



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



Ingeniería Bioquímica

Bioacumulación y eliminación de
endosulfán lactona en *Eisenia fetida*

Residencia Profesional

Presenta:

Ana Fabiola Hernández Sántiz

Asesor:

Dra. Rocío Meza Gordillo

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Enero 2019

ÍNDICE

1	Introducción	4
2	Justificación	5
3	Objetivos	5
4	Caracterización del área en que participó:	6
4.1	Organigrama	7
4.2	Misión	8
4.3	Visión	8
4.4	Valores	8
5	Problemas a resolver, priorizándolos	9
6	Alcances y limitaciones	9
6.1	Alcances	9
6.2	Limitaciones	9
7	Fundamento teórico	10
7.1	Plaguicidas organoclorados	11
7.1.1	Clasificación y estructuras	11
7.2	Endosulfán	12
7.2.1	Antecedentes	12
7.2.1.1	Estructura química	13
7.2.1.2	Propiedades físicas y químicas	13
7.2.1.3	Propiedades toxicológicas	14
7.2.1.4	Problemática ambiental	15
7.2.1.5	Problemática agrícola	15
7.2.1.6	Regulaciones del endosulfán	16
7.2.2	Metabolitos del endosulfán	16
7.3	Vermicompostaje <i>Eisenia fetida</i>	19
7.3.1	Organismos implicados en el proceso de vermicompostaje	20
7.3.2	Clasificación taxonómica de la lombriz <i>Eisenia fetida</i>	22
7.3.3	Características anatómicas, morfológicas y reproductivas de la lombriz <i>Eisenia fetida</i>	22
7.3.3.1	Tubo digestivo	22
7.3.3.2	Sistema nervioso	23
7.3.3.3	Sistema circulatorio	23
7.3.4	Morfología	24
7.3.4.1	Reproducción y ciclo biológico	25
7.3.5	Condiciones ambientales para el desarrollo de <i>Eisenia fetida</i>	27

7.3.5.1. Temperatura	27
7.3.5.2. Humedad	27
7.3.5.3. Aireación	27
7.3.5.4. Alimentación	28
7.3.5.5. pH	28
7.3.5.6. Luz	28
8 Procedimiento y descripción de las actividades realizadas	29
8.1 <i>Eisenia fetida</i>	29
8.2 Preparación del sustrato y adaptación de <i>Eisenia fetida</i>	29
8.2.1 Bioacumulación	29
8.2.2. Adición de <i>Eisenia fetida</i>	30
8.2.3. Fase de eliminación.....	30
8.3 Extracción de endosulfán.....	31
8.3.1. Incremento de peso (%).....	31
8.3.2. Método cromatográfico de HPLC UV/VS.....	32
9 Resultados, planos, graficas, prototipos	33
10 Conclusiones y recomendaciones.....	37
11 Referencias bibliográficas.....	38

1 Introducción

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades en humanos y en los animales, así como, para el control de insectos y ácaros que afectan la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimento para animales (FAO, 2003). Sin embargo, se reconoce que son sustancias químicamente complejas, que una vez aplicadas en el ambiente, están sujetas a una serie de transformaciones a nivel físico, químico y biológico (fenómenos de adsorción y absorción sobre suelos y plantas, volatilización, fotólisis y degradación química o microbiana).

El endosulfán es un plaguicida organoclorado que se encuentra en mezcla de isómeros (α y β) y se transforma en condiciones aeróbicas biológicas de oxidación en endosulfán sulfato, el cual es degradado en metabolitos polares tóxicos y peligrosos para el medio ambiente (Silva et al., 2010) como endosulfán diol, endosulfán éter y endosulfán lactona (Tiwari y Guha, 2013), permaneciendo en suelo como residuos peligrosos y más tóxicos que el propio endosulfán (Odukkathil y Vasudevan, 2016). De ellos, el endosulfán lactona ha sido el menos estudiado y reportado. Se encuentra catalogado como el hidrocarburo clorado más extensamente usado a nivel mundial y actualmente es considerado como una de las causas más importantes de envenenamiento por plaguicida en muchos países, por lo tanto ha sido propuesto por la Unión Europea, en agosto del 2007, para que se incluya en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes con la finalidad de que se restrinja y/o elimine a nivel mundial, debido a que es tóxico, persistente, bioacumulable, y puede desplazarse a grandes distancias.

La biorremediación es cualquier proceso que utiliza organismos vivos como microorganismos, hongos y plantas, por medio de agentes o compuestos derivados de cualquiera de ellos, para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural ya sea en el suelo o en las aguas (Liu et al., 1989).

Por lo tanto el término vermirremediación se ha utilizado recientemente para indicar el uso de lombrices de tierra en la eliminación de contaminantes de los suelos (Sinha

et al., 2008) o cuando las lombrices de tierra ayudan a degradar compuestos no reciclables (*Gupta y Garg, 2009*).

Las lombrices modifican las propiedades físicas del suelo tales como la agregación, la estabilidad y la porosidad al excavar galerías, y las propiedades químicas y biológicas como la tasa de descomposición de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes y la composición y actividad de los microorganismos y de otros invertebrados del suelo (*Domínguez et al. 2004, Lores et al. 2006, Monroy et al. 2008*).

2 Justificación

El proyecto se realizó con el fin de conocer las concentraciones de endosulfán que puedan bioacumular o biotransformar las lombrices de tierra, así mismo se comparará los resultados con una investigación ya realizada sobre el contaminante endosulfán lactona en la lombriz *Eisenia fetida*, esto debido a que no existen muchos estudios realizados sobre dicho contaminante.

El endosulfán lactona es un contaminante orgánico persistente que se incorpora directamente en el ambiente, agua, aire, suelo y sedimento provocando problemas de grado toxicológico en los cultivos de la agricultura.

La metodología experimental se basó en la norma OCDE 317 para la prueba de productos químicos y de los estudios realizados por *Vázquez, P. et al 2013*.

3 Objetivos

Evaluar el efecto de bioacumulación y eliminación de endosulfán lactona en un sistema de vermicomposteo utilizando *Eisenia fetida*

4 Caracterización del área en que participó:

Polo tecnológico nacional en biocombustibles y servicios analíticos del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

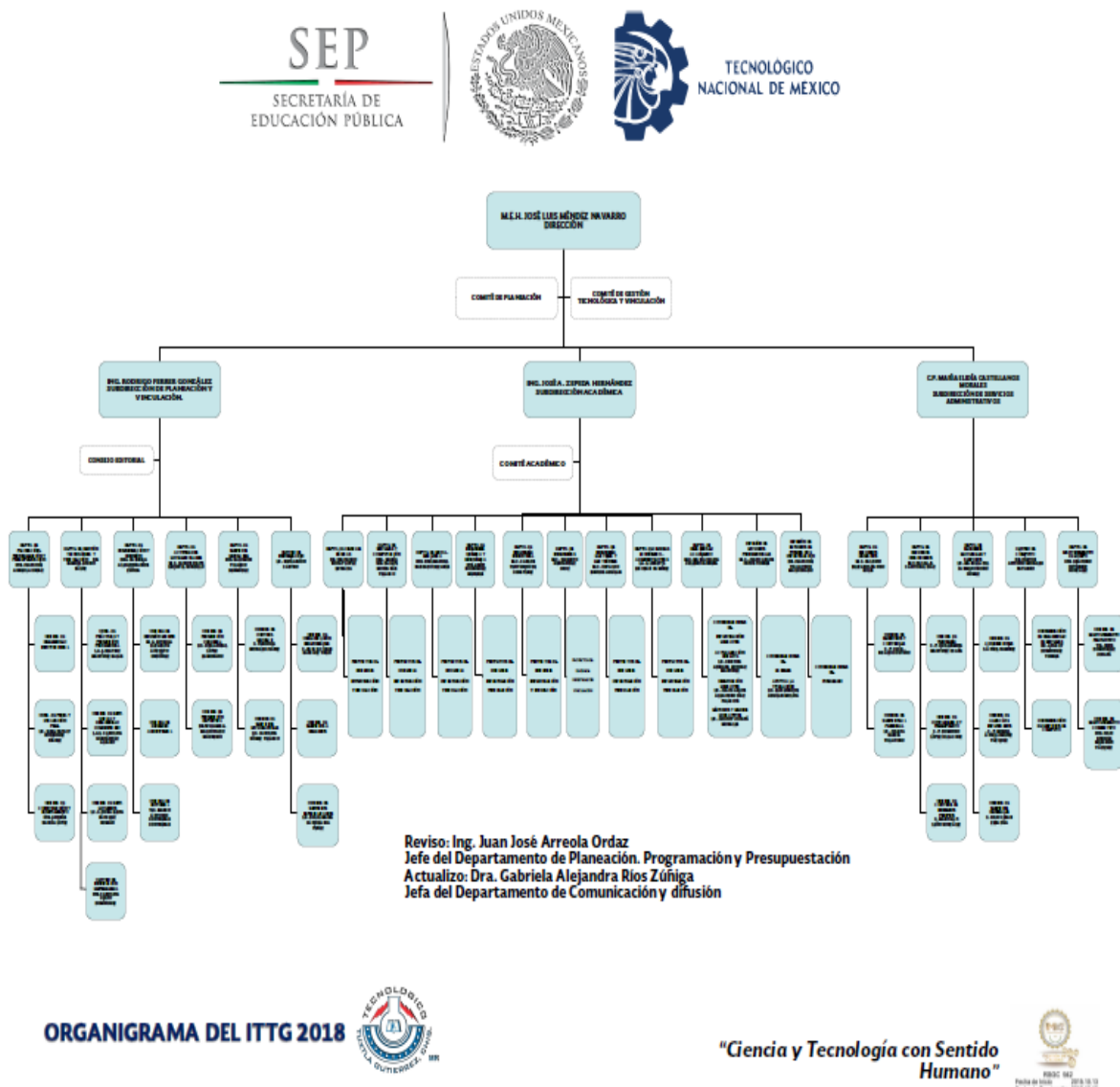
El polo tecnológico cuenta con once diferentes laboratorios de análisis para distintas pruebas de calidad que requiere la norma europea (siendo esta la más completa a nivel mundial). Los Laboratorios son los que se presentan a continuación: Laboratorio 1 de Recepción de muestras, Laboratorio 2 de Cromatografía, Laboratorio 3 de Microbiología, Laboratorio 4 de Biología Molecular, Laboratorio 5 de Pruebas de Combustión, Laboratorio 6 de Destilación, Laboratorio 7 de Caracterización de materias primas, Laboratorio 8 de Derivatizaciones, Laboratorio 9 y 10 de Espectrofotómetro FT-IR y Espectrofotómetro UV/VIS, Laboratorio 11 de Análisis Bromatológicos.

