todo su amor y cariño, por tenerme confianza y mantenerse a mi lado siempre.
- ∞ A mi novio, por compartir conmigo estos cinco años de carrera apoyándome incondicionalmente.

# *Agradecimientos*

Quisiera en estos momentos agradecer a muchas personas que han estado conmigo en la realización de este Trabajo de Diploma:

- ✧ A mis tutoras, las profesoras Grethel y Marlene, quienes me han ayudado en este gran logro, compartiendo sus habilidades y conocimientos en esta materia. También a Yadileiny, quien no se encuentra en estos momentos, pero desde lejos me ha brindado todo su apoyo.
- ✧ A mis padres quienes son las personas más importantes de mi vida, me han servido de apoyo y guía en este camino. Gracias por su dedicación y su amor. Los quiero mucho.
- ✧ A mi novio, el cual quiero muchísimo y me ha demostrado todo su cariño.
- ✧ A toda mi familia, por su presencia en estos momentos de mi vida.
- ✧ A mis suegros, quienes han estado conmigo siempre en todo momento.

Muchas Gracias.

# Opinión de los Tutores

*Trabajo de Diploma: Modalidad de Proyecto,*

*La estudiante Milena Lillianne Quintero Monet trabajó desde segundo año de su carrera vinculada al Grupo de Aditivos nutricionales del Centro de Estudios Biotecnológicos, en el Proyecto Institucional, perteneciente al Programa de Ciencias Básicas: “Evaluación de microorganismos con efecto biorremediador en la cuenca hidrográfica del Río Yumurí”, donde desarrolló un serio y sistemático trabajo en la búsqueda de información, en el desarrollo de diferentes protocolos de investigación para darle cumplimiento a las etapas de dicho proyecto, de conjunto con profesores-investigadores del CEBIO, con resultados satisfactorio. Los resultados obtenidos de la investigación fueron presentados en Jornadas científicas de la Facultad por la estudiante.*

*Con el desarrollo y la formación alcanzada en esta investigación le permitió a la estudiante Milena proponer un nuevo proyecto al Programa de Ciencias Básicas y constituir su trabajo de Diploma de culminación de estudios, por las posibilidades reales de aplicar esta temática en los sistemas agropecuarios en el territorio matancero y proponer una mejora ecológica de los mismos a partir del uso de microorganismos con efecto biorremediador.*

*Consideramos que el tema presentado resulta de una alta novedad científica pues se encuentra en línea con los objetivos de Ciencia y Técnica del Ministerio de Educación Superior en la búsqueda de nuevos proyectos integradores, donde se logre una vinculación Universidad y el entorno con enfoque agroecológico y sostenible y permita el cierre de ciclo de las investigaciones.*

*La estudiante logró en esta etapa de su formación un nivel de independencia permitiendo así realizar con éxito la propuesta de proyecto al Programa de Ciencias Básicas de la Universidad de Matanzas. El trabajo desarrollado posee una amplia revisión bibliográfica actualizada y presencia de los clásicos en la temática que se aborda, así como, la utilización adecuada del idioma Inglés y de las nuevas técnicas de la informatización, lo que permitió una mejora en la formación profesional de la estudiante.*

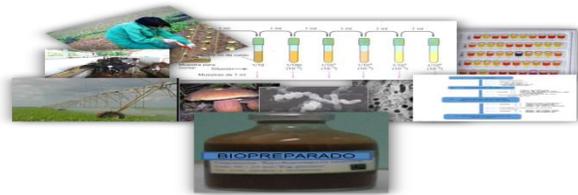
Tutoras de la Tesis:

*Ing. Grethel Milián Florido, Dr. C  
Lic. Marlene María Martínez Mora, MS.c  
Lic. Yadileiny Portilla Tundidor, MS.c*

# Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>I. FUNDAMENTACIÓN</b> .....	7
1.1.- Ecosistemas.....	7
1.2.- Contaminación. Situación actual en Cuba, Matanzas.....	8
1.3.- Principales agentes contaminantes de los suelos.....	13
1.4.- Principales contaminantes de los ecosistemas acuáticos y terrestres.....	15
1.5.- Biorremediación. Orígenes. Concepto .....	18
1.6.- Métodos de biorremediación.....	19
1.7.- Principales microorganismos con efecto biorremediador.....	21
1.8.- Resultados sobre el uso de microorganismos como biorremediadores.....	22
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>III. RESULTADOS ESPERADOS</b> .....	27
<b>IV. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS: CRONOGRAMA</b> .....	29
1 <sup>era</sup> Etapa: Estado del arte .....	29
2 <sup>da</sup> Etapa: Identificar los sistemas agropecuarios contaminados .....	30
3 <sup>era</sup> Etapa: Identificar los principales agentes contaminantes en los suelos y en los sistemas de abastos de agua para uso en los sistemas de regadíos y consumo animal.....	30
4 <sup>ta</sup> Etapa: Aislar, seleccionar e identificar microorganismos con posible efecto biorremediador.....	30
<b>V. RECURSOS NECESARIOS Y PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO</b>	41
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	55
Anexo 1.- Puntos de muestreos para el aislamiento de los microorganismos ...	55
Anexo 2-. Clave para la identificación del género Bacillus spp. (Fields, 1978). .	56
Anexo 3. Propuesta de proyecto al Programa de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas.....	59

# *Introducción*



## INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de agua potable y el acceso a los alimentos constituyen uno de los mayores problemas de gran parte de la población mundial. Por ello, la agricultura es un componente dominante de la economía global. Así, la necesidad de producir alimentos en cantidad suficiente repercute en las prácticas agrícolas de todo el mundo. En muchos países esta presión origina una expansión hacia tierras marginales, y en otros, a la expansión del riego y a una utilización cada vez mayor de fertilizantes y plaguicidas con el fin de lograr y mantener rendimientos superiores (CISAN, 2018 a-b).

Actualmente los plaguicidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas) son ampliamente utilizados en la agricultura y la industria en todo el mundo debido a su alta actividad. Más del 55% de la tierra que se usa para la producción agrícola en países en vías de desarrollo, emplea cerca del 26% del total de plaguicidas producidos en el mundo. Sin embargo, el coeficiente de incremento en el uso de estos dentro de países en vías de desarrollo es considerablemente más alto que el de los países desarrollados. Los plaguicidas son necesarios para proteger las cosechas, las pérdidas ascienden cerca del 45% de la producción de alimentos total mundial. Existen varias clases de plaguicidas entre los que se encuentran los piretroides, estos se reconocen como uno de los grupos más importantes (Cycon *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2011).

La presencia de residuos y metabolitos de plaguicidas en el alimento, agua y suelo representa actualmente uno de los temas importantes para la química ambiental (Ramírez y Torres, 2014). Existe una gran variedad de métodos físicos y químicos para tratar los suelos y mantos acuíferos contaminados, pero muchos de estos procedimientos no destruyen los compuestos peligrosos sino que los transfieren de una fase a otra, por lo que el proceso biológico en el que se transforman estos compuestos peligrosos en compuestos más simples son un desafío importante en la actualidad. Estos ofrecen las ventajas del funcionamiento a temperatura y presión ambiental, reducen gastos del capital y de operación.

Sin embargo, una limitación de los sistemas de biotratamiento, es el potencial tóxico de agentes xenobióticos. En la práctica, esto significa que se debe tener un gran cuidado con los microorganismos que se usen ya que pueden ser inhibidos o causar su muerte por los efectos tóxicos de los contaminantes orgánicos (Nieblas, 2016). Para la biodegradación, el plaguicida podrá servir idealmente como la única fuente de carbono y energía para los microorganismos, donde se incluye la síntesis de las enzimas apropiadas para la transformación de este, lo que proporciona un mecanismo importante en la degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente (Yu *et al.*, 2015).

Actualmente, se conocen muchas técnicas para mejorar la calidad de los suelos y el agua, entre las que se encuentra la biorremediación. Esta consiste en la potenciación de aquellos microorganismos naturales, principalmente bacterias, que degradan los compuestos contaminantes transformándolos en moléculas de agua, dióxido de carbono y otros metabolitos mucho menos contaminantes que los que les dieron origen, inocuas para los seres vivos (Álvarez, 2015; Portilla, 2016).

Con el desarrollo de las investigaciones, en este campo el concepto de biorremediación se transforma y profundiza. Se define como cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar a un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. Esta se aprovecha para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos (Álvarez, 2015; Hernández -Ruíz *et al.*, 2017).

La aplicación de esta técnica no daña en absoluto la estructura del ecosistema y elimina la contaminación sin provocar efectos secundarios. Esto lleva a pensar en la biorremediación como una técnica efectiva en la descontaminación (Portilla, 2016) por medio de la degradación microbiana y enzimática así como la utilización de estrategias como la bioestimulación de microorganismos nativos, y el bioaumento (Boullosa, 2011), el que se basa en la inoculación de cepas, consorcios microbianos de laboratorio o mezclas de enzimas (Alarcón y Ferrera, 2015).

En los ambientes contaminados existen abundantes especies con estas capacidades metabólicas específicas, debido a la adaptación de la microflora presente en el contaminante (Álvarez, 2015). Cepas de *Bacillus*, *Lactobacillus*, levaduras y actinomicetos son una opción muy viable, ya que son microorganismos capaces de utilizar contaminantes como fuente de carbono y energía (Velásquez, 2017) necesarios para su crecimiento, donde se generan productos más sencillos.

En Cuba, la contaminación de los suelos y el agua se identifican como uno de los principales problemas ambientales. La provincia de Matanzas no se encuentra excluida de esta problemática, con aplicación de productos químicos en los suelos en un rango del 100%, lo que hace que se identifique como una problemática medio ambiental.

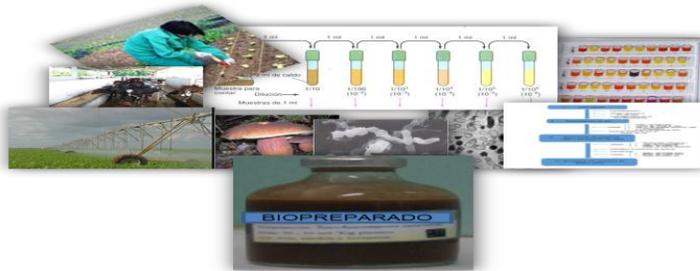
En la Universidad de Matanzas, Portilla (2016) aisló microorganismos de uno de los ríos emblemáticos de esta provincia: El río Yumurí. En él se reportan niveles elevados de materia orgánica, amonio, fosfato y metales pesados como consecuencia de vertimientos de los residuales a los suelos, cavernas o directamente a corrientes superficiales. Estos residuos sobrepasan los límites de autodepuración e influyen negativamente sobre la calidad de sus aguas. La autora demostró que los microorganismos aislados, seleccionados e identificados fueron capaces en condiciones de laboratorio de mostrar un efecto biorremediador. Sin embargo; estos estudios no se han realizado en otros ecosistemas donde pudieran tener un efecto positivo.

**Problema Científico:** La contaminación ambiental se posiciona como uno de los más importantes problemas que afectan a la sociedad del siglo XXI. La pérdida de calidad del aire, del recurso hídrico y de suelos disponibles para actividades agrícolas se incrementa exponencialmente. El uso indiscriminado de productos químicos y mal manejo de las aguas en los sistemas agropecuarios en el territorio matancero, constituye una fuente contaminante por excelencia.

Sobre la base de los antecedentes expuestos y el problema científico, esta investigación se propuso como **hipótesis** la siguiente:

El aislamiento, identificación y evaluación de bacterias seleccionadas de ecosistemas agrícolas y acuíferos contaminados por la incorporación de productos químicos u otros procesos, aporta criterios de selección para el uso de las mismas como agentes biorremediadores.

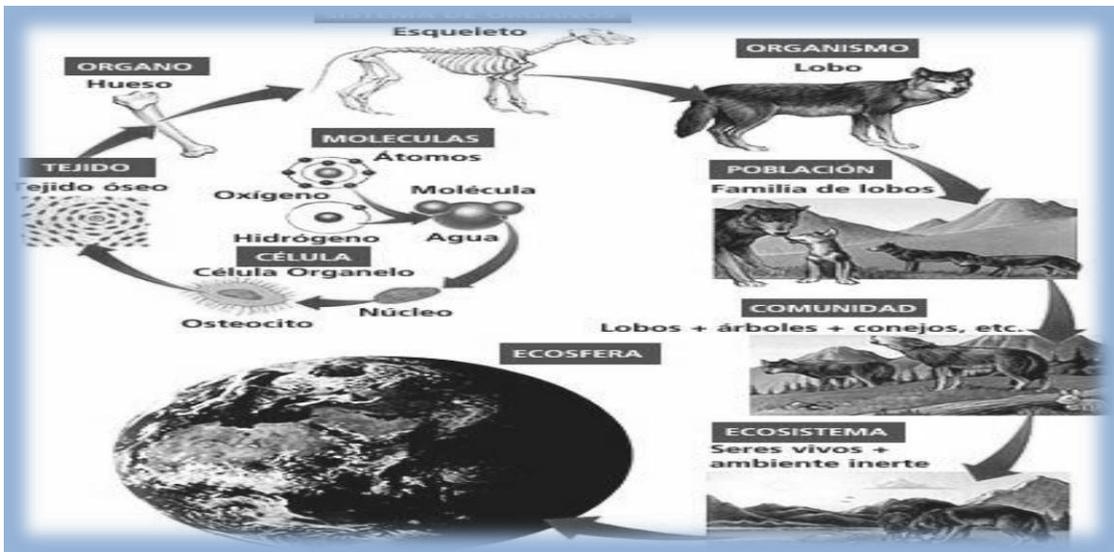
# Fundamentación



# I. FUNDAMENTACIÓN

## 1.1.- Ecosistemas

Un ecosistema, es el conjunto formado por los seres vivos y los elementos no vivos del ambiente y la relación vital que se establece entre ellos (figura 1). La ciencia encargada de estudiar los ecosistemas y estas relaciones es la llamada ecología. Los ecosistemas pueden ser de dos tipos: terrestres (bosques, selvas, sabanas, desiertos, polos, etc.) y acuáticos (comprenden desde un charco hasta los océanos, mares, lagos, lagunas, manglares, arrecifes coralinos, etc.) (Martínez, 2015).



