



# **INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

## **INGENIERIA BIOQUÍMICA**

### ***PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL***

*Evaluación del potencial de la vermicultura para la  
degradación de BPC's.*

#### **Laboratorio de biotecnología**

#### **FECHA DE INICIO**

10/Agosto/2011

#### **FECHA DE TÉRMINO**

10/Diciembre/2011

#### **ASESOR INTERNO**

Dra. Rocío Meza Gordillo

#### **REVISORES**

M.C. Juan José Villalobos Maldonado

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

#### **PRESENTA ALUMNO**

Jesús Alberto Coronado Villanueva

#### **NÚMERO DE CONTROL**

07270233

Tuxtla Gutiérrez Chiapas a 10 de diciembre del 2011

## ÍNDICE

	Página.
I. INTRODUCCIÓN -----	4
II. JUSTIFICACIÓN -----	5
III. OBJETIVOS -----	6
3.1.- Generales -----	6
3.2.- Específicos-----	6
IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA -----	7
V. PROBLEMÁTICA A RESOLVER -----	8
VI. ALCANCES Y LIMITACIONES-----	8
VII. FUNDAMENTO TEÓRICO-----	9
7.1.- <i>Bifenilos Policlorados (BPC's)</i> -----	9
7.2.- Métodos de detección de los BPC's. -----	13
7.3.- Legislación ambiental nacional e internacional -----	13
7.4.- Métodos de eliminación de BPC's -----	15
7.5.- Biorremediación -----	16
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS -----	24
8.1.- Análisis bromatológico de la excreta de conejo-----	24
8.1.1.- Determinación de humedad -----	24
8.1.2.- Determinación de cenizas-----	24
8.1.3.- Determinación de extracto etéreo-----	25
8.1.4.- Determinación de proteínas -----	25
8.2.- Preparación de soportes -----	27
8.2.1.- Excreta de conejo -----	27
8.2.2.- <i>Peat moss</i> -----	27
8.3.- Preparación de la solución de BPC's -----	28
8.4.- Selección de lombrices -----	29
8.5.- Análisis de supervivencia -----	30
8.6.- Preparación de la muestra para el cromatografo-----	31

8.6.1.- Tratamiento del soporte-----	31
8.6.2.- Tratamiento a la lombriz -----	31
IX. RESULTADOS y discusiones -----	33
9.1.- Composición química de excreta de conejo en base seca -----	33
9.2.- Experimento de sobrevivencia y estudio de comportamiento-----	34
9.3.-Evaluación del comportamiento de <i>eisenia foetida</i> a diferentes concentraciones de BPC´S.-----	35
X. CONCLUSIÓN-----	40
XI. RECOMENDACIONES-----	41
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	42
XIII. ANEXOS -----	46

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los *BPC's* o *Bifenilos policlorados (polychlorinated biphenyls)* son una serie de compuestos organoclorados, que constituyen una serie de 209 congéneres, los cuales se forman mediante la cloración de diferentes posiciones del *Bifenilo*, diez en total.

Los fabricantes de este producto reconocieron su toxicidad ambiental, pero debido a la forma de uso y sus aplicaciones industriales, reconocieron además, la imposibilidad práctica de controlar las emisiones al medio de estos productos.

Es por ello que en la actualidad los BPC's se encuentran ampliamente difundidos en el medio ambiente, ya sea por vertido directo de industrias que lo utilizan o por combustión y vertido a ríos y aguas marinas de desechos contaminados.

El efecto que tienen estos compuestos en la salud humana, sobre todo en personas expuestas a grandes cantidades de BPC's son efectos en la piel como acné o salpullidos y daños en el hígado. Mientras que algunos animales expuestos en su alimentación a esta molécula, sufrieron daños en el hígado, estómago, glándulas tiroideas y algunos murieron.

Es por ello que se requiere de un sistema de eliminación y degradación de BPC's del medio ambiente. Para ello se recurrirá al uso del vermicomposteo mediante el uso de la lombriz *Eisenia foetida*, ya que las lombrices han demostrado un enorme potencial de aireación del suelo para mejorar su valor nutricional, (Hickman 2008) y de degradación de algunos compuestos parecidos estructuralmente a los BPC's. Contreras (2009).

## II. JUSTIFICACIÓN

Las lombrices (*eisenia foetida*) tienen en su tracto digestivo microorganismos endo-simbiontes capaces de biodegradar a los BPC'S, estos en conjunto con los microorganismos del soporte utilizado (excreta de conejo y *peat moss*), podrían acelerar el proceso de biodegradación de BPC'S.

Adicionalmente se sabe que la remoción y aireación que ocasionan las lombrices al moverse son benéficas para la degradación de BPC'S debido a que parte de la ruta metabólica de los microorganismos capaces de degradarlos es aerobia por lo que se ve altamente beneficiada.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1.- OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el potencial de la vermicultura para biodegradar a los *Bifenilos Policlorados*.

#### 3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar de manera físico-química la excreta de conejo.
- Estudiar el comportamiento y la sobrevivencia de las lombrices con el soporte y sustrato utilizado.
- Determinar la concentración máxima no tóxica de BPC'S en lombrices (*Eisenia foetida*).

#### **IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA**

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

El laboratorio de biotecnología está dividido en tres áreas: una de siembra, una para preparar soluciones y una para pesar reactivos y muestras. Así mismo, cuenta con 4 equipos Kjeldalh, un rota vapor, dos campanas de extracción, una balanza analítica, un espectrofotómetro, una agitadora magnética, dos autoclaves, dos bombas de vacío y tres centrifugas.

Preparación de materia: en esa sección, se adaptó un área de lombricultura en donde se realizan las labores de mantenimiento de las lombrices para su desarrollo y reproducción, esta área está situada en el edificio N de la misma institución en donde se cuenta con unas recipientes hechos especialmente para la reproducción de lombrices.

El Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez se encuentra ubicado en carretera Panamericana Km 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Es una institución dedicada a formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora; respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos, así como también es una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprendida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región, siendo una de las más importantes del estado de Chiapas.

## **V. PROBLEMÁTICA A RESOLVER**

Al término del proyecto “Evaluación del potencial de la vermicultura para degradación de BPC’s” se pretende dar solución a los diferentes problemas como conocer el potencial de degradación de la vermicultura con el uso de *Eisenia foetida* y la consecuente eliminación o disminución de los BPC’s en suelos contaminados.

## **VI. ALCANCES Y LIMITACIONES**

### ALCANCES

Se caracterizó la excreta de conejo, realizando análisis bromatológicos de acuerdo a lo establecido por la AOAC.

Se inició un área de lumbricultura que satisficiera la demanda de sobrevivencia de las lombrices (*Eisenia foetida*) para posteriores investigaciones.

Se analizó el comportamiento de las lombrices (*Eisenia foetida*) en el soporte utilizado, que servirá para futuros experimentos

### LIMITACIONES

No se pudo preparar eficazmente la solución de BPC’s debido a que los solventes que hay en la institución no fueron eficaces.

Sólo se probaron 3 concentraciones para evaluar la concentración máxima no tóxica de BPC’s en lombrices, debido a que la cantidad de reactivo que había en la institución era muy pequeña y parte de esa cantidad está destinada a estandarizar la metodología de extracción y preparación de muestras para la cromatografía.

La determinación de la concentración máxima no tóxica dura 72 días y se inició en el mes de noviembre, por lo que para fines de entrega del reporte de la residencia sólo se analizarán los resultados que se obtuvieron hasta el día 10 de diciembre.



## VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 7.1.- BIFENILOS POLICLORADOS (BPC's)

Los BPC's son un subconjunto de compuestos químicos orgánicos sintéticos conocidos como hidrocarburos aromáticos halogenados (organoclorados) (Lopera et al. 2006). Estos compuestos aromáticos están formados de manera tal, que los átomos de hidrógeno de la molécula de bifenilo (dos anillos de benceno unidos por una única unión carbono-carbono) pueden ser sustituidos por hasta 10 átomos de cloro como lo indica Ruíz (2005).

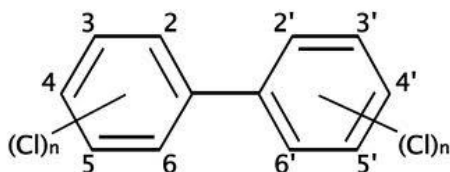


Figura 1. Estructura química de los BPC's

En teoría existen 209 análogos, aunque en realidad han encontrado unos 130 análogos en las formulaciones químicas comerciales mencionados por Holoubek (2000). Es característico que de cuatro a seis de los 10 posibles sitios de sustitución estén ocupados por un átomo de cloro. Los análogos de BPC's con mayor contenido de cloro son prácticamente insolubles en agua y sumamente resistentes a la degradación. Por otro lado, los BPC's tienen 12 análogos a los que la Organización Mundial de la Salud ha asignado factores de equivalencia de toxicidad, debido a que exhiben una toxicidad parecida a la dioxina descrito en Ruíz (2005).

