



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

RESPUESTAS TOXICOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE *Eisenia fetida* A ENDOSULFÁN LACTONA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MC. IBQ. PAOLA TAYDÉ VÁZQUEZ VILLEGAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ROCÍO MEZA GORDILLO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

AGOSTO 2019.

RESUMEN

El endosulfán es un plaguicida organoclorado sintético que, a pesar de estar prohibida su síntesis y distribución mundial, sigue siendo ampliamente utilizado en cultivos agrícolas. La preocupación por su uso y acumulación ha aumentado por su naturaleza residual y su alto nivel de toxicidad. Mediante procesos enzimáticos oxidativos del suelo, el endosulfán se transforma en endosulfán sulfato, y a su vez en compuestos más polares y tóxicos como el endosulfán diol, endosulfán éter y endosulfán lactona; este último con escasa evidencia científica en relación con su toxicidad y bioacumulación en seres vivos.

Por tal razón, en este proyecto se llevaron a cabo pruebas de toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* determinando la concentración letal media (CL50) y concentración efectiva media (CE50) en papel filtro (48 h) y en suelo artificial (14 días) de acuerdo con la normatividad de la OCDE 207, en donde se obtuvieron valores de CL50 = 7.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 0.004 mg/kg y de CE50 = 9.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 0.0027 mg/kg, respectivamente.

Con los datos obtenidos de la prueba de toxicidad se evaluó la remoción del contaminante en sustrato estéril y no estéril compuesto por excreta de conejo y peat moss (15:85) durante 56 días, obteniendo las condiciones óptimas de remoción (90.86 %) en 5 días, con 0.009 mg de endosulfán lactona/kg de sustrato no estéril y 8 lombrices, con una deseabilidad del 95 %.

Por último mediante SDS-PAGE se detectó la presencia del complejo multienzimático citocromo P450 (CYP450) en la lombriz, como respuesta a la exposición a endosulfán lactona, y se evaluó su efecto a diferentes concentraciones con respecto al tiempo sobre la actividad enzimática. Se detectó la presencia de un complejo proteico con tamaño molecular de 37 a 50 KDa, similar al reportado para CYP450, cuya actividad enzimática fue mayor con respecto al control en experimentos de CL50 en papel filtro a 48 h (0.00107 mol/mg proteína min).

Esto sugiere que la presencia de compuestos estresores, como el contaminante endosulfán lactona, en el medio donde se encuentra *Eisenia fetida*, aumenta la actividad del complejo multienzimático Citocromo P450 pudiendo utilizarse como bioindicador.

PALABRAS CLAVE: Xenobiótico, toxicidad, sustrato, remoción, superficie de respuesta, citocromo P450.

ABSTRACT

Endosulfan is a synthetic organochlorine pesticide that, although its synthesis and worldwide distribution is prohibited, is still widely used in agricultural crops. The concern for its use and accumulation has increased due to its residual nature and its high level of toxicity. By enzymatic oxidative processes of the soil, endosulfan is transformed into endosulfan sulfate, and in turn into more polar and toxic compounds such as endosulfan diol, endosulfan ether and endosulfan lactone; the latter with scarce scientific evidence in relation to its toxicity and bioaccumulation in living beings.

For this reason, endosulfan lactone toxicity tests in *Eisenia fetida* were carried out in this project, determining the mean lethal concentration (LC50) and mean effective concentration (EC50) in filter paper (48 h) and in artificial soil (14 days). In accordance with the OECD 207 regulations, where values of LC50 = 7.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 0.004 mg/kg and EC50 = 9.6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and 0.0027 mg/kg, respectively, were obtained.

With the data obtained from the toxicity test, the removal of the contaminant in sterile and non-sterile substrate composed of rabbit excreta and peat moss (15:85) for 56 days was evaluated, obtaining the optimum conditions of removal (90.86 %) in 5 days, with 0.009 mg of endosulfan lactone/kg of non-sterile substrate and 8 earthworms, with a desirability of 95 %.

Finally, by means of SDS-PAGE, the presence of the multienzyme cytochrome P450 (CYP450) complex in the worm was detected in response to exposure to endosulfan lactone, and its effect was evaluated at different concentrations with respect to time on the enzymatic activity. The presence of a protein complex with a molecular size of 37 to 50 KDa was detected, similar to the one reported for CYP450, whose enzymatic activity was greater with respect to the control in LC50 experiments on filter paper at 48 h (0.00107 mol/mg protein min).

This suggests that the presence of stressors, such as the contaminant endosulfan lactone, in the medium where *Eisenia fetida* is found, increases the activity of the multienzyme complex Cytochrome P450 and can be used as a bioindicator.

KEY WORDS: Xenobiotic, toxicity, substrate, removal, response surface, cytochrome P450.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para los estudios de doctorado durante el periodo Febrero 2016 a Julio 2019. Beca No. 259185.

Al **Tecnológico Nacional de México (TecNM)** mediante el Programa de Becas para estudios de Maestría y Doctorado SES-TNM 2015, por la beca otorgada en el periodo Agosto – Diciembre 2015.

Al **Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez** por el apoyo académico e institucional brindado durante el desarrollo de la presente tesis.

Al **Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) unidad Mérida**, por permitir realizar una estancia de investigación, dirigida por la Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera.

A la **Dra. Rocío Meza Gordillo** (asesora del proyecto de investigación) por su guía y asesoramiento, por compartir su conocimiento, por su paciencia, por confiar en mí incondicionalmente y sobre todo por su amistad.

A los integrantes del comité tutorial, al **Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo**, al **Dr. Juan José Villalobos Maldonado**, al **Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli** y al **Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina** por el apoyo, guía y asesoramiento en el trascurso de la ejecución del proyecto.

A todas aquellas personas que participaron poco o mucho en la elaboración del proyecto como jóvenes de servicio social, residentes, tesis y tesis de maestría y a los laboratoristas de la institución por facilitar instalaciones y materiales adecuados.

A mi amiga **M. C. Maritza del Carmen Hernández Cruz** por su tiempo y dedicación, por su amistad incondicional y por el conocimiento transmitido.

A todos mis compañeros del Instituto (colegas) que hicieron amena la estancia y que siempre estuvieron en la mejor disposición de ayudar o aportar en algo.

A mi esposo **Lic. Guillermo Venturino Coutiño Gómez** por su paciencia, por apoyarme en todo, por animarme siempre y por ayudarme a superarme cada día.

A mis hijas, que son el motor para seguir superándome profesional y personalmente.

A mi familia por apoyarme en cada sueño cumplido y por cumplir.

Gracias!

ÍNDICE

1. Introducción

2. Antecedentes

2.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato

2.2 Extracción de compuestos organoclorados en sustrato sólido

2.3 Lombrices de tierra: *Eisenia fetida*

2.3.1 Anatomía interna de *Eisenia fetida*

2.4 Toxicidad aguda

2.5 Remoción de compuestos orgánicos persistentes (COPs)

2.6 Respuestas fisiológicas

3. Justificación

4. Objetivo general y específicos

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos específicos

5. Metodología

5.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato

5.2 Extracción de endosulfán lactona en sustrato sólido

5.2.1 Procedimiento de extracción con disolventes

5.2.1.1 Extracción con acetonitrilo

5.2.1.2 Extracción con acetato de etilo

5.2.2 Análisis por HPLC UV

5.2.3 Análisis estadístico

5.2.4 Validación de la metodología de extracción

5.3 Toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida*

5.3.1 Análisis de toxicidad aguda (OCDE-207, 1984)

5.3.1.1 Prueba en papel filtro (PPF)

5.3.1.2 Prueba en sustrato artificial (PSA)

5.3.2 Cálculo de inhibición de crecimiento (%)

5.3.3 Análisis estadístico

5.4 Remoción de endosulfán lactona en sustrato y su presencia en *Eisenia fetida*

- 5.4.1 Remoción en sustrato sólido
- 5.4.2 Presencia de endosulfán lactona en lombriz
- 5.5 Respuestas fisiológicas: citocromo P450
 - 5.5.1 Extracción de microsomas de *Eisenia fetida*
 - 5.5.2 Determinación de cantidad de proteína
 - 5.5.3 Electroforesis SDS-PAGE
 - 5.5.4 Determinación de la actividad de CYP3A4
 - 5.5.5 Cálculo de parámetros cinéticos
 - 5.5.6 Análisis estadístico

6. Resultados y discusiones

- 6.1 Características fisicoquímicas del sustrato y vermicomposta
- 6.2 Extracción de endosulfán lactona en sustrato sólido
 - 6.2.1 Extracción con disolventes
 - 6.2.2 Optimización
 - 6.2.3 Validación del método de extracción
- 6.3 Toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* y sus respuestas fisiológicas
 - 6.3.1 Determinación de CL50 y CE50 por prueba en papel filtro (PPF)
 - 6.3.2 Respuestas fisiológicas de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona por papel filtro
 - 6.3.3 Determinación de CL50 y CE50 por prueba en sustrato artificial (PSA)
- 6.4 Remoción de endosulfán lactona en sustrato sólido y su presencia en *Eisenia fetida*
 - 6.4.1 Incremento de peso de la lombriz
 - 6.4.2 Sustrato no estéril
 - 6.4.2.1 Concentración de endosulfán lactona en sustrato y su remoción
 - 6.4.2.2 Endosulfán lactona en lombriz
 - 6.4.2.3 Optimización del proceso de remoción
 - 6.4.3 Sustrato estéril
 - 6.4.3.1 Concentración de endosulfán lactona en sustrato y su remoción
 - 6.4.3.2 Endosulfán lactona en lombriz
 - 6.4.3.3 Optimización del proceso de remoción

6.4.4 Optimización y deseabilidad de remoción

6.5 Respuestas fisiológicas de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona: medición de actividad enzimática (citocromo P450)

7. Conclusiones

8. Recomendaciones y sugerencias

9. Referencias bibliográficas

10. Anexos

10.1 Cuantificación de proteína

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Variables incluidas en la remoción de endosulfán lactona
- Cuadro 2. Concentración de reactivos para la elaboración del gel de poliacrilamida
- Cuadro 3. Características fisicoquímicas del sustrato y de la vermicomposta
- Cuadro 4. Eficiencia de extracción con la metodología haciendo uso de acetonitrilo, variando el tiempo de agitación de la muestra
- Cuadro 5. Valores de parámetros de validación para el método de extracción sólido-líquido de endosulfán lactona en sustrato utilizando acetonitrilo
- Cuadro 6. CL50 y CE50 de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* por PPF a 48 h
- Cuadro 7. Parámetros cinéticos del complejo enzimático citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta a CL50 en papel filtro a 48 h
- Cuadro 8. Inhibición del crecimiento (%) de *Eisenia fetida* a 14 días expuesta a endosulfán lactona en sustrato artificial
- Cuadro 9. CL50 y CE50 de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* para PSA a 14 días
- Cuadro 10. Incremento de peso (%) de las lombrices, obtenida durante los días de muestreo.
- Cuadro 11. Incremento de peso (%) de lombrices con respecto a las concentraciones de endosulfán lactona en sustrato estéril y no estéril
- Cuadro 12. Concentración final de endosulfán lactona en sustrato y lombriz con respecto a la concentración inicial
- Cuadro 13. Concentración de endosulfán lactona en sustrato estéril conforme a la concentración inicial de endosulfán lactona
- Cuadro 14. Resultados óptimos de remoción (%) en sustrato estéril y no estéril
- Cuadro 15. Parámetros cinéticos del complejo enzimático citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta a 14 días

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Segmento de corte transversal de *Eisenia fetida* mostrando el celoma, B) Esquema que muestra los nefridios como órganos excretores de *E. fetida*

Figura 2. Estructura tridimensional de citocromo P450

Figura 3. Análisis de medias de eficiencia de extracción (%)

Figura 4. A) Superficie de respuesta estimada, B) Diagrama de Pareto estandarizada para eficiencia de extracción (%)

Figura 5. Gráfico Probit que señala el porcentaje de acumulación de A) Mortalidad para CL50 y B) Inhibición del crecimiento para CE50 en papel filtro a 48 h

Figura 6. Efectos fisiológicos de *Eisenia fetida*

Figura 7. Cantidad de proteína en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en CL50 en papel filtro a 0 y 48 h

Figura 8. Patrón electroforético de SDS-PAGE de *Eisenia fetida* expuesta a CL50 en papel filtro

Figura 9. Gráfica de concentración de sustrato y producto con respecto al tiempo en condiciones de CL50 en papel filtro con 400 mg endosulfán lactona/L y 48 h de exposición

Figura 10. Gráfico Probit de porcentaje acumulado de A) Mortalidad para CL50 y B) Inhibición del crecimiento para CE50 en PSA a 14 días

Figura 11. Transformación de metabolitos: paratión a paraoxón

Figura 12. Porcentaje de remoción de endosulfán lactona en sustrato no estéril por acción del proceso de vermicompostaje a 56 días de exposición

Figura 13. Unidad experimental sin lombrices, con formación de hongos en el día 28

Figura 14. Concentración de endosulfán lactona presente en sustrato y lombriz a lo largo de los días de muestreo

Figura 15. Aspecto del sustrato

Figura 16. Representación de la superficie de respuesta mediante el gráfico de contorno para la remoción de endosulfán lactona al día 5 en sustrato no estéril

Figura 17. Porcentaje de remoción de endosulfán lactona en sustrato estéril por acción del proceso de vermicompostaje a 56 días de exposición

Figura 18. Concentración de endosulfán lactona presente en sustrato estéril y lombriz a lo largo de los días de muestreo

Figura 19. Representación de la superficie de respuesta mediante el gráfico de contorno para la remoción de endosulfán lactona al día 14 en sustrato estéril

Figura 20. Diagrama de Pareto para el día 14 en sustrato estéril

Figura 21. Contorno de superficie de respuesta de deseabilidad para sustrato no estéril

Figura 22. Contorno de superficie de respuesta de deseabilidad para sustrato estéril

Figura 23. Cantidad de proteína en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en sustrato a 0, 3, 5, 7 y 14 días

Figura 24. Patrón electroforético de SDS-PAGE de microsomas extraídos de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en sustrato

Figura 25. Gráfica de concentración de sustrato y producto con respecto al tiempo haciendo uso de 0.004 mg endosulfán lactona/kg

Figura 26. Actividad enzimática relativa (medida con respecto al control) durante 14 días de exposición

Figura 27. Curva estándar para la determinación de proteínas

1. INTRODUCCIÓN

La FAO (2002) define a un plaguicida como “*cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier peste, enfermedad o plaga*”; dentro de esta definición se incluyen herbicidas, insecticidas y fungicidas (Damalas *et al.*, 2011).

Los plaguicidas se clasifican en función de sus características principales como la toxicidad aguda (capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud de un organismo, a través de una o múltiples exposiciones, en un periodo relativamente corto) (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico. OCDE 207, 1984), en extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, moderadamente peligrosos y ligeramente peligrosos; vida media (permanente, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes); estructura química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, etcétera) y uso (agricultura, salud pública, ganadería y cuidado de animales domésticos, mantenimiento de áreas verdes, industria, hogar, etcétera) (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los plaguicidas organoclorados son compuestos químicos sintéticos de amplio espectro ampliamente utilizados en la agricultura. Su estructura química le confiere una alta estabilidad física y química que le permiten ser insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos y grasas, por lo tanto favorecen su persistencia en el ambiente, bioacumulación por seres vivos y su lenta biodegradabilidad. Su vida media es de 5 a 30 años (persistente). A causa de su alta lipofilidad tienden a acumularse en el tejido celular subcutáneo, en la grasa de la leche materna y en la sangre (Uzcátegui *et al.*, 2011).

A partir de 2014 la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) dejó de otorgar la autorización para importar endosulfán a México con base en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) (2009), la Ley Federal del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) (2011) y el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) (2014). A partir de 2015 se canceló el registro sanitario del ingrediente activo endosulfán (COFEPRIS, 2019), sin embargo, declaró que se dejará de utilizar hasta 2016. Por lo que todavía se encuentra en el mercado y aunque existan autorizaciones de revocaciones de registros sanitarios del producto, los agricultores lo utilizan debido a su amplio espectro y efectividad en cultivos como alfalfa, algodón, apio, brócoli,

berenjena, melón, pepino, sandía, chile, fresa, frijol, papa y piña por mencionar algunos contra enfermedades y plagas como ácaros, gusanos barrenadores y chupadores.

El endosulfán es altamente tóxico para los seres humanos y para la mayoría de los animales, mostrando efectos agudos y crónicos a exposición de bajas concentraciones (10 – 160 mg de endosulfán/kg suelo) (Bejarano *et al.*, 2008; Stockholm Convention, 2009). Se prohibió debido a su carácter residual, alta toxicidad, persistencia, transporte a grandes distancias y bioacumulación en tejidos grasos (Betancurt *et al.*, 2015), por lo cual también forma parte de los Compuestos Orgánicos Persistentes (COP's) (Stockholm Convention, 2005).

El constante uso del plaguicida endosulfán genera en el suelo subproductos más dañinos como el endosulfán lactona, que se ha identificado en suelo hasta 6 años después de la primera exposición. Esta molécula se genera por la oxidación de endosulfán, teniendo una estructura polar que lo hace tóxico, persistente y bioacumulable (Betancur *et al.*, 2015).

En el suelo, suceden dos fenómenos bioquímicos importantes como lo son la absorción y la biotransformación de contaminantes que producen una variedad de respuestas fisiológicas y bioquímicas en los organismos y microorganismos que en él habitan y que proporcionan una medida de su efecto tóxico (Gómez, 2012). *Eisenia fetida* es un modelo de estudio ampliamente utilizado para evaluar efectos tóxicos de diversos contaminantes en suelo entre ellos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) (Nam *et al.*, 2015), plaguicidas organofosforados como clorpirifos y malation (Gómez, 2012) y endosulfán (Yuk *et al.*, 2013). Al estar presente el endosulfán lactona en el suelo, se infiere que lombrices como *Eisenia fetida*, podrían ayudar al proceso de biorremediación por medio del vermicompostaje, como ha sido reportado por varios autores en la remoción y biorremediación de COP's (Thangadurai *et al.*, 2014; Villalobos-Maldonado *et al.*, 2015; Odukkathil *et al.*, 2016).

Por lo que el objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de endosulfán lactona sobre *Eisenia fetida* en el proceso de vermicompostaje, tomando en cuenta sus respuestas toxicológicas (toxicidad aguda) y fisiológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato

Las características de un sustrato son el resultado de sus propiedades físicas y químicas, las cuales dependen de la estructura de los componentes y vienen definidas por la proporción entre partículas de tamaño grande y pequeño, el conjunto de poros, los minerales que contengan, así como la microfauna que habita en él. Existe una gran diversidad de sustratos para la elaboración de compostas y para la alimentación de lombrices haciendo vermicomposta. Algunos materiales poseen mejores características de alimento para *Eisenia fetida*, como lo son las excretas de diversos animales, entre los que encontramos las excretas de conejo.

Dentro de las características de los sustratos, se tiene a la materia orgánica que es el conjunto de residuos orgánicos de origen animal o vegetal, en diferentes etapas de descomposición y que se compone principalmente de dos fracciones: 1) La fracción lábil que mantiene las características químicas del material de origen (carbohidratos, lignina, celulosa, ácidos grasos, etcétera.) y 2) La fracción húmica constituida por ácidos fúlvicos y húmicos (Martínez *et al.*, 2008).

Por otro lado, la proporción carbono/nitrógeno (C/N), indica la potencialidad del sustrato para transformar la materia orgánica en nitrógeno mineral. Si la proporción C/N es baja (<10), se favorece la descomposición bacteriana y por tanto una mayor proliferación de estas, hay falta de energía en el sistema y alta concentración de nitrógeno mineral; por el contrario, cuando la proporción C/N es alta (>25), se favorece una descomposición fúngica, mayor proliferación de hongos y es un suelo con exceso de carbono y de energía (Vanegas, 2008). Para estudios de biorremediación y remoción de contaminantes, es necesario tener un sustrato con valores de C/N alrededor de 20 – 30, ya que favorece el sistema debido a la descomposición bacteriana y fúngica y un mejor aprovechamiento de la materia orgánica en proceso de descomposición.

2.2 Extracción de compuestos organoclorados en sustrato sólido

Los métodos analíticos de extracción de plaguicidas han sido muy usados para determinar la cantidad residual de plaguicidas en sedimentos (Gfrerer y Lankmayr, 2005), suelo (Rashid *et al.*, 2010) o en frutas y hortalizas (Aysal *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2010). Algunos de ellos necesitan de equipos especiales muy sofisticados de alto costo y gran consumo de energía como el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Masiá *et al.*, 2015), que además requieren de un procedimiento de purificación antes de ser detectados por alguna técnica cromatográfica (Fernández *et al.*, 2008) y que generan residuos inclusive más tóxicos que los productos iniciales. Es por ello que es necesario retomar los principios básicos de las principales técnicas utilizadas como la extracción mediante disolventes (Li *et al.*, 2009) y asistida por ultrasonido (Tor *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2011; Tiwari y Guha, 2013) en las que, a pesar de requerir mayor volumen de disolvente, el tiempo de extracción es corto, hace uso de equipos sencillos y de bajo costo, haciendo un procedimiento más práctico, además de que las eficiencias de extracción alcanzan hasta un 96 % en suelos (Li *et al.*, 2009).

Existen estudios en donde extraen endosulfán de suelo haciendo uso de diversos disolventes, como lo reportado por Siddique *et al.*, (2003) en donde evaluaron el uso de varios disolventes y sus mezclas como metanol, acetonitrilo y acetona:acetonitrilo y agitación rotatoria para extraer endosulfán de suelo, encontrando mayor eficiencia con el uso de acetonitrilo (>90 %); Tiwari y Guha (2013) extrajeron endosulfán y sus metabolitos haciendo uso de acetato de etilo seguido de un tratamiento con ultrasonido y centrifugación, obteniendo una eficiencia de extracción para endosulfán α de 79 %, endosulfán β de 77 % y endosulfán lactona de 81 %; Ali *et al.*, (2014), hicieron uso de una mezcla de diclorometano y acetona con agitación ultrasónica y tuvieron rendimiento de 94 % para endosulfán α y 103 % para endosulfán β .

Aunque se encontró un estudio (Li *et al.*, 2009) para extraer endosulfán lactona, el método de extracción no fue el principal objetivo de estudio de la investigación y la matriz de suelo fue diferente al sustrato utilizado en esta investigación; además de que la metodología reportada de extracción no fue validada, por lo que fue necesario replicar la metodología de extracción de endosulfán lactona en sustrato sólido (peat moss y excreta de conejo) y validarla.