**Figura 1.** Niveles ecológicos (Fuente: Martínez, 2015)

La mayoría de los ecosistemas de nuestro planeta son acuáticos, ya que sus tres cuartas partes están cubiertas por agua. Sin embargo, los ecosistemas terrestres son los más conocidos por nosotros debido a que no requiere un equipo especial para su observación (Martínez, 2015). Estos se caracterizan por la presencia de componentes vivos o bióticos (plantas, animales, bacterias, algas y hongos) y de componentes no vivos o abióticos (luz, sombra, temperatura, agua, humedad, aire, suelo, presión, viento y pH).

Los ecosistemas mantienen un intercambio constante de materia y energía que pasan de un ser viviente a otro, a través de las llamadas cadenas alimentarias.

Las plantas (organismos productores) captan la energía solar y sintetizan materia orgánica (alimentos), tanto para ellas como para los organismos consumidores (animales) que la aprovechan, los cuales además; pueden luego alimentarse unos de otros. Al morir estos organismos actúan los descomponedores (bacterias y hongos) y los transforman en nutrientes que enriquecen el suelo, los cuales serán aprovechados por las plantas, iniciándose así un nuevo ciclo.

Cabe resaltar, que actualmente los ecosistemas se enfrentan a una dificultad sin precedentes: **la Humanidad**. La acción incontrolada del ser humano sobre los ecosistemas como la destrucción y fragmentación de hábitats (incendios, tala indiscriminada, la caza, y pesca sin control y el uso de productos químicos), el cambio climático, la contaminación del suelo y del agua, afecta su estado de “equilibrio natural” y; el normal desarrollo y crecimiento de los organismos en una población. Por ello, se crean los decretos y leyes para la protección del ambiente (Martínez, 2015).

La Ley de Aguas en su artículo 6, inciso 20 de la Ley General del Ambiente en Honduras define la contaminación del agua como *“la acción y efecto de introducir materias o formas de energía o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con sus usos posteriores o con su función ecológica”* (Sánchez, 2011).

La ley de los suelos define que *“los suelos deben usarse de acuerdo con su capacidad agrológica específica. Estos deben clasificarse basados en la pendiente, grado de erosión, fertilidad del suelo y factores del clima. Los suelos deben ser usados de forma tal que se mantenga su integridad física, y su capacidad productora, su fertilidad, inclinación, grado de erosión y otros factores”*.

De ahí la necesidad de protección de los mismos como una alternativa viable a la solución de los problemas de hambruna que acarrea la humanidad.

### **1.2.- Contaminación. Situación actual en Cuba, Matanzas**

La contaminación del suelo es el resultado de la deposición final sin tratamientos previos de una cantidad increíble de sustancias contaminantes, además de los

químicos que se utilizan en otras tareas que también terminan en este sustrato (Zhang *et al.*, 2014).

Según esta definición, la contaminación puede ser:

- Natural: resultado del equilibrio dinámico de la tierra, actividad geofísica y fases del ciclo natural del agua.
- Artificial (antropogénica): resultado de la actividad humana que genera sustancias ajenas a la composición natural del agua o de los suelos (Herrera *et al.*, 2013).

En general, y dado que la palabra contaminación suele ir asociada a la artificial, dejaremos a un lado la natural, más aceptada, y entenderemos por procesos contaminantes los provocados o derivados por la acción del hombre.

La contaminación de los suelos por vertimiento de aguas residuales, mal uso de fertilizantes, desechos de hidrocarburos, metales pesados y complejos químicos, entre otros, hace que la metodología a seguir para lograr su recuperación no esté desarrollada a plenitud, lo que provoca con ello, que la efectividad de las tecnologías aplicadas, en muchas ocasiones sea insuficiente (Jaramillo *et al.*, 2016).

Reyes *et al.*, (2016) define el suelo "... como algo maravilloso. Por estériles y aburridos y en ocasiones cenagosos que puedan parecer, la delgada capa que forma y que cubre la superficie del planeta, es el basamento de la biosfera, nuestro principal recurso repleto de vida bajo de miles de formas, el suelo merece ser calificado como un ecosistema por derecho propio o con más propiedad como una multitud de ecosistemas".

El origen de la contaminación de las aguas está ligado a varias actividades dentro de las que se destacan las actividades urbanas, agrícolas, ganaderas e industriales (Cobos, 2002). La contaminación de las aguas debido a las actividades urbanas, es consecuencia de la inadecuada eliminación y ubicación de los residuos. Las aguas residuales urbanas contienen fundamentalmente contaminantes orgánicos procedentes de vertidos de residuos sólidos, efluentes líquidos domésticos, lavado diario, fugas de colectores y alcantarillas, fosas

sépticas, así como papeles, detergentes, aceites y restos de plásticos; además también pueden presentar bacterias, virus y otros microorganismos que acompañan a los contaminantes anteriores (Polomé *et al.*, 2016).

La contaminación de las aguas por prácticas agrícolas es debida fundamentalmente a la utilización de fertilizantes y biocidas en exceso (Agarwal *et al.*, 2015). Los fertilizantes son ricos en compuestos nitrogenados y fosforados, por lo que son lavados y arrastrados de la superficie por lluvias y escorrentías, que los conducen a cauces de ríos y de ahí a lagos o embalses lo que favorece su eutrofización. Por otra parte, muchos de los biocidas que se utilizan en la agricultura presentan una alta toxicidad y persistencia, con alta capacidad de acumulación en los organismos vivos (Rashid y Romshoo, 2013).

La contaminación de aguas por explotaciones ganaderas es debida a compuestos orgánicos y biológicos procedentes de residuos de instalaciones ganaderas y purines de animales estabulados. Las aguas utilizadas en las explotaciones ganaderas, sobre todo para operaciones de limpieza, pueden arrastrar el estiércol, los purines producidos, así como restos de plaguicidas de origen ganadero (Gu *et al.*, 2008).

La contaminación del agua se considera como una de las actividades industriales más compleja y en muchos casos difícil de eliminar. Al mismo tiempo es la actividad más contaminante de las aguas. El agua es un elemento fundamental en las actividades industriales, como vehículo energético, de transporte, disolvente, en operaciones de lavado, base para reacciones, intercambiadores de calor, y, como materia prima (Popescu *et al.*, 2015).

Todos estos procesos contaminantes, independientemente de su origen, afectan en cantidad e importancia las características del medio receptor y los usos del agua y calidades exigidas del recurso. (Coronel y Tenesaca, 2013).

### **Situación de la contaminación en Cuba, Matanzas**

La situación ambiental del país no puede dejar de enmarcarse dentro del proceso histórico, económico y social por el tránsito, por su vinculación y efectos producidos sobre el medio ambiente. Durante el período colonial y ya en este

siglo, bajo la condición impuesta de República Mediatizada, el desarrollo económico que se logra alcanzar se sustentó principalmente en la producción agrícola extensiva, con un uso y manejo inadecuado de los suelos y una intensa destrucción de las áreas boscosas (Pérez *et al.*, 2009).

Las profundas transformaciones económicas y sociales logradas por el proceso revolucionario, condujeron a cambios favorables en las condiciones de vida de la población y consecuentemente un incremento en las acciones encaminadas a la protección y conservación de los recursos naturales, los que son considerados como patrimonio de todo el pueblo (Díaz-Asencio *et al.*, 2011).

Paralelamente a estos logros existen errores y deficiencias, dados en lo fundamental por la insuficiente conciencia, conocimientos y educación ambiental, la carencia de una mayor exigencia en la gestión, la limitada introducción y generalización de los resultados de la ciencia y tecnología, la aún insuficiente incorporación de la dimensión ambiental en las políticas, planes y programas de desarrollo, y la ausencia de un sistema jurídico lo suficientemente integrador y coherente. Por otra parte, la carencia de recursos materiales y financieros impide alcanzar niveles superiores de protección ambiental, lo que se agudiza en los últimos años por la situación económica en la cual se ve inmerso el país, debido a la pérdida de las relaciones comerciales y el sostenido e incremento del bloqueo económico de Estados Unidos.

Actualmente la contaminación en Cuba está enfocada en las aguas residuales urbanas, ganadería, agricultura, vertederos de residuos sólidos, aguas superficiales y actividades industriales (minería). A nivel nacional, las acciones van dirigidas desde el CITMA y apoyada por los programas nacionales como: Programa de Asociación de País (OP-15), el Fondo Mundial para el Medio Ambiente (GEF) y el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD).

Hoy se trabaja con mayor énfasis en la zona más occidental y extremoriental, en las cuales se promueve el manejo sostenible de tierras (MST). Muchas de las acciones se encaminan a disminuir la pérdida de los suelos causada por la erosión, rehabilitación y estabilización de cárcavas, se impulsa la fertilización con

materia orgánica, y la construcción de canales de drenaje y tranques de agua para el riego. Se suma la siembra de especies forestales y frutales, y otras protectoras del suelo, cuerpo natural que contiene todos los elementos químicos de la tabla periódica del científico ruso Dimitri Mendeleev, con el fin de disminuir la presencia de metales pesados en los suelos (ONE, 2011).

La provincia de Matanzas, no se encuentra ajena a estos programas de protección del medio ambiente. De ahí, que exista una definición de sus principales problemas ambientales, los que se recogen en la Estrategia Ambiental de la provincia (CITMA, 2015).

De los lugares identificados en la provincia con alta contaminación se encuentra el río Yumurí, uno de los tres ríos más importantes de la ciudad de Matanzas. De menos longitud y caudal que los otros dos (el río San Juan y Canímar), el río separa los barrios de Versalles y Matanzas, sin embargo, la belleza natural del paisaje se ve empañada por las condiciones higiénico-ambientales de sus márgenes y el vertimiento de residuales, a lo largo de su cauce, desde su nacimiento hasta desembocadura. Tiene múltiples fuentes contaminantes, debido a la acción del hombre, y los asentamientos humanos (Portilla, 2016).

Los últimos datos de la carga contaminante reducida de la cuenca hidrográfica, informan un número de 7 fuentes emisoras. La carga contaminante generada es de 411 t/año, [calculada como: demanda bioquímica de oxígeno (DBO)] y la carga contaminante dispuesta de 197 t/año (calculada como DBO). A esto se suman los albañales de la ciudad y los micro-vertederos (CITMA, 2013; Portilla, 2016). Estos informes demuestran el uso indiscriminado de los ríos como sumideros para los desechos de la agricultura, urbanos y de la industria, lo cual repercute negativamente en el ecosistema.

Las áreas cultivables de la provincia exponen niveles de contaminación en un 100%, ya que se conoce que todos los cultivos reciben la aplicación de productos químicos como parte de las cartas tecnológicas de los cultivos.

### **1.3.- Principales agentes contaminantes de los suelos**

#### **Plaguicidas**

Representan el primer agente contaminante del suelo, no solo por afectarlo directamente, sino que además extermina tanto a la plaga como a otras especies, lo que genera un desequilibrio ambiental, y favorece a la contaminación de los productos que son ingeridos por el hombre (Portilla, 2016).

#### **Minería**

Las aguas de relave producidas en la actividad minera depositan en el suelo grandes cantidades de elementos químicos como el mercurio (Hg), arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), cobre (Cu), entre otros. Todos estos elementos productos de diferentes industrias, como la del papel, la del cloro, la del cemento o directamente la minera, entre otras, produce graves problemas.

#### **Basura**

La gran generación de desperdicios diarios representa uno de los agentes contaminantes del suelo más alarmantes, sobre todo cuando se elimina sin ningún tipo de criterio medioambiental. La basura orgánica arrojada al aire libre sin tratamiento se fermenta, genera gases tóxicos y mal olor, además de sustancias que pueden filtrarse en suelos permeables, contaminando no solo ese sector, sino además las aguas superficiales y subterráneas, lo que trasciende en las cadenas alimenticias.

Hemos de distinguir entre contaminación natural, frecuentemente endógena, y contaminación antrópica, siempre exógena.

*La contaminación natural es el proceso de concentración y toxicidad que muestran determinados elementos metálicos, presentes en los minerales originales de algunas rocas a medida que el suelo evoluciona.*

Un caso significativo se produce sobre rocas serpentizadas con altos contenidos de elementos como Cr, Ni, Cu, Mn, cuya edafogénesis en suelos con fuertes lavados origina la pérdida de los elementos más móviles, prácticamente todo el Mg, Ca y, en ocasiones hasta gran parte del Si, con lo que los suelos residuales

fuertemente evolucionados presentan elevadísimas concentraciones de aquellos elementos metálicos, que hacen a estos suelos susceptibles de ser utilizados como minas metálicas. Obviamente, a medida que avanza el proceso de concentración residual de los metales pesados se produce el paso de estos elementos desde los minerales primarios, es decir desde formas no asimilables, a especies de mayor actividad e influencia sobre los vegetales y el entorno. De esta forma, la presencia de una fuerte toxicidad para muchas plantas sólo se manifiesta a partir de un cierto grado de evolución edáfica, y por tanto es máxima en condiciones tropicales húmedas (Portilla, 2016).