Los BPC's elaborados comercialmente tienen nombres diferentes, ejemplo, Aroclor, Clophen, etc., y cada uno de los comerciantes tiene su propia forma de nombrarlos. Para Aroclor, se utiliza un código de cuatro dígitos: los primeros dos representan al bifenilo (12), y los últimos dos indican el porcentaje en peso del contenido de cloro de la mezcla; por ejemplo, el Aroclor 1260 es una mezcla de BPC's con un 60% de cloro (Ruíz et al. 2005).

Físicamente, los BPC's presentan desde aspecto aceitoso hasta resinas duras y transparentes o cristales blancos, dependiendo del grado de cloración de la molécula.

Los *BPC's* son compuestos persistentes, tóxicos y bioacumulativos (Vasilyeva, et al. 2007). Generalmente, son subproductos que se generan durante una combustión incompleta, conteniéndose así en residuos como la basura, lodos de depuración, etc. Descrito por Michel (2001). Los BPC's fueron usados en el pasado y ahora contaminan varias zonas industriales y naturales (Vasilyeva, et al, 2007).

Estos compuestos son muy estables, por lo que no son modificados químicamente por la acción de ácidos ni bases fuertes. Holoubek (2000) menciona que en la atmósfera, pueden ser atacados por radicales hidroxilo dando lugar a compuestos de degradación, y si son irradiados con UV de la longitud de onda adecuada pueden perder sus cloros, aumentando su velocidad de degradación.

Los BPC's pertenecen a la familia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (*PAH's*), estos son contaminantes que causan un gran daño a la salud humana y al medio ambiente; son catalogados como "hidrocarburos recalcitrantes", y debido a su alto peso molecular son difíciles de remediar. Los BPC's también pertenecen al grupo de compuestos llamados contaminantes orgánicos persistentes (*COP's*). (Rajiv et al., 2010).

Lopera (2006) indica que estos hidrocarburos son usados como fluidos dieléctricos debido a sus propiedades físico-químicas, gracias a esto, el sector eléctrico es uno de los principales contaminantes, pues muchos equipos como condensadores y transformadores fueron diseñados y fabricados para trabajar utilizando fluidos dieléctricos de alta concentración de BPC's.

El consumo de los Bifenilos policlorados en México se inicia prácticamente desde la década de 1940 con la importación de grandes cantidades de equipo eléctrico conteniendo estos compuestos, principalmente transformadores y capacitores entre otros. La mayor parte de los BPC's introducidos al país fueron producidos en dos plantas de los EE.UU., aunque también se importaron menores cantidades de

Europa y Japón en la década de 1980, cuando su importación todavía era permitida (Cortinas, et al. 2003)

Sectores que pueden verse afectados por la contaminación de BPC's debido a su uso son las industrias química, de plásticos, refinería de petróleo y todas aquellas que utilicen equipos de transferencia de calor.

En el artículo escrito por Holoubek (2000) menciona la interacción de este contaminante con el medio ambiente es muy importante ya que el carácter más volátil de los BPC's permite su paso desde el suelo a atmósfera, donde pueden volver al suelo o a la hidrosfera, o pasar a formar parte de la cadena alimenticia por inhalación. Su estabilidad permite que se difundan grandes distancias antes de ser asimilados o degradados.

-Hidrosfera: Los BPC's pueden llegar a la hidrosfera por solubilización de restos en sedimentos, excreción de organismos marinos y por deposición húmeda o seca desde la atmósfera.

-Atmósfera: Estos compuestos llegan a la atmósfera por evaporación desde el suelo en zonas contaminadas, donde pueden adherirse a la superficie de aerosoles y dispersarse o volver al suelo o a la hidrosfera. El grado de evaporación depende del tipo de suelo y de su humedad, normalmente a suelo más seco se evaporan más rápidamente.

-Suelo: Se acumulan en el humus debido a su carácter lipófilo, desde donde pueden movilizarse con dificultad hacia la atmósfera o el agua. Su persistencia aumenta con el grado de cloración. (Yarto, et al.2007).

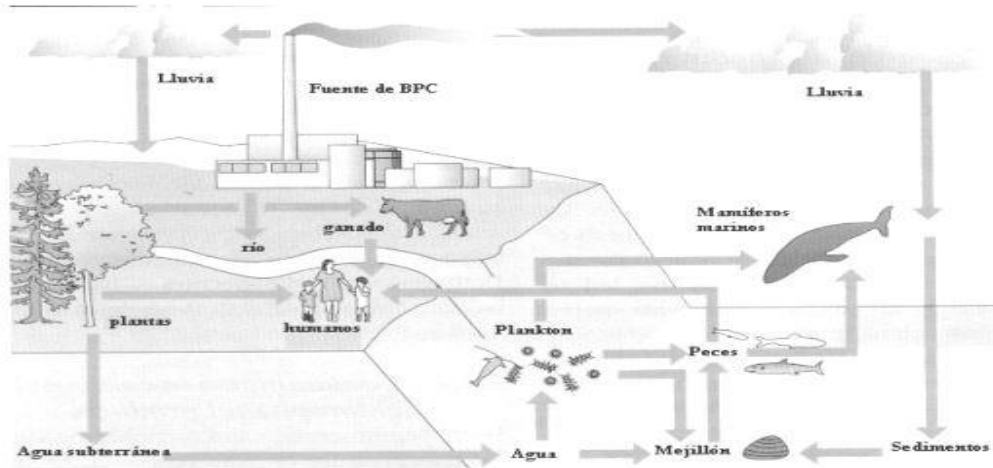


Figura 2, Rutas de distribución de BPC's en el ambiente.

Fuente: Instituto Nacional de Ecología (INE).

Los BPC's pueden ser degradados por microorganismos mediante el rendimiento del ciclo del ácido tricarboxílico. El paso inicial en la biodegradación aeróbica de BPC's es la dioxigenación de los congéneres de este compuesto por medio de la enzima bifenil dioxigenasa. En este paso, las enzimas catalizan la incorporación de dos grupos hidroxilo en el anillo aromático del congénere del BPC's, el cual incrementa la reactividad y lo hace más susceptible a la ruptura del anillo enzimático. (Vasilyeva, et al, 2007).

Cortinas (2003) advierte que el manejo de estos compuestos requiere tener presente que se trata de sustancias tóxicas con capacidad de persistir sin modificarse durante muchos años, de atravesar las membranas celulares y de bioacumularse en el tejido adiposo de animales y seres humanos. Aunque son termoresistentes, pueden arder en contacto directo con una llama liberando dioxinas y furanos cuando se incendian los equipos que los contienen.

## 7.2.- MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LOS BPC's.

Los métodos analíticos para BPC's se basan en su separación por medio de cromatografía de gases, usando columnas capilares con diferentes polaridades y detectores específicos, tales como el detector de ionización de llama (FID), el detector de captura de electrones (ECD) y la espectrometría de masas (MS). Estos métodos sirven para identificar y cuantificar los BPC's. (*Robles et al, 2005*).

- GC-FID: puede llegar a detectar 0.5 ppm de algún BPC's de compuesto por cada  $\mu\text{L}$  de muestra, pudiendo ser usado como una segunda referencia. Es el más usado y el más sensible (Krupcik et al., 1992).

- GC-ECD: usado para detectar los congéneres de BPC's presentes en cualquier muestra. Es el más sensible para la detección de compuestos clorados.

- GC-MS: Su sensibilidad es menos que el GC-ECD, tiene una gran selectividad para los BPC's, puede distinguir y medir individualmente los congéneres de BPC's.

## 7.3.- LEGISLACIÓN AMBIENTAL NACIONAL E INTERNACIONAL.

En la actualidad, se cuenta en el país con dos marcos de referencia para evaluar los avances en la gestión ambiental adecuada de los Bifenilos policlorados y su eliminación:

1. La legislación nacional establecida a través de:

a) Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.

b) Norma Oficial Mexicana NOM-133-ECOL-2000, Protección ambiental-Bifenilos policlorados (BPC's)-Especificaciones de manejo.

c) Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

2. Los Convenios Internacionales de los que México es parte e involucran el control de BPC's, como los siguientes:

El Convenio de Basilea, dedicado al control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, el cual entró en vigor en 1992, y cuyo objetivo es establecer un control estricto de los movimientos transfronterizos de los residuos peligrosos y de otros residuos, para proteger la salud de las personas y el medio ambiente de los efectos nocivos que pudieran derivarse de la generación y el manejo de tales residuos.

