



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

---

*Evaluación de toxicidad de metales en suelos del  
Valle de Toluca empleando como indicador Eisenia  
andrei*

**TESIS**

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**SALOMÓN CAMPOS VERONA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. EN C. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA**

DIRECTOR ADJUNTO

**DRA. ARACELI AMAYA CHÁVEZ**

DIRECTOR EXTERNO

**DR. PEDRO ÁVILA PÉREZ**

**TOLUCA, MÉXICO A 19 DE ABRIL DE 2013**





Toluca, México, 13 de marzo de 2013

**P. QFB. SALOMÓN CAMPOS VERONA**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM.  
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad **TESIS**, estará formado por:

M. en I. VÍCTOR FRANCISCO PACHECO SALAZAR  
**PRESIDENTE**  
Dr. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA  
**VOCAL**  
Dra. ARACELI AMAYA CHÁVEZ  
**SECRETARIO**  
Dr. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA  
**SUPLENTE**

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO  
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ  
DIRECTORA



c.c.p. Expediente  
c.c.p. Archivo.



El presente trabajo pertenece al área de calidad ambiental y fue desarrollado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México bajo la dirección del Dr. en C. Juan Carlos Sánchez Meza en el proyecto: EDOMEX-2009-C02132003 “*Evaluación de toxicidad de metales en suelos del Valle de Toluca empleando como indicador Eisenia andrei*”

## Dedicatorias.

A mis padres Mireya y Salomón; por su comprensión y ayuda en los buenos y malos momentos. Por haberme enseñado a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento, por sus consejos, su paciencia y fé en mí. Por brindarme y hacer de mí lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

A mis maestros y amigos quienes me apoyaron y a pesar de caer varias veces me ayudaron a levantarme. A la Dra. Carolina Caicedo Díaz, al Dr. Carlos González Romero, al Dr. Juan Carlos Sánchez Meza y a todos aquellos maestros que en su momento jamás dejaron de creer en mí, y siempre más que con un conocimiento teórico, con una palabra de aliento me ayudaron y guiaron para enfrentar los retos presentados.

No menos importantes a todas aquellas personas que a lo largo de la carrera y aun fuera de ella fueron y son parte esencial del impulso que me permite dar hoy este gran paso.

Euridice por brindarme el tiempo, apoyo, cariño y paciencia, sin los cuales el camino habría sido mucho más difícil, y que han sido parte fundamental y básica en la culminación de esta etapa de mi vida, a mis amigas Dennev y Michelle, por su apoyo y amistad incondicional.

Final y principalmente GRACIAS a Dios por permitirme llegar a este punto, por poner en mi camino a cada una de las personas que siempre me apoyaron.

## Agradecimiento.

Al COMECyT por el apoyo brindado al proyecto EDOMEX-2009-C02132003  
*“Evaluación de toxicidad de metales en suelos del Valle de Toluca empleando como indicador Eisenia andrei”.*

Al Dr. Juan Carlos Sánchez Meza por el apoyo, comprensión y ayuda  
brindados para la realización de este proyecto.

Al Dr. Pedro Ávila Pérez por permitirme formar parte de este proyecto.

A la Dra. Aracely Amaya Chávez, por su valiosa aportación a este trabajo.

A PIFI 2012 por su apoyo para la impresión de este trabajo.

## Abreviaturas empleadas

ZMVT- Zona Metropolitana del Valle de Toluca.

PM10- Partículas Suspendidas.

MDA- Malondialdehído.

OECD- Organisation for Economic Co-operation and Development.

ZMVM- Zona Metropolitana del Valle de México.

UAEMEX- Universidad Autónoma del Estado de México

SOD- Superóxido dismutasa.

CAT- Catalasa

LIPO- Lipoperoxidación.

CRT- Control

SMI- San Miguel, Ocoyoacac.

HIP- Parque Hípico

FN- Parque Fidel Negrete.

CIE- Parque La Ciervita, Nevado.

SAN- Villa Santín, Sauces.

LA- Lomas Altas.

SNA- San Antonio

AME- Ameyalco.

ALA- Parque Alameda.

TOL- Tollocan.

PIL- Parque La Pilita.

CAC- Cacalomacán.