2.3 Lombrices de tierra: *Eisenia fetida*

La lombriz *Eisenia fetida* es una especie epigea, vive en la superficie del suelo y se alimenta de materia orgánica en proceso de descomposición (restos vegetales, heces de animales, etcétera); esta especie tiene un tamaño de 6–9 cm de longitud (Ccasani y Poma, 2012), uniformemente pigmentada y con altas tasas reproductivas y metabólicas que le permiten adaptarse a las condiciones ambientales variables de la superficie del suelo; presentan una alta tasa de consumo, digestión y asimilación de la materia orgánica. La temperatura óptima de desarrollo oscila entre 15 y 26 °C y una humedad de 70 a 85 %; su ciclo de vida abarca de 45 a 51 días; son hermafroditas y necesitan al menos dos lombrices para reproducirse, de tal manera que generan un capullo o huevecillo cada 21 días, del que nacen de 4 a 6 lombrices (Domínguez y Gómez-Brandon, 2010).

Las lombrices de tierra se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, generalmente húmedo y permeable, reduce la materia orgánica, por lo que favorece una mejor mezcla de la fracción orgánica y mineral, aumentando así la fertilidad del suelo; las lombrices también intervienen en la aireación y filtración del agua en el suelo, por medio de surcos o galerías que ellas mismas realizan, proporcionando materia orgánica disponible para otros organismos, interactuando con ellos formando agregados (Brito-Vega, 2009; Domínguez y Pérez-Losada, 2010).

Además aceleran la mineralización de nitrógeno a partir de la materia orgánica, pero el efecto depende de la especie y sus interacciones con la biota de otros suelos, las características del suelo y la ubicación de la materia orgánica (Blouin *et al.*, 2013).

El uso de lombrices para la restauración o remediación de suelos contaminados puede basarse en varias estrategias diferentes dependiendo de la naturaleza de la contaminación. Las lombrices podrían introducirse en el suelo para estimular la población microbiana, lo que a su vez aceleraría la degradación de contaminantes orgánicos. El metabolismo del suelo ingerido también puede conducir a la mineralización directa de contaminantes orgánicos. Tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos, la actividad de lombrices puede reducir la cantidad de sorción en las partículas del suelo a través de la digestión de materia orgánica, modificaciones

de la química del suelo o ambos, lo que aumenta la disponibilidad de contaminantes y reduce las escalas de tiempo requeridas para la bioremediación (Blouin *et al.*, 2013).

Las lombrices de tierra están expuestas a muchos compuestos diferentes en su hábitat natural. Dado que los plaguicidas se aplican mediante atomización de una formulación diluida o como gránulos en la superficie del suelo y las lombrices se alimentan de hojas o materia orgánica que se encuentra de igual manera en la superficie del suelo, éstas se encuentran más expuestas a plaguicidas (Katagi *et al.*, 2015). Se ha descubierto que las especies de lombrices de tierra, como *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris*, y *Allobophora chlorotica*, eliminan contaminantes del suelo, como metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Tejada y Masciandaro, 2011; Dendooven *et al.*, 2011). Sin embargo, es necesario realizar estudios de toxicidad de estos compuestos en *Eisenia fetida* para plantear una estrategia adecuada de biorremediación, ya que podría ayudar en la remoción de plaguicidas y sus subproductos, como el endosulfán lactona. Aunado a eso, se podría identificar si hay un efecto en su metabolismo al hacer mediciones de actividad enzimática (aumento o disminución) con respecto a aquellas lombrices sin contaminante y de esa manera identificar si *Eisenia fetida* podría ser usada como indicador de suelos contaminados con endosulfán lactona.

2.3.1 Anatomía interna de *Eisenia fetida*

El cuerpo de *E. fetida* presenta una segmentación interna y externa, teniendo en la pared del cuerpo de afuera hacia adentro, cutícula, epidermis donde se producen una secreción mucosa, capas musculares y el celoma (figura 1A) que contiene el líquido celómico extendiéndose a lo largo del animal y envolviendo al canal alimenticio, actuando como un sistema de transporte y facilitando la distribución de nutrientes, metabolitos y gases respiratorios, pudiendo almacenar productos de desechos para su posterior excreción (Claros, 2015). El líquido celómico puede ser expulsado por medio del ano o de los nefridios (figura 1B) que se encuentran a lo largo del cuerpo de la lombriz, como respuesta al estrés derivado de factores bióticos o abióticos (temperatura menor de 20 °C o mayor a 32 °C; pH menor a 6 y mayor a 8, prevenir la desecación, promover la respiración cutánea y proteger contra depredadores (Iparraguirre, 2016). Los

nefridios son órganos que se encuentran en cada segmento del cuerpo de la lombriz, funcionando como órganos excretores.

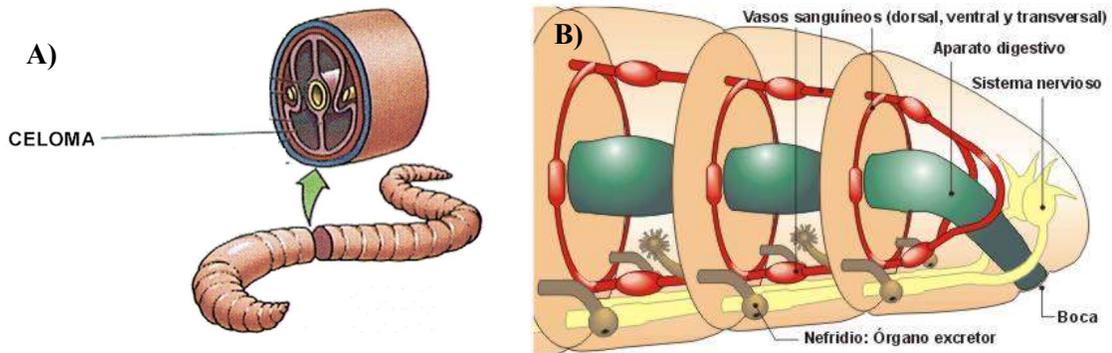


Figura 1. A) Segmento de corte transversal de *E. fetida* mostrando el celoma. B) Esquema que muestra los nefridios como órganos excretores de *E. fetida*

El líquido celómico también participa en la respuesta inmune en *E. fetida*, teniendo capacidad fagocítica y bactericida, encapsulando sustancias ajenas al cuerpo de la lombriz en donde actúan enzimas que participan en las reacciones de la fase I y fase II del proceso de biotransformación de xenobióticos como el complejo multienzimático del citocromo P450 (Gómez, 2012; Iparraguirre, 2016).

2.4 Toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad son bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota; generalmente se usa tejido vivo, organismo, o grupo de organismos. Estos bioensayos consisten en la exposición de grupos de organismos, a concentraciones conocidas del tóxico por un tiempo determinado, registrando los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados para su posterior análisis estadístico (Gómez, 2014). Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento y peso, entre otros.

La concentración letal media (CL50) es una medida para evaluar el efecto tóxico de sustancias peligrosas al medio ambiente, que significa la concentración de la sustancia medida a la cual el 50 % de los organismos mueren en un periodo de exposición determinado, mientras

la concentración efectiva media (CE50) es la concentración a la cual el 50 % de los organismos presentan algún efecto ante la exposición de un compuesto (Repetto *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2012).

Las pruebas de toxicidad con las lombrices de tierra roja californiana son relativamente simples y baratas de realizar y los resultados de la prueba se pueden utilizar no sólo para determinar la toxicidad del suelo, sino también para determinar la absorción de los contaminantes del suelo por las lombrices de tierra y la posibilidad de movimiento de los contaminantes en la cadena alimentaria.

Los organismos modelo más utilizados en este tipo de ensayos toxicológicos son peces o lombrices (*Eisenia fetida* o *Eisenia andrei*), debido a la interacción de ambos con el agua y el suelo y a su gran capacidad de metabolizar compuestos halogenados y organofosforados tales como plaguicidas (Dendooven *et al.*, 2011).

Las lombrices de tierra junto con macro y microorganismos, forman la fauna más importante del suelo, ayudando a degradar la materia orgánica, formar y poner a disposición nutrimentos esenciales para el crecimiento de plantas (Dominguez *et al.*, 2010; Gaete *et al.*, 2010), y son utilizadas de manera habitual en el proceso de vermicompostaje de residuos orgánicos sólidos generando abono para remediar suelos contaminados (Blouin *et al.*, 2013), para remover compuestos orgánicos persistentes (Villalobos-Maldonado *et al.*, 2015), remover algunos derivados de petróleo (Coutiño-González *et al.*, 2010) y como bioindicador de toxicidad (Castrillo *et al.*, 2013).

Un estudio relacionado con la determinación de CL50 y CE50 de plaguicidas en diversos organismos fue el reportado por Gupta *et al.*, (2011), quienes expusieron a *Eisenia fetida* a endosulfán y otros plaguicidas, determinándose el valor de CL50 mediante la metodología descrita por la OCDE 207 (1984) con ligeras modificaciones, encontrando una CL50 para endosulfán de 0.002 mg/kg en 96 h, y concluyen que el endosulfán fue ecotoxicológicamente más peligroso que el resto de los plaguicidas estudiados debido a que la CL50 fue menor que la dosis agrícola recomendada aplicada en suelos (2.5 g de endosulfán/ha de suelo) equivalente a 0.025 mg de endosulfán/kg de suelo. A esa concentración, el plaguicida comienza a causar la muerte en el 50 % de los organismos probados.

Por otro lado, Alonzo (2013), evaluó la CL50 de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán siguiendo la metodología reportada por OCDE 207 (1984) y un análisis Probit, encontrando una CL50 de 0.14 mg de endosulfán/kg de sustrato artificial, encontrando una disminución en la cantidad de materia orgánica con respecto al control en aquellos experimentos donde se tenían las lombrices y el plaguicida, indicando que la presencia de plaguicidas sintéticos afecta la actividad biológica de las lombrices. En concentraciones menores a las tóxicas, existen amplios reportes en donde *Eisenia fetida* favorece la remoción de compuestos orgánicos e inorgánicos en suelo.

2.5 Remoción de compuestos orgánicos persistentes (COPs)

La remoción de contaminantes es una técnica de biorremediación de suelos y agua que se ha utilizado principalmente para cambiar de lugar al contaminante en cuestión, del medio donde se encuentra, obteniendo así matrices más limpias y aptas para la agricultura, comercio, construcción, etcétera.

Las lombrices como *Eisenia fetida*, ayudan a la remoción de compuestos orgánicos persistentes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Contreras-Ramos *et al.*, 2009) y los bifenilos policlorados (BPC) (Villalobos-Maldonado *et al.*, 2015), alimentándose de la materia orgánica que contiene el suelo y que tiene inmerso el contaminante, mejorando la estructura y aireación del suelo (Dendooven *et al.*, 2011).

El empleo de sistemas de adsorción y absorción en el proceso del vermicompostaje, aumenta la interacción del contaminante con el sustrato y la lombriz, de tal manera que se mejoran los procesos de remoción.

Sin embargo, no existen reportes de remoción de endosulfán lactona o alguno de los subproductos derivados de endosulfán, haciendo uso de la lombriz *Eisenia fetida*, ni de las respuestas que ésta presenta ante la exposición.

2.6 Respuestas fisiológicas

Las respuestas fisiológicas de los seres vivos, vienen dadas por respuestas generadas ante un estrés externo que puede ser de tipo ambiental, afectando ciertos órganos del sistema inmunológico y por ende macromoléculas de éste, como algunas proteínas o enzimas que se sobre expresan o disminuyen su actividad por algún factor externo estresor.

Un ejemplo de enzimas que se activan en presencia de contaminantes o xenobióticos ambientales, son las enzimas del complejo multienzimático del citocromo P450, localizadas en el retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias (González, 2014), las cuales contienen monooxigenasas que participan en la defensa de condiciones estresantes con el fin de tolerarlos, metabolizarlos o eliminarlos (Coutiño, 2011).

Dentro de las isozimas que componen al sistema enzimático del citocromo P450, se encuentra la subunidad CYP3A4, la cual se reporta como una enzima que genera una respuesta ecotoxicológica de contaminantes ambientales (Cao *et al.*, 2012).

El complejo multienzimático citocromo P450 tiene en su estructura una combinación de regiones α -hélice y hojas plegadas (láminas β) que rodean al grupo hemo, dejando disponible los sitios de unión o anclaje a la membrana y a diversos sustratos, como se observa en la figura 2.

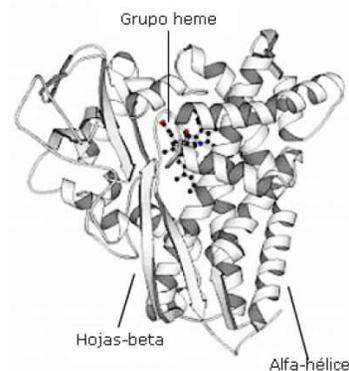


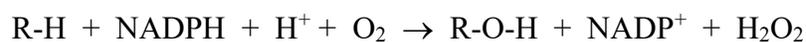
Figura 2. Estructura tridimensional del citocromo P450 (González, 2014)

Debido a que los xenobióticos no forman parte de la dieta de organismos como las lombrices, no son utilizados como nutrimentos y por lo tanto no se incorporan a las rutas bioquímicas del metabolismo intermediario. Sin embargo, son utilizados como sustrato para el citocromo P450.

El sistema de monooxigenasa del citocromo P450 es una gran familia de hemoproteínas y desempeña un papel vital en la desintoxicación y biotransformación de muchos compuestos xenobióticos. Algunos de estos compuestos tienen naturaleza lipofílica, que puede atravesar las membranas biológicas, unirse a otras estructuras y de esta manera interferir en otros procesos metabólicos. De tal manera que se lleva a cabo en dos fases:

- 1) Fase I: Los xenobióticos son transformados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles debido a que se forman grupos funcionales polares nuevos como carboxilo, hidroxilo o amina.
- 2) Fase II: Intervienen transferasas que actúan sobre los metabolitos generados en las reacciones de fase I o xenobióticos, que mediante reacciones de conjugación con moléculas endógenas de carácter polar, facilitan el transporte por el organismo y de esta manera su excreción.

La reacción principal que se lleva a cabo para la transformación de los xenobióticos a compuestos más polares y fácilmente excretables, haciendo uso del sistema multienzimático del citocromo P450 es:



En donde se generan especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además del radical libre sustrato (R^\bullet) el que al unirse a un radical hidroxilo, genera finalmente el producto hidroxilado (ROH) (González, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Alrededor de 50 millones de hectáreas de suelo se pierden anualmente por toxificación (envenenamiento de suelos) por sustancias químicas derivadas de plaguicidas, fertilizantes, residuos industriales y residuos domésticos vertidos en drenajes. Después de un tiempo de recibir estas sustancias los suelos pierden su fertilidad, pues se destruye su microfauna (Dellsperger, *et al.*, 2003).

Uno de los plaguicidas más usados en la agricultura es el endosulfán; un plaguicida organoclorado que ha sido evaluado por el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) como tóxico, persistente y bioacumulable. Además del endosulfán con sus isómeros α y β , el ecosistema está expuesto a sus derivados (algunos más tóxicos) producto de la oxidación: endosulfán sulfato, endosulfán diol, endosulfán éter y endosulfán lactona.

De este último (endosulfán lactona) no se tiene evidencia científica de evaluación de toxicidad y su efecto en la ecología del suelo. Sin embargo, empleando modelos biológicos como la lombriz *Eisenia fetida* expuesta a este derivado de plaguicida, se podría tener evidencia de toxicidad en suelo.

Aunque están descritos los mecanismos generales de respuesta de *Eisenia fetida* ante xenobióticos, se desconoce el efecto fisiológico que genera endosulfán lactona en este modelo y si hay alguna relación de la concentración y tiempo de exposición, con la magnitud de la respuesta. Además, la identificación del aumento de actividad del CYP450 a la exposición, permitiría utilizar este complejo de este compuesto enzimático como un bioindicador de la contaminación en suelos.

4. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de endosulfán lactona sobre las respuestas fisiológicas y toxicológicas de *Eisenia fetida* en sustrato.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Evaluar la toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* mediante un bioensayo de exposición aguda a 48 horas y 14 días, para la determinación de CL50 y CE50.

4.2.2 Maximizar la remoción de endosulfán lactona en sustrato por *Eisenia fetida* mediante un diseño de superficie de respuesta, optimizando la remoción.

4.2.3 Evaluar el efecto de la concentración de endosulfán lactona sobre las respuestas fisiológicas de *Eisenia fetida*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Caracterización fisicoquímica del sustrato

El sustrato se constituyó de 85 % de peat moss y 15 % de excreta de conejo (Villalobos-Maldonado *et al.*, 2015). Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron pH, humedad, nitrógeno inorgánico, nitrógeno total, densidad real y materia orgánica (NOM-021-RECNAT-2000).

5.2 Extracción de endosulfán lactona en sustrato sólido

Se usó endosulfán lactona (100 mg) como estándar analítico con pureza >99 % de la marca Sigma Aldrich ®. El acetonitrilo y acetato de etilo usados fueron grado HPLC marca Fermont®. El sustrato fue secado, molido y tamizado a una apertura de malla de 0.2 mm y 0.5 mm. Se usó un sonicador marca Cole-Parmer a 700 kW (Cole-Parmer), un agitador rotatorio, una centrífuga marca Eppendorf y un cromatógrafo de líquidos (HPLC) modelo Flexar (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA) con detector UV/VIS y automuestreador. Para elaborar la curva patrón de endosulfán lactona se utilizaron soluciones de 0.15–1.05 mg/L; para la validación del método se incluyeron concentraciones de 10–100 mg/L asegurando un coeficiente de correlación (R^2) mayor al 98 %.

5.2.1 Procedimiento de extracción con disolventes

5.2.1.1 Extracción con acetonitrilo

Se empleó la metodología descrita por Li *et al.*, (2009), con ligeras modificaciones. Brevemente, se colocó sustrato (5, 10 y 15 g) con un tamaño de partícula de 0.2 y 0.5 mm, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se contaminó con 0.5 y 1.0 mg/L de endosulfán lactona y se adicionó acetonitrilo (50, 75 y 100 mL), se mezcló en un agitador rotatorio por una hora a 175 rpm, para su posterior centrifugación a 4000 rpm por 15 min a 20 °C. El sobrenadante se decantó y se dejó concentrar en una campana de extracción por 24 h hasta alcanzar 1 mL; el concentrado

se filtró y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC UV).

5.2.1.2 Extracción con acetato de etilo

Se siguió la metodología de Tiwari y Guha (2013) con ligeras modificaciones. Brevemente, se colocaron 5 g de sustrato con tamaño de partícula de 0.2 y 0.5 mm, en tubos falcon de 50 mL y se agregó acetato de etilo a dos proporciones diferentes muestra:acetato de etilo (1:2 y 1:4.5); se contaminó el sustrato con endosulfán lactona a 0.5 y 1.0 mg/L. Esta mezcla se llevó a tratamiento ultrasónico a 40 kHz, variando el tiempo (10, 20 y 30 min), se centrifugó a 4000 rpm por 15 min y el sobrenadante se separó para concentrarse durante 24 h en una campana de extracción hasta 1 mL, el concentrado se filtró para su análisis por HPLC UV.

5.2.2 Análisis por HPLC UV

El método de análisis fue reportado por Li *et al.*, (2009). Brevemente, se usó una columna marca ZORBAX ODS (4.6 x 250 mm x 5 µm), con fase móvil acetonitrilo-agua (80:20), flujo de 1 mL/min, en donde el tiempo de retención de endosulfán lactona fue de aproximadamente 5.3 min y tiempo total del método de 10 min. La longitud de onda de máxima absorción fue de 217 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL.

5.2.3 Análisis estadístico

Las extracciones se hicieron utilizando diseños factoriales completos con tres repeticiones y con una $p < 0.05$. Para optimizar se usó un diseño de superficie de respuesta factorial 3^2 , analizando resultados en el software estadístico Stat graphics Centurion XVI®.

5.2.4 Validación de la metodología de extracción

Para la validación se utilizaron cinco parámetros: 1) Límite de cuantificación (LC) que es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente para un nivel de confianza (95 %)

a niveles trazas (<100 mg/kg); 2) Límite de detección (LD) que es la menor cantidad que puede ser medida por el equipo analítico; 3) Intervalo de linealidad que se determina con base en las concentraciones con las que se construyó la curva patrón; 4) Coeficiente de variación (<20 %) y 5) Precisión (δ) que es la proximidad entre valores de una magnitud obtenidos por mediciones replicadas, descrita generalmente por la desviación estándar (Espín *et al.*, 2010; OAA.DC-LE-05, 2013). La metodología fue validada usando suelo agrícola contaminado con una concentración conocida de endosulfán lactona, se replicaron las condiciones óptimas obtenidas y se probó de igual manera en suelo agrícola que tenía aproximadamente cuatro años de haber sido expuesto a endosulfán.

5.3 Toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida*

La lombriz *Eisenia fetida* fue obtenida del rancho Luanda, localizado en el municipio de Ocozacoautla de Espinoza, Chiapas, México. Las lombrices fueron mantenidas en excreta de conejo y peat moss (1:1) durante dos meses antes de la prueba. El endosulfán lactona (Pestanal® grado HPLC) fue adquirido de Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) con 99.1 % de pureza. La solución patrón de endosulfán lactona fue preparada en acetonitrilo a una concentración final de 100 mg/L.

5.3.1 Análisis de toxicidad aguda (OCDE-207, 1984)

5.3.1.1 Prueba en papel filtro (PPF)

Las concentraciones de endosulfán lactona utilizadas fueron 0.1, 1, 10, 100 y 1000 mg/L como primer ensayo. Posteriormente se utilizaron concentraciones de 100, 400, 700, 1000, 1300 y 1600 mg/L. El volumen adecuado de cada solución fue agregado a cajas Petri de vidrio de 8.5 cm de diámetro y área de contacto de 56.74 cm² que contenían papel filtro de poro medio; como controles se tuvieron cajas Petri con papel filtro impregnado con acetonitrilo. El disolvente utilizado se dejó evaporar por una hora en una campana de extracción y posteriormente se rehidrató el papel filtro agregando 1 mL de agua destilada a cada caja Petri junto con una lombriz con clitelo desarrollado que previamente se lavó con agua destilada, se secó con papel absorbente y se dejó en contenedores de plástico por 3 horas para vaciar su tracto

gastrointestinal. Cada tratamiento se hizo con 10 repeticiones. Todas las cajas Petri se mantuvieron en una incubadora marca Novatech a 25 °C en completa oscuridad durante 48 h. Pasado este tiempo, se evaluó la mortalidad (%) en la lombriz para determinar la CL50 y la inhibición de crecimiento (%) para CE50, además de los daños físicos observados. Las lombrices fueron consideradas muertas cuando presentaban poco movimiento y no respondían a un estímulo mecánico definido.