Se cuenta con líneas de investigación como:

- Biotecnología vegetal, que tiene como objetivo desarrollar procesos biotecnológicos para el aprovechamiento sustentable de células, tejidos, órganos y plantas completas de interés agroindustrial del estado de Chiapas.
- Ingeniería de procesos biotecnológicos y alimentarios, que agrupa a expertos en las áreas de fermentaciones y de alimentos, con enfoque en el área de la ingeniería bioquímica y biotecnología, donde los principales objetivos son desarrollar procesos en el área de ingeniería de alimentos y transformación sustentable de los productos primarios del Estado de Chiapas.
- Biocombustibles y desarrollo sustentable que tiene como objetivo desarrollar investigación sobre biocombustibles a partir de diversas fuentes propias de la región sureste de México. Se busca investigar la diversificación de las materias desde las etapas de extracción, manejo y estandarización, para su transformación a biocombustibles mediante procesos tecnológicos sustentables.

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio 8 de Derivatizaciones y el laboratorio de analítica donde se cuenta con los materiales, reactivos y equipos necesarios.

4.1 Organigrama



ORGANIGRAMA DEL ITTG 2018



"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"



4.2 Misión

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.

4.3 Visión

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

4.4 Valores

El Ser Humano

El Espíritu de Servicio

El Liderazgo

El Trabajo en Equipo

La Calidad

El Alto Desempeño

Respeto al Medio Ambiente

5 Problemas a resolver, priorizándolos

- Debido a la humedad del peat moss y excreta de conejo fue un poco laborioso el hecho de tamizar a ciertos compuestos.

6 Alcances y limitaciones

6.1 Alcances

- El proyecto se llevó a cabo y se obtuvieron los resultados satisfactorios que se esperaban. Estos resultados se hicieron con el fin de poder mejorar o añadir a estudios ya antes realizados.
- El experimento se llevó a cabo en tiempo y forma al contar con los materiales necesarios dentro del laboratorio.

6.2 Limitaciones

- La falta de espacio y tiempo para el uso del equipo HPLC debido a la gran demanda de uso.

7 Fundamento teórico

Se entiende por plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias con la cual se pretende prevenir, destruir, repeler o atenuar alguna plaga. A su vez, se entiende por plaga a cualquier organismo que interfiera con la conveniencia o bienestar del hombre u otra especie de su interés. Las estructuras y los organismos a los que atacan los plaguicidas son muy variadas y dependiendo de éstas, se han tratado de clasificar de la siguiente manera.

TABLA 1: Según el tipo de organismo que controla. Fuente: Niño, L. & Torres, N. et.; al. 2009.

Insecticida	Controlan insectos
Acaricida	Controlan ácaros
Fungicida	Controlan hongos y levaduras
Herbicida	Controlan hierba y maleza
Nematicida	Controlan nematodos
Molusquicidas	Controlan de moluscos
Rodenticidas	Controlan roedores
Bactericida	Controlan bacterias
Ovicidas	Controlan huevos de insectos o ácaros

TABLA 2: Según su estructura química. Fuente: Niño, L. & Torres, N. et.; al. 2009.

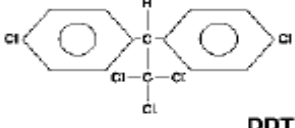
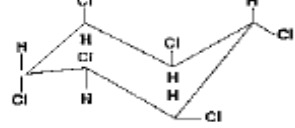
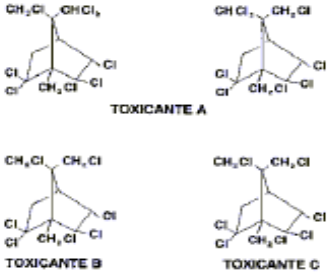
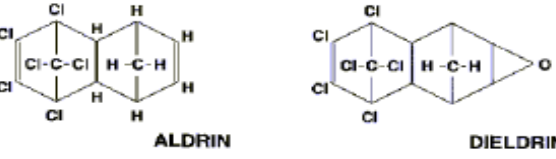
INSECTICIDAS	HERBICIDAS	FUNGICIDAS	RODENTICIDAS
Organoclorados	Dinitrofenoles	Compuestos de cobre, azufre	Inorgánicos
Organofosforados	Triazinas	Fenoles	Cumarinas/indandionas
Carbamatos	Ácidos Tricloroaceticos	Bencenos sustituidos	Convulsivos
Piretroides	Compuestos clorofenilicos	Tiocarbamatos	Colecalciferol
Otros	Paracuant, diquat	Tioftalimidias	

7.1 Plaguicidas organoclorados

7.1.1 Clasificación y estructuras

Los insecticidas organoclorados pueden agruparse, por su estructura química, en cuatro clases: derivados de hidrocarburos aromáticos (DDT, dicofol, metoxicloro, clorobencilato), derivados de hidrocarburos alicíclicos (Lindano), derivados de hidrocarburos terpénicos (toxafeno), derivados de hidrocarburos ciclodiénicos (aldrín, dieldrín, endrín, endosulfán, declorano, clordano, heptacloro).

TABLA 3: Estructura química de los plaguicidas organoclorados. Fuente: Niño, L. & Torres, N. et.; al. 2009

PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS	ESTRUCTURA QUIMICA
<p><i>Derivados de hidrocarburos aromáticos: (DDT y compuestos análogos, tales como DDE, DDD, dicofol, metoxicloro y clorobencilato)</i></p>	 <p style="text-align: center;">DDT</p>
<p><i>Derivados de hidrocarburos alicíclicos (Lindano)</i></p>	 <p style="text-align: center;">LINDANO</p>
<p><i>Derivados de hidrocarburos terpénicos: (terpenos clorados)</i></p>	 <p style="text-align: center;">TOXICANTE A</p> <p style="text-align: center;">TOXICANTE B</p> <p style="text-align: center;">TOXICANTE C</p>
<p><i>Derivados de hidrocarburos ciclodiénicos (aldrín, dieldrín, endrín, endosulfán, declorano, clordano, heptacloro).</i></p>	 <p style="text-align: center;">ALDRIN</p> <p style="text-align: center;">DIELDRIN</p>

Los organoclorados son poco solubles en agua, estables a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, lo que los hace bastante persistentes en el medio ambiente.

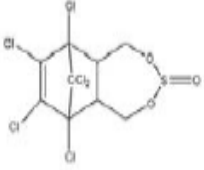
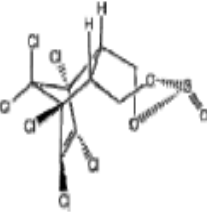
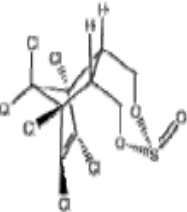
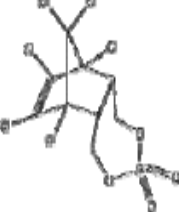
Los plaguicidas organoclorados se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente terrestre y acuático, como resultado de que en las últimas dos décadas han sido utilizados constantemente para combatir plagas en la industria, la agricultura, e incluso durante las campañas de salud donde son aplicados para contrarrestar enfermedades como la malaria. Sus propiedades fisicoquímicas los hacen muy resistentes a la degradación biológica, por lo que son altamente persistentes (Iwate *et al.*, 1994).

7.2 Endosulfán

7.2.1 Antecedentes

El endosulfán es un insecticida organoclorado perteneciente al grupo de los ciclodienos y es químicamente similar a la aldrina, al clordano y al heptacloro.

El endosulfán grado técnico contiene por lo menos 94% de los isómeros alfa y beta puros en una proporción 7:3, respectivamente. El principal metabolito, el sulfato de endosulfán, puede encontrarse en el ambiente por fotólisis del endosulfán o como resultado de la oxidación de éste por microorganismos. Otros productos de degradación incluyen; endosulfán diol, endosulfán lactona, endosulfán éter, endosulfán hidroxietil, endosulfán ácido carboxílico.