# ÍNDICE

	Página
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	XI
<b>INDICE DE TABLAS</b>	XII
<b>RESUMEN</b>	14
<b>CAPITULO 1- Marco Teórico</b>	15
1. Marco teórico	16
1.1 La Zona Metropolitana del Valle de Toluca	16
1.2 Contaminación atmosférica	16
1.3 Metales pesados en suelos	19
1.3.1 Fuentes de los metales	19
1.3.2 Movilidad de los metales pesados	20
1.4 Estrés oxidativo	23
1.4.1 Contaminación de suelos por metales pesados	24
1.4.2 Importancia de las lombrices en los suelos	25
1.4.3 Empleo de <i>Eisenia andrei</i> como bioindicador	26
1.5. Planteamiento del problema.	28
1.6. Hipótesis.	28
1.7. Objetivos	29
1.7.1 Objetivo General.	29
1.7.2. Objetivos específicos.	29
<b>CAPITULO 2- Metodología</b>	30

2.1. Determinación y recolección de puntos de muestreo de la ZMVT.	32
2.2. Determinación de pH en suelos.	33
2.3. Incubación y obtención de cultivos de <i>Eisenia andrei</i> .	34
2.4. Realización de pruebas de toxicidad aguda.	34
2.4.1. Exposición de organismos a elutriados.	34
2.4.2. Exposición directa de organismos en suelo.	35
2.5. Determinación de enzimas de estrés.	36
2.5.1 Determinación de Superóxido dismutasa (SOD).	36
2.5.2. Determinación de catalasa (CAT).	37
2.5.3. Determinación de lipoperoxidación (LIPO).	37
2.5.4. Determinación de proteínas.	37
<b>CAPITULO 3- Resultados y discusión</b>	<b>38</b>
3.1. Puntos de muestreo.	39
3.2. pH en suelos.	40
3.3. Exposición de organismos a elutriados.	41
3.4. Exposición directa de organismos en suelos.	43
3.5. Determinación de enzimas de estrés, lipoperoxidación y proteínas en organismos expuestos a elutriados y suelos.	45
3.5.1. Determinación de Superóxido dismutasa.	45
3.5.2. Determinación de catalasa.	47
3.5.3. Determinación de lipoperoxidación.	48
3.6. Determinación de la concentración de metales presentes en suelo.	50
3.7. Análisis de resultados.	56

<b>CAPITULO 4- Conclusiones</b>	61
<b>ANEXOS</b>	65
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	69

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
Figura 1.1. Material Particulado Aerotransportado en la ZMVT	18
Figura 1.2 <i>Eisenia andrei</i>	27
Figura 2.1: Diagrama de metodología	31
Figura 2.2: Dinámica de Vientos sobre la ZMVT	33
Figura 2.3: Pruebas toxicológicas en papel, método OECD	35
Figura 3.1: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a elutriados de la primera fase del estudio, respecto del control	41
Figura 3.2: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a elutriados de la segunda fase del estudio, respecto del control	42
Figura 3.3: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a suelos de la primera fase del estudio, respecto al peso inicial.	43
Figura 3.4: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a suelos de la segunda fase del estudio, respecto su peso inicial.	44
Figura 3.5: Comparación de SOD presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la primera fase	45
Figura 3.6: Comparación de SOD presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la segunda fase.	46
Figura 3.7: Comparación de catalasa presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la primera fase.	47
Figura 3.8: Comparación de catalasa presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la segunda fase.	48

Figura 3.9: Comparación de Lipoperoxidación presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de los suelos de la primera fase.	48
Figura 3.10: Comparación de Lipoperoxidación presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de los suelos de la segunda fase.	49
Figura 3.11: Comparación de presencia de Titanio en suelos de la primera y segunda fase	50
Figura 3.12: Grafica 3.12: Comparación de presencia de Manganeso en suelos de la primera y segunda fase	51
Figura 3.13 Comparación de presencia de Zinc en suelos de la primera y segunda fase.	52
Figura 3.14 Comparación de presencia de Hierro en suelos de la primera y segunda fase del estudio.	53
Figura 3.15 Comparación de presencia de Cobre en suelos de la primera y segunda fase del estudio.	54
Figura 3.16: Comparación de presencia de Plomo en suelos de la primera y segunda fase del estudio.	55

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
Tabla1: Localización geográfica de los puntos de muestreo.	39
Tabla 2: Resultados de la determinación pH de muestras de la primer y segunda etapa del estudio	40
Tabla 3. Relación de Pearson (r) de las concentraciones de metales pesados en suelo de la primera fase de estudio.	56
Tabla 4. Relación de Pearson (r) de las concentraciones de metales pesados en suelo de la segunda fase de estudio.	57
Tabla 5. Correlación de las concentraciones de metales en suelo con respecto a los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en lombrices.	58

“La ciencia no es sino una perversión de sí misma a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad.”

