

T
628.44
C65

**NO SALE A
DOMICILIO**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
AMAZONIA PERUANA**



Escuela de Postgrado "José Torres Vásquez"

**PROGRAMA DE MAESTRIA EN ECOLOGÍA Y DESARROLLO
SOSTENIBLE**

**Lixiviado de residuos sólidos del relleno sanitario
manual de Nauta y su genotoxicidad en *Eisenia
foetida* "lombriz roja"**

**Autoras: Marianela Cobos Ruiz
Milagros Costa Sinacay**

**Tesis para obtener el Grado Académico de Magister en Ecología y
Desarrollo Sostenible**

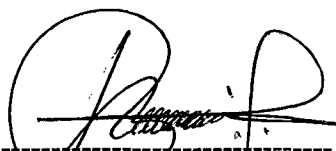


IQUITOS - PERU

2011

DONADO POR:
Cobos Ruiz Marianela y otros
Iquitos, 18 de 05 de 2011

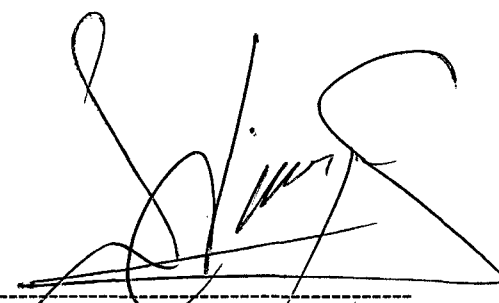
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR




Dr. Roberto Pezo Díaz
Presidente



Dra. Maritza Grández Ruíz
Miembro



MSc. Pedro Adrianzen Julca
Miembro



Dr. Juan Carlos Castro Gómez
Asesor

DEDICATORIA

*A mis padres; José y Laura a quienes
debo todo lo que hasta hoy he podido
lograr.*

*A mi amado esposo y amigo Juan
Carlos; por su amor y apoyo
incondicional en el logro de esta meta
trazada. Ya mis tres tesoros; Carlos
Gilberto, Juan José y Juan
Carlitos, quienes han sacrificado parte
de su tiempo de estar juntos para así
lograr este objetivo.*

Marianela Cobos Ruiz

A Dios por su Fortaleza, a mis padres Francisco y Gladis, mis hermanas Isella y Fiorella, por su apoyo incondicional, y por estar siempre conmigo, son mi principal motivo para seguir superándome.

Milagros Costa Sinacay

AGRADECIMIENTOS.

Al Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía, por permitirnos el acceso a sus instalaciones, uso de materiales y equipos.

A la Municipalidad Provincial de Loreto-Nauta, por permitirnos el acceso al Relleno sanitario manual, sin ello no hubiera sido factible la realización de este trabajo de investigación.

Al proyecto multidisciplinario “Estudio sobre la concentración de contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos en lixiviados del relleno sanitario manual de Nauta y en aguas de pozos aledaños-Región Loreto” por el apoyo en el análisis de metales del lixiviado.

Al proyecto multidisciplinario “Expresión de genes que codifican enzimas de la vía biosintética Smirnoff -Wheeler y su relación con la concentración de vitamina C en frutos de *Myrciaria dubia* (HBK) Mc vaugh “camu camu”. Iquitos-Perú por el apoyo con materiales y reactivos empleados en la etapa experimental de nuestra tesis.

Al Centro de Capacitación en Conservación Interdisciplinaria en Amazonia Occidental CCCIAMAZ-UNAP, entidad que en el marco del Acuerdo MacArthur-UNAP, contribuyó económicamente en el desarrollo de la presente tesis.

Al Dr. Juan Carlos Castro Gómez, quien como asesor y amigo, nos brindó orientación constante y confianza durante la ejecución de nuestro trabajo de tesis.

Al Sr. Francisco Santiago Costa Oliva, colaborador y sobre todo un buen padre. Agradecimiento muy especial por el apoyo logístico en la obtención de material biológico y acceso a las instalaciones del relleno sanitario manual de Nauta.

A cada uno de nuestros profesores de la maestría, en especial al Msc. Angel Ruiz Frías y a la Msc. Mery Ushiñahua Álvarez; quienes con sus sabias enseñanzas y consejos nos estimularon para la culminación de esta investigación.

A nuestros amigos y compañeros de la maestría; Kosseth Bardales, Victor Gonzales, Miguel Gutierrez, David Laurel, Llaqueli Apuela, Antonio Suárez, Rocky Lizama, Arnulfo Shupingahua, Neptali Flores, Carlos Tong, Gabriel Valdivia, Karla Camacho, Augusto Freitas, Jack Flores, Rafael Tello, Connie Gálvez, Oscar Llapapasca, Ruler Soto, Julio Novoa, Aquiles Sánchez, Freddy Dávila, Maritza Echevarría, Janeth Mayora y Luis Rossi, quienes en el transcurso de estos años nos brindaron su amistad sincera y opiniones acertadas durante la ejecución de nuestro trabajo de tesis.

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron con la realización de nuestra investigación.

ABREVIATURAS

% HCC	Porcentaje de Humedad a Capacidad de Campo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
Ag	Plata
Al	Aluminio
ANOVA	Análisis de Varianza
As	Arsénico
ATP	Adenosina Trifosfato
Ba	Bario
Be	Berilio
BER	Reparación por Excisión de Bases
Bi	Bismuto
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
CONAM	Consejo Nacional del Ambiente
Cr	Cromo
Cs	Cesio
Cu	Cobre
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DIGESA	Dirección General de Salud Ambiental
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DQO	Demanda Química de Oxígeno
EDTA	Acido Etilenodiamino Tetraacético
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
Fe	Hierro
GC-MS	Cromatografía de Gases, Espectroscopia de Masas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Hg	Mercurio
K	Potasio
Li	Litio
LMP	Límites Máximos Permisibles
Mn	Manganeso
MN	Micro Núcleos
Mo	Molibdeno
N	Nitrógeno
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NER	Reparación por Excisión de Nucleótidos
Ni	Níquel
O₂⁻	Superóxido
OH⁻	Radicales hidroxilo
P	Fósforo

Pb	Plomo
PBS	Buffer Fosfato Salino
RSU	Residuos Sólidos Urbanos
Sb	Antimonio
SCGA	Ensayo de Electroforesis en Gel de Células simples
Se	Selenio
Si	Silicio
SITIRS	Sistema de Tratamiento Integral de Residuos Sólidos para Nauta
Sn	Estaño
Sr	Estroncio
Ta	Talio
Ti	Titanio
UA	Unidades arbitrarias
V	Vanadio
W	Tungsteno
Zn	Zinc

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	TITULO	Pág.
01	Informe de análisis de metales presentes en lixiviado de residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	TITULO	Pág.
01.	Ciclo vital de <i>Eisenia foetida</i>	58
02.	Diseño del experimento	59
03.	Ruta de acceso al relleno sanitario manual de Nauta	60
04.	Vista del relleno sanitario manual	61
05.	Ampliación del relleno sanitario	61
06.	Poza donde se almacena el lixiviado que genera el relleno sanitario manual	61
07.	Canales construidos para el recorrido del lixiviado hacia la poza de Almacenamiento	61
08.	Ejemplar de <i>Eisenia foetida</i>	63
09.	Crianza y mantenimiento de las lombrices	63
10.	Remoción del sustrato como parte del mantenimiento durante el cultivo	63
11.	Control de la humedad del suelo al realizarse la adición de nuevo sustrato	63
12.	Control de viabilidad de las lombrices	64
13.	Presencia de tocones (huevos) de las lombrices encontrados en el sustrato	64
14.	Preparación de componentes del suelo	64
15.	Ejemplares adultos de 300 a 600mg de peso	64
16.	Pesado de suelo a utilizar (200g)	65
17.	Adición del lixiviado en el suelo preparado	65
18.	Distribución de lombrices por tratamiento	65
19.	Proceso de evaluación aplicando diferentes tratamientos	65

20.	Diferentes concentraciones del lixiviado	65
21.	Lombrices en purga por 24 a 48 horas	67
22.	Lombrices en solución de extrusión fría por 2 a 4 minutos	67
23.	Adición de capas de agarosa	68
24.	Homogenización de mezcla de celomocitos con agarosa	68
25.	Láminas en proceso de lisis	69
26.	Electroforesis en condiciones de refrigeración	69
27.	Láminas en solución alcalina por 25 minutos	69
28.	Láminas en proceso de fijación y tinción	70
29.	Colecta de lixiviado de la poza	71
30.	Nivel de daño genotóxico en células estudiadas	72
31.	Nivel de daño genotóxico en celomocitos de <i>Eisenia foetida</i> expuesto a diferentes concentraciones de lixiviado	73
32.	Relación entre la concentración de lixiviado, tiempo de exposición y nivel de daño genotóxico	74
33.	Distribución del sistema de drenaje del lixiviado	82
34.	Detalles de la zanja para el almacenamiento del lixiviado	83
35.	Zanja de lixiviado para recibir las llantas usadas	84
36.	Red de zanjas externas para el almacenamiento del lixiviado	84
37.	Cubierta o techo ligero para evitar el ingreso del agua de lluvia al relleno sanitario manual	85
38.	Tamaño y Niveles de daño de los cometas obtenidos	114
39.	Mecanismos de acción de los iones metálicos	115

INDICE DE ANEXOS

N°	TITULO	Pág.
1.-	Glosario de términos	102
2.-	Protocolo de laboratorio	106
3.-	Ficha de registro para observación de cometas	113
4.-	Tamaño y niveles de daño de los cometas obtenidos	114
5.-	Mecanismos de acción de los iones metálicos	115

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>v</i>
ABREVIATURAS	<i>vi</i>
INDICE DE TABLAS	<i>viii</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
INDICE DE ANEXOS	<i>x</i>
RESUMEN	<i>xv</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO II	
2.1. ANTECEDENTES	
2.1. 1. MARCO LEGAL	19
2.1.2. REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1.3. MARCO TEÓRICO	34
2.1.3.1. Diagnóstico del relleno sanitario manual de Nauta	34
2.1.3.1.1. Situación actual en el manejo de los residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta	35
2.1.3.1.2. Clasificación de los residuos sólidos según su origen de acuerdo a la Ley General de Residuos Sólidos. Ley N° 27314	36
2.1.3.1.3. Impactos de una gestión inadecuada de los residuos sólidos	37
2.1.3.1.4. Competencia de las municipalidades provinciales y distritales en el relleno sanitario	42
2.1.3.2. EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN ORGANISMOS EXPUESTOS A CONTAMINANTES AMBIENTALES.	
2.1.3.2.1. Contaminantes ambientales (o xenobióticos)	45
2.1.3.2.2. Genotoxicidad	46

2.1.3.2.3	Estudios genotóxicos <i>in vitro</i>	47
2.1.3.2.4	Los metales como posibles causantes de genotoxicidad	48
2.1.3.2.5	Toxicidad de los metales pesados	49
2.1.3.2.6	Genotoxicidad de los metales pesados	51
2.1.3.2.7	Detección del daño genotóxico	52
2.1.3.2.8	El Ensayo cometa	52
2.1.3.3.	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE EN ESTUDIO	
2.1.3.3.1	Características generales de <i>Eisenia foetida</i>	54
2.1.3.3.2	Anatomía y fisiología de la lombriz	56
2.1.3.3.3	Taxonomía de la lombriz	57
2.1.3.3.4	Ciclo vital de <i>Eisenia foetida</i>	57
CAPÍTULO III		
3.1.	METODOLOGIA	
3.1. 1.	Tipo de investigación	59
3.1.2.	Diseño de investigación	59
3.1.3.	Población y muestra	60
3.1.3.1.	Ubicación del Área de Estudio	60
3.1.3.2.	Población	62
3.1.3.3.	Muestra	62
3.1.4.	Evaluación del nivel de daño genotóxico en celomocitos de <i>Eisenia foetida</i> expuestos a diferentes concentraciones del lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta	62
3.1.4.1.	Obtención y cultivo de lombrices	62
3.1.4.2.	Exposición de <i>Eisenia foetida</i> "lombriz roja" a diferentes diluciones de lixiviado	64
3.1.4.2.1	Evaluación de la genotoxicidad en celomocitos de <i>Eisenia foetida</i> a través del ensayo cometa	67
3.1.4.3.	Técnica de Recolección de Datos	70

3.1.4.4.	Análisis de metales en el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta	71
3.1.4.4.1	Toma de la muestra de lixiviado	71
3.1.4.4.2	Análisis de metales presentes en el lixiviado	71
3.1.4.5	Instrumentos para la recolección de datos	71
3.2	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	
3.2.1.	Recuento de cometas	72

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1.	Genotoxicidad en celomocitos de <i>Eisenia foetida</i> expuestos al lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta	73
4.2	Análisis de metales del lixiviado de residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta	74
4.3	PROPUESTA DE DISEÑO DE TRATAMIENTO DE LIXIVIADO EN BASE A REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
4.3.1.	Para el diseño del sistema de drenaje de lixiviado	80
4.3.2.	Respecto al volumen de lixiviado	80
4.3.3.	Longitud del sistema de zanjas para el lixiviado	81
4.3.4.	Drenaje y manejo del lixiviado	81
4.3.5.	Construcción del sistema de drenaje interno de lixiviado	82
4.3.6.	Control y almacenamiento del lixiviado	86
4.3.7.	Tratamiento del lixiviado	86
4.3.8.	Aislamiento del almidón del plátano	87
4.3.9.	Preparación de las mezclas coagulantes	87
4.3.10.	Realización del experimento	88

CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN	89
CAPÍTULO VI	
CONCLUSIONES	94
CAPÍTULO VII	
RECOMENDACIONES	95
CAPÍTULO VIII	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	
1.-Glosario de términos	102
2.-Protocolo de laboratorio	106
3.-Ficha de registro para observación de cometas	113
4.-Tamaño y niveles de daño de los cometas obtenidos	114
5.- Mecanismos de acción de los iones metálicos	115

RESUMEN

La normativa ambiental vigente en nuestro país, referida a la descarga de efluentes líquidos y lixiviados no contempla la evaluación de su genotoxicidad. Por lo que el presente estudio proporciona las bases para medir los efectos genotóxicos de los lixiviados en un organismo modelo, *Eisenia foetida* proporcionando así una herramienta necesaria para determinar el daño genotóxico de organismos expuestos a contaminantes ambientales.

El lixiviado fue colectado en el relleno sanitario manual de Nauta. Para evaluar la genotoxicidad se expuso lombrices adultas de *Eisenia foetida* a diferentes concentraciones del lixiviado (1:1, 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000) por 7, 14 y 21 días. Luego se obtuvieron los celomocitos de las lombrices para registrar los cometas producidos. Los resultados nos muestran que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la cantidad de cometas inducidos entre los días de tratamiento y entre las concentraciones evaluadas, de tal manera que a mayor concentración de lixiviado y a mayor tiempo de exposición se observa un mayor daño genotóxico en los celomocitos de *Eisenia foetida*. El efecto genotóxico encontrado se atribuye a la presencia de los iones metálicos presentes en el lixiviado. Por lo que para minimizar el efecto genotóxico del lixiviado proponemos el empleo de mezclas preparadas con almidón de plátano-sulfato de aluminio y arcillas con propiedades coagulantes para el tratamiento de lixiviados ya que constituyen una opción de tratamiento físico en nuestra región. En conclusión, el lixiviado generado en el relleno sanitario manual de Nauta muestra efecto genotóxico en celomocitos de *Eisenia foetida*.

Palabras claves: lixiviado, genotoxicidad, *Eisenia foetida*, relleno sanitario manual de Nauta.

ABSTRACT

Environmental standards in our country, relating to the discharge of wastewater and leachate does not include the assessment of genotoxicity. As this study provides the basis for measuring the genotoxic effects of leachate as a model organism, *Eisenia foetida* providing a necessary tool to determine the genotoxic damage of organisms exposed to environmental contaminants.

The leachate was collected in the sanitary landfill of Nauta. To evaluate the genotoxicity was exposed adult worms *Eisenia foetida* in different concentrations of the leachate (1:1, 1:2, 1:10, 1:100 and 1:1000) for 7, 14 and 21 days. Celomocytes were then extracted from the worms to record the comets produced. The results show significant differences ($p < 0.05$) in the number of comets induced between days of treatment and the concentrations evaluated, so that the higher concentration of leachate and longer exposure time has become more genotoxic damage celomocytes in *Eisenia foetida*. The genotoxic effect found is attributed to the presence of certain metals and probably other components of the leachate. So to minimize the genotoxic effect of the leachate suggest the use of mixtures prepared with banana starch-clay and aluminum sulfate coagulation properties for treating leachate as they are a physical treatment option in our region. In conclusion, the leachate generated at the landfill Nauta manual shows celomocytes genotoxic effect in *Eisenia foetida*.

Key words: leachate, genotoxicity, *Eisenia foetida*, Nauta manual filling.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La norma legal en materia ambiental en el Perú es la Ley N° 28611 (2005), Ley General del Ambiente que incorporó la gestión de residuos sólidos en el concepto de saneamiento básico; antes de esta ley, el saneamiento básico sólo consideraba el tema de aguas¹.

La normativa ambiental vigente en nuestro país, referida a la descarga de efluentes líquidos y lixiviados no contempla la evaluación de su genotoxicidad; esto significa que un efluente determinado puede ser tóxico para los organismos pero al cumplir con los límites de descarga establecidos pueda ser descargado en un cuerpo de agua determinado. La toxicidad de un lixiviado no puede ser entendida, ni explicada, solamente por el análisis de las concentraciones de sustancias o parámetros individuales. Por el contrario, es la resultante de la interacción, sinergista o antagonista, de cada uno de los componentes físicos y químicos que los componen. Por lo tanto, la única manera de evaluar su potencia tóxica es mediante la aplicación de ensayos o pruebas de toxicidad, utilizando organismos modelos para tal fin¹.

La Agencia de Medio Ambiente de Estados Unidos ha analizado hasta 200 compuestos diferentes presentes en los lixiviados en los vertederos de residuos sólidos urbanos. Algunos como cloruro de vinilo, cloruro de metilo, tetracloruro de carbono, clorobencenos (de los que destaca el hexaclorobenceno, por su toxicidad) y arsénico son sustancias cancerígenas. Al igual que el resto de las sustancias organocloradas, son persistentes y bioacumulables en todos los eslabones de la cadena trófica. El plomo, cadmio y el mercurio son metales pesados presentes en los lixiviados de los vertederos. El plomo procede principalmente de las baterías de los coches y de aparatos electrónicos, plásticos, vidrio, cerámica, pigmentos, etc. El plomo ocasiona lesiones cerebrales en los niños e hipertensión arterial en adultos. El mercurio produce lesiones renales y neurológicas. Las fuentes de cadmio y mercurio son fundamentalmente las pilas. El cadmio, además, se encuentra en los aparatos electrónicos, plásticos, etc.; produce lesiones renales y hepáticas².

Los estudios genotóxicos son más rápidos y baratos de analizar y son más fáciles de interpretar, ya que indican el daño en las células de los organismos que han estado expuestos, e incluso si está siendo afectado por la presencia de contaminantes tóxicos u otros estresores,

como la falta de oxígeno. Se podrá incluir este tipo de estudios en los programas de monitoreo, ya que anteriormente no se consideraba por su costo relativamente alto y la dificultad de interpretar los resultados, entre otras razones³. Una característica importante y diferenciadora de los riesgos genotóxicos es que sus efectos no siempre son evidentes, sino que la mayoría de las veces cuando se reconoce este riesgo es demasiado tarde y ya se han producido daños importantes en la salud de los organismos vivos, incluyendo el hombre².

Por lo que; el presente estudio tiene como principal objetivo establecer la genotoxicidad de los lixiviados en celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos al lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta; así como también analizar posibles causas de genotoxicidad y proponer un diseño de tratamiento de lixiviados en base a revisión bibliográfica, proporcionando así, las bases para medir los efectos genotóxicos de los lixiviados en organismos que se encuentran en el ambiente, ya que se basan en mecanismos genéticos que fundamentan la toxicidad, proporcionando así una herramienta necesaria para determinar el daño en el ADN de los organismos expuestos a los contaminantes ambientales, debido a que muchos de estos no son biodegradables, por tanto, su permanencia en el ambiente plantea una amenaza a largo plazo para la salud pública y la vida silvestre, donde los cambios biológicos debido a la contaminación ocurre en todos los niveles de organización, desde molecular hasta niveles de comunidad.

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1 MARCO LEGAL

La Ley General del Ambiente en el Perú, establece que toda persona tiene el derecho irrenunciable a vivir en un ambiente saludable, equilibrado y adecuado para el pleno desarrollo de la vida, y el deber de contribuir a una efectiva gestión ambiental y de proteger el ambiente, así como sus componentes. De este modo, se asegura particularmente la salud de las personas en forma individual y colectiva, la conservación de la diversidad biológica, el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales y el desarrollo sostenible del país¹.

Esta misma ley, incorporó la gestión de residuos sólidos en el concepto de saneamiento básico. Antes de esta ley, el saneamiento básico sólo consideraba lo referente a las aguas.

El contenido constitucional del derecho al medio ambiente está delimitado por dos elementos: 1) el derecho a gozar de ese medio ambiente y 2) el derecho a que ese medio ambiente se preserve; por ese motivo se debe entender al ambiente como un bien jurídico constitucional, digno de protección y promoción, ello nos lleva a la conclusión que, dado el carácter complejo del medio ambiente, éste merece un enfoque ecosistémico e interdisciplinario, que nos permita entender que la decisión o el tratamiento jurídico de algún problema ambiental tiene implicancias en otros aspectos ambientales⁴.

A través del principio de sostenibilidad; la gestión y manejo del ambiente y de sus componentes, así como el ejercicio y la protección de los derechos que establece la Ley General del Ambiente, se sustentan en la integración equilibrada de los aspectos sociales, ambientales y económicos del desarrollo nacional, así como en la satisfacción de las necesidades de las actuales y futuras generaciones. Este principio permite integrar la política ambiental con las demás políticas públicas, los procesos de planificación, decisión y ejecución de políticas públicas en todos los niveles de gobierno⁵.

Asimismo, refiere que por el principio de prevención, el diseño de los instrumentos de gestión ambiental debe tener como objetivos prioritarios; prevenir, vigilar y evitar la

degradación ambiental. Cuando no sea posible eliminar las causas que la generan se adoptarán las medidas de mitigación, recuperación, restauración o eventual compensación, que correspondan⁵.

La prevención es uno de los pilares fundamentales en la gestión ambiental a fin de prevenir actos que provocan un deterioro del ambiente en cierto modo irreversible. En tal sentido, consiste en el conocimiento y valoración anticipada de los peligros y riesgos asociados a ciertas actividades que potencian y probablemente puedan causar daños ambientales⁵.

Referente al principio precautorio, establece que cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la falta de certeza absoluta no debe utilizarse como razón para postergar la adaptación de medidas eficaces y eficientes para impedir la degradación del ambiente⁵. La aplicación del principio precautorio requiere el cumplimiento de los siguientes presupuestos:

a. Identificar la posible amenaza y caracterizar el problema: el propósito es lograr una mejor comprensión de lo que podría suceder si la actividad económica continúa.

b. Identificar lo que se sabe y lo que no se sabe sobre la amenaza; es decir, lograr un mejor análisis sobre la incertidumbre que rodea la comprensión de la amenaza, de ahí que es preciso hacer el análisis técnico y científico sobre la misma.

c. Reformular el problema para obtener una descripción de lo que debe hacerse; es decir, entender qué se pretende obtener con la actividad propuesta, por lo que puede entonces reformularse el problema en términos de que se debe lograr y facilitar la identificación de posibles alternativas.

d. Evaluar las alternativas a partir del análisis exhaustivo de las alternativas propuestas. La aplicación del principio precautorio nos permite reenfocar la pregunta que debe formularse la autoridad ambiental o la empresa; así en vez de preguntar qué nivel de riesgo es aceptable, se puede preguntar si existe una forma más segura y más limpia de realizar esa actividad; sin embargo, esta nueva propuesta debe considerar que el principal enfoque es la tutela y protección del ambiente ante la incertidumbre científica.

e. Adoptar la alternativa. De esta forma, dentro de las diversas opciones, con la información recabada es preciso determinar el grado de precaución a adoptar, como paralizar las actividades, exigir alternativas o modificaciones de un proyecto determinado.

f. Realizar un programa de monitoreo y seguimiento sin importar qué medida se adopte, es imprescindible identificar resultados esperados e inesperados; de ahí que sea preciso contar de manera independiente con una entidad responsable del monitoreo y seguimiento.

El impacto al ambiente no sólo procede de la extracción de las materias primas, sino también de las emisiones y residuos producidos durante el procesamiento de los bienes y de una disposición final inadecuada. Entonces, para que el desarrollo sea sostenible es imprescindible pensar en todo el ciclo productivo considerando los principios de minimización del uso de materia prima, re-uso y reciclaje de los productos, así como de la disposición final adecuada de los residuos. Una disposición final inadecuada ocasiona graves impactos sociales, ambientales y económicos, violando derechos fundamentales de la población a su salud y a un ambiente ecológicamente equilibrado y sano⁶.



2.1.2 REVISIÓN DE LITERATURA

Al evaluar el efecto biológico de uranio empobrecido y natural en las lombrices de *Eisenia foetida*, las concentraciones de metales en el suelo experimental variaron de 1,86 a 600 mg kg⁻¹. Se tuvo en cuenta aspectos de mortalidad, peso, estabilidad de la membrana lisosomal midiendo el tiempo de retención con rojo neutro, los cambios histológicos y los efectos genéticos (ensayo cometa) para evaluar los efectos biológicos en las lombrices de tierra después de 7 y 28 días de exposición. No hubo efectos en términos de mortalidad o la reducción de peso. Los efectos citotóxicos y los genotóxicos fueron bajas en las concentraciones del uranio natural. Para algunos de los criterios de valoración, en especial los efectos genéticos, la dosis uranio-efecto de las relaciones se han encontrado en forma no lineal. Los resultados muestran un nivel estadísticamente significativo más alto de incidencia en las lombrices expuestas a uranio natural en comparación con el uranio empobrecido⁷.