5.3.1.2 Prueba en sustrato artificial (PSA)

El sustrato artificial se preparó mezclando los ingredientes: 10 % de peat moss, 20 % de arcilla, 70 % de arena industrial y 1 g de CaCO₃ para ajustar el pH a 7.0. Las concentraciones evaluadas fueron 0 (control), 0.1, 1 y 10 mg de endosulfán lactona/L, es decir, 0.0011, 0.11 y 11 mg/Kg. Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 1 L adicionados con 500 g de sustrato artificial y adicionado con el volumen correspondiente de la solución de endosulfán lactona para alcanzar la concentración deseada, mezclando perfectamente y ajustando al 35 % de humedad. Diez lombrices adultas y con clitelo desarrollado, previamente lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y pesadas, se colocaron en los frascos de vidrio y se taparon con tela de algodón para permitir el flujo de aire, ajustando la humedad a 35 % cada 7 días. Todos los frascos estuvieron sometidos a periodos de luz/oscuridad de 12/12 h a 25–28 °C. Cada concentración tuvo cuatro réplicas. Se evaluó mortalidad (para CL50) e inhibición del crecimiento (%) (para CE50) a los 14 días, sin adición de alimento, como lo reporta Shi *et al.*, (2015) y Li *et al.*, (2015).

5.3.2 Cálculo de inhibición de crecimiento (%)

La inhibición del crecimiento es un parámetro que se calcula haciendo uso de los pesos iniciales y finales de la lombriz (Jovana *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015)

$$IC = \frac{Po - Pt}{Po} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

IC = Inhibición del crecimiento; Po = Peso inicial (g); Pt = Peso final total (g)

5.3.3 Análisis estadístico

Los resultados de ambas pruebas se evaluaron mediante el análisis Probit (Gupta *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2015; García *et al.*, 2016; Rico *et al.*, 2016) utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI. El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar, teniendo como variable de respuesta la mortalidad de las lombrices para la CL50 e inhibición del crecimiento (%) para la CE50.

5.4 Remoción de endosulfán lactona en sustrato y su presencia en *Eisenia fetida*

Las unidades experimentales fueron frascos de vidrio de 1 L con 50 g de sustrato (85 % peat moss y 15 % excreta de conejo). El sustrato fue no estéril y estéril, el cual se esterilizó de acuerdo a la metodología modificada de Peñaloza *et al.*, (2013). Brevemente, la esterilización se realizó en una autoclave a 121 °C a 15 lb de presión por 20 minutos, tres días consecutivos, cada 24 h. La humedad se ajustó al 70 % con agua destilada y se usaron tres concentraciones de endosulfán lactona (mg/kg), determinadas por la CL50 en sustrato artificial (OCDE 207, 1984). La prueba se realizó durante 56 días (dos ciclos reproductivos de la lombriz) y la remoción y presencia de endosulfán lactona se midió a los días 0, 1, 3, 5, 7, 14, 28 y 56.

Se usó un diseño de superficie de respuesta 3^2 con 2 repeticiones, dando un total de 18 unidades experimentales; evaluado con el programa estadístico Stat Graphics versión XVI. Las variables del experimento están dadas en el cuadro 1.

Cuadro 1. Variables incluidas en la remoción de endosulfán lactona.

Factores	Niveles	Variable de respuesta
Endosulfán lactona (mg/kg)	0.001	Remoción de endosulfán lactona (%)
	0.004	
	0.009	
Lombriz	0	
	5	
	10	

Al ser 18 unidades experimentales y 8 días de muestreo, se tuvieron un total de 144 unidades experimentales para evaluar la remoción y presencia de endosulfán lactona en el sistema de vermicomposteo en sustrato estéril y no estéril.

5.4.1 Remoción en sustrato sólido

Para cada día de muestreo se tuvieron 18 unidades experimentales, de las cuales se separó el sustrato y las lombrices. La remoción estuvo determinada con la ecuación (2) (Islam *et al.*, 2009):

$$\text{Remoción (\%)} = \left\{ \frac{[\text{Endosulfán lactona}]_{\text{inicial}} - [\text{Endosulfán lactona}]_{\text{final}}}{[\text{Endosulfán lactona}]_{\text{inicial}}} * 100 \right\} \quad \text{Ec. (2)}$$

En cada día de muestreo se realizó la extracción del plaguicida en sustrato de acuerdo a lo descrito por Li *et al.*, (2009) con ligeras modificaciones (12 g de sustrato con 75 mL de acetonitrilo, agitación de 2 h y 175 rpm de agitación) para su análisis en cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a UV (HPLC UV).

Debido a que son 8 días de muestreo, se tienen 8 valores óptimos de remoción para cada sustrato (estéril y no estéril), por lo que se realiza una optimización de respuesta múltiple para obtener la deseabilidad, la cual se utiliza para obtener información cualitativa y respuestas cuantitativas mediante la transformación simple y rápida de diferentes variables de respuestas sobre una medida (Islam *et al.*, 2009). La deseabilidad se encuentra en una escala de 0 a 1 (Kuhn, 2016), fácilmente transformable a porcentaje.

Para conocer las concentraciones finales de endosulfán lactona encontradas en sustrato y lombriz, se hizo la cuantificación mediante HPLC anteriormente descrita y evaluada mediante ANOVA multifactorial.

5.4.2 Presencia de endosulfán lactona en lombriz

Las lombrices separadas del sustrato se lavaron con agua destilada, se secaron con una toalla absorbente y se pesaron, para evaluar el incremento de peso, el cual se determinó con la ecuación (3) y se analizó estadísticamente mediante un ANOVA multifactorial:

$$\text{Incremento de peso (\%)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} * 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Se siguió la misma metodología de extracción del contaminante en lombriz y se determinó la concentración que contiene ésta mediante HPLC-UV.

5.5 Respuestas fisiológicas: citocromo P450

Para evaluar la actividad del citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona, ésta se expuso a tres condiciones: la CL50 en papel filtro (PPF) a 48 h, condiciones provenientes de la prueba en sustrato artificial (CL50 PSA) y condiciones provenientes de la optimización del proceso de remoción. Posterior a estos tres tratamientos, se tomaron las lombrices para la extracción de los microsomas y se procedió de acuerdo a la metodología que se describe a continuación.

5.5.1 Extracción de microsomas de *Eisenia fetida*

Se siguió la metodología de Cao *et al.*, (2012) con ligeras modificaciones. Brevemente, las lombrices se inmovilizaron en una solución de glicerol enfriada con hielo (glicerol al 20 % en agua destilada) durante 10 minutos, se transfirieron a una gasa y se lavaron con una solución de KCl (0.15 mol/L) hasta que el flujo fue incoloro. Las lombrices lavadas se homogenizaron en vórtex por 5 min en 5 mL de solución tampón de homogeneización (250 mmol/L de sacarosa, 50 mmol/L Tris pH 7.5, 1 mmol/L ditioneitol (DTT) y 1 mmol/L EDTA) en baño de hielo. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 15000 x g por 30 min. El sobrenadante se recogió y se centrifugó de nuevo a 150000 x g por 1.5 h haciendo uso de una ultracentrífuga para la obtención de microgránulos. Los microgránulos obtenidos de microsomas, se resuspendieron con 2 mL de solución tampón (250 mmol/L de sacarosa, 50 mmol/L Tris pH 7.5, 1 mmol/L ditioneitol (DTT), 1 mmol/L EDTA y 20 % glicerol) para obtener soluciones microsómicas que sirvieron para la determinación de la actividad y detección por electroforesis de poliacrilamida de la subunidad CYP3A4. Todo lo anterior fue realizado a 4 °C.

5.5.2 Determinación de cantidad de proteína

El contenido de proteína en los microsomas extraídos fue determinado mediante la metodología descrita por Folin-Lowry (Layne, 1957).

5.5.3 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó con base en la metodología de Laemmli (1970) y Li *et al.*, (2006), con ligeras modificaciones. Brevemente, el gel de separación se prepara al 15 % y el de apilamiento al 4 % como lo indica el cuadro 2. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis mini Protean (Biorad,USA). El gel se tiñó con azul de Coomassie al 1 %. Las condiciones de electroforesis fueron las siguientes: 80 V por 60 min y 50 V por 60 min utilizando un buffer de corrida 1X (Tris/Glicina/SDS). Los patrones obtenidos se compararon con el estándar (marcador molecular).

Cuadro 2. Concentraciones de reactivos para la elaboración del gel de poliacrilamida

	Gel de separación (15 %)	Gel de apilamiento (4 %)
H ₂ O	4.2 mL	5.6 mL
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1.0)	3.75 mL	975 µL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.5 mL	-----
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-----	2.5 mL
SDS 10 %	100 µL	100 µL
Persulfato de amonio 1 %	500 µL	500 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C por 5 min en una solución Laemmli 3X.

Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomasie (2 %), ácido acético (10 %) y metanol (25 %) por 1 h. Para desteñir y eliminar el color azul de fondo se utilizó una solución de ácido acético (10 %) y metanol (25 %) por aproximadamente 5 h.

5.5.4 Determinación de la actividad de CYP3A4

La actividad de CYP3A4 se determinó como actividad de la 6 β -hidroxitestosterona teniendo como sustrato a la testosterona, siendo ésta la más utilizada al tener disponible los hidroxilos para el acoplamiento de la enzima (Zhang *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2012). El sistema de incubación (200 μ L) se mantuvo a pH 7.4 con tampón de fosfato de potasio 0.1 M que contiene 60 μ M de testosterona, 3.3 mM MgCl₂, 0.2 – 0.5 mg/mL de proteína microsómica, 3.3 mM de glucosa-6-fosfato y 0.4 U/mL de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El control negativo se preparó sin proteína microsomal. La mezcla se pre incubó a 30 °C durante 5 min. La reacción se inició mediante la adición de 1 mM de NADPH (sirviendo como donador de H⁺) y se terminó con la adición de 100 μ L de metanol enfriado con hielo después de una incubación de 30 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 min y la alícuota del sobrenadante se inyectó directamente para su análisis en HPLC UV.

Las condiciones de HPLC fueron las siguientes: columna de fase reversa C18 (5 μ m, 4.6 mm ID x 250 mm); fase móvil A de metanol-agua-acetonitrilo (39:60:1, v/v) y fase móvil B de metanol-agua-acetonitrilo (80:18:2); flujo de 0.7 mL/min por 30.5 min a una proporción de 50 % A y 50 % B y 52 min a una proporción de 30 % A y 70 % B; picos cromatográficos de testosterona y 6 β -hidroxitestosterona se cuantificaron a 254 nm.

5.5.5 Cálculo de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos se evaluaron mediante el método integral gráfico (Rodríguez & Valdivia, 2005), debido a que el mecanismo no se modifica durante el transcurso de la reacción y por lo tanto el orden de ésta es constante. El método se basó en la disminución de la concentración del sustrato o la aparición del producto en función del tiempo, teniendo en el eje y (eje de las ordenadas) a $t/\ln(S_0/S)$ y en el eje de las x (eje de las abscisas) a $(S_0-S)/\ln(S_0/S)$; posteriormente se trazó una gráfica de estas funciones, realizando una regresión lineal. En donde la ecuación de la recta viene dada por:

$$\frac{(S_0-S)}{\ln\left(\frac{S_0}{S}\right)} = -Km + Vmax \frac{t}{\ln\left(\frac{S_0}{S}\right)} \quad \text{Ec. (4)}$$

En donde:

S_0 = Sustrato inicial o al tiempo cero (μmol)

S = Sustrato final o al tiempo indicado (μmol)

K_m = Afinidad de la enzima por el sustrato (μmol)

V_{max} = Velocidad máxima de crecimiento ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

t = Tiempo (min)

5.5.6 Análisis estadístico

Los niveles de testosterona y 6β -hidroxitestosterona en microsomas extraídos de la lombriz se analizaron por triplicado y fueron comparados en los organismos con diferentes tratamientos (concentración y días de exposición) mediante un análisis de varianza multifactorial, analizado con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Características fisicoquímicas del sustrato y vermicomposta

En el cuadro 3 se presenta los valores de los parámetros de la caracterización fisicoquímica del sustrato y de la vermicomposta.

Cuadro 3. Características fisicoquímicas del sustrato y de la vermicomposta

Parámetro	Sustrato	Vermicomposta	Valor de referencia	Referencia bibliográfica
Humedad (%)	36 +/- 5.6	92 +/- 2.6	-----	NOM-021-RECNAT-2000
pH	6.9 +/- 0.08	7.3 +/- 0.02	Suelo neutro = 6.6 a 7.3	
Nitrógeno inorgánico (mg/kg)	48 +/- 1.9	56 +/- 5.8	Suelo alto en nitrógeno inorgánico = 40 a 60 mg/kg	
Nitrógeno total (%)	0.25 +/- 0.002	0.30 +/- 0.008	Suelo alto en nitrógeno = 0.15 a 0.25 % Suelo muy alto en nitrógeno = >0.25 %	
Densidad real (g/cm ³)	1.05 +/- 0.006	1.19 +/- 0.006	Suelo arcilloso = 1.0 a 1.19 g/cm ³	
Materia orgánica ^a (%)	7.3 +/- 0.34	10.9 +/- 0.26	Suelo medio = 6.1 a 10.9 %	
Carbono orgánico (%)	7.48 +/- 0.26	14.15 +/- 0.69		
C/N	29.92	47.17	C/N > 30 alto contenido de carbono	Durán y Henríquez, 2007

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. ^aLa materia orgánica fue analizada con la metodología de Walkley y Black, en la que se detecta entre un 70 y 84 % del carbono orgánico total, por lo que es necesario introducir un factor de corrección de 1.298.

El sustrato utilizado fue clasificado como suelo neutro, arcilloso y alto contenido en nitrógeno total, por lo que se puede comparar con los valores de referencia descritos en el cuadro 3 para suelo.

Como se puede observar en el cuadro 3, el sustrato seco tiene menos humedad en relación con la vermicomposta, debido a que el sustrato se ajusta al 70 % de humedad para permitir que la lombriz tome los nutrientes necesarios de este y tenga mejor movilidad. En cuanto al pH, tanto el sustrato como la vermicomposta, presentan pH neutro o ligeramente básico, es decir, las lombrices pueden estabilizar el pH del alimento que consumen, debido a que secretan carbonato cálcico para producir una digestión alcalina (Durán y Henríquez, 2007).

Por otra parte, en suelos con presencia de lombrices se ha encontrado una mayor capacidad de intercambio catiónico: las heces producidas por las lombrices se encuentran muy enriquecidas en iones Ca, Mg, P y K lo cual enriquece la fertilidad del suelo (Lemtiri *et al.*, 2014; Iparraguirre, 2016).

La vermicomposta presenta alto contenido de nitrógeno (0.30 %), lo que se refleja como un indicador de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo para las plantas y se relaciona con la obtención teórica de los valores de carbono orgánico (14.15 %) como relación carbono/nitrógeno (C/N) que indica la potencialidad del suelo para transformar la materia orgánica en nitrógeno mineral.

Durán y Henríquez (2007), reportaron una relación C/N de 10 a 25 en vermicomposta hecha por *Eisenia fetida* con lo cual indica que es una vermicomposta estable, con la proporción suficiente para el crecimiento de plantas; una proporción por arriba del 25 sería inestable y no cumpliría con el funcionamiento adecuado.

Por otro lado, la relación C/N del sustrato fue de 29.92 y de la vermicomposta de 47.17. La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) (1996), recomienda el uso de suelos con una relación C/N de 50 a 100 para la biodegradación de suelos contaminados con

hidrocarburos, debido a que tienen mayor cantidad de carbono que ayuda de manera eficiente a la asimilación de contaminantes por los microorganismos del suelo (Viñas, 2005).

La vermicomposta utilizada tiene una relación C/N cercano a lo requerido por la EPA, y se compone de 85 % peatmoss y 15 % excreta de conejo, por lo que sugiere que es una opción viable para el uso de biorremediación de suelos contaminados.

6.2 Extracción de endosulfán lactona en sustrato sólido

6.2.1 Extracción con disolventes

De acuerdo con el análisis estadístico de los resultados de la metodología de extracción con acetonitrilo, la cantidad de sustrato, el volumen de acetonitrilo y el tamaño de partícula tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la variable de respuesta ($p < 0.05$). Las condiciones con la mejor eficiencia de extracción (50-60 %) fueron 5 g de sustrato, 75-100 mL de acetonitrilo y 0.2 mm de tamaño de partícula, como se muestra en la figura 3.

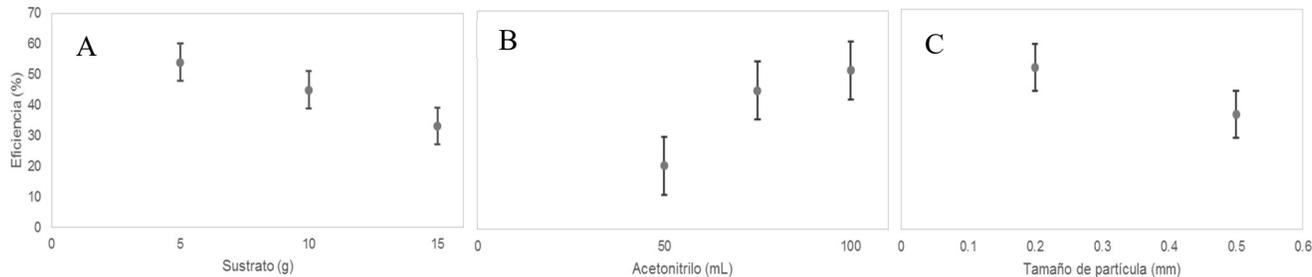


Figura 3. Análisis de medias de eficiencia de extracción (%) en (A) sustrato (g), (B) acetonitrilo (mL) y (C) tamaño de partícula (mm) sobre la metodología de extracción con acetonitrilo, analizado con Tukey HSD ($p < 0.05$)

En cuanto a la metodología de extracción haciendo uso de acetato de etilo, al analizar los resultados del diseño experimental se observó que ningún factor tuvo efecto sobre la variable de respuesta, y presentó una eficiencia de extracción de endosulfán lactona del 35 al 40 %; por lo que se descartó el uso de este disolvente para la metodología de extracción.

El proceso de extracción con acetonitrilo fue más eficiente que el utilizado con acetato de etilo debido a las características físicas de estos dos disolventes, es decir, la constante dieléctrica

es mayor en acetonitrilo comparada con la del acetato de etilo (37.5 y 6.0, respectivamente) (Masschelein-Kleiner, 2004), convirtiéndolo en un disolvente más polar. Ambos disolventes son apróticos polares, es decir, no contienen hidrógenos ácidos en su estructura por lo que no pueden formar interacciones por puente de hidrógeno y la interacción con la molécula de endosulfán lactona es mediante interacciones electrostáticas, que son más fuertes con el acetonitrilo, por tener mayor constante dieléctrica, generándose mayor efecto de solvatación, fenómeno que se lleva a cabo en dos fases: 1) Las moléculas del soluto (endosulfán lactona) son rodeadas por las moléculas del disolvente (acetonitrilo), 2) Las partículas de soluto se separan de la matriz y se disuelven en la solución, de modo que en el proceso de extracción, una vez que se obtiene el sobrenadante, el endosulfán lactona está presente en el disolvente que después es eliminado para posteriormente realizar la cuantificación del soluto en HPLC-UV.

Con base en los resultados de ambas metodologías (acetonitrilo y acetato de etilo), se procedió a optimizar la variable de respuesta utilizando acetonitrilo como disolvente debido a que se obtuvo mayor eficiencia de extracción.

6.2.2 Optimización

Para este proceso, se usó un diseño de superficie de respuesta factorial 3^2 , en donde los factores evaluados fueron la cantidad de sustrato (5, 10 y 15 g) y la cantidad de acetonitrilo (50, 75 y 100 mL), con la misma variable de respuesta, manteniendo constante el tamaño de partícula (2 mm). Los resultados óptimos obtenidos del análisis en el software estadístico fueron 12 g de sustrato, 100 mL de acetonitrilo y eficiencia de extracción del 77 %, como se aprecia en el gráfico de superficie de respuesta (figura 4A) y el gráfico de Pareto (figura 4B).

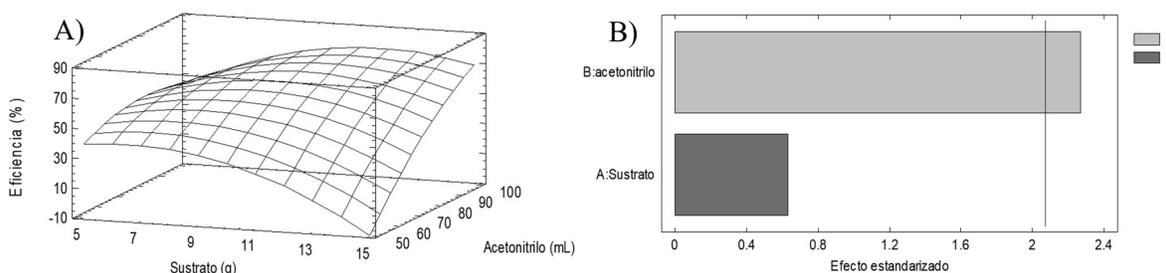


Figura 4. A) Superficie de respuesta estimada, B) Diagrama de Pareto estandarizado para eficiencia de extracción (%)

En el diagrama de Pareto, se aprecia que la cantidad de acetonitrilo tiene influencia positiva sobre la eficiencia de extracción del compuesto de interés, sucediendo lo contrario con la cantidad de sustrato, observándose que a mayor cantidad de acetonitrilo y menor cantidad de sustrato, se obtiene una mayor eficiencia.

Replicando el experimento utilizando las condiciones óptimas que genera el programa Stat Graphics con 12 g de sustrato, 75 mL de acetonitrilo y 1 mg/L de endosulfán lactona, y variando el tiempo de agitación, se obtuvieron los resultados descritos en el cuadro 4 en donde se observa que con 120 min de agitación se obtiene la mayor eficiencia de extracción (97 %).

Cuadro 4. Eficiencia de extracción con la metodología haciendo uso de acetonitrilo, variando el tiempo de agitación de la muestra.

Tiempo de agitación (min)	Eficiencia de extracción (%)
60	47 b
90	45 b
120	97 a
DMS	3.5

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado, analizado mediante un ANOVA simple con una $p < 0.05$.

6.2.3 Validación del método de extracción

Las condiciones óptimas para la extracción de endosulfán lactona en sustrato haciendo uso de la metodología de extracción sólido-líquido con acetonitrilo, se utilizaron para realizar la validación y los parámetros cuantificados se muestran en el cuadro 5, observándose que el valor

del coeficiente de correlación fue mayor a 0.997 dando una excelente linealidad en el amplio rango de concentraciones estudiadas. Con base en lo descrito por Currie (1995), el límite de cuantificación debe ser 3.33 veces el límite de detección, situación que se cumple en esta validación ya que $LC = 0.15 \text{ mg/L}$ y $LD = 0.045 \text{ mg/L}$.

Cuadro 5. Valores de parámetros de validación para el método de extracción sólido-líquido de endosulfán lactona en sustrato, utilizando acetonitrilo.