Nikola Tesla

## Resumen

La zona Metropolitana del Valle de Toluca, (ZMVT) se considera una de las urbes más importantes de la región centro del país. Por su posición geográfica con respecto al territorio nacional, la ZMVT se encuentra bajo la influencia de sistemas meteorológicos tropicales durante la época de lluvia. Esta zona se caracteriza por la diferencia de la dirección de los vientos durante la época seca y la época húmeda del año, lo cual permite que esta zona se caracterice por la creciente acumulación de partículas suspendidas, en este caso de metales pesados ya sea en su forma metálica o como sales, los cuales al ingresar a los organismos producen efectos dañinos tales como el estrés oxidativo, incrementando la actividad de las enzimas que actúan como defensa ante este.

En este trabajo, se llevó a cabo la toma de muestra de 13 puntos de la ZMVT durante dos etapas del año, la primera: época de lluvia al finalizar agosto de 2011 y la siguiente en época de sequía en noviembre de 2010, con los cuales se realizaron ensayos de toxicidad empleando la lombriz *Eisenia andrei* como organismo de prueba tanto en suelos como en papel, con la finalidad de determinar como biomarcador la actividad enzimática de catalasa y superóxido dismutasa además de evaluar la lipoperoxidación y las proteínas, así como la concentración de metales presentes en cada muestra. Y finalmente se llevó a cabo la correlación de actividades enzimáticas y la concentración de metales presentes en cada muestra.

Los resultados mostraron que no existe una relación directa entre las enzimas antioxidantes, la lipoperoxidación y los metales evaluados (Ti, Pb, Mn, Zn) a excepción del hierro obtenido durante la segunda etapa del estudio, el cual presentó una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) con la catalasa, concluyendo finalmente que el estrés oxidativo no es inducido directamente por la presencia de los metales en suelos, por lo cual se sugiere realizar estudios adicionales de las muestras con la finalidad de determinar cuál es el factor crucial que induce el estrés en los organismos de prueba.

# CAPITULO 1

## Marco teórico

## **1. Marco teórico**

### **1.1 La Zona Metropolitana del Valle de Toluca**

La Zona Metropolitana del Valle de Toluca cuyas siglas son ZMVT considerada como una de las urbes más importantes en la Región Centro del País ha presentado una transformación paulatina en sus actividades económicas, pasando de ser una economía rural a una industrial y de servicios (Inventario de emisiones de la ZMVT, 2004).

### **1.2 Contaminación atmosférica**

En la ZMVT se han presentado periodos de altas concentraciones de partículas suspendidas PM10 debidas a fuentes tanto externas como internas. Entre las externas están el transporte de material fraccionado proveniente de zonas agrícolas, áreas afectadas por procesos de erosión, e incendios forestales. Entre las fuentes internas se puede mencionar calles sin pavimentar, quemas de Influencia de emisiones naturales y antropogénicas en el material aerotransportado del Valle de Toluca.

El incremento de las actividades productivas y la creciente concentración de población, han detonado un aumento en los servicios de transporte, tanto público como privado, ocasionando un mayor consumo de combustibles y por la consecuente degradación de su calidad del aire. Este problema se complica si se considera que la ZMVT abarca una superficie de 1,209 km<sup>2</sup> y se asienta a una altitud promedio de 2,660 metros sobre el nivel del mar, situación que determina que el contenido de oxígeno sea 23% menor que a nivel del mar, lo cual tiende a hacer menos eficientes y más contaminantes los procesos de combustión.

En años recientes se ha incrementado el estudio y caracterización del material particulado suspendido en el aire de ciudades con intensa actividad industrial, en donde los contenidos generalmente sobrepasan las normas ambientales en vigor. La ZMVT no es la excepción, ya que a partir de 2004 los valores de

partículas aerotransportadas han sobrepasado los límites vigentes. (Caballero S. B. 2009)

El material particulado presenta un tratamiento especial en la bibliografía se clasifica a la vez como contaminante primario y secundario debido a su variada composición. Se define como materia particulada o partícula al material sólido y líquido, disperso y/o arrastrado por el aire, mayor a moléculas individuales, es decir mayor a 0.0002 micrómetros de diámetro y menor a 500 micrómetros.