Nombre común	Endosulfán	Endosulfán I (alfa)	Endosulfán II (beta)	Sulfato de endosulfán
Fórmula química	$C_9H_6Cl_6O_3S$			$C_9H_6Cl_6O_4S$
Número CAS	115-29-7	959-98-8	33213-65-9	1031-07-8
Estructura				
Log K_{OW}	3.55 a 3.62	3.83	3.52	3.66
Log K_{OC}	3.5	3.55	--	--

-- sin datos

FIGURA 1: Características fisicoquímicas del endosulfán. Fuente: Toxicological Profile for Endosulfán, ATSDR, 2000.

7.2.1.1 Estructura química

El endosulfán hace parte de una familia de compuestos organoclorados del grupo de los ciclodienos de fórmula $C_9H_6Cl_6O_3S$ y de uso agrícola e industrial. Su nombre químico es 6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatien-3-óxido, tiene un peso molecular de 406.96 g. mol⁻¹ y se ha demostrado que el endosulfán es altamente tóxico en forma aguda por vías oral e inhalatoria, así como ligeramente tóxico por vía dérmica.

7.2.1.2 Propiedades físicas y químicas

Su punto de ebullición es igual a 106°C a 0.7 mmHg., punto de fusión a 106 °C., tiene una densidad relativa igual a 1.745 a 20°C., es soluble en xileno, keroseno, cloroformo, acetona y etanol, su presión de vapor es igual a 6.2x10⁻⁶ mmHg a 20°C. Esta sustancia se descompone al calentarse, produciendo vapores tóxicos que incluyen a los óxidos de azufre y al cloro. Reacciona con bases, causando peligro de intoxicación por los vapores de dióxidos de azufre que produce, es corrosivo al hierro.

7.2.1.3. Propiedades toxicológicas

El endosulfán tiene afinidad para los receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el cerebro y actúa como antagonista no competitivo del GABA. El enlace del GABA al receptor induce la incorporación de iones de cloruro por las neuronas, lo que provoca la hiperpolarización de la membrana. El bloqueo de esta actividad se traduce sólo en una repolarización parcial de la neurona y en un estado de excitación incontrolable.

Se ha demostrado que el endosulfán es altamente tóxico en forma aguda por vías oral e inhalatoria, así como ligeramente tóxico por vía dérmica. Este compuesto afecta fuertemente el sistema nervioso y sus efectos neurotóxicos han sido observados tanto en animales en estudios agudos, subcrónicos y crónicos, como en seres humanos por exposición ocupacional o intencional. La intoxicación aguda por endosulfán puede resultar en irritabilidad, inquietud, espasmos musculares, convulsiones y muerte.

Es un insecticida de contacto e ingestión de amplio espectro, aplicado principalmente en agricultura y, en algunos países, en salud pública. Se utiliza para controlar plagas en frutas, vegetales, té, tabaco, algodón, etc.,

El endosulfán es un compuesto tóxico que ha sido ampliamente utilizado como plaguicida en México. Se ha detectado que el endosulfán produce efectos neurotóxicos, hematotóxicos y nefrotóxicos agudos en mamíferos y es altamente tóxico para organismos acuáticos.

7.2.1.4 Problemática ambiental

El endosulfán se encuentra catalogado como el hidrocarburo clorado más extensamente usado a nivel mundial y actualmente es considerado como una de las causas más importantes de envenenamiento por plaguicida en muchos países. La persistencia ambiental de estas sustancias, y su amplia presencia en muchas regiones, se agrava por el transporte a largo alcance que ocurre de unos sitios a otros como resultado de la volatilización de estos materiales.

A pesar del anuncio del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) de incorporar el endosulfán a la lista de contaminantes orgánicos prohibidos (Convención de Estocolmo, 2011), el pesticida aún es usado. Esto fue demostrado recientemente en un estudio de contaminantes en el Lago Qarun en Egipto, ya que el estudio de los contenidos indicaban usos recientes y descargas frescas al lago (*Barakat, Khairy & Aukaily, 2013*). Por su parte Argentina y otros países han extendido legalmente su uso hasta el año 2016 (SC, 2011). Colombia adhirió a la Convención de Estocolmo el 23 de mayo de 2001 y lo ratificó el 22 de octubre de 2008, pero algunos sectores de la población aún lo usan.

7.2.1.5 Problemática agrícola

Como Contaminante Orgánico Persistente (COP), el endosulfán se incorpora directamente en el ambiente acuático por medio de las aguas lluvias y de riego en los cultivos, afectando las especies que allí se encuentran, acumulándose en los tejidos de los peces y otros organismos. Sus efectos sobre los vertebrados e invertebrados acuáticos se empiezan a hacer visibles aun en concentraciones tan bajas como $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Su tiempo de vida media en agua varía entre 3 y 7 días hasta cerca de 5 meses, dependiendo de la cantidad de oxígeno disuelto, la turbidez y el pH de los otros contaminantes del medio (*Capkin, Altinok & Karahan, 2006*). El endosulfán-sulfato, principal producto de la degradación, es igualmente tóxico y más persistente en el medio ambiente que sus compuestos de origen (*Siang, Yee & Seng, 2007*).

Aunque el endosulfán no desciende en gran medida hacia las aguas subterráneas, se escurre luego de las fumigaciones y ha sido detectado en estratos profundos del terreno, en concentraciones que van desde 0,008 a 0,053 $\mu\text{g L}^{-1}$, hasta 20 días después de la última fumigación (*Kaushik & Kaushik, 2007*).

7.2.1.6 Regulaciones del endosulfán

El endosulfán se desarrolló a comienzos de los cincuenta y en la actualidad está prohibido su uso; sin embargo, todavía se utiliza en diferentes regiones del mundo. La India, por ejemplo, está catalogada como el productor y exportador más importante del mundo (9900 toneladas anuales). Le siguen Alemania (4000 toneladas anuales) y China (2400 toneladas anuales) (*Yuquan, Kane, Tatsuya, Toru & Takeshi, 2000*). Este plaguicida salió al mercado en una época en que era escasa la conciencia ambiental, y se disponía de muy poco conocimiento del destino final de este compuesto y sus metabolitos. Para ese entonces, los estudios toxicológicos y los trabajos de monitoreo eran muy escasos y no era obligatorio hacerlos.

7.2.2 Metabolitos del endosulfán

La transformación aeróbica del endosulfán 1 y 2 se produce a través de la oxidación mediada biológicamente. Se degrada rápidamente hasta sus metabolitos y persiste por más tiempo bajo condiciones de mayor acidez. El metabolito principal que se forma es el endosulfán-sulfato 7 (isómeros α y β), que luego se degrada lentamente a los metabolitos más polares: endosulfán-diol 8 (isómeros α y β), endosulfán-éter 9 (isómeros α y β) y endosulfán-lactona 10 (isómeros α y β) (*Walse, Scott & Ferry, 2003*). En la evaluación de riesgos emitida por la Unión Europea, se cita el patrón de degradación ilustrado en la figura 2. También se produce sulfato de endosulfán por degradación anaeróbica más lenta que la aeróbica (Convenio de Rotterdam, 2011).

Los isómeros (α y β) se transforman en los respectivos derivados endosulfán-diol 8, ya sea directamente o a través de endosulfán-sulfato 7. Luego los isómeros α y β endosulfán-diol se degradan en un conjunto de metabolitos relacionados, que incluyen: endosulfán-éter 9, endosulfán-ácido hidroxicarboxílico y

endosulfánlactona 10 y endosulfán-hidroxiéter 11 (Ciglasch, Busche, Amelung & Trotrakool, 2008).