El Acuerdo de Cooperación Ambiental de América del Norte, para apoyar la implementación de este se creó la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA), y en 1995 se creó el Grupo de Manejo Adecuado de Sustancias Químicas, orientado a promover la eliminación o reducción de sustancias que son tóxicas, persistentes y bioacumulables como los Bifenilos Policlorados, a través del desarrollo de planes de acción regional.

El Convenio de Róterdam sobre el Procedimiento de Consentimiento Previo Fundamentado, aplicable a ciertos plaguicidas y a ciertos productos químicos peligrosos que son objeto de comercio internacional, promovido por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), para que la importación de las sustancias que pudieran causar daño significativo a la salud humana y al ambiente sólo se realicen con el conocimiento y consentimiento pleno del país importador.

El Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (*COPs*), firmado el 22 de mayo de 2001 y cuya ratificación fue aprobada por el senado el 17 de octubre de 2002 y se dio a conocer al Secretariado del Convenio en febrero 2003. Este Convenio incluye una serie de medidas para reducir las liberaciones al ambiente de *COPs*, que pueden ir desde la elaboración de planes de acción, hasta la prohibición total y absoluta de tales contaminantes.

Con la ayuda de estos convenios y normas que regulan la interacción y trabajo de las empresas con sustancias nocivas con el medio ambiente, se han manejado algunos métodos de eliminación de contaminantes en el medio ambiente.

#### 7.4.- MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE BPC's

Algunos de los más importantes métodos de eliminación de BPC's son:

-INCINERACIÓN: Implica la oxidación a altas temperaturas de los desechos para transformarlos en óxidos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) y residuos inorgánicos que pueden ser liberados al ambiente con bajo impacto.

-QUÍMICOS: clorolisis, deshidrohalogenación catalítica, reacciones con sales fundidas, reacciones con ozono y reducciones con metales alcalinos que alcanzan sólo una deshalogenación parcial. Algunos subproductos como el aceite mineral contaminan más que el propio BPC,s.

-FÍSICOS: no son tratamientos que impliquen destrucción, es decir, los BPC's sólo son vaciados de los contenedores y/o transformadores y reemplazados con otro fluido, esto no ayuda a liberarse del problema de los BPC's, sino que sólo cambia su ubicación.

-ENERGÍA RADIANTE: se promueven las reacciones químicas y por tanto la destrucción de los BPC's, debido a que la energía interactúa directamente con la molécula de BPC,s. (Lopera, et al., 2006).

-BIOLÓGICOS: la degradación microbiana de los BPC's requiere actividades metabólicas debido al alto número de congéneres existentes. La degradación de los BPC's ocurre principalmente vía co-metabolismo, en la que los microorganismos son los responsables de la transformación de los BPC's y están dispuestos a crecer teniendo como única fuente de carbono a los BPC's y requieren de un co-sustrato para el crecimiento microbiano y la degradación. El compostaje es un camino viable para proveer una diversidad microbiana con muchas capacidades metabólicas y co-sustratos para el metabolismo de los BPC's. El compostaje ofrece una forma efectiva para biorremediar los suelos contaminados estudiado por Michel (2001).

Con el objetivo de solucionar el problema de los BPC's para su eliminación del medio ambiente, y haciendo uso de la naturaleza misma, se hace uso del último método de eliminación descrito en donde la biorremediación forma parte del mismo.

#### 7.5.- BIORREMEDIACIÓN

Asha (2010) describe que la biorremediación hace uso de un consorcio de microorganismos o de un proceso microbiano para degradar o eliminar tóxicos de los contaminantes ambientales. Esta tecnología se deriva de justificaciones científicas del concepto de Química verde o Ingeniería verde y es tan prometedora que se usa para quitar por completo cualquier contaminante que afecte la naturaleza.

Las prácticas de biorremediación consisten en el uso de microorganismos como hongos y bacterias para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana. (Benavides et al., 2006).

Los problemas de medio ambiente pueden ser clasificados tanto directa como indirectamente: generación de basura (aguas residuales, residuos de cocina, residuos industriales, efluentes, residuos de agricultura, residuos de alimentos) y uso de químicos para varios propósitos en la forma de insecticidas, pesticidas, fertilizantes químicos, productos tóxicos y subproductos de las industrias químicas. La generación de basura es un efecto de actividades de consumo y producción, y esto tiende a incrementar con el avance económico. Lo que genera desconcierto en el incremento de la presencia de químicos tóxicos como halógenos alifáticos, aromáticos, Bifenilos policlorados y otros contaminantes orgánicos e inorgánicos que se pueden encontrar en aire, agua o suelo, afectando de diversas maneras al medio ambiente, y determinando así, la capacidad de regulación de la biósfera. (Asha et al., 2010).



Existen tres enfoques para tratar con los sitios contaminados:

- a. Identificar el problema.
- b. Evaluación de la naturaleza y el grado de peligro.
- c. La mejor opción para remediar la acción.

La necesidad de remediar estos sitios ha traído como consecuencia el desarrollo de nuevas tecnologías que eliminen tóxicos y destruyan los contaminantes como lo establece Asha (2010).

El proceso bioquímico y fisicoquímico de remediación en compostas es similar al que ocurre biológicamente en el suelo. La composta acelera la destrucción de los contaminantes orgánicos haciendo uso de las altas temperaturas provocadas por el metabolismo del suelo, que generalmente es más alta en la composta que en el suelo.

Diferentes técnicas de biorremediación han sido usadas para descontaminar la superficie de suelos, agua, sistemas marinos y ecosistemas completos contaminados. La mayoría de las tecnologías de biorremediación fueron desarrolladas tratando la contaminación de los hidrocarburos del petróleo a contaminantes inmovilizados o transformándolos en productos químicos que no fueran dañinos para la salud humana ni para el medio ambiente. (Asha et al., 2010).

### CLASIFICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS DE LA BIORREMEDIACIÓN.

Ex situ: es una modalidad del tratamiento que disminuye físicamente los contaminantes y los mueve a otra área (no necesariamente) para el tratamiento. Ejemplo: el uso de biorreactores, digestión anaerobia, compostaje y algunas formas de tratamiento sólido-líquido.

*In situ*: Son técnicas que se llevan a cabo en el lugar donde se originan. Ejemplo: Bioestimulación de los microorganismos propios del lugar. (Asha et al., 2010).

Desde la perspectiva de la remediación, el ambiente del suelo puede ser dividido en dos zonas:

1. Superficie del suelo poco profundo: usualmente son suelos por arriba de 1 a 3 pies; estos suelos representan la región del ambiente que está incluida en la definición agronómica del suelo. Son fácilmente modificados y son generalmente más maleables para la remediación que los suelos más profundos. Estos suelos también son conocidos como aquellos suelos que pueden ser excavados o tratados por medio de modificaciones de superficie y no requieren instalación de paredes.
2. Suelos profundos no saturados: Son aquellos suelos que se encuentran entre los suelos de la superficie y un acuífero. Los suelos son por lo general insaturados, aunque puede haber bolsas de agua en el suelo saturado dentro de la zona insaturada, particularmente en la zona de las raíces y en la franja capilar de la superficie de la capa freática. Además, puede haber inclusiones de materiales de baja permeabilidad, tales como arcilla dentro de la zona insaturada, que puede llegar a saturarse de agua. A diferencia de los suelos superficiales, los suelos insaturados con frecuencia no son susceptibles de tratamiento o de la superficie de excavación, sino que alguna modificación de estos suelos implica el uso de galerías de infiltración, pozos de inyección, o de otro tipo de ingeniería para la introducción de materiales. (Asha et al., 2010).

## VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA BIORREMEDIACIÓN

Como ventajas de la biorremediación podemos nombrar: que es una tecnología noble con el medio ambiente, reduce la contaminación y los problemas que esta con lleva, es de nueva creación por lo que todavía falta mucho por investigar.

Como desventajas podemos nombrar: costos altos, algunos compuestos contaminantes que son degradados se convierten en otros que son mucho más tóxicos o cancerígenos.

Dentro de los procesos de biorremediación mediante el uso de lombrices podemos encontrar a la vermicultura, mediante el uso del vermicompostaje.

El compostaje es un proceso aerobio, biológico, termofílico de degradación y de estabilización de materia orgánica bajo condiciones controladas. (Reséndez et al., 2004).