Las partículas de origen natural provienen principalmente de suelos y ocasionalmente de origen biológico: restos orgánicos de plantas y animales, esporas, virus, etc. Las que provienen de la combustión por lo general están integradas por partículas atomizadas y cenizas del combustible, (figura 1.1). Es por esta razón que se emplean diversos términos que describen las partículas suspendidas. A su vez las partículas se dispersan y depositan en la superficie, de acuerdo con sus propiedades sedimentables y con los patrones meteorológicos que prevalecen en un momento determinado.

Por otra parte, las partículas emitidas por fuentes antropogénicas, fijas o móviles, de origen industrial o vehicular son aquellas que poseen una morfología esférica y superficie porosa por la salida de gases resultantes de procesos de combustión incompleta, constituidas por carbono y azufre y en mucho menor grado por vanadio, titanio y níquel (Colbeck, 2008).

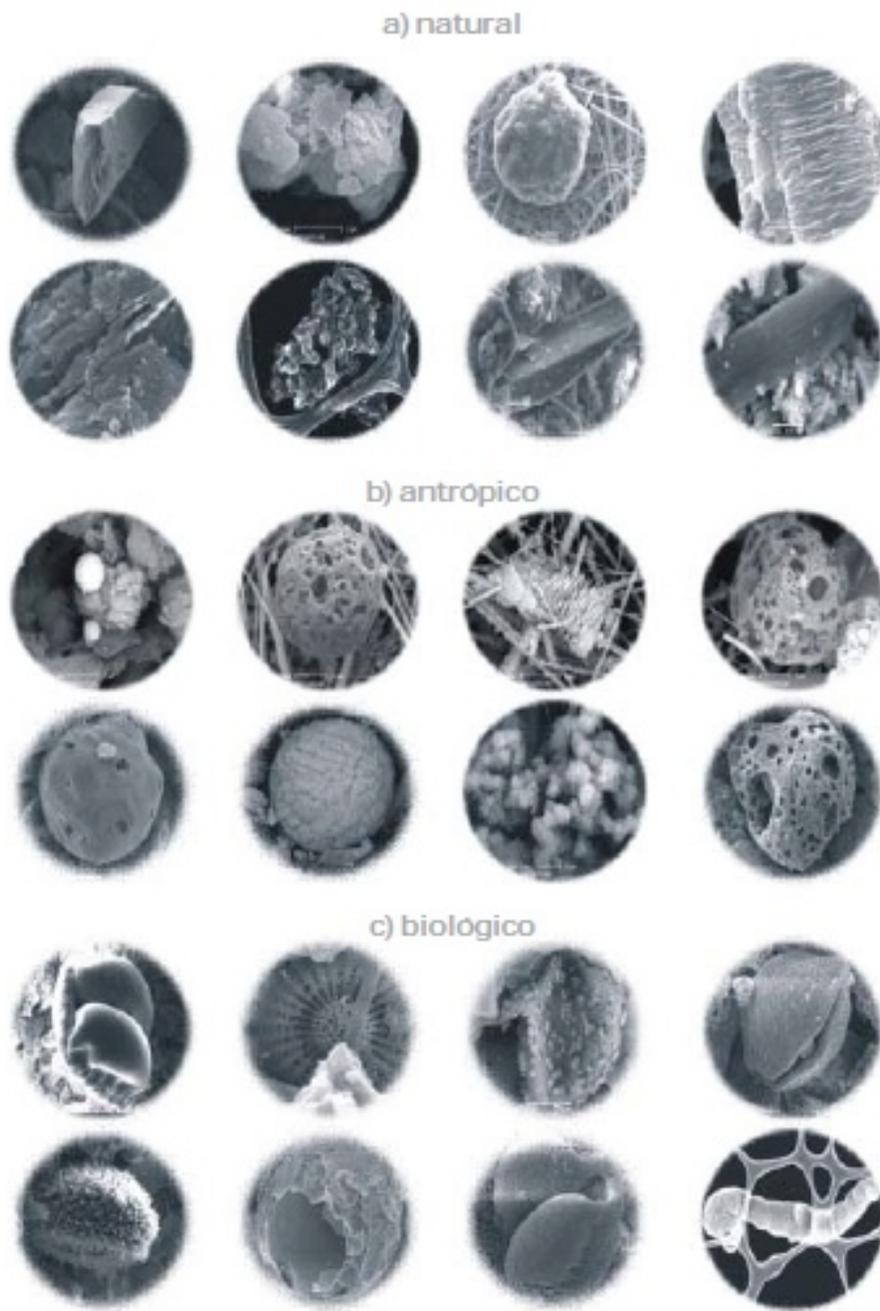


Figura 1.1. Material Particulado Aerotransportado en la ZMVT.  
 (Romero G.E.T y Reyes Gutiérrez L, 2008).