Otro ejemplo de aparición natural de una anomalía de alta concentración de una forma tóxica se produce en la evolución acidificante de los suelos por la acción conjunta de la hidrólisis, lavado de cationes, presión de CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos que, progresivamente, conducen a una mayor concentración de Al disuelto y a un predominio de especies nocivas como Al<sup>+3</sup> o las formas Al-OH escasamente polimerizadas.

Los fenómenos naturales pueden ser causas de importantes contaminaciones en el suelo. Así es bien conocido el hecho de que un solo volcán activo puede aportar mayores cantidades de sustancias externas y contaminantes, como cenizas, metales pesados, H<sup>+</sup> y SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, que varias centrales térmicas de carbón (Portilla, 2016).

Pero las causas más frecuentes de contaminación son debidas a la actuación antrópica, que al desarrollarse sin la necesaria planificación producen un cambio negativo de las propiedades del suelo.

En los estudios de contaminación, no basta con detectar la presencia de contaminantes sino que se debe definir los máximos niveles admisibles y además se analizan los posibles factores que puedan influir en la respuesta del suelo a los agentes contaminantes, como son: vulnerabilidad, poder de amortiguación, movilidad, biodisponibilidad, persistencia y carga crítica, que pueden modificar los denominados *umbrales generales de la toxicidad* para la estimación de los

impactos potenciales y la planificación de las actividades permitidas y prohibidas en cada tipo de medio (Portilla, 2016).

#### **1.4.- Principales contaminantes de los ecosistemas acuáticos y terrestres**

##### **Materia orgánica disuelta**

El carbono orgánico disuelto frecuentemente se mide como materia orgánica disuelta (MOD), la cual representa un importante reservorio de carbono orgánico en los ecosistemas acuáticos. La dinámica de la MOD tiene un papel importante en diferentes procesos ecológicos y biogeoquímicos. La actividad humana es una fuente abundante de MOD (Hudson *et al.*, 2007) como lo es la materia orgánica particulada, mucha de la cual entra en los cuerpos de agua a través de descargas directas. Entre un 40 y 60% de la materia orgánica disuelta produce fluorescencia, este material fluorescente se compone principalmente de proteínas y de ácidos orgánicos derivados de la descomposición de materia de plantas y animales (Nie *et al.*, 2016).

##### **Materia orgánica en los sedimentos**

Una consecuencia de la eutrofización es la acumulación de materia orgánica de los sedimentos, lo cual conlleva un aumento dramático en la densidad de bacterias heterotróficas. Este fenómeno ocasiona un aumento en la actividad respiratoria como consecuencia de la degradación bacteriana de la materia orgánica y una disminución considerable del oxígeno disuelto (Pearl, 1998). Debido a la relativa solubilidad del oxígeno en el agua, con la presencia mantenida de materia orgánica, la demanda de oxígeno acaba excediendo a la disolución de este por aireación y el sedimento se transforma en anóxico (Murua, 2014).

##### **Compuestos inorgánicos**

##### **Nitrógeno**

El ciclo biogeoquímico del nitrógeno involucra diversas transformaciones de este elemento, lo que lleva asociado su circulación a través del ambiente, y determina en gran medida la productividad biológica de los ecosistemas. El ciclo del nitrógeno en los ecosistemas acuáticos es de naturaleza microbiana debido a que

los compuestos de nitrógeno son en su mayoría, solubles y desde ese punto de vista más accesibles para los microorganismos (Lomas y Mulholland, 2008; Zhang *et al.*, 2015).

La materia orgánica viva y muerta representa una pequeña reserva de nitrógeno orgánico que incluye los materiales naturales como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y urea principalmente. Las formas iónicas más comunes de nitrógeno inorgánico disuelto en el agua son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Murueta, 2014; Tang *et al.*, 2011).

La actividad humana altera sustancialmente el ciclo global del nitrógeno, a través del aumento de las concentraciones de compuestos inorgánicos nitrogenados en aguas superficiales y especialmente en los suelos subterráneos, lo que provoca efectos significativos en muchos organismos acuáticos y de esta forma contribuye a la degradación de ecosistemas acuáticos (Copetti *et al.*, 2015; Pillay *et al.*, 2015).

### **Fósforo**

El fósforo es un elemento extremadamente importante que controla el estado trófico de muchos ecosistemas acuáticos, fundamentalmente, dulceacuícolas (Zhang *et al.*, 2011). Para estudiar su dinámica es fundamental tomar en cuenta los sedimentos, los cuales representan el principal sumidero de este nutriente.

El impacto de los sedimentos en el ciclo del fósforo depende de su tendencia a retener o liberar este nutriente, esto a su vez se relaciona con las condiciones fisicoquímicas de cada sedimento (González-Chávez, 2005), entre las que se incluyen: 1) naturaleza y cantidad de óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio; 2) potencial redox; 3) contenido de materia orgánica; 4) distribución y tamaño de las partículas del sedimento; 5) contenido de apatito o precipitados de carbonatos; 6) contenido de arcillas (Davies y Reynolds, 2001) y 7) pH (Yoo *et al.*, 2006).

La concentración de fósforo en el sedimento puede ser de varios órdenes de magnitud superior a la del agua. Cuando la acumulación de fósforo es excesiva en el sedimento, se puede llegar a superar la capacidad de carga interna del sistema, lo que provoca una liberación de fósforo en la forma de fosfatos lo que causa una

eutrofización severa de manera que los sedimentos pueden ser considerados como una fuente de contaminación por fósforo (Sulu-Gambari *et al.*, 2016).

### **Metales pesados**

Según los autores Aviñó *et al.* (2007) y Gálvez (2003) se definen como metales pesados (MP) aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm<sup>3</sup> cuando están en forma elemental o cuyo número atómico es superior a 20 (donde se excluyen a los metales alcalinos y alcalinos térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor de 0,01%.

Los metales pesados se clasifican en:

- ✓ Oligoelementos o micronutrientes: los elementos que son necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen: Arsénico (As), Boro (B), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Selenio (Se) y Zinc (Zn).
- ✓ Los elementos sin función biológica conocida: estos son altamente tóxicos e incluyen: Bario (Ba), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Antimonio (Sb), Bismuto (Bi) (Doan, 2010).

Los metales pesados son elementos potencialmente tóxicos, cuya presencia en el medio ambiente se incrementan notablemente en las últimas décadas, fundamentalmente por la acción del hombre. (Covarrubias y Peña, 2017; Xu *et al.*, 2016; Wijesiri *et al.*, 2016).

En un informe del Centro de Ingeniería y Manejo Ambiental de Bahías y Costas, se expone la situación de la contaminación en las costas y Bahías de Cuba. Se declara que Santiago de Cuba y especialmente La Habana constituyen las áreas más contaminadas de Cuba. Sin embargo, para los metales Cobalto (Co), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn) y Níquel (Ni), la situación es diferente, donde las bahías de Carbónico, Nipe y Levisa, son las de mayor contaminación, esta situación está dada por las actividades minero metalúrgico del níquel (Doan, 2010). Teniendo en

cuenta estos datos el grado de contaminación general es: La Habana > Santiago de Cuba > Cienfuegos > Matanzas > Levisa > Nipe > Cárdenas > Carbónico.

En la provincia de Matanzas a pesar de no encontrar los mayores reportes de concentraciones de metales, se encuentran afectadas las zona de Varadero, Cárdenas y Matanzas por el mal tratamiento de residuales principalmente de origen agrícola. En correspondencia a los daños que la acumulación de estos metales puede ocasionar a los sistemas biológicos, es vital la remoción de estos contaminantes de ecosistemas acuáticos y terrestres (Portilla, 2016).

### **1.5.- Biorremediación. Orígenes. Concepto**

#### **Orígenes-concepto**

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80. Los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos. Uno de los muchos reporteros enviados a Alaska meditaba sobre el daño provocado por el vertido del Exxon Valdéz. Pensaba que el petróleo, sustancia natural, no provocaría un daño ambiental irreparable y tal como se observó durante décadas, el crudo después de un largo tiempo es diluido y asimilado por el medio ambiente.

De esta intrínseca capacidad de la naturaleza para superar algunos desequilibrios en el ecosistema, surge la biorremediación, como una tecnología que usa un elemento biológico, en la mayoría de los casos microorganismos, para eliminar contaminantes de un lugar, sea este suelo, sedimento, fango o mar. Esta tecnología se transforma en la colaboradora directa de la naturaleza, que no siempre es capaz de superar por sí sola grandes desequilibrios. La biorremediación le da una ayuda al medio ambiente en la mejora de los ecosistemas dañados, donde se aceleran dichos procesos naturales. Lo que hacen los microorganismos es degradar los desechos en productos menos tóxicos, además de concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas, metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con diversos contaminantes.

La biorremediación microbiana hace referencia a todos los procesos biológicos que se pueden usar para minimizar un impacto negativo en el ambiente; usualmente, es la remoción de un contaminante presente en el suelo, el agua o el aire mediante el empleo de microorganismos. Algunos microorganismos, especialmente ciertas bacterias tienen la habilidad de convertir las moléculas de un contaminante orgánico en dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos necesarios para los ciclos biogeoquímicos, como también oxidar o reducir los agentes inorgánicos que contaminan un ambiente, esto permite que se regeneren los ecosistemas que son afectados por el vertimiento de sustancias orgánicas como el petróleo y sus derivados (hidrocarburos), plaguicidas (compuestos alifáticos y aromáticos halogenados); sustancias inorgánicas (compuestos nitrogenados), y también algunos contaminantes metálicos (Dash, 2015).

Estudios referativos definen que la biorremediación surge como una alternativa para transformar los plaguicidas en compuestos más simples y poco contaminantes mediante el uso del potencial metabólico de los microorganismos. Los microorganismos que más se utilizan como biorremediadores son los géneros *Serratia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*. La biorremediación depende de la capacidad competitiva de los microorganismos, de la biodisponibilidad y la concentración del organofosforado, del pH, la temperatura y el tipo de suelo, así como de la presencia de suplementos nutricionales (Hernández- Ruíz *et al.*, 2017).

La tierra está cada día más enferma por la gran cantidad de contaminantes que son liberados al ambiente. Esto perjudica a los ecosistemas, lo que provoca severos daños a todos los seres vivos, donde se incluye al hombre. La biorremediación, rama de la biotecnología que utiliza un elemento biológico para mejorar el daño, ofrece excelentes soluciones y es en sí un buen negocio, pero la falta de regulación juega en contra de su utilización como un remedio para sanar la tierra y como una oportunidad para salvar el planeta (Ayesa, 2018).

### **1.6.- Métodos de biorremediación**

La biotecnología ambiental emplea los procesos biológicos modernos en la protección y restauración de la calidad del ambiente. A través de ella se puede

evaluar el estado de los ecosistemas, transformar los contaminantes en sustancias no tóxicas, generar materiales biodegradables a partir de recursos renovables y desarrollar procesos de manufactura y manejo de desechos ambientalmente seguros (Barrios, 2011; Portilla, 2016).

Actualmente, una de las principales aplicaciones de la biotecnología ambiental es la biorremediación, considerada como una tecnología emergente. Se define como una tecnología de biorrestauración de ambientes naturales previamente contaminados, por eliminación, atenuación o transformación de los compuestos contaminantes (Ali *et al.*, 2016). Para ello se emplea la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas), también se pueden emplear plantas, oxígeno y nutrientes, para acelerar los procesos de biodegradación natural. La transformación puede ser parcial, por obtención de un compuesto menos tóxico que el parental, mientras que la mineralización o transformación total es la degradación hasta dióxido de carbono y agua (procesos aerobios), agua y metano (condiciones anaerobias) (Dash y Das, 2015).

El uso de la biorremediación recibe especial atención, por ser de bajo costo y ambientalmente amigable, comparado con los procedimientos químicos y físicos. Sin embargo, este procedimiento puede llevar años para completar la restauración y recuperación de las áreas impactadas, dependiendo entre otros factores, de la cantidad de contaminante y de condiciones ambientales que favorezcan la proliferación y actividad de los organismos que se utilicen (Bradley *et al.*, 2015).

Gómez *et al.* (2006) señalan que el proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto en los siguientes tipos:

Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleídos (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Lucero *et al.*, 2016).

Biorremediación microbiana. Es el uso de bacterias que presentan la propiedad de acumular o metabolizar compuestos recalcitrantes. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de

menor impacto ambiental experimenta un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se emplean otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos (Ruffini *et al.*, 2016).

La biorremediación microbiana se define como la remoción de un contaminante presente en el suelo, el agua o el aire mediante el empleo de microorganismos. Algunos microorganismos, especialmente ciertas bacterias tienen la habilidad de convertir las moléculas de un contaminante orgánico en dióxido de carbono, agua e iones inorgánicos necesarios para los ciclos biogeoquímicos, como también oxidar o reducir los agentes inorgánicos que contaminan un ambiente, esto permite que se regeneren los ecosistemas que se afectaron por el vertimiento de sustancias orgánicas como el petróleo y sus derivados (hidrocarburos), plaguicidas (compuestos alifáticos y aromáticos halogenados); sustancias inorgánicas (ej. compuestos nitrogenados y del fósforo), y también algunos contaminantes metálicos (Andreolli *et al.*, 2016; Hernández-Ruiz *et al.*, 2017).

Para que las bacterias puedan remover los contaminantes a gran escala existen diferentes técnicas de biorremediación, a continuación se mencionan algunas de ellas:

- ∞ **Bioestimulación**
- ∞ **Bioaumentación**
- ∞ **Landfarming**
- ∞ **Compostaje**

### **1.7.- Principales microorganismos con efecto biorremediador**

Los ecosistemas contaminados se caracterizan por contener una gran diversidad de microorganismos aclimatados a los contaminantes que normalmente son liberados de los procesos de origen. Frecuentemente estos microorganismos son efectivos para degradar los compuestos contaminantes debido a los cambios que se producen a nivel genómico durante largos períodos de aclimatación. La presión selectiva de los contaminantes sobre los microorganismos, permite la

supervivencia únicamente de aquellos que son capaces de adaptar sus mecanismos metabólicos para sobrevivir en esas condiciones (Portilla, 2016).