Vermicompostaje, es el término dado al proceso de conversión de manera biodegradable por lombrices de tierra en vermicomposta. Es la elaboración de abono orgánico a través de la utilización de varias especies de lombrices de las cuales, la más conocida y usada es *Eisenia foetida*, conocida también como “lombriz roja” o “californiana” indico esto por Durán (2009).

El primer paso en el Vermicompostaje se produce cuando las lombrices rompen el sustrato hasta pequeños fragmentos antes de ingerirlo. Esto aumenta la disponibilidad de los microorganismos y enzimas del sustrato. El sustrato es entonces ingerido y pasa por un proceso de digestión enzimática provocada por numerosas especies de bacterias y enzimas presentes en el intestino de la lombriz, finalmente la lombriz excreta vermicomposta. (Gajalakshmi et al., 2008).

Soto (2002) establece que la vermicomposta (lombricomposta o humus de lombriz) es un subproducto estable tipo composta en la cual cierto tipo de lombrices de tierra (*Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus*, etc.) transforman los residuos orgánicos.

En su composición están presentes todos los nutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, sodio, manganeso, hierro, cobre, zinc, carbono, etc.) en cantidad suficiente para garantizar el perfecto desarrollo de las plantas, además de un alto contenido en materia orgánica que enriquece el suelo y favorece la circulación de agua y aire.

Debido a sus agentes biológicos, químicos y acciones físicas, las lombrices pueden ser empleadas directamente para promover la biodegradación de contaminantes orgánicos en los procesos de biorremediación.

Las lombrices de tierra han demostrado su potencial de airear el suelo, y por tanto, mejorar su estado nutricional y fertilidad, variables conocidas para limitar las velocidades de biorremediación. Las lombrices de tierra dificultan los procesos en los que los contaminantes orgánicos se unen al suelo y promueven así, la dispersión y biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos para la degradación de los microorganismos. (Hickman et al., 2008).

Zachary (2008) establece que las lombrices de tierra en general, son tolerantes a muchos contaminantes químicos, incluyendo los metales pesados y los contaminantes orgánicos del suelo y estos pueden acumularse en sus tejidos.

Por lo tanto, mediante el uso de estas excelentes propiedades de las lombrices de tierra, el proceso de vermicomposta ha sido empleado para la degradación de contaminantes orgánicos como PAHs, BPC's, etc. (Contreras et al., 2009).

El ciclo de vida de la lombrices es muy similar una de otras, son animales invertebrados del tipo anélidos, o sea, gusanos segmentados, son hermafroditas muy prolíficas pero no se autofecundan, por tanto, es necesaria la cópula, la cual ocurre cada 7 o 10 días.

Luego cada individuo deposita sus huevos protegidos en una cápsula llamada cocón cada 10 días, de unos 2 mm. La cópula produce 2 cocones de la cual emergen hasta un máximo de 9 nuevas lombrices (promedio 2 a 4 lombrices/cocón). (*cecytech-dg-ui-enc-001*) después de un periodo de incubación de 14 a 23 días. El tránsito premadurez-madurez ocurre cuando adquieren un peso de 0.240 gramos (2.5 a 3 cm). Estas nuevas lombrices alcanzarán su madurez sexual a los dos meses de edad y se reproducirán cada 7 días durante toda su vida (máxima: 4.5 años en condiciones de laboratorio y poco más de 1 año en campo). Éstas, recién nacidas alcanzan la madurez sexual luego de 6 a 10 semanas, son inmunes a las enfermedades y tienen una increíble capacidad de regeneración.

La longevidad de esta especie se estima en alrededor de 15 ó 16 años, cuando la cría se realiza con todos los cuidados se obtienen los mejores resultados.

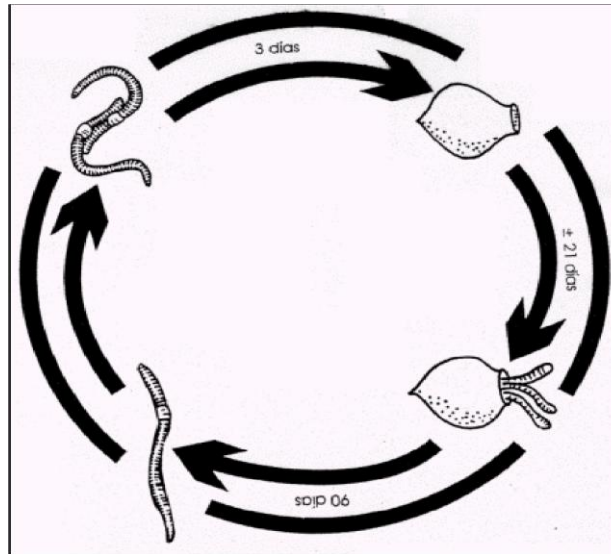


Figura 3, ciclo de vida de *Eisenia foetida*

El sistema reproductivo confirmando su alta eficiencia de esta especie, tenemos que en promedio para esta especie se producen 3.5 capullos en 10 días; el periodo medio de incubación es de 21 días, cuando la temperatura del sustrato es de 25 °C; cada capullo en promedio produce 3 individuos, lo cual quiere decir que se pueden obtener 380 individuos por lombriz/año.

Del sistema digestivo, es importante mencionar, que la manera en que la lombriz consume los alimentos es por succión, no tiene dientes, de ahí la importancia de mantener bien húmedo el residuo orgánico a transformar. Su nivel de eficiencia es del 60 %, es decir, todos los días consume una cantidad de comida equivalente a su peso, excretando en forma de humus el 60 % de la misma; el 40 % restante es asimilado y utilizado por la lombriz para sus funciones vitales. Así, un kilogramo de lombriz consume un kilogramo de desecho orgánico al día.



Figura 4, *E. foetida*  
Comparada con *E. Hortensis*.

Teniendo en cuenta la capacidad de su sistema reproductivo con respecto al ciclo de vida de *Eisenia foetida*, Contreras (2009) estudiaron la supervivencia, crecimiento y formación de huevecillos de la lombriz en suelo contaminado con PAHs durante 70 días y encontraron que la lombriz sobrevive (94%) y acumula esos contaminantes. A su vez, requieren lodos de depuración como sustrato para tener mayor supervivencia y reproducción.

Anterior a este reporte Contreras (2008) estudiaron la eliminación de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (Fenantreno, Antraceno y Benzo-a-pireno) en suelo modificado con vermicomposta mediante el uso de lombrices de tierra, (*Eisenia foetida*); encontraron que se elimina en un 88% el fenantreno y en menor proporción el resto de los contaminantes estudiados. Usaron como sustrato una adición de biosólidos (obtenidos de una planta de tratamiento de aguas residuales, mezclado con excretas de vacas).

Mientras que en años anteriores, Michel (2001); determinaron los efectos del suelo contaminado en una composta para la degradación de BPC's cuando este suelo era contaminado con BPC's de una fábrica de papel. Observaron que hubo pérdidas del 40% de BPC's en la composta, lo cual se atribuye a la biodegradación y no a la volatilización de estos compuestos.

Singer (2001); estudiaron la contribución que hacen las lombrices (*Pheretima hawayana*) y algunos microorganismos (*Rhodococcus* sp.) a la eliminación de los BPC's; las lombrices de tierra fueron utilizadas para mejorar la dispersión de los BPC's, la aireación del suelo, el aumento de carbono y contenido de Nitrógeno para modificar la comunidad microbiana del suelo. Para un mayor control, usaron tratamientos con y sin lombrices, encontrando que con lombrices se remueve el 55% de los BPC's, mientras que sin lombrices se remueve el 39%. Atribuyen la eliminación de los BPC's a los microorganismos propios del suelo.

Tharakan (2004); investigaron el potencial que tiene el uso de las lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) sobre la biotransformación de BPC's encontrados en sedimentos y aguas residuales de un lugar conocido, usando biorreactores de vermicomposta.

Encontraron concentraciones de BPC's mayores a 200 ppm y menores de 1000 ppm en los sedimentos que muestrearon, y después de aproximadamente 180 días de tratamiento con los lombrices hubo una reducción de *BPC's* del 80%.

harakan (2005); estudiaron también la biotransformación de los BPC's mediante dos tecnologías: (1) la aplicación de microorganismos anaerobios y aerobios en un reactor biológico de suelo cultivado con ciclos de anaerobiosis y aerobiosis, (2) la aplicación de lombrices en biorreactores de vermicomposta. Ambas evaluadas en un tiempo de 6 a 12 meses, teniendo como resultado que en (1) se redujeron el 70% en las primeras seis semanas e indican que fue debido a la interacción de los microorganismos presentes. En (2) se tiene una reducción de más del 70% de BPC's y una pérdida de biomasa de las lombrices de 54%, esto sugiere que los BPC's proveen una inhibición por crecimiento y contribuye a la reducción de viabilidad y salud de las lombrices.

## VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES REALIZADAS

### 8.1.- ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA EXCRETA DE CONEJO

#### 8.1.1.- DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Determinación de la humedad de acuerdo a lo establecido por el método de la *AOAC.2005.950.46B*. Para llevar a cabo esta determinación, se tomaron muestras homogenizadas de excreta de conejo.

Se tomaron 5g de muestra y se colocaron en crisoles a peso constante (por triplicado), para la eliminación de la humedad, se introdujeron en un horno a una temperatura de 70°C. Pesando las muestras a cada 3 h durante 24 h.

La diferencia de peso obtenida de la muestra húmeda y la seca, es el contenido de humedad.

#### 8.1.2.- DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Esta determinación se realizó de acuerdo a lo establecido por el método estándar de la *AOAC.1990.942.05*. El método aquí presente es empleado para la determinación de cenizas en las muestras expuestas a calcinación; considerando a estas, como el contenido de minerales totales o material inorgánico en la muestra. (Ver anexo)

En un crisol de porcelana previamente llevado a peso constante, se llevó de 5 a 10g de muestra seca, para posteriormente calcinarlo mediante una mufla con una temperatura entre 550°C a 600°C durante 12 h. Se dejó enfriar y se continuó con el desecado para posteriormente pesar.



### 8.1.3.- DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO

Para la determinación de extracto etéreo y con la única finalidad de conocer la cantidad de grasa presente en la muestra, se siguió con lo establecido por el método estándar de la AOAC.960.39B.

Se llevó a los cartuchos wathman a peso constante a una temperatura de 60°C y en ellos se pesó de 3 a 5g de muestra seca, para después colocarlo en el equipo de extracción. Para montar el equipo (soxhlet) se colocó vaselina en todas sus uniones y se llenó el depósito con aproximadamente 250mL de hexano. Posteriormente se llevo a ebullición durante 8 hrs. Tomando el tiempo desde el primer reflujo del solvente.

Al término de la extracción los cartuchos se colocaron en una campana de extracción, para evaporar el hexano contenido en su superficie, esto se realizó durante 24 h. Pasado el tiempo se llevaron los cartuchos con las muestras libres de hexano a una estufa para lograr un peso constante, a 60°C durante aproximadamente 6 h para luego pesarlos.

### 8.1.4.- DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Determinación de proteínas de acuerdo a lo establecido por el método estándar de la AOAC (2005.928.08) "KJELDAHL

#### A) Digestor

Se pesó 0.05 g de muestra seca y desengrasada en papel arroz libre de nitrógeno, 0.5 g de mezcla catalizadora y 0.3g de  $K_2SO_4$ , se colocó en un matraz micro KJENDALH y agregaron 5 mL de  $K_2SO_4$ , posteriormente se colocaron los matraces en la parrilla de digestión. (Se calentó primero a baja temperatura y se va aumentando paulatinamente hasta alcanzar la máxima girando ocasionalmente el matraz). Se mantener a temperatura máxima de 4 a 6 horas girando ocasionalmente, hasta tener una solución verde claro. Se pasó a un matraz macro KJELDALH lavando con pequeñas cantidades de agua destilada para pasar toda la solución antes digestada.

## B) Destilación

Se agregaron 250 mL de agua destilada al matraz macro- KJELDALH. 15 mL de NAOH al 40 % y 1 mL de sulfato de potasio al 10 % y se colocó en la parrilla, se sellaron con teflón todas las uniones para evitar pérdidas de vapor.

Se prepararon 50 mL de ácido bórico al 4 % en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agregaron 10 gotas de mezcla de indicadores. El matraz se colocó en la salida del intercambiador de calor procurando que el extremo quede sumergido en la solución.

Una vez que se instaló correctamente el equipo, se comenzó la destilación inmediatamente, la destilación se detuvo hasta obtener aproximadamente 200 mL de destilado. Se lavó el intercambiador de calor con agua destilada y se recogió en el mismo matraz. El destilado se tituló con ácido clorhídrico.

- Todos los análisis bromatológicos se hicieron por triplicado y lo que se presenta en los resultados es la media de los valores obtenidos.

## 8.2.- PREPARACIÓN DE SOPORTES

### 8.2.1.- EXCRETA DE CONEJO

La excreta de conejo forma parte del soporte y simultáneamente es el sustrato de la lombriz, la cual aportará al inóculo los nutrimentos básicos de supervivencia como Nitrógeno, Carbohidratos y algunas sales.

Para la elaboración de la excreta como parte del soporte, primero se recolectó una cantidad considerable de excreta en una granja ubicada en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. Dicha muestra se homogenizó y se secó al sol durante aproximadamente 48 h. con la muestra seca se prosiguió con la molienda, mediante un molino de mano, continuando inmediatamente con el tamizado mediante mallas 50 y 100. Esto se debe a que durante el experimento se evaluará la cantidad de huevecillos, los cuales tienen un tamaño igual o mayor al de la malla 40.

Se pesó la cantidad de muestra en peso seco correspondiente a cada frasco, la cual fue del 15% respecto al peso total del soporte.

### 8.2.2.- PEAT MOSS

La utilización de este compuesto como parte del soporte se debió a su gran parecido en cuanto a propiedades físicas a la tierra, además de que es aún más poroso, lo cual permitirá a las lombrices mayor área de movimiento y por tanto mayor homogenización del medio y de oxígeno, otro factor que impulsó a la utilización del *peat moss*, fue su valor nutrimental ya que es mayor que el de la tierra común y en su comercialización se encuentra estandarizado.

Dentro de las características principales de este compuesto se encuentra su alta retención y absorción de humedad, por lo que el primer paso a realizar es el secado al sol durante aproximadamente 24 h.

Posteriormente se continuó con la molienda y el consecuente tamizado a mallas 50 y 100 y por último se pesó la muestra correspondiente al peso total, lo que representa el 85% del peso total del soporte. (Ver anexos)

### 8.3.- PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE BPC's

La muestra utilizada fue decaclorobifenilo, sólido en frascos de 100 mg con ayuda de una micropipeta con capacidad de 1000  $\mu$ l, se agregó 1 mL de aceite de motor en el frasco que contenían los BPC's, se agitó y se extrajo con la micro-pipeta para pasarlo a un matraz volumétrico de 100 mL. Este paso se repitió 5 veces para poder sacar toda la muestra de los frascos.

Se agregaron 25 mL de hexano y se agitó cuidadosamente hasta que el aceite se disolvió en el hexano, se taró el matraz volumétrico a 100 mL de manera cuidadosa con más hexano.

El matraz volumétrico se introdujo de manera cuidadosa a un sonicador, para poder obtener una mezcla homogénea de las sales de BPC's en la solución, cuando la solución se homogenizó se pasó a un vaso de precipitado de 250 mL. Para poder tomar de ahí las cantidades necesarias para alcanzar las concentraciones de BPC's en cada unidad experimental.

La solución preparada contenía 1 mg de BPC'S/mL.

#### 8.4.- SELECCIÓN DE LOMBRICES

Este paso se lleva a cabo con la única finalidad de utilizar en el experimento las lombrices físicamente más sanas y sexualmente maduras (con clitelio desarrollado).

El primer paso a seguir para la elección es dejar de alimentarlas durante aproximadamente 5 días, las lombrices utilizadas para las unidades experimentales fueron adaptadas primero al soporte que se utilizó (*peat moss* y excreta de conejo) en cunas diseñadas para la reproducción de las lombrices, con un ángulo de 3 grados para evitar la acumulación de los ácidos húmicos. Las lombrices habitan por lo general a no más de 20 cm de la superficie, cuando están limitadas en alimentación, la mayoría de ellas se acumula cerca de la superficie.

Se eligieron las lombrices más grandes, tomando puños de tierra donde la concentración de lombrices era superior, y se trasladaron a un contenedor amplio. Se procuró coleccionar una gran cantidad de lombrices, ya que no todas son aptas para ser inoculadas en los medios, debido a sus características físicas, como tamaño o que no presentan clitelio desarrollado.

Se escogieron 3 lombrices grandes con clitelio desarrollado para cada unidad experimental (ver anexo) y se retiró la máxima cantidad de composta de su superficie. Se pesaron en conjunto las 3 lombrices, se anotaron las observaciones y se introdujeron a las unidades experimentales. Fueron un total de 147 lombrices seleccionadas para todas las unidades experimentales.

## 8.5.- ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El experimento a realizar fue hecho con la finalidad de conocer la aceptabilidad de la lombriz hacia las diferentes variables a las cuales fue expuesta, como diferentes porcentajes de sustrato y *peat moss*, así como también diferentes cantidades de lombrices.