### **1.3 Metales pesados en suelos**

La tabla periódica contiene alrededor de 70 elementos metálicos, de los cuales aproximadamente 59 son considerados metales pesados, es decir que tienen un peso mayor que el del hierro (55.85 g/mol), estos elementos se encuentran presentes en la corteza terrestre en concentraciones relativamente bajas. Muchos de ellos son esenciales para el desarrollo y crecimiento de animales, plantas y otros organismos del suelo, aunque también pueden convertirse en contaminantes cuando superan ciertos umbrales. (Plant et al., 2001).

Los metales pesados constituyen una fuente importante del aumento de estrés oxidativo, aumentan la actividad oxidante de la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa (Gaete, 2010).

La acumulación de estos metales altera las características del suelo provocando que los organismos que viven en el tengan alteraciones a nivel fisiológico. Estos metales es posible encontrarlos en forma de sales o incluso en su forma metálica, sin embargo al ingresar al organismo de los seres vivos pueden tener la capacidad de ocasionar alteraciones fisiológicas que se pueden ver reflejadas, tales como estrés oxidativo. Un efecto dañino de las especies reactivas del oxígeno es la peroxidación lipídica de las membranas. (Gaete, 2010)

#### **1.3.1 Fuentes de los metales**

Las fuentes de estos metales pueden ser de origen geogénico o antropogénico, los primeros se refieren a la geodisponibilidad, es decir aquella proporción en la que su contenido puede liberarse a la superficie o cerca de la superficie (Plumlee, 1994), dicho de otra manera son aquellos que pasan de la roca madre a los suelos tras haber sido liberados por efecto de la erosión ya sea por el aire o por el agua. La liberación de estos elementos depende de la estabilidad, estructura y tipo de enlace atómico. De los distintos tipos de rocas; las ultrabásicas, como las peridotitas, presentan altos contenidos en metales pesados (Cu y Mn). Las menores concentraciones de metales pesados se encuentran en las rocas ígneas ácidas y en las sedimentarias (areniscas y

calizas). Los porcentajes más altos de metales pesados en los suelos, heredados de la roca madre, se dan para Mn, mientras que Co, Cu, Zn y Pb se presentan en menores cantidades y son mínimos los contenidos en As, Cd y Hg.

Por otra parte las fuentes antropogénicas son aquellas que se derivan de las actividades cotidianas del ser humano y entre estas tenemos las siguientes: Actividades agrícolas: riego, fertilizantes inorgánicos, pesticidas, estiércol, enmiendas calizas y, sobre todo, lodos residuales de depuradoras.

- Generación de energía eléctrica: la combustión de carbón es una de las principales fuentes de deposición de metales en el suelo. Las centrales térmicas que usan petróleo pueden ser fuentes de Pb y Ni.
- Actividades industriales: las principales industrias contaminantes son las fábricas de hierro y acero, que emiten metales asociados a las menas de Fe y Ni. La fabricación de baterías produce cantidades considerables de Pb. Las industrias de productos químicos, fármacos, pigmentos y tintes, el curtido de pieles, etc. Producen distintos tipos de contaminantes. En general las áreas altamente industrializadas incluyen Fe, Pb y Zn.
- Residuos domésticos: aproximadamente el 10% de la basura está compuesta por metales. Su enterramiento puede contaminar las aguas subterráneas, mientras que la incineración puede contaminar la atmósfera al liberar metales volátiles y como consecuencia contaminar los demás suelos. Por otra parte, las basuras no controladas obviamente son una importante fuente de contaminantes para el suelo y las aguas superficiales. (Rulkens et al., 1995):

### **1.3.2 Movilidad de los metales pesados**

La movilidad de un metal depende no sólo de su especiación química, sino de una serie de parámetros del suelo tales como pH, materia orgánica, carbonatos, minerales de la arcilla, etc. Así, no todos los cationes de cambio están igualmente disponibles, sino que depende del mineral o minerales de los que están formando parte como complejo de cambio. En general, la movilidad de los metales pesados

es muy baja, quedando acumulados en los primeros centímetros del suelo, siendo lixiviados a los horizontes inferiores en muy pequeñas cantidades. Por eso la presencia de altas concentraciones en el horizonte superior decrece drásticamente en profundidad cuando la contaminación es antrópica. Esto sucede precisamente porque la disponibilidad de un elemento depende también de las características del suelo en donde se encuentra (Galán, 2000). Los parámetros geográficos llegan a ser esenciales para valorar la sensibilidad de los suelos a la agresión de los contaminantes; en concreto:

a) pH. La mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos en suelos arcillosos, excepto As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino.