E. foetida puede desarrollar una mayor tolerancia a pruebas citotóxicas y genotóxicas con exposiciones a largo plazo a una concentración subletal de cadmio en el laboratorio. Se expusieron ejemplares de *E. foetida* de una población control de laboratorio y de una población de campo a varias concentraciones de sulfato de cadmio en el agua del suelo artificial. El grupo que había estado expuesto a cadmio durante más de una década fueron más tolerantes a los efectos deletéreos de Cd en ambos niveles celulares y moleculares de la población de control de laboratorio. La población de campo, que procedía de un entorno muy contaminado por metales, mostró también alta tolerancia a nivel molecular. Los resultados ofrecen nueva evidencia de biomarcadores de mayor tolerancia de Cd en *E. foetida*, pero los mecanismos que sustentan la aparente tolerancia, no son muy claros⁸.

La mutagenicidad inducida por metales en las lombrices de tierra fueron observadas en experimentos de la generación de 8-oxoguanina (en las lombrices de tierra expuestos a suelos con cadmio y níquel. Este compuesto es un importante premutagénico que ocasiona daño oxidativo en el ADN, induciendo mutaciones puntuales, lo que lleva a la carcinogénesis⁹.

Los tres estados de crecimiento (adultos, en formación e inmaduros) de *E. foetida* fueron expuestos durante 14 días a suelos mezclados con desechos contaminantes de la minería. Los efectos tóxicos sobre el crecimiento de las lombrices inmaduras fueron causados por proporciones de 5 y 10% de los residuos mineros, mientras que los maduros o en formación no mostraron ningún efecto adverso sobre el crecimiento. Además, sólo los gusanos inmaduros expuestos a los suelos con las escombreras dieron una pérdida de peso corporal del 10%, que contrasta con el resultado de que el peso corporal de los gusanos inmaduros aumentó sobre todo cuando se expone al control. Las concentraciones de arsénico en las lombrices de tierra con más de 14 días de exposición no mostraron ninguna diferencia con la madurez inicial de la lombriz. Los resultados indican que la capacidad de resistencia a la toxicidad y el grado de tolerancia a los contaminantes dependen del estado de madurez de *E. foetida*¹⁰.

La genotoxicidad del endosulfán en la lombriz de tierra utilizando el ensayo cometa, fue significativamente más alta que en los controles ($p < 0,01$). Además que el aumento de las lesiones al ADN depende de las dosis de exposición durante los 28 días que duró el ensayo. Tal es así que, el daño del ADN en celomocitos de la lombriz de tierra tratados con la mayor dosis (1,0 y 10,0 mg/kg) fue significativamente mayor que en los tratados con 0,1 mg/kg ($p < 0,05$)¹¹.

El tratamiento de los lixiviados como desarrollo sostenible es importante por cuanto disminuye la contaminación ambiental, sobre todo en temporada de lluvias; por ello, en periodo de lluvias las 12 mil toneladas de basura que genera a diario el Distrito Federal de México dan lugar a los lixiviados de rellenos sanitarios, uno de los contaminantes más peligrosos para el ambiente, en particular para los acuíferos; los lixiviados son una corriente líquida que se genera en los basureros por efecto de la lluvia, y tienen una alta concentración de contaminantes, 100 veces superior a la de las aguas residuales, por lo que tiene un riesgo potencial muy alto para el entorno¹².

Si no se trata los lixiviados en una región vulnerable como la ciudad de México pueden filtrarse al subsuelo y contaminar los mantos freáticos, de donde se extrae gran parte del agua potable que consumen los habitantes; incluso, un manto acuífero

contaminado con lixiviados requiere de tecnología avanzada para quitarle los metales pesados y las sales, con el propósito de volverlo seguro para el uso humano¹².

El modelo de manejo de desarrollo sostenible presenta el primer sistema móvil para descontaminación y tratamiento de lixiviados en vertederos, lo cual permite a los vertederos moverlos de un centro a otro según lo necesiten, hasta la fecha en los vertederos pequeños y medianos no se podían realizar grandes inversiones en plantas fijas. Los lixiviados, generados por los residuos acumulados, son depositados en las balsas de los vertederos, que deben ser vaciadas y tratadas cada cierto tiempo dependiendo de su capacidad de almacenamiento. El correcto tratamiento de estas balsas supone un beneficio medioambiental para la zona en la que se encuentre el vertedero al disminuir su impacto en el área y además, es capaz de generar recursos reutilizables, así, permite la recuperación y transformación de los residuos en abonos y reutilizar el agua para riego u otros usos industriales. Con el uso de este tipo de plantas, los vertederos no sólo estarán reduciendo sus gastos de vertido y tratamiento, sino que además, aprovecharán los residuos generados y minimizarán un potencial riesgo de contaminación¹³.

Existen tres métodos de obtención de celomocitos de *E. foetida*: 1) punción de la cavidad celómica, 2) extrusión por excitación eléctrica y 3) extrusión en un medio irritante. Con los tres métodos existe una alta viabilidad celular (95 a 98%) y la cantidad de celomocitos/lombriz obtenidos son de 8.9×10^4 , 2.5×10^6 y 6.0×10^6 para los métodos 1, 2 y 3 respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$). Si bien el número de células obtenidas por extrusión con medio irritante es el más alto, el método que emplea excitación eléctrica ofrece las ventajas de producir suspensiones con menor cantidad de sustancias químicas agregadas que podrían interferir en ensayos posteriores. Además, por ser más sencillo, rápido y económico, resulta una alternativa útil para la obtención de celomocitos de *E. foetida* en los ensayos cometa y biomarcadores no específicos de estrés ambiental¹⁴.

La aplicación de bioensayos para evaluar el peligro de toxicidad de lixiviados descargados en un medio acuático, los cuales son una mezcla compleja de productos químicos, siendo difícil evaluar el riesgo que representa para la fauna acuática utilizando las técnicas de identificación de productos químicos, como la cromatografía de gases y

espectroscopía de masas (GC-MS). De esta revisión se desprende que las pruebas de toxicidad, utilizando especies que representan los diferentes niveles tróficos, es una forma superior a predecir el riesgo que plantea la aprobación de la gestión que el análisis químico. Estudios previos evaluaron la toxicidad de lixiviados utilizando bacterias, algas, plantas, invertebrados y peces. Los estudios mostraron que existen varios niveles de toxicidad de los lixiviados en las especies evaluadas. El amoníaco, la alcalinidad, los metales pesados y los compuestos orgánicos recalcitrantes fueron identificados como la causa de reacciones adversas de los organismos de prueba¹⁵.

El ensayo cometa en *Eisenia foetida* expuesta a suelos contaminados con Cd y Pb, donde la exposición a Cd causó diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento (ANOVA, $p < 0,05$, $p < 0,01$) y un perfil positivo de dosis-respuesta. En cuanto al tratamiento con Pb, no hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con 50 y 500 mg kg⁻¹ de Pb y el control. Los resultados mostraron que el daño del ADN inducido por Cd fue mayor que con Pb¹⁶.

La genotoxicidad de suelos contaminados en *Eisenia foetida* en Lorena Francia, donde las lombrices fueron expuestas por 4 y 10 días. Encontrando daño a nivel de ADN, además que los contaminantes genotóxicos en el suelo presentaban biodisponibilidad a pesar de la edad de la tierra contaminada. Entre los contaminantes encontrados en el suelo se mencionan a los hidrocarburos aromáticos policíclicos que parecía ser la fuente más probable de la genotoxicidad registrada, aunque los efectos de los metales no podían excluirse. La medición de efectos genotóxicos en las lombrices de tierra podrían complementar las pruebas estandarizadas existentes utilizadas en la evaluación ecotoxicológica de los riesgos asociados a suelos contaminados¹⁷.

El contenido de metales de los residuos sólidos urbanos (RSU) que han pasado por un proceso de separación tiene inherentemente más baja disponibilidad de metales en general, en comparación con los residuos que son colocados sin ningún proceso de segregación. Los procesos de compostaje también reducen la disponibilidad de metales en comparación con otros métodos de estabilización de residuos orgánicos. El zinc es el elemento en el suelo agrícola identificado como la principal preocupación en relación con

los impactos potenciales sobre la actividad microbiana del suelo y también es el metal más importante en el compost con respecto a la fertilidad del suelo y los procesos microbianos. Sin embargo, con la excepción de un estudio, no hay otras pruebas tangibles que demuestren los efectos negativos de los metales pesados en el caso del suelo de compost en los procesos microbianos del suelo y sólo son reportados efectos positivos de la aplicación de compost en el estado de los microorganismos y la fertilidad del suelo. Los impactos negativos sobre los microorganismos del suelo se dan a largo plazo y podría ser explicada por las concentraciones excepcionalmente altas de diversos metales pesados y otros elementos¹⁸.

El ensayo cometa se basa en el hecho de que bajo condiciones normales la célula tiene en su núcleo ADN enrollado e intacto, mientras que al ser expuesta a sustancias genotóxicas éste se fragmenta. En consecuencia, al lisar las membranas plasmática y nuclear y someter a electroforesis el ADN intacto no migrará significativamente en comparación con el ADN fragmentado. Las condiciones alcalinas de la técnica permiten evidenciar roturas de una sola hebra, sitios de reparación retardados y sitios alcalinos lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evaluar fragmentación de las dos hebras del ADN. La imagen que se observa después de revelar el gel es semejante a un cometa, donde la cabeza representa el ADN sin dañar y la cola el ADN fragmentado. El ensayo puede ser utilizado rutinariamente, debido a su sencillez y rapidez y se emplea para probar la genotoxicidad de nuevos compuestos antes de ser puestos en el mercado³.

Los metales, como el Fe, Zn y Cd, son los principales contaminantes en los ecosistemas acuáticos. Además, que éstos metales normalmente están presentes en estos ecosistemas en forma de mezclas, y su efecto en los organismos expuestos es el resultado de las interacciones que ocurren entre los metales, así como con otros contaminantes y factores ambientales. Se evaluó la absorción de Cd, Fe y Zn en forma individual y como una mezcla y su efecto en adenosin trifosfato (ATP). *Hoffmeisteri limnodrillus*, un organismo acuático importante dado su resistencia a grandes cantidades de estos xenobióticos, para ello se expuso durante 96 horas a los sedimentos tratados con cada uno de estos metales por separado y en mezcla. Los tres metales provocaron una importante disminución en el contenido de ATP cuando actúan por separado y como parte de una

mezcla. Cuando se presenta como una mezcla, su asimilación y efecto en el organismo se modifican. Por lo tanto, un enfoque de la toxicidad de acción conjunta debe ser utilizado para las evaluaciones de la toxicidad relativa a estos contaminantes²¹.

La sensibilidad de cinco especies de lombrices (*Diffringens amynthas*, *Caliginosa aporrectodea*, *Rubidus dendrodrilus*, *Eisenia foetida* y *Microchaetus benhami*), a la genotoxicidad por 48 horas de exposición a suelos con concentraciones subletales de sulfato de cadmio. Cantidades significativas de daño en el ADN fueron detectados en las especies: *C. aporrectodea*, *R. dendrodrilus* y *E. foetida*. Ésta última mostró el más alto nivel de daño en el ADN. Todas las lombrices expuestas acumularon Cadmio, a pesar que las cantidades acumuladas en el cuerpo no necesariamente se relacionan con los niveles de daño en el ADN, ya que la mayor cantidad de Cadmio fue secuestrado y probablemente son inofensivos para estos organismos²².

El tratamiento de los lixiviados, es una necesidad que se repite a nivel mundial, pues en toda infraestructura de disposición de residuos se generan de manera inevitable los lixiviados, los cuales se relacionan directamente con la cantidad de materia orgánica generada, ya que éstas después de ser asimiladas por actividad bacterial, producen grandes cantidades de metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos, amoniaco, calor, agua, entre otros; el líquido generado es el lixiviado, que siempre está en contacto con todos los contaminantes y que logra arrastrarlos por la sencilla razón de que los compuestos pesados insolubles se convierten en materiales más simples y solubles²³.

La evaluación de la genotoxicidad de suelos industriales en *Eisenia foetida*, indican que todas las muestras de suelo cumplieron con los lineamientos de calidad ambiental para concentraciones de metales. Sin embargo, las eluciones han producido efectos genotóxicos en diluciones tan bajas como 6%. Las concentraciones de metales totales para cada elución acuosa podría expresar los efectos sinérgicos de estos compuestos²⁴.

Los metales pesados generados de la incineración de residuos sólidos municipales se pueden filtrar en el suelo y las aguas subterráneas constituyendo riesgos a largo plazo para el ambiente. La concentración de los metales fue determinado mediante espectrofotometría

de masas y la genotoxicidad de los lixiviados con la técnica de micronúcleos en células de raíz de *Vicia faba*. Los resultados mostraron que las concentraciones de aluminio (Al), manganeso (Mn), cobalto (Co), cadmio (Cd) y mercurio (Hg) en los lixiviados fueron inferiores a 0,01 mg l⁻¹, y las de hierro (Fe), el cobre (Cu) y molibdeno (Mo) eran inferiores a 0,1 mg l⁻¹. Las concentraciones de cromo (Cr), zinc (Zn), selenio (Se), estroncio (Sr), bario (Ba) y el cesio (Cs) tenían entre 0,11 mg l⁻¹ y 2,19 mg l⁻¹. Plomo (Pb) las concentraciones, en particular, llegó hasta el 19,6 mg l⁻¹, superando claramente el límite de concentración máxima (5 mg l⁻¹). Observaron un aumento significativo de las frecuencias de micronúcleos (MN) los grupos expuestos a lixiviados que en el grupo control negativo ($P < 0,05$). Con el aumento de metales pesados en los lixiviados, los efectos tóxicos sobre las células de *Vicia faba* fueron mayores, lo que implica que los metales pesados fueron los factores principales que causan los efectos genotóxicos. Recomiendan, que además de los análisis químicos, deben realizarse las pruebas biológicas, como el ensayo de MN de las células *Vicia faba*²⁵.

Los lixiviados son los líquidos contaminados que drenan de un relleno sanitario. Varían ampliamente en cuanto a su composición, según la antigüedad del relleno y del tipo de residuo que contienen. Sin embargo, la cantidad de lixiviados producidos depende del balance entre la precipitación, la infiltración, la capacidad de campo y permeabilidad (propiedades de la estructura del suelo) y la escorrentía. Asimismo, refieren que los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas tóxicas, sólidos disueltos, sales y otros componentes que escurren en forma vertical contaminando los acuíferos. De allí la importancia de ubicar los rellenos en suelos impermeables por encima del nivel freático, evitando que los lixiviados se acumulen dentro del relleno. A fin de proteger las reservas de aguas subterráneas contra la contaminación, es necesario tomar precauciones y medidas complementarias, tales como cubiertas de arcilla o membranas, revestimientos para el relleno, medios para recolectar, extraer y tratar el lixiviado y un sistema de vigilancia de las aguas subterráneas²⁶.

También afirman que el dióxido de carbono, producto de la descomposición orgánica en combinación con el agua, crea un ambiente ácido en el cual los minerales como el calcio, magnesio, hierro, cadmio, plomo y zinc, presentes en los desechos (o en el suelo), tienden a disolverse y avanzar hacia el nivel freático. El calcio y el magnesio sólo aportan

dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano.

Finalmente, manifiestan que la dispersión de los lixiviados afectan los ecosistemas de la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas. Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes para la vida de ciertas especies como la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), las variaciones del pH y la variación de la temperatura del medio, entre otras²⁶.

Es importante analizar las sustancias bioacumulables, debido a que pueden ser transferidas a los niveles tróficos superiores de las cadenas alimenticias en ecosistemas acuáticos. Por otro lado, la actividad metabólica de desintoxicación de los organismos puede producir metabolitos genotóxicos, es decir, alterar la estructura química del ADN. El poder genotóxico de los efluentes puede ser el resultado de la interacción de todos los compuestos químicos presentes²⁷.

Los sistemas biológicos presentan respuestas complejas a los xenobióticos que van desde el estrés a los cambios asociados con el mecanismo de toxicidad. Sus resultados muestran datos que son reveladores en la complejidad de la respuesta de la expresión génica a estímulos como la exposición a xenobióticos. Afirman que la Toxicogenómica trata de utilizar la complejidad de la respuesta como una huella digital o firma característica de la exposición a los xenobióticos. Existen, sin embargo dos grandes retos experimentales que deben ser objeto de valoración por la Toxicogenómica para tener éxito. El primero es técnico y se refiere a las dificultades intrínsecas asociadas con la medición precisa de la expresión génica. El segundo desafío es el sistema biológico utilizado. Para sistemas *in vitro* deben trabajarse con líneas celulares o células primarias. Estos factores, y más, podrían afectar el perfil de expresión génica obtenida en respuesta a la exposición a xenobióticos³⁰.

La acumulación de metales pesados (Cromo, Cadmio, Plomo, Cobre y Zinc) en dos grupos de *E. foetida* mantenidas en un compost de lodos (Irán y Australia) tiene como resultado que la concentración de los metales pesados disminuyó con el tiempo de

duración del compost de lodos. Al comparar los dos grupos de lombrices, demostraron que las lombrices provenientes de Irán consumen mayores cantidades de micronutrientes como Cobre y Zinc con respecto a las lombrices de tierra de Australia, mientras que la bioacumulación de elementos no esenciales, tales como el Cromo, Cadmio, Plomo por el grupo australiano fue mayor. La disminución significativa de las concentraciones de metales pesados en el compost de lodos final indica la capacidad de acumulación de metales pesados en los tejidos del cuerpo de las lombrices de tierra de Irán y Australia³¹.

La genotoxicidad del cloruro de níquel en la lombriz de tierra es evidente con el aumento del número de células con el ADN dañado conforme aumentaba la concentración de la solución. Encontraron diferencias significativas ($p= 0,05$) entre los controles positivos y negativos. El efecto de la exposición a la concentración más baja (0,0049 mg/l) no fue significativamente diferente del control negativo. En las células de animales expuestos a concentraciones mayores de 0,025 mg/l, también causó poco daño al ADN, por lo tanto no podían atribuir con precisión el daño genotóxico. Los animales no sobrevivieron al ser expuestos a una concentración de 0,05 mg/l²⁹.

Estabilizaron lixiviados con un proceso secuencial de coagulación-floculación más oxidación química. Además, mencionan que el proceso de coagulación-floculación y foto-oxidación son utilizados como pretratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios³².

El seguimiento de genotoxicidad en el ambiente mediante el uso de organismos centinelas para ensayos sensibles. Indican las propiedades genotóxicas del agua y sedimento recolectados en el río Noyyal, el mismo que está contaminado con vertidos industriales y aguas residuales. Mediante ensayo cometa en los peces *Cyprinus carpio* y lombrices de tierra *E. foetida* y tras la electroforesis, observaron el daño del ADN (longitud del ADN y anchura de la masa de ADN), además, observaron que en los eritrocitos, el hígado y las células del riñón de los peces, la cantidad de daño se incrementó con la duración de la exposición. Del mismo modo, la longitud del ADN fue significativamente mayor en los celomocitos de las lombrices de tierra tratadas con muestras de sedimentos. Los mayores niveles de daño en el ADN se obtuvieron con las muestras tomadas en aguas debajo de los centros urbanos. Estos resultados indican que el

río Noyyal está contaminado con sustancias que son genotóxicas para los peces y las lombrices de tierra y que el ensayo cometa tiene una sensibilidad suficiente para detectar la genotoxicidad³³.

La calidad del lixiviado es una variable muy fuerte y está en relación con la localización del sitio y el tiempo de colocación de los desechos. Así, el término “lixiviado típico” debe utilizarse con ciertas reservas. En relación con las características químicas, una muestra de lixiviado obtenida de estas fuentes puede no ser considerada representativa del volumen total del lixiviado³⁴.

En pequeñas descargas, el lixiviado presenta decoloramiento y mal olor; esto se da por lo general en la parte más baja de los basureros. Estas descargas pueden representar la intersección del nivel de agua interna de las celdas de basura con la superficie del suelo o también puede tratarse de pequeños lentes de agua colgada dentro de los montículos de basura. Estas descargas son invaluable para la obtención de muestras para la determinación de las concentraciones de lixiviado; como es de esperarse, las descargas no siempre son representativas del volumen total del lixiviado. Los cambios sustanciales en el lugar de descarga o en el porcentaje del flujo o bien la aparición de nuevas descargas, son indicadores de cambio de flujo en el sistema. Asimismo, para evaluar las características del lixiviado en sitios de disposición final de desechos sólidos que no cuentan con sistema de drenaje, no es posible hacer un estudio completo de este líquido contaminante que impacta en zonas propensas a la contaminación o ya contaminadas. Siendo necesario contar con un dispositivo para obtener muestras de lixiviado³⁵.

Es importante incluir ensayos biológicos en los programas de análisis de muestras ambientales para complementar los parámetros químicos y físicos. Además, es necesario una batería de pruebas selectas que evalúen la genotoxicidad de los contaminantes ambientales (prueba de Ames, ensayo cometa, etc.)³⁶.

El lixiviado presenta condiciones metanogénicas. Entre las sustancias tóxicas que encontró están las anilinas (hasta 207 mg/l). Los metales con mayor concentración fueron: Fe (27 mg/l), Al (9 mg/l) y Mn (1.5 mg/l). Además, encontraron una alta concentración de

organismos potencialmente patógenos (1.3×10^6 UFC/ml) de los cuales aislaron: *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Aerobacter hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida* y *Pasteurella spp*³⁷.

Las sales de los metales pesados inducen con frecuencia mutaciones intracromosomales. Además, sugieren que los efectos mutagénicos encontrados no solo se deben a contaminantes diversos encontrados en los cuerpos de agua contaminados, sino también a la acción compleja de los metales pesados y cianuro³⁸.

Muchos de los efectos tóxicos del cadmio (Cd) se deben a la interacción con los elementos esenciales, como el zinc (Zn). Estas interacciones pueden tener lugar en diferentes etapas de la absorción, distribución en el organismo y la excreción de los metales y en la fase de funciones biológicas del Zn. La exposición a Cd lleva a la perturbación del zinc en el organismo, por un lado, mientras que en la dieta la ingesta de zinc tiene un importante efecto sobre la absorción de Cd, la acumulación y la toxicidad en el otro. El estatus de Zn del cuerpo es importante en relación con el desarrollo de la toxicidad del cadmio. Numerosos datos muestran que el aumento de suministro de zinc puede reducir la absorción y acumulación de Cd y prevenir o reducir las acciones negativas de Cd, mientras que la deficiencia de zinc puede intensificar la acumulación y toxicidad del Cd³⁹.

La genotoxicidad de los plaguicidas Imidacloprid y RH-5849 en *Eisenia foetida* muestran que Imidacloprid fue más genotóxico que el RH-5849. Además, sus resultados de las frecuencias de micro núcleos de médula ósea de ratón indican que los dos plaguicidas no mostraron efectos significativos ($p > 0,05$), hasta que llegó a la dosis de 100 mg / kg de imidacloprid y 300 mg / kg de RH-5849. Aunque no detectaron genotoxicidad mediante el uso de las pruebas de micro núcleos, los resultados del ensayo cometa mostraron que los dos plaguicidas provocaron lesiones significativas del ADN ($p < 0,01$) en lombrices de tierra mostraron una relación de dosis-efecto²⁸.

Existe una gran interdependencia entre el estado nutricional del organismo y el grado de acumulación y toxicidad de metales pesados. El cadmio es uno de los venenos más peligrosos. Su ingesta en la dieta con una cantidad inadecuada de calcio produce un aumento de la absorción de cadmio en el tracto gastrointestinal y aumento de la acumulación de este metal en el organismo. El consumo elevado de calcio protege contra la absorción, la acumulación y la toxicidad del Cd. Las interacciones entre el calcio y el cadmio pueden ocurrir en diferentes etapas (absorción, distribución en el organismo, la eliminación) y el cadmio puede interferir con las funciones biológicas de los iones Ca^{40} .

En los últimos años se ha investigado sobre tratamientos de lixiviado utilizando productos inorgánicos en procesos fisicoquímicos como por ejemplo el de coagulación-floculación y ozonificación para hacer más eficiente el tratamiento en rellenos sanitarios⁴¹.

2.1.3 MARCO TEÓRICO

2.1.3.1 Diagnóstico del relleno sanitario manual de Nauta

En el Plan Integral de Gestión Ambiental de Residuos Sólidos de la ciudad de Nauta, se indica que el principal problema ambiental ocasionado por el manejo inadecuado de los residuos sólidos es la contaminación de los recursos naturales (agua, suelo y aire), así como el deterioro estético de la ciudad y sus paisajes naturales. La ausencia de un correcto tratamiento de los residuos sólidos está provocando el deterioro de muchas zonas urbanas y peri urbanas, perjudicando las actividades turísticas propuestas para estos lugares⁴².

El relleno sanitario es la alternativa más conveniente para la disposición final de los residuos sólidos en nuestro medio, evitándose de esta forma, los efectos antes mencionados, ya que es una técnica sanitaria que trata los residuos sólidos en el suelo, sin ocasionar perjuicio al ambiente y sin causar molestia o peligro para la salud y la seguridad pública, ni durante su operación, ni después de su cierre.

El método utiliza principios de ingeniería para confinar la basura en un área de poca extensión, cubriéndola con capas de tierra y compactándola diariamente; además, prevee los problemas que pueden causar los lixiviados y gases producidos en el relleno como consecuencia de la descomposición de la materia orgánica⁴².