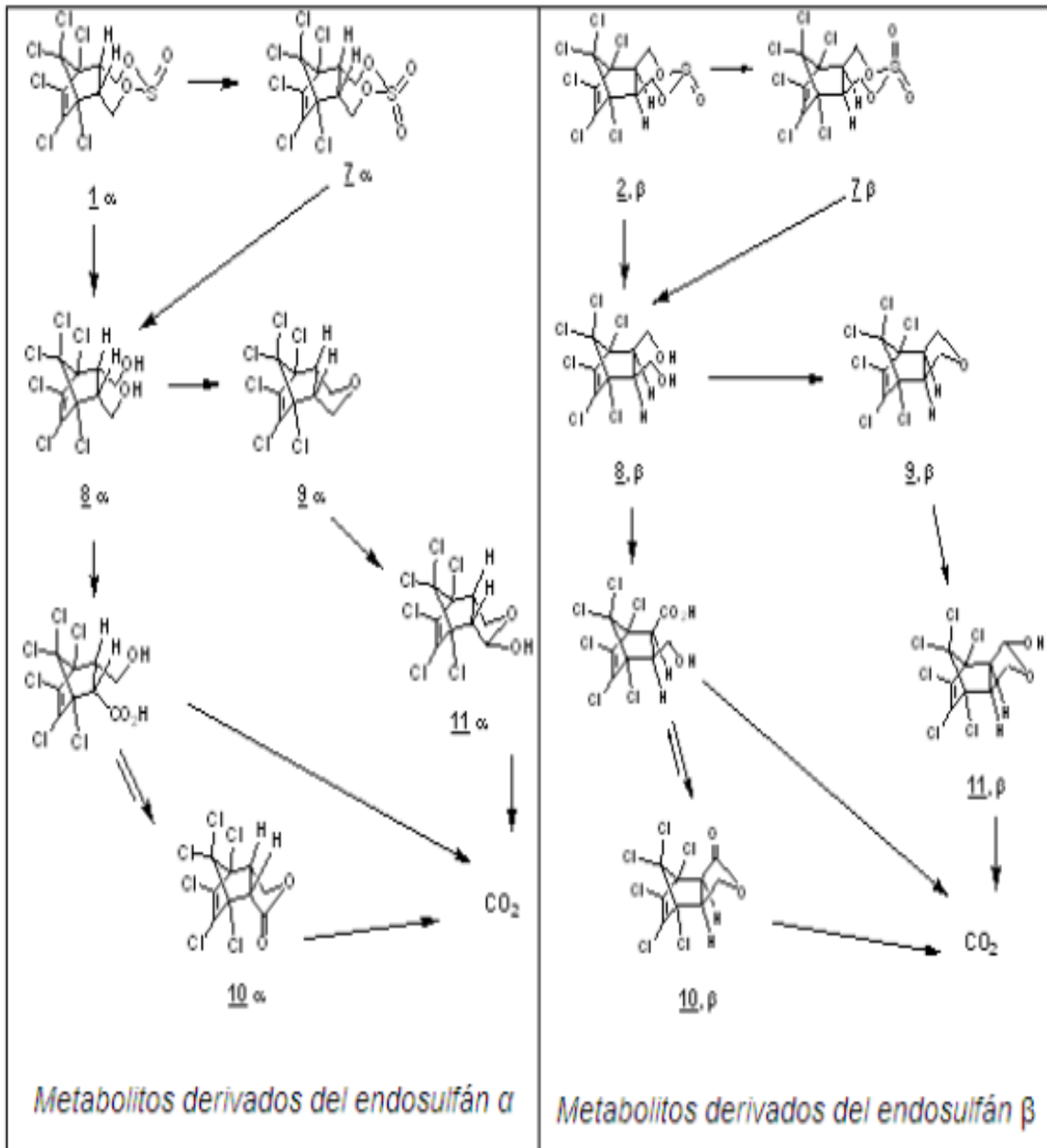
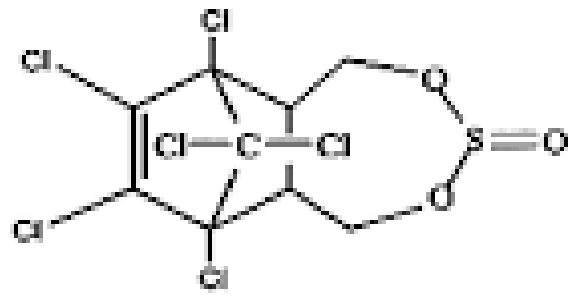
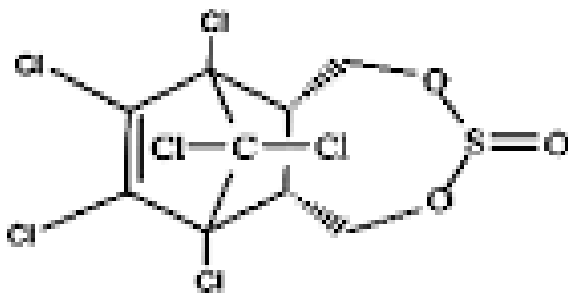


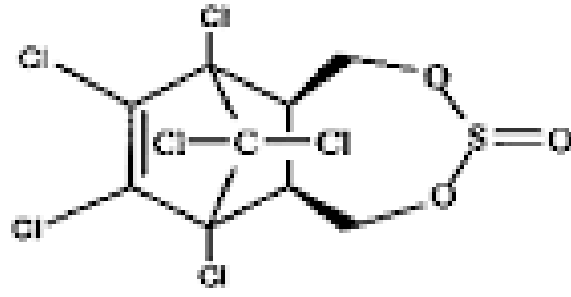
FIGURA 2: Metabolitos derivados del endosulfan α y β Fuente: (Ciglasch, Busche, Amelung & Trotrakool, 2008).



Endosulfan



Endosulfan (alpha isomer)



Endosulfan (beta isomer)

FIGURA 3: Endosulfan alfa y beta

7.3 Vermicompostaje *Eisenia fetida*

El vermicompostaje es un proceso de biooxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica mediada por la acción combinada de lombrices y microorganismos, mediante el cual se obtiene un producto final estabilizado, homogéneo y de granulometría fina denominado vermicompost, lumbricompost, compost de lombriz o humus de lombriz. Esta práctica de biotransformación aprovecha varias de las ventajas derivadas de la actividad de algunas especies de lombrices, las cuales aceleran la descomposición y la humificación de la materia orgánica, ya sea de un modo directo (alimentación detritívora y desplazamiento a través de galerías) o indirecto (estimulación de la actividad microbiana). Por otro lado, mejoran la estructura del producto final, al provocar, por el paso del residuo a través del sistema digestivo de la lombriz, la ruptura de los materiales orgánicos, reduciendo su tamaño de partículas y favoreciendo la formación de agregados estables. Además la actividad de estos detritívoros aumenta el contenido de nutrientes, convirtiéndolos a través de la actividad microbiana, en formas solubles y asimilables por los cultivos.

El proceso de vermicompostaje ha sido utilizado para la biodegradación de un gran número de residuos orgánicos, y se considera como una ecotecnología limpia, si impacto ambiental y cuyos costes de inversión, energéticos y de mantenimiento son moderadamente bajos. Su utilización aporta los siguientes beneficios:

- a) Eliminación de residuos orgánicos nocivos, insalubres, molestos y de difícil gestión
- b) Generación de un producto final útil (vermicompost), de gran valor como enmienda orgánica del suelo de alta calidad, que puede funcionar como un abono órgano químico.
- c) Producción de una gran biomasa de lombriz, de alto contenido proteico y de alta calidad alimentación animal (avícola, porcino y piscícola, fundamentalmente).

7.3.1. Organismos implicados en el proceso de vermicompostaje

Las lombrices son uno de los organismos implicados en este proceso, de las más de 4400 especies de lombrices terrestres identificadas, solamente una media docena de ellas, pueden ser utilizadas en la degradación de residuos orgánicos. Estas lombrices, pertenecientes taxonómicamente al Orden Haplotaxida y Familia Lumbricidae, se agrupan en la categoría ecológica de epigeas, que poseen una estrategia reproductiva “r” (rápida y prolífica), lo cual permite que sucesivas generaciones se vayan sustituyendo de manera continua, manteniendo por ello unas altas tasas de consumo del sustrato orgánico, lo cual acelera su degradación. Diversos estudios han sido enfocados principalmente en el crecimiento de la población de las lombrices, por ejemplo *Rodríguez-Quiroz y Paniagua-Michel (2005)* que trabajaron con los biosólidos de la PTAR Ecoparque en el noreste de México, estos autores reportaron un mayor incremento en el peso de la especie y un tiempo de vida más largo.

Canellas et al. (2002) han sugerido que las lombrices pueden incrementar la velocidad de descomposición de los residuos orgánicos y en este sentido, favorecer el proceso de vermicomposteo de estos materiales. Aunque un gran número de especies de lombrices más comúnmente utilizadas a nivel mundial es *Eisenia fetida*. *Eisenia fetida* se corresponde con la forma rayada y presenta el área entre los segmentos sin pigmentación o de color amarillo o pálido; de ahí, su nombre común de lombriz rayada o lombriz tigre. En contraste, *E. andrei*, la lombriz roja común, tiene la forma de color rojo uniforme.



FIGURA 4: Diferencias entre *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*.

Aparte de las diferencias en la pigmentación, ambas especies son morfológicamente similares (Sims & Gerard 1985, Reinecke & Viljoen 1991) y sus parámetros biológicos, sobre todo de potencial reproductivo y sus ciclos de vida no se diferencian significativamente, aunque la tasa de crecimiento y producción de capullos es algo más alta en *E. andrei* que en *E. fetida* (Elvira et al. 1996).

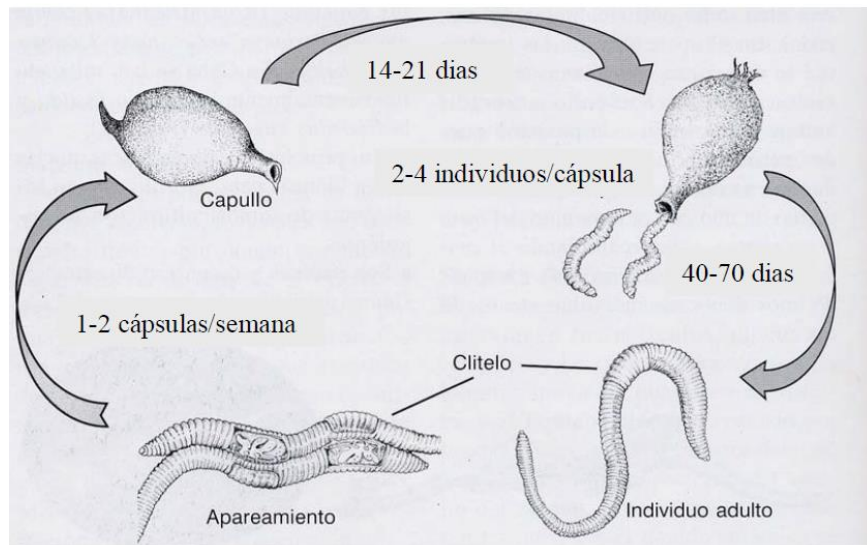


FIGURA 5: Ciclo biológico de *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*.