b) Textura. Los suelos arcillosos retienen más metales por adsorción o en el complejo de cambio de los minerales de la arcilla. Por el contrario, los arenosos carecen de capacidad de fijación y puede contaminarse el nivel freático.

c) Mineralogía de arcillas. Cada mineral de la arcilla tiene unos determinados valores de superficie específica y de descompensación eléctrica. Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayores son sus posibilidades de adsorber metales (Bourg 1995).

En general, los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir varias vías:

1) Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la fase acuosa del suelo, ocupando sitios de intercambio o específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo, asociados con la materia orgánica del suelo y/o precipitados como sólidos puros o mixtos (Pagnanelli et al., 2004). Desde la base fisicoquímica se sabe que los metales precipitan como resultado de cambios en el pH, oxidación y otros cambios de su composición química (Novotny, V., 1995).

- 2) Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas.
  
- 3) Pueden pasar a la atmósfera por volatilización. Para elucidar el comportamiento de los metales pesados en los suelos y prevenir riesgos tóxicos potenciales se requiere la evaluación de la disponibilidad y movilidad de los mismos (Banat et al., 2005).

La movilidad natural de los metales pesados en los suelos es consecuencia de la actividad biológica, de las interacciones sólido-líquido y de la acción del agua (Bourg, 1995).

En el caso de los residuos procedentes de la hidrometalurgia del zinc, la movilización natural de metales pesados puede tener lugar por la acción del agua, en forma soluble y particulada y también por el viento, en forma de partículas pueden sufrir diferentes procesos de migración en forma soluble o lavado, y en forma particulada.

La circulación de metales con las aguas está influenciada por el balance hídrico del agua en el suelo, donde interviene la cantidad de precipitación, evaporación, escurrimiento y filtración del agua, en función de las propiedades fisicoquímicas del suelo. Cabe resaltar la influencia que ejerce el pH del suelo, ya que la mayoría de los elementos traza, con la excepción de Mo, As y Se, son más móviles en condiciones de acidez creciente (Alloway, B. J., 1995).

El viento es un agente que también produce la movilización o migración en forma particulada de los metales pesados que se encuentran en la superficie del suelo. En este caso, los factores que gobiernan el proceso son la naturaleza de las partículas que transporta y la intensidad del viento.

#### **1.4 Estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo es básicamente la consecuencia de un desequilibrio entre producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo (Kohen, et al, 2002). La producción en exceso de estos radicales genera estrés oxidativo ocasionando daño al ADN, proteínas, lípidos y al tejido en sí, generando de esta manera condiciones favorables para el desarrollo de patologías. Además la producción de radicales libres se ve reflejada en una respuesta del sistema de defensa antioxidante de los organismos.

Un efecto dañino de las especies reactivas de oxígeno es la peroxidación lipídica de la membrana. La lipoperoxidación está relacionada con el aumento de la permeabilidad de iones, uniones entre lípidos y polipéptidos y la inactivación de proteínas y enzimas de la membrana (Vavilin. D.1998)

Si bien todos los organismos vivos soportan numerosos factores endógenos y exógenos de estrés oxidativo, al mismo tiempo poseen numerosos sistemas de defensas antioxidantes regulables, enzimáticos y no enzimáticos.

Existen enzimas que actúan específicamente sobre determinadas especies reactivas. Por ejemplo la superóxido dismutasa, dismuta (reacción a través de la cual dos moléculas iguales se transforman en otras dos moléculas distintas) al  $O_2^{\cdot-}$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ , la catalasa se localiza en la mitocondria y los peroxisomas y está involucrada en la destrucción del  $H_2O_2$  generado durante el metabolismo celular.

La principal manifestación molecular del incremento en el estrés oxidativo es la peroxidación de los lípidos de membrana, la cual se ha propuesto como punto de confluencia de varios desórdenes fisiológicos y diversos tipos de estrés (Shewfelt y del Rosario, 2000). El deterioro de los lípidos llevaría a la pérdida de la integridad y fluidez de la membrana, que a su vez afectaría la función apropiada de las proteínas de membrana ya sea por un ataque directo de las proteínas por ERO o por la pérdida de actividad debida a un ambiente lipídico desfavorable. Aunque los lípidos, las proteínas y el ADN son susceptibles al ataque por radicales libres, se ha observado que la peroxidación de lípidos esta cinéticamente favorecida (Shewfelt y Purvis, 1995). De esta manera, la

peroxidación preferencial de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas tiene una función protectora al prevenir el ataque a las proteínas y al DNA (Shewfelt y Purvis, 1995; Shewfelt y del Rosario, 2000).