A diferencia de los botaderos, los rellenos sanitarios son lugares donde se entierran los residuos, garantizando que éstos no ocasionen daños al ambiente y a la salud. Para ello se debe garantizar la construcción de la infraestructura apropiada, como las chimeneas para la eliminación de gases, drenes para la recolección de lixiviados, drenes de escorrentías para la captación de las lluvias, cercos de protección, vías de acceso apropiadas, entre otros. La correcta operación de los rellenos sanitarios garantizará una disposición final adecuada de los residuos sólidos⁴².

El diseño de rellenos sanitarios requiere considerar ciertos criterios básicos, tales como acceso, distancia de amortiguamiento, cercado, excavación de zanjas, pendientes, manejo de lixiviados, procedimientos de vigilancia y operación, entre otros, que, normalmente, son establecidos por las autoridades responsables de su aprobación y manejo⁴². El relleno sanitario manual, se presenta como una alternativa, técnica y económica, para resolver el problema de la disposición de los residuos sólidos en localidades con menos de 40,000

habitantes, o que producen en promedio un máximo de 20 toneladas diarias de basura⁴². Para la operación cotidiana del relleno sanitario manual, prima la mano de obra sobre la maquinaria pesada; la maquinaria se requiere para la preparación del sitio, realizándose las demás actividades manualmente, a través de los obreros municipales.

En el 2001 la Municipalidad Provincial de Loreto (Nauta) y el Proyecto Araucaria Amazonas-Nauta de la AECL, iniciaron un trabajo conjunto para contar con un Sistema de Tratamiento Integral de Residuos Sólidos para Nauta (SITIRS), que consideró un Plan de Gestión Integral de los Residuos Sólidos, un Expediente Técnico del relleno sanitario y un plan de educación ambiental que promoviera la participación organizada y consciente de la población⁴².

2.1.3.1.1 Situación actual en el manejo de los residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta

La Municipalidad Provincial de Loreto (Nauta) es la encargada de la prestación del servicio de limpieza pública, realizando las labores de recolección, transporte y disposición final de los residuos sólidos urbanos.

De acuerdo a un estudio de generación y caracterización de los residuos sólidos domiciliarios, se estima que en Nauta se producen 10.5 toneladas diarias de residuos sólidos domiciliarios y 2.7 toneladas diarias de residuos sólidos de mercados, colegios y establecimientos; se generan en total 13.2 toneladas. La disposición final se lleva a cabo desde julio del 2003 en un área municipal, ubicada a 7.5 Km de la carretera Nauta-Iquitos.

La situación actual del manejo de residuos sólidos se realizó en base a los aspectos técnicos operativos, que describe el ciclo de vida de los residuos sólidos desde la generación, almacenamiento y barrido, recolección, transporte y disposición final.

De acuerdo a la composición de los residuos sólidos domiciliarios y su elevado porcentaje de materia orgánica, se planteó un Programa de compostaje que consideró un piloto de segregación en la fuente, elaboración de compost (en cantidades mínimas que abastecen el cultivo de hortalizas) y lombricultura. Este Programa se desarrolló en un área de tratamiento dentro del relleno sanitario. Esta propuesta se planteó con la finalidad de

reducir la cantidad de desechos que se entierran y suprimir los lixiviados, que pueden afectar las aguas subterráneas que se encuentran debajo del área designada.⁴²

2.1.3.1.2 Clasificación de los residuos sólidos según su origen de acuerdo a la Ley General de Residuos Sólidos. Ley N° 27314

a) Residuos sólidos municipales:

Son aquellos que tienen origen en las actividades domésticas y comerciales de las ciudades.

Los **residuos domésticos** incluyen a los residuos biodegradables (sólidos orgánicos) e inertes, materiales como papel, cartones, vidrios, plásticos, metales, textiles, pilas, entre otros. Los **residuos comerciales** provienen de bienes y servicios, como centros de abastos de alimentos, restaurantes, tiendas, bares, bancos, oficinas de trabajos, entre otras actividades comerciales y laborales. Estos residuos están constituidos mayormente por papel, plásticos, embalajes diversos, restos de aseo personal, latas, entre otros similares.

a. Residuos industriales:

Son aquellos generados en las actividades de las diversas ramas industriales, tales como manufacturas, química, pesquería, y otras similares. Estos residuos se presentan como: lodos, cenizas, desechos metálicos, vidrios, plásticos, papel, cartón, madera, entre otros, que generalmente se encuentran mezclados con sustancias alcalinas o ácidas, aceites pesados, entre otros.

b. Residuos hospitalarios:

Son aquellos que proceden de los centros de salud, hospitales, clínicas e incluso casas particulares donde se brinda atención a pacientes. Los residuos hospitalarios se consideran residuos peligrosos por ser fuentes infecciosas, por contener residuos orgánicos con cargas patógenas elevadas y de algo riesgo para la salud pública; entre ellos tenemos: medicinas que han excedido su fecha de vencimiento, y que no son reutilizables, material infeccioso (ropa de cama, vendajes, equipos de transfusión), residuos patógenos (residuos de quirófanos, sondas, agujas, bisturís, etc.)

c. Residuos agropecuarios:

Están compuestos por aquellos residuos generados en el desarrollo de las actividades agrícolas y pecuarias; estos residuos incluyen los envases de fertilizantes, plaguicidas, agroquímicos diversos, entre otros.

2.1.3.1.3 Impactos de una gestión inadecuada de los residuos sólidos ⁶

1. En la Salud

En general, los residuos sólidos poseen altas cargas patógenas y constituyen medios para la proliferación de agentes vectores de enfermedades de alto riesgo para la salud humana, así como para el ambiente. La peligrosidad de los residuos varía de acuerdo al grado de toxicidad o al potencial contaminante de sus componentes, contribuyendo a ello también las condiciones atmosféricas de disposición (humedad y temperatura).

La exposición humana a los residuos peligrosos puede ocurrir en los sitios de generación (exposición ocupacional o exposición durante accidentes), en la segregación formal e informal, durante el transporte, y en los sitios donde se almacenan o se depositan para su tratamiento. En los sitios de disposición final, los trabajadores formales e informales se encuentran expuestos a diversos factores de riesgo generados por las tareas de recolección y transporte de los residuos sólidos. La falta de medidas de prevención y control de riesgos, especialmente en la recolección manual, las condiciones poco seguras del manejo de los residuos, y la falta de hábitos y condiciones de higiene, entre otras causas, aumentan la incidencia de accidentes y enfermedades asociadas tales como exposición a accidentes por exposición a instrumentos punzo-cortantes, infecciones gastrointestinales, epidérmicas y respiratorias, así como por exposición a productos peligrosos.

Las poblaciones expuestas a los agentes físicos, químicos y biológicos de los residuos sólidos municipales son:

- Los trabajadores formales e informales que manipulan residuos.
- La población no atendida por los servicios de recolección.
- La población que vive cerca de los sitios de tratamiento y disposición final de los residuos.
- La población de segregadores y sus familias.

- La población en general, a través de la contaminación de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, del consumo de carne de animales criados en condiciones de insalubridad o con restos alimenticios procedentes de los residuos municipales y de la exposición a residuos peligrosos.

Los principales factores que contribuyen a esta situación son la escasa atención de las autoridades relacionadas con el sector y la deficiente calidad de los servicios prestados. Los componentes de los residuos pueden variar según el estilo de vida de la población de cada localidad. Por lo tanto, la afectación de la salud humana, debido a agentes físicos, químicos y biológicos contenidos en aquéllos constituye el principal problema que surge de una inadecuada gestión de los residuos en los distritos del Perú.

2. En el Ambiente:

Probablemente, todo impacto en el ambiente tendrá incidencia directa o indirecta en la salud humana. De allí la importancia de un tratamiento integral y relacionado de los impactos ambientales de los residuos sólidos en la salud pública. Una porción significativa de los impactos en la salud humana depende de las condiciones particulares de la localización, la geomorfología y las características de los medios físico y biótico de donde se disponen los residuos sólidos.

Los impactos derivados de una mala gestión de los residuos sólidos en el ambiente se pueden clasificar de la siguiente manera:

a) Contaminación del Aire:

Los gases producidos por la descomposición de la fracción biodegradable de los residuos (metano, sulfuro de hidrógeno y dióxido de carbono) se dispersan por acción del aire, produciendo olores que se difunden en los entornos. Los olores pueden causar malestar, cefaleas y náuseas, además de desvalorizar las propiedades inmuebles dentro de su ámbito de influencia. La quema de los residuos también contribuye a la generación de monóxido de carbono, dioxinas, cenizas y volatilización de sustancias químicas contaminantes que afectan a la salud (tales como bencina, o cloro-vinilo). Estas sustancias contribuyen a que las poblaciones expuestas sean mucho más susceptibles a desarrollar enfermedades respiratorias.

De otro lado, los escombros, desmontes, residuos producidos por la construcción, o botaderos abiertos, emiten polvo y material particulado que puede portar apuntes patógenos y materiales peligrosos. El polvo también es responsable de molestias, problemas respiratorios y pulmonares. A ello se añaden los riesgos de contaminación del agua de ríos, lagos, pozos, alimentos, poblaciones cercanas, entre otros.

b) Contaminación del Suelo:

En los residuos sólidos se puede encontrar una gran variedad de subproductos químicos, especialmente pilas y baterías, aceites y grasas, pesticidas y herbicidas, solventes, pinturas y tintes, productos de limpieza y detergentes, cosméticos, medicamentos, aerosoles, cauchos sintéticos y asbestos, entre otros. Todas estas sustancias son altamente contaminantes del suelo.

La disposición de residuos en sitios frágiles, inestables, o en depresiones causadas por la erosión puede ocasionar derrumbes de franjas de morros y residencias construidas en áreas de riesgo o suelos con pendiente. Adicionalmente, el suelo que subyace a los desechos sólidos depositados en un botadero a cielo abierto o en un relleno sanitario se contamina con microorganismos patógenos, metales pesados, sustancias tóxicas e hidrocarburos que están presentes en el lixiviado de los desechos.

La afectación al suelo por el depósito de basura en un vertedero es directa por los lixiviados. Los lixiviados son los líquidos contaminados que drenan de un relleno sanitario. Varían ampliamente en cuanto a su composición, según la antigüedad del relleno y del tipo de residuo que contiene. Sin embargo, la cantidad de lixiviados producidos depende del balance entre la precipitación, la infiltración, la capacidad de campo y permeabilidad (propiedades de la estructura del suelo) y la escorrentía.

Cuando los residuos sólidos municipales se entierran, la materia orgánica presente se degrada en condiciones aeróbicas durante las primeras semanas (en áreas húmedas) o en el primer año (en áreas secas), y después se degrada anaeróbicamente cuando ya no hay oxígeno presente. Los residuos producen lixiviados mientras se descomponen.

c) Contaminación de Aguas Superficiales:

Uno de los efectos ambientales más serios provocados por el inadecuado manejo de los residuos sólidos es la contaminación de las aguas superficiales, sobre todo de aquellas que constituyen fuentes de abastecimiento de agua potable. Por una parte, la materia orgánica disminuye el oxígeno disuelto y aumenta los nutrientes (N y P), conduciendo a los cuerpos de agua a procesos de eutrofización.

Por otra parte, los residuos y los lixiviados están frecuentemente mezclados con residuos industriales peligrosos, ocasionando la pérdida de fuentes de agua para consumo humano o para recreación, asimismo la destrucción de la fauna acuática y del paisaje, con altos costos de *remediación ambiental y restauración del hábitat*. En algunos casos, los procesos de degradación de la calidad biológica de los cuerpos de agua en condiciones naturales pueden llegar a ser irreversibles. Asimismo, la presencia de residuos sólidos en los cursos de agua puede ocasionar inundaciones por obstrucción de canales de drenaje y del alcantarillado.

d) Contaminación de Aguas Subterráneas:

Los acuíferos, confinados o libres, pueden contaminarse inadvertidamente por la inadecuada disposición final de residuos sólidos. En la mayoría de las situaciones se subestima el problema, aún cuando la contaminación por efecto de nitritos y otras sustancias químicas en aguas subterráneas para consumo humano es peligrosa para la salud.

Los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas tóxicas, sólidos disueltos, sales y otros componentes que escurren en forma vertical contaminando los acuíferos. De allí la importancia de ubicar los rellenos en suelos impermeables por encima del nivel freático, evitando que los lixiviados se acumulen dentro del relleno. A fin de proteger las reservas de aguas subterráneas contra la contaminación, es necesario tomar precauciones y medidas complementarias, tales como cubiertas de arcilla o membranas, revestimientos para el relleno, medios para recolectar, extraer y tratar el lixiviado y un sistema de vigilancia de las aguas subterráneas. Sin embargo, se considera que, a una distancia adecuada del acuífero, el suelo constituye un medio eficaz para eliminar materiales orgánicos, metales pesados y otros iones inorgánicos en virtud de la filtración, adsorción, actividad biológica y precipitación.

El dióxido de carbono, producto de la descomposición orgánica en combinación con el agua, crea un ambiente ácido en el cual los minerales como el calcio, magnesio, hierro, cadmio, plomo y zinc, presentes en los desechos (o en el suelo), tienden a disolverse y avanzar hacia el nivel freático. El calcio y el magnesio sólo aportan dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano.

e) Afectaciones a la Flora y Fauna:

La dispersión de los líquidos lixiviados afectan los ecosistemas de la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas. Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes para la vida de ciertas especies como la demanda biológica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), las variaciones del pH, y la variación de la temperatura del medio, entre otras.

Las afectaciones a la flora y fauna no sólo se dan de manera directa sobre los individuos, sino también sobre áreas críticas de alimentación o reproducción, ocasionando alteraciones fisiológicas en los organismos. La presencia de sustancias contaminantes o tóxicas puede alterar funciones vitales para el mantenimiento de poblaciones genéticamente viables o para la sobrevivencia de la especie.

3. Implicancias sociales:

El acelerado crecimiento de las ciudades, sin planificación, plantea una difícil situación para enfrentar el tema de servicios básicos como el de la gestión de los residuos. Los más afectados en este proceso son los estratos más pobres de las ciudades, que carecen de servicios básicos.

La carencia de servicios básicos y el desconocimiento de mecanismos para proteger su salud pone a la población más pobre en una grave situación de vulnerabilidad. Esta vulnerabilidad se relaciona con la calidad del ambiente en el que viven, considerando variables como su situación de vivienda, acceso a servicios, educación e información, lo que los pone en desventaja frente a la exposición a agentes patógenos, ante los cuales tienen menos posibilidades de protegerse.

La mejora de estos servicios y la educación sanitaria pueden reducir significativamente la mortalidad infantil en general, principalmente la de los niños más pobres, cuya vulnerabilidad es mayor. Las toneladas de residuos vertidos al ambiente diariamente alimentan a roedores e insectos que transmiten peligrosas enfermedades, además de la contaminación que producen en el suelo, el agua y los alimentos a través de los lixiviados producidos por la descomposición de los residuos.

La reducción de riesgos provenientes de la mala gestión de residuos sólidos involucra ampliar la noción de “salud pública”, incorporando otros aspectos como lo avanzado en nuestro país respecto a los sistemas de agua y saneamiento, lo que se ha traducido en políticas públicas e inversión. El desarrollo de políticas, la implementación del Plan Nacional de Gestión Integral de Residuos Sólidos y la inversión en infraestructura son necesarios en la gestión de residuos sólidos son acciones que deben tener un alcance nacional, pero adaptadas al contexto local.

2.1.3.1.4. Competencia de las municipalidades provinciales y distritales en el relleno sanitario.

La “base ejecutiva” del sistema está constituida por los municipios distritales y provinciales. Los primeros proveen el servicio de recolección, reciclaje y disposición en rellenos sanitarios. Los municipios provinciales regulan y fiscalizan el proceso de la gestión de los residuos en toda su jurisdicción y son responsables también por la gestión de los residuos sólidos de origen domiciliario, comercial y de aquellas actividades que generen residuos similares a éstos en todo el ámbito de su jurisdicción.

a. Municipalidades Distritales:

Según la Ley General de los Residuos Sólidos⁴³, los municipios distritales son responsables por la prestación de los servicios de recolección y transporte de los residuos sólidos y de la limpieza de vías, espacios y monumentos públicos en su jurisdicción, deben proveer el servicio de limpieza pública determinando las áreas de acumulación de desechos, rellenos sanitarios y el aprovechamiento industrial de desperdicios. Los residuos sólidos en su totalidad deben ser conducidos directamente a la planta de

tratamiento, transferencia o al lugar de disposición final autorizado por la municipalidad provincial.

Conforme lo establece el Reglamento de la Ley General de Residuos Sólidos⁴⁴, corresponde a los municipios distritales:

- Asegurar una adecuada prestación del servicio de limpieza, recolección y transporte de residuos en su jurisdicción, debiendo garantizar la adecuada disposición final de los mismos. Asimismo debe determinar las áreas a ser utilizadas por la infraestructura de residuos sólidos en su jurisdicción en coordinación con la municipalidad provincial respectiva y en sujeción a la Ley y al Reglamento.
- Asegurar que se cobren tarifas o tasas por la prestación de servicios de limpieza pública, recolección, transporte, transferencia, tratamiento o disposición final de residuos, de acuerdo a los criterios que la municipalidad provincial establezca, bajo responsabilidad.
- Determinar las áreas de disposición final de residuos sólidos en el marco de las normas que regulan la zonificación y el uso del espacio físico y del suelo en el ámbito provincial que le corresponda. Bajo los mismos criterios, determinar las zonas destinadas al aprovechamiento industrial de residuos sólidos.
- Supervisar en su jurisdicción los aspectos técnicos del manejo de residuos indicados en los literales a) y b), excluyendo las infraestructuras de residuos.
- Sancionar al generador del ámbito de su competencia por el incumplimiento de la Ley, el Reglamento y las normas que se emitan al amparo de ésta.
- Suscribir contratos de prestación de servicios con empresas registradas en la DIGESA.

b. Municipalidades Provinciales:

Según la Ley General de los Residuos Sólidos, los municipios provinciales son responsables por la gestión de los residuos sólidos de origen domiciliario, comercial y de aquellas actividades que generen residuos similares a éstos, en todo el ámbito de su jurisdicción. Regulan y controlan el proceso de disposición final de desechos sólidos, líquidos y vertimientos industriales en el ámbito provincial y tienen opción de intervenir

en el sistema de limpieza pública y tratamiento de residuos sólidos, cuando por economías de escala resulte eficiente centralizar provincialmente el servicio.

Son responsables por la gestión de los residuos sólidos de origen domiciliario, comercial y de aquellas actividades que generen residuos similares a éstos en todos los ámbitos de su jurisdicción. Según el Reglamento de la Ley General de Residuos Sólidos deben:

- Planificar, promover, regular, aprobar, autorizar, fiscalizar, supervisar y sancionar en su jurisdicción los aspectos técnicos y formales de gestión y manejo de residuos de competencia municipal, tal como se establece en la Ley y el Reglamento. La función de planificación se debe desarrollar en armonía con el Plan de Desarrollo Regional Concertado que formula la región respectiva.
- Asegurar la adecuada limpieza de vías, espacios y monumentos públicos, y promover el manejo adecuado de los residuos generados en las ciudades capitales hasta la disposición final.
- Establecer criterios para la fijación de tasas o tarifas que se cobren por la prestación de los servicios de limpieza pública, recolección, transporte, transferencia, tratamiento o disposición final de residuos sólidos en los distritos de su jurisdicción, asegurando asimismo su efectiva aplicación. Dichos criterios deben considerar los costos reales de los servicios, la tecnología utilizada y garantizar su calidad y eficiencia.

2.1.3.2 EVALUACIÓN GENOTÓXICA EN ORGANISMOS EXPUESTOS A CONTAMINANTES AMBIENTALES.

El término genotóxico se refiere a los efectos toxicológicos letales y hereditarios, tanto en las células germinales como en las somáticas. La ciencia que estudia esos factores y sus efectos genéticos adversos es la Genética Toxicológica, su objetivo es conocer los eventos que ocurren en los procesos de interacción de las genotoxinas con el ADN y la expresión del daño genético³³.

2.1.3.2.1 CONTAMINANTES AMBIENTALES (O XENOBIÓTICOS)

Inicialmente el término xenobióticos (etimológicamente: “ajeno a la vida”) estaba limitado a compuestos químicos sintetizados por el hombre, constituidos por determinados elementos o grupos estructurales y que fueron detectados con posterioridad en los sistemas naturales. Todo cambio significativo en la composición o condiciones normales de un medio, constituye una forma de contaminación. Tales cambios afectan al recurso en sí o a su uso para un fin determinado, y los agentes que lo provocan pueden ser: químicos, físicos y biológicos. El medio afectado puede ser aire, agua, suelo o cualquier sustrato orgánico (de ordinario, más de uno de ellos simultáneamente)³³.

Tal amplitud de factores y de efectos, involucran agentes de diferente naturaleza y acciones continuas y discontinuas, que pueden producirse espontáneamente o ser provocadas, muchas veces por la actividad del hombre en su búsqueda de recursos a consumir, asociadas con la transformación de materias primas naturales a través de procesos industriales y la acumulación de una cantidad de residuos considerables.

En cuanto a la composición, puede ser que implique una variación anómala en la proporción en que se encuentran los componentes habituales (ej.: concentración de nitratos en el agua subterránea por uso de fertilizantes) o la aparición e incorporación de sustancias que normalmente no se encuentran en el ambiente. Estos contaminantes químicos pueden ser inorgánicos (generalmente sales) u orgánicos (derivados más o menos sustituidos de moléculas inicialmente formadas por carbono e hidrógeno, p.e. hidrocarburos). A su vez, tanto unas como otras pueden reconocer un origen natural (ej.: flúor, vanadio o arsénico en aguas subterráneas en varias provincias del país; productos de degradación biológica, que incluyen desde detritos hasta metano, en condiciones anaeróbicas), o en la mayoría de los casos, ser el resultado de la actividad del hombre: origen antrópico (metales pesados provenientes de la minería, metalurgia; residuos domiciliarios o agropecuarios)⁴¹.

Los contaminantes físicos incluyen variaciones repentinas en la temperatura, la incorporación de isótopos radioactivos (vuelcos de agua de refrigeración, en general y de reacciones nucleares, en particular), radiación electromagnética y ruidos. En ciertas zonas de grandes ciudades se manifiesta una sobrecarga de información gráfica (contaminación visual). La contaminación biológica, puede ser muy variada, desde las parasitosis

endémicas en zonas pantanosas, en embalses o en cuerpos de agua con aporte de desechos domiciliarios, hasta las denominadas “mareas rojas”, producidas por el crecimiento poblacional de determinado grupo de algas⁴¹.

2.1.3.2.2 GENOTOXICIDAD

La genética toxicológica tiene sus inicios en el año 1927 cuando se demuestra la capacidad de los rayos X para inducir mutaciones en *Drosophila melanogaster*⁴⁵. Años más tarde en 1949, se descubre las propiedades mutagénicas del gas mostaza, descubrimiento que permitió incrementar el concepto de mutagénesis. Durante las décadas del 50 y 60 se alcanzan la mayor parte de los conocimientos básicos acerca de la estructura y replicación del ADN, código genético, los mecanismos de la síntesis proteica y la reparación del ADN.

La sociedad de Mutagénesis Ambiental es fundada en 1969, debido a la preocupación de muchos investigadores por el impacto genético que podría acarrear la proliferación de contaminantes químicos en el ambiente, producto de la actividad humana. Es en este mismo año que es reconocida la Toxicología Genética, como disciplina científica. Décadas más tarde, el desarrollo de la denominada tecnología del ADN recombinante ofreció metodologías que han resultado fundamentales en el conocimiento directo de la estructura y configuración del genoma, la identificación de genes específicos, la determinación de las alteraciones generadas en la información genética y su relación con la inducción del cáncer y otras enfermedades de base genética.

Las investigaciones relacionadas con la genotoxicidad adquieren cada día mayor importancia a nivel mundial, debido al creciente deterioro del ambiente al que se encuentra expuesto el hombre moderno. Existen tres razones que justifican esta preocupación. Primero, el incremento en el grado de mutación de las células germinales (óvulos, espermatozoides y sus precursores) lo cual puede provocar el aumento de la incidencia de las enfermedades genéticas en futuras generaciones. Segundo, la existencia de una estrecha relación entre la inestabilidad genómica de células somáticas con el cáncer y las enfermedades degenerativas crónicas y el tercero, el origen ambiental del cáncer⁴⁶.

La toxicidad genética o genotoxicidad es el proceso por el cual un agente produce un efecto deletéreo sobre el ADN y otros blancos celulares que controlan la integridad del material genético.

Se denominan genotóxicos a aquellos agentes que producen alteraciones estructurales en el material hereditario, causando cambios o re arreglos en el mismo, e induciendo por tanto mutaciones. Una vez producidas, las mutaciones son permanentes y por lo tanto heredables a otras células, o incluso de padres a hijos cuando las mutaciones se producen sobre células germinales como óvulos o espermatozoides. La acumulación de estas mutaciones en las células de mamíferos tiene relación con la aparición de procesos neoplásicos. Además, si estas mutaciones se producen durante el embarazo en las células del concepto en desarrollo, pueden llevar a la inducción de malformaciones o incluso abortos. Si las mutaciones se producen sobre óvulos o espermatozoides pueden llevar a alteraciones reproductivas como infertilidad o una mayor incidencia de enfermedades hereditarias⁴⁶.

2.1.3.2.3 ESTUDIOS GENOTÓXICOS *IN VITRO*

Las pruebas de genotoxicidad son ensayos que evidencian las alteraciones causadas al material genético, de manera directa o indirecta, por agentes ambientales, tanto en células somáticas como germinales. La adecuada determinación de la actividad genotóxica exige la disponibilidad de métodos de detección específicos. El primer paso para realizar los estudios de evaluación genotóxica es la ejecución de ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial mutagénico de los compuestos químicos en breve tiempo. Estos ensayos de genotoxicidad a corto plazo resultan de gran utilidad porque permiten detectar mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas, daño primario a la estructura del ADN, transformaciones celulares u otras afectaciones, los cuales son inducidos por compuestos químicos o físicos que abundan en el ambiente⁴⁷.