El éxito de la biorremediación consiste en la selección de microorganismos que puedan degradar materiales contaminados a diferentes temperaturas, pH, salinidad y concentración de nutrientes. Muchos tipos de microorganismos son aislados para mejorar procesos de biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos u otros compuestos recalcitrantes, por ejemplo *Bacillus* spp., *Rhodococcus*, *Mycobacterias*, levaduras, *Micromycetes* y *Pseudomonas*, los cuales utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos simples y complejos y tienen la capacidad de producir enzimas extracelulares capaces de degradar un gran número de compuestos que constituyen contaminantes de los ecosistemas (Echeverri *et al.*, 2011).

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos recalcitrantes que constituyen contaminantes de múltiples ecosistemas. Hasta el presente los géneros que más se utilizan son: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Vibrio*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Gómez *et al.*, 2006; Portilla, 2016).

### **1.8.- Resultados sobre el uso de microorganismos como biorremediadores**

Son muchas las soluciones ambientales que existen para recuperar los suelos que se ven afectados por la contaminación de compuestos orgánicos, lo cual depende de las características propias del recurso suelo, magnitud de la contaminación, tipo de contaminante entre otros. Hoy una de las tecnologías más usada es la biorremediación (Álvarez, 2015).

Estudios realizados por (Balderas-León *et al.*, 2015) en un suelo contaminado en alta concentración de aceite residual automotriz (ARA) aplicaron los criterios de la biorremediación (BR) por doble y secuencial bioestimulación (BS) y posterior fitorremediación (FR) con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus/Burkholderia cepacia* o bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) para reducir el ARA remanente. Los resultados indicaron que la biorremediación del suelo por doble y

secuencial BS: con SM el ARA decreció a 32500 ppm/30 días y con *Proteus. Vulgaris*; lo que disminuyó hasta 10100 ppm/90 días. Su fitorremediación para minimizar el ARA remanente con *S. vulgare* y BPCV a floración lo redujo de 2500 ppm a 800 ppm.

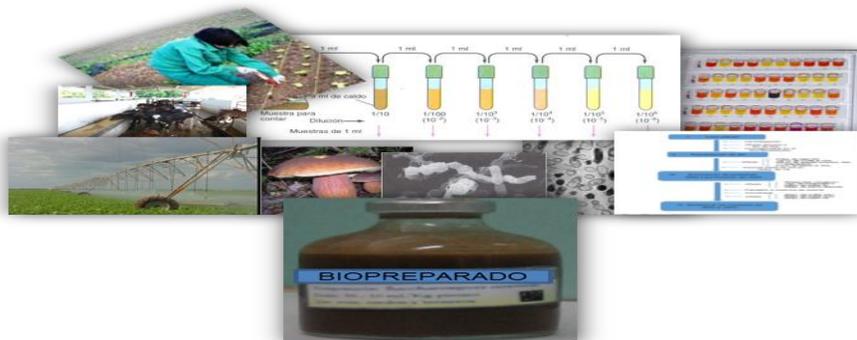
Investigaciones reportadas por Benítez y Miranda (2013), recogen los niveles de contaminación de los cuerpos de aguas superficiales a partir de la utilización inadecuada y excesiva de plaguicidas en la agricultura. Los mismos informaron la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados, carbamatos, triazinas y piretroides, entre otros, en aguas superficiales cercanas a zonas de producción agrícola en Venezuela, Colombia, Ecuador y México. En la mayoría de los casos, las concentraciones encontradas sobrepasan los límites establecidos por las normativas nacionales e internacionales establecidas.

Otros estudios fueron reportados por Herrera *et al.*, (2013), cuando evaluaron la presencia de metales pesados en aguas. Los mismos encontraron: Cd, Ag, Se, Sn, Ni, Cr, Cu, B, Zn, Hg, Ba, Pb, Mn, As y Al en los sedimentos superficiales del sector medio del río Pirro, lo que afecta la calidad del agua que se utiliza para aplicar en los cultivos agrícolas.

Roa y Cañizares (2012), biorremediaron con el uso de algas aguas que contenían fosfatos y nitratos, los que obtuvieron una remoción del 60% de la cantidad inicial de nitratos, mientras que los fosfatos disminuyeron en un 47%. Además alcanzaron la mayor producción de clorofila a (6.5 mg/L) y para carotenos el valor más alto. El examen de viabilidad de la microalga mostró resultados positivos al observarse al microscopio formación de un número importante de cenobios, tres días después de la inoculación en medio Bold de las células extraídas de las microesferas, concordante con un color verde intenso en los cultivos.

Portilla (2016), evaluó 32 cepas, de ellas, solo cuatro fueron capaces de remover la materia orgánica, amonio, fosfato, Cr, Pl, Cu, Co y Zn. Las especies que predominaron fueron *B. licheniformis* y *B. subtilis*, lo que presenta al género *Bacillus* como uno de los más destacados para ser empleado en procesos de biorremediación microbiana.

# Objetivos



## II. OBJETIVOS

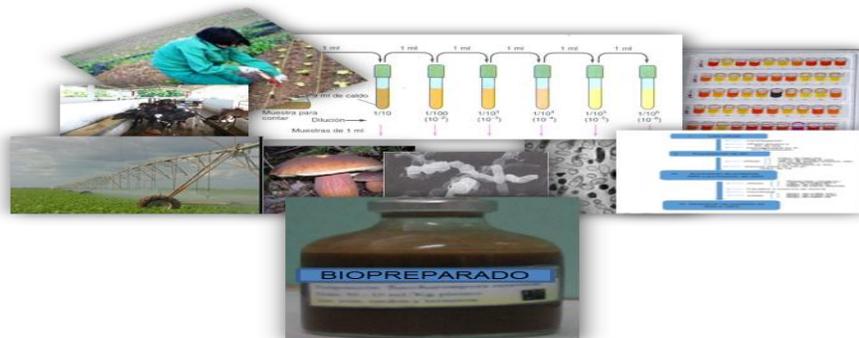
### Objetivo general

Obtención de microorganismos con actividad biorremediadora en sistemas agropecuarios.

### Objetivos específicos

1. Identificar las fuentes contaminantes de los sistemas agropecuarios.
2. Identificar los principales agentes contaminantes de los sistemas agropecuarios.
3. Aislar, seleccionar e identificar microorganismos autóctonos de suelos contaminados y de las áreas de abasto de agua para riego y consumo animal con potencial actividad biorremediadora.
4. Formular biopreparados microbianos estables con capacidad biorremediadora.
5. Evaluar la actividad biorremediadora de los biopreparados seleccionados *in vitro* e *in situ*.

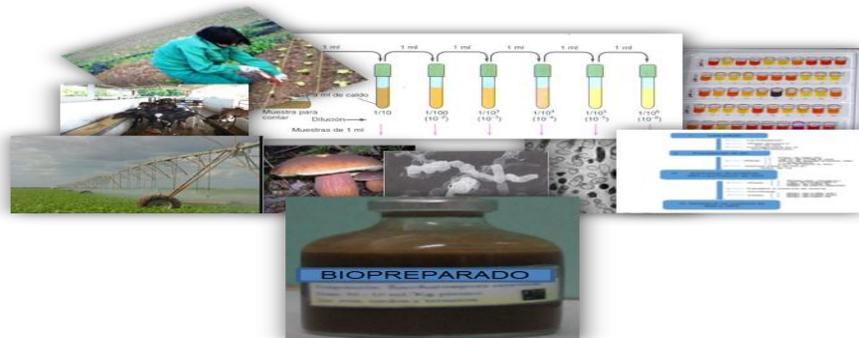
# Resultados Esperados



### III. RESULTADOS ESPERADOS

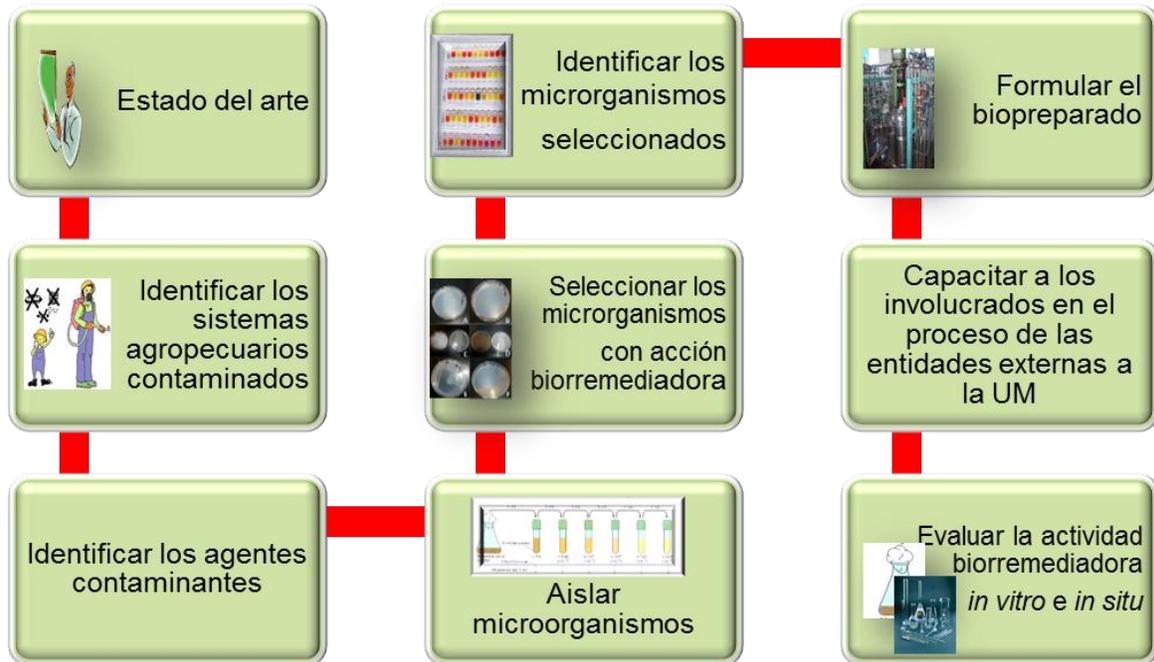
- ☞ Lograr identificar los principales suelos de interés agrícola contaminados por la acción de agentes químicos y la causa de la contaminación.
- ☞ Identificar en los sistemas de abasto de agua para regadío y consumo animal los principales agentes contaminantes.
- ☞ Aislar, identificar y seleccionar microorganismos con posible efecto biorremediador.
- ☞ Proponer un nuevo producto biológico con efecto biorremediador.
- ☞ Evaluar el producto obtenido en condiciones *in vitro* e *in situ*.
- ☞ La formación de nuevos estudiantes de culminación estudios.
- ☞ Aportaría 2 publicaciones del Grupo III.
- ☞ Presentación en eventos y jornadas científicas de la facultad.
- ☞ Capacitación de los trabajadores involucrados en la evaluación en el terreno del producto obtenido.

# Metodos y Procedimientos



## IV. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS: CRONOGRAMA

El proyecto se desarrollará en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas de conjunto con el Departamento de carrera. El desarrollo del cronograma de trabajo se presenta en la figura 2.



**Figura 2.** Cronograma de trabajo (Fuente: Elaboración propia)

### 1<sup>era</sup> Etapa: Estado del arte

En esta etapa se conformará el equipo que trabajará en el futuro proyecto, con experiencia en la temática. Para su conformación se tendrán en cuenta los investigadores del CEBIO que poseen experiencias en la temática, los profesores investigadores del Departamento de Carrera que están vinculados con la asignatura de Manejo y Suelo, así como, los estudiantes que pertenecen al Grupo científico estudiantil del Grupo de Aditivos Nutricionales del CEBIO.

Labores a desarrollar en esta etapa.

- ∞ Revisión de bibliografía actualizada del tema
- ∞ Biorremediación.

- ∞ Principales microorganismos biorremediadores.
- ∞ Acción de los químicos sobre los suelos.
- ∞ Existencias de productos biorremediadores sobre los suelos.
- ∞ Principales agentes de contaminación en las fuentes de abastos de los sistemas de regadíos y consumo animal.