La lipoperoxidación surge como una consecuencia natural de los procesos metabólicos en la célula, que involucra reacciones de iniciación, propagación, y terminación (Snaich, 1992; Winston, 1983). Las especies reactivas de oxígeno tales como el superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son productos que se originan a partir del transporte de electrones en los cloroplastos y mitocondrias, entre otros (Winston, 1983). La interacción del superóxido y el peróxido de hidrógeno con especies de hierro ( $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) en las membranas conduce a la formación de radicales libres de lípidos presumiblemente vía la formación del radical hidroxilo ( $-OH$ ) (Snaich, 1992). La lipoperoxidación comienza con la remoción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso insaturado, lo que da por resultado la formación de un radical lipídico. El rearrreglo de las dobles ligaduras produce dienos conjugados. El ataque por oxígeno molecular produce un radical peroxilídico, el cual puede remover un átomo de hidrógeno de un lípido adyacente para formar un hidroperóxido lipídico, o un endoperóxido lipídico que a su vez puede conducir a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de degradación (Buege y Aust, 1978). La medición o cuantificación del malondialdehído (MDA), se ha usado como un indicador de la lipoperoxidación y ésta a su vez se ha usado como un parámetro indicador de estrés oxidativo en células y tejidos (Esterbauer, et .al. 1991).

#### **1.4.1 Contaminación de suelos por metales pesados.**

La concentración total de metales en un suelo determinado permite predecir el daño presente en los organismos que viven en este, así como determinar el riesgo ecológico que estas concentraciones representan. (Alexander. 2000)

El contenido de metales presentes en los suelos es usado en muchos países como referencia o como criterio de contaminación en suelos, sin embargo esto no es una fuente confiable de información sobre el efecto que estos metales

acumulados en suelo tienen sobre los organismos vivos de los lugares de muestreo. Es importante tener en cuenta que: la contaminación por metales en suelos es un factor importante que afecta a los organismos que viven en este, incluyendo a las lombrices, que representan entre el 60 y 80% de la biomasa total de este (Lanno, et al. 2004).

#### **1.4.2 Importancia de las lombrices en los suelos.**

Las lombrices de tierra junto con otros organismos macro descomponedores, están entre los organismos más importantes del suelo. Esto se debe a la capacidad de descomponer la materia orgánica, reciclamiento de nutrientes y formación del suelo. Esta importante función puede ser afectada por la presencia de elementos tóxicos en el suelo, tales como los metales pesados (Giménez, R, et al. 2004).

Las lombrices causan importantes modificaciones físicas en el suelo (galerías, madrigueras y hoyos) que mejoran el ambiente para el desarrollo de otros organismos (como los microorganismos) e incrementan la disponibilidad de hábitats y alimento para las plantas y otros animales (Lavelle, 1997;). Además, aumentan la porosidad, facilitan la formación de agregados y mejoran la estructura del suelo, promueven la oxigenación y la infiltración de agua, incrementan el transporte de nutrientes y compuestos químicos agrícolas hasta las capas profundas (Subler et al., 1997; Edwards y Bohlen, 1996), contribuyen a la formación del suelo y a reducir la erosión. Sus efectos son especialmente importantes en suelos con estructura pobre (Ríos, 2005). Por ello la contaminación del suelo con compuestos orgánicos, metales pesados, plaguicidas y lluvia ácida puede afectar a las poblaciones de lombrices. Estos contaminantes se acumulan en sus tejidos y pueden constituir un problema para el gran número de animales que se alimentan de ellas, debido a su potencial biomagnificación (Edwards y Bohlen 1996).

### 1.4.3 Empleo de *Eisenia andrei* como bioindicador.

Los estudios toxicológicos constituyen uno de los elementos de juicio más adecuados para la evaluación del riesgo potencial producido por contaminantes presentes en el ambiente.

Se considera que las lombrices son organismos de prueba útiles para monitorear la toxicidad que provocan varios compuestos o xenobióticos (Fent, 1996), incluyendo metales pesados, plaguicidas, contaminantes orgánicos, mezclas complejas y desconocidas de contaminantes en suelos (Edwards y Bohlen, 1996).