La evaluación genotóxica para compuestos de nueva síntesis y fitofármacos es de carácter obligatorio a nivel internacional. La diversidad de efectos deletéreos a los que está expuesto el material hereditario es imposible de detectar a través de un único sistema de ensayo. El amplio espectro de mutaciones que pueden originarse no sería abarcado en un ensayo aislado y ofrecería un resultado poco preciso. Resulta imprescindible usar un grupo de ensayos *in vitro* e *in vivo* que permitan una correcta extrapolación del efecto genotóxico

de la sustancia de interés para poder predecir con certeza un posible efecto carcinogénico del compuesto en estudio y realizar una correcta extrapolación de los hallazgos detectados, al hombre.

2.1.3.2.4 LOS METALES COMO POSIBLES CAUSANTES DE GENOTOXICIDAD

De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75% son metales, entre los que destacan los denominados metales pesados tóxicos más conocidos como son el mercurio, el plomo, el cadmio y el talio. También se suele incluir un semimetal como es el arsénico y, en raras ocasiones, algún no metal como el selenio. A veces también se habla de contaminación por metales pesados incluyendo otros elementos tóxicos más ligeros, como el berilio o el aluminio.

Éstos son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano. Aunque el término metal pesado no está bien definido, la descripción más aceptada corresponde a que los metales pesados son un grupo de elementos que tienen un peso molecular comprendido entre 63,5 y 200,6 con una distribución electrónica similar en su capa externa⁴⁵.

Desde un punto de vista biológico y toxicológico los metales pueden ser clasificados en cuatro grupos: (1) metales con toxicidad aparente y con amplia distribución en el ambiente (p.ej. arsénico, cadmio, plomo, mercurio y uranio); (2) metales traza esenciales (cromo, cobalto, manganeso, selenio y zinc); (3) otros metales con importancia biológica (níquel y vanadio); y (4) metales con interés farmacológico (aluminio, galio, litio y platino).

En las últimas décadas, la concentración de metales en el ambiente ha aumentado considerablemente, debido a las variadas actividades de origen antropogénico principalmente la minería, deforestación, generación de residuos sólidos entre otros, de manera que actualmente estos metales representan una clase importante de contaminantes ambientales⁴⁵.

En general, algunos metales pueden tener efectos positivos como micronutrientes esenciales a bajas concentraciones y efectos tóxicos a niveles altos. Estos efectos pueden observarse a nivel histológico, celular o molecular. Entre los efectos a corto plazo causados por los metales de transición destacan la neurotoxicidad, la hepatotoxicidad y la nefrotoxicidad, sin olvidar su potencial cancerígeno.

2.1.3.2.5 TOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS (mercurio, plomo, cadmio y talio)

Los metales pesados muestran toxicidad cuando no son metabolizados por el organismo y cuando, consecuentemente se acumulan en los tejidos. Las rutas de exposición a los metales son múltiples, que éstos pueden entrar en el cuerpo a través de los alimentos, agua, aire o por la absorción a través de la piel.

Aunque los niveles de exposición generalmente son bajos, éstos pueden incrementar considerablemente por razones de índole laboral o como consecuencia de accidentes.

Las propiedades toxicológicas de los metales dependen altamente del elemento metálico involucrado, pero éstas se ven drásticamente modificadas en función del tipo de compuesto formado, de si es orgánico o inorgánico, así como de sus características hidrofílicas o lipofílicas; estos factores determinan significativamente su toxicinética y, por lo tanto, sus posibilidades de alcanzar sus dianas biológicas⁴⁵.

Potencialmente, todos los metales pesados pueden causar toxicidad cuando son ingeridos en cantidades suficientemente altas, pero hay algunos metales con características especiales, los cuales pueden tener una gran capacidad de penetración o producir toxicidad a concentraciones bajas. A pesar de que la toxicidad de los metales ha sido ampliamente investigada en las últimas décadas, todavía existen múltiples incógnitas sobre sus mecanismos de acción.

En general, los metales pesados suelen ejercer su toxicidad por la formación de complejos con compuestos orgánicos. Estas moléculas biológicas modificadas pierden sus capacidades funcionales propias, provocando el malfuncionamiento o la muerte de las células afectadas. La mayoría de los grupos involucrados en la formación de complejos son el oxígeno, el azufre, y el nitrógeno. Cuando los metales se unen a estos grupos pueden

inactivar sistemas enzimáticos importantes (glucólisis, ciclo de krebs, cadena transportadora de electrones, etc.) ó afectar las estructuras proteicas.⁴⁵

Los metales pesados poseen una elevada reactividad biológica dada su capacidad para unirse con diversos tipos de moléculas orgánicas. Los procesos de bioacumulación de los metales se deben básicamente a la imposibilidad, por parte del organismo afectado, de mantener los niveles necesarios de excreción del contaminante, por lo que sufre una acumulación en el interior del mismo. El proceso se suele agravar a lo largo de las cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación experimentan un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, siendo en los superiores donde se hallan los mayores contaminantes. Una vez incorporados a los tejidos, los metales son capaces de reaccionar con una variedad de moléculas, y sus efectos tóxicos específicos sobre un sistema biológico dependen de reacciones con complejos que son esenciales para la función normal de ese sistema. Así, los metales muestran gran afinidad por los grupos sulfhidrilo y, en menor medida, por el radical amino, fosfato, carboxilo, imidazol e hidroxilo, pertenecientes a enzimas u otras proteínas esenciales.

Por otro lado, diversos estudios previos demuestran que algunos de los denominados metales de transición (plomo, cadmio, mercurio y arsénico) actúan como catalizadores de reacciones de oxidación de macromoléculas biológicas; por lo tanto, la toxicidad asociada a estos metales se podría deber también al daño oxidativo inducido en los tejidos. Tanto los metales que poseen actividad óxido-reductora (hierro, cobre y cromo), como los que no la poseen (plomo, cadmio y mercurio), pueden causar incrementos importantes de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como los radicales hidroxilo (OH[•]), superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células bajo condiciones de estrés oxidativo muestran un amplio rango de alteraciones debidas a lesiones causadas por los EROs en los lípidos, proteínas y ADN, lo que sugiere que la toxicidad de los metales pesados puede ser explicada, al menos en parte, por la capacidad de inducir estrés oxidativo en las células⁴⁵.

Luego de un análisis de los efectos tóxicos de los metales pesados, es necesario que consideremos también la genotoxicidad como un tipo específico de toxicidad, ya que muchos de estos metales tienen la capacidad de interactuar con el ADN, ya sea de forma directa o indirecta, provocando efectos biológicos nocivos para las células y, en consecuencia, para los organismos.

2.1.3.2.6 GENOTOXICIDAD DE LOS METALES PESADOS

Los metales pueden inducir genotoxicidad por múltiples vías, ya sea por si solos o por la potenciación de los efectos de otros agentes, es decir, por la interacción entre agentes. Se ha descrito que casi todos los metales causan daños en el ADN por la generación de estrés oxidativo en las células, principalmente por las especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden inducir la peroxidación de lípidos, daño en el ADN, la reducción de grupos sulfhidrilo, así como alteraciones de las vías de señalización celular y de la homeostasis del calcio. Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno generados por los metales pueden promover distintos tipos de daño en el ADN, tales como roturas de cadena simple y modificaciones de las bases del ADN. Sin embargo, los metales también pueden inducir la genotoxicidad debido a su habilidad para inhibir los mecanismos de reparación del ADN⁴⁵.

Por ejemplo, metales como el níquel y el plomo pueden ser comutagénicos e interferir con los mecanismos de reparación por excisión de nucleótidos (NER) y de bases (BER). La disminución de la habilidad para eliminar el daño genético causado por los metales puede incrementar el riesgo de cáncer. Además, se ha demostrado que los metales afectan la fidelidad de la replicación del ADN, debido a que son capaces de inhibir las enzimas involucradas en la replicación y en la síntesis de nucleótidos, así como alterar los procesos de metilación del ADN y de los componentes del complejo de replicación del ADN⁴⁵.

Aunque existen numerosos estudios que han evaluado los efectos genotóxicos y carcinógenos de diferentes metales pesados, aún se desconocen los efectos que pueden provocar algunos metales y, fundamentalmente, los mecanismos por los cuales causar genotoxicidad. De esta manera, nuevos estudios que utilicen ensayos sensibles y capaces

de detectar un amplio rango de mutaciones ayudarán a dilucidar y conocer más profundamente los efectos de los metales o metaloides sobre el material genético.

2.1.3.2.7 DETECCIÓN DEL DAÑO GENOTÓXICO

La gran trascendencia que tienen los efectos adversos causados por los metales pesados (y otros agentes) sobre el ADN, ha hecho que los científicos se hayan movilizado en la obtención de herramientas que permitan detectar con la mayor rapidez y sencillez posibles si un determinado agente es genotóxico o no, y aportar información sobre los mecanismos mediante los cuales ejercen su potencialidad genotóxica.

Así, para detectar los posibles agentes genotóxicos se ha desarrollado una amplia variedad de ensayos que utilizan organismos de complejidad muy variada, abarcando desde organismos unicelulares simples, como las bacterias, hasta mamíferos y cultivos de células humanas. Cada ensayo tiene la capacidad de detectar diferentes alteraciones en el ADN, lo que permite que, al utilizar distintos ensayos en paralelo, se pueda tener una evaluación genotóxica completa del potencial de un determinado agente⁴⁵.

2.1.3.2.8 EL ENSAYO COMETA

El ensayo del cometa, conocido como electroforesis alcalina en gel de células individuales (SCGA:Single Cell gel Electrophoresis Assay), es una prueba sensible, rápida y sencilla que permite la cuantificación y análisis del daño genético causado por diferentes agentes químicos y físicos. Este ensayo tiene la capacidad de detectar el daño genético causado por roturas del ADN de doble y simple cadena, sitios álcali-lábiles, daño oxidativo, y enlaces ADN-ADN, ADN-proteína, o aductos, así como el daño genético debido a deficiencias en la reparación del ADN⁴⁵.

El ensayo cometa comprende una metodología básica, la cual se puede resumir en siete etapas: (1) las células de interés se suspenden en agarosa y se colocan en portaobjetos previamente cubiertos con agarosa; (2) se procede a la lisis de las células bajo una alta concentración de sales para eliminar las proteínas celulares y liberar el ADN; (3) se lleva a cabo una exposición alcalina (usualmente, pH> 13) para el desenrollamiento y relajación del ADN, permitiendo la expresión de roturas de cadena simple y de sitios alcalilábiles; (4) se lleva a cabo una electroforesis bajo condiciones alcalinas (pH>13), la cual permite que las roturas del ADN o los bucles relajados migren bajo el efecto del campo eléctrico hacia

el ánodo; (5) a continuación, se procede a la neutralización de las condiciones alcalinas; (6) se procede a la tinción del ADN y a la visualización microscópica (mediante fluorescencia) de los cometas; y (7) finalmente se procede al recuento y análisis de los niveles de daño genético observado.

El principio del ensayo se basa en que el ADN no dañado mantiene una asociación altamente organizada con una matriz de proteínas en el núcleo. Cuando el ADN es dañado, esta organización es alterada y las cadenas simples de ADN pierden su estructura compacta y se relajan, expandiéndose fuera de su cavidad. Cuando el campo eléctrico es aplicado, el ADN, que tiene una carga negativa, migra hacia el ánodo. Las cadenas de ADN no dañado son demasiado grandes, y no migran de la cavidad, mientras que el ADN dañado presenta fragmentos, los cuales se pueden mover fácilmente a través de la agarosa. Así, la cantidad de ADN que migra es una medida de la cantidad de ADN dañado en la célula⁴⁵.

Las principales ventajas que presenta este ensayo son las siguientes: a) se pueden obtener datos a nivel de células individuales, lo cual permite un análisis estadístico más potente; b) sólo se necesita un pequeño número de células por muestra (aprox 10.000); c) es capaz de detectar niveles bajos de daño genético; d) se puede utilizar cualquier célula eucariota; e) el tiempo necesario para completar un estudio es muy corto; y f) es un ensayo relativamente económico de realizar⁴⁵.

La gran sensibilidad del ensayo cometa fue desarrollado para medir la variación del daño en el ADN y la capacidad de reparación dentro de una población de células de mamíferos, en la última década sus aplicaciones van desde la biomonitorización de poblaciones humanas y organismos centinelas, a procesos de reparación del ADN y otros estudios de toxicología genética. En este último campo este ensayo ha tenido gran importancia y sus aplicaciones incluyen: 1) ensayos de exploración; 2) estudios mecanísticos para distinguir el daño producido en los cromosomas por genotoxicidad y citotoxicidad; 3) estudios mecanísticos para distinguir entre carcinógenos genotóxicos y carcinógenos no genotóxicos; y 4) puede incluirse en las baterías de ensayos *in vitro* e *in vivo*⁴⁵.

Este amplio uso se debe principalmente a que es un ensayo muy versátil, en donde cualquier tipo de tejido puede ser empleado, tiene la capacidad de detectar diferentes tipos de daño genético y sólo requiere un bajo número de células. Convirtiéndose así en un ensayo ideal en comparación a otros⁴⁵.

2.1.3.3 DESCRIPCION DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

2.1.3.3.1 Características generales de *Eisenia foetida*

Conocida también como “lombriz roja”; de color rojo oscuro, respira por medio de su piel, mide de 6 a 8 cm de largo, de 3 a 5 milímetros de diámetro y pesa aproximadamente 1 gramo. Son de una especie genéticamente mejorada, son anélidos segmentados de la clase clitelados y pertenecen al orden oligoquetos, poseen las siguientes características: son longevas ya que pueden vivir hasta 16 años, son hermafroditas, acoplándose cada 7 días, siendo su reproducción geométrica ya que son prolíferas, ponen un coco cada 7 días del cual nacen hasta 10 lombrices y adquieren su madurez sexual a los 2 o 3 meses. Son animales con un excelente aparato digestivo compuesto con 6 hígados y que come por día hasta su propio peso, adquiriendo para sí hasta el 30% y excretando el 70%. Y justamente es aquí el valor económico de sus deyecciones, ya que estamos en presencia del producto orgánico de excelentes condiciones con macro y micro nutrientes necesarios para los vegetales en general⁴⁸.

La lombriz está clasificada en el reino animal como Anélido terrestre de la clase de los Oligoquetos. Vive en ambientes húmedos, rehúye la luz y se nutre de restos orgánicos vegetales y animales en descomposición, siendo un excelente recuperador. Es hermafrodita insuficiente (tiene ambos sexos, pero necesita aparearse para reproducirse).

Está dotada de 5 corazones y 6 pares de riñones. En cautiverio vive un promedio de 15 años y no contrae ni transmite enfermedades. Desde el punto de vista ecológico se la clasifican en:

EPIGEAS, viven sobre la superficie del suelo, se alimentan de materia orgánica y producen HUMUS.

ENDOGEAS, son las más conocidas, viven dentro del suelo cavan galerías horizontales y comen y defecan tierra.

ANECICAS, viven dentro del suelo, cavan galerías verticales y durante la noche suben a la superficie del suelo alimentándose de materia orgánica.

Los tres grupos de lombrices son sin duda el gran arado de la tierra y constituyen el elemento más importante en el rol de los EDAFOECOSISTEMAS.

Siendo las lombrices animales migratorios por excelencia, ha sido necesario para poder desarrollar la lombricultura, que su hábito sea modificado y es así como luego de más de 14 años de proceso, su hábito migratorio fue modificado para llegar al día de hoy en que su hábito sedentario permitiera mantenerla en cautiverio y poder realizar un proceso industrial en el que no solamente se la pueda mantener en un criadero sin que fugue, sino que adicionalmente ya tiene la capacidad de vivir en altas densidades (30 a 40.000 lombrices por metro cuadrado) sin que se alteren sus efectos conductuales.

De las más de 8000 especies conocidas de lombrices, solamente 2500 han sido clasificadas y solamente tres de ellas han podido ser domesticadas, siendo *Eisenia foetida* la más conocida y aquella que es utilizada en más del 80% de los criaderos del mundo.

Las lombrices californianas pueden criarse en cualquier lugar del planeta que posea, al menos, una temporada con temperaturas promedio superior a los 20°C, es decir cualquier lugar con climas templados. Estas lombrices, a 21°C tienen la máxima capacidad de reproducción, por lo tanto, se reproducirán más durante los meses cálidos. Cuando la temperatura es inferior a 7°C, las lombrices no se reproducen, pero siguen produciendo abono, aunque en menor cantidad.

2.1.3.3.2 Anatomía y fisiología de la lombriz

La lombriz se caracteriza por presentar una segmentación interna y externa en el cuerpo, cada segmento semeja a un anillo característica principal de los anélidos. Las principales características sistémicas de la lombriz son: carecen de esqueleto y poseen una delgada cutícula pigmentada, tienen pocas gónadas las cuales están situadas en definidas posiciones segmentadas⁴⁹.

La lombriz vive normalmente en zonas con clima templado, su temperatura corporal oscila entre los 19° C y 20° C, mide de 6 a 8 cm de longitud; su diámetro oscila entre los 3 y 5 mm es de color rojo oscuro; en cada metámero se ubican 5 pares de corazones y un par de riñones una temperatura optima 25°C, pH ideal 6.8 a 7.2, humedad 70 a 80 %⁴⁹.

El aparato digestivo está formado por la cavidad bucal, faringe, esófago, buche, estómago e intestino. En el esófago se encuentran las glándulas calcáreas, cuya función es excretar carbonato de calcio para neutralizar los ácidos orgánicos presentes en el alimento⁴⁹. El uso que las lombrices dan a la faringe es el de una bomba succionadora, donde las contracciones musculares jalan las partículas a través de la boca; El estómago muele el alimento con la ayuda de las partículas minerales. La lombriz roja tiene la ventaja sobre otro tipo de explotaciones de no contraer enfermedades, su mayor peligro en éste tema radica en el envenenamiento por exceso de acidez y gases, esto puede suceder cuando proteínas no totalmente fermentadas se acidifican y liberan gases nocivos³⁵.

La respiración es a través de la superficie del cuerpo, en la cual hay una red de pequeños vasos sanguíneos; en la pared del cuerpo de las lombrices terrestres el oxígeno es disuelto en una película permeable de la superficie húmeda, y se conduce a través de la cutícula y la epidermis hasta los vasos donde es tomado por la hemoglobina y ésta es transportada por todo el cuerpo⁴⁹.

La cutícula húmeda de la pared del cuerpo, favorece la absorción de oxígeno, y la liberación de anhídrido carbónico, por lo tanto la respiración sólo puede darse con la cutícula húmeda, cuando se expone una lombriz al sol deja de respirar al irse secando³⁶.

2.1.3.3 Taxonomía de la lombriz

Reino	Animal
Tipo	Anélida
Clase	Oligoqueta
Familia	Lombrícidae
Género	Eisenia
Especies	<i>Eisenia foetida</i> (lombriz roja)

2.1.3.4 Ciclo vital de *Eisenia foetida*

La lombriz roja madura sexualmente a los dos meses de vida, (figura 01) lo cual viene indicado por el apareamiento del clitelo. La copulación de las lombrices se efectúa con no menos de 7 días entre uno y otro, teniendo 1 ó 2 capullos por cada lombriz por copulación. Si las condiciones son óptimas, después de 14 a 21 días de incubación, eclosiona el capullo y nacen las nuevas crías, entre 2 y 9 lombricillas de color rosado pálido translúcido por capullo, en condiciones de moverse y nutrirse de inmediato. Las nuevas lombrices alcanzan su madurez sexual entre 45 y 90 días de su nacimiento dependiendo de las condiciones de cultivo.

El sistema muscular de la lombriz roja consiste en una serie de fibras externas circulares o transversas de músculo, que rodean el cuerpo, y una serie interna de fibras musculares longitudinales que sirven para mover las cerdas. El aparato circulatorio está formado por un vaso sanguíneo dorsal prominente y cuando menos cuatro vasos sanguíneos ventrales, que recorren de forma longitudinal el cuerpo y están conectados entre sí a intervalos regulares por medio de una serie de vasos transversales. El vaso dorsal está equipado con válvulas y es el verdadero corazón. No obstante, el bombeo de la sangre se produce sobre todo por movimientos musculares generales⁴⁵.

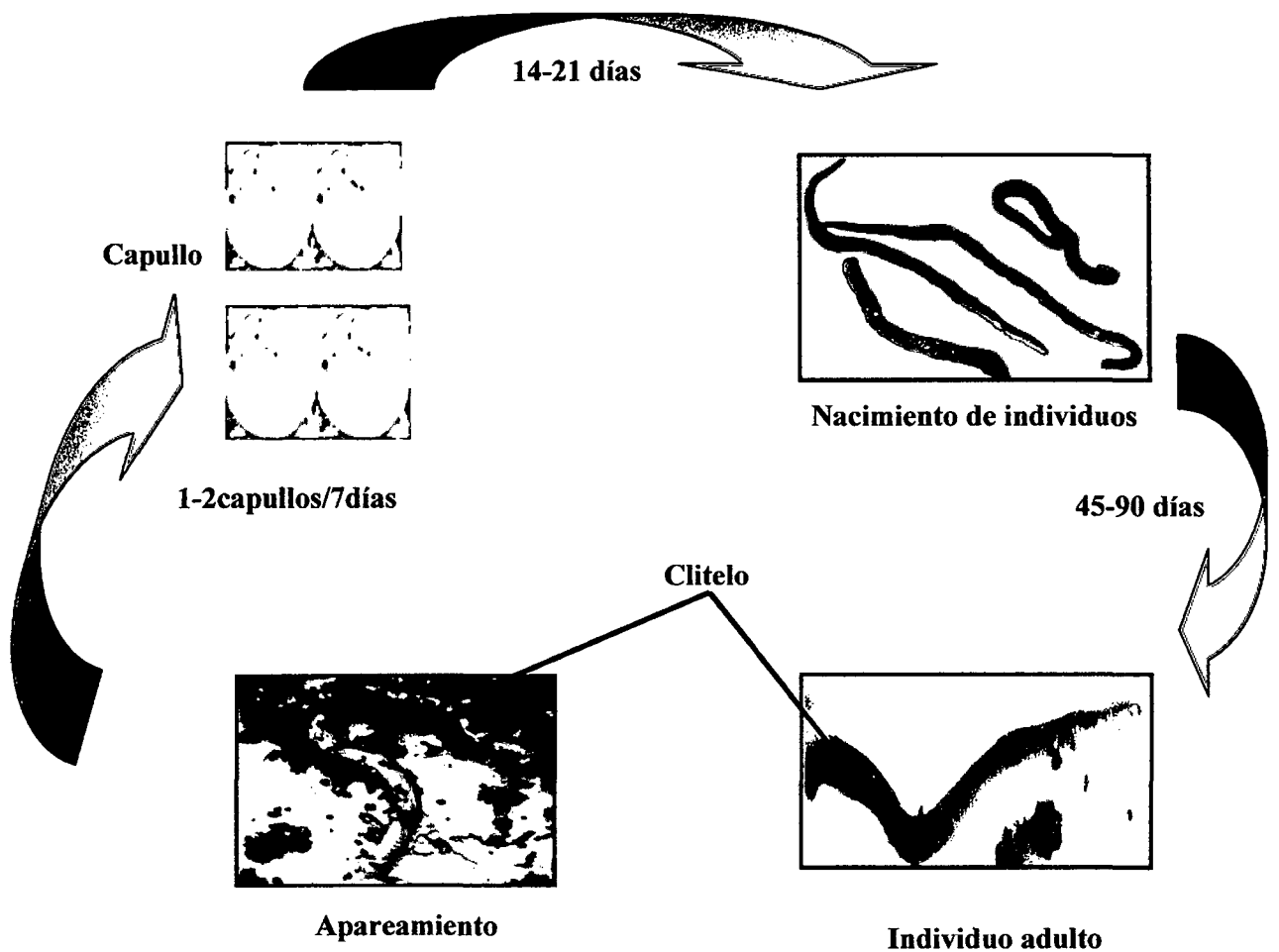


Figura 01. Ciclo vital de *Eisenia foetida* "lombriz roja"

La lombriz roja alcanza su madurez sexual a los 90 días de edad y se considera adulta a los 7 meses. Cada lombriz está dotada de un aparato genital masculino y de un aparato genital femenino, el aparato genital femenino recibe el esperma, y lo retiene hasta el momento de la fecundación, dos lombrices en fase de acoplamiento giran en sentido opuesto la una de la otra, de esta manera pueden contactar, el aparato genital masculino de una con el aparato genital femenino de la otra³⁷.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA

3.1.1 Tipo de investigación

El estudio aplicó la investigación descriptiva, permitiéndonos estudiar el efecto genotóxico, en *E. foetida*, de diferentes diluciones de lixiviado y diferentes tiempos de exposición, manifestándose en la fragmentación del ADN nuclear de los celomocitos, efecto, que se visualizó como cometas en los geles de agarosa teñidos con nitrato de plata.

3.1.2 Diseño de investigación

El diseño fue de tipo experimental. Se contó con dos grupos de suelos que fueron tratados con agua ultrapura (control negativo-CN) y lixiviado (grupo problema). Cada grupo de suelo se trabajó por duplicado con 10 lombrices cada uno, que fueron expuestos por 3 semanas a diferentes concentraciones de los lixiviados: 1/1 v/v, 1/2 v/v, 1/10 v/v, 1/100 v/v y 1/1000 v/v. La población estuvo constituida por el lixiviado que se genera en los rellenos sanitarios manuales y ejemplares de lombrices de la Amazonía. La muestra estuvo representada por el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta y 120 individuos de *E. foetida* “lombriz roja” (10 por cada grupo experimental [3 a los 7 días y 3 a los 14 días y 3 a los 21 días de exposición]). Obtenidas por muestreo aleatorio simple.