Parámetro	Valor
Ecuación	$Y = 16025 X$
Intervalo de linealidad (mg/L)	0.15 - 100
Concentraciones usadas (mg/L)	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	0.999
LD (mg/L)	0.045
LC (mg/L)	0.15
Eficiencia de recuperación (%)	97
Coeficiente de variación	16.68
Precisión	+/- 13.77

La metodología de extracción con acetonitrilo se probó en un suelo agrícola contaminado artificialmente en una concentración de 0.58 mg endosulfán lactona/kg suelo, obteniéndose una eficiencia de extracción del 36 %. Por otro lado, la metodología de extracción validada se probó en suelo agrícola que fue expuesto a endosulfán hace aproximadamente cuatro años y se encontró presente endosulfán lactona a una concentración de 0.065 mg endosulfán lactona/kg suelo. Probando así la persistencia de endosulfán lactona en suelo.

6.3 Toxicidad de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* y sus respuestas fisiológicas

Las evaluaciones de toxicidad de endosulfán lactona en *E. fetida*, se llevaron a cabo mediante pruebas en papel filtro y pruebas en sustrato artificial (OCDE 207, 1984). De tal manera que las pruebas en papel filtro pueden examinar específicamente la exposición dérmica del plaguicida disuelto en agua, mientras que las pruebas de toxicidad del sustrato artificial también evalúan la ingesta alimentaria, minimizando las interacciones existentes con el suelo natural como lo son el pH, contenido de materia orgánica, carbono orgánico disuelto en agua, fenómeno de histéresis y degradación microbiana (Katagi *et al.*, 2015).

6.3.1 Determinación de CL50 y CE50 por prueba en papel filtro (PPF)

La CL50 fue evaluada por el análisis estadístico Probit, que es un tipo de regresión utilizado para analizar las variables de respuesta binomial. La medida probó la respuesta de un organismo alterado por varias concentraciones del producto químico en cuestión y comparó las concentraciones en las que se encontró una respuesta. La relación entre la respuesta y las concentraciones produce una forma sigmoide, sin embargo, el análisis Probit permite transformar el sigmoide a una forma lineal y evaluar su regresión, obteniendo así un valor cuantitativo que representa la CL50 en un rango de confiabilidad estadística de 95 % (Vincent 2010), lo cual se aprecia en la Figura 5.

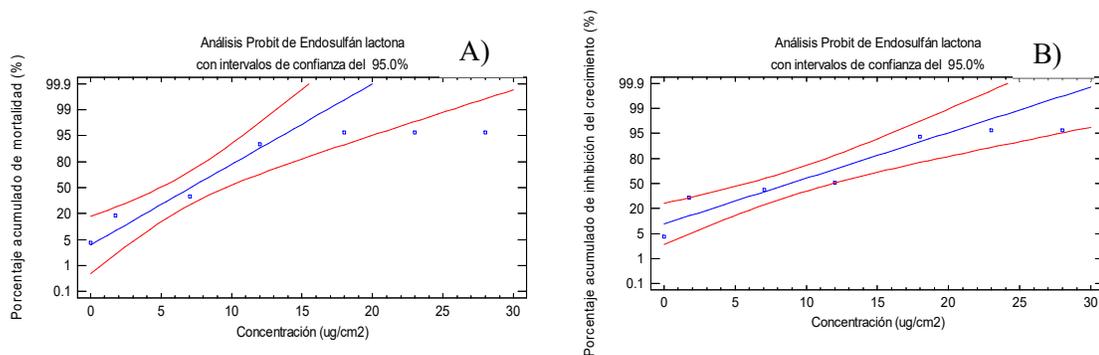


Figura 5. Gráfico Probit que señala el porcentaje de acumulación de A) Mortalidad para CL50 y B) Inhibición de crecimiento para CE50 en papel filtro a 48 h. $p < 0.05$

De tal manera que como resultado de la figura 5, se obtiene el cuadro 6 en donde se presentan los valores máximos y mínimos de cada determinación, es decir, las cifras en paréntesis indican el rango mínimo y máximo en el cual se encuentra la CL50 y CE50.

Cuadro 6. CL50 y CE50 de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* para PPF a 48 h

Compuesto	CL50 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	CE50 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
Endosulfán lactona	7.10 (4.90 – 9.60)	9.60 (7.00 -12.30)

Los valores fueron obtenidos mediante la prueba de máxima verosimilitud. $p < 0.05$

Según los valores de CL50 de Roberts y Dorough (1984) obtenidos para PPF, los plaguicidas se clasifican como supertóxicos ($< 1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), extremadamente tóxicos ($1-10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), muy tóxicos ($10-100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), moderadamente tóxicos ($100 - 1000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y relativamente no tóxicos ($> 1000 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Tras esta clasificación, el endosulfán lactona estudiado en este proyecto, se clasifica como extremadamente tóxico ($7.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, equivalente a 400 mg/L).

La CE50 es la concentración en donde se empieza a observar algún efecto sobre la lombriz; se puede evaluar con respecto a la inhibición del crecimiento, reproducción (De Silva et al., 2010) o formación de huevecillos durante el tiempo en que se sometió el contaminante al organismo (Brown et al. 2004; García et al. 2016). Para este caso se realizó haciendo uso de la inhibición del crecimiento (%) y como se aprecia en los resultados para endosulfán lactona, según el límite inferior de CE50 ($7.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), a esta concentración comienza a haber un efecto físico notable en *Eisenia fetida*, lo cual también se puede apreciar en la figura 6, así como los efectos agudos ocasionados por contacto a través de la piel de *E. fetida* debido a las diferentes concentraciones de los compuestos. En la figura 6A y 6B, la lombriz está viva, con alargamiento de la parte posterior al clitelo, presenta además cortes segmentados y excesivo movimiento al menor contacto.

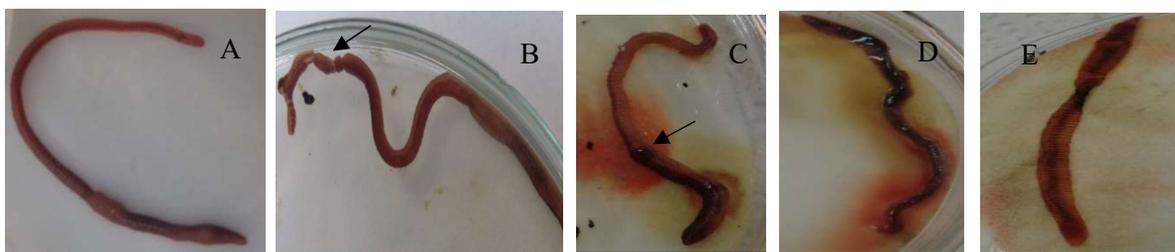


Figura 6. Efectos fisiológicos en *Eisenia fetida*. (A) Alargamiento de la parte posterior al clitelo. (B) Cortes segmentados en la parte posterior de la lombriz (a 400 mg/L). (C) Formación de protuberancias después del clitelo y desangrado (a 700 mg/L). (D) Aplanamiento total (a 1000 mg/L). (E) Degeneración de la lombriz dejando solo su piel (a 1600 mg/L).

Según Roberts y Doroug (1984), conforme pasa el tiempo de exposición, aumentan los efectos de manera significativa, de tal manera que éstos comienzan con enrollamiento y liberación del fluido celómico, siguiendo con rigidez y contractura, que aumentan conforme pasan las horas de exposición, seguido de encogimiento por segmentos, que van de 1 a 5 segmentos a lo largo del cuerpo de la lombriz (deteniendo la locomoción), finalizando con ablandamiento, poco tono muscular y muerte.

Saxena *et al.*, (2014) compararon la toxicidad de cuatro plaguicidas en *Eisenia fetida* y *Metaphire postuma* y describen que la concentración de los plaguicidas es dependiente del porcentaje de mortalidad, incrementando conforme aumenta la concentración y que las lombrices exhiben daños progresivos como enrollamiento, liberación del fluido celómico, inflamaciones segmentarias, constricciones, degeneración y muerte.

Contracción del músculo, rigidez e hinchazón del cuerpo, se observan cuando *E. fetida* es sometida a concentraciones de toxicidad aguda de plaguicidas organoclorados, compuestos organofosforados, carbamatos y piretroides (Katagi *et al.*, 2015). Daños similares encontraron Babic *et al.*, (2016) evaluando por contacto a *E. fetida* expuesta durante 48 h con lodos de depuración con alta carga de compuestos orgánicos.

Esto debido a que en pruebas con papel filtro, el contacto con el plaguicida es mayor y la manera en que se difunde o se expone el plaguicida es por medio de su piel o dermis (Saxena *et al.*, 2014), encontrándose en ella nefridios que absorben directamente al plaguicida, afectando el sistema nervioso, el sistema digestivo y la locomoción (Iparraguirre 2016). Cuando se absorben tóxicos mediante la piel, éstos se unen a proteínas transportadoras (permeasas) que

permiten el paso de estos tóxicos hacia dentro de la membrana plasmática en donde forman vesículas resistentes que se adhieren a membranas lipoides, los cuales requieren de una transformación química para su excreción en la que se introducen grupos polares para atravesar la membrana mediante transporte pasivo, liberarlos y excretarlos al medio para que los microorganismos del sustrato lo aprovechen como alimento (Marshall 1985; Gómez 2012)

Una evaluación histopatológica hecha por Saxena *et al.*, (2014) revela que la membrana cuticular, la epidermis y los músculos circulares y longitudinales, se desintegraron completamente, lo que produjo sangrado, constricción, fragmentación del cuerpo y muerte.

Según Lin *et al.*, (2012) las alteraciones que sufre la lombriz al contacto con cualquier contaminante o compuesto orgánico dañino es debido al estrés, sobre todo del tipo oxidativo, liberando enzimas para su protección como la catalasa o la super óxido dismutasa, como lo demostraron al evaluar los efectos bioquímicos del triclosán sobre la lombriz detectando el aumento de la concentración de estas enzimas. Al existir un exceso de plaguicida en la prueba por contacto, el estrés que sufre la lombriz se observa además, con inflamación, sangrado y hasta la muerte.

El primer contacto del plaguicida con la lombriz en pruebas con papel filtro es por medio de su piel, es decir, por medio de proteínas - enzimas y lípidos que se encuentran en la pared membranal de las células epiteliales, pudiendo causar una desestabilización en las estructuras de estas moléculas permitiendo un transporte activo del plaguicida hacia dentro de las células (Saxena *et al.*, 2014; Katagi *et al.*, 2015), teniendo un exceso de plaguicida y causando la muerte celular.

Resultados similares se observan en este trabajo en la figura 6C, 6D y 6E. A baja toxicidad (200 mg/L) apenas se ve afectada la supervivencia de la lombriz, sin embargo una alta toxicidad (700 mg/L) causa efectos crónicos debido a la acumulación de estas sustancias en el organismo de la lombriz (Li *et al.*, 2015).

El aumento o disminución de actividad enzimática se evaluó en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en CL50 en pruebas con papel filtro.

6.3.2 Respuestas fisiológicas de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona por papel filtro

En la figura 7 se aprecia la cantidad de proteína en *E. fetida* expuesta a 400 mg de endosulfán lactona/L (CL50) en papel filtro al tiempo 0 y a las 48 horas, no habiendo diferencia estadística significativa comparado con el control en ambos casos. Sin embargo, hubo diferencia estadística significativa si se comparan las concentraciones al tiempo 0 y a las 48 horas, aumentando la concentración de proteína. A mayor tiempo de exposición, estos resultados sugieren que el estrés causado solamente por el confinamiento en las cajas Petri, sin ningún alimento para *E. fetida*, es suficiente para generar mayor cantidad de proteínas.

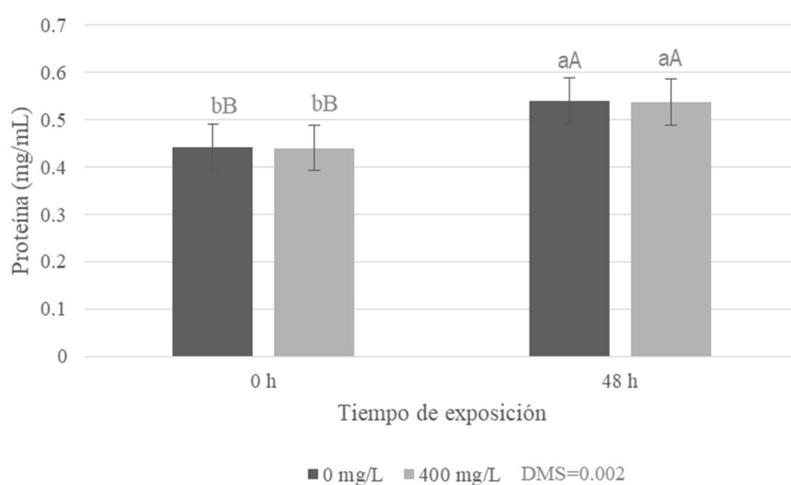


Figura 7. Cantidad de proteína en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en CL50 en papel filtro a 0 y 48 horas. Letras minúsculas indican diferencia entre tiempo y letras mayúsculas indican diferencia entre concentraciones. $p < 0.05$

Para conocer el peso molecular de la proteína cuantificada por el método de Lowry, se realizó un análisis por SDS-PAGE (figura 8), para el control negativo (CL50(1) y CL50(2)), y para los experimentos contaminados (CL50(3) y CL50(4)), en donde se observa que no hubo diferencia entre el control negativo y los contaminados ya que se encontró proteínas de peso similar, aproximadamente 48 KDa, peso molecular dentro del rango descrito para el CYP450 (Ll *et al.*, 2006).

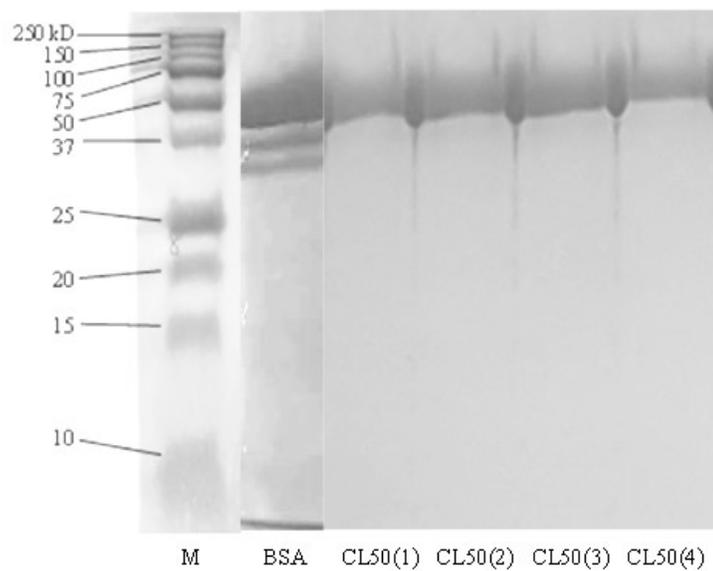


Figura 8. Patrón electroforético de SDS-PAGE de microsomas extraídos de *Eisenia fetida* expuesta a CL50 en papel filtro. M = marcador molecular, BSA = albúmina sérica bovina, CL50(1) = blanco a 0 horas de exposición, CL50(2) = blanco a 48 horas de exposición, CL50(3) y CL50 (4) = lombriz expuesta a 400 mg endosulfán lactona /L por 48 horas.

Cao *et al.*, (2012) evaluaron la actividad de las subunidades EROD y CYP3A4 del citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta a diferentes concentraciones de metales pesados en papel filtro a 48 h, encontrando que la subunidad EROD puede ser usada como biomarcador de la contaminación de metales pesados en suelo y no así la subunidad CYP3A4 debido a que EROD se muestra más sensible a la presencia de metales pesados. Con respecto a EROD, se encontró poca información para invertebrados como las lombrices debido a su difícil medición ya que interfiere con algunos pigmentos propios de la lombriz, sin embargo en este estudio se eliminó la hemoglobina haciendo lavados continuos, para poder identificarla.

En pruebas con papel filtro, se ve activado el complejo multienzimático del citocromo P450, existiendo mayor disponibilidad del contaminante por contacto en la dermis de la lombriz y en menor tiempo, pero en los controles negativos, en donde no está presente el contaminante, el CYP450 se activa por las condiciones estresantes de falta de agua, alimento, poco espacio y la lombriz se encuentra aislada, es decir, factores abióticos diferentes al factor estresante del contaminante.

Para poder conocer de manera cuantitativa al citocromo P450 encontrado en los microsomas de la lombriz, se evaluó la actividad enzimática de ésta en una subunidad denominada CYP3A4, teniendo como sustrato testosterona y como producto a 6 β -hidroxitestosterona (6BHT) (Zhang *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Los resultados se observan en la figura 9, en donde se aprecia como disminuye el sustrato y aumenta el producto, siguiendo un comportamiento de cinética enzimática habitual. La mayor producción de 6 β -hidroxitestosterona fue de 0.46 μ mol y se observa al minuto 35, haciendo énfasis en que esta producción empezó a partir del minuto 10; se mantuvo constante y sin diferencia estadística significativa al sustrato hasta el minuto 20, en donde se aprecia un ligero descenso en su concentración.

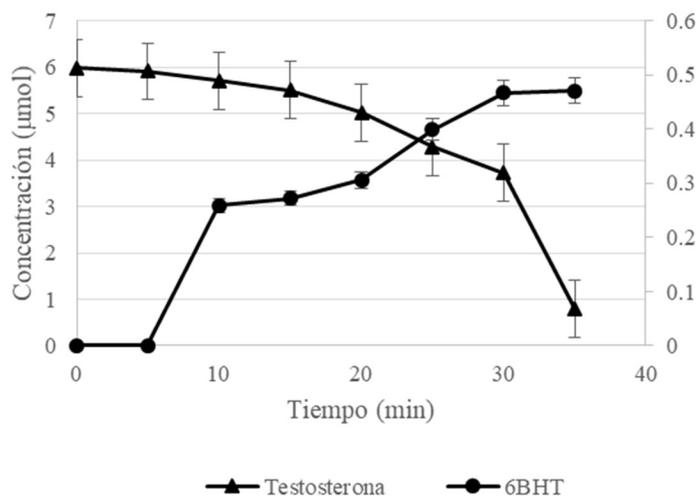


Figura 9. Gráfica de concentración de sustrato y producto con respecto al tiempo en condiciones de CL50 en papel filtro con 400 mg de endosulfán lactona/L y 48 h de exposición. Las determinaciones se hicieron por triplicado. $p < 0.05$.

Con los datos anteriores y haciendo uso del método integral gráfico (Ec. 4) se calcularon los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}), plasmados en cuadro 7, observándose que el valor de K_m (2747 nmol) con respecto al control ($K_m = 1036$ nmol) disminuye indicando una mayor afinidad de la enzima por el sustrato; la actividad enzimática es mayor cuando *Eisenia fetida* está expuesta al contaminante, debido a que el contaminante juega un papel estresante en las lombrices, haciendo que se aumente la actividad del complejo multienzimático. De esta manera

también se explica por qué aún en los blancos se tiene respuesta en la determinación cuantitativa realizada por electroforesis (figura 8).

Cuadro 7. Parámetros cinéticos del complejo enzimático citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta a CL50 en papel filtro a 48 h

Muestra	Vmax (nmol/min)	Km (nmol)	Actividad enzimática (mol testosterona/mg proteína min)	Actividad enzimática relativa*
Control	13.9 b	1036 a	0.00019 b	
CL50 PPF	79.3 a	2747 b	0.00107 a	5.71
DMS	1.23	256	0.00021	

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se analizaron mediante anova simple con una $p < 0.05$. *La actividad enzimática se expresa como relativa con respecto al control.

Cao *et al.*, (2012) observan similar comportamiento cuando *Eisenia fetida* es expuesta a cobre a concentraciones arriba de 100 mg/L con respecto al control, disminuyendo su actividad enzimática medida como actividad relativa de 4.4 a 2.0 %, posiblemente por una inhibición del complejo multienzimático del citocromo P450 por el sustrato.

Achazi *et al.*, (1998) evaluaron la presencia del complejo multienzimático en *Eisenia fetida* expuesta a diversos hidrocarburos policíclicos aromáticos como el pireno y encontraron actividad enzimática de 0.26 a 1.05 pmol/mg de proteína min, observando mediante la técnica SDS-PAGE proteínas de peso molecular de 54, 56 y 58 KDa identificada como la subunidad CYP1A.

Con estos resultados se demuestra que la lombriz *Eisenia fetida* al estar expuesta al subproducto endosulfán lactona exhibe enzimas como las del complejo multienzimático citocromo P450, que utiliza en su defensa a estresores ajenos al medio en donde se encuentra, aumentando su actividad enzimática, funcionando éste como activador.

6.3.3 Determinación de CL50 y CE50 por prueba en sustrato artificial (PSA)

Los compuestos tóxicos afectan a la lombriz por contacto a través de la piel (Díaz *et al.*, 2012), incluso si este compuesto está en un sustrato. El cuadro 8 muestra los resultados de inhibición del crecimiento en PSA, donde se encontró diferencia estadística entre las

concentraciones de cada compuesto, incluso en controles de disolvente (acetonitrilo). La inhibición del crecimiento sugiere que pocos nutrientes del sustrato fueron suficientes para la supervivencia de las lombrices, pero insuficientes para su crecimiento y desarrollo (Wu *et al.*, 2011). Es notable que cuanto mayor sea la concentración del contaminante, mayor fue la inhibición del crecimiento, lo que indica que este parámetro puede ser un buen indicador del estrés químico. El valor del 100 % de inhibición ocurre en una concentración más alta de endosulfán lactona.

Cuadro 8. Inhibición del crecimiento (%) de *Eisenia fetida* a 14 días de exposición a endosulfán lactona en sustrato artificial.

Concentración (mg/kg)	Inhibición del crecimiento (%) con endosulfán lactona
0 (agua)	11.59 b
0 (acetonitrilo)	15.75 c
0.0011	6.64 a
0.11	98.88 d
11	100 e
DMS	0.16

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado, analizadas mediante ANOVA simple. $p < 0.05$

Brown *et al.*, (2004) observaron una reducción significativa en el crecimiento de la lombriz de tierra *Lumbricus rubellus*, expuesta a pireno. Por otra parte, Wu *et al.*, (2011), observó características de crecimiento similares usando fenantreno en *Eisenia fetida*, y mencionó que dicho compuesto inhibe el crecimiento de la lombriz, posiblemente relacionado con su estrategia para sobrevivir de manera natural, minimizando el consumo de alimentos para evadir los contaminantes.

La CL50 y CE50 evaluada para la prueba en sustrato artificial, se pueden apreciar en el cuadro 9 y en la figura 10. Las concentraciones reportadas son usadas como referencia para procesos de remoción en sustrato, haciendo uso de *Eisenia fetida*. Gupta *et al.*, (2011) sometieron a *Eisenia fetida* a endosulfán por 96 horas y encontraron una CL50 de 0.002 mg/kg. Por otro lado, Wang *et al.*, (2012) sometieron a *E. fetida* al plaguicida acetoclor por 14 días

encontrando una CL50 de 283 mg/kg, mostrando así una tolerancia más alta a compuestos clorados.