La lombriz roja *Eisenia fetida*, fueron criadas intensivamente en california (EUA) es un especie que algunos investigadores la denomina “rojo hibrido”, lo que ha dado lugar a muchas confusiones ya que no se trata de un hibrido, sino de una lombriz que al igual que el resto de sus parientes son el resultado de la selección natural, la lombriz *Eisenia fetida* es la especie más cultivada en el mundo entero, debido a su tolerancia a los factores ambientales (pH, temperatura, humedad), potencial reproductor y capacidad de apiñamiento (Spurgeon y Hopkin, 2000; González et al., 2006; Mendoza, 2008).

La lombriz roja californiana *Eisenia fetida* es de las especies que más se adaptan a su crianza en cautiverio, se le puede cultivar en pequeña y gran escala, bajo techo o a la intemperie, con diversos climas, tipos de alimento y altitudes (Pineda, 2006)

7.3.2. Clasificación taxonómica de la lombriz *Eisenia fetida*

De acuerdo al Ministerio de Agricultura Técnica de Chile (MAT, 2007), la lombriz *Eisenia fetida* se clasifica como:

REINO: Animal

TIPO: Anélido

CLASE: Oligoqueto

ORDEN: Opisthoro

FAMILIA: Lombricidae

GÉNERO: *Eisenia*

ESPECIE: *fetida*

7.3.3. Características anatómicas, morfológicas y reproductivas de la lombriz *Eisenia fetida*

7.3.3.1 Tubo digestivo

El tubo digestivo, de importancia en el proceso de humificación, reinicia en la boca ubicada bajo el prostomium, primer anillo o segmento de la cabeza, ésta puede ser proyectada o invaginada, a ella le sigue una faringe de gruesas paredes musculares, que conducen a un esófago portador de cilios en el cual se abren los conductores de las glándulas calcíferas o glándulas de Morren. Los cuales son órganos especiales de regulación de los equilibrios iónicos del medio interno del oligoqueto. En el estómago existe una estructura dilatada que recibe el nombre de buche que se constituye de un estómago muscular o molleja. La molleja conduce a las paredes musculares, hasta llegar al intestino, que recorre internamente todo el animal hasta el ano situado en la cola de la lombriz. El intestino posee un pliegue dorsal que aumenta la superficie de absorción (Eastman, 1999; Tocalino et al., 2004; Schuldt et al., 2007).

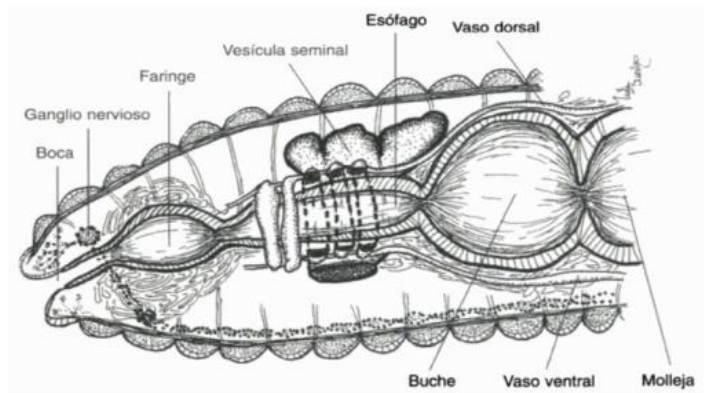


Figura 6: Estómago con estructura dilata.

7.3.3.2 Sistema nervioso

El sistema nervioso está constituido por un cerebro cefálico ganglionar de posición dorsal, que emite cordones alrededor del esófago, para conectarse con masas ganglionares pequeñas, que se ubican en la región ventral del animal a lo largo de todo el cuerpo. Las lombrices carecen de ojos pero poseen grupos de receptores repartidos por la piel que permite percibir la luz y sustancias químicas diversas, funcionando esta percepción también, a modo de olfato, estos receptores facilitan la orientación de las lombrices para la búsqueda de alimentos.

7.3.3.3 Sistema circulatorio

En la región esofágica del cuerpo de la lombriz se sitúa un número variable de cinco vasos contráctiles y que reciben el nombre de corazones y también poseen un par de riñones. El aparato circulatorio del animal es un sistema de canales cerrados que se ramifican en una red de finos capilares en el tegumento sobre el intestino y los diversos órganos. Debido al sistema circulatorio cerrado la sangre fluye por los vasos. Los trayectos principales recorren la parte dorsal y ventral de la lombriz. El vaso dorsal lleva sangre pigmentada de rojo, detrás y adelante y en el tercio anterior se produce al menos cinco pares de conexiones circulares pulsátiles corazones con el vaso central que lleva la sangre nuevamente hacia atrás.

Las partes de las células de la piel de las lombrices generan una cutícula. Otras células intercaladas producen moco que mantienen húmeda la cutícula. Cuando se seca, ésta no permite el intercambio gaseoso. Las lombrices respiran únicamente por la piel y en tales circunstancias el oxígeno no ingresa a la sangre (*Eastaman, et al. 1999*).

7.3.4. Morfología

La longitud de la lombriz normalmente es de 2.5 a 3.0 cm creciendo hasta 6 a 7cm, su diámetro oscila entre los 3 y 5 mm, normalmente tienen un peso de 0.25 g, es de color rojo oscuro, respira a través de la piel y el abdomen es más pálido que el resto del animal.

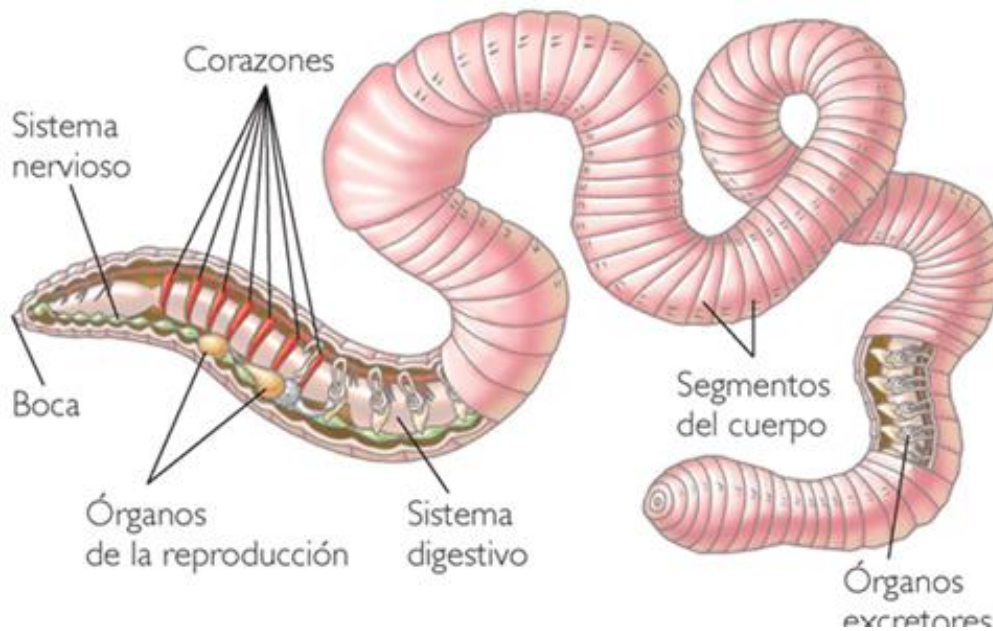


FIGURA 7: Anatomía de *Eisenia fetida*

7.3.4.1 Reproducción y ciclo biológico

Las lombrices, por tener los órganos genitales masculinos y femeninos en un mismo individuo, se conocen como monoicos, son organismos hemafroditas. El aparato genital masculino está integrado por los testículos que son glándulas secretoras de esperma. Su situación es anterior, muy cerca de la boca. El aparato genital femenino recibe el esperma y lo retiene hasta el momento de fecundación; este aparato genital se encuentra en una posición relativa posterior al aparato genital masculino.

Cuando la lombriz alcanza la madurez sexual desarrolla en el tercio anterior un anillo mucoso; el clitelium o clitelo que se sitúa en la parte anterior del cuerpo, aproximadamente a la altura de su primer tercio, si se considera la longitud total de la lombriz. El clitelo se puede ver cuando las lombrices son adultas el anillo contiene una glándula que segrega un líquido especial, cuya finalidad es de proteger a los capullos embrionales conocidos como cocones. La fecundación se efectúa a través del clitelium. Las lombrices empiezan a reproducirse a los tres meses, no hay época definida para la reproducción debido a que es durante todo el año.