### **2<sup>da</sup> Etapa: Identificar los sistemas agropecuarios contaminados**

Para el desarrollo de esta etapa se dividirá en dos partes:

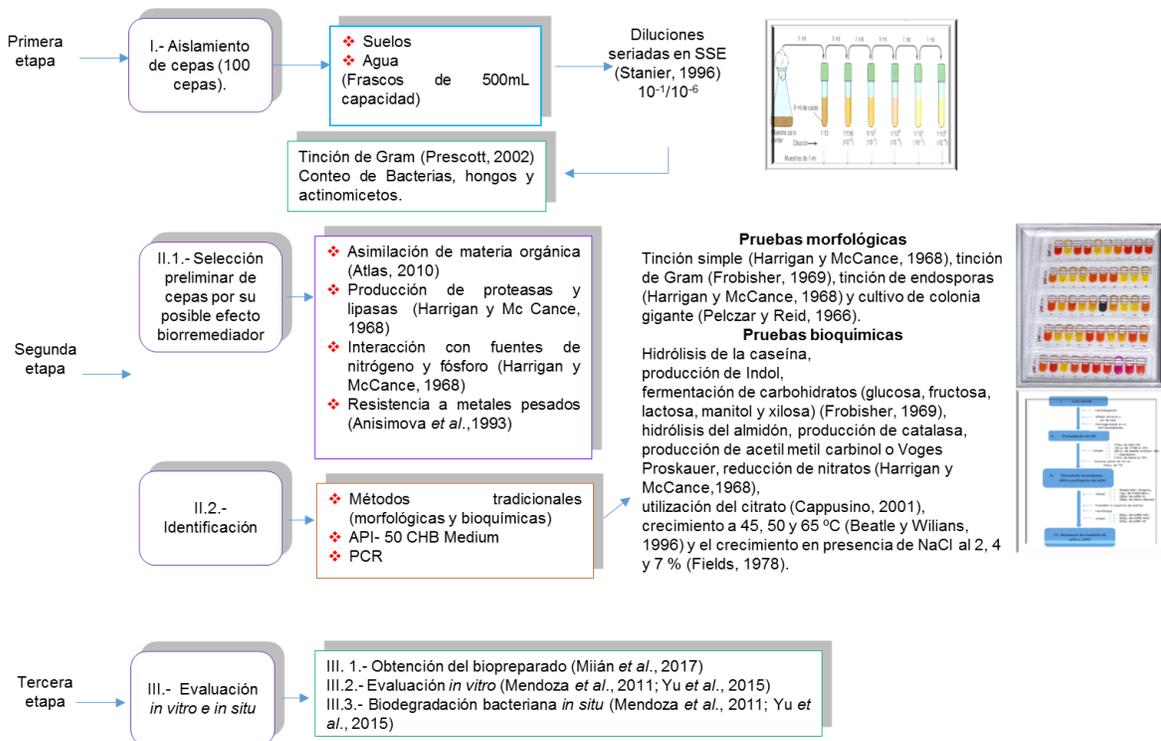
- Identificar los suelos contaminados
- Identificar las fuentes de abasto de agua para regadío y consumo animal.

Se realizará una visita al Laboratorio Provincial de Suelo de la provincia de Matanzas, con el objetivo de conocer los principales suelos que se encuentren afectados por compuestos químicos u otros agentes contaminantes que afecten la calidad de los suelos y tengan una incidencia colateral en los cultivos que se desarrollen. Así como, a entidades de la Empresa Pecuaria Genética de Matanzas y a la delegación de la Agricultura para conocer las fuentes de abastos y la calidad para su uso en los sistemas de regadío y para ser consumidas por los animales de interés zootécnicos en las unidades de producción pecuarias.

**3<sup>era</sup> Etapa:** Identificar los principales agentes contaminantes en los suelos y en los sistemas de abastos de agua para uso en los sistemas de regadíos y consumo animal.

**4<sup>ta</sup> Etapa:** Aislar, seleccionar e identificar microorganismos con posible efecto biorremediador. Para esta etapa se procederá según la metodología de trabajo expuesta en la figura 3.

## IV.- MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS: CRONOGRAMA



**Figura 3.** Secuencia experimental para la obtención de cepas con posible efecto biorremediador. (Fuente: Elaboración propia)

**I Etapa:** Aislamiento de cepas, esta investigación se realizará en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas.

### Toma de muestras

De acuerdo a la extensión y forma del terreno, se eligen las zonas donde se efectuará la toma de muestra, limpiándose estas de toda vegetación superficial y sustancias ajenas al suelo. Se tomará 1g de muestra de suelo y en el caso de las muestras líquidas se tomará 1mL de agua, se adicionará a un tubo que contiene solución salina estéril (SSE), y se realizará la técnica de las diluciones seriadas de Stanier (1996). De las diluciones de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se tomara 1 mL y se añade en la placa.

Para la siembra de la muestra de suelo se realizará de la siguiente manera:

- Placa con el medio Agar Saboraud (BIOCEN): Hongos  $10^{-4}$ .

- ∞ Placa con el medio Agar Actinomicetos (BIOCEN): Actinomicetos  $10^{-5}$ .
- ∞ Placa con el medio Agar Nutriente (BIOCEN): Bacterias  $10^{-6}$ .

Para esparcir la muestra se auxiliará de la espátula de Drigalsky. Incubar a  $30^{\circ}\text{C}$  y realizar observaciones diarias efectuando el conteo (tinción de Gram):

Bacterias: 24 horas.

Hongos: 6 días.

Actinomicetos: 14 días.

Para conocer la calidad del agua para regadío y consumo animal se seguirá la metodología de determinación de la concentración de *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes. Para ello se utilizará la técnica de Filtración por Membrana (FM), se emplearán membranas estériles de nitrato de celulosa (Sartorius, con un tamaño de poro de  $0,45\ \mu\text{m}$  y  $47\ \text{mm}$  de diámetro) y un equipo de filtración Sartorius. Se utilizarán placas Petri plásticas estériles ( $47\ \text{mm}$ ) con los medios Agar Lactosa Tergitol (concentración final  $0,095\ \text{\%}$  peso/volumen) con cloruro de trifenil- 2,3,5-tetrazolio (TTC) (concentración final  $0,024\ \text{\%}$  [peso/volumen]) (Merck) y agar Chromocult para coliformes (Merck) para la enumeración de los coliformes termotolerantes y *E. coli* respectivamente. Se siguió la metodología establecida por AFNOR (2001). En el medio agar Lactosa Tergitol con TTC, se consideraran bacterias coliformes termotolerantes a las colonias amarillo-naranja con un halo amarillo alrededor después de 24 h de incubación a una temperatura de  $44 \pm 0,5\ ^{\circ}\text{C}$ . En el caso de *E. coli* se considerarán como colonias de esta especie a las que presentaron una coloración azul oscuro o violeta en el agar Chromocult para coliformes después de 24 h de incubación a  $37 \pm 0,5\ ^{\circ}\text{C}$ . El conteo se expresará como unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 mL de muestra y se sembrarán tres réplicas por cada punto (Larrea-Murrell *et al.*, 2013; Romeu-Álvarez *et al.*, 2012).

## II. Etapa:

### **II.1. Selección preliminar de cepas por su posible efecto biorremediador**

#### **Asimilación de materia orgánica**

Los aislados se sembrarán por estría en placas Petri con un medio sólido, Medio para Asimilación de Carbono (Atlas, 2010). Los carbohidratos que se utilizarán son:

monosacáridos: glucosa, manosa y xilosa

disacáridos: lactosa

polisacáridos: almidón

Los cultivos se incubarán a 30 °C por 48 horas; posteriormente se observará la ocurrencia o no de crecimiento en presencia de cada carbohidrato.

### **Producción de proteasas**

Se evaluará la capacidad de hidrólisis de dos proteínas: caseína y gelatina, de acuerdo a la metodología descrita por Harrigan y McCance (1968). La hidrólisis de la caseína se comprueba mediante la siembra de los aislados en un medio con esta proteína y la hidrólisis de la gelatina se determina en el medio Gelatina - Agar de Frazier modificado. Ambos ensayos se incubarán a 30 °C durante cinco días. La prueba de la gelatina se revelará con una solución de cloruro mercuríco (8 a 10 mL del reactivo). Ambas actividades hidrolíticas se verificarán por la aparición de una zona transparente alrededor del crecimiento bacteriano (halo de hidrólisis).

### **Producción de lipasas**

Se evaluará en el medio Agar - Tween (Harrigan y McCance, 1968). Los aislados se sembrarán y se incubarán a 30 °C durante cinco días; cada 24 h se verifica la aparición de un precipitado alrededor del desarrollo bacteriano, producto de la combinación del calcio y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. La selección de este medio se sustenta al tener en cuenta que las lipasas son generalmente producidas en carbono lipídico como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tweens (Gupta *et al.*, 2004).

### **Interacción con fuentes de nitrógeno**

Se emplearán diferentes medios de cultivo, según el tipo de interacción a determinar. La reducción desasimilativa del nitrato se evaluará en el medio Agua de peptona nitrato (Harrigan y McCance, 1968); para el revelado se utilizarán los

reactivos I y II de Griessllosvay, zinc en polvo y se realizará la observación de la campana de Durhan contenida en cada tubo de prueba. Se emplearán los medios: Medio para Bacterias Oxidadoras de Amonio, Medio para Bacterias Oxidadoras de Nitrito y Medio para Bacterias Amonificantes (Merck), para la detección de estas características, según las metodologías informadas por Atlas (2010). Los microorganismos inoculados en cada medio se incubarán a 30 °C durante una semana. Para la detección de amonificación se medirá la absorbancia por espectrofotometría a 640 nm, para evaluar la proliferación bacteriana. Para la detección de amonio se empleará el reactivo de Nessler, la aparición de un precipitado carmelita en el medio indicara un resultado positivo. Los iones nitrato y nitrito se detectarán mediante el reactivo de Griess y zinc en polvo.

#### **Interacción con fuentes de fósforo**

Se evaluará la acumulación de fosfato en un medio base líquido (Atlas, 2010), se inocularán los aislados y se mantendrán en interacción con el medio a 30 °C y 100 r.min<sup>-1</sup> durante 72 h. La capacidad de las bacterias de acumular este compuesto se constatará por el método analítico del cloruro estañoso (APHA-AWWA-WPCF, 2001).

Se realizará un ensayo *in vitro* donde se empleó como muestra el suelo afectado, el agua y cada uno de los aislados por separados. Se prepararán erlenmeyers con 5g de suelo proveniente de los diferentes cultivos que recibieron productos químicos y 5mL de los diferentes lugares de agua que se muestrearon y se realizarán suspensiones a partir de cada aislamiento hasta obtener una concentración de 600 células/mL (turbidez similar al patrón #2 de la escala de MacFarland), luego se inocularán las muestras de agua y suelo, hasta obtener una muestra total de 10mL. Luego se medirá la capacidad de este aislado de acumular fosfato mediante el método del cloruro estañoso.

#### **Ensayo de resistencia a metales**

Se realizó según la metodología empleada por Anisimova *et al.* (1993).

### **Preparación de las soluciones de metales**

Se prepararán disoluciones a una concentración de 5 mM y pH 7 de los metales cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ), plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en las que se utilizarán las sales: dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ), cloruro de cobalto  $\text{CoCl}_2$ , sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) y sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), respectivamente. Estas disoluciones concentradas servirán de partida para la preparación de los medios con las diferentes concentraciones de metales a estudiar.

### **Preparación de los medios de cultivo**

Para cada metal se ensayarán 3 concentraciones:  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ : 1,0; 2,0; 3,0 mM respectivamente.

Se prepararán erlenmeyers con medio agar nutriente (BioCen 28g de agar para 1000 mL de agua destilada) y cada medio se suplementará con un determinado volumen de la disolución de concentración 5 mM de cada metal, de manera individual, para lograr las diferentes concentraciones deseadas. Posteriormente, el medio se agitará para mezclar el metal añadido con el agar y se verterá en placas Petri.

### **Siembra de los aislados**

Se partirá de un pre - inóculo preparado en Caldo nutriente, con un crecimiento de 24 horas, se realizará la siembra de los aislados por estría en placas Petri con agar nutriente suplementado con el metal, cada una con su réplica. La siembra se incubará a  $30^\circ\text{C}$ , 72 horas.

Como controles se emplearán: medio agar nutriente sin los metales, donde se inoculará cada muestra para verificar su crecimiento en condiciones normales, medio con agar nutriente con la concentración estudiada para cada metal, sin inoculación, para la verificación de la esterilidad de los medios empleados y agar nutriente con la concentración estudiada para cada metal, inoculados con cepas de resistencia conocida a estos metales, pertenecientes a la colección de microorganismos del Departamento de Fisiología, del Instituto de Ciencia Animal

(ICA) y del cepario del Centro de Higiene y Epidemiológico de la provincia de Matanzas.

### **Lectura de los resultados**

Se realizarán 3 lecturas del crecimiento, a las 24, 48 y 72 horas. Se observará si hay crecimiento o no del aislado bacteriano en el medio suplementado con la solución de metal. Se clasificará la presencia de crecimiento como resistencia (R) y la ausencia de crecimiento como sensibilidad (S).

**II.2.** Identificación microbiana convencional se llevará a cabo en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas /2019.

### **Identificación microbiana convencional**

#### **Caracterización morfo-tintoriales y fisiológica - bioquímica de los aislados**

A partir de la siembra por agotamiento en medio Agar nutriente, se determinarán las características culturales de cada aislado. La determinación de las características morfológicas y tintoriales se realizará a través de la Tinción de Gram y observación de las preparaciones en un microscopio óptico (ocular 16x, objetivo 100x). Adicionalmente, en el caso de las bacterias Gram positivas se realizara la técnica de Tinción con verde malaquita (Harrigan y McCance, 1968) para la observación de la presencia o ausencia de endosporas. Las bacterias Gram negativas se sembraran por punción en tubos con medio Agar nutriente sin inclinación (Agar anaerobio) (Prescott, 2002), para la evaluación del crecimiento en función del oxígeno. Metodología descrita por Milián *et al.* (2014).

Además se realizaran pruebas fisiológicas y bioquímicas que permitieran en su conjunto ubicar los aislados microbianos en grupos taxonómicos generales, según el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2001).

Para determinar las especies de *Bacillus* se usará la clave de identificación de Fields (1978) (Anexo 2). Las técnicas que se utilizarán serán las siguientes:

**Pruebas morfológicas:** Tinción simple y tinción de endosporas (Harrigan y McCance, 1968), tinción de Gram (Frobisher, 1969), y cultivo de colonia gigante (Pelczar y Reid, 1966).