Se prepararon unidades experimentales de 50g con concentraciones de excreta de conejo de 5%, 10% y 15 %, el porcentaje restante fue de *peat moss*. En frascos con capacidad de un litro, color ámbar. Esto debido a las características primordiales para la supervivencia de las lombrices las cuales deben de permanecer en lugares oscuros ya que las lombrices son sensibles a la luz. El metabolismo de las lombrices es de tipo aerobio por lo que fue necesario hacer aireaciones en tiempos determinados, de esta manera se eligieron botes de boca ancha y de vidrio para la retención del oxígeno e inocuidad del sistema.

A continuación, se le agregó agua destilada hasta alcanzar una humedad del 75 % (150 mL), se agitó y homogenizó cada unidad experimental con ayuda de espátulas.

Se inocularon lombrices adultas, con clitelio desarrollado, 3, 5 y 7 en cada una de las concentraciones para así tener un total de 9 unidades experimentales. Los frascos se taparon con pañalina para impedir que las lombrices salieran, y permitir el paso de oxígeno.

Los frascos se mantuvieron en incubación a 25°C y se observó el comportamiento de las lombrices al principio cada 2 días por las primeras 2 semanas, ajustado la humedad con agua destilada.

No se presentó muerte de ninguna lombriz durante un periodo de 2 meses, por lo cual se deduce que no hubo inconveniente alguno en cuanto a aceptabilidad del sustrato y soporte hacia la lombriz.

## 8.6.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL CROMATÓGRAFO

### 8.6.1.- TRATAMIENTO DEL SOPORTE

Se pesan 30 gramos de soporte húmedo en un recipiente de aluminio y se colocaron destapados en la estufa a 70 °C por 24 horas, una vez terminado este proceso, se pesaron por cuadruplicado muestras de 1.5 gramos y se pasan a tubos falcón de 15 mL. Se agregaron 10 mL de hexano (HPLC) y se agitó con ayuda de un equipo vortex durante 2 minutos, después se pasan a un sonicador (los tubos deben estar destapados y no deben tocar ninguna pared del equipo) durante 20 minutos en tantos de 5 minutos para que el equipo no se calentara, una vez terminado este proceso se pasó a centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos, una vez que finalizó la centrifugación se vació el sobrenadante en un tubo falcon de 50 mL. Al tubo falcon de 15 mL se le agregaron nuevamente 10 mL de hexano (HPLC) y se repitieron los pasos posteriores (2 veces más) para garantizar la completa extracción de los BPC's.

Una vez terminado el proceso, el extracto se dejó evaporar en la campana de extracción hasta tener un volumen de 1 mL aproximadamente, y se guardaron las muestras para su posterior análisis.

### 8.6.2.- TRATAMIENTO A LA LOMBRIZ

El primer paso fue sacar las lombrices de los frascos y lavarlas con un chorrito de agua destilada para quitar el soporte que se le haya adherido, posteriormente se observaron las características físicas de las lombriz, como el color, tamaño, y se pesaron, se dejaron las lombrices en un vaso de plástico con tapa durante 24 horas para que excretaran el sustrato que aun tenían en su tracto digestivo.

Pasadas las 24 horas se congelaron con Nitrógeno líquido, se agregó el doble de su peso de sulfato de potasio y se trituró hasta obtener un polvo fino, posteriormente se pasó el polvo a un tubo falcon de 15 mL, se agregaron 10 mL

de hexano (HPLC) y agitó con ayuda de un equipo vortex durante 2 minutos, después se pasaron a un sonicador (los tubos deben estar destapados y no deben tocar ninguna pared del equipo) durante 20 minutos en tantos de 5 minutos para que el equipo no se calentara, una vez terminado este proceso se pasa a centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos, una vez que finalizó la centrifugación se vació el sobrenadante en un tubo falcon de 50 mL. Al tubo falcon de 15 mL se le agregaron nuevamente 10 mL de hexano (HPLC) y se repitieron los pasos posteriores (2 veces más) para garantizar la completa extracción de los BPC's. Una vez terminado el proceso, el extracto se dejó evaporar en la campana de extracción hasta tener un volumen de 1 mL aproximadamente, y se guardan las muestras para su posterior análisis.



## **IX. RESULTADOS Y DISCUSIONES.**

### **9.1.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXCRETA DE CONEJO EN BASE SECA**

Después de realizar los análisis bromatológicos de acuerdo a lo establecido a la AOAC se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 1). Los resultados de cenizas, grasas, proteínas están en base seca, el porcentaje de los compuestos carbonados se obtuvo por diferencia.

Tabla 1. Composición química de la excreta de conejo

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
Humedad (%)	23.2	+ - (.9516)
Cenizas (%)	19.2	+ - (.7354)
Grasas (%)	1.86	+ - (.3523)
N total. (%)	1.4	+ - (.1)
Compuestos carbonados	77.54	

## 9.2.- EXPERIMENTO DE SOBREVIVENCIA Y ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.

Los resultados aquí mostrados (tabla 2) corresponden al último monitoreo realizado al 16 de diciembre del 2011, que equivale a la semana 13 después de iniciado el experimento. La humedad se estabilizó aproximadamente a las 2 semanas, cuando el soporte ya era físicamente diferente. La actividad de las lombrices se vio notablemente reducida después de la semana 10.

Tabla 2. EXPERIMENTO DE SOBREVIVENCIA Y ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO.

SOBREVIVENCIA Y ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO DE LA SEMANA 13.					
UNIDAD EXPERIMENTAL	PORCENTAJE DE EXCRETA	NÚMERO DE LOMBRICES	SOBREVIVENCIA %	NÚMERO DE HUEVECILLOS	OBSERVACIONES
1	5	3	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
2	5	5	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
3	5	7	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
4	10	3	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
5	10	5	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
6	10	7	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
7	15	3	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
8	15	5	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO
9	15	7	100	NO	DISMINUCION DE TAMAÑO

También se observó que la pérdida de peso y tamaño comenzó después de las 10 semanas de haber empezado el experimento, posiblemente debido a que los nutrientes del medio se están agotando. No se observó que las diferentes concentraciones de sustrato (excreta de conejo) afectaran el comportamiento de las lombrices. El 100 % de las lombrices de las unidades experimentales aun siguen vivas.

9.3.- Evaluación del comportamiento de *eisenia foetida* a diferentes concentraciones de BPC'S.

Los resultados aquí mostrados corresponden a los tratamientos no esterilizados, donde la única variable inicial fue la concentración de BPC'S, con concentraciones de 50 ppm (tabla 3), 75 ppm (tabla 4) y 100 ppm (tabla 5). La proporción de excreta (15 %) y de *peat moss* (85%) fue constante para todos los tratamientos, la cantidad de lombrices fue de 3 y estaban sexualmente maduras.

Tabla 3. Resultados del tratamiento con 50 ppm de BPC's estéril.

BPC's 50 PPM ESTERIL						
NÚMERO	MUESTREO (DÍAS)	PESO INICIAL	OBSERVACIONES INICIALES	PESO FINAL	SOBREVIVENCIA %	NÚMERO DE HUEVECILLOS
1	0	1.7573	Normal	1.7156	100	0
2	7	1.5546	Normal	1.8178	100	0
3	14	1.2567	Normal	0.9495	66.66	0
4	28	1.5683	Normal	1.1756	66.66	0

Tabla 4. Resultados del tratamiento con 75 ppm de BPC's estéril

BPC's 75 PPM ESTERIL						
NÚMERO	MUESTREO (DÍAS)	PESO INICIAL	OBSERVACIONES INICIALES	PESO FINAL	SOBREVIVENCIA %	NÚMERO DE HUEVECILLOS
1	0	1.372	Normal	1.417	100	0
2	7	1.8417	Normal	2.3543	100	0
3	14	1.428	Normal	1.8472	66.66	0
4	28	1.5963	Normal	0.8754	66.66	0

Tabla 5. Resultados del tratamiento con 100 ppm de BPC's esteril.

BPC's 100 PPM ESTERIL						
NÚMERO	MUESTREO (DÍAS)	PESO INICIAL	OBSERVACIONES INICIALES	PESO FINAL	SOBREVIVENCIA %	NÚMERO DE HUEVECILLOS
1	0	----	Normal	----	----	----
2	7	1.6204	Normal	1.1047	66.66	0
3	14	1.3564	Normal	1.3878	100	0
4	28	1.5407	Normal	2.0431	100	2

Tabla 6. Porcentaje de sobrevivencia y biomasa de los tratamientos esterilizados.