Las lombrices copulan entre una y cinco veces por semana, produciendo cada animal una puesta o cocón conteniendo dos a cinco embriones o lombrices, lo abandonan al cabo de 23 días que es cuando adquieren la madurez sexual, antes de los 60 días deben permanecer a una temperatura de 25°C. Las lombrices se nutren dentro del cocón por las secreciones del clitelium, en el momento del nacimiento, las crías rompen la envoltura que han adquirido un color café oscuro. Estos pequeños animales son parecidos a los padres, con los mismos hábitos alimenticios y dieta similar; en una población de lombrices pueden distinguirse diferentes estadios en un mismo núcleo: cocones, juveniles, animales subadultos y adultos lombrices.

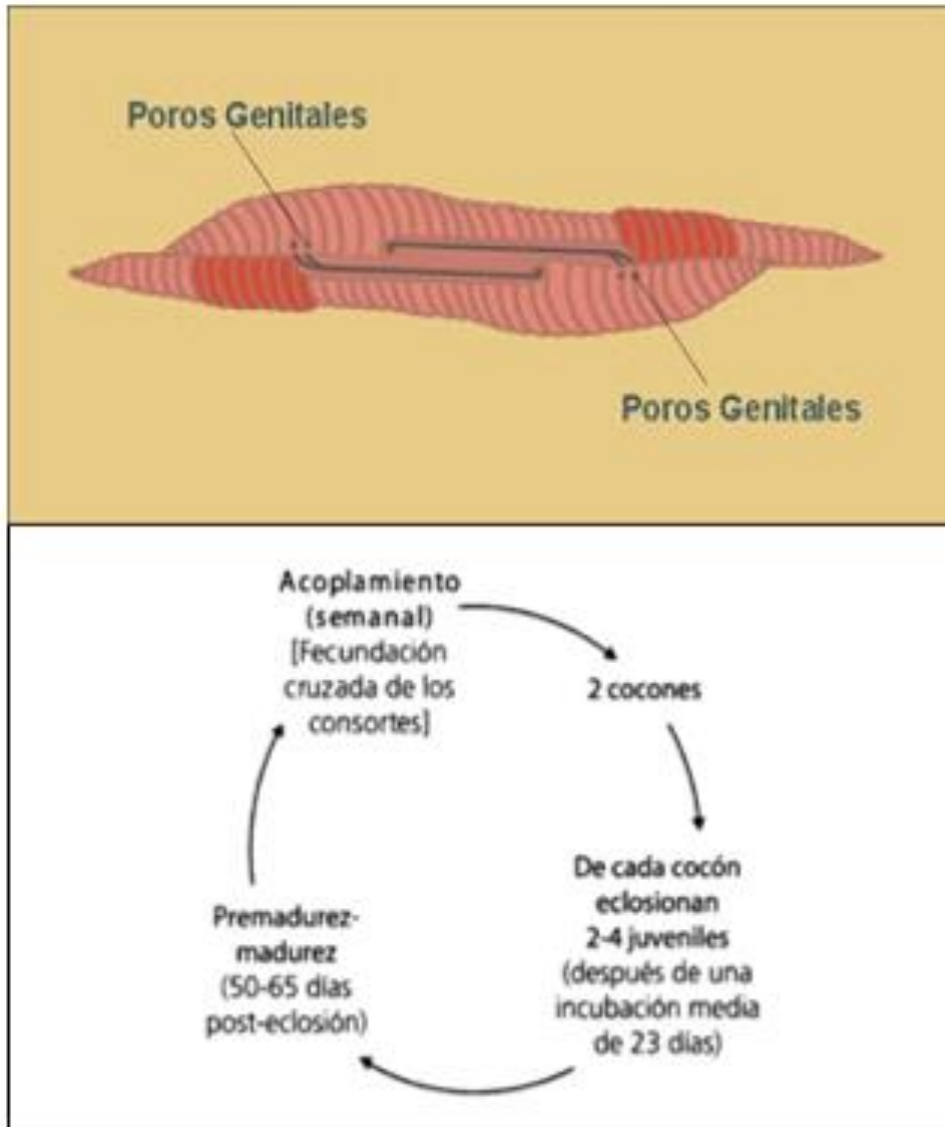


FIGURA 8: Acoplamiento de *Eisenia fetida*

7.3.5 Condiciones ambientales para el desarrollo de *Eisenia fetida*

El control de los factores ambientales, así como la correcta alimentación con el sustrato orgánico, son determinaciones para una correcta y eficiente crianza de lombrices. Los cuidados más comunes que se deben observar para mantener sano y eficiente el procesamiento con las lombrices, tiene que ver con proporcionarles la temperatura, humedad, acidez, aireación, así como el alimento, en el tipo y en las cantidades adecuadas (*Ferruzzi, 1986; Mendoza 2006; Shult et al., 2007*)

7.3.5.1. Temperatura

La temperatura más propicia para el desarrollo óptimo de las lombrices se encuentra alrededor de los 20°C en el extremo inferior las lombrices no pueden sobrevivir en temperaturas inferiores a 10°C, mientras que por el otro extremo temperaturas mayores a 30°C pueden ser mortales para ellas. Estas temperaturas extremas son difíciles de alcanzar en una noche invernal o provocarse por una adición desmedida de materia orgánica fresca. (*Ferruzzi, 1986; Mendoza 2006; Shult et al., 2007*)

7.3.5.2. Humedad

El riego debe ser fino para mantener húmedo el medio de crecimiento, donde se encuentra la lombriz, en este sentido la humedad promedio más favorable para las lombrices es del 75 al 85%. Se debe de revisar el deposito donde se encuentra la vermicompost y verificar que esté siempre presente una apariencia húmeda, al grado de poder extraer unas cuantas gotas, si se toma en las manos y se aprieta, exprimiéndolo con los dedos; por otra parte se debe prevenir la entrada de agua en grande volúmenes que pueda llegar a inundar el sustrato, lo que reduce la aireación necesaria y provoca al escape o ahogamiento de las lombrices.

7.3.5.3. Aireación

Las lombrices al igual que los seres aeróbicos necesitan de aire, por que respiran y eliminan el bióxido de carbono, por lo que el compost o el sustrato deberán permitir la suficiente ventilación interna para que este proceso se lleve a cabo. Adiciones

exageradas de alimento fresco, muy denso o pastoso pueden también provocar una falta de ventilación, esto se evita distribuyendo el material en capas más delgadas, o agregar materiales porosos.

7.3.5.4. Alimentación

El alimento debe estar lo suficientemente asimilable para las lombrices. Un kilogramo de lombrices se come un kilogramo de alimento al día. Las lombrices se alimentan de materiales orgánicos en descomposición. Antes de comer los residuos vegetales los humedece con un líquido parecido a la secreción del páncreas humano, lo cual constituye un pre digestión.

7.3.5.5. pH

Las acides o alcalinidad en el sustrato de crecimiento donde se desarrollan las lombrices es una característica difícil de observar y reconocer a simple vista, por lo que es conveniente que se tenga a la mano un papel indicador de pH, con el cual se podrá identificar el cambio de coloración, en base a la escala, que va determinar la acidez o alcalinidad en el medio de crecimiento. Las lombrices pueden desarrollarse apropiadamente cuando el pH está entre 5, moderadamente ácido, y 6, ligeramente ácido, es decir un rango cercano al 7, que presenta al pH neutro. En caso muy extremo en el que el valor de pH se encuentran persistentemente inclinado hacia uno u otro extremo, se puede tratar de neutralizar añadiendo pequeñas cantidades de cal disuelta para casos de acidez o vinagre en forma disuelta para reducir alcalinidad.

7.3.5.6. Luz

Las lombrices necesitan de oscuridad, ya que la presencia de luz la afecta directamente, la exposición por tiempos cortos a los rayos ultravioleta las deseca y las mata (*Quintero, 2004*).

8 Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

8.1 *Eisenia fetida*

Las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) fueron adquiridas en el rancho “Luanda” ubicado en el municipio de Ocozocoautla de Espinoza, Chiapas, durante los meses de JUNIO-JULIO del 2018, las cuales fueron alimentadas con excreta de vaca. Posteriormente, se acondicionaron en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez y se alimentaron con excreta de conejo y peat moss (ambos secos) por lo menos dos veces a la semana, manteniendo la humedad y temperatura de 75% y 24°C respectivamente, en un recipiente de aluminio (cama) que fue resguardado en un cuarto oscuro durante dos meses.

8.2 Preparación del sustrato y adaptación de *Eisenia fetida*.

El sustrato sólido, compuesto por excreta de conejo y peat moss, se molió en un molino común y se tamizó en una malla 100 (tamaño de partícula de 0.144 mm). Se mezclaron los dos componentes del sustrato en proporciones de 85% - 15% de peat moss y excreta de conejo respectivamente (42.5 g de peat moss y 8.5 g de excreta), dando un total de 50.0g, en cada frasco de vidrio color ámbar con capacidad de un litro, y se le agregaron aproximadamente 110 ml de agua destilada para alcanzar una humedad del 75%. La mezcla que se obtuvo fue homogénea para permitir el contacto del sustrato húmedo con las lombrices.

8.2.1 Bioacumulación

La fase de bioacumulación consta de 5 días de muestreo que fueron monitoreados los días 0, 1, 3, y 5.