Cuadro 9. CL50 y CE50 de endosulfán lactona en *Eisenia fetida* por PSA a 14 días

Compuesto	CL50 (mg/kg)	CE50 (mg/kg)
Endosulfán lactona	0.004 (0.003 -0.005)	0.003 (0.002 – 0.004)

Los valores fueron obtenidos mediante la prueba de máxima verosimilitud. $p < 0.05$

En la figura 10, se puede apreciar el gráfico derivado del análisis Probit, que contiene una gráfica lineal para la obtención de la CL50.

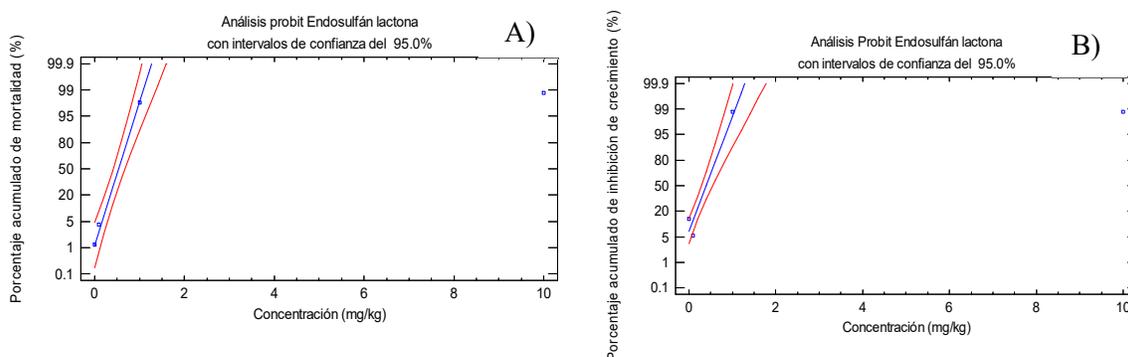


Figura 10. Gráfico Probit de porcentaje acumulado de A) Mortalidad para CL50 y B) Inhibición de crecimiento para CE50 en PSA a 14 días.

Este tipo de gráficos son útiles para conocer las relaciones concentración–respuesta de organismos expuestos a sustancias peligrosas y dan una relación cuantificable de concentración.

Como se puede observar, para endosulfán los valores de CL50 y CE50 son menores en PSA que en PPF, indicando que la exposición dérmica provocaron mayor toxicidad aguda. Valores de CL50 tomados de ambas pruebas para piretroides y otros plaguicidas organofosforados, indican que los valores menores de CL50 en PSA con relación a los encontrados en PPF, pueden deberse a menor disponibilidad por adsorción del sustrato, degradación rápida del compuesto en el sustrato o mayor desintoxicación metabólica en la lombriz a través de lo consumido en su alimento. Sin embargo es necesario tomar en cuenta que en la transformación metabólica donde generalmente decrece la concentración del plaguicida, se forman metabolitos que podrían ser más tóxicos (Katagi *et al.*, 2015), por ejemplo, el oxón de un plaguicida organofosforado

(paratión a paraoxón) (Figura 11) (Stenersen 1979), formando enzimas oxigenasas provenientes de los microorganismos del suelo o de la lombriz, que ayudan a este proceso de transformación metabólica.

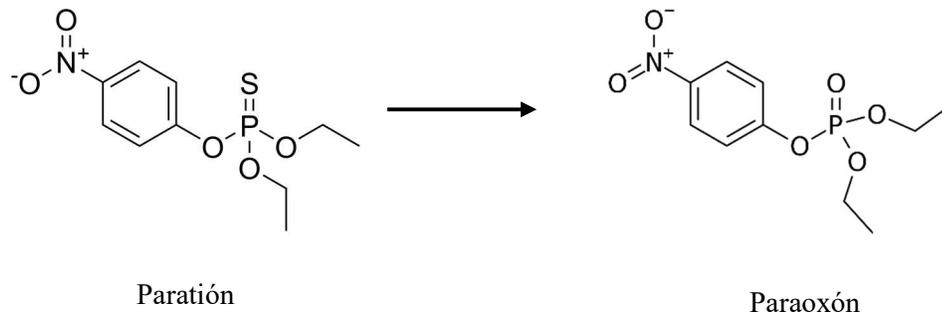


Figura 11. Transformación de metabolitos: paratión a paraoxón (Stenersen 1979)

6.4 Remoción de endosulfán lactona en sustrato sólido y su presencia en *Eisenia fetida*

Se estableció el experimento de remoción en sustrato estéril y no estéril, para poder observar la influencia de los microorganismos del sustrato, que junto con la lombriz generan mayores porcentajes de remoción (Contreras-Ramos *et al.*, 2009) y así evaluar de manera cualitativa la diferencia entre ambas condiciones.

6.4.1 Incremento de peso de la lombriz

Se midió el incremento de peso de la lombriz haciendo uso de los pesos iniciales y finales del conjunto de lombrices utilizadas en cada unidad experimental. En el cuadro 10, se observan los resultados de incremento de peso (%) obtenido durante los días de muestreo del sistema sustrato-lombriz-contaminante, en sustrato estéril y no estéril.

Cuadro 10. Incremento de peso (%) de las lombrices, obtenida durante los días de muestreo.

DIA	Incremento de peso (%)			
	Sustrato No Estéril		Sustrato Estéril	
	5 lombrices	10 lombrices	5 lombrices	10 lombrices
0	0 d	0 e	0 c	0 c
1	9.32 d	14.46 e	-18.26 c	15.09 c
3	27.16 d	38.41 de	40.12 bc	46.03 c
5	72.96 cd	91.13 d	39.52 bc	39.33 c
7	102.79 c	70.90 d	63.61 b	67.28 bc
14	331.52 b	232.33 b	155.45 a	139.59 a
28	564.29 a	326.21 a	213.11 a	176.42 a
56	369.49 b	176.96 c	93.73 b	118.98 ab
DMS	74.12	53.01	60.38	59.49

El método empleado es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. $p < 0.05$. Diferentes letras indican que se encontró diferencia estadística significativa entre los días de muestreo.

Se puede observar que el mayor incremento de peso (564.29 %) fue en condiciones de sustrato no estéril a los 28 días con 5 lombrices y no se encontró diferencia estadística significativa con respecto al día 56, pero si se encontró con respecto a los días restantes. La misma condición del mayor incremento de peso se encuentra también con 5 lombrices en sustrato estéril, teniendo diferencia estadística significativa con los días restantes; teniendo al día 1 un valor negativo (-8.26) debido a la disminución de peso. Con 10 lombrices en sustrato no estéril se obtiene el incremento de peso máximo de 326.21 % al día 28, existiendo diferencia estadística significativa con respecto a los días restantes, con 10 lombrices en sustrato estéril el mayor incremento fue de igual manera al día 28, existiendo diferencia estadística significativa con respecto a los días restantes, excepto al día 14. Con 5 y 10 lombrices, el incremento de peso decae al día 56 en ambos sustratos, debido al agotamiento del sustrato y a que no se agregó alimento extra en ningún día a lo largo del experimento.

Choo y Baker (1998), encontraron que el endosulfán reduce significativamente el peso de lombrices juveniles de *Aporrectodea trapezoides* expuesta durante cinco semanas en dos tratamientos, en suelo y en condiciones de laboratorio y de igual manera inhibe la producción de huevecillos, afectando directamente a su reproducción.

Por otro lado, de acuerdo al análisis de incremento de peso (%) con respecto a las concentraciones iniciales utilizadas de endosulfán lactona en todo el experimento (Cuadro 11), se observa que con 5 lombrices se encontró diferencia estadística significativa a 0.001 mg/kg con respecto al control, pero no hubo diferencia estadística significativa con respecto a las otras concentraciones utilizadas; sin embargo con 10 lombrices el mayor incremento de peso se refleja haciendo uso de 0.004 mg de endosulfán lactona/kg, habiendo diferencia estadística significativa con 0.001 y 0.009 mg/kg en sustrato no estéril; en sustrato estéril no se encontró diferencia estadística significativa con el uso de 5 lombrices; y solo hubo diferencia entre el control y 0.009 mg/kg haciendo uso de 10 lombrices.

Cuadro 11. Incremento de peso (%) de lombrices con respecto a las concentraciones de endosulfán lactona en sustrato estéril y no estéril

Endosulfán lactona (mg/kg)	Incremento de peso (%)			
	Sustrato No Estéril		Sustrato Estéril	
	5 lombrices	10 lombrices	5 lombrices	10 lombrices
0	179.57 b	116.92 b	67.14 a	110.42 a
0.001	240.41 a	102.53 b	103.42 a	79.52 ab
0.004	194.15 ab	188.9 a	83.85 a	89.25 ab
0.009	230.17 ab	134.75 b	81.18 a	65.21 b
DMS	56.03	40.07	45.64	44.97

El método empleado fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. $p < 0.05$. Diferentes letras indican que se encontró diferencia estadística significativa entre los días de muestreo.

Cabe hacer notar que en sustrato estéril, los valores de incremento de peso son menores comparados con los valores en sustrato no estéril, esto debido a que al inicio del experimento se tiene un sustrato estéril, que conforme pasan los días se va colonizando con los microorganismos propios de la lombriz y no hubo interferencia con microorganismos provenientes del sustrato

que ayuden a que la lombriz gane peso, es decir, conforme pasan los días, se encontró una competencia por alimento por parte de la lombriz, sus microorganismos de la lombriz y los propios del sustrato (Durán y Henríquez, 2009).

En resumen, el mayor incremento de peso (564.29 %) de *Eisenia fetida* se llevó a cabo en sustrato no estéril a los 28 días con 5 lombrices y con 0.001 mg endosulfán lactona/kg sustrato.

6.4.2 Sustrato no estéril

6.4.2.1 Concentración de endosulfán lactona en sustrato y su remoción

El cuadro 12 muestra que las concentraciones finales más altas se obtienen en experimentos sin lombrices, sin embargo, el endosulfán lactona no se elimina completamente del sustrato, incluso con la presencia de lombrices. No se encontró diferencia estadística significativa entre las concentraciones iniciales utilizadas (0.001 y 0.009 mg/kg) en experimentos sin lombrices, con remociones de 37 y 23 % respectivamente. Sin embargo, se encontró diferencia en 0.004 mg endosulfán lactona/kg inicial, con una remoción del 20 %.

Con respecto al número de lombrices, se encontró diferencia estadística significativa entre la concentración inicial de 0.001, 0.004 y 0.009 mg/kg para 5 y 10 lombrices de tierra, con una remoción aproximada de 25, 48.4 y 60 % respectivamente. Sin embargo, para la concentración de 0.001 mg/kg no hubo una diferencia estadística significativa entre el uso de 0, 5 y 10 lombrices de tierra en el sustrato; para 0.004 y 0.009 mg/kg sucede lo contrario, porque no hubo una diferencia estadística significativa entre el uso de 5 y 10 lombrices de tierra, es decir, incluso en experimentos sin lombrices, se encontró la presencia de endosulfán lactona en el sustrato y no hubo diferencia entre el uso de 5 o 10 lombrices.

Cuadro 12. Concentración final de endosulfán lactona en sustrato y lombriz con respecto a la concentración inicial

Endosulfán lactona inicial (mg/kg)	SUSTRATO			DMS	LOMBRIZ		DMS
	Endosulfán lactona (mg/kg) final con cero lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con 5 lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con 10 lombrices		Endosulfán lactona (mg/kg) final con cinco lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con diez lombrices	
0.001	0.0006 aA	0.0006 cA	0.0005 cA	0.0003	0.0004 bA	0.0003 bA	0.0005
0.004	0.0033 bA	0.0021 bB	0.0021 bB	0.0001	0.0005 bA	0.0006 bA	0.0004
0.009	0.0071 aA	0.0038 aB	0.0036 aB	0.0002	0.0011 aA	0.0012 aA	0.0005
DMS	0.0008	0.0008	0.0007		0.0005	0.0005	

El método empleado fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. $p < 0.05$. Las letras minúsculas diferentes indican que hubo una diferencia estadística significativa entre las concentraciones y las letras mayúsculas diferentes indican que se encontró una diferencia estadística significativa entre el número de lombrices.

Los porcentajes de remoción obtenidos en sustrato no estéril a lo largo de los días de muestreo, se observan en la figura 12, para 5 y 10 lombrices no existe diferencia estadística significativa en el porcentaje de remoción a partir del día 5, teniendo la mayor remoción de 90.86% y manteniéndose constante a partir del día 14. En experimentos sin lombrices, se tuvo remoción sin diferencia estadística significativa en los días 3 a 28, aumentando al día 56, debido posiblemente a la formación de hongos a partir del día 28 (figura 13).

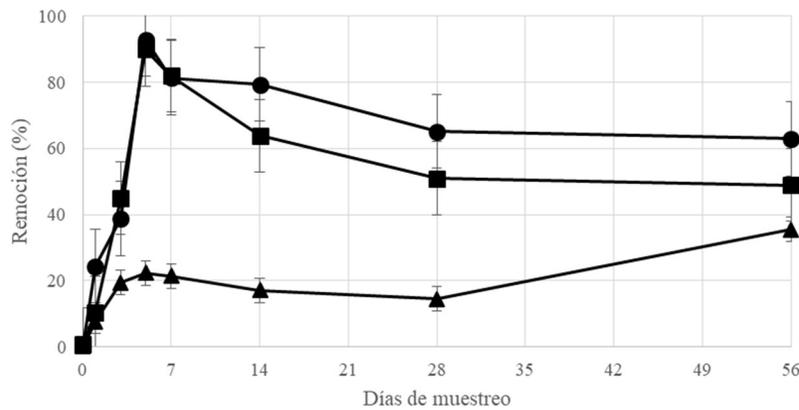


Figura 12. Remoción de endosulfán lactona en sustrato no estéril por acción del proceso de vermicompostaje a 56 días de exposición. ▲ cero lombrices, ■ 5 lombrices y • 10 lombrices. $p < 0.05$

Coutiño-González *et al.*, (2010), evaluaron la remoción de antraceno haciendo uso de *Eisenia fetida* y encontraron una remoción de 41 % en experimentos sin lombrices y de 93 % en experimentos con lombrices, durante 70 días y explica que efectivamente la lombriz acelera los procesos de remoción de contaminantes en suelo, acondicionando el sustrato y alterando la actividad biológica, sin embargo los microorganismos también juegan un papel importante debido a que son los responsables de la degradación bioquímica de la materia orgánica; por lo que las lombrices estimulan la actividad microbiana y su crecimiento a través de la excreción de carbono degradable. De tal manera que las lombrices, trabajando en conjunto con los microorganismos del suelo, no solo aceleran la remoción de contaminantes del suelo, sino la remoción de los productos de degradación de los contaminantes (Dendooven *et al.*, 2011).

Ali *et al.*, (2014), evaluaron la remoción de endosulfán α y β , haciendo uso de un compostaje de residuos vegetales utilizando un composteador de tambor rotativo continuo a gran escala, teniendo remociones del 84.95 y 83.20 % para endosulfán α y β respectivamente a los 8 días. Ellos contaban con un consorcio microbiano que incluía *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Lactobacillus* sp. Concluyen que el sistema utilizado es una técnica apta para eliminar compuestos plaguicidas organoclorados de vegetales, es decir, el uso del composteador en sinergia con los microorganismos, aceleran la eliminación de contaminantes.



Figura 13. Unidad experimental sin lombrices, con formación de hongos en el día 28.

En unidades experimentales con lombrices no hubo formación de hongos, sin embargo en experimentos sin lombrices hubo la formación de éstos (figura 13) y se observó un incremento en el porcentaje de remoción al día 56 (38%) en experimentos sin lombrices. Las lombrices,

airean el sustrato y lo movilizan de tal manera que evitan la formación de hongos; lo cual no sucede cuando no se tienen lombrices en el medio. Cabe señalar que los hongos observados no fueron identificados, sin embargo algunos autores como Bhalerao *et al.*, (2007), Kataoka *et al.*, (2011), Romero *et al.*, (2014), hacen uso de hongos como *Aspergillus niger*, *Mortierella* sp., y *Penicillium* sp, durante 12, 28 y 6 días respectivamente, en la degradación de endosulfán en pruebas in vivo y en suelo, obteniendo porcentajes superiores a 90 % de degradación de endosulfán.

6.4.2.2 Endosulfán lactona en lombriz

Fue indispensable evaluar la presencia de endosulfán lactona en la lombriz, para evaluar el efecto del contaminante sobre *Eisenia fetida*. De tal manera que la ruta de ingreso de los contaminantes al interior de la lombriz, es por medio de su tegumento y su tracto gastrointestinal, resaltando que el fenómeno de adsorción es mayor en la piel de la lombriz que por vía oral (Vijver *et al.*, 2005).

Al analizar las concentraciones finales encontradas en las lombrices de tierra (cuadro 12), se observa que no hubo efecto de las concentraciones iniciales utilizadas en las unidades experimentales o que utilizan 5 o 10 lombrices de tierra, lo que representa el 37, 13 y 12 % del endosulfán lactona presente en la lombriz en sustrato no estéril con concentraciones iniciales de 0.001, 0.004 y 0.009 mg/kg respectivamente.

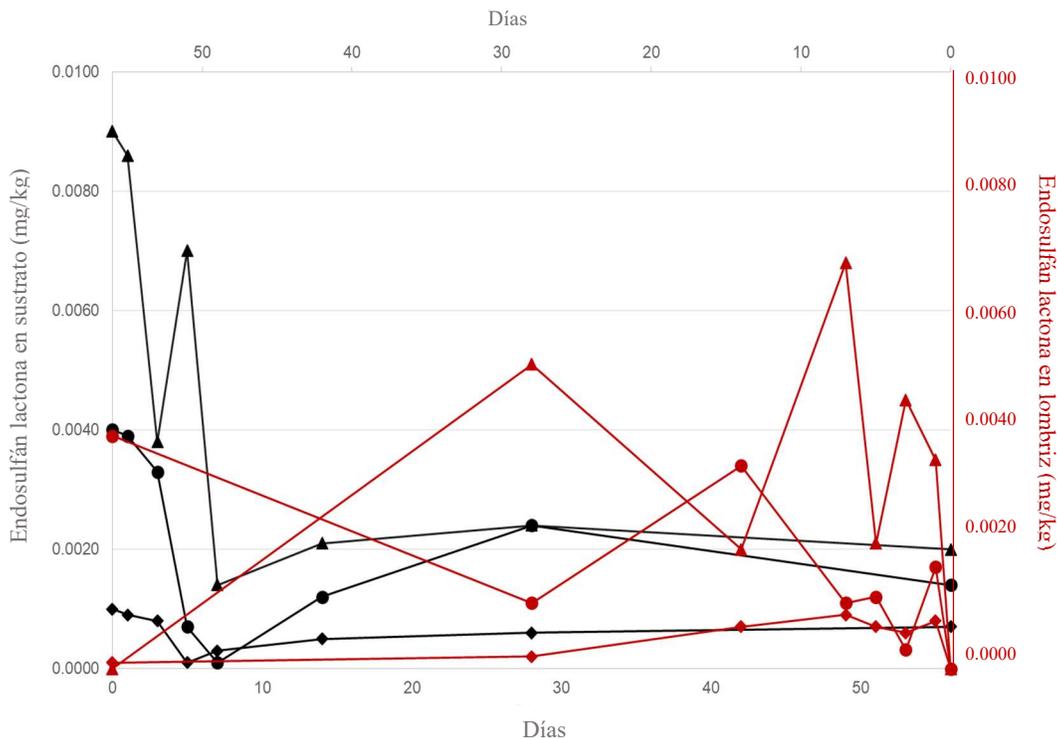


Figura 14. Concentración de endosulfán lactona presente en sustrato y lombriz a lo largo de los días de muestreo con 0.001 mg/kg (♦), 0.004 mg/kg (●) y 0.009 mg/kg (▲) iniciales

En la figura 14, se observa de manera conjunta el comportamiento de endosulfán lactona presente en sustrato y en lombriz a lo largo de días de muestreo. Para sustrato (línea negra) se aprecia que en el día 1, la presencia del contaminante es de aproximadamente 95 %, sin embargo se ve un descenso de concentración en los días 5 y 7 donde se corrobora con mayor remoción (80–90 %), inclusive sin diferencia estadística hasta el día 14 para 0.001 y 0.009 mg/kg. Para las tres concentraciones iniciales utilizadas, al día 56 se tienen concentraciones finales de 0.0007, 0.0014 y 0.0020 mg/kg respectivamente.

Con respecto a las concentraciones finales en lombriz (línea roja), al día 1 se observa un aumento considerable de la concentración para las tres concentraciones iniciales utilizadas, sin embargo a partir del día 3 desciende la concentración en aproximadamente en 68 %, y se observa que para 0.004 y 0.009 mg endosulfán lactona/kg sustrato inicial al día 7 se tienen concentraciones finales de 0.0001 y 0.0004 mg/kg no habiendo diferencia estadística entre ambas. Para la concentración inicial de 0.009 mg/kg se obtiene la máxima concentración del

contaminante en lombriz de 0.007 mg/kg, seguida de una disminución hasta el día 56, en donde se tienen concentraciones finales de 0.0005, 0.0004 y 0 mg endosulfán lactona/kg lombriz para 0.001, 0.004 y 0.009 mg endosulfán lactona/kg inicial.

Ahora bien, a partir del día 1 al 3, la lombriz pasa por un proceso de adaptación y comienza a excretar vermicomposta, el cual es reportado como un fertilizante orgánico nutritivo, rico en micronutrientes, microorganismos beneficiosos al suelo como bacterias fijadoras de nitrógeno y actinomicetos, así como algunas hormonas de crecimiento (Adhikary, 2012); a partir del día 5 comienza a realizar funciones de remoción, lo cual es favorecedor a la remoción de compuestos orgánicos persistentes haciendo sinergia entre la lombriz, sus funciones y su excreta, así como las propiedades y microorganismos que contenga el sustrato. Las deyecciones de la lombriz poseen una riqueza en microbiota muy grande, con cerca de 2×10^{12} colonias/g de humus producido (Durán y Henríquez, 2007).

Kafilzadeh *et al.*, (2015), encontró bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Bacillus*, aislados de sedimentos de un río en Irán que pudieron degradar endosulfán en más del 80 %.

Por otro lado, según Kauschke *et al.*, (2007) y Bilej *et al.*, (2010) reportaron que las lombrices de tierra contienen en su interior fluido celómico que trabaja en el sistema inmunológico de ésta y que ante cualquier peligro o estrés externo, pueden actuar de dos maneras: a) Eliminando cualquier sustancia mediante fagocitosis, es decir, encapsulan el componente en cuestión para su posterior excreción al medio, b) Aumentando la actividad enzimática para transformar las moléculas contaminantes en otras más polares que puedan ser aprovechadas por los microorganismos del tracto digestivo de la lombriz o los que se encuentran en el medio en el que vive.