**Pruebas bioquímicas:** Hidrólisis de la caseína, producción de Indol, fermentación de carbohidratos (glucosa, fructosa, lactosa, manitol y xilosa) (Frobisher, 1969), hidrólisis del almidón, producción de catalasa, producción de acetil metil carbinol o Voges Proskauer, reducción de nitratos (Harrigan y McCance, 1968), utilización del citrato (Cappusino, 2001), crecimiento a 45, 50 y 65 °C (Beatle y Wilians, 1996) y el crecimiento en presencia de NaCl al 2, 4 y 7 % (Fields, 1978).

**Determinación de los perfiles de fermentación de carbohidratos:** Se seguirá la metodología para el empleo del API 50 CHB Medium y las Galerías API 50 CH (BioMérieux, S. A., France). La identificación de las cepas se llevará a cabo mediante la utilización del Apilab Plus Software, Versión 3.3.3. Esta investigación se realizará a través de algún proyecto de intercambio internacional.

**Identificación por biología molecular: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

Se sembrarán las cepas que presentaron potencialidades en la biorremediación frente a la caracterización realizada en condiciones *in vitro*. Estos aislados se sembraron en Caldo nutriente y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las muestras serán secuenciadas en universidades externas con apoyo de algún proyecto internacional.

Etapa III: Evaluación *in vitro* e *in situ* de las posibles cepas con efecto biorremediador: esta etapa constará de dos fases:

**1<sup>era</sup> Fase: Elaboración del producto:** tradicionalmente los medios cultivos son sumamente costosos, por lo que se propone para la obtención del biopreparado trabajar con medios de cultivos modificados (Milián *et al.*, 2017) por el Grupo de Aditivos nutricionales pertenecientes al CEBIO formulados con componentes nacionales los que se abaratan mucho más, lo que favorece la factibilidad del mismo bajo las condiciones técnico- materiales de Cuba.

Se incluirá en esta etapa los estudios de caracterización y estabilidad del biopreparado (tabla 2), según las normas vigentes, descritas para los estudios de calidad Microbiológica de los Alimentos de Consumo Humano y Animal NC-ISO (Bennett y Lancette, 2007).

**Tabla 2.** Pruebas microbiológicas para la determinación de microorganismos contaminantes

Pruebas microbiológicas	Referencia NC- ISO
Recuento de coliformes fecales y totales	4832: 2010
Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4833-1: 2014
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	6888-1: 2003
Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	4833-1: 2014
Conteo de <i>Salmonella</i> en 25 mL	6579: 2008
Conteo de Enterobacterias	4832: 2010
Recuento de levaduras viables por mL	7954:2002
Recuento de hongos	7954:2002

2<sup>da</sup> Fase: *Microorganismos*: las cepas seleccionadas e identificadas con posible efecto biorremediador. Se procederá según la metodología descrita por (Mendoza *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015).

3<sup>era</sup> Fase: se dividirá en dos partes:

Parte I: *Capacitación*: Incluye la capacitación en las diferentes entidades donde se aplicará el producto y se medirá el impacto ambiental sobre el ecosistema.

La capacitación se hará a través de talleres en las diferentes recrias, directo con el productor y el resto del personal que ahí labora, donde se incluye como elementos importantes el productor, administrador y el médico veterinario.

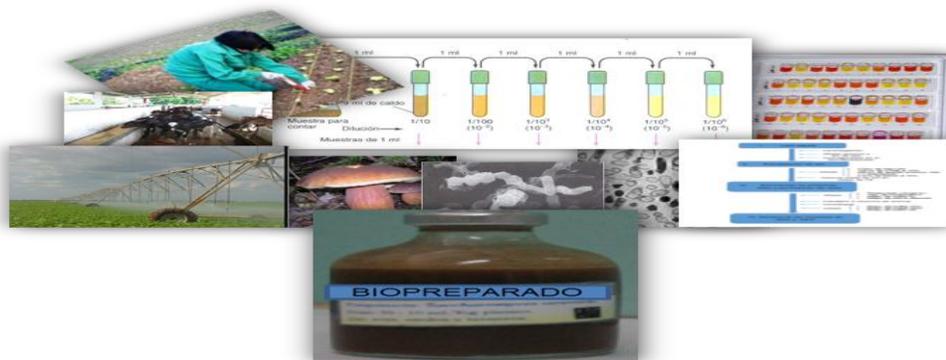
La capacitación contemplará dos tipos de talleres de trabajo: primeramente con funcionarios de la empresa y segundo con los productores directos. Estos talleres permitirán difundir la importancia de trabajo en equipo y la conciencia de que es

necesario tener un ecosistema seguro lo que permitirá de forma directa –indirecta el incremento de los índices productivos en el territorio.

Parte II: *Evaluación*: Se evaluará el producto obtenido en condiciones de laboratorio y en los lugares muestreados inicialmente. Se procederá según la metodología descrita por (Mendoza *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015).

# Recursos necesarios

## Presupuesto global del Proyecto



## V. RECURSOS NECESARIOS Y PRESUPUESTO GLOBAL DEL PROYECTO

Los estudios de factibilidad son una parte del proceso inversionista y constituye la culminación de los estudios de pre inversión y por lo tanto de la formulación y preparación de un proyecto, lo que constituye la base de la decisión respecto a su ejecución. Los estudios de pre inversión, pueden pasar por las etapas previas de ideas, perfil (oportunidades) y prefactibilidad con independencia de la complejidad y características del proyecto y de los estudios que requiera. En el año 2006 el Ministerio de Economía y Planificación (MEP) dicto la Resolución 91, que establece las indicaciones para el proceso inversionista con enfoque a la Dirección Integrada de Proyecto (DIP) (Hidalgo, 2010). Dando respuesta a lo establecido en esta resolución es preciso demostrar la factibilidad económica de la obtención de microorganismos con actividad biorremediadora en sistemas agropecuarios, de ahí que se prosigue a exponer la factibilidad de realizar el proyecto.

En la tabla 3, se presentan los recursos humanos para llevar a cabo el proyecto; en la tabla 4, los recursos materiales; en la tabla 5, el presupuesto global del proyecto y en la tabla 6, la planificación de los resultados según la metodología propuesta por la Dirección de Ciencia y Técnica de la Universidad de Matanzas, para los Proyectos Institucionales.

**Tabla 3.-** Recurso humanos principales

Nombres y apellidos	J de resultado	Grado científico	Categoría docente	Entidad	% de participación
Grethel Milián Florido	X	Dr.C	PT	UM	15
Ana Rondón Castillo	X	Dr.C	PT	UM	15
Marlene Martínez Mora	X	MSc.	PA	UM	15
Yasmari Rubio Fontanils		-	PI	UM	15
Caridad Díaz Boffil		MSc.	PA	UM	5
Jorge L. Álvarez Marques		MSc.	PA	UM	5
Idania Rodríguez Martínez		MSc.	Pa	UM	5
Loreta Brito Pérez		-	TL	UM	15
Especialista de la producción	X	-	EP	Empresas	10

**PT:** profesora titular, **PA:** profesora auxiliar, **PI:** Profesor instructor, **TL:** técnico de laboratorio y **EP:** especialista de la producción

**Tabla 4.-** Recursos necesarios que aportan las instituciones involucradas

Recursos necesarios	
Aporte institucional	Materiales
Universidad de Matanzas	Medios de cultivo
	Cristalería y miscelánea
	Agua destilada y corriente
	Balanza digital
	Autoclave
	Refrigerador
	Incubadora
	Flujo laminar
	Zaranda termostatada
	pH digital
	Microscopio óptico
	Erlenmeyer de diferentes capacidades
	Frascos de cristal
Placas petri	
Especialistas de la producción	Garantizar las áreas donde se aislarán los microorganismos
	Participar en la: <ul style="list-style-type: none"> <li>✚ capacitación</li> <li>✚ aplicación de los productos</li> </ul>
Conjuntos	Medir el <b>Impacto Ambiental</b>

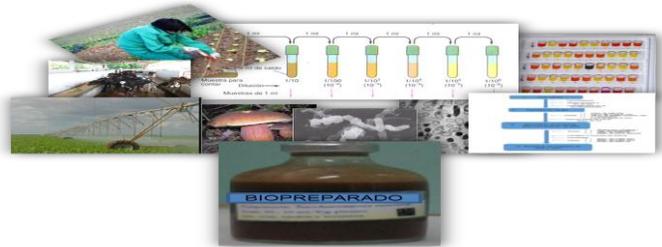
**Tabla 5.- Presupuesto global del proyecto**

	Gastos Bienes y servicios	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12
2.01	Viáticos										
2.01.02	Alimentación										
2.01.02	Transportación			500							
2.01.03	Alojamiento										
2.01.04	Gastos de Bolsillo										
2.02	Alimentación										
2.02.01	Alimentos consumo humano										
2.02.02	Bebidas										
2.02.03	Productos Agropecuarios										
2.02.05	Servicios gastronómicos Contratados										
2.02.06	Alimento Consumo Animal										
2.03	Vestuario y Lencería										
2.05	Medicamentos y Materiales Afines										
2.08	Energía Combustibles y Lubricantes										
2.10	Otros Consumos Materiales			500							
2.10.01	Libros Revistas Periódicos										
2.10.02	Papel de escritorio				100						
2.10.03	Papel para computadora										
2.10.04	Artículos de limpieza		100								
2.10.05	Útiles de escritorio										
2.10.06	Utiles de materiales eléctricos										
2.10.07	Utiles de herramientas										
2.10.08	Materias primas y materiales		300								
2.10.99	Otros no especificados previamente										
2.11	Servicios Profesionales										
2.11.01	Servicios Jurídicos										
2.11.02	Servicios de contabilidad y auditoría										
2.11.03	Servicios de Procesamiento de Datos										
2.11.04	Servicios de Ingeniería y arquitectónicos										
2.11.05	Servicios de capacitación										
2.11.06	Servicios de lavandería y tintorería										
2.11.07	Servicios de seguridad y protección										
2.11.99	Otros no especificados previamente(colegiatura eventos)										
2.12	Servicios Contratados a Privados										
2.13	Otros servicios contratados										
2.13.01	Agua										
2.13.02	Teléfono										
2.13.03	Otros servicios de telecomunicaciones										
2.13.04	Transportación										
2.13.99	Otros no especificados previamente										
2.14	Otros gastos										
2.14.02	Efecto económico y social innovación y racionalización										
2.14.05	Indemnizaciones										
	<b>Total</b>		<b>400</b>	<b>1000</b>		<b>100</b>					

**Tabla 6.-** Resultados y planificación de las actividades principales

Resultados Planificados	Entidades Participantes	Actividades Principales	Inicio	Término	Indicadores verificables
Actualización del estado del arte	UM	Revisión de bibliografía actualizada del tema.	Enero/18	Febrero/18	Monografía (1)
Identificar las fuentes contaminantes	UM	Realizar el muestreo (agua y suelo) en distintos puntos.	Febrero/18	Marzo/18	Publicación (1: Rev: Avanzada Científica) Eventos Científicos Informe Parcial
		Visitar las instalaciones estatales de las áreas muestreadas y conocer sus principales productos de desechos para evaluarlos.	Marzo/18	Abril/18	
		Identificar las principales zonas de contaminación.	Mayo/18	Junio/18	
Identificar los agentes contaminantes	UM	Aislar posibles contaminantes presentes en las muestras tomadas.	Octubre/18	Diciembre/18	Eventos Científicos Informe parcial
		Identificar los agentes contaminantes de origen químico y biológico.	Enero/19	Abril/19	
Aislar e identificar microorganismos autóctonos con potencial actividad biorremediadora	UM	Aislar microorganismos autóctonos e inocuos para el hombre y el ecosistema.	Mayo /19	Julio/19	Publicación (1: bases de datos internacionales) Eventos Científicos Informe parcial
		Identificar los microorganismos aislados.	Septiembre/19	Enero/20	
		Valorar la utilización de especies previamente identificadas que forman parte de la colección de cepas del CEBIO con capacidad biorremediadora.	Febrero/20	Marzo/20	
Seleccionar los cultivos microbianos atendiendo a su eficiencia biorremediadora	UM	Evaluar la capacidad biorremediadora de los microorganismos para cada uno de los agentes contaminantes. Conservar los microorganismos	Abril/20	Junio/20	Publicación (1: bases de datos internacionales) Informe parcial
Formular biopreparados microbianos estables con capacidad biorremediadora	UM	Establecer consorcios o simbiosis entre los microorganismos más eficientes en la biorremediación.	Octubre/20	Enero/21	Publicación (1: bases de datos internacionales) Informe parcial
		Evaluar la capacidad biorremediadora de los mismos.	Enero/21	Abril/21	
		Establecer las condiciones fisiológicas adecuadas para el biopreparado formulado.	Abril/21	Mayo/21	
		Realizar ensayos de estabilidad a dichas formulaciones con capacidad biorremediadora.	Mayo/21	Junio/21	
Evaluar la actividad biorremediadora de los biopreparados seleccionados <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	UM/ Entidades del territorio vinculadas con la investigación	Evaluar <i>in vitro</i> la capacidad de descomposición de contaminantes del biopreparado.	Septiembre/21	Diciembre/21	Informe final
		Aplicar el biopreparado en las zonas de mayor índice de contaminación y evaluar su efecto biorremediador.			
		Capacitación a los trabajadores externos vinculados.			
		Informe final de la investigación	Diciembre/21		