Para la fase de bioacumulación de endosulfán en *Eisenia fetida* y sustrato se utilizaron 20 unidades experimentales:

- 4 frascos de referencia (blanco) sin endosulfán lactona
- 16 frascos con endosulfán lactona

Nota: El número de réplicas es de 4 por punto de muestreo.

La cantidad de endosulfán lactona que se adicionó a las unidades experimentales para contaminarlos con endosulfán lactona fue de 340 µL. Que es igual a una

concentración de 0.6 mg/ kg de endosulfan lactona al sustrato. A dos de las unidades experimentales que no se contaminaron con endosulfán lactona, se les agregó 0.6 mg/ kg de acetonitrilo al sustrato mientras que a las otras dos no se agregó nada.

8.2.2. Adición de *Eisenia fetida*

Se pesaron 5 lombrices cada una con una diferencia de pesos de 0.1 g, se agregaron a los frascos ámbar que previamente contenían el sustrato húmedo y se cerró el orificio del frasco con pañalina para permitir el paso de oxígeno. Para evaluar la adaptación de las lombrices al sustrato, las condiciones de los frascos se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 ° C durante toda la prueba, bajo un ciclo de luz / oscuridad controlado de 16/8 horas.

8.2.3. Fase de eliminación

La fase de eliminación consta de 21 días de muestreo que fueron monitoreados los días 0, 1, 3, 5, 7, 14 y 21.

Para la fase de eliminación se utilizaron 56 unidades experimentales;

- 28 unidades experimentales de referencia (blanco) sin endosulfán lactona, teniendo en cuenta que 4 unidades experimentales se utilizaron para cada día de monitoreo.
- 28 unidades experimentales sin endosulfán lactona.

Nota: Para cada día de muestreo se utilizaron 8 unidades experimentales

8.3 Extracción de endosulfán

A una muestra de cada tratamiento en los días especificados anteriormente se tomó una unidad experimental, se retiraron las lombrices y se eliminó el sustrato que pudiera estar adherido al cuerpo de la lombriz, lavándolas con agua destilada, se secaron y pesaron, se dejaron por 24 horas en un recipiente seco y tapado para purgarlas.

El sustrato se puso a secar para retirar humedad en un horno por 24 horas a 60°C. Una vez seco, se pesaron 12 g en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con 75 ml de acetonitrilo grado gradiente. Se mezclaron en una agitadora a 175 rpm por un tiempo de 1:30 horas, el sobrenadante se colocó en un tubo marca falcon de 50 ml. y se dejó evaporar en una campana de extracción por 24 horas y lo obtenido después de la evaporación se agregó de ese sobrenadante 1 ml en tubos eppendorff para su posterior análisis en cromatografía.

Para las lombrices, una vez pasadas las 24 horas, se lavaron y después de secarlas, se congelaron a temperaturas inferiores a -18 °C para triturarlas en un mortero, se agregó aproximadamente de 2-3 g sulfato de sodio para retirar humedad; se colocó 1 g de la pasta resultante de sulfato de sodio y lombriz en matraces de Erlenmeyer con una mezcla de 10 ml de cloruro de metileno y 2 ml de acetona. Se mezclaron en una agitadora a 175 rpm por un tiempo de 1:30 horas, el sobrenadante se colocó en tubos falcon de 15 ml y se dejó evaporar en una campana de extracción por 24 horas y lo obtenido después de la evaporación se guardó la cantidad de 1 ml de ese sobrenadante en tubos eppendorff para su posterior análisis en cromatografía (*Contreras et al., 2006*).

8.3.1. Incremento de peso (%)

Para conocer el incremento de peso, las lombrices fueron pesadas antes de ser adicionadas al sustrato y después de los días de muestreo. El resultado es la diferencia en el peso ya sea mayor o menor con respecto al inicial, de todas las unidades experimentales.

El incremento de peso es un parámetro que se calcula haciendo uso de los pesos iniciales y finales de la lombriz de tierra (*Villalobos-Maldonado et al., 2015*), considerando la siguiente formula con pequeñas modificaciones:

$$IP: \frac{Pf - Po}{Po} * 100 \text{ ----- (1)}$$

Dónde:

IP= Incremento de peso

Pf= Peso final

Po= Peso inicial

8.3.2. Método cromatográfico de HPLC UV/VS

Se construyó la curva de calibración estándar de endosulfán lactona, se trazaron las concentraciones del analito contra el pico que fue el área bajo la curva con las condiciones cromatográficas propuestas. La identificación y cuantificación de endosulfán lactona en lombrices, se determinó utilizando un cromatógrafo PerkinElmer CT 06484 (Shelton, USA). Las condiciones de operación del equipo fueron las siguientes: Columna capilar Zorbax ODS-C18 de medidas 4.6 mm por 250 mm por 5 µm. Teniendo como elución isocrática una fase móvil: agua/acetonitrilo (20/80, v/v); temperatura de la columna 25 °C; detección UV/VS a 217 nm longitud de onda; volumen de inyección: 20 µL; flujo constante 1 ml min⁻¹. Los parámetros validados se observan en la tabla 4.

TABLA 4: Datos de validación para el método de extracción de endosulfán lactona en lombriz de tierra con acetonitrilo.

Parámetro	Valor
Ecuación	Y= 16025 X
Intervalo de linealidad (mg L ⁻¹)	0.15 -100
Concentraciones usadas (mg L ⁻¹)	0.15, 0.25, 0.35, 0.45, 0.55, 0.65, 0.75, 0.85, 0.95, 1.05, 10, 50, 100
R ²	0.9993
Límite de Detección (mg L ⁻¹)	0.045
Límite de Cuantificación (mg L ⁻¹)	0.15
Eficiencia de recuperación (%)	68
Coefficiente de variación	16.68
Precisión (δ)	+/- 13.77

9 Resultados, planos, gráficas, prototipos

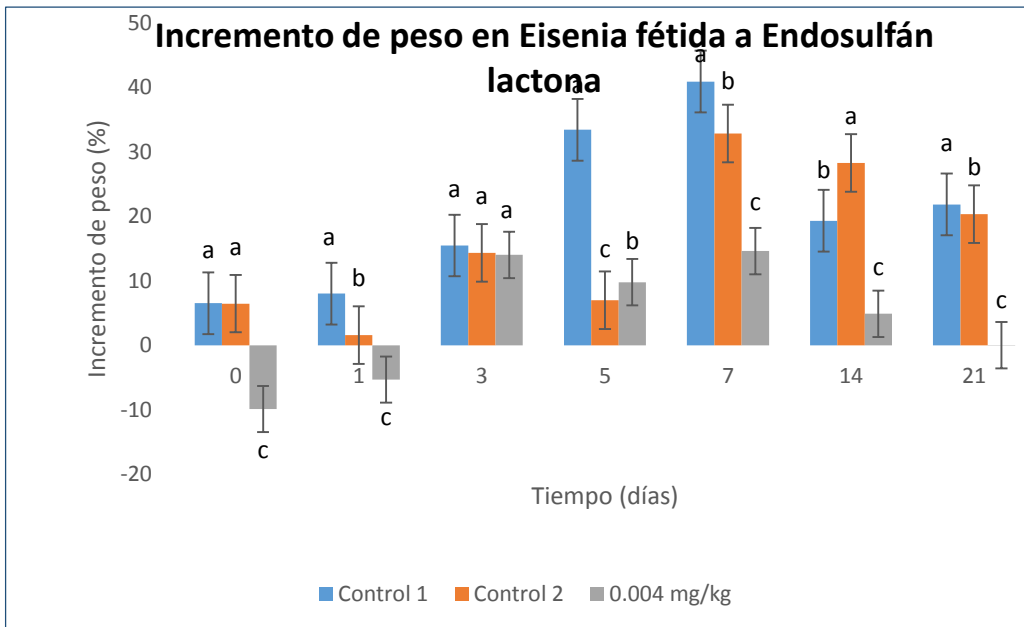


FIGURA 9: Incremento de peso en *Eisenia fetida* por endosulfán lactona en la fase de eliminación.

El incremento de peso en *Eisenia fetida* se puede observar en las figura 9, en dónde se puede ver que desde el día 0 hay un descenso de peso y a partir del día 3 ya se puede ver un incremento.

Como se puede observar en el día 3 no hay una diferencia significativa entre los controles y los que están contaminados con endosulfán lactona. En los días 3 y 7 se ve un alto incremento de peso a diferencia de los demás días, estando en el día 7 el mayor incremento de peso en los controles. También se puede observar en donde el peso de *Eisenia fetida* va disminuyendo a partir del día 14.

Los estudios han demostrado que el crecimiento de lombrices de tierra se inhibe después de la exposición a sustancias químicas tóxicas y la disminución de peso es una respuesta común de lombrices al estrés. (Su et al., 2013; Ye et al., 2016).

Cao et al. 2015 reportó resultados acerca de clomazone en *Eisenia fetida*, en donde se percibe la pérdida de peso conforme pasan los días, esto se debe a que las lombrices pueden acumular contaminantes en sus tejidos corporales a través de la piel y los sistemas digestivos. (Shan et al. 2014; Rodriguez-Campos et al. 2014).

Los estudios han demostrado que el crecimiento de las lombrices de tierra se inhibe después de la exposición a sustancias químicas tóxicas, y la reducción del peso es una respuesta común de las lombrices de tierra al estrés (Ye et al. 2016 y Liu et al. 2018). Sin embargo Ye et al. (2016) informaron que la reducción de peso puede deberse a la pérdida de glucógeno, lípidos y proteínas inducida por sustancias químicas tóxicas.