Las evaluaciones del nivel de daño genotóxico en los celomocitos de las lombrices se hicieron mediante el ensayo cometa a los 7, 14 y 21 días. Para ello, se tomaron mediante muestreo aleatorio simple 9 lombrices (3 de los 7, 14 y 21 días) de cada grupo experimental (grupo control y grupo problema), tal como se muestra en el diseño.

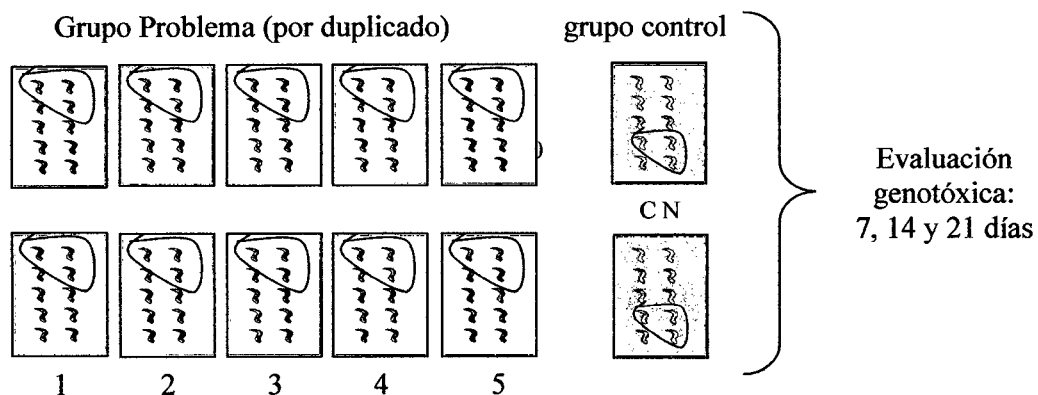


Figura 02. Diseño del experimento

3.1.3 Población y muestra

3.1.3.1 Ubicación del Área de Estudio:

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonía – CIRNA de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. La muestra de lixiviado fue colectado del relleno sanitario manual de Nauta, ubicada a 7.5 Km de la ciudad de Nauta, la misma que se encuentra a 115 km de Iquitos (vía fluvial) y 2 horas (vía terrestre). La ciudad de Nauta se encuentra ubicada en la margen izquierda del río Marañón, a unas siete millas de su confluencia con el río Ucayali. Fundada en 1830, es una de las provincias más antiguas de nuestra Amazonía. Debido a su estratégica ubicación como punto de enlace de los ríos Marañón y Ucayali, fue cobrando importancia y se constituyó en el centro principal de intercambio comercial y de comunicaciones.

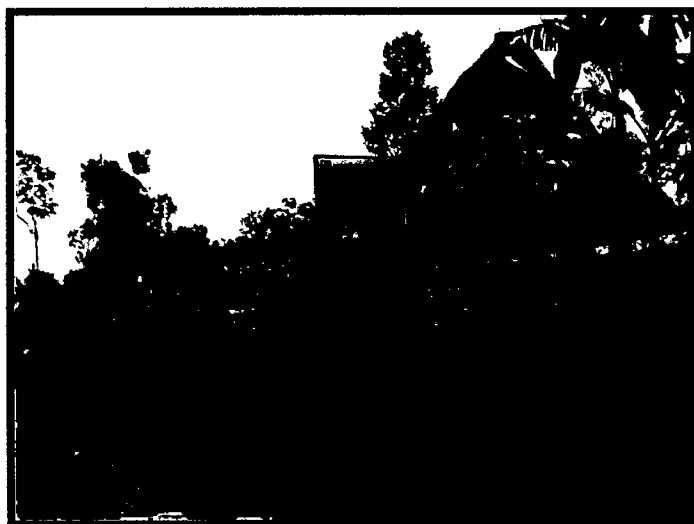


Figura 03. Ruta de acceso al relleno sanitario manual de Nauta.

Su paisaje es colinoso, con superficies de topografía accidentada; en las cercanías de la ciudad, las tierras son aptas para la producción forestal con limitaciones de suelos y erosión.

La Municipalidad Provincial de Loreto-Nauta hasta el 2002 venía utilizando un botadero a cielo abierto y desde julio del 2003 ha adquirido un área ubicada a 7.5 Km de la carretera Nauta - Iquitos, en donde está funcionando el Proyecto del relleno sanitario manual.



Figura 04. Vista del relleno sanitario manual

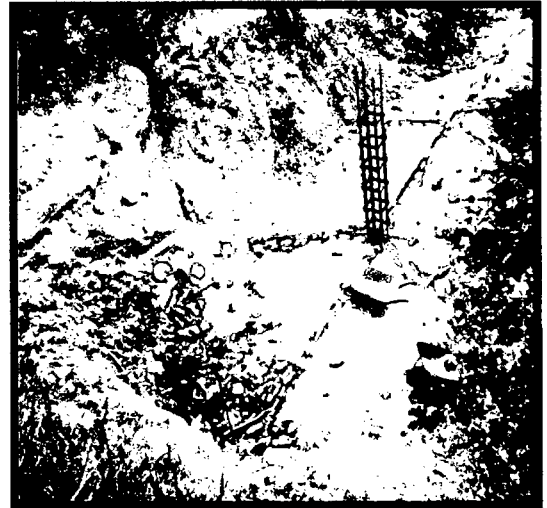


Figura 05. Ampliación del relleno sanitario

A través del reconocimiento del área se pudo observar el inicio del proceso de ampliación del relleno sanitario manual (figuras 04 y 05), asimismo, se encuentran los depósitos de lixiviados que se encuentran expuestos al ambiente, que cuando sobrepasa su capacidad, el personal tiende a retirar este lixiviado en baldes y los arroja por los alrededores del lugar ó simplemente al suelo cercano. Además, los colectan en botellas plásticas descartables y almacenan con fines fertilizantes para sus cultivos.



Figura 06. Poza donde se almacena el lixiviado que genera el relleno sanitario manual.



Figura 07. Canales construidos para el recorrido del lixiviado hacia la poza de almacenamiento.

3.1.3.2 Población:

Estuvo constituida por los ejemplares de *Eisenia foetida* de la Amazonía Peruana y lixiviados que se generan en los rellenos sanitarios manuales.

3.1.3.3 Muestra:

Constituidas por el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta y 120 individuos de *E. foetida* (10 por cada grupo experimental). La muestra de lixiviado se obtuvo por muestreo aleatorio simple de una de las pozas existentes en el relleno. De la misma manera aleatoria se procedió con el muestreo de las lombrices para la respectiva evaluación genotóxica.

3.1.4. Evaluación del nivel de daño genotóxico en celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos a diferentes concentraciones del lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta

Para el establecimiento del respectivo nivel de daño genotóxico se procedió de la siguiente manera:

3.1.4.1. Obtención y cultivo de lombrices

Las lombrices fueron adquiridas del biohuerto de la Municipalidad Provincial de Loreto-Nauta lugar donde se dedican al cultivo de esta especie con fines de investigación, una vez colectadas fueron transportadas a un huerto casero para ser cultivadas y mantenidas por varias semanas bajo las siguientes condiciones: se colocaron 100 lombrices en etapa pre-juvenil en un recipiente de madera de 50x50x25cm que contenía suelo para el cultivo (50% de tierra preparada para macetas, 30% de estiércol de ganado vacuno, 20% de pajilla). El recipiente presentó una ligera pendiente hacia uno de los extremos recubierto por un plástico con pequeños hoyos con la finalidad de conservar la humedad adecuada.

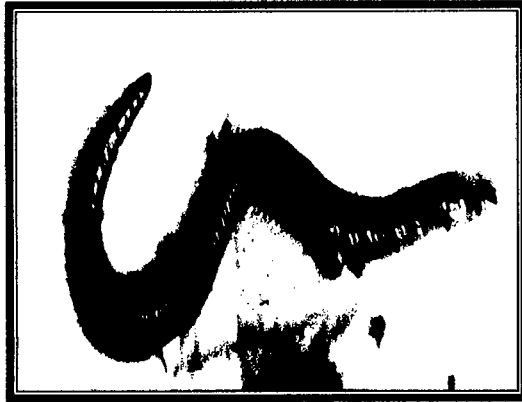


Figura 08. Ejemplar de *Eisenia foetida*

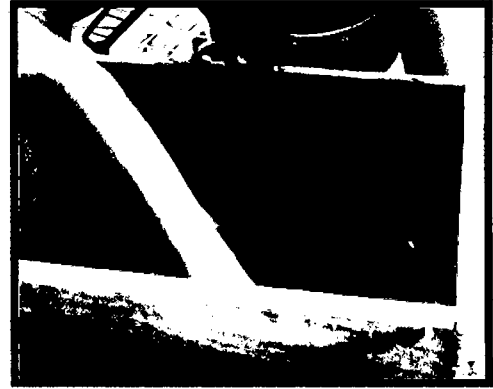


Figura 09. Crianza y mantenimiento de las lombrices

El cultivo se realizó conservando una humedad relativa de 80 a 85%, humedad del suelo de 35% y pH de 6.5. Cada 3 días se controló la humedad, removiendo con la mano el sustrato a fin de oxigenar el medio.

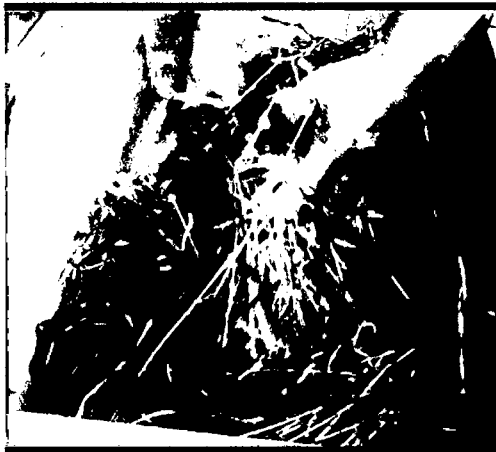


Figura 10. Remoción del sustrato como parte del mantenimiento durante el cultivo.



Figura 11. Control de la humedad del suelo al realizarse la adición de nuevo sustrato.

Cada semana se preparó un nuevo medio de cultivo como alimento, el cual se adicionó al cultivo, revolviendo con mucho cuidado y agregando agua para humedecer el sustrato. En cada semana se aprovechó la oportunidad para realizar el control de viabilidad de los ejemplares y observar el crecimiento y la presencia de tocones (huevos).



Figura 12. Control de viabilidad de las lombrices.



Figura 13. Presencia de tocones (huevos) de las lombrices encontrados en el sustrato.

3.1.4.2. Exposición de *Eisenia foetida* “lombriz roja” a diferentes diluciones de lixiviado.

Para establecer las condiciones experimentales de la evaluación genotóxica se procedió a preparar los suelos problema y control, secando el estiércol de vacuno y homogenización de los demás componentes. Además, se seleccionaron los individuos adultos con clitelo bien definido y con pesos entre 300 y 600mg. Éstos fueron distribuidos en grupos de 10 individuos en recipientes de plástico de 500ml que contenía suelo utilizado para el mantenimiento de los mismos con seis tratamientos diferentes:



Figura 14. Preparación de componentes del suelo

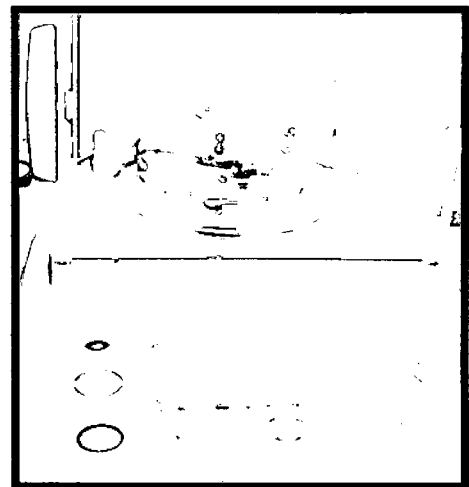


Figura 15. Ejemplares adultos de 300 a 600mg de peso



Figura 16. Pesado de suelo a utilizar (200g)

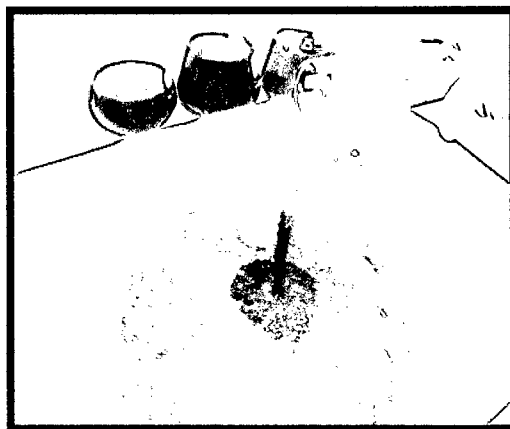


Figura 17. Adición del lixiviado en el suelo preparado



Figura 18. Distribución de lombrices por tratamiento



Figura 19. Proceso de evaluación aplicando diferentes tratamientos



Figura 20. Diferentes concentraciones del lixiviado utilizado en la evaluación genotóxica.

El suelo **control negativo** presentó la misma composición de nutrientes utilizada para el cultivo y mantenimiento de las lombrices. Se empleó 200g del mismo, humedecido con agua destilada al 35%. Para conocer la humedad a capacidad de campo y así poder conocer cuántos ml equivale al 35% de solución para cada suelo, se tomó una muestra de suelo utilizado para el mantenimiento de las lombrices de aproximadamente 100 g y se puso a secar a temperatura ambiente, evitando pérdidas de suelo. Una vez completamente seco se volvió a pesar. Con los valores de peso inicial y final se calculó el porcentaje de humedad a capacidad de campo (% HCC) de la siguiente manera:

$$\% \text{ HCC} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

Del resultado de la resta del peso húmedo con el peso seco, se obtuvo la cantidad de agua disponible en el suelo, por lo tanto al hacer una regla de tres entre la cantidad de agua en el suelo y el 35% requerido en 100 g, se obtuvo la cantidad de agua requerida para cualquiera que sea la cantidad de suelo a utilizar.

Para el **suelo problema** se empleó 200g del suelo control negativo humedecido al 35% con la dilución respectiva del lixiviado (1/1, 1/2 v/v, 1/10 v/v, 1/100 v/v y 1/1000 v/v.) (ver anexo). Se tuvo en consideración que en los tratamientos aplicados no existieran una mortalidad mayor del 10%.

Una vez que los recipientes estuvieron preparados con sus suelos correspondientes, se incorporaron los organismos en ellos, se cubrió la boca del envase con papel aluminio y una liga. Posteriormente se colocaron al *azar* los envases rodeados con envases de agua, dando inicio así al experimento. Se evaluaron los efectos a los 7, 14 y 21 días. Debido a que fue una prueba corta, los organismos no fueron alimentados durante la misma. Cada semana se vació el contenido de los recipientes en bandejas para verificar las condiciones en las que se encontraban los organismos y evaluar la mortalidad.

3.1.4.2.1 Evaluación de la genotoxicidad en celomocitos de *Eisenia foetida* a través del ensayo cometa.

La metodología a seguir para el ensayo cometa fue el siguiente:

a) Obtención de celomocitos³.

- Se seleccionaron aleatoriamente tres lombrices de cada grupo experimental, se los puso en purga por 24 a 48 horas en placas petri con papel toalla humedecido con suero fisiológico. Las toallas se cambiaron cada media hora para evitar que los restos desechados por las lombrices sean consumidos nuevamente.

- Después de purgar las lombrices, se colocaron con mucho cuidado en un tubo de 10ml con 2 ml de solución de extrusión fría (ver composición en anexo) a temperatura ambiente por 2 a 4 minutos.

-Se retiraron las lombrices con una pinza y los celomocitos se almacenaron en refrigeración 4°C protegidos de la luz.



Figura 21. Lombrices en purga por 24 a 48 horas



Figura 22. Lombrices en solución de extrusión fría por 2 a 4 minutos

b) **Prueba de viabilidad:** Se mezcló 20 μ l de azul de Tripán 0.4% y 20 μ l de la suspensión de celomocitos y se puso en una cámara de Neubauer para observar en el microscopio a 40X. Se hizo un conteo del total de células y se determinó el porcentaje de células viables luego de haber identificado a las células no viables (citoplasma teñido de azul).

c) Preparación del control positivo *in vitro*

Se pesó 0.85 g de cloruro de sodio (NaCl) y se disolvió en 70ml de agua ultrapura. Se añadió 30ml de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se homogenizó y se almacenó por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se sumergieron cuidadosamente en esta solución las láminas que contienen los celomocitos inmovilizados en gel de agarosa para su incubación por 30 minutos a 4°C. Se emplearon los celomocitos del grupo control.

d) Preparación de las láminas:

Se limpiaron las láminas con alcohol de 96° y secaron a temperatura ambiente. Se agregó en el centro de la lámina portaobjetos 250 μ l de agarosa de punto de fusión normal, para luego ser extendida con una laminilla cubreobjetos; posteriormente se dejó secar por 15 minutos en refrigeración.

Transcurrido el tiempo de secado, se procedió a retirar la laminilla deslizándola suavemente, para luego añadir 80 μ l de la mezcla de celomocitos (66 μ l de celomocitos + 154 μ l de agarosa bajo punto de fusión) y se colocó nuevamente en refrigeración por 15 minutos en oscuridad. Seguidamente se añadió la tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (80 μ l) y se cubrió con laminilla. Se secó por 15 minutos para luego retirar las laminas cubre objetos, para luego someterlas a la solución de lisis.

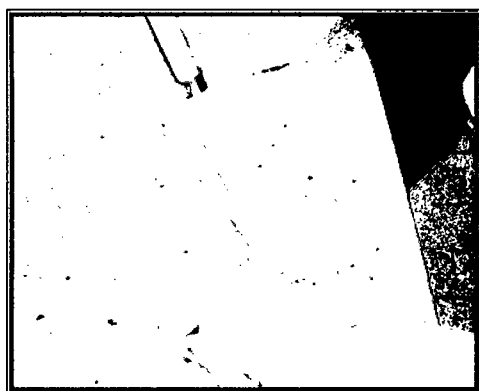


Figura 23. Adición de capas de agarosa

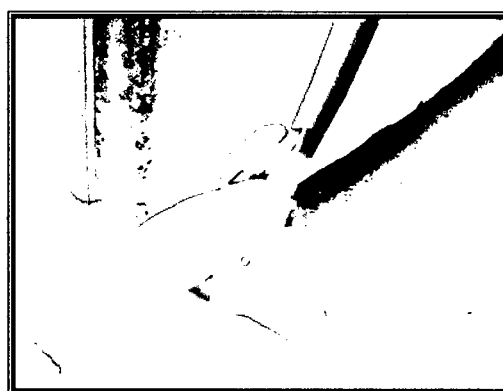


Figura 24. Homogenización de mezcla de celomocitos con agarosa.

d) Lisis:

- Se sumergieron las láminas preparadas en un recipiente de base plana que contenía 250 ml de la solución de lisis refrigerada (4°C), (homogenizada con 1 ml de Tritón X-100 y 1 ml de DMSO) por 1 hora en oscuridad.



Figura 25. Láminas en proceso de lisis

e) Electroforesis:

- Transcurrido el tiempo de lisis, se retiraron las láminas de la solución de lisis y se trasladaron a la cámara de electroforesis que contenía buffer de corrida (solución alcalina) por 25 minutos en refrigeración y en oscuridad, asegurándonos que las láminas estén totalmente cubiertas con dicha solución. Luego se realizó la electroforesis a 30 volts, 300 mA durante 20 minutos. Cumplido el tiempo, se retiraron las láminas y lavaron con agua ultrapura (obtenido por un proceso consecutivo de destilación, desionización, ultrafiltración y tratamiento con luz ultravioleta) fría.

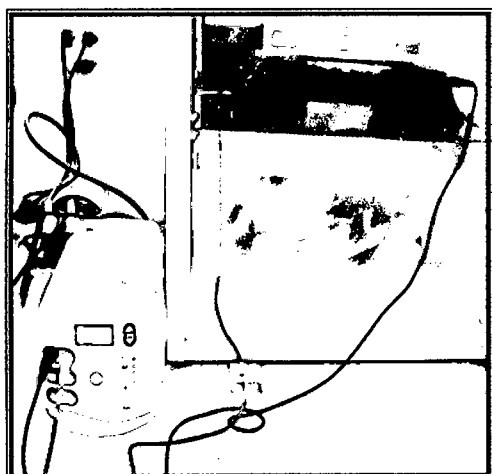


Figura 26. Electroforesis en condiciones de refrigeración

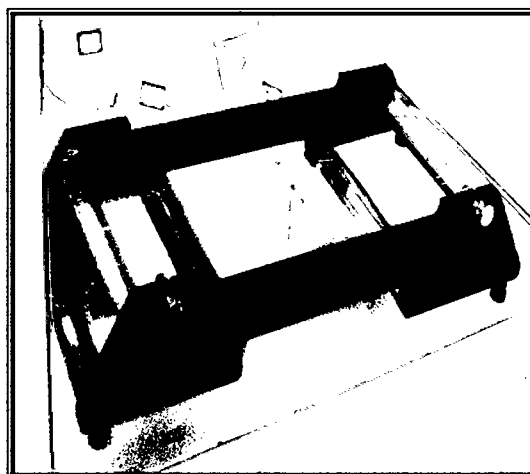


Figura 27. Láminas en solución alcalina por 25 minutos

- Se añadió el buffer de neutralización en placas petri conteniendo las láminas, todo este proceso se realizó en el agitador horizontal por 10 minutos a 68 rpm.
- Culminada la neutralización, se lavó con agua ultrapura fría y se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora.

g) Fijación y Tinción

- Cumplido el tiempo se lavaron las láminas con agua ultrapura y se colocaron en placas petri, todo este proceso se realizó en el agitador horizontal por 10 minutos a 68 rpm.
- Culminada de fijación, se lavaron nuevamente con agua ultrapura y se dejaron secar por 12 horas. Para iniciar la tinción agregando las soluciones A y B (ver composición en anexo) sobre las láminas y en oscuridad durante 1h aproximadamente, agitando a 68 rpm.
- Se detuvo la tinción agregando 1 ml de solución STOP durante 10 minutos. Para luego lavarlas por tres veces con agua ultrapura y se dejaron secar a temperatura ambiente, y guardarlas para su posterior recuento de los cometas.

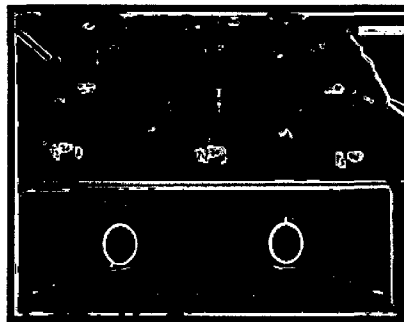


Figura 28. Láminas en proceso de fijación y tinción

3.1.4.3 Técnica de Recolección de Datos:

Los equipos, métodos y técnicas utilizadas establecidas para las siguientes variables son establecidas de acuerdo a (Corona *et al.* 2008)³. Además se procedió a recopilar los datos procediendo de la siguiente manera:

Observación: Estuvo dirigida para la obtención de información directa de los resultados de los niveles de daño del ADN en cada tiempo de exposición al lixiviado. Las observaciones se realizaron utilizando el microscopio con cámara incorporada, anotándose los datos en fichas de registro (ver anexo 03). La imagen que se pudo observar después de realizar la corrida electroforética asemejó a un cometa, en donde la cabeza representa el ADN sin dañar, mientras que la cola del mismo es el ADN dañado o fragmentado.

3.1.4.4. Análisis de metales en el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta.

Para la respectiva medición de la concentración de estos metales pesados se procedió en primer lugar de la siguiente manera:

3.1.4.4.1 Colecta del lixiviado

El lixiviado formado a partir de los residuos sólidos se dirige a una poza construida para su recolección, más no así para su tratamiento. Para la recolección de la muestra se utilizaron botellas de plástico con tapa rosca cuya capacidad fue de 5L empleando un embudo a fin de facilitar su colecta. Luego se transportó al laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la UNAP debidamente almacenadas en termos que conservan una temperatura refrigerada para el envío y análisis correspondientes.



Figura 29. Colecta de lixiviado de la poza

3.1.4.4.2 Análisis de metales presentes en el lixiviado.

La muestra de lixiviado (500ml) se envió al Laboratorio de Envirolab Perú S.A.C, que cuenta con un Laboratorio Certificado en la ciudad de Lima, quienes realizaron el análisis cualitativo de 31 elementos químicos mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de acuerdo a las normas establecidas en (EPA 2007)⁵⁵.

3.1.4.5 Instrumentos de Recolección de Datos:

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron, fueron:

- a). **Fichas o guías de observación.** Se utilizó para registrar la información obtenida de la presencia de cometas, datos fisicoquímicos, y otros.

b). Los Equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron el microscopio con cámara incorporada, cámara de electroforesis, refrigeradora, estufa, baño maría y otros.

3.2. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se empleó la estadística descriptiva e inferencial. Se determinaron el promedio, desviación estándar y para conocer si existen diferencias estadísticas significativas entre el grupo control (positivo (*in vitro*) y negativo) y los grupos experimentales (1, 2, 3, 4 y 5) se hizo el test de ANOVA, mientras que analizar parámetros del ensayo cometa y los diferentes niveles de daño se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. Estableciéndose a priori un nivel de significación $\alpha=0,05$. Los análisis se hicieron usando el paquete estadístico PASW statistics versión 18. Para el análisis del nivel de daño se aplicó lo siguiente:

3.2.1. Recuento de los cometas:

Se observó las láminas en el microscopio con un aumento de 400x y se clasificó 100 cometas de cada lámina correspondiente a cada tratamiento, procediendo a la lectura de acuerdo a la siguiente clasificación:

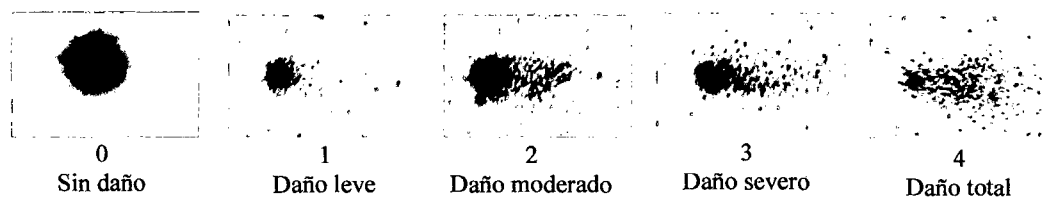


Figura 30. Nivel de daño genotóxico en células estudiadas.