PPM DE BPC'S	SOBREVIVENCIA %	BIOMASA %
50	83.25	110.08
75	83.25	126.85
100	88.88	109.29

Los resultados de la tabla 6 son el promedio de los cambios de biomasa en las 4 tomas de muestra que se realizaron, correspondientes a cada concentración. La toma uno del tratamiento con 100 ppm de BPC'S no se realizó, pero para análisis de resultados se tomó como el promedio de las 3 tomas de muestra correspondientes a esa concentración.

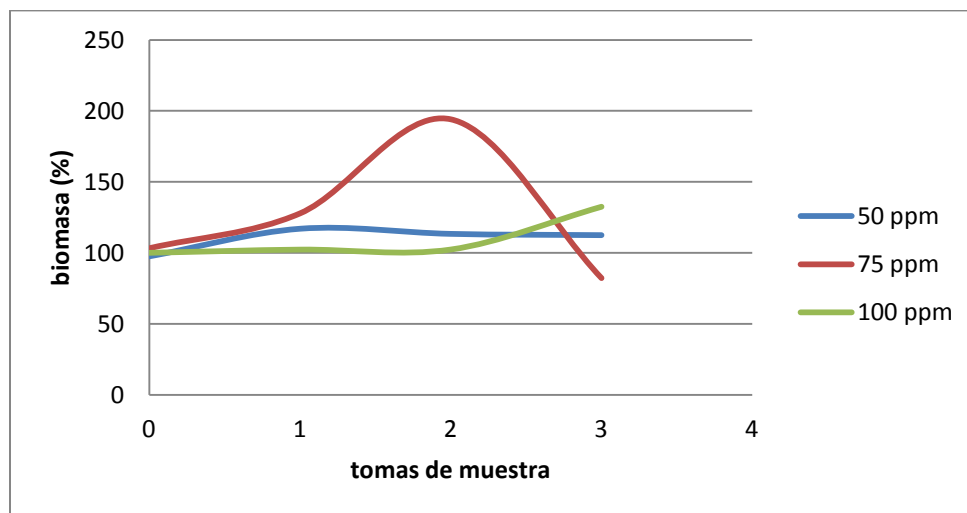
Los resultados obtenidos en los porcentajes de sobrevivencia de los diferentes tratamientos con BPC'S no difieren de manera significativa, debido a que las 3 concentraciones se han mantenido hasta el momento alrededor del 85 %, aunque aun hacen falta 2 monitores correspondientes a las días 56 y 72, si estos monitores arrojan datos semejantes se podrían tomar 2 criterios para determinar la concentración máxima de BPC'S, el primero sería elegir la concentración más alta

(100 ppm), como la concentración máxima no tóxica, el segundo criterio podría ser probar con concentraciones más altas hasta encontrar resultados con diferencias más significativas.

### Análisis de resultados.

La grafica 1 muestra los cambios en los porcentajes de biomasa correspondientes a cada toma de muestra (día 0, 7, 14,28).

Gráfica 1. Comparación en los cambios de biomasa (%) de los tratamientos no esterilizados.



La biomasa se vio afectada positivamente, se observa el máximo aumento de esta en la concentración de 75 ppm de BPC'S. Esto nos indica que las lombrices seguían alimentándose y engordando a pesar de estar en un medio contaminado, lo que podría significar que están fisiológicamente sanas, aunque estresadas, este resultado no es muy significativo para determinar cuál sería la concentración máxima no tóxica de BPC'S.

## RESULTADOS DE LOS TRATAMIENTOS SIN BPC's (BLANCOS)

Los siguientes resultados ( tabla 7) corresponden a los tratamientos a los que no se les agregó BPC'S, y se les dio trato igual que a los tratamientos con BPC'S.

Tabla 7. Resultados del tratamiento sin BPC's. No estéril.

BLANCO NO ESTERIL						
NÚMERO	MUESTREO (DÍAS)	PESO INICIAL	OBSERVACIONES INICIALES	PESO FINAL	SOBREVIVENCIA %	NÚMERO DE HUEVECILLOS
1	0	1.649	Normal	1.7113	100	0
2	7	1.426	Normal	2.09	100	0
3	14	1.2033	Normal	1.3142	100	0
4	28	1.7915	Normal	1.9976	100	0

### 9.6.-Análisis de resultados:

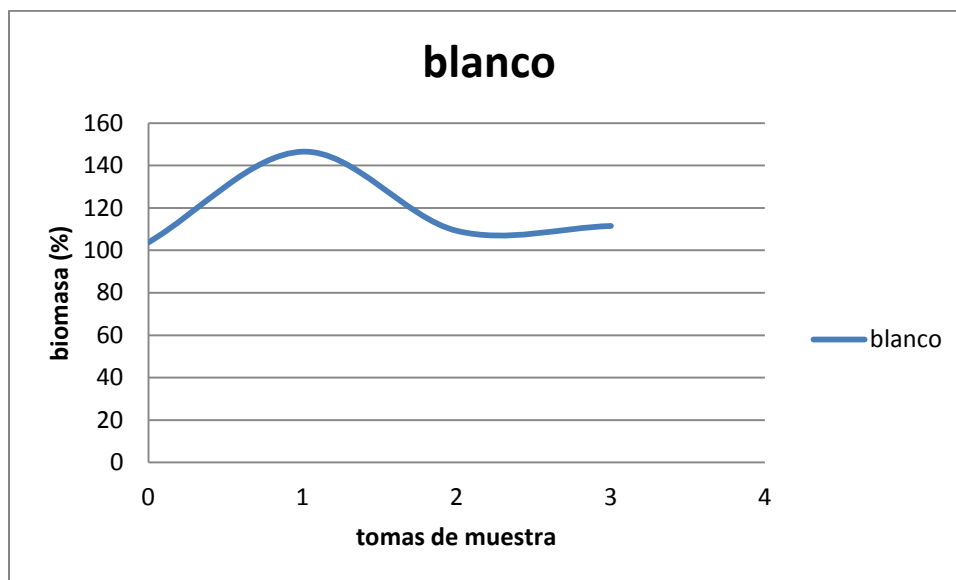
Los siguientes resultados (tabla 8) corresponden a los tratamientos sin BPC'S (blancos) donde se puede observar el promedio del aumento de biomasa de las 4 tomas de muestra que se realizaron.

Tabla 8. Porcentaje sobrevivencia y biomasa de los tratamientos no esterilizados.  
(Blancos)

ppm de BPC'S	Sobrevivencia %	Biomasa %
00	100	117.76

La gráfica 2 demuestra la variación en los porcentajes de biomasa en las 4 tomas de muestra que se realizaron correspondientes al día 0, 7, 14, 28. Se observa el mayor aumento de biomasa en el día 7.

Gráfica 2. Comparación en biomasa (%) de los tratamientos no esterilizados. (Blancos).



## X. CONCLUSIÓN

Se caracterizó la excreta de conejo, los resultados fueron los que se esperaban según la revisión bibliográfica.

El experimento del estudio de comportamiento y sobrevivencia de las lombrices *eisenia foetida* con el soporte y sustrato utilizado (*peat moss* y excreta de conejo), sin BPC'S demostraron que tiene la capacidad de sobrevivir más de 70 días en las mismas condiciones que en las unidades experimentales con BPC'S.

Las lombrices sobreviven a altas concentración de BPC'S, tienen un pequeño aumento de peso y ha producido huevecillos en las unidades experimentales con concentraciones de BPC'S más altas (100 ppm). Aun hacen falta más estudios para saber si es un método eficaz para remover o biodegradar BPC'S pero se estudios anteriores han demostrado su gran capacidad para remover moléculas estructuralmente parecidas del suelo.

El 84.5 % lombrices sobrevivieron a concentraciones de BPC'S superiores a las 50 ppm, estos es más de lo que está permitido en la norma mexicana, por lo que la vermirremediación podría ser un método eficaz para remediar este problema, aunque aun hacen falta más estudios en el área para poder determinar su eficacia.

Los BPC'S que se usaron fueron (decaclorobifenil) se sabe que entre más clorados estén los bifenilos son potencialmente más tóxicos, por lo que se podría concluir que si las lombrices son resistentes a esta muestra que está en su totalidad clorada, podrían ser resistentes a cualquier otra muestra de BPC'S o mezclas en los rangos de concentraciones probadas.