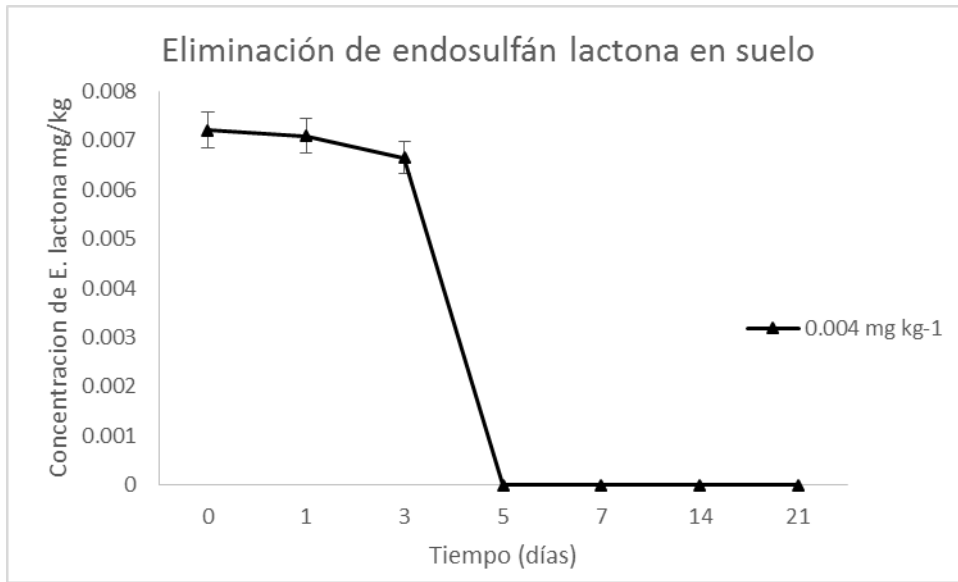


FIGURA 10: Concentración de Endosulfán lactona en suelo en fase de eliminación.

Como se observa en la figura 10, en el día 3 aún se encuentran concentraciones de endosulfán lactona en el suelo, pero a partir del día 5 ya hay una disminución significativa de contaminante hasta el día 21. A pesar de que las lombrices fueran depositadas en sustrato libre de contaminante, se ve la presencia de contaminante en sustrato debido a que las lombrices comienzan a excretar residuos de contaminantes que pudieran tener en su organismo.

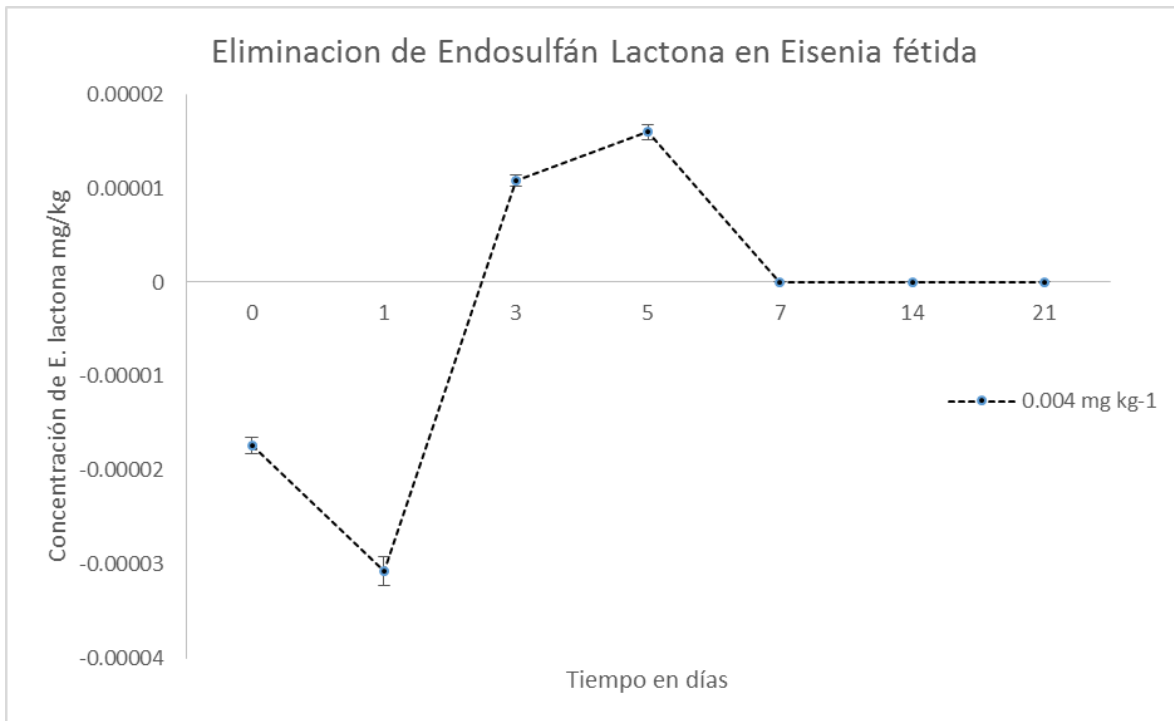


FIGURA 11: Concentración de Endosulfán Lactona en *Eisenia fetida* en fase de eliminación.

En la figura 11 se puede observar que la concentración de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* es poco significativa pero a partir del día 3 se puede ver nuevamente cantidades de endosulfán hasta el día 5. Al observar en la figura 10 se puede ver que la concentración de endosulfán en suelo disminuye por lo tanto en *Eisenia fetida* aumenta en el día 5.

Las lombrices tienen una interrelación compleja con microorganismos, que sirven como su principal fuente de nutrientes, pero las lombrices de tierra también promueven la actividad microbiana por fragmentación e inoculación de materia orgánica en descomposición con microorganismos (Li et al., 2002).

10 Conclusiones y recomendaciones

Se llega a la conclusión de que los estudios realizados son de gran importancia y aporte a la investigación debido a que así se conocen resultados diferentes mediante la aplicación de nuevos métodos.

Los resultados de endosulfán lactona a *Eisenia fétida* fueron favorables ya que se obtuvieron datos confiables al compararlos con estudios antes realizados en donde podemos ver que *Eisenia fetida* es muy importante en los estudios de bioacumulación ó eliminación debido a que es capaz de sobrevivir en ambientes controlados y también son capaces de sobrevivir a endosulfán lactona sin que éste pueda afectarlas ya que *Eisenia fétida* pudo reproducirse al notar la aparición de cocones en el sustrato.

Este tipo de estudios en suelo pueden servir de ayuda para conocer indicadores de contaminantes en suelos y posteriormente poder remediarlos. El uso de equipos como el HPLC es de gran utilidad en el área de la investigación debido a que nos proporcionan datos confiables para determinar las cantidades exactas que se desean saber al momento de realizar una investigación científica.

11 Referencias bibliográficas

- 1.- Aguilar, J. (2018). Bioacumulación y eliminación de Endosulfán Lactona en *Eisenia Fetida*. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
- 2.- Betancur, M., Ocampo, R. & Rios, I. 2014. La problemática del endosulfán: Aspectos químicos, analíticos y ambientales. Luna azul, 21, pp.3-5.
- 3.- Convenio de Rotterdam. 2011. Aplicación del procedimiento de consentimiento fundamentado previo a productos químicos prohibidos o rigurosamente restringidos.
- 4.- Del puerto, A., Suárez, S. & Palacio, D. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Scielo., 52, p.3.
- 5.- Gómez, M. & Domínguez, J. 2010. Ciclos de vida de las lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje. Scielo., 26, p.2.
- 6.- Lema, I. 2011. Diagnóstico de la situación del endosulfán en México. Instituto Nacional de Ecología.
- 7.- Morales, I. 2010. Dinámica poblacional de la lombriz (*Eisenia fetida*) en lodos residuales de Met-Mex peñoles. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila.
- 8.- Niño, I. & Torres, N. 2009. Determinación de la característica de toxicidad del endosulfán por medio de la técnica TCLP (toxicity characteristic leaching procedure). Universidad de la salle. Bogotá.
- 9.- Pérez, M. & Domínguez, M. 2010. *Eisenia fetida* (savigny, 1826) y *Eisenia Andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. Scielo., 26, p.2.
- 10.- Ramírez, J. & Trujillo, M. 2012. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente. , 26, pp.2-3.
- 11.- Saavedra, m. 2007. Biodegradación del Alperujo utilizando hongos del género Pleurotus y anélidos de la especie *Eisenia fetida*. Universidad de granada.
- 12.- Sánchez D. 2009. Comportamiento reproductivo de *Eisenia Fétida* durante el ciclo otoño-invierno en diferentes estiércoles. Universidad Autónoma de Agraria. México.
- 13.- Vázquez, P. 2013. Biodegradación de bifenilos policlorados (bpc's) por acción del vermicompostaje. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
- 14.- Xao, J. , Li, P., Li, Q. Sheng, P. & Dia, X. 2015. Bioaccumulation and Elimination of the Herbicide clomazone in the earthworms *eisenia fétida*. Crossmark.