Esto posiblemente está ocurriendo en la lombriz al verse afectada por endosulfán lactona inmerso y mezclado en su medio y que se puede observar en un aumento en la concentración del contaminante después del día 7 en sustrato.

Ahora bien, al finalizar el tiempo de exposición (56 días) en las diferentes unidades experimentales, se separó el sustrato y la lombriz para la evaluación de la concentración de endosulfán lactona y se encontró que el sustrato seco tenía diferentes características

morfológicas como las mostradas en la figura 15. Donde se muestra los diferentes tipos de sustratos secos formados o no por las lombrices, es decir, en el sustrato seco al día 56 que contenía lombrices, su aspecto es granular, sin grumos, color café oscuro y tamaño de partícula homogénea aproximadamente de 1mm, como se aprecia en la figura 15A, características deseables de un abono proveniente del proceso de vermicompostaje.



Figura 15. Aspecto del sustrato A) con lombrices al día 56, B) sin lombrices al día 56; C) sin lombrices al día cero.

Según Brechelt, (2004), el humus producido por el vermicompostaje con *Eisenia fetida* es un material suelto y de textura granulada; no fermenta ni presenta olor (Terry *et al.*, 2012). Caso contrario se observa en la figura 15B, en donde no se tenían lombrices, el color y tamaño no es uniforme y se observan grumos; sin embargo, el aspecto cambia debido a la presencia de microorganismos en las condiciones no estériles con respecto al sustrato inicial del día cero (figura 15C).

6.4.2.3 Optimización del proceso de remoción

Los resultados del diseño experimental de superficie de respuesta 3^2 , dio como resultado el valor óptimo de remoción de **90.86 %**, y que se llevó acabo en el día 5, con 0.009 mg endosulfán lactona/kg y 8 lombrices, lo cual se puede apreciar en la figura 16, la cual tiene el valor óptimo representado por un asterisco en la figura.

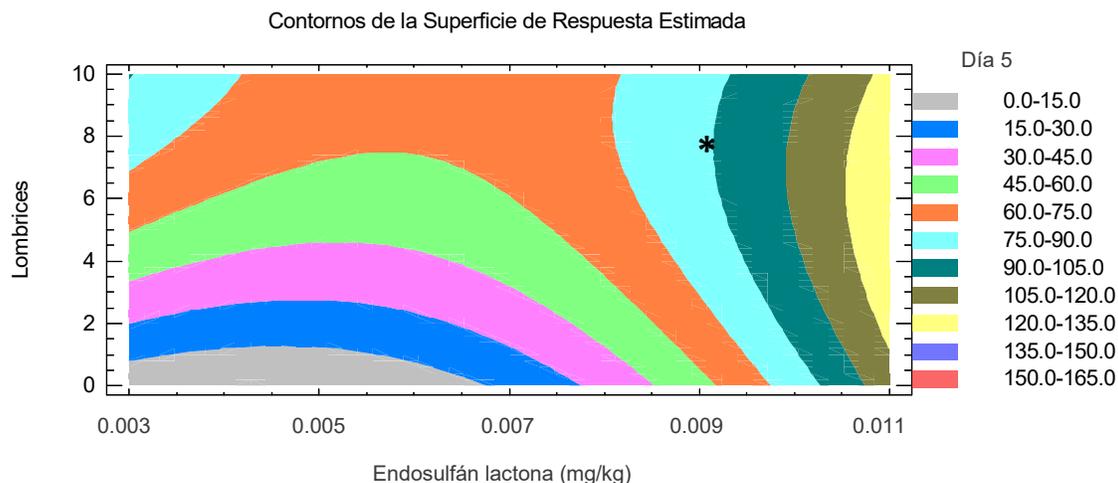


Figura 16. Representación de la superficie de respuesta mediante el gráfico de contorno para la remoción de endosulfán lactona el día 5 en sustrato no estéril.

El modelo polinomial de segundo orden generado es:

$$\text{Remoción del día 5} = 45.5192 - 215.485 \cdot \text{endosulfán lactona} + 16.5857 \cdot \text{Lombrices} + 254.861 \cdot \text{endosulfán lactona}^2 - 9.4625 \cdot \text{endosulfán lactona} \cdot \text{Lombrices} - 0.5223 \cdot \text{Lombrices}^2$$

Con una $R^2 = 97.57\%$, es decir la ecuación se ajusta en un alto porcentaje al modelo estadístico.

Villalobos-Maldonado *et al.*, (2015) evaluaron la remoción de decaclorobifenilo empleando *Eisenia fetida* y condiciones no estériles, encontrando una remoción de 95.38 % en los primeros 7 días del experimento, no teniendo diferencia estadística significativa entre el uso de 3 ó 5 lombrices por unidad experimental a partir de una concentración inicial de decaclorobifenilo de 200 mg/L. Esto significa que el uso de lombrices junto con los microorganismos del medio en donde se lleva a cabo el proceso de vermicompostaje que tiene inmerso al contaminante, juegan un papel importante en los procesos de remoción de COPs como los bifenilos policlorados o los plaguicidas, sin importar el uso de 3 o 5 lombrices.

6.4.3 Sustrato estéril

6.4.3.1 Concentración de endosulfán lactona en sustrato y su remoción

Los resultados de concentraciones finales para sustrato estéril conforme a las concentraciones iniciales de endosulfán lactona se muestran en el cuadro 13, en donde se puede observar que se encontraron menores remociones en los experimentos sin lombrices, teniendo una remoción máxima de 43 % para una concentración inicial de 0.001 mg/kg, existiendo diferencia estadística significativa entre las concentraciones restantes. Con 5 lombrices la mayor remoción fue de 51.7 % con 0.004 mg/kg, existiendo diferencia estadística significativa entre las tres concentraciones; sin embargo, para 10 lombrices no se observaron diferencias entre las concentraciones de 0.004 y 0.009 mg/kg. En contraste con el uso de sustrato no estéril, en el sustrato estéril se observó una diferencia estadística significativa entre el uso de 5 y 10 lombrices para las tres concentraciones utilizadas, siendo la mayor cuando se utilizan 5 lombrices de tierra.

Cuadro 13. Concentración de endosulfán lactona en sustrato estéril calculada conforme a la concentración inicial de endosulfán lactona

Endosulfán lactona inicial (mg/kg)	SUSTRATO			DMS	LOMBRIZ		DMS
	Endosulfán lactona (mg/kg) final con cero lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con cinco lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con diez lombrices		Endosulfán lactona (mg/kg) final con cinco lombrices	Endosulfán lactona (mg/kg) final con diez lombrices	
0.001	0.0006 cA	0.0006 cA	0.0006 cA	0.0001	0.00004 aB	0.0001 bA	0.0002
0.004	0.0024 bB	0.0019 bC	0.0028 aA	0.00005	0.000006 bB	0.0002 bA	0.00002
0.009	0.0052 aA	0.0053 aA	0.0046 aA	0.0003	0 bA	0.0005 aA	0.0005
DMS	0.0008	0.0009	0.0007		0.00006	0.0001	

El método empleado fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. $P < 0.05$. Las letras minúsculas diferentes indican que hubo una diferencia estadística significativa entre las concentraciones y las letras mayúsculas diferentes indican que se encontró una diferencia estadística significativa entre el número de lombrices

En la figura 7, se representó la remoción de endosulfán lactona por acción del vermicompostaje en experimentos con y sin lombrices en sustrato estéril y se observó que no

existió diferencia estadística significativa en el uso de 5 y 10 lombrices; la máxima remoción se da con 10 lombrices entre los días 5, 7 y 14 con 78 % de remoción, disminuyendo al día 56 con 49%. En experimentos sin lombrices se observó remoción, teniendo la máxima al día 5 habiendo diferencia estadística con respecto a los días restantes y disminuyendo al día 56. Esto sugiere que a partir del día 1, las lombrices colonizaron el medio donde se encontraban con sus eyecciones que contienen microorganismos que pudieron haber ayudado al proceso de remoción.

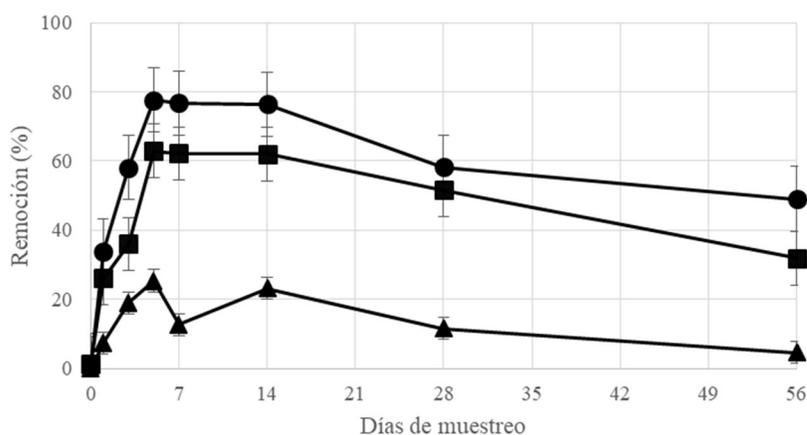


Figura 17. Porcentaje de remoción de endosulfán lactona en sustrato estéril por acción del proceso de vermicompostaje a 56 días de muestreo. ▲ cero lombrices, ■ 5 lombrices y • 10 lombrices. $p < 0.05$

6.4.3.2 Endosulfán lactona en lombriz

En el cuadro 13 se puede observar que con respecto a lombriz, no hubo una diferencia estadística significativa entre las concentraciones de 0.001 y 0.004 mg/kg, haciendo uso de 5 lombrices, sin embargo, con 0.009 mg/kg no se detectó presencia del contaminante en lombriz. Para 10 lombrices no hubo diferencia entre las concentraciones, sin embargo, si hubo una diferencia estadística significativa entre el uso de 5 y 10 lombrices, observándose mayor concentración de endosulfán lactona cuando se utilizaron 10 lombrices.

Picón *et al.*, (2014) evaluaron la colonización del tracto digestivo de la lombriz *Enantiodrilus borelli* en suelo estéril, recalando que tanto en el intestino como en las excretas de las lombrices, se encontró una gran densidad y diversidad microbiológica que se representa en la gran actividad del suelo. Los géneros bacterianos encontrados fueron *Kurthia* sp., *Oscillospira*

sp., *Bacillus* sp., *Azomonas* sp., y *Acidiphilium* sp., de los cuales *Oscillospira* sp., y *Bacillus* sp., no se recolonizaron en suelo estéril, por lo que se consideran como bacterias endógenas de la lombriz, ya que se mantienen asociadas de manera íntima a la pared interna del intestino; sin embargo *Azomonas* sp., y *Acidiphilium* sp., son endógenas y recolonizan de manera eficiente el suelo estéril.

Por otro lado, Villalobos-Maldonado *et al.*, (2017) estudiaron las bacterias cultivables del tracto digestivo de la lombriz *Eisenia fetida* con potencial para remover contaminantes orgánicos persistentes, encontrando bacterias del género *Bacillus* sp., *Caryophanon* sp., *Staphylococcus* sp., y *Pseudomonas* sp. Asimismo, Zenteno-Rojas *et al.*, (2019) reportaron un análisis molecular de bacterias aisladas del tracto intestinal de *Eisenia fetida* con potencial para remoción de decaclorobifenilo; mostrando así el potencial de esta lombriz para remover compuestos orgánicos persistentes.

Aunque en este estudio con endosulfán lactona, no se realizó la identificación de microorganismos, se sugiere que algunos géneros como los mencionados por Picón *et al.*, (2014) o por Villalobos-Maldonado *et al.*, (2017), pudieran estar presentes en el sistema y ser capaces de colonizar el sustrato, ayudando al proceso de remoción de endosulfán lactona haciendo uso de *Eisenia fetida*.

Géneros que han sido reportados en diversos trabajos de investigación asociados al tracto digestivo de diversas lombrices como *Libyodrilus violaceus* alimentada con materia orgánica de un suelo agrícola de Nigeria (Idowu *et al.*, 2006), *Enantiodrillus borelli* alimentada con restos de caña de azúcar (Picón y Teisaire, 2012), y encuentran que los géneros bacterianos más abundantes han sido *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., entre otros; encontrando mayormente a bacterias del género *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Micrococcus* sp., de los cuales mencionan que algunos tipos de *Pseudomonas*, pudieran ser endógenas de las lombrices de tierra, por lo que se puede inferir que este género sea el involucrado en poblar el sustrato estéril y ayudar junto con las lombrices a remover al endosulfán lactona presente en el sistema.

Con respecto a la concentración de endosulfán lactona en sustrato, se observa en la figura 18 cómo disminuye la concentración (línea negra) desde el día 1, haciéndose constante para 0.001 mg/kg hasta el día 28, no encontrando endosulfán lactona en sustrato al día 56. Para la concentración inicial de 0.004 mg/kg se observa la disminución hasta el día 5 (0.0007 mg/kg), no habiendo diferencia estadística significativa para los días restantes. En la concentración inicial de 0.009 mg/kg, se observa la menor concentración encontrada al día 7 (0.0019 mg/kg), es decir, una remoción de 68 %, habiendo diferencia estadística con respecto a los demás días.

Para las concentraciones encontradas en lombriz (línea roja) (figura 18) con respecto a los días de muestreo, se observa que la mayor concentración final encontrada fue al día 3 para 0.001 y 0.004 mg/kg inicial, con 0.0057 y 0.0079 mg/kg respectivamente; sin embargo, no hubo presencia del contaminante para la concentración inicial de 0.009 mg/kg a lo largo de los días de muestreo.

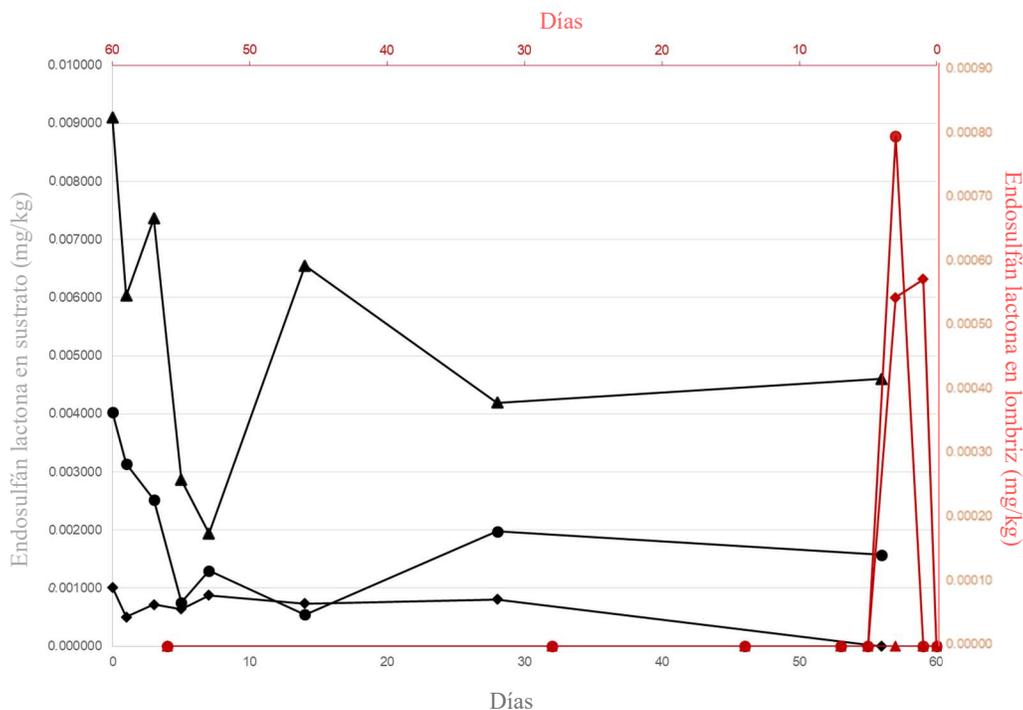


Figura 18. Concentración de endosulfán lactona presente en sustrato estéril y lombriz a lo largo de los días de muestreo con 0.001 mg/kg (◆), 0.004 mg/kg (●) y 0.009 mg/kg (▲) iniciales

En el sistema de vermicomposteo existe una relación de tipo complementaria entre los microorganismos del sustrato provenientes del tracto digestivo de la lombriz y la propia lombriz,

en donde ésta favorece la actividad microbiana ayudando en la degradación de materia orgánica y por tanto de sustancias más fácil de digerir y metabolizar por las lombrices (Iparraguirre *et al.*, 2016). Explicando así porqué los microorganismos juegan un papel importante en el proceso de remoción en sustrato estéril.

6.4.3.3 Optimización del proceso de remoción

El valor óptimo de remoción (%) que genera el diseño experimental para las condiciones estériles fue de **83.86 %** en el día 14 con 10 lombrices y 0.0045 mg/kg de endosulfán lactona, lo cual se puede observar en la figura 19 con un diagrama de contornos de superficie de respuesta.

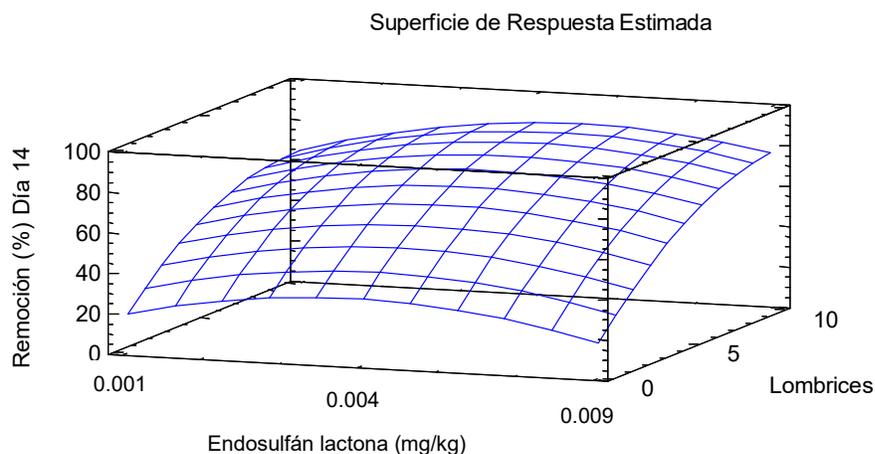


Figura 19. Representación de la superficie de respuesta mediante el gráfico de contorno para la remoción de endosulfán lactona al día 14 en sustrato estéril.

La ecuación polinomial de segundo orden fue:

$$\text{Remoción día catorce} = -22.4114 + 187.693 \cdot \text{endosulfán lactona} + 8.874 \cdot \text{Lombrices} - 159.657 \cdot \text{endosulfán lactona}^2 + 2.29083 \cdot \text{endosulfán lactona} \cdot \text{Lombrices} - 0.492967 \cdot \text{Lombrices}^2$$

Con una $R^2 = 91.74 \%$

Al igual que en sustrato no estéril, la cantidad de lombrices tiene una influencia positiva en la remoción del endosulfán lactona, como se aprecia en la figura 20.

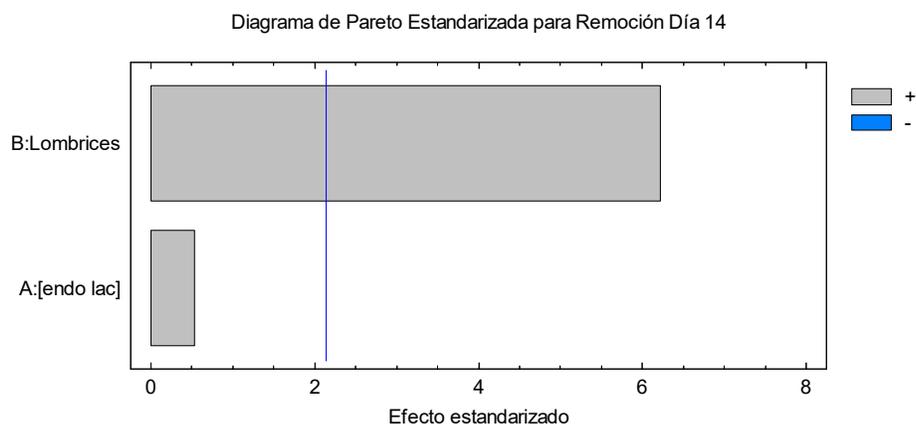


Figura 20. Diagrama de Pareto para el día 14 en sustrato estéril.

En general, tanto la remoción (%) como el peso de la lombriz fueron menores en sustrato estéril que en sustrato no estéril. Contreras-Ramos *et al.*, (2009), encontraron el mismo comportamiento: el peso de las lombrices fue significativamente bajo en sustrato estéril, que en el no estéril y explican que las lombrices tienen una estrecha relación con los microorganismos, los cuales hacen más disponibles los nutrientes que necesita la lombriz para ganar peso, sin ellos puede crecer y desarrollarse, pero en menor cantidad y mayor tiempo.

6.4.4 Optimización y deseabilidad de remoción

Los resultados que genera la optimización del diseño experimental, evaluando la remoción por cada día de muestreo en sustrato estéril y no estéril se encuentran en el cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados óptimos de remoción (%) en sustrato estéril y no estéril

DIA	NO ESTÉRIL	ESTÉRIL
0	1.11	0.82
1	37.82	32.86
3	61.09	47.76
5	90.86	81.51
7	84.87	81.35
14	82.48	83.86
28	75.28	73.07
56	73.76	54.20

Como se puede observar en el cuadro 14, con sustrato no estéril en el día 5, se tiene mayor remoción de endosulfán lactona (90.86 %), y para sustrato estéril fue en el día 14 donde se observó la remoción máxima (83.86 %). Es decir, la presencia de microorganismos en sustrato no estéril genera mayores porcentajes de remoción, en menor tiempo, en comparación con el sustrato estéril.

Los resultados óptimos de remoción para sustrato no estéril se logra con las condiciones de 0.009 mg/kg al día 5 con 8 lombrices y para sustrato estéril de 0.0045 mg/kg al día 14 con 10 lombrices, los cuales se describen para evaluar la remoción mediante la optimización de múltiples variables de respuesta, dando como resultado una deseabilidad. Esta función se realiza una vez obtenida la remoción para cada día de muestreo; en la actualidad, la función de deseabilidad es una técnica establecida para la determinación simultánea de ajustes óptimos de variables independientes (factores) que pueden determinar niveles óptimos de rendimiento para una o más respuestas.

Para el sustrato no estéril se obtuvo una deseabilidad del 95 % (figura 21) con 0.009 mg/kg de endosulfán lactona y 10 lombrices; y para el sustrato estéril de 70 % (figura 22), con 0.0038 mg/kg y 9 lombrices.