Al terminar el conteo de los 100 cometas por lámina, se hizo una sumatoria del total de células en cada nivel de daño y se multiplicó por su mismo nivel de daño, para finalmente obtener la sumatoria de éstas multiplicaciones. La clasificación del daño por medio de unidades arbitrarias (UA) se encuentra en un intervalo de 0 a 400, siendo 0 el menor daño y 400 el mayor daño³.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Genotoxicidad en celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos al lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta.

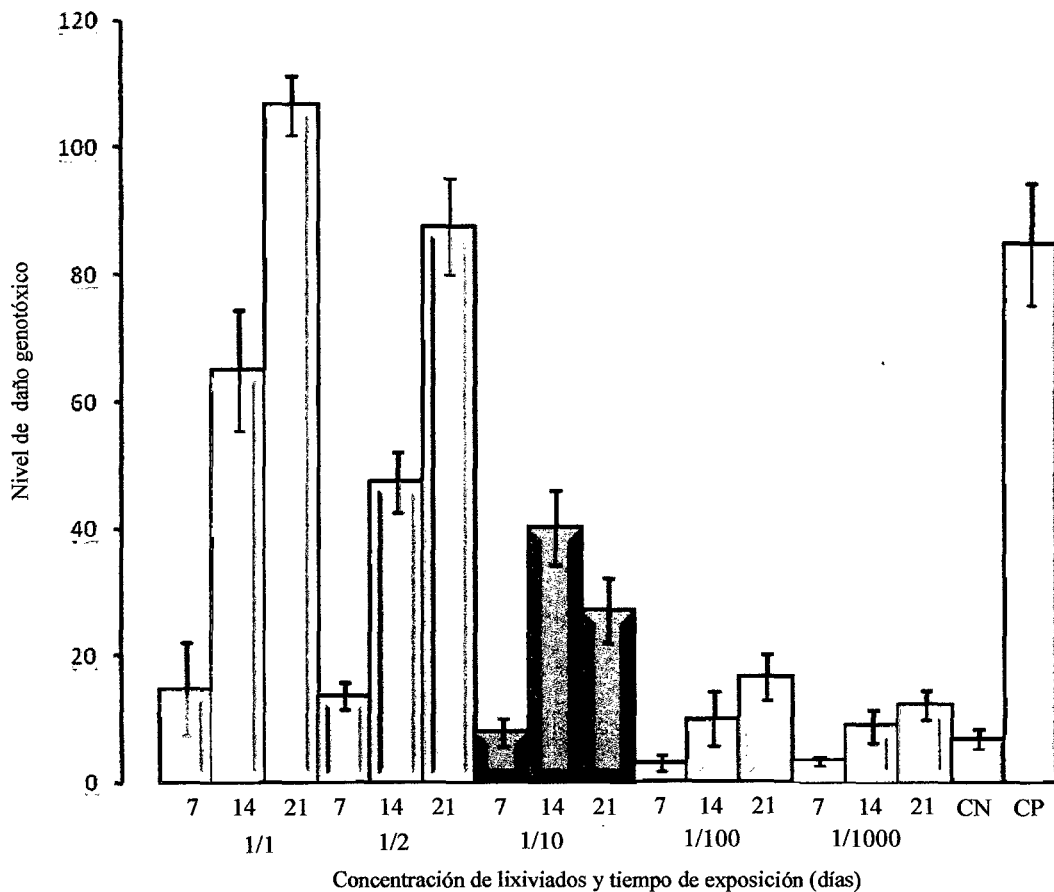


Figura 31. Nivel de daño genotóxico en celomocitos de *Eisenia foetida* expuestos a diferentes concentraciones de lixiviado.

La presente gráfica muestra el nivel de daño genotóxico en cada uno de los tratamientos aplicados (7, 14 y 21 días). En ella se observa claramente que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los días de tratamiento en cada concentración empleada. Asimismo, es evidente que en la primera semana de exposición al lixiviado (7 días) el nivel de daño genotóxico es menor y va incrementándose conforme transcurre el tiempo y la

dilución del lixiviado. Las diluciones $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{1000}$ muestran un alto grado de significancia en cada uno de los tiempos de exposición al lixiviado. Cabe manifestar que durante los 21 días que duró la exposición de las lombrices al lixiviado no se registró mortalidad de los ejemplares.

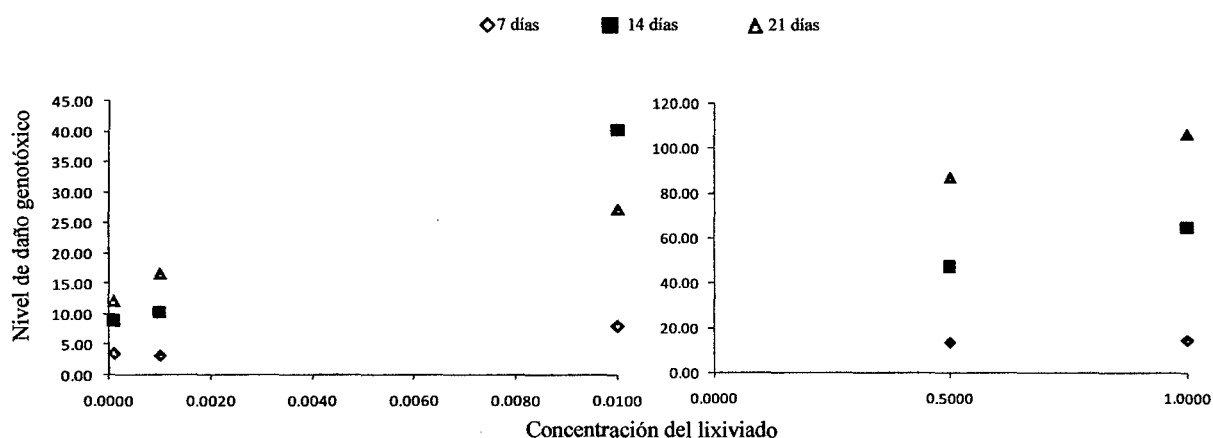


Figura 32. Relación entre la concentración de lixiviado, tiempo de exposición y nivel de daño genotóxico.

Los gráficos muestran que a mayor concentración de lixiviado y a mayor tiempo de exposición se observa que se incrementa el nivel de daño genotóxico en los celomocitos de la lombriz *Eisenia foetida*.

4.2 Análisis de metales del lixiviado de residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta.

En la tabla 01 se presenta la concentración de metales presentes en el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta. Se puede evidenciar que las concentraciones de arsénico (As), níquel (Ni) y berilio (Be) en los lixiviados son inferiores a 0.001 mg/l, las de bismuto (Bi) inferior a 0.10mg/l, las de cadmio (Cd) y titanio (Ti) son inferiores a 0.003 mg/l, las de cobalto (Co) son inferiores a 0.005 mg/l, las de cobre (Cu), plomo (Pb), antimonio (Sb), molibdeno (Mo) y plata (Ag) son inferiores a 0.010 mg/l, las de litio (Li) y talio (Tl) son inferiores a 0.02 mg/l, las de selenio (Se) son inferiores a 0.002 mg/l, las de estaño (Sn) son inferiores a 0.04 mg/l, las de tungsteno (W) son inferiores a 0.2 mg/l, las de vanadio (V) son inferiores a 0.007 mg/l, y las de mercurio (Hg) son inferiores a 0.0002 mg/l.

Las concentraciones de bario (Ba), cromo (Cr), zinc (Zn), estroncio (Sr), y manganeso (Mn) están entre 0.17 mg/l y 0.47 mg/l. El Aluminio (Al) con una

concentración de 6.4 mg/l, además las concentraciones del hierro (Fe), fósforo (P), boro (B), magnesio (Mg) y calcio (Ca) están entre 19.2 mg/l y 58.43 mg/l. siendo los metales de elevadas concentraciones; el sodio (Na) y el silicio (Si) que están entre 305.3 mg/l y 364.5 mg/l, en particular el potasio (K) llegó hasta 2242 mg/l, superando claramente el límite de concentración máxima (0.20 mg/l).

El hierro nos muestra una presencia de 19.12 mg/l, siendo su límite de cuantificación de 0.001mg/l. Este elemento es el cuarto más abundante de la corteza terrestre, y se presenta en dos estados de oxidación: el Fe^{+3} ($\text{Ar}3\text{d}^5$) o férrico y el Fe^{+2} ($\text{Ar}3\text{d}^6$) o ferroso. En presencia de O_2 el Fe^{+2} es oxidado rápidamente a Fe^{+3} , el cual es poco soluble en agua y en donde precipita como óxidos de hierro. Por lo tanto, en nuestra atmósfera rica en O_2 , la forma termodinámicamente más estable del hierro es también la de más difícil acceso para los organismos.

Tabla 01. Informe de análisis de metales presentes en lixiviado de residuos sólidos del relleno sanitario manual de Nauta.

Solicitante:	UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA				
Domicilio Legal:	Av. Grau N° 1072 Iquitos				
Tipo de Muestra:	Solución Líquida (Lixiviados)				
Plan de Muestreo:	...				
Solicitud de Análisis:	SET-175				
Procedencia de la Muestra:	...				
Fecha de Ingreso:	2010-09-13				
Código ENVIROLAB PERU:	1009175				
Referencia:	Cotización N° 7992				
			Fecha de Muestreo:	2010-09-07	
Código de Lab.:	1009175-01	Descripción:		Muestra de Lixiviado	
Análisis	Método de Referencia	Límite de Cuantificación	Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
Aluminio Total	EPA 200.7	0.02	6.4	mg/L	2010-09-16
Arsénico Total	EPA 200.7	0.001	N.D.	mg/L	2010-09-16
Boro Total	EPA 200.7	0.03	32.5	mg/L	2010-09-16
Bario Total	EPA 200.7	0.003	0.17	mg/L	2010-09-16
Berilio Total	EPA 200.7	0.001	N.D.	mg/L	2010-09-16
Bismuto Total	EPA 200.7	0.10	N.D.	mg/L	2010-09-16
Calcio Total	EPA 200.7	0.003	58.43	mg/L	2010-09-16
Cadmio Total	EPA 200.7	0.003	N.D.	mg/L	2010-09-16
Cobalto Total	EPA 200.7	0.005	N.D.	mg/L	2010-09-16
Cromo Total	EPA 200.7	0.002	0.2	mg/L	2010-09-16

"N.D." significa No Detectable al nivel de cuantificación indicado.					
Condición y Estado de la Muestra Ensayada: La muestra llegó a temperatura ambiente al Laboratorio.					
Nota: La fecha de muestreo, es dato proporcionado por el Cliente.					
Metales: EPA 200.7 "Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry" Rev. 4.- May 1994					

Código de Lab.:	1009175-01		Fecha de Muestreo: 2010-09-07		Muestra de Lixiviado	
	Análisis	Método de Referencia	Límite de Cuantificación	Descripción: Resultado	Unidad	Fecha de Análisis
Cobre Total	EPA 200.7	0.010	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Hierro Total	EPA 200.7	0.001	19.12	mg/L	2010-09-16	
Potasio Total	EPA 200.7	0.20	2242.8	mg/L	2010-09-16	
Litio Total	EPA 200.7	0.02	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Magnesio Total	EPA 200.7	0.001	36.35	mg/L	2010-09-16	
Manganeso Total	EPA 200.7	0.001	0.47	mg/L	2010-09-16	
Molibdeno Total	EPA 200.7	0.01	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Sodio Total	EPA 200.7	0.02	305.3	mg/L	2010-09-16	
Níquel Total	EPA 200.7	0.001	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Fósforo Total	EPA 200.7	0.3	20.5	mg/L	2010-09-16	
Plomo Total	EPA 200.7	0.010	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Antimonio Total	EPA 200.7	0.010	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Selenio Total	EPA 200.7	0.002	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Silicio Total	EPA 200.7	0.04	364.5	mg/L	2010-09-16	
Estaño Total	EPA 200.7	0.04	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Estroncio Total	EPA 200.7	0.0003	0.43	mg/L	2010-09-16	
Titanio Total	EPA 200.7	0.003	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Talio Total	EPA 200.7	0.02	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Tungsteno	EPA 200.7	0.2	N.D.	mg/L	2010-09-20	
Vanadio Total	EPA 200.7	0.007	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Zinc Total	EPA 200.7	0.002	0.26	mg/L	2010-09-16	
Plata Total	EPA 200.7	0.010	N.D.	mg/L	2010-09-16	
Mercurio Total	EPA 1631	0.0002	N.D.	mg/L	2010-09-18	

"N.D." significa No Detectable al nivel de cuantificación indicado.

Condición y Estado de la Muestra Ensayada:

La muestra llegó a temperatura ambiente al Laboratorio.

Nota: La fecha de muestreo, es dato proporcionado por el Cliente.

Metales: EPA 200.7 "Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry"
Rev. 4.4 May 1994

Mercurio: EPA 1631 E "Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry"
Revision E August 2002

LUIS BUENO CARBAJAL

Gerente General

C.I.P. N° 6618

Lima, Perú.

2010-09-22

Nota: -Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra indicada.

-Estos resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas del producto.

Page 2 / 2

4.3 PROPUESTA DE DISEÑO DE TRATAMIENTO DE LIXIVIADO EN BASE A REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El almacenamiento de residuos sólidos en el relleno sanitario manual de la municipalidad de Nauta ha permitido un gran avance en la protección del ambiente; no obstante también ha generado un problema ante la aparición de un líquido altamente contaminante, lixiviados de difícil tratamiento mediante métodos convencionales. El alto poder contaminante de los lixiviados hace necesario un tratamiento adecuado, previo a su destino final. Este tratamiento dependerá del origen, composición y producción del lixiviado, mientras que la disposición final variará de acuerdo con los tratamientos recibidos, tales como vertido a aguas superficiales, descarga en estaciones depuradoras de aguas residuales, descarga sobre pilas de compostaje o descarga sobre el propio vertedero⁴⁶.

No existe un sistema de tratamiento exclusivo para el lixiviado; muy por el contrario, se proponen numerosos métodos de tratamiento que se combinan e incluyen tratamiento biológico, adsorción con carbón activado, sedimentación, etc. y tratamientos específicos tales como reducción química, membranas, intercambio iónico entre otros. La gestión de lixiviados es clave para la eliminación del potencial que tiene un vertedero para contaminar acuíferos subterráneos. Estos autores comentan el uso de varias alternativas para gestionar el lixiviado recolectado de los vertederos, incluyendo 1) reciclaje del lixiviado, 2) evaporación del lixiviado, 3) tratamiento seguido por evacuación, y 4) descarga a los sistemas municipales para la recolección de aguas residuales⁵².

Muchas han sido las contribuciones en el tratamiento de los lixiviados. En las últimas décadas los sistemas de tratamiento de lixiviados se han perfeccionado considerablemente y se han vuelto más fiables. Muchos vertederos europeos incluyen ahora plantas bien diseñadas y construidas que permiten tratar los lixiviados de forma consistente con los niveles de limpieza específicos requeridos para cada emplazamiento⁵².

El relleno sanitario manual existente en el distrito de Nauta, no cuenta con el tratamiento de su lixiviado. Por consiguiente es necesario proponer procesos ambientalmente sustentables, que sean técnicamente realizables, económicamente viables y socialmente aceptables.

La solución a este problema es el desarrollo de nuevos productos de fácil aplicación y que puedan sustituir a los de elevado costo. Este es el caso de los polímeros naturales que se obtienen de una variedad de plantas nativas. Generalmente, son utilizados con diferentes propósitos, pero podrían servir en muchos casos como excelentes ayudantes de coagulación o floculación. Tal es el caso del alginato de sodio, goma de tuna, almidones solubles en agua fría (pregelatinizados), goma de semillas de nirmali, pulpa de algarrobo, gelatina común, carboximetil celulosa, goma de red sorrela, sílica activada, lentejas, tamarindo, alhova, floccotan y quitosana⁵³.

En esta propuesta se sugiere la utilización de almidón de plátano. El almidón es una fracción importante de un gran número de productos agrícolas, tales como cereales (maíz, trigo, arroz) cuyo contenido de este carbohidrato es de 30-80%; leguminosas (fríjol, chícharo, haba) con 25-50%; tubérculos (papa, yuca) en los que el almidón representa 60-90%; y algunas frutas como el plátano y el mango, que en su estado verde o inmaduro alcanzan contenidos de almidón de hasta 70% en base seca⁵³.

Sobre la base de los estudios realizados en varios rellenos pequeños, se puede afirmar que la generación de lixiviado se presenta fundamentalmente durante los períodos de lluvias y unos cuantos días después, y se interrumpe durante los periodos secos.

Por tal razón, sería conveniente una adaptación de este método de cálculo para calcular la generación del lixiviado en función de la precipitación de los meses de lluvias y no de todo el año. Este criterio es importante a la hora de estimar la red de drenaje o almacenamiento de lixiviado para los rellenos sanitarios manuales.

Por lo tanto, se sugiere que partiendo de la ecuación, los registros de precipitación sean los del mes de máxima lluvia, expresados en mm/mes, con lo cual se consigue una buena aproximación al caudal generado:

$$Q_{lm} = P \times A \times K$$

donde:

Q_{lm} = Caudal medio de lixiviado generado (m^3 /mes)

P_m = Precipitación máxima mensual (mm/mes)

A = Área superficial del relleno (m^2)

K = Coeficiente que depende del grado de compactación de la basura

1 m = 103 mm

4.3.1. Para el diseño del sistema de drenaje de lixiviado

Dada la poca extensión superficial (3.5 Ha) del relleno sanitario manual, en primer lugar se recomienda minimizar el ingreso de las aguas de lluvia no solo controlando las aguas de escorrentía por medio de canales interceptores a nivel perimetral, sino también impidiendo que las lluvias caigan directamente sobre los terraplenes o zanjas con residuos si se construye un techo que funcione a manera de paraguas. De esta manera, la cantidad de lixiviado tiende a ser nula, con lo que se evita uno de los mayores problemas de este tipo de obras, sobre todo en nuestra zona que se caracteriza por ser lluviosa.

Las instalaciones mínimas y complementarias que debe poseer un relleno de seguridad es la geomembrana de un espesor no inferior a 2mm, tal como está estipulado en el artículo 86, numeral 2 del Reglamento de la Ley 27314 Ley General de Residuos Sólidos.

En segundo lugar, es conveniente construir un sistema de almacenamiento del lixiviado en forma de espina de pescado al interior del relleno, en concreto en la base que servirá de soporte de cada plataforma. El sistema puede estar conectado.

Evitar o minimizar el incremento de lixiviados, e impedir de paso la contaminación de las aguas de lluvia, es técnica y ambientalmente mejor y mucho más económico que diseñar e instalar sistemas de impermeabilización artificial, que construir sistemas de drenaje y, por supuesto, que llevar a cabo los tratamientos convencionales para estas aguas altamente contaminadas, en especial en los pequeños municipios⁵⁰.

4.3.2. Respecto al volumen de lixiviado

La mayor cantidad posible del lixiviado generado se almacenará en zanjas en el interior del relleno sanitario, a manera de falso fondo, y el resto se guardará en otras fuera del relleno para que se evapore. Progresivamente se construirán más zanjas según las necesidades locales. El volumen de lixiviado se estimará con la siguiente ecuación:

$$V = Q \times t$$

donde:

V = Volumen de lixiviado que será almacenado (m^3)

Q = Caudal medio de lixiviado o líquido percolado (m^3/mes)

t = número máximo de meses con lluvias consecutivas (mes)

4.3.3. Longitud del sistema de zanjas para el lixiviado

Con el caudal obtenido se pueden calcular las dimensiones del sistema de zanjas para el almacenamiento de lixiviado. Las zanjas deberán tener por lo menos un ancho de 0,6 metros por un metro de profundidad, siempre que el nivel freático esté un metro más abajo y el suelo tenga las condiciones de impermeabilidad recomendado⁵⁰.

4.3.4. Drenaje y manejo del lixiviado

El manejo del líquido percolado o lixiviado es uno de los mayores problemas que se presentan en un relleno sanitario. Es necesario que se cuente con canales periféricos que interceptan y desvían las aguas de escurrimiento, la lluvia que cae directamente sobre su superficie aumenta el volumen del lixiviado. A continuación se señalan algunas consideraciones para disminuir estos problemas.

Es de vital importancia construir un sistema de drenaje que servirá de base al relleno sanitario antes de depositar la basura; este sistema deberá retener el lixiviado en el interior del relleno para su almacenamiento indefinido, siendo necesario que la compactación diaria de la celda en capas sea de un espesor no menor de 0.20m, y cobertura final con material apropiado en un espesor no menor de 0.50m, tal como está estipulado en el artículo 87, numeral 4 del Reglamento de la Ley 27314 Ley General de Residuos Sólidos. Con ello se logrará disminuir en buena parte su salida y evitar su tratamiento, lo que por su elevado costo es sumamente complejo y poco factible en los pequeños municipios⁵⁰.

Para una mayor eficiencia, se recomienda construir estos drenajes en todas las bases de los taludes interiores y exteriores de las terrazas o niveles que conforman el relleno sanitario. Así, se evitan los escurrimientos por la superficie de los taludes inferiores de los terraplenes de residuos y, además, su interconexión con el drenaje vertical de gases.

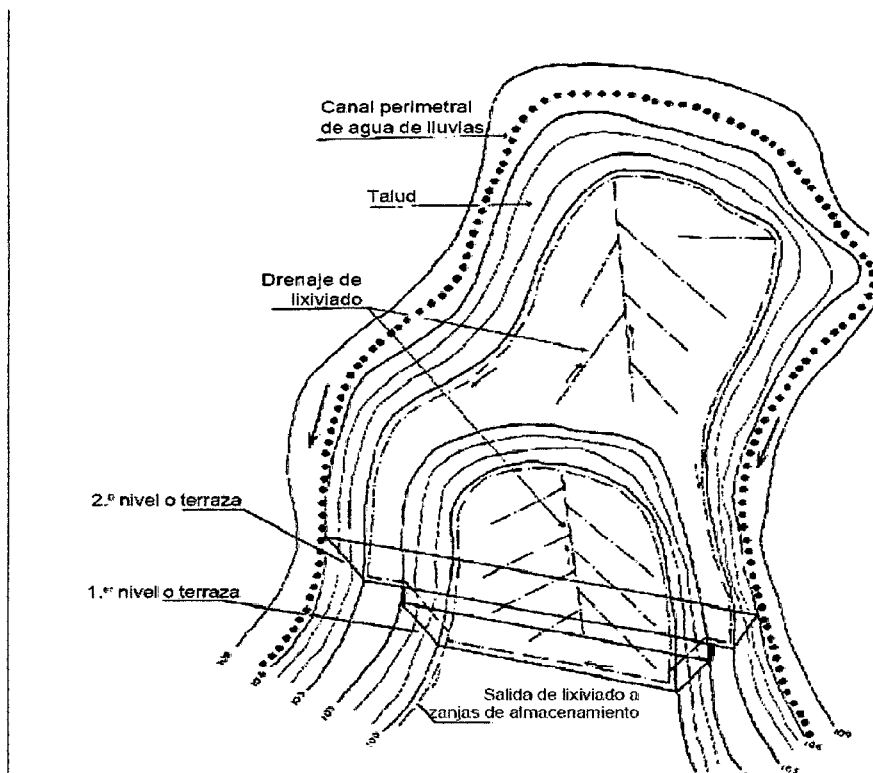


Figura 33. Distribución del sistema de drenaje del lixiviado

4.3.5. Construcción del sistema de drenaje interno de lixiviado

El sistema de drenaje y almacenamiento de lixiviado consiste en una red horizontal de zanjadas de piedra, interrumpidas con pantallas del mismo terreno o de madera. Una manera de construir los drenes es la siguiente:

1. Se traza en el terreno la línea por donde se ubicará el drenaje, el cual puede ser similar al de un sistema de alcantarillado (p. ej.: espina de pescado).
2. Se excavan las zanjadas del dren principal de 0,6 metros por un metro y se instalan las pantallas cada 5 ó 10 metros, con un ancho de 0,20 a 0,30 metros, o simplemente se dejan intactos en la zanja estos pequeños bloques de suelo. Para que el lixiviado pueda permanecer almacenado en el interior del relleno sin rebosar por las zanjadas, se dejará un borde libre de unos 0,30 metros entre la pantalla y el nivel de la superficie del terreno.

3. A fin de tener más capacidad de almacenamiento, se llenarán las zanjas con piedras que midan entre 4 y 6 pulgadas, no con cascajo. Hecho esto, se colocará sobre ellas un material que permita infiltrar los líquidos y retener las partículas finas que lo puedan colmatar; para ello se pueden utilizar, sacos o costales de polipropileno o bien ramas secas de helecho, pasto e incluso hierba.