## **XI. RECOMENDACIONES**

- Encontrar el solvente apropiado, para la correcta preparación de la solución de BPC´S.
- Estandarizar la técnica de extracción de BPC´S en el soporte y las lombrices.
- Estandarizar la metodología de cuantificación de BPC´S en el cromatógrafo.
- Comprar una incubadora más grande para los siguientes experimentos.
- Comprar tamices malla 50, 60 y 100 para facilitar el recuento de huevecillos de las unidades experimentales.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asha A. Juwarkar, Sanjeev K. Singh, Ackmez Mudho. 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation: A review. *Rev Environ Science Biotechnology*, 9:215–288
2. Atiyeh, R.M., Lee, S., Edwards, C.A., Arancon, N.Q and Metzger, J.D. 2002. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology.*, 84: 7-14
3. Benavides López de Mesa J., Quintero G., Guevara Vizcaíno A.L., Jaimes Cáceres D.C., Gutiérrez Riaño S.M., Miranda García J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 4: 82-90.
4. Contreras Ramos S.M, Álvarez Bernal D, Dendooven L. 2006. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution* 141:396–401
5. Contreras-Ramos, D. Álvarez-Bernal, L. Dendooven 2007. Dynamics of nitrogen in a pahs contaminated soil amended with biosolid or vermicompost in the presence of earthworms 67 : 2072–2081
6. Contreras Ramos S.M., Álvarez Bernal D., Dendooven L. 2008. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil amended with biosolid or vermicomposta in the presence of earthworms (*Eisenia fetida*). *Soil Biology and biochemistry*, 40: 1954-1959.

7. Contreras Ramos S.M., Álvarez Bernal D., Dendooven L. 2009. Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAH contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost. *Applied Soil Ecology* 41:269–276
8. Cortinas de Nava C. Diagnóstico Nacional de Bifenilos Policlorados en México. Reporte Final. Acosta y Asociados. Proyecto INE-1/01. Diciembre del 2001/ Abril 2003. Preparado para: Instituto Nacional de Ecología No. INE/AD-084/2001
9. Dioxin and PCB Analysis, 2007. Sigma-Aldrich.
10. Durán L., Henríquez C. 2009. Crecimiento y reproducción de la lombriz roja (*Eisenia fetida*) en cinco sustratos orgánicos. Nota técnica. *Agronomía costarricense* 33(2): 275-281.
11. Field J.A., Sierra Álvarez R. 2008. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Rev Environmental Science Biotechnology* 7: 211–241
12. Gajalakshmi S, Abbasi S.A. 2008. Solid waste management by composting: state of the art. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 38:311–400
13. Holoubek I. 2000. Polychlorinated biphenyls (PCB) world-wide contaminated sites. Tocoen report No. 173
14. Krupcik J., Koean A., Petrfk J., Leclercq R.A., Ballschmiter K. 1992. On the Use of Reference Standards for Quantitative Trace Analysis of PCBs by HRGC. *Analyses of Technical PCB Formulations by HRGC/FID. Chromatographia*, 33: 514-520

15. Lopera Posada E., Aguirre Cardona J. 2006. Purification of mineral insulating oil contaminated with polychlorinated biphenyls (PCB's). *Dyna*, 73: 75-88
16. Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica Clínica Latinoamericana* 39 (1): 27-36.
17. Michel F.C. Jr, Quensen J., Reddy C.A. 2001. Bioremediation of a PCB—contaminated soil via composting. *Compost Science Utilization* 9(4):274–283
18. Moreno Reséndez A., Pedro Cano R. 2004. La vermicomposta y su potencial para el desarrollo de especies vegetales. *Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura*.
19. Rajiv K. Sinha, Sunita Agrawal, Krunal Chauhan, Vinod Chandran, Brijal Kiranbhai Soni. 2010. Vermiculture technology: reviving the dreams of Sir Charles Darwin for scientific use of earthworms in sustainable development programs. *Technology and Investment*, 1: 155-172.
20. Robles Martínez H.A., Cuevas Rodríguez G., Hernández Castillo D. 2005. Determination of PCBs in transformer oil using gas chromatography with mass spectroscopy and aroclors (A1254:A1260). *Journal of Mexico Chemistry and Society*, 49(3): 263-270
21. Ruiz Aguilar G.M.L. 2005. Biodegradación de bifenilos policlorados (BPCs) por microorganismos. *Acta universitaria*, 15: 19-28.

22. Singer A.C., W Jury, E Luepromchai, C.-S Yahng, D.E Crowley, 2001. Contribution of earthworms to PCB bioremediation, *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 765-776.
23. Soto, G., y Muñoz, C. 2002. Consideraciones teóricas y prácticas sobre el compost y su empleo en la agricultura orgánica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 65:123-129.
24. Tharakan J.; Addagada A.; Tomlinson D. 2004. Vermicomposting for the bioremediation of PCBs congeners in superfund site media. Conference: international conference on waste management and the environment. 117-124
25. Tharakan J. 2005. Application of microbes and earthworms for the biological remediation of polychlorinated biphenyl contaminated sludge. *Jordan International Chemical Engineering Conference V*.
26. Vasilyeva G. K., Strijakova E.R. 2007. Bioremediation of soils and sediments contaminated by polychlorinated biphenyls. *Microbiology*, 76 (6): 639-653.
27. Yarto M. 2007. Los efectos de la contaminación: el caso de las sustancias tóxicas persistentes. Instituto Nacional de Ecología (INE), México.
28. Zachary A., Hickman Z.A., Reid B.J. 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environ International* 34:1072–1081

### XIII. ANEXOS



Imagen. Micro kjeldahl.



Imagen2. Cartuchos waltman con excreta, listo para soxleth.

ANEXOS



Imagen3. Molienda de peat moss.



Imagen4. Molienda de excreta de conejo.

ANEXOS



Imagen5. Preparación del soporte (tamizado).



Imagen6. Unidades experimentales.



ANEXOS



Imagen7. Solución de BPC's.



Imagen8. Sonicador.

ANEXOS



Imagen9. Bortex.

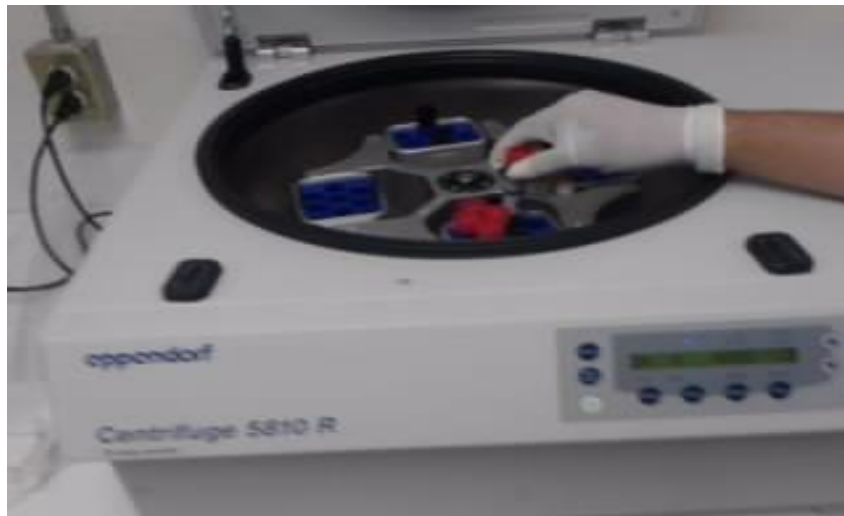


Imagen10. Centrifugación.

## ANEXOS

### FÓRMULA PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE HUMEDAD

A = Peso de la charolilla seca y limpia (g)

B = Peso de la charolilla mas muestra húmeda (g)

C = Peso de la charolilla mas muestra seca (g)

$$CONTENIDO DE HUMEDAD = 100 \left( \frac{(B - A) - (C - A)}{B - A} \right)$$

### FÓRMULA PARA DETERMINACIÓN DE CENIZAS

A = Peso del crisol con muestra (g)

B = Peso del crisol con cenizas (g)

C = Peso de la muestra (g)

$$CONTENIDO DE CENIZAS (\%) = 100 \left( \frac{A - B}{C} \right)$$

### FÓRMULA PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE EXTRACTO ETÉREO

A = Peso del matraz limpio y seco (g)

B = Peso del matraz con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

$$CANTIDAD DE GRASA (\%) = 100 \left( \frac{B - A}{C} \right)$$

## FÓRMULA PARA DETERMINAR PROTEÍNAS

$$\%N = \frac{(ml\ HCl)(N)(0.014)(100)}{Pm}$$

%N = Porcentaje de Nitrógeno total en la muestra.

ML HCl = Mililitros de HCl gastados en la titulación.

N = La normalidad del HCl

Pm = Peso de la muestra en gramos.

Para obtener el % de proteína en la muestra, el %N se debe multiplicar por un factor de conversión, el cual varía de acuerdo a la muestra que se esté analizando.