# Referencias Bibliográficas



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., Prajapati, R., Singh, O.P., Raza, S.K. & Thakur, L.K. 2015. Pesticide residue in water--a challenging task in India. *Environ Monit Assess.* 187(2):54
- Alarcón A. & Ferrera-Cerrato R. 2015. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y AGUAS. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 31 (2) 211-212
- Ali, N., Dashti, N., Salamah, S., Sorkhoh, N., Al-Awadhi, H. & Radwan, S. 2016. Dynamics of bacterial populations during bench-scale bioremediation of oily seawater and desert soil bioaugmented with coastal microbial mats. *Microb Biotechnol.* 11: 1-15
- Alonso, J., García, M.A., Pérez-López, M. & Melgar, M.J. 2004. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. *Revista de Toxicología.* España. 21: pp 11-15
- Álvarez, H. 2015. Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Revista Química Viva,* 14 (1):18-25. E-ISSN: 1666-7948
- Andreolli, M., Albertarelli, N., Lampis, S., Brignoli, P., Khoei, N.S. & Vallini, G. 2016. Bioremediation of diesel contamination at an underground storage tank site: a spatial analysis of the microbial community. *World J Microbiol Biotechnol.* 32(1):1-6
- Anisimova, L., Suinora, T. & Boronin, A. 1993. Resistance to metals gramnegative isolated from sewage and soils of industrial regions. *Microbiology.* 62(5): 505-508
- APHA, AWWA. & WPCF. 2001. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 20<sup>th</sup> ed., Washington, DC
- Atlas, R.M. 2010. Handbook of Microbiological Media 4th Edition. ASM Press and CRC Press: p. 2044
- Aviñó, J.P.N., Alonso, I.A. & López-Moya, J.R. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas.* 16 (2): 10-25
- Ayesa, F. 2018. Biorremediación. <http://www.ingenieroambiental.com> [Consultado: Marzo 6, 2018]
- Barrios, Y. 2011. Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Bioteología Aplicada.* 28:60-68
- Balderas-León, I. & Sánchez-Yáñez, J. M. 2015. Biorremediación of soil polluted by 75000 ppm of waste motor oil applying biostimulation and phytoremediation with *Sorghum vulgare* and *Bacillus cereus* or *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society.* 6 (1): 23-32 Selva Andina Research Society La Paz, Bolivia. ISSN: 2072-9294. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361336202005>
- Beatle, S.H. & Wilians, A.G. 1996. "Conference of the Society for Applied Bacteriology". *Suplemente to Journal.* 81(2): 24
- Benítez-Díaz, P. & Miranda-Contreras, L. 2013. Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* 29: 7-23. Universidad Nacional Autónoma de México Distrito Federal, México. ISSN: 0188-4999. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958001>
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2001. Bergey's Manual Trust Ed. Springer-Verlay New York. 1 y 2

- Boullosa, N. 2011. Biorremediación: 10 Métodos de recuperación ecológica. Granja Vertical "5 Terre Style": Revolución urbana verde [Consultado: Marzo 2, 2018]
- Bradley, P.M., Battaglin, W.A., Iwanowicz, L.R., Clark, J. & Journey, C.A. 2015. Aerobic biodegradation potential of endocrine disrupting chemicals in surface-water sediment at Rocky Mountains National Park, USA. *Environ Toxicol Chem.* 20:1-14
- Cappusino, J.G. 2001. Microbiology and Laboratory Manual. 6 Ed: 157-491
- Carballo, M.E, Heydrich, M., Rojas, N., Salgado, I., Romeu, B., Manzano, A.M., Larrea, J., Domínguez, O., Martínez, A., Sánchez, M.I., Cruz, M., Guerra, G., Rojas, M. & Ramos, M. 2011. Impact of microbial and chemical pollution in Cuban fresh water ecosystems: strategies for environmental recovery. *Biotecnología Aplicada.* 28:276-279
- Chagas-Spinelli, A.C., Kato, M.T., Lima, E.S. & Gavazza, S. 2012. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *J Environ Manage.* 113:510-6
- Cárdenas, J.F., Moctezuma, M.G., Acosta, I. 2010. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes ríos de la Huasteca Potosina. *Revista Académica de Investigación Tlatemoani.* Marzo-No. 1
- CISAN. 2018a. La tecnología alimentaria y la inocuidad de los alimentos.
- CISAN. 2018b. <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s00.htm#Contents>, [Consultado: Marzo 2, 2018]
- CITMA Segmento Ambiental. CV. El portal del medio ambiente en Cuba; 2015. Disponible en: <http://www.medioambiente.cu/diccionario.Asp>, [Consultado: Abril 25, 2015]
- CITMA Segmento Ambiental. Informe de Manejo Integrado de Agua, Matanzas, Cuba. 2013. Disponible en: <http://www.medioambiente.cu>, [Consultado: Mayo 3, 2015]
- Cobos, C.R. 2002. El agua: Situación actual y necesidades de gestión. Serie de documentos técnicos: No. 5. Universidad Rafael Landívar (URL). Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas (FCAA).
- Copetti, D., Finsterle, K., Marziali, L., Stefani, F., Tartari, G., Douglas, G., Reitzel, K., Spears, B.M., Winfield, I.J., Crosa, G., D'Haese, P., Yasseri, S. & Lüring, M. 2015. Eutrophication management in surface waters using lanthanum modified bentonite: A review. *Water Res.* 6(15): 1-30
- Coronel, V.E. & Tenesaca, M.N. 2013. Estudio de factibilidad de un proceso de biorremediación del colorante índigo presente en aguas residuales de la industria textil en la ciudad de Cuenca, a través de hongos ligninolíticos. Tesis de Grado en Opción al Título de Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca. España
- Cortés, X. & Fernández, L. 2013. Aislamiento de microorganismos acumuladores de metales. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería
- Covarrubias, S. A. & Peña, J. J. C. 2017. Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (Especial Biotecnología e ingeniería ambiental) 7-21. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01
- Cuberos, E., Rodríguez, A.I. & Prieto, E. 2009. Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista Salud Pública.* 11(2): 278-289.

- Cycoń, M., Żmijowska, A., Wójcik, M. & Piotrowska-Seget, Z. 2013. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *J Environ Manage.* 117:7-16
- Dash, H.R. & Das, S. 2015. Diversity, community structure, and bioremediation potential of mercury-resistant marine bacteria of estuarine and coastal environments of Odisha, India. *Environ Sci Pollut Res Int.* 19:1-11
- Delgadillo-López, A.E., González-Ramírez, C.A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J.R. & Acevedo-Sandoval, O. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 14: 597- 612
- Díaz-Asencio, M., Alvarado, J.A., Alonso-Hernández, C., Quejido-Cabezas, A., Ruiz-Fernández, A.C., Sanchez-Sanchez, M., Gómez-Mancebo, M.B., Froidevaux, P. & Sanchez-Cabeza, J.A. 2011. Reconstruction of metal pollution and recent sedimentation processes in Havana Bay (Cuba): a tool for coastal ecosystem management. *J Hazard Mater.* 196:402-11
- Doan, C. 2010. Comportamiento de las plantas de henequén (*Agave fourcroydes* L.) cultivadas en altas concentraciones de metales pesados. Tesis de Maestría. Universidad de Matanzas. Cuba
- Echeverri, G.E., Manjarrez, G. & Cabrera, M. 2011. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.* ISSN: 1794-2470.8 (13): 1- 120
- Fields, M. 1978. Métodos para el estudio de las bacterias esporuladas termofilas de interés en las industrias alimentarias y sanitarias. 1st ed., Zaragoza, España: Acribia S.A., 250 p., ISBN: 978-84-200-0389-4, Available: <<http://www.agapea.com/libros/Metodos-para-el-estudio-de-las-bacterias-esporuladas-termofilas-de-interes-en-las-industrias-alimentarias-y-sanitarias-9788420003894-i.htm>>, [Consulted: May 15, 2017]
- Filippelli, G.M. 2008. The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements.* 4: 89–95
- Frobisher, M. 1969. Microbiología, Ed. Salvat. España
- Gálvez, A.M. 2003. Fitorremediación de los suelos contaminados con metales pesados. México. 111h. Tesis (en opción al título de Máster en Biotecnología). Universidad de las Américas Puebla, México
- Gómez, M.L., Vivas, L.J., Ruiz, R.A., Reyes, V.R. & Hurtado, C.A. 2006. Bacterias marinas nativas degradadoras de compuestos orgánicos persistentes en Colombia. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR - Santa Marta. 32 p. (Serie de publicaciones generales No. 19). ISBN: 958-97349-6-0
- González-Chávez, M.C. 2005. Remediation of Soils Polluted with HeavyMetal Using Plants and Rhizospheric Microorganisms. *Terra Latinoamericana*, 23 (1): pp. 29-37. E-ISSN: 2395-8030
- Gu, P., Shen, R.F. & Chen, Y.D. 2008. Diffusion pollution from livestock and poultry rearing in the Yangtze Delta, China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 15(3):273-7
- Gupta, R., Gupta, N. & Rath, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763–781
- Harrigan, W.F. & McCance, M.E. 1968. Métodos de laboratorio en Microbiología. Editorial Académica. España: p.426

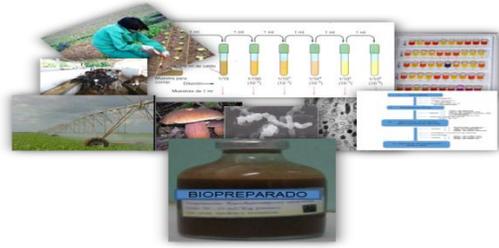
- Hernández-Ruiz, G.M., Álvarez-Orozco, N.A & Ríos-Osorio, L.A. 2017. Bioremediation of organophosphates by fungi and bacteria in agricultural soils. A systematic review. *Corpoica Cienc Tenol Agropecuaria*, 18 (1): 139-159. ISSN: 0122-8706, ISSNe: 2500-5308
- Herrera, J., Rodríguez, J., Coto, J., Salgado, V. & Borbón, H. 2013. Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro. *Tecnología en Marcha*. Vol. 26, N° 1. Pág. 27-36
- Hidalgo, L. G. 2010. Estudio de factibilidad económica para la producción del biopreparado probiótico de *Bacillus subtilis* en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Tesis de diploma para optar por el título de Licenciada en Economía. p. 96
- Hudson, N., Baker, A. & Reynolds, D. 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters- a review. *River Research and Applications*. 23: 631–649
- Jaramillo, B. E. C., Bermúdez, A. T. & Tirado, B. I. 2016. Organophosphorus pesticides degrading bacteria present in contaminated soils. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 5 (3): 1-10. ISSN -1010-2760, E-ISSN: 2071-0054
- Kartal, B., Kuenen, J.G. & van Loosdrecht, M. 2010. Sewage treatment with ANAMMOX. *Science*. 328: 702–703
- Latorre, O.M., Guerra, J.E., Fleitas, S., Pérez, M., Fontela, G. & Méndez, J. 2012. Calidad sanitaria del río Yumurí para uso recreativo y pesquero, desde septiembre 1998 al 2009. *Rev Méd Electrón [Internet]*. May-Jun [citado: 23 de enero de 2015 (viernes)]; 34(3). Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202012/vol3%202012/tema07.htm>
- Larrea-Murrell, J.A., Rojas-Badía, M.M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández N.M. & Pérez, M. 2013. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 44 (3): 24-34
- Lorite-Herrera, M., Hiscock, K. & Jiménez-Espinosa, R. 2009. Distribution of dissolved inorganic and organic nitrogen in river water and groundwater in an agriculturally-dominated catchment, south-east Spain *Water Air and Soil Pollution*. 198: 335–346
- Lucero, P.A., Ferrari, MM2, Orden AA2, Cañas I3, Nassetta M3. & Kurina-Sanz M. 2016. Treatment of endosulfan contaminated water with in vitro plant cell cultures. *J Hazard Mater*. 305:149-55
- Martínez, M. 2015. Ecosistemas. Ministerio de Cultura y Educación. Pp1-15
- McDowell, R.W. & Sharpley, A.N. 2001. A comparison of fluvial sediment phosphorus (P) chemistry in relation to location and potential to influence stream P concentrations. *Aquatic Geochemistry*. 7: 255–265
- Mendoza, J.C. Perea, Y.S., Salvador, J.A., Morales, J.A. & Pérez, G. 2011. Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote., *ACI*. 2 (3). pp. 45-55
- Milián, G., Rondón, A. J., Pérez, M., Samaniego, L. M., Riaño, J., Bocourt, R., Ranilla, R., Carro, M. D., Rodríguez, M. & Laurencio, M. 2014. Isolation and identification of strains of *Bacillus spp.* in different ecosystems, with probiotic purposes, and their use in animals. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(4): 347–351, ISSN: 2079-3480
- Milián, G., Rondon, A. J., Pérez, M., Arteaga, Fatima., Bocourt, R., Portilla, Y., Rodríguez, M., Pérez, Y., Beruvides, A & Laurencio, M. 2017. Methodology for the isolation, identification