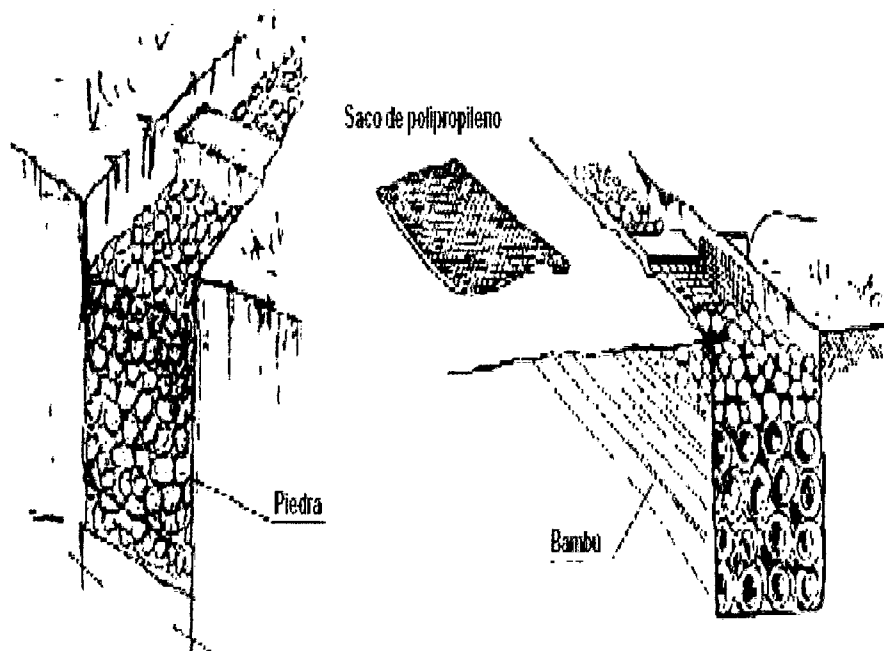


Figura 34. Detalles de la zanja para el almacenamiento del lixiviado.

4. Las zanjas que contengan llantas desechadas de automotores poseen mayor capacidad de almacenamiento del líquido percolado; de paso, se aprovecha así un material voluminoso de difícil manejo en el relleno, que, de no disponerse adecuadamente, podría terminar convirtiéndose en un criadero de mosquitos. Una vez enterradas las llantas en sentido vertical, una junto a la otra, se coloca encima una capa de piedra de 0,20 a 0,30 metros de espesor y se la cubre con sacos de polipropileno o ramas secas, como en el caso anterior. La zanja tendrá una conformación especial para recibir las llantas (figura 35).
5. Cuando se presentan largos periodos de lluvias y la cantidad de lixiviado excede la capacidad de las zanjas de almacenamiento al interior del relleno, se recomienda prolongar y orientar las zanjas de drenaje de la misma manera y, además, construir

fuera del terreno una red de zanjas de secado que permita almacenar este líquido durante esas épocas (figura 34)



Figura 35. Zanja de lixiviado para recibir las llantas usadas

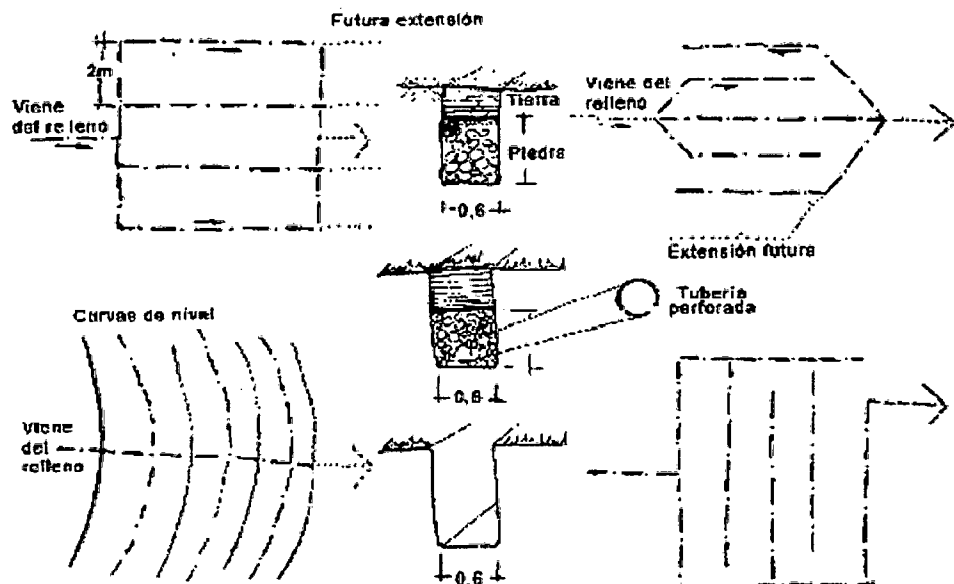


Figura 36. Red de zanjas externas para el almacenamiento del lixiviado

6. En estas zanjas de drenaje exterior se pueden dejar tramos alternos entre pantalla y pantalla sin efectuar el llenado de piedras. Esto se hace con varios propósitos, entre ellos:

- Estimar el volumen del lixiviado que sale del relleno.
- Determinar la cantidad de sedimentos y el momento de efectuar la limpieza de las zanjas.

Considerando nuestro clima tropical se sugiere aplicar un método más eficaz para controlar la lluvia cubriendo con un techo ligero de palma, paja o plástico (similar al de los invernaderos) toda el área superficial de las zanjas o de los terraplenes de basura; con ello se impedirá el ingreso de la lluvia que cae directamente sobre las zonas terminadas y el frente de trabajo. Este método puede disminuir en 90 ó 95% la generación de lixiviado. En algunos pequeños rellenos este problema puede ser eliminado por completo (figura 37).

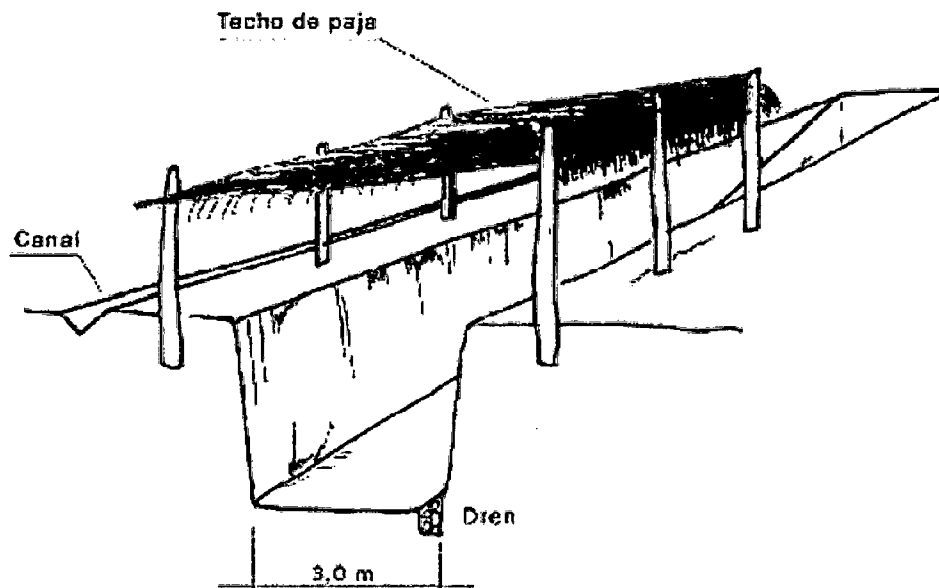


Figura 37. Cubierta o techo ligero para evitar el ingreso del agua de lluvia al relleno sanitario manual

4.3.6. Control y almacenamiento del lixiviado

- Sobredimensionar la red de zanjas de drenaje en el relleno sanitario.
- Construir el relleno de manera que se tengan áreas estrechas de trabajo; es decir, es preferible superponer las celdas, una encima de otra, apoyándolas sobre el talud del terreno y las celdas ya terminadas; dicho de otro modo, la obra se hace hacia arriba en lugar de extenderla en el terreno.
- Introducir en la rutina diaria el cubrimiento de celdas y áreas terminadas temporalmente con material plástico, a fin de impedir la infiltración del agua de lluvia a través de la basura y reducir así el volumen de lixiviado. Hay que señalar que la cantidad de material plástico requerida es pequeña, tomando en cuenta la poca extensión del relleno y el método de trabajo.
- Inmediatamente después de haber terminado algunas zonas del relleno, se procede a aplicar la cobertura final en cuya superficie se sembrará pasto o grama.

4.3.7. Tratamiento del lixiviado

Si cubrimos las áreas rellenadas de residuos y el frente de trabajo con un techo ligero de palma, paja o plástico, no tendremos lixiviado, con lo que se minimizarán todos los problemas y los costos de un tratamiento por lo demás incierto en estos lugares.

En pequeñas poblaciones es necesario evitar a toda costa la generación de lixiviado, pero si a pesar de todo se genera un poco, hay que mantenerlo dentro del relleno sanitario y así evitar tratamientos costosos.

Es importante tener un suelo impermeable o bien hay que impermeabilizarlo artificialmente para que se pueda construir la red de zanjas de almacenamiento que retendrá el lixiviado en el relleno.

Otra práctica que minimiza el problema del lixiviado al clausurarse algunas áreas del relleno sanitario o cuando este acaba su vida útil es la siembra de pasto, grama y pequeños arbustos de raíces cortas que se adapten a las condiciones de la obra. Se los debe sembrar tanto sobre la superficie ya clausurada como en los alrededores del sector rellenado; la evapotranspiración puede ser muy efectiva y en algunos casos hasta evita la producción de lixiviado.

En casos extremos en que no se logre controlar su producción y dado que el lixiviado de los RSM de las pequeñas poblaciones presenta características semejantes a las aguas residuales domésticas (con gran porcentaje de materia orgánica biodegradable de difícil decantación), se podrán aplicar tratamientos biológicos para mejorar en lo posible la calidad de este líquido. Ejemplos de estos métodos son los filtros percoladores y las lagunas de estabilización.

4.3.8. Aislamiento del almidón del plátano.

Para ello se utiliza la metodología modificada de Canepa *et al* (2008)⁵². Se pesa y lava 5kg de plátano, los que son pelados y picados en porciones $\sim 2 \times 1,5$ cm, remojándose por 5min a 40°C en un recipiente que contiene un volumen de agua de seis veces el peso de la muestra, que luego será molida en una licuadora a prueba de impacto, hasta que se desintegre completamente.

Cuando ya esté molida la muestra se lava tres veces con la misma agua utilizada para el remojo sobre un tamiz del N° 100, se elimina la fibra retenida. El filtrado se va acumulando en un recipiente donde se deja sedimentar por ~ 3 h. El sobrenadante se separa por decantación y el sedimento se mantiene refrigerado durante la noche. Al día siguiente se repite la operación, eliminando nuevamente el sobrenadante. El sedimento que se obtiene se centrifugará a 850rpm durante 15min para separar el agua de la pasta. La pasta se seca en una estufa a 40°C por 24h, se pulveriza en porciones de 5g y se envasa en frascos de plástico.

4.3.9. Preparación de las mezclas coagulantes.

Se utiliza dos coagulantes inorgánicos convencionales, sulfato de aluminio (SA) y cloruro férrico (CF) y se prepara mezclas coagulantes basadas en almidón de plátano. Las arcillas bentónicas, la galactita y otras arcillas adsorbentes se utilizan para ayudar en la coagulación de aguas que contengan color intenso o baja turbiedad, como es el caso del lixiviado en estudio, y proporciona materia suspendida adicional al agua en la que se pueden formar los flóculos. Estas partículas floculantes son capaces de sedimentarse rápidamente debido al alto peso específico de la arcilla⁵².

4.3.10. Realización del experimento.

Se realiza un pre-tratamiento al lixiviado, la cual consiste de:

- Acidificación. Se añade ácido sulfúrico concentrado con el fin de oxidar la materia orgánica que es disuelta en el lixiviado y adecuarlo de esta forma para la etapa de coagulación. El pH de control debe ser de 4,5.
- Neutralización. Se agrega cal Ca(OH)_2 , para ajustar el pH hasta un valor ~7.
- Coagulación-floculación. Una vez pretratado el lixiviado se realiza la prueba de jarras, cada una con cuatro repeticiones. Para ello se agrega 1000ml del lixiviado pretratado en seis vasos de precipitado y se adicionan tanto las mezclas como los coagulantes convencionales a seis concentraciones diferentes (75, 150, 225, 300, 375mg l⁻¹) más un testigo. El mezclado se realiza según el método citado en Flores *et al* (2004)⁵³, con mezcla rápida por 15seg a 200rpm, a fin de desestabilizar las cargas superficiales de las partículas de la materia orgánica contenida, seguida de mezcla lenta por 25min a 25rpm para promover la formación de flóculos. Se deja sedimentar cada vaso por 30min y al término de la sedimentación se mide turbiedad, color, demanda química de oxígeno, pH, y conductividad.

Los resultados de la concentración óptima permitirán establecer la factibilidad de aplicar mezclas preparadas a base de almidón de plátano-sulfato de aluminio y arcillas con propiedades coagulantes para el tratamiento de lixiviados. Tales mezclas, por su menor costo, pudieran ser una opción de tratamiento físico en nuestra región.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Las lombrices son conocidas como eficientes acumuladores de metales pesados⁵⁴ y han sido considerados como organismos indicadores de suelos contaminados^{54, 56}, debido a que son fáciles de manejar, además de su extensa distribución terrestre y tienen la capacidad de acumular y concentrar grandes cantidades de contaminantes inorgánicos y orgánicos^{56 y 57}; ya que han heredado resistencia a la toxicidad de estos contaminantes, entre ellos los metales pesados (Morgan, 1991)⁵⁸. Esto se pudo constatar en cada una de las etapas del proceso de evaluación genotóxica realizada en el presente estudio, al igual que (Durand 2009)¹⁰ confirmó con sus resultados que las lombrices de tierra tiene una capacidad de resistencia a la toxicidad y el grado de tolerancia difiere con la madurez.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) encontradas entre los días de tratamiento en cada concentración empleada en nuestra investigación son evidentes, tal es así que en cada uno de los tratamientos el nivel de daño decrece gradualmente conforme disminuye la dilución del lixiviado y se incrementa a medida que aumenta la concentración y mayor tiempo de exposición al lixiviado. Por lo que guardan relación con lo mencionado por (Jiménez 2004)⁵⁹, ya que ellos consideran que la cantidad de metal disponible para las lombrices de tierra depende de la concentración absoluta del metal dentro de un ambiente del suelo dado y una serie de factores físico-químicos tales como la textura del suelo, pH del medio, la naturaleza y el alcance de los minerales de arcilla y materia orgánica. Y lo reportado por (Liu *et al.* 2009)¹¹ que afirman que el aumento de las lesiones del ADN depende de las dosis de exposición durante los 28 días que duró sus ensayo, Tal es así que, el daño del ADN en celomocitos de la lombriz de tierra tratados con la mayor dosis (1,0 y 10,0 mg/kg) fue significativamente mayor que en los tratados con 0,1 mg/kg ($p < 0,05$)¹¹. De igual manera los resultados que obtuvieron (Bonnard *et al.* 2009)¹⁷ cuando estudiaron la genotoxicidad y efectos en la reproducción en *E. foetida* expuestos a suelos contaminados mostraron daño a nivel de ADN y una disminución en el número de celomocitos después de 28 y 56 días de exposición mencionando a los hidrocarburos aromáticos policíclicos que parecía ser la fuente más probable de la genotoxicidad registrada, aunque los efectos de los metales no podían excluirse. Del mismo modo (Kovalchuk *et al.* 2001)³⁸ reportaron que la contaminación con sales de metales induce a un incremento en la frecuencia de las mutaciones intracromosomales.

Los resultados del presente estudio están en buen acuerdo con ellos. Se sugiere que el efecto genotóxico encontrado en este estudio se debe a la acción compleja de los iones metálicos presentes en el lixiviado. Se sabe que los iones metálicos (como el Fe^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+}) no atraviesan libremente la membrana celular. Las formas de paso de estos metales son quelatos. Los quelatos son sintetizados biológicamente y actúan como ionóforos, que acarrear los iones metálicos. Los ionóforos específicos para el caso del hierro son conocidos como sideróforos (Emery, 1982⁶⁰; Olsen *et al.*, 1981⁶¹).

Al igual que otros metales del grupo de transición, el Fe^{2+} puede dar lugar a estrés oxidativo, el cual es controlado por los niveles de compuestos reductores como los tioles glutatión y cisteína así como por la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa (anexo 05). De acuerdo con (Aust 1989)⁶² la peroxidación de lípidos requiere Fe (III) ó Fe (II) probablemente en la forma de complejos O_2Fe . Además, el Fe es capaz de catalizar reacciones redox entre el oxígeno y las macromoléculas. Por otro lado, se sabe que el hierro unido al ADP, histidina, EDTA, citrato y otros agentes quelantes es capaz de facilitar la formación de especies reactivas de oxígeno capaces de causar daño oxidativo a los lípidos, proteínas y fragmentar el ADN⁴⁵.

Los resultados obtenidos confirman el efecto mutagénico de los iones metálicos y presentes en el lixiviado (anexo 05), tal como lo reporta (Morgan 1991)⁵⁸. De la misma manera que (Takeshi y Kazuyoshi 2010)⁹ que examinaron la mutagenicidad inducida por metales en las lombrices de tierra cultivados en camas conteniendo metales, en la cual observaron que el 8-oxo-Gua era un importante premutagénico que ocasiona daño en el ADN y que induce al estrés oxidativo, lo que lleva a la carcinogénesis.

Asimismo, cabe mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos la presencia del calcio en el lixiviado se considera como un elemento muy necesario en la composición de los organismos ya que se combina con el fosforo y mantiene libre el hierro para su absorción y utilización. Varios minerales también pueden ayudar a eliminar el exceso de hierro almacenado: el manganeso y el zinc.

Respecto al Zinc se observa una concentración de 0.26 mg/l (LMP=0.002mg/l), lo cual es preocupante ya que su exposición en el ambiente debe ser restringido ya que es considerado como el segundo más importante rastro de metal en los organismos después del hierro, que participan en la función biológica de varias proteínas y enzimas. A pesar de ser un oligoelemento esencial, el zinc es conocido como uno de los metales tóxicos para la mayoría de los organismos por encima de ciertas concentraciones y tiempos de exposición.

Durante los 21 días que duró la exposición de las lombrices a las diferentes concentraciones del lixiviado no se registró mortalidad ni cambios en el comportamiento de las lombrices, al igual que (Giovanetti *et al.* 2010)⁷ al evaluar los efectos biológicos en las lombrices de *E. foetida* después de 7 y 28 días de exposición al uranio empobrecido y el natural no observaron efectos en términos de mortalidad o la reducción de peso. Manifiestan que para algunos de los criterios de valoración, en especial los efectos genéticos, la dosis uranio-efecto de las relaciones se han encontrado en forma no lineal.

Asimismo, (Saint-Denis *et al.* 1998)⁵⁷ estudiaron las actividades de las enzimas (catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión- S-transferasa y glutatión reductasa) que participan en sistemas antioxidantes de defensa en *E. foetida*, que están principalmente localizados en el citosol. En respuesta a las perturbaciones de contaminantes orgánicos e inorgánicos encontraron variaciones en la concentración de glutatión y la actividad de las enzimas glutatión-S-transferasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Sin embargo, los mecanismos de acción genotóxica de muchos metales pesados siguen aún sin ser conocidos en las lombrices.

En el presente estudio, las diluciones utilizadas en cada uno de los tratamientos mostraron efectos genotóxicos claros bajo condiciones experimentales normales y sin causar mortalidad, lo que demuestra la alta sensibilidad del ensayo cometa, por lo que podemos decir que estos resultados son adecuados para detectar mutagénicos tanto físicos como químicos, sugiriendo al mismo tiempo que esta técnica puede ser utilizada para evaluar otros tipos de agentes genotóxicos.

Como se ha mencionado anteriormente, el ensayo cometa es una técnica muy versátil y muy sensible, ya que permite evaluar el daño genético primario de forma rápida, sencilla y en cualquier tipo de célula eucariota con un número reducido de células. Estas

características, además, de su alta sensibilidad han llevado a que este ensayo sea ampliamente utilizado en estudios *in vivo* e *in vitro*, con diferentes organismos y tejidos⁴⁶.

El ensayo cometa también ha sido empleado para evaluar la genotoxicidad *in vivo* de muchos metales pesados, demostrando ser altamente sensible y rápido para detectar el daño genético en diferentes organismos modelo (Reinecke y Reinecke, 2004)²⁹.

De acuerdo a (Orta 2009)¹², los lixiviados son contaminantes peligrosos para el ambiente, en particular para los acuíferos, ya que tienen una alta concentración de contaminantes, cien veces superior a la de las aguas residuales, por lo que tiene un riesgo potencial muy alto para el entorno. (Thomas *et al.* 2009)¹⁵, afirman que las pruebas de toxicidad, utilizando especies que representan los diferentes niveles tróficos, es una forma superior a predecir el riesgo que plantea la aprobación de la gestión que el análisis químico. Estudios previos evaluaron la toxicidad de lixiviados utilizando bacterias, algas, plantas, invertebrados y peces. Encontraron que el amoníaco, la alcalinidad, los metales pesados y diverso compuestos orgánicos recalcitrantes fueron identificados como la causa de reacciones adversas en los organismos de prueba.

Los metales y las concentraciones encontradas en el lixiviado del relleno sanitario manual, podemos atribuir a los siguientes factores: tiempo de funcionamiento (1 año), segregación previa de los residuos sólidos, preparación de los canales de almacenamiento de residuos sólidos. Estos constituyen las principales causas de que los lixiviados no contengan mayor número de metales pesados y en cantidades detectables que puedan ocasionar daños irreversibles en los organismos vivos. Sin embargo, a pesar de ello se evidenció severo daño genotóxico en los celomocitos de *E. foetida*.

Concordando con lo mencionado por (Smith 2009)¹⁸ quien señala que el contenido de metales de los residuos sólidos urbanos que han pasado por un proceso de separación tengan inherentemente más baja disponibilidad de metales en general, en comparación con los residuos que son colocados sin ningún proceso de segregación.

El calcio y el magnesio sólo aportan dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano²⁶.

Un diseño de tratamiento apropiado para el lixiviado es el desarrollo de nuevos productos de fácil aplicación y que puedan sustituir a los de elevado costo. Este es el caso de los polímeros naturales que se obtienen de una variedad de plantas nativas. Los resultados permitirán establecer la factibilidad de aplicar mezclas preparadas a base de almidón de plátano-sulfato de aluminio y arcillas con propiedades coagulantes para el tratamiento de lixiviados. Tales mezclas, por su menor costo, pudieran ser una opción de tratamiento físico en nuestra región.

Del mismo modo se señala en (CONAM, 2007)²³ que el tratamiento de los lixiviados, es una necesidad que se repite a nivel mundial, pues en toda infraestructura de disposición de residuos se generan de manera inevitable los lixiviados, relacionándose directamente con la cantidad de materia orgánica, porque las estructuras moleculares orgánicas, después de ser asimiladas por actividad bacterial, producen grandes cantidades de metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, mercaptanos, amoníaco, calor, entre otros y agua; ésta cantidad de agua generada es el lixiviado, que siempre está en contacto con todos los contaminantes y que logra arrastrarlos por la sencilla razón de que los compuestos pesados insolubles se convierten en materiales más simples y solubles²³.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- El nivel de daño genotóxico en celomocitos de *Eisenia foetida* depende del tiempo de exposición y la concentración del lixiviado.
- Se estandarizó el protocolo del ensayo cometa en celomocitos de *E. foetida* para monitorear suelos contaminados.
- El efecto genotóxico reportado en el presente estudio se debe a la acción compleja de los iones metálicos presentes en el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta.
- La aplicación de un método de tratamiento de lixiviado representaría una oportunidad para evaluar el uso potencial de coagulantes orgánicos o mezclas de bajo costo como una buena opción para los sistemas de tratamiento del lixiviado generado en el relleno sanitario manual de Nauta.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES:

- Continuar con la caracterización completa del lixiviado a fin de conocer el contenido de la misma para así aplicar un tratamiento adecuado.
- Utilizar la técnica estandarizada de ensayo cometa para evaluar la genotoxicidad en *Eisenia foetida* expuestos a diferentes contaminantes ambientales.
- Aplicar el diseño de propuesta de tratamiento del lixiviado en el relleno sanitario manual de Nauta.
- Evaluar el efecto genotóxico del lixiviado en las personas que manipulan el lixiviado del relleno sanitario manual de Nauta.
- Evaluar la utilidad del lixiviado como fertilizante en el cultivo de plantas.
- Modificar la Ley General de Residuos Sólidos (Ley 27314) a fin de incluir la prohibición de la descarga del lixiviado de un relleno sanitario manual al ambiente.

CAPÍTULO VIII.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. DIARIO OFICIAL EL PERUANO: Ley General del Ambiente, Ley N° 28611 publicada, el 15 de octubre del 2005.
2. AGENCIA DE MEDIO AMBIENTE DE EE.UU.(USEPA). Disponible en <http://noincineraciontenerife.com/album/lixiados/index1.htm>
3. CORONA D. , CRAM S., ROJAS, E. (2008). Ensayo de Genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* 233-273. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.
4. TRIBUNAL CONSTITUCIONAL (2005). Sentencia N° 1206-2005-PA/TC, tomada de: <http://www.tc.gob.pe/jurisprudencia/2007/01206-2005-AA.html>
5. DEFENSORÍA DEL PUEBLO (2009). Herramientas para la defensa de los derechos ambientales, pp. 12-14 , Lima, Perú.
6. MERINO, B. 2008. EN INFORME DEFENSORIAL N° 125, “Pongamos la basura en su lugar, propuestas para la gestión de los residuos sólidos municipales”. Defensoría del Pueblo, pp. 4-8, Lima, Perú.
7. GIOVANETTI A, FESENKO S, COZZELLA M, ASENCIO L, Y SANSONE U (2010). Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. J Environ Radioact. Jun;101(6):509-16.
8. VOUA OTOMO P, y REINECKE SA. (2010)Increased cytotoxic and genotoxic tolerance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. Ecotoxicology;19(2):362-8.
9. TAKESHI HIRANO y KAZUYOSHI TAMAE; (2010) Review Article Heavy Metal-Induced Oxidative DNA Damage in Earthworms.
10. DURAND (2009), The Effects of Earthworm Maturity on Arsenic Accumulation and Growth After Exposure to Soils Containing Mine Tailings.2009. Earth and Environmental Science Atmospheric and Biological Environmental Monitoring Part III, 295-302, DOI: 10.1007/978-1-4020-9674-7_21
11. LIU W., SHENG Z., WANG J., HUA W., XIE H. y SONG Y. (2009). Assessment of the Genotoxicity of Endosulfan in Earthworm and White Clover Plants Using the Comet Assay. *Arch Environ contam Toxicol*. 56:742-746.
12. ORTA M (2009), Instituto de Ingeniería de la UNAM, Proyecto de Tratamiento y Control de Residuos aplicado en el relleno sanitario de Bordo Poniente de México.