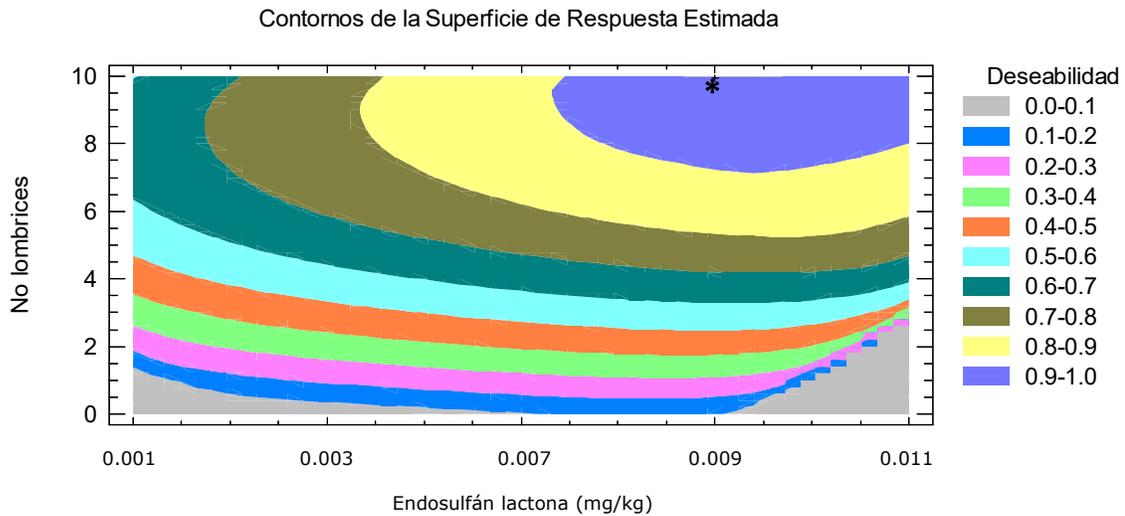


Figura 21. Contorno de superficie de respuesta de deseabilidad para sustrato no estéril.

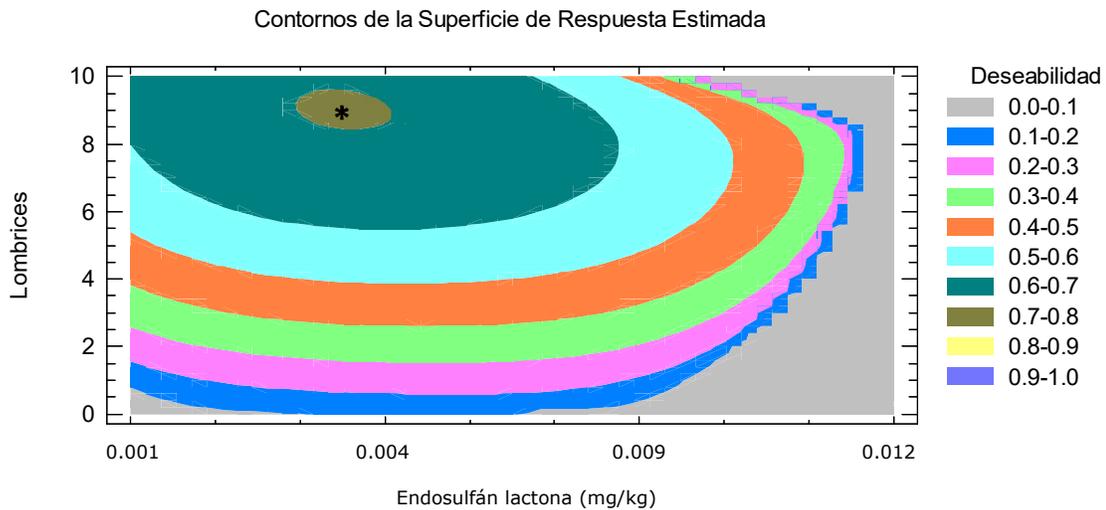


Figura 22. Contorno de superficie de respuesta de deseabilidad para sustrato estéril.

Según Lazic (2006) que utilizó una escala para la deseabilidad, el proceso de remoción en sustrato no estéril se encuentra en el rango de 80 a 100% con una deseabilidad muy buena, es decir, el proceso es aceptable y excelente para el área de estudio. Sin embargo, la deseabilidad en el proceso de remoción en sustrato estéril (70%) cae dentro del rango de 63 a 80% con una deseabilidad buena, es decir, el proceso es aceptable y bueno. Es por ello que las mejores condiciones fueron las encontradas en sustrato no estéril.

La función de deseabilidad maximiza el valor óptimo y no se ha reportado para procesos de remoción de plaguicidas haciendo uso de *Eisenia fetida*, sin embargo, se han utilizado en otros

procesos químicos; por ejemplo Islam *et al.*, (2009) emplearon la función de deseabilidad para remover quinalfos (plaguicida organofosforado) haciendo uso de una solución acuosa de hojas usadas de té, teniendo como resultados óptimos para la mayor remoción de quinalfos (96.31 %) a pH de 8.83, [quinalfos] (7 mg/L) y 0.4 g de hojas usadas de té, obteniendo una deseabilidad de 0.99 o 99 %. Por otro lado, Amini *et al.*, (2008) aplicaron la metodología de superficie de respuesta para optimizar la remoción de plomo haciendo uso de una solución acuosa de *Aspergillus niger*, teniendo 96.2 % de remoción con un pH de 3.4, una concentración inicial de 19.3 mg/L y una biomasa inicial de 3.7 g/L, obteniendo una deseabilidad de 0.9 (90 %) lo cual indica el alto porcentaje en el cual se puede representar el modelo experimental y las condiciones deseadas, indicando así, una metodología viable para el proceso de remoción, debido al porcentaje cercano a 100 obtenido de deseabilidad.

Se replicaron las condiciones óptimas de mayor remoción en sustrato no estéril, 5 días, con 0.009 mg endosulfán lactona/kg y 8 lombrices; siguiendo la metodología estandarizada y validada de extracción con 12 g de sustrato, 75 mL de acetonitrilo, 175 rpm y 2 h de agitación. Los resultados obtenidos fueron de una remoción óptima de 90%, lo cual indica que los resultados teóricos obtenidos mediante el programa Statgraphics son reproducibles obteniendo resultados de optimización.

6.5 Respuestas fisiológicas de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona: medición de actividad enzimática (citocromo P450)

La evaluación de las respuestas fisiológicas en lombriz, se llevó a cabo haciendo uso de los microsomas de lombrices expuestas a 0.004 mg endosulfán lactona/kg sustrato, resultado derivado de la CL50 en pruebas de sustrato artificial, a lo largo de 14 días, teniendo muestra los días 3, 5, 7 y 14 y como control los resultados del día cero, evaluando primeramente la cantidad de proteína, lo cuales se aprecian en la figura 23.

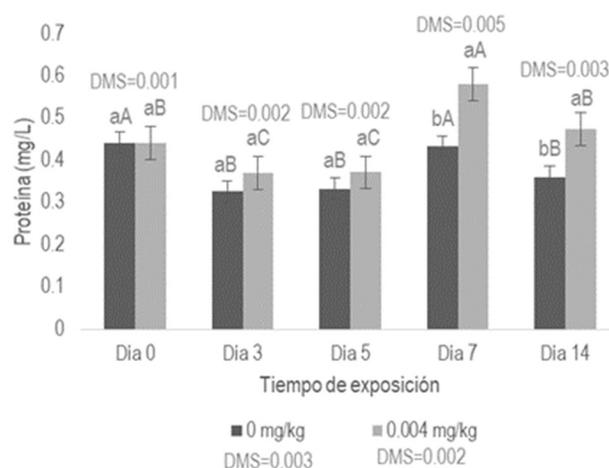


Figura 23. Cantidad de proteína en *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en sustrato a 0, 3, 5, 7 y 14 días. $p < 0.05$. Letras minúsculas indican diferencia entre los días de exposición para ambas concentraciones y letras mayúsculas indican diferencia entre concentraciones para cada día de muestreo.

En el día cero no se encontró diferencia estadística significativa en la cantidad de proteína de *E. fetida* en experimentos con o sin endosulfán lactona, sin embargo, en los días 7 y 14 se encontró diferencia entre el control negativo y los experimentos que contienen endosulfán lactona (0.004 mg/kg), observándose el aumento al día 7.

Similar comportamiento se observa en el gel de poliacrilamida (figura 24): en el control negativo (cero días) no se observan las bandas correspondientes al citocromo P450, mientras que a 3, 5, 7 y 14 días de exposición en sustrato con 0.004 mg/kg se encuentra una proteína de aproximadamente 50 - 37 KDa similar al peso molecular del citocromo P450, específicamente la subunidad CYP3A4 (Qui *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Es importante aclarar, que en este extracto proteico pueden estar presentes, además del CYP450, otras proteínas de origen enzimático que se pueden encontrar en la lombriz como: superóxido bismutasa, glutatión S-transferasa, catalasa (Ji *et al.*, 2013); lumbroquinasa, aldehído deshidrogenasa, entre otras relacionadas con el metabolismo de la lombriz (Wang *et al.*, 2010); además de algunas subunidades de CYP450 como CYP1A2, CYP2E1 y CYP3A4 (Lu *et al.*, 2017).

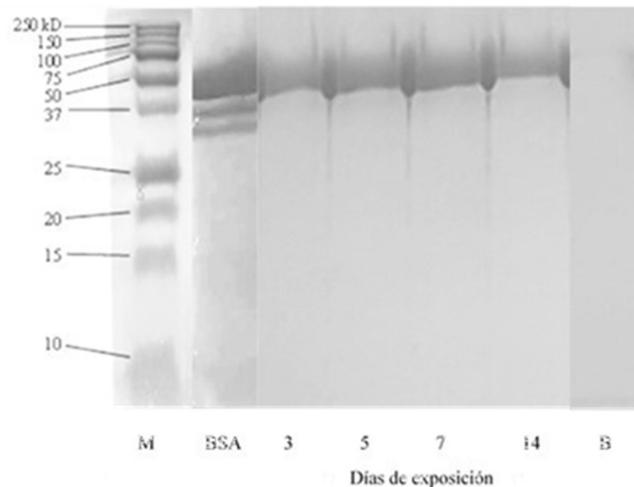


Figura 24. Patrón electroforético de SDS-PAGE de microsomas extraídos de *Eisenia fetida* expuesta a endosulfán lactona en sustrato. M = marcador molecular, BSA = albúmina sérica bovina, 3 = lombriz expuesta por 3 días, 5 = lombriz expuesta por 5 días, 7 = lombriz expuesta por 7 días, 14 = lombriz expuesta por 14 días, B = blanco a 0 días de exposición.

Achazi *et al.*, (1998), evaluaron la presencia y actividad de la subunidad del citocromo P450, EROD (CYP1A2) en *Eisenia fetida* expuesta a suelo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) durante 28 días, encontrando un peso aproximado de 54 KDa para esta subunidad mediante la técnica de SDS-PAGE y también se reportó que no se encontraron cambios significativos en su actividad a lo largo del tiempo de exposición. Así mismo, se encontró que los HPAs y los plaguicidas son inductores del sistema del citocromo P450 y pueden funcionar como bioindicador en suelos contaminados y que se expresa en las lombrices de manera enzimática, debido a que en la parte externa de ellas, no se observa ningún cambio fisiológico o muerte. Sin embargo, al evaluar varias especies de lombrices, no todas presentan de manera significativa al citocromo P450, tal es el caso de *L. terrestris*. De igual manera, se hace mención que la expresión del complejo multienzimático en el retículo endoplásmico es alta cuando la exposición se da por primera vez, caso contrario ocurre cuando se expone al individuo durante meses, debido a un proceso de adaptación de las lombrices al contaminante.

La cuantificación enzimática de CYP3A4 se llevó a cabo de la misma manera que para los experimentos de CL50 en papel filtro (Zhang *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013); de tal manera que en la figura 25 se observa como es consumido el sustrato y se obtiene el producto, observándose que no existe diferencia estadística significativa entre los días de muestreo para el consumo del sustrato, sólo se encontró diferencia en el control (día cero) a los 35 min de exposición con 0.79 μmol de testosterona restante, es decir, sin consumir. Con respecto a la formación del producto no se encontró diferencia estadística significativa en los días cero, 5, 7 y 14, teniendo un máximo de producción al minuto 20, el día 3 con 0.662 μmol de 6BHT formado.

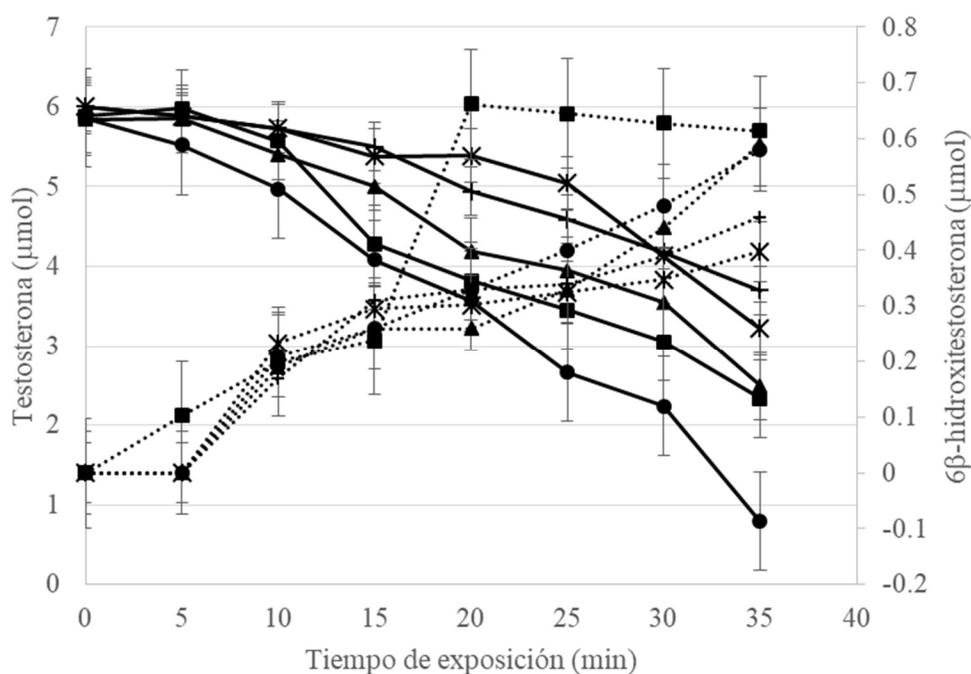


Figura 25. Gráfica de concentración de sustrato y producto con respecto al tiempo haciendo uso de 0.004 mg de endosulfán lactona/kg. ● Día cero, ■ Día 3, ▲ Día 5, * Día 7, + Día 14. Las determinaciones se hicieron por triplicado. $p < 0.05$.

Según Van der Hoeven, (1981), la formación del producto 6β-hidroxitestosterona (6βHT) se debe a la presencia del citocromo P450 en microsomas de hígado de ratas expuestas a fenobarbital, midiendo el metabolismo de testosterona, con una formación máxima de 0.00182 μmol al minuto 30 de exposición, incrementando 6.5 veces más con respecto al control. Años

más tarde Sonderfan *et al.*, (1987) estudiaron al citocromo P450 mediante las diferentes rutas de oxidación de testosterona, medida en HPLC en microsomas de ratas expuestas al antibiótico eritromicina con formación de 0.0015 μmol 6 β -hidroxitestosterona, aumentando 1.5 veces con respecto al control, indicando que existe un aumento de actividad en monooxigenasas del citocromo P450 expuesta a xenobióticos.

Los parámetros cinéticos correspondientes se muestran en el cuadro 15; en el que se observa que aumenta la actividad enzimática con respecto al control cuando *Eisenia fetida* es sometida a CL50 en sustrato. El valor de K_m con respecto al control aumenta en los días de muestreo, mostrando mayor valor de K_m al día 3, teniendo una menor afinidad de la enzima por el sustrato, pudiendo deberse a que la lombriz está inmersa en un sustrato que le sirve como soporte para su supervivencia, pero no como alimento y a su vez, este sustrato pudiera contener ciertos microorganismos que estén influyendo en la participación de otras enzimas propias de los microorganismos, no de la lombriz; aunque esto no fue así en la prueba cualitativa de SDS-PAGE (figura 24).

Cuadro 15. Parámetros cinéticos del complejo enzimático citocromo P450 en *Eisenia fetida* expuesta por 14 días

Muestra	Vmax ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (μmol)	Actividad enzimática (mmol/mg proteína min)
Día cero	0.0155 e	0.7274 e	0.2087 e
Día 3	0.0187 d	3.0458 a	0.2518 d
Día 5	0.0233 c	2.7540 b	0.3138 c
Día 7	0.0346 b	2.5489 c	0.4659 a
Día 14	0.0502 a	2.0157 d	0.3730 b
DMS	0.002	0.69	0.0045

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado y se analizaron mediante ANOVA simple con una $p < 0.05$.

La actividad enzimática es mayor al día 7 encontrándose diferencia estadística con respecto a los días restantes (Cuadro 15) y sobre todo con el control (día cero). De la misma forma se observó en la figura 26, la actividad enzimática relativa, teniendo la máxima actividad al día 7, encontrándose diferencia estadística significativa con respecto a los días restantes.

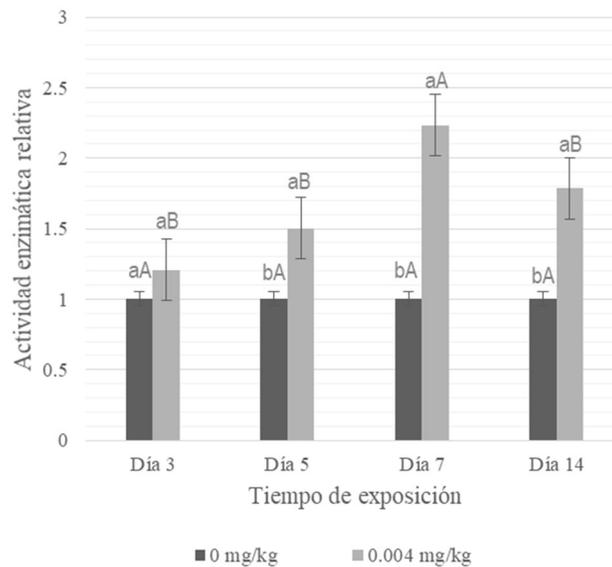


Figura 26. Actividad enzimática relativa (medida con respecto al control), durante 14 días de exposición. Letras minúsculas indican diferencia entre los días de exposición para ambas concentraciones y letras mayúsculas indican diferencia entre concentraciones para cada día de muestreo. $p < 0.05$

Cao *et al.*, (2017) evaluaron la actividad de EROD y CYP3A4 en *Eisenia fetida* expuesta a metales pesados por 21 días en sustrato, encontrando que la expresión de ambas subunidades aumenta conforme la concentración de cadmio, cobre, plomo y zinc aumenta, sin embargo la mayor actividad enzimática se lleva a cabo dentro de los 7 primeros días, disminuyendo notablemente al día 21 para plomo, cobre y zinc; teniendo para cadmio la mayor actividad en el día 21, el cual puede ser efecto de una inhibición en la expresión del complejo multienzimático conforme al tiempo, característica de un mecanismo de adaptación de las lombrices al medio donde se encuentran los contaminantes. Además tuvieron una actividad enzimática relativa de 1.75 para cadmio a 0.5 mg/kg disminuyendo a 4 mg/kg a 14 días; una actividad de 1.5 para 400 mg plomo/kg disminuyendo a 0.5 a 500 mg/kg a 14 días, concluyendo que ciertas concentraciones aumentan la actividad favorablemente y tienen una conversión óptima del sustrato; teniendo una inhibición de la enzima para ambos metales al aumentar la concentración, haciendo énfasis en que este complejo multienzimático pudiera ser utilizado como un biomarcador potencial para las respuestas tóxicas del suelo expuesto a metales pesados

utilizando la concentración y el tiempo de exposición, ayudando a revelar la toxicidad de metales pesados en el suelo.

Lu *et al.*, (2017) evaluaron la activación de varias subunidades del CYP450, en tres especies de lombrices encontrando que los niveles de expresión varían con la especie de la lombriz, su edad y la parte de su cuerpo. Estas diferencias en la aparición de las tres enzimas CYP parecen reflejar el nicho ecológico de los anélidos y la probabilidad de contacto con los contaminantes del suelo de las especies respectivas.

Estos resultados pueden ayudar a explicar por qué las lombrices de tierra son capaces de adaptarse a suelos muy diferentes y extensamente contaminados y proporcionan datos importantes para estudios de ecotoxicología, ya que funcionan como biomarcadores de suelos contaminados y que a su vez, la presencia de estas enzimas facilitan la biodegradación y biotransformación de contaminantes; entendiendo así, la gran habilidad y supervivencia de las lombrices a condiciones ambientales adversas.

7. CONCLUSIONES

- La extracción de endosulfán lactona en sustrato haciendo uso de acetonitrilo y agitación fue más eficiente que la extracción con acetato de etilo y ultrasonido. Por lo tanto la metodología es viable para la extracción y cuantificación de endosulfán lactona en suelo o en sustrato, corroborándose lo descrito en la literatura: 1) Endosulfán lactona es un producto de oxidación de endosulfán, y 2) La significativa persistencia de endosulfán lactona en suelo agrícola.
- La determinación de la CL50 permitió determinar una aproximación a la concentración máxima a utilizar en los cultivos donde se hace uso de plaguicidas, sin embargo al ser *Eisenia fetida* un organismo modelo para las cuestiones ambientales de biorremediación y biodegradación de xenobióticos, se sugirió hacer uso de esta lombriz para poder remover los compuestos estudiados que junto con la CL50 se tuvo una aproximación del efecto dañino que le causará así como de la concentración máxima tolerable.
- De acuerdo con los resultados de CL50, el endosulfán lactona es extremadamente tóxico, tanto por pruebas en papel filtro como por pruebas en sustrato artificial ya que a menores concentraciones (0.001 – 0.004 mg/kg) genera toxicidad aguda en *Eisenia fetida*.
- El sustrato no estéril favoreció el proceso de remoción de endosulfán lactona, sin embargo en sustrato estéril existe remoción, demostrando que las lombrices juegan un papel importante en estos procesos, debido a que proveen una mejor distribución del contaminante en el sustrato mediante la mezcla y oxigenación del proceso.
- El sistema de vermicomposteo usando *Eisenia fetida* fue significativo para la remoción de endosulfán lactona en sustrato sólido.
- La presencia del complejo multienzimático del citocromo P450 es indicador de la presencia de contaminantes en sustrato, debido al aumento de actividad enzimática en *Eisenia fetida*.

8. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

1. Se sugiere hacer uso de consorcios microbianos ya reportados para remover compuestos orgánicos persistentes en el sistema de vermicomposteo para la remoción de endosulfán lactona.
2. Para este trabajo, hizo falta la purificación del complejo multienzimático CYP450 mediante técnicas de biología molecular y evaluar la capacidad de transformar endosulfán lactona en un compuesto hidroxilado.
3. Se sugiere el estudio de los genes involucrados en la presencia y actividad del citocromo P450 de la lombriz *Eisenia fetida*.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achazi, R. K., Flenner, C., Livingstone, D. R., Peters, L. D., Schaub, K., & Scheiwe, E. (1998). Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1-3), 339-350.
- Adhikary, S. (2012). Vermicompost, the story of organic gold: A review. *Agricultural Sciences*, 3(7), 905.
- Ali, M., Kazmi, A. A., & Ahmed, N. (2014). Study on effects of temperature, moisture and pH in degradation and degradation kinetics of aldrin, endosulfan, lindane pesticides during full-scale continuous rotary drum composting. *Chemosphere*, 102, 68-75.
- Amini, M., Younesi, H., Bahramifar, N., Lorestani, A. A. Z., Ghorbani, F., Daneshi, A., & Sharifzadeh, M. (2008). Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, 154(1), 694-702.
- Aysal, P., Ambrus, A., Lehotay, S. J., & Cannavan, A. (2007). Validation of an efficient method for the determination of pesticide residues in fruits and vegetables using ethyl acetate for extraction. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(5), 481-490.
- Babić S., Barišić J., Malev O., Klobučar G., Popović N. T., Strunjak-Perović I. & Klobučar R. S. (2016). Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight? *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.
- Bejarano, F., Souza, J., Weber, J. M., Guadarrama, C., Escamilla, E., Beristáin, B. & Ramírez, F. (2008). El endosulfán y sus alternativas en América Latina. *México: Bejarano, F.*
- Betancur, L. A., Ocampo, R., & Ríos, L. A. (2015). La problemática del endosulfán: aspectos químicos, analíticos y ambientales. *Revista. Luna Azul*, 40, 293-313.
- Bilej, M., Procházková, P., Šilerová, M., & Josková, R. (2010). Earthworm immunity. *Invertebrate immunity* Springer, Boston, MA. 66-79.
- Bhalerao, T. S., & Puranik, P. R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(4), 315-321.

- Blouin M., Hodson M. E., Delgado E., Baker G., Brussaard L., Butt K. R., Tondoh J.E. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161-182.
- Brechelt, A. (2004). Manejo ecológico del suelo. *Fundación Agricultura y Medio Ambiente. Red de acción de Plaguicidas y sus alternativas para América Latina*.
- Brito-Vega, H., & Espinosa-Victoria, D. (2009). Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms (Oligochaeta). *Journal of Biological Sciences*, 9(3), 192-199.
- Brown P. J., Long S. M., Spurgeon D. J., Svendsen C., & Hankard P. K. (2004). Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57(11), 1675-1681.
- Cao, X., Song, Y., Kai, J., Yang, X., & Ji, P. (2012). Evaluation of EROD and CYP3A4 activities in earthworm *Eisenia fetida* as biomarkers for soil heavy metal contamination. *Journal of hazardous materials*, 243, 146-151.
- Cao, X., Bi, R., & Song, Y. (2017). Toxic responses of cytochrome P450 sub-enzyme activities to heavy metals exposure in soil and correlation with their bioaccumulation in *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 144, 158-165.
- Castrillo K., Otahola V. A., González N. B., Otahola J. & Arenas A. (2013). Uso de *Eisenia fetida* como bioindicador de la toxicidad de rípios de perforación base aceite generados en la industria petrolera. *RITI UDO* 2(2), 10-21.
- Ccasani Mulato, N., & Poma Enriquez, A. (2012). Evaluación de la densidad poblacional, peso y longitud de la lombriz roja californiana/eisenia foetidia) alimentadas en estiercol y compost de bovino y ovino. Tesis Universidad Nacional de Huancavelica, Facultad de Ciencias de Ingeniería.
- Claros Guzmán, A. M. (2015). Efectos tóxicos del fluido celómico de la lombriz de tierra *Eisenia fetida* en coleoptera y orthoptera. Tesis Universidad Autónoma de Aguascalientes, Facultad de Fisiología y Farmacología.
- COFEPRIS. (2019). Registro sanitario de plaguicidas y nutrientes vegetales. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-plaguicidas-y-nutrientes-vegetales>. Consultado Mayo 2019.
- Contreras-Ramos, S. M., Alvarez-Bernal, D., & Dendooven, L. (2009). Characteristics of earthworms (*Eisenia fetida*) in PAHs contaminated soil amended with sewage sludge or vermicompost. *Applied soil ecology*, 41(3), 269-276.
- Coutiño-González E., Hernández-Carlos B., Gutiérrez-Ortiz R., & Dendooven L. (2010). The earthworm *Eisenia fetida* accelerates the removal of anthracene and 9, 10-anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(6), 525-529.
- Coutiño Rodríguez, E. M. D. R. (2011). Defensa química y citocromo P450: relación con la defensa inmune. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 11(2), 53-63.
- Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67(10), 1699-1723.
- Choo, L. P. D., & Baker, G. H. (1998). Influence of four commonly used pesticides on the survival, growth, and reproduction of the earthworm *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae). *Australian Journal of Agricultural Research*, 49(8), 1297-1303.
- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419.

- Dendooven L., Alvarez-Bernal D., & Contreras-Ramos S. M. (2011). Earthworms, a means to accelerate removal of hydrocarbons (PAHs) from soil? A mini-review. *Pedobiologia*, 54, S187-S192.
- De Silva P., Mangala C.S., Pathiratne A. & Van Gestel C.A.M. (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. *Applied Soil Ecology*, 44(1), 56-60.
- Dellsperger V., Tamez C., Robledo P. (2003) Programa “Ciudadanía Ambiental”: Manual de Ecología Básica y de Educación Ambiental. Módulo 6: Suelos. Mesa México – Suiza.
- Díaz M. D. C. C., Domínguez F. A. S., & Toledo Á. M. (2012). Monitoreo De Suelos Contaminados Mediante Pruebas Ecotoxicológicas. *Tlatemoani*, (11).
- Domínguez J. & Pérez-Losada M. (2010). *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. *Acta zoológica mexicana*, 26(SPE. 2), 321-331.
- Domínguez, J., & Gómez-Brandón, M. (2010). Ciclos de vida de las lombrices de tierra aptas para el vermicompostaje. *Acta zoológica mexicana*, 26(SPE2), 309-320.
- Durán, L., & Henríquez, C. (2007). Caracterización química, física y microbiológica de vermicompostes producidos a partir de cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense*, 31(1).
- EPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4225 Seedling Emergence, Tier II. EPA 712-C-96-363
- Espín, S., López, E. M., Mojica, P. M., & Fernández, A. J. G. (2010). Desarrollo de un método analítico para la extracción de plaguicidas organoclorados en plumas. *Anales de Veterinaria de Murcia* (26), 77-90.
- Fernández Moreno, J. L., Garrido Frenich, A., Plaza Bolaños, P., & Martínez Vidal, J. L. (2008). Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 43(9), 1235-1254
- Gaete H., Hidalgo M. E., Neaman A., & Ávila G. (2010). Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. *Quim. Nova*, 33(3), 566-570.
- Garcia-Velasco N., Gandariasbeitia M., Irizar A., & Soto M. (2016). Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in *Eisenia fetida* earthworm exposed through Standard OECD Tests. *Ecotoxicology*, 25(8), 1543-1555.
- Gfrerer, M., & Lankmayr, E. (2005). Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 203-211.
- Gómez Hernández, A. D. P. (2014) Evaluación de la toxicidad de suelos mediante un bio-ensayo con la lombriz de tierra *Eisenia fetida* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Gómez, M., & Cecilia, E. (2012). Biomarcadores moleculares y celulares en la lombriz de tierra *Eisenia* spp.(Annelida: Oligochaeta) expuesta a los pesticidas organofosforados clorpirifos y malatión (Doctoral dissertation, Universidad de Oriente).
- González, J. C. R., & Guerra, I. R. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(3), 495-507.
- Gupta R. D., Chakravorty P. P., & Kaviraj A. (2011). Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. *Chemosphere*, 84(5), 724-726.

- Idowu, A. B., Edema, M. O., & Adeyi, A. O. (2006). Distribution of bacteria and fungi in the earthworm *Libyodrilus violaceus* (Annelida: Oligochaeta), a native earthworm from Nigeria. *Revista de biología tropical*, 54(1), 49-58
- INECC (2014). Perfil Nacional de Sustancias Químicas. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental. SEMARNAT. México
- Iparraguirre Bolaños, E. (2016). Growth, reproduction and recruitment of *Eisenia andrei* in natural substrates: A functional approach. PhD Tesis. Universidad del País Vasco
- Ji, C., Wu, H., Wei, L., Zhao, J., Lu, H., & Yu, J. (2013). Proteomic and metabolomic analysis of earthworm *Eisenia fetida* exposed to different concentrations of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether. *Journal of proteomics*, 91, 405-416.
- Jovana M., Tanja M., & Mirjana S. (2014). Effects of three pesticides on the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny 1826) under laboratory conditions: Assessment of mortality, biomass and growth inhibition. *European Journal of Soil Biology*, 62, 127-131.
- Kafilzadeh, F., Ebrahimnezhad, M., & Tahery, Y. (2015). Isolation and identification of endosulfan-degrading bacteria and evaluation of their bioremediation in Kor River, Iran. *Osong public health and research perspectives*, 6(1), 39-46.
- Katagi T., & Ose K. (2015). Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm. *Journal of pesticide science*, 40(3-4), 69-81.
- Kataoka, R., Takagi, K., & Sakakibara, F. (2011). Biodegradation of endosulfan by *Mortierella* sp. strain W8 in soil: influence of different substrates on biodegradation. *Chemosphere*, 85(3), 548-552.
- Kauschke, E., Mohrig, W., & Cooper, E. L. (2007). Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms. *European Journal of Soil Biology*, 43, S110-S115.
- Kuhn, M. (2016). The desirability Package. <http://cran.uib.no/web/packages/desirability/vignettes/desirability.pdf> (fecha de consulta: 14/Nov/2017)
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Elsevier
- Lazic, Z. R. (2006). Design of experiments in chemical engineering: a practical guide. *John Wiley & Sons*, 388-392.
- Lemtiri, A., Colinet, G., Alabi, T., Cluzeau, D., Zirbes, L., Haubruge, É., & Francis, F. (2014). Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement= Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 18.
- Li, W., Dai, Y., Xue, B., Li, Y., Peng, X., Zhang, J., & Yan, Y. (2009). Biodegradation and detoxification of endosulfan in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1), 209-216.
- Li J., Zhang W., Chen L., Liang J., & Lin K. (2015). Biological effects of decabromodiphenyl ether (BDE209) and Pb on earthworm (*Eisenia fetida*) in a soil system. *Environmental Pollution*, 207, 220-225.
- Lin D., Xie X., Zhou Q., & Liu Y. (2012). Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environmental toxicology*, 27(7), 385-392.
- LI, W., & GE, F. (2006). Effect of herbicide acetochlor on cytochrome P450 monooxygenases and GST of earthworms *Eisenia fetida*. *Journal of Environmental Sciences*, 18(1), 135-140.

- Lu, X., Li, Y., Thunders, M., Cavanagh, J., Matthew, C., Wang, X., ... & Qiu, J. (2017). Differential protein expression and localization of CYP450 enzymes in three species of earthworm; is this a reflection of environmental adaptation?. *Chemosphere*, 171, 485-490.
- Marshall, A. J., & Williams, W. D. (1985). *Zoología. Invertebrados* (Vol. 1). Reverté.
- Martínez, E., Fuentes, J. P., & Acevedo, E. (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 68-96.
- Masiá, A., Vázquez, K., Campo, J., & Picó, Y. (2015). Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túrria River Basin. *Journal of Chromatography A*, 1378, 19-31.
- Masschelein-Kleiner, L. (2004). Los solventes. *Santiago, Chile: Centro Nacional de Conservación y Restauración*.
- Menezes Filho, A., dos Santos, F. N., & de Paula Pereira, P. A. (2010). Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. *Talanta*, 81(1), 346-354.
- Mériaux, A., Pageau, P., Cormier, Y., Goyer, N., & Duchaine, C. (2006). Bioaerosols in peat moss processing plants. *Journal of occupational and environmental hygiene*, 3(8), 408-417.
- Nam, T. H., Jeon, H. J., Mo, H. H., Cho, K., Ok, Y. S., & Lee, S. E. (2015). Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental geochemistry and health*, 37(6), 943-951.
- NOM-021-RECNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Federación del, 14, 17.
- OAA.DC-LE-05 (2013) Guide for validation of test methods. *Version, 1*, 1-11.
- Odukkathil, G., & Vasudevan, N. (2016). Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation. *Journal of environmental management*, 165, 72-80.
- Organization for Economic Cooperation and Development OECD (1984) Earthworm, Acute Toxicity Tests-207. OECD guideline for testing of chemicals
- Peñaloza, G. S. A., Rincón, D. J. P., & Restrepo, L. G. C. (2013). Evaluación de la esterilización húmeda y la esterilización por microondas de dos tipos de suelos. *Revista científica*, 1(17), 87-93.
- Picón, M. C., & Teisaire, E. S. (2012). Identification of the Intestinal Microbial Community of Glossoscolecidae Earthworms (Annelida: Oligochaeta). *Mun. Ent. Zool*, 7(2), 1035-1043.
- Picón, M. C., Teisaire, E. S., & Bellone, C. H. (2014). Las cepas bacterianas del tubo digestivo de *Enantiodrilus borelli* (Annelida: Glossoscolecidae) y su recolonización en suelo estéril. *Rev. Agron. Noro. Argent*, 34(2), 46-49.
- Qiu, X., Li, W., Tian, Y., & Leng, X. (2003). Cytochrome P450 monooxygenases in the cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae): tissue difference and induction. *Journal of economic entomology*, 96(4), 1283-1289.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.
- Rashid, A., Nawaz, S., Barker, H., Ahmad, I., & Ashraf, M. (2010). Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(17), 2933-2939.
- Repetto M., Sanz P., Jurado C., López-Artíguez M., Menéndez M., & de la Peña E. (1995). Glosario de términos toxicológicos. *copyright c*.

- Rico A., Sabater C., & Castillo M. Á. (2016). Lethal and sub-lethal effects of five pesticides used in rice farming on the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 127, 222-229.
- Roberts B. L., & Dorough H. (1984). Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3(1), 67-78.
- Rodríguez, Y. M. V., & Valdivia, A. E. O. (2005). Cálculo de parámetros de rapidez en cinética química y enzimática. UNAM
- Romero-Aguilar, M., Tovar-Sánchez, E., Sánchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P., Sánchez-Meza, J. C., Castrejón-Godínez, M. L., ... & Ortiz-Hernández, M. L. (2014). *Penicillium* sp. as an organism that degrades endosulfan and reduces its genotoxic effects. *SpringerPlus*, 3(1), 536.
- Santiago Lugo, A. (1995). Estudio de la flora bacteriana intestinal de *Onychochaeta borincana* (Oligochaeta: Glossoscolecidae) en Puerto Rico. Master's thesis, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayaguez.
- Saxena, P. N., Gupta, S. K., & Murthy, R. C. (2014). Comparative toxicity of carbaryl, carbofuran, cypermethrin and fenvalerate in *Metaphire posthuma* and *Eisenia fetida*—a possible mechanism. *Ecotoxicology and environmental safety*, 100, 218-225.
- Shi Y., Zhang Q., Huang D., Zheng X., & Shi Y. (2015). Survival, growth, detoxifying and antioxidative responses of earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to soils with industrial DDT contamination. *Pesticide biochemistry and physiology*, 128, 22-29.
- Siddique, T., Zahir, Z. A., & Frankenberger Jr, W. T. (2003). Reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of endosulfan and its major metabolites. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 26(7), 1069-1082.
- Sonderfan, A. J., Arlotto, M. P., Dutton, D. R., McMillen, S. K., & Parkinson, A. (1987). Regulation of testosterone hydroxylation by rat liver microsomal cytochrome P-450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 255(1), 27-41.
- Stenersen, J. (1979). Action of pesticides on earthworms. Part II: Elimination of parathion by the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). *Pesticide Science*, 10(2), 104-112.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Review Committee. (2005). Report of the persistent organic pollutants review committee on the work of its first meeting. *Geneva: UNEP/POPS/POPRC*, 452.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants Review Committee. (2009). Report of the persistent organic pollutants review committee on the work of its fifth meeting. *Geneva: UNEP/POPS/POPRC.5/10/Add.2*.
- Tejada, M., Masciandaro, G., (2011). Application of organic wastes on a benzo(a)pyrene polluted soil. Response of soil biochemical properties and role of *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology Environmental Safety* 74, 668–674.
- Terry, F. A. J., Peñalver, D. A., López, M. R., Peralta, M. P., Cárdenas, M. L. O., Corona, M. P., & López, R. C. (2012). Uso de humus de lombriz en la formulación de sustratos para la aclimatización de cultivos tropicales. *Centro Agrícola*, 39(3), 37-44
- Thangadurai, P., & Suresh, S. (2014). Biodegradation of endosulfan by soil bacterial cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 94, 38-47.
- Tiwari M. K., & Guha S. (2013). Kinetics of the biodegradation pathway of endosulfan in the aerobic and anaerobic environments. *Chemosphere*, 93(3), 567-573.
- Tor, A., Aydin, M. E., & Özcan, S. (2006). Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil. *Analytica Chimica Acta*, 559(2), 173-180.
- Uzcátegui, J., Araujo, Y., & Mendoza, L. (2011). Residuos de plaguicidas organoclorados y su relación con parámetros físico-químicos en suelos del Municipio Pueblo Llano, Estado Mérida. *Bioagro*, 23(2), 115-120.

- Van der Hoeven, T. (1981). Testosterone oxidation by rat liver microsomes: effects of phenobarbital pretreatment and the detection of seven metabolites by HPLC. *Biochemical and biophysical research communications*, 100(3), 1285-1291.
- Vanegas, A. F. C. (2008). Relación del Carbono y Nitrógeno del suelo con usos y coberturas del terreno en Alcalá, Valle del Cauca (Doctoral dissertation, Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias Ambientales. Maestría en Ecotecnología).
- Vijver, M. G., Wolterbeek, H. T., Vink, J. P., & van Gestel, C. A. (2005). Surface adsorption of metals onto the earthworm *Lumbricus rubellus* and the isopod *Porcellio scaber* is negligible compared to absorption in the body. *Science of the Total Environment*, 340(1-3), 271-280.
- Villalobos-Maldonado J. J., Meza-Gordillo R., Mancilla-Margalli N.A., Ayora-Talavera T. R., Rodríguez-Mendiola M. A., Arias-Castro C., Vázquez-Villegas P.T., Ruíz-Valdiviezo V.M. (2015). Removal of Decachlorobiphenyl in Vermicomposting Process Amended with Rabbit Manure and Peat Moss. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(5), 1-11.
- Villalobos-Maldonado, J. J., Meza-Gordillo, R., Enciso-Sáenz, S., Castañon-González, J. H., Rosales-Quintero, A., Lagunas-Rivera, S., ... & Rincón-Rosales, R. (2017). Identificación molecular de bacterias en *Eisenia foetida* Savigny cultivadas, con potencial de remoción de contaminantes orgánicos persistentes. *Hormiga escamolera*.
- Vincent K. (2010). Probit analysis. The San Francisco State University. Department of Biology Document Repository. Last Accessed on March, 13, 2010.
- Viñas Canals, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universidad de Barcelona.
- Wang, X., Chang, L., Sun, Z., & Zhang, Y. (2010). Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in the earthworm *Eisenia fetida* during *Escherichia coli* O157: H7 stress. *Journal of proteome research*, 9(12), 6547-6560.
- Wang Y., Wu S., Chen L., Wu C., Yu R., Wang Q., & Zhao X. (2012). Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 88(4), 484-491.
- Wu S., Wu E., Qiu L., Zhong W., & Chen J. (2011). Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. *Chemosphere*, 83(4), 429-434.
- Yuk, J., Simpson, M. J., & Simpson, A. J. (2013). 1-D and 2-D NMR-based metabolomics of earthworms exposed to endosulfan and endosulfan sulfate in soil. *Environmental pollution*, 175, 35-44.
- Zenteno-Rojas, A., Martinez-Romero, E., Rincón-Molina, C. I., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Meza-Gordillo, R., Villalobos-Maldonado, J. J., & Rincón-Rosales, R. (2019). Removal of High Concentrations Decachlorobiphenyl of Earthworm *Eisenia fetida* and its Symbiotic Bacteria in a Vermicomposting System. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(6), 116.
- Zhang, T., Zhu, Y., & Gunaratna, C. (2002). Rapid and quantitative determination of metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates by gradient liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 780(2), 371-379.
- Zhang, Q., Zhu, L., Wang, J., Xie, H., Wang, J., Han, Y., & Yang, J. (2013). Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(1), 201-208.

10. ANEXOS

10.1 Cuantificación de proteína

Se realizó una curva estándar con base en la metodología de Folin-Lowry (Layne, 1957), teniendo como referencia a la albúmina sérica bovina, como se observa en la figura 27; teniendo la ecuación (4) con una $R^2 = 0.9977$

$$Y = 0.9569X + 0.0005 \quad \text{Ec. (4)}$$

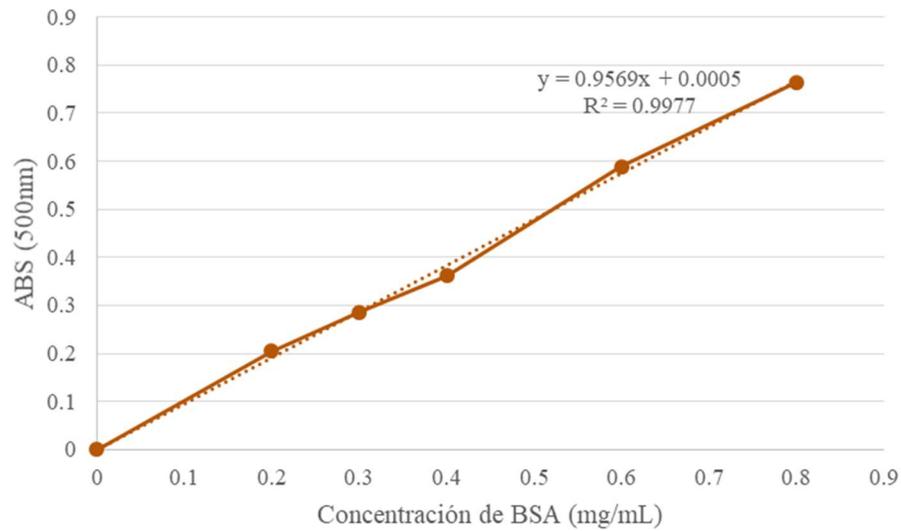


Figura 27. Curva estándar para la determinación de proteínas