- and selection of *Bacillus spp.* strains for the preparation of animal additives. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51, (2):197-207, ISSN: 2079-3480
- Mulholland, M.R. & Lomas, M.W. 2008. Nitrogen up take and assimilation. In: Nitrogen in the Marine Environment (2nd Edition) pp. 303-384
- Murueta, L.N. 2014. Efecto de la carga orgánica y de nutrientes y su biorremediación en sedimentos de ecosistemas acuáticos con distintas características ecológicas. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Biodiversidad y Biología Evolutiva. Universidad de Valencia, España
- Nie, Z., Wu, X., Huang, H., Fang, X., Xu, C., Wu, J., Liang, X. & Shi, J. 2016. Tracking fluorescent dissolved organic matter in multistage rivers using EEM-PARAFAC analysis: implications of the secondary tributary remediation for watershed management. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2: 1-14
- Nieblas, Y. 2016. Hongos y bacterias biorremediadoras. <https://prezi.com/1rk3tnsyv9wk/colector-solar039039> [Consultado: Mayo 12, 2018]
- NC -ISO 4832:2010. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la enumeración de Coliformes. Método de referencia
- NC -ISO 4833-1:2014. Microbiología de la cadena alimentaria- Método horizontal para la enumeración de microorganismos- Parte 1: Conteo de colonias a 30°C por la Técnica de placa vertida
- NC ISO 6579:2008. Microbiología de los Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella spp.*
- NC ISO 6888-1:2003. Enumeración de *Staphylococcus coagulasa* positiva. Parte 1. Técnica utilizando el medio Agar Baird Parker
- NC ISO 7954:2002. Microbiología de Alimentos de Consumo Humano y Animal. Método para el conteo de levaduras. Vig. Mayo 2003
- O.N.E. 2011. Oficina Nacional de Estadística. Gestión Ambiental en Cifres. Cuba 2010. 1-32
- Pearl, H.W. 1998. Nuisance phytoplankton blooms in coastal estuarine inland waters. *Limnology and Oceanography.* 33: 823–847
- Pelczar, M. J. & Reid, R. D. 1966. Microbiología. Ed. Castilla. España
- Pérez, M. M., Domínguez, E. R., Martínez, P., López, M. E., Gonzáles, Y.M. & Monteagudo, M. 2009. Eficiencia de diferentes sustratos de filtros de suelo plantados en la depuración de aguas residuales domésticas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 40 (3): 181-185
- Pillay, V., Isaacson, C., Mothobi, P., Hale, M., Tomar, L.K., Tyagi, C., Altini, M., Choonara, Y.E. & Kumar, P. 2015. Carcinogenic nitrosamines in traditional beer as the cause of oesophageal squamous cell carcinoma in black South Africans. *S Afr Med J.* 105(8):656-8
- Polomé, P., Mignot, E., Nasri, A., Lipeme, G., Campan, L., Hooge, C. & Rivière, N. 2016. Urban domestic wastewater: how to reduce individual injection?. *Water Sci Technol.* 73(1):144-52
- Popescu, R., Mimmo, T., Dinca, O.R., Capici, C., Costinel, D., Sandru, C., Ionete, R.E., Stefanescu, I. & Axente, D. 2015. Using stable isotopes in tracing contaminant sources in an industrial area: A case study on the hydrological basin of the Olt River, Romania. *Sci Total Environ.* 533:17-23
- Portilla, Y. 2016. Caracterización de las potencialidades biorremediadoras de cepas bacterianas del río Yumurí, ubicado en Matanzas, Cuba. Tesis en Opción al Título Académico de

- Máster en Ciencias en Microbiología. Mención Ecología Microbiana. Universidad de La Habana. pp. 100
- Prescott, H. 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, Fifth Ed.: p. 466
- Rashid, I. & Romshoo, S.A. 2013. Impact of anthropogenic activities on water quality of Lidder River in Kashmir Himalayas. *Environ Monit Assess*. 185(6):4705-19.
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Mercedes Díaz. & González, E.E. 2016. Heavy metals contamination: implications for health and food safety. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16 (2):pp. 66-77, Sogamoso-Boyacá. Colombia, ISSN Impreso 1900-771X, ISSN Online 2422-4
- Reynolds, C.S., Davies, P.S. 2001. Sources and bioavailability of phosphorus fractions in freshwaters: a British perspective. *Biological Reviews*. 76: 27-64
- Roa Parra, A. L & Cañizares Villanueva, R.O. 2012. Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado Bistua: *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10 (1): 71-79. Universidad de Pamplona Pamplona, Colombia. ISSN: 0120-4211. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90326398006>
- Ruffini, M., Giorgetti, L., Becarelli, S., Siracusa, G., Lorenzi, R & Di Gregorio, S. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L". *Environ Sci Pollut Res Int*. 15: 1-11
- Sánchez, E.N. 2011. Compendio de legislación ambiental de Honduras. Disponible en: [http://www.fao.org/pgafa-gpa-archive/hnd/files/compendio\\_de\\_legislacion\\_ambienta\\_abril-2011.pdf](http://www.fao.org/pgafa-gpa-archive/hnd/files/compendio_de_legislacion_ambienta_abril-2011.pdf). Consultado: Enero 28, 2016
- Senesi, N. 1993. In *Organic substances in soil and water: natural constituents and their influences on contaminant behavior*. (Eds.) A.J Beck, K.C. Jones, M.B.H. Hayes & U. Mingelgrin. *The Royal Society of Chemistry: Cambridge*. p. 74
- Smith, V.H. 2003. Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems: a global problem. *Environmental Science and Pollution Research*. 10: 126–139
- Stanier, R. S. 1996. *Microbiología*. 2nd ed., España: Reverte, 750 p., ISBN: 978-84-291-1868-1.
- Sulu-Gambari, F., Seitaj, D., Meysman, F.J., Schauer, R., Polerecky, L., Slomp, C.P. 2016. Cable Bacteria Control Iron-Phosphorus Dynamics in Sediments of a Coastal Hypoxic Basin. *Environ Sci Technol*. 50(3):1227-33
- Tang, C.J., Zheng, P., Wang, C.H., Mahmood, Q., Zhang, J.Q., Chen, X.G., Zhang, L. & Chen, J.W. 2011. Performance of high-loaded ANAMMOX UASB reactors containing granular sludge. *Water Research*. 45: 135–144
- Tietzel, G & Parsek, M. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ Microbiol*. 69: 2313-2320
- Torres, B.N & Ramírez A. L.N. 2014. Caracterización de la zona de influencia del cultivo de cebolla larga y la determinación de tasas de usos de agroquímicos en el Lago de Tota. *Trabajo de Grado. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia*
- Valls, M., De Lorenzo, V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 327-338

- Velásquez, M.T. 2017. Extracto hidroalcohólico de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) como bioestimulador en un suelo de sabana contaminado con petróleo. *Revista Académica de la Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán*, 21(2):1-11. ISSN: 2448-8364
- Wetzel, R.G. 2002. *Limnology. Lake and River Ecosystems. Third Edition.* Academic Press. San Diego, CA, USA
- Wijesiri, B., Egodawatta, P., McGree, J. & Goonetilleke, A. 2016. Influence of uncertainty inherent to heavy metal build-up and wash-off on stormwater quality. *Water Res.* 91:264-276
- Wolfe, A.H., Patz, J.A. 2002. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. *Ambio.* 31: 120–125
- Xu, D., Wang, Y., Zhang, R., Guo, J., Zhang, W. & Yu, K. 2016. Distribution, speciation, environmental risk, and source identification of heavy metals in surface sediments from the karst aquatic environment of the Lijiang River, Southwest China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 20:1-12
- Yoo, J.H., Ro, H.M., Choi, W.J., Yoo, S.H. & Han, K.H. 2006. Phosphorus adsorption and removal by sediments of a constructed marsh in Korea. *Ecological Engineering.* 27: 109–117
- Yu, X.M., Yu, T., Yin, G.H., Dong, Q.L., An, M., Wang, H.R. & Ai, C.X. 2015. Glyphosate biodegradation and potential soil bioremediation by *Bacillus subtilis* strain Bs-15. *Genet Mol Res.* 14(4):14717-30
- Zhang, Q., Tang, F., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Wang, M. & Laanbroek, H.J. 2015. Shifts in the pelagic ammonia-oxidizing microbial communities along the eutrophic estuary of Yong River in Ningbo City, China. *Front Microbiol.* 6:1180
- Zhang, W., ASIRI, A.M., LIU, D., DU, D. & LIN, Y. 2014. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 54: 1-10, febrero de 2014, ISSN: 01659936, DOI: 10.1016/j.trac.2013.10

*Anexos*



## ANEXOS

### Anexo 1.- Puntos de muestreos para el aislamiento de los microorganismos



**Figura 5.-** Toma de muestra de agua para consumo animal (Empresa Pecuaria Genética de Matanzas).



**Figura 6.-** Toma de muestra de suelo



**Figura 7.-** Toma de muestra de los sitios de abasto para el regadío

**Anexo 2-** Clave para la identificación del género *Bacillus* spp. (Fields, 1978).

1. Catalasa.

+      —————> 2

-      —————> 16

2. Voges Proskauer.

+      —————> 3

-      —————> 9

3. Crecimiento en anaerobiosis en agar.

+      —————> 4

-      —————> 8

4. Crecimiento a 50<sup>o</sup> C.

+      —————> 5

-      —————> 6

5. Crecimiento en NaCl al 7%.

+      —————> *B. licheniformis*

-      —————> *B. coagulans*

6. Ácido y gas de la glucosa.

+      —————> *B. polymixa*

-      —————> 7

7. Crecimiento en pH: 5.7

+      —————> *B. cereus*

-      —————> *B. alvis*

8. Hidrólisis del almidón

+      —————> *B. subtilis*

- → *B. pumilus*
- 9. Crecimiento a 65° C.
  - +      → *B. stearothermophyllus*
  - → 10
- 10. Hidrolisis del almidón
  - +      → 11
  - → 14
- 11. Ácido y gas de la glucosa.
  - +      → *B. macerans*
  - → 12
- 12. Utilización del citrato.
  - +      → *B. megatherium*
  - → 13
- 13. pH del caldo V. Proskauer < 6.0.
  - +      → *B. circulans*
  - → *B. phumicus*
- 14. Crecimiento en anaerobiosis en agar.
  - +      → *B. lenthunporus*
  - → 15
- 15. Ácido de la glucosa.
  - +      → *B. brevis*
  - → *B. sphaericus*
- 16. Crecimiento a 65° C.

+    →    *B. larvae*

-    →    17

17.    Descomposición de la caseína.

+    →    *B. larvae*

-    →    18

18.    Cuerpo parasporal en esporangio.

+    →    *B. popilliae*

-    →    *B. lentinorbus*

**Anexo 3.** Propuesta de proyecto al Programa de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas.

<b>TÍTULO DEL PROGRAMA</b> Ganadería y Pesca: Obtención, producción y aplicación de alimentos y fármacos por vías biotecnológicas.
<b>TÍTULO DEL PROYECTO</b> Obtención de microorganismos con actividad biorremediadora en sistemas agropecuarios.
<b>ENTIDAD EJECUTORA</b> Universidad de Matanzas <b>Director:</b> Dr. C. Edgar Borot Vicerrector de Investigación y Postgrado. Dirección: Carretera Varadero Km 3 ½. Matanzas. Teléfono: 45256808 Fax E-mail <a href="mailto:edgar.borot@umcc.cu">edgar.borot@umcc.cu</a>
<b>ENTIDAD PARTICIPANTE (incluyendo entidades productoras de bienes y servicios)</b> Empresa Pecuaria Genética de Matanzas <b>Director:</b> Sergio Miguel Acosta Camaraza Dirección: Carretera Central Teléfono: 047 599433 Fax: E-mail: Firma Director:
<b>ENTIDAD PARTICIPANTE (incluyendo entidades productoras de bienes y servicios)</b> Delegación de la Agricultura <b>Director:</b> Sergio Miguel Acosta Camaraza Dirección: Autopista Varadero Teléfono: 047 599433 Fax: E-mail: Firma Director
<b>JEFE DEL PROYECTO (Nombre y apellidos)</b> Ing. Grethel Milián Florido, Dr.C. Entidad: Universidad de Matanzas Teléfono: 45-256767 Fax Email <a href="mailto:grethel.milian@umcc.cu">grethel.milian@umcc.cu</a>
<b>USUARIOS o CLIENTES</b> Universidad de Matanzas <b>Director:</b> Dr. C. Edgar Borot. Vicerrector de Investigación y Postgrado. Dirección: Carretera Varadero Km 3 ½. Matanzas. Teléfono: 261251 Fax E-mail <a href="mailto:edgar.borot@umcc.cu">edgar.borot@umcc.cu</a> Nombre y Firma Director Dr. C. Edgar Borot
<b>DURACIÓN</b> Fecha de Inicio <u>Enero 2019</u> Fecha Terminación <u>Enero 2021</u>
<b>AVAL DEL CONSEJO CIENTÍFICO o TECNICO DE LA ENTIDAD</b>
<b>PROBLEMA A RESOLVER. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>
<b>Antecedente</b> Existen en la actualidad un grupo de productos que se comercializan mundialmente con efecto biorremediador de los ecosistemas con resultados satisfactorios. Con anterioridad en el CEBIO se trabajó en el Proyecto de Investigación, perteneciente al Programa de Ciencias básicas, titulado: "Evaluación de microorganismos con efecto biorremediador en la cuenca hidrográfica del río Yumurí". Proyecto aprobado por la UM/2014 en el que se obtuvieron resultados satisfactorios.
<b>Problema a resolver</b> Lograr disminuir los niveles de contaminación en ecosistemas de la provincia de Matanzas de conjuntos con otras entidades del territorio a partir de la obtención: <b><u>de Productos de elevado valor biorremediador capaz de mejorar la calidad de los suelos y el agua para uso en la alimentación animal y regadío.</u></b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>

Obtener microorganismos con actividad biorremediadora en sistemas agropecuarios.
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Identificar las fuentes contaminantes de los sistemas agropecuarios.</li><li>• Identificar los principales agentes contaminantes de los sistemas agropecuarios.</li><li>• Aislar, seleccionar e identificar microorganismos autóctonos de suelos contaminados y de las áreas de abasto de agua para riego y consumo animal con potencial actividad biorremediadora.</li><li>• Formular biopreparados microbianos estables con capacidad biorremediadora.</li><li>• Evaluar la actividad biorremediadora de los biopreparados seleccionados <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>.</li></ul>
<b>METODOLOGÍA A UTILIZAR PARA ENFRENTAR EL PROBLEMA.</b> (que garantiza la calidad en la ejecución y los resultados). <b>Se describen en el acápite de cronograma de trabajo.</b>
Aislamiento de microorganismo Análisis químico, Análisis microbiológico, Obtención de biopreparados y evaluación <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> y Estabilidad en el tiempo del producto biológico obtenido