13. MAROTO A (2009). Empresa ARETECH (Advanced Research Technologies). España.
14. FUCHS J. (2008) Métodos de obtención de celomocitos de *E. foetida* para ensayos eco toxicológicos. Toxicología y Química Legal. CONICET.
15. THOMAS DJ, TYRREL SF, SMITH R, y FARROW S, (2009). Bioassays for the evaluation of landfill leachate toxicity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* Jan;12(1):83-105.
16. LI M, LIU Z, XU Y, CUI Y, LI D, KONG Z. (2009). Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Chemosphere.* ; 74(5):621-5.
17. BONNARD M, EOM IC, MOREL JL, VASSEUR P. (2009) Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*.*Environ Mol Mutagen.* ; 50(1):60-7.
18. SMITH SR. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ Int.* ; (1):142-56.
19. STEINERT, S., STREIB, M., LEATHER y D. B. CHADWICK. (1998). DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research* 399: 65-85.
20. COTELLE, S. Y J. F. FÉRARD. (1999). Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
21. GRAJEDA Y ORTEGA MDE L, LÓPEZ EL, PEROTZI LF, GARDUÑO SICILIANO L, MARTÍNEZ MG. 2008. Cadmium, iron, and zinc uptake individually and as a mixture by *Limnodrilus hoffmeisteri* and impact on adenosine triphosphate content. *Environ Toxicol Chem.* ; 27(3):612-6.
22. FOURIE F, REINECKE SA, y REINECKE AJ, (2007). The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf.* Jul;67(3):361-8.
23. CONAM (2007). Manejo de Residuos Sólidos. Situación en América Latina y el Caribe.
24. DI MARZIO WD, SÁENZ ME, MONTIVERO C, ALBERDI JL, TORTORELLI MC, y AMBRINI G. (2007). Genotoxicity of aqueous elutions of industrial soils. *Bull Environ Contam Toxicol.* Nov; 79(5):483-7.
25. SHAOLONG FENG, XINMING WANG, GANGJIAN WEI, PINGAN PENG, YUN YANG AND ZHAOHUI CAO^C. (2006). Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity.

26. GLYNN H. &. HEINKE G. (1999) Ingeniería ambiental. México DF: Prentice Hall, 2da. Edición, p. 576.
27. DI MARZIO, DARÍO W. (2005). Evaluación de la Ecotoxicidad de Efluentes Industriales y Municipales. Publicado en Revista de Ingeniería Sanitaria y Ambiental – AIDIS, 82: 88 – 93.
28. ZANG, Y., Y. ZHONG Y Z. M. KONG. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 108: 271-278.
29. REINECKE, S.A. y A. J. REINECKE. (2004). The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 208-215.
30. GANT TW, y ZHANG SD.(2005). In pursuit of effective toxicogenomics. *Mutat Res.* 4;575(1-2):4-16.
31. SHAHMANSOURI M, POURMOGHADAS H, PARVARESH A, ALIDADI H; (2005). Heavy Metals Bioaccumulation by Iranian and Australian Earthworms (*Eisenia fetida*) in the Sewage Sludge Vermicomposting. *Iranian J Env Health Sci Eng*, Vol. 2, No. 1, pp. 28-32.
32. RIVAS J, BELTRÁN F, CARBALHO F, ACEDO B, JIMENO O (2004). Stabilized leachates: sequential coagulation- flocculation + chemical oxidation process. *J. Haz. Mat.* 116: 95-102.
33. RAJAGURU P, SUBA S, PALANIVEL M, KALAISELVI K. (2003). Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environ Mol Mutagen.*;41(2):85-91.
34. GONZÁLES R. y CÁRDENAS KU. (2002). Muestreador de Lixiviados para SDFDS que no cuentan con Sistema de Recolección. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México.
35. DRIEDGER, R. (1996). Guidelines for Environmental Monitoring a Municipal Solid Waste Landfill. En González Herrera, Roger y Kù Cárdenas, Luciano. Muestreador de Lixiviados para SDFDS que no cuentan con Sistema de Recolección. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México. 48p.
36. VERSCHAEVE L, (2002). Genotoxicity studies in groundwater, surface waters, and contaminated soil. *ScientificWorldJournal*. May 8;2:1247-53.
37. MARTÍNEZ, R (2001). Estudio sobre la concentración de contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos en lixiviados del relleno sanitario “San Nicolás” y en agua de pozos aledaños. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1p.

38. KOVALCHUK O, TITOV V, HOHN B y KOVALCHUK I, (2001) A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment. *Nat. Biotechnol.* 6: 568-572.
39. BRÓZSKA MM Y MONIUSZKO-JAKONIUK J. (2001). Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem Toxicol.* ; 39(10):967-80.
40. BRÓZSKA MM Y MONIUSZKO-JAKONIUK J. (1998). The influence of calcium content in diet on acumulation and toxicity of cadmium in the organism. *Arch Toxicol.* ; 72(2):63-73.
41. ENZMINGER JD, ROBERSON D, AHLER RC, KOSSON DS (1987). Treatment of landfill leachates. *J Haz. Mat.* 14: 83-101.
42. MUNICIPALIDAD PROVINCIAL DE LORETO-NAUTA, CONAM-SER LORETO, PROYECTO ARAUCARIA AMAZONAS NAUTA/AGENCIA ESPAÑOLA DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL/GOBIERNO REGIONAL DE LORETO (2005). Plan Integral de Gestión Ambiental de Residuos Sólidos de la ciudad de Nauta. pp 8-41, Nauta, Perú.
43. DIARIO OFICIAL EL PERUANO: Ley General de Residuos Sólidos, Ley N° 27314, publicada el 20 de julio del 2000.
44. DIARIO OFICIAL EL PERUANO: Reglamento de la Ley N° 27314, Ley General de Residuos Sólidos, Decreto Supremo N° 057-2004-PCM, publicada el 24 de julio del 2004.
45. CARMONA, E. R. (2009). Evaluación genotóxica de algunos metales pesados en *Drosophila melanogaster* mediante los ensayos SMART de alas y Cometa. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
46. ROJAS, E., LOPEZ M y VALVERDE M. (1999). Single Cell Gel Assay: methodology and applications. En: Corona D. V, Cram S. H., Rojas, E. (2008). Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología; México. pp. 225-254.
47. SALAGOVIC, J., J. GILLES, L. VERSCHAEVE Y I. KALINA. (1996). The Comet Assay for the of genotóxico damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42(1-2): 17-21.
48. COLLINS, A. R. (2004). The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26: 249-26.
49. MARTÍNEZ C. (1996). Potencial de la lombricultura, 140 p. In: A Carballo y S. Bravo (eds). Elementos básicos para su desarrollo Texcoco. Mx.



50. ROBINSON H, LAST S (1999) Tecnología punta en el tratamiento de lixiviados en Europa. *Revista Residuos* 46: 70-73.
51. CER (2000). *Leachate Treatment: Principles and options*. Curso superior sobre gestión y diseño de vertederos. Club Español de Residuos. Madrid, España. 4 pp.
52. CANEPA J. R, GOÑI J, HOWARD R. y CCAMACHO W, (2008). Mezclas con potencial coagulante para tratamiento de lixiviados de un relleno sanitario. INCI v.33 n.1 Caracas
53. FLORES E, GARCÍA F, FLORES E, NÚÑEZ M, GONZÁLEZ R, y BELLO-PÉREZ L (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Cient. Venez.* 55: 86-90.
54. MORGAN, J.E, y Morgan, A.J., (1988). Calcium-lead interactions involving earthworms. Part 1: The effect of chlorogogenous calcium on lead accumulation by earthworms field and laboratory conditions. *Environmental Pollution* 54, 41e53.
55. EPA (2007) "Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry" Rev. 4.4 May 1994.
56. FITZPATRICK LC, MURATTI-ORTÍZ JF, VENABLES BJ, GOBEN AJ. (1996). Comparative toxicity in earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols. *Bull Environ Contam Toxicol.* 57 (1): 63-8.
57. SAINT-DENIS M, LABROT F, NARBONNE JF, RIBERA D (1998). Glutathione, glutathione – related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 35 (4): 602-14.
58. MORGAN AJ (1991). Accumulation of heavy metals from polluted soils by the earthworm, *Lumbricus rubellus*: can laboratory exposure of "control" worms reduce biomonitoring problems? *Environ Pollut*, 74 (1): 39-52.
59. JIMÉNEZ RJ (2004). Tratamiento de lixiviados en vertederos. *Revista Residuos*.
60. EMERY, T. (1982). Iron metabolism in human and plants. *Am. Sci.* 70:626-632.
61. OLSEN, R.A., R.B, CLARK AND J.H. BENNETT. (1981). The enhancement of soil fertility by plant roots. *Am. Sci.* 69:378-384.
62. AUST, S.D. (1989). Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl. Nutr. Diet.* 43:266-277.

ANEXOS

ANEXO 01

GLOSARIO DE TERMINOS

Lixiviado

El lixiviado es el líquido que ha pasado a través o ha emergido de la masa del material que constituye el relleno sanitario y que en consecuencia contiene materiales procedentes de los residuos. Por lo tanto, implica una fuente importante de contaminación ambiental dada su elevada carga orgánica y química.

Toxicología

La toxicología puede ser definida como la ciencia de los venenos o de las sustancias tóxicas, sus efectos, antídotos y detección; o bien como señala la Organización Mundial de la Salud "disciplina que estudia los efectos nocivos de los agentes químicos y de los agentes físicos (agentes tóxicos) en los sistemas biológicos y que establece además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes. Se ocupa de la naturaleza y de los mecanismos de las lesiones y de la evaluación de los diversos cambios biológicos producidos por los agentes nocivos".

Residuos

La Real Academia Española (2007), define a los residuos como aquello que resulta de la descomposición o destrucción de algo; y material que queda como inservible después de haber realizado un trabajo u operación.

Residuos Sólidos

Ley General de Residuos Sólidos (2000), define a los residuos sólidos como las sustancias, productos o subproductos en estado sólido o semisólido de los que su generador dispone, o está obligado a disponer, en virtud de lo establecido en la normatividad nacional o de los riesgos que causan a la salud y el ambiente.

Botadero

La Ley General de Residuos Sólidos denomina a los botaderos como la acumulación inapropiada de residuos sólidos en las vías, terrenos baldíos o espacios públicos de ámbito urbano o rural. Los botaderos carecen de medidas de adecuación sanitaria, por lo cual representan riesgos ambientales y a la salud de las poblaciones. Los botaderos carecen de autorización sanitaria.

Contaminantes ambientales

Todo cambio significativo en la composición o condiciones normales de un medio, tales cambios afectan al recurso en sí o a su uso para un fin determinado, y los agentes que lo provocan pueden ser: químicos, físicos y biológicos. El medio afectado puede ser aire, agua, suelo o cualquier sustrato orgánico (de ordinario, más de uno de ellos simultáneamente).

Eisenia foetida

Son anélidos segmentados de la clase clitelados y pertenecen al orden oligoquetos, tienen un excelente aparato digestivo compuesto con 6 hígados y que come por día hasta su propio peso, adquiriendo para sí hasta el 30% y excretando el 70%.

Ensayo Cometa

Se fundamenta en el hecho de que el ADN en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, este migrará más que un ADN sin daño. En condiciones alcalinas la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de una sola hebra, sitios retardados de reparación y sitios álcali lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evaluar rompimientos de doble hebra en el ADN.

Mutagénesis

Es el proceso por el que se genera una mutación, ésta se define como un cambio hereditario en el material genético. Existe gran evidencia de que una amplia variedad de agentes ambientales, incluyendo los carcinógenos que interactúan directamente con el ADN, produciendo cambios hereditarios, son importantes para la evaluación de los riesgos de mutagenicidad y carcinogenicidad de los agentes físicos y químicos.

Mutágenos

Son agentes físicos o químicos capaces de inducir en los seres vivos varias clases de cambios deletéreos heredables. El ADN celular está organizado y éstos, a su vez, en cromosomas, los cuales, en los organismos superiores, se alojan en el núcleo celular. La información genética es muy estable. Sin embargo, las mutaciones ocurren

espontáneamente, con frecuencias muy bajas en las células que aparentemente no están expuestas a agentes mutagénicos externos.

Suelo control negativo

Es un suelo libre de contaminantes que es necesario para evaluar la aceptabilidad de la prueba. Este suelo puede ser *una sola opción* de las siguientes: 1) un suelo comercial sin contaminantes, 2) un suelo de campo no contaminado *proveniente de una zona alterna y similar al área de estudio*, previamente conocida como una *zona sin contaminantes* o 3) un suelo artificial.

Suelo de referencia

Es un suelo que proviene de la misma zona de estudio que las muestras problema, pero que está libre de contaminantes o se conoce de antemano que tiene una concentración muy baja de contaminantes.

Suelo control positivo

Es el suelo control negativo seleccionado al cual se le adiciona el compuesto tóxico de referencia. Este suelo se usa con la finalidad de observar si el disolvente acarreador causa alguna interferencia en los organismos durante el bioensayo.

Relleno sanitario: es la técnica mediante la cual diariamente los residuos sólidos se depositan en celdas debidamente acondicionadas para ello, esparcen, acomodan, compactan y cubren. Su fin es prevenir y evitar daños a la salud y al ambiente, especialmente por la contaminación de los cuerpos de agua, de los suelos, de la atmósfera y a la población al impedir la propagación de artrópodos, aves de carroña y roedores.

Relleno sanitario manual: es aquel en el que sólo se requiere equipo pesado para la adecuación del sitio y la construcción de vías internas, así como para la excavación de zanjas, la extracción, el acarreo y distribución del material de cobertura. Todos los demás trabajos, tales como construcción de drenajes para lixiviados y chimeneas para gases, así como el proceso de acomodo, cobertura, compactación y otras obras conexas, se llevan a cabo manualmente.

El relleno sanitario manual se utilizará como método de disposición final de los desechos ordinarios de poblaciones urbanas y rurales que generen menos de 20 toneladas diarias de estos desechos.

Acido Desoxirribonucleico (ADN)

Es la sustancia química donde se almacenan las instrucciones que dirigen el desarrollo de un huevo hasta formar un organismo adulto, que mantienen su funcionamiento y que permite la herencia. Es una molécula de longitud gigantesca, que está formada por agregación de tres tipos de sustancias: azúcares llamados desoxirribosas, el ácido fosfórico y base nitrogenada de cuatro tipos: adenina, guanina, timina y citosina.

Metales pesados.

Son un grupo de elementos químicos que presentan un peso molecular comprendido entre 63,5 y 200,6 con una distribución electrónica similar en su capa externa.

ANEXO 02
PROTOCOLO PARA TRABAJOS DE LABORATORIO

I. INFRAESTRUCTURA EN EL LABORATORIO

Para el cultivo y mantenimiento de las lombrices de experimentación se necesita de un ambiente con temperatura (20 - 25 °C) e iluminación controlada (12 horas luz/12 horas oscuridad), y agua.

Para el ensayo cometa

Ambiente con temperatura controlada y limpia. Este cuarto debe estar apartado, para controlar la contaminación con los reactivos y materiales utilizados dentro del laboratorio.

Para procesar el material contaminado

Área exclusiva para limpiar material con residuos de compuestos tóxicos y evitar contaminación de otros materiales.

II. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1. Materiales

- ✓ Algodón.
- ✓ Guantes quirúrgicos.
- ✓ Papel parafilm.
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Agujas descartables Nº 23x1”
- ✓ Jeringas de 1 o 3 ml.
- ✓ Marcador de cristalería.
- ✓ Micropipetas de 10 – 100 µL, 100 - 1000µL.
- ✓ Puntas para micropipetas de 10 – 100 µL, 100 - 1000µL.
- ✓ Láminas portaobjeto.
- ✓ Láminas cubre objeto.
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Gradilla para microtubos eppendorff.

- ✓ Microtubos eppendorff.
- ✓ Probetas
- ✓ Placas petri.
- ✓ Vasos de precipitado.
- ✓ Beackers

5. 2. Equipos

- ✓ Microscopio con cámara incorporada.
- ✓ Cámara de electroforesis con fuente de poder.
- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Destilador de agua.
- ✓ Agitador magnético.
- ✓ Agitador horizontal.
- ✓ Estufa
- ✓ Autoclave.
- ✓ Potenciómetro o pH-metro.
- ✓ Congeladora.
- ✓ Refrigeradora.
- ✓ Cocina eléctrica.
- ✓ Cámara fotográfica digital.

5.3. Reactivos

- ✓ Cloruro de Sodio 0.9 %
- ✓ Cloruro de sodio 0.4 y 2.5 M.
- ✓ Cloruro de potasio 9 mM.
- ✓ Fosfato de potasio 0.7 mM.
- ✓ Fosfato de sodio.
- ✓ Bicarbonato de sodio 2 mM.
- ✓ TRIS 10 y 0.4 mM.
- ✓ EDTA 1 y 100 mM.
- ✓ Tritón X-100 1%.
- ✓ Dimetil sulfóxido 10%.
- ✓ Hidróxido de sodio 300 mM.

- ✓ Ácido tricloroacético 15 %.
- ✓ Sulfato de zinc 5%.
- ✓ Glicerol 5%.
- ✓ Carbonato de sodio 5%.
- ✓ Nitrato de amonio 0.2%.
- ✓ Nitrato de plata 0.2%.
- ✓ Ácido tungstosilícico 0.5%.
- ✓ Formaldehído 0.15%.
- ✓ Ácido acético 1%.
- ✓ Agarosa de bajo punto de fusión 1%
- ✓ Agarosa de punto de fusión normal 3%.
- ✓ Alcohol medicinal 90°.
- ✓ Azul de Tripán.

III. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para el lavado de material

- Solución de lavado:

Reactivos	Concentración
NaOH	0.1M
Etanol 96°	10%

Se disuelve el hidróxido de Sodio en Etanol, preparar de acuerdo a la cantidad que se requiera para lavar el material. En un recipiente de plástico se deja remojando el material durante 24 horas o una noche como mínimo. Luego se lava con agua destilada y se deja secar el material.

Para viabilidad celular

- Solución de azul de trypan 0.4 %

Reactivos	Volumen: 100ml
Azul de Trypan	0.4g

Disolver el reactivo en PBS 1X 18 mohms, centrifugar y guardar el sobrenadante, a temperatura ambiente en un tubo Eppendorf de 1.5 ml por un tiempo máximo de un mes.

Para la extracción de celomocitos

Solución salina	
Reactivos	Volumen de la solución (100ml)
NaCl 0.85 g	0.85g
H2O destilada/desionizada	100ml

Disolver el reactivo en agua ultrapura y aforar a 100 ml. Conservar a temperatura ambiente por un tiempo máximo de un mes.

Solución de extrusión			
Reactivos	volumen de la	Solución (1 litro)	Concentración Final (Nm)
Etanol		12ml (etanol al 100%)	5%
Solución salina (0.85 g NaCl) en 100ml		2.12g	85%
EDTA		2.5 mg/ml	

Almacenar en refrigeración hasta el momento de su uso.

Para el ensayo cometa

Los reactivos marcados con un (*) deben ser preparados inmediatamente antes de su uso.

- Solución de agarosa de punto de fusión normal al 3 %

Reactivos	Volumen: 20ml
Agarosa regular	0.6 g

Para preparar la agarosa se debe utilizar suero fisiológico

- Solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1 %

Reactivos	Volumen: 20ml
Agarosa regular	0.2 g

- Solución de hidróxido de sodio 1N

Reactivos	Volumen: 100ml
NaOH	4g

Disolver el reactivo en agua ultrapura y aforar al volumen deseado. Esta solución se debe almacenar a temperatura ambiente en frasco ámbar por un tiempo máximo de 2 semanas.

- Solución madre de lisis: pH 10

Reactivos	Volumen: 1000ml
NaCl 2.5M	146 g
Tris 10mM	1.2 g
EDTA 100mM	37.2 g

Disolver los reactivos en agua ultrapura, ajustar el pH a 10 con aproximadamente 10 g de NaOH en pastilla y/o NaOH 1N y aforar a 1 L.

- Solución de lisis final (*)

Reactivos	Volumen de solución: 100ml
Solución Madre de Lisis	c.s.p. 100ml
pH 10 DMSO	10%
Triton X-100	1%

Se mezcla con cuidado todos los reactivos ya que se produce una reacción exérgica. Antes de colocar las laminillas en la solución, ésta se debe enfriar 4 °C, por lo menos 20 minutos antes de su uso, verificando de antemano que el pH sea de 10.

- Solución de neutralización: Tris-base 0.4 M, pH 7.5

Reactivos	Volumen de solución:
	1000ml
Tris-base	48.5 g

Disolver el reactivo en el agua ultrapura, ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado antes de aforar a 1 L. Esta solución debe almacenarse a temperatura ambiente en frasco ámbar por un tiempo máximo de 2 semanas.

- Solución de fijación

Reactivos	Volumen de solución:
	1000ml
AcidoTricloroacetico 15%	150 g
Sulfato Zinc 5%	50 g
Glicerol 5%	57.5 ml

Disolver los reactivos en agua ultrapura, registrar el pH, antes de aforar a 1 L. Esta solución debe almacenarse a temperatura ambiente en frasco ámbar.

- Solución alcalina*

Reactivos	Volumen de solución:
	500ml
NaOH 300Mm	6g
EDTA 1mM	0.186 g

Agregar los reactivos y aforar con agua ultrapura. Es necesario utilizar solución nueva con cada corrida de la electroforesis.

- Solución de tinción

- Solución A *

Reactivos	Volumen: 100ml
Carbonato de Sodio 5%	5g

- Solución B

Reactivos	Volumen: 100ml
Nitrato de Amonio 0.2%	0.2 g
Nitrato de Plata 0.2%	0.2 g
Acido Silícico Tungstico 0.5%	0.5 g
Formaldehido 0.15%	0.15 ml

La solución A y B se almacenarán en envases ámbares separados. Se mezclarán en una proporción de 66% de Solución A en 34% de solución B, al momento de la tinción de láminas.

Dilución de los Lixiviados

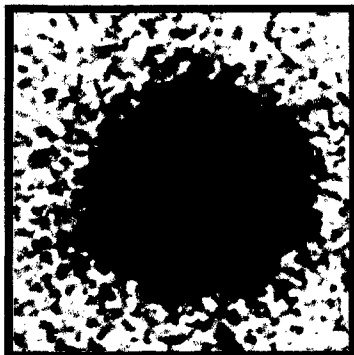
Dilución	lixiviado (ml)	agua destilada (ml)
1/1	200	-
½	100	100
1/10	20	180
1/100	2	198
1/1000	0.2	199.8
Control negativo	-	200

**ANEXO 03.
FICHA DE REGISTRO PARA OBSERVACIÓN DE COMETAS**

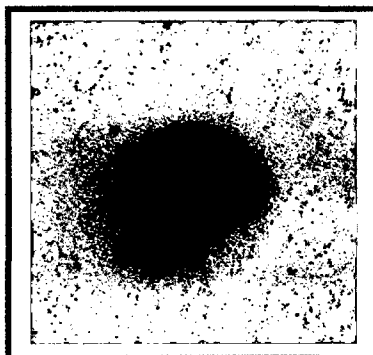
Nro.	Nivel de daño	Nro.	Nivel de daño	Nro.	Nivel de daño	Nro.	Nivel de daño
1		26		51		76	
2		27		52		77	
3		28		53		78	
4		29		54		79	
5		30		55		80	
6		31		56		81	
7		32		57		82	
8		33		58		83	
9		34		59		84	
10		35		60		85	
11		36		61		86	
12		37		62		87	
13		38		63		88	
14		39		64		89	
15		40		65		90	
16		41		66		91	
17		42		67		92	
18		43		68		93	
19		44		69		94	
20		45		70		95	
21		46		71		96	
22		47		72		97	
23		48		73		98	
24		49		74		99	
25		50		75		100	

ANEXO 04

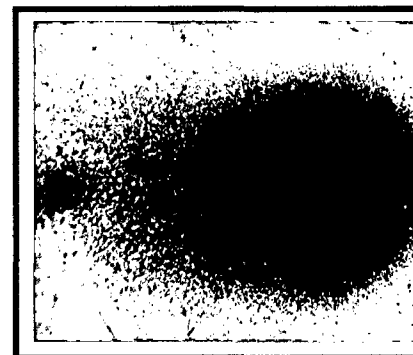
TAMAÑO Y NIVELES DE DAÑO DE LOS COMETAS OBTENIDOS.



Grado 0
Sin daño



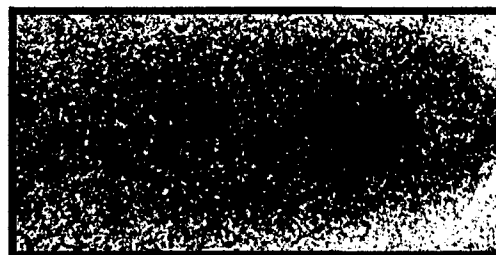
Grado 1
Daño leve



Grado 2
Daño moderado



Grado 3
Daño severo



Grado 4
Daño total

ANEXO 05.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS IONES METÁLICOS