Debido a que las lombrices se encuentran en contacto directo con los suelos, tienen un contacto más directo con los metales acumulados en estos por lo que han demostrado tener una gran tolerancia a la contaminación por metales. Este es el motivo por el cual las lombrices se han reportado como un buen bioindicador para realizar evaluación de contaminación de suelos por metales pesados, como por ejemplo el uso de *Eisenia andrei*, sugerido por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, por sus siglas en inglés OECD.

Además el uso de lombrices de tierra es una forma prioritaria de evaluar la contaminación de suelos (Reinecke and Reinecke, 2004), debido a que estos organismos además de ser muy fáciles de manipular, tienen gran distribución terrestre y tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos. Las lombrices de tierra se encuentran expuestas constantemente a metales pesados, pesticidas y otros contaminantes en el ambiente y por lo tanto su supervivencia depende de un eficiente sistema de desintoxicación.

Para evaluar dicha contaminación, se realizan bioensayos con la lombriz *Eisenia andrei* (figura 1.2) que pertenece a la familia Lumbricidae, esta es exógena en México, pero de amplia distribución, fácil manejo y cultivo. Su principal

característica morfológica es la presencia de segmentos externos e internos en su cuerpo, es hermafrodita y cuando es adulta se observa una protuberancia epidérmica denominada clitelo, en el que se forman los capullos en los cuales son depositados los huevos (Santamaría, 1996). Esta especie se desarrolla bien en pH de 5 a 7, a temperaturas de 20 a 28°C. Además es considerada un bioindicador de la calidad de los suelos, ya que solo es capaz de desarrollarse y reproducirse en condiciones adecuadas de humedad (85 %), y alimentación (material orgánico agropecuario, industrial y doméstico). Además, *E. andrei* es un organismo de fácil manejo en el laboratorio casi no contrae enfermedades, tiene un ciclo reproductivo corto (alcanza su madurez sexual en aproximadamente 2 meses) y es extremadamente prolífica (deposita cada 7 a 10 días una cápsula o huevo con un contenido que fluctúa de 2 a 20 embriones) (Santamaría ,1996).



Figura 1.2: *Eisenia andrei*

Esta importante función puede ser afectada por la presencia de elementos tóxicos en el suelo.

Uno de los parámetros que permite evaluar el efecto de los metales pesados sobre este organismo es precisamente la cuantificación de enzimas de estrés

oxidativo así como de la lipoperoxidación presente como mecanismo de defensa ante el daño ocasionado por los metales pesados.

### **1.5. Planteamiento del problema.**

La contaminación ambiental por metales se hace cada vez más extensiva como consecuencia del aumento de la actividad industrial ocurrida entre finales del siglo XX y comienzos del siglo XXI. Estos contaminantes, derivados de un creciente número de diversos factores antropogénicos (efluentes y desechos industriales y urbanos, tratamiento de las plantas con aguas residuales, agroquímicos, efluentes tóxicos, y operaciones de la industria minera) han afectado progresivamente los diferentes ecosistemas. Entre estos metales, Fe y Mn son importantes como micronutrientes, mientras que Zn es un elemento tóxico que se encuentra en muy baja concentración. Pb no posee función conocida como nutriente y puede ser tóxico para los organismos del suelo (Niess, 1999). La presencia de metales pesados esenciales y no esenciales en la atmósfera, el agua y el suelo, en cantidades excesivas, puede causar serios problemas a todos los organismos vivos. La forma química de los metales en la solución del suelo depende del metal en cuestión, del pH y de la presencia de otros iones (Das et al., 1997).

En la ZMVT se han presentado periodos de altas concentraciones de partículas suspendidas PM10 debidas a fuentes tanto externas como internas. Entre las externas están el transporte de material fraccionado proveniente de zonas agrícolas, áreas afectadas por procesos de erosión, e incendios forestales. Entre las fuentes internas se puede mencionar calles sin pavimentar, quemas de residuos a cielo abierto y emisiones de la industria y flota vehicular (Agenda Ecológica Federal, 2008).

### **1.6. Hipótesis.**

Se pretende determinar la correlación que existe entre la concentración de metales en suelos de los diferentes puntos de la zona metropolitana del Valle de

Toluca y las enzimas de estrés oxidativo generadas en el organismo *Eisenia andrei*.

La concentración de metales presentes en los organismos empleados para la realización del experimento, tendrá una correlación significativa con la concentración presente en los suelos a los cuales fueron expuestos, de tal manera que ambas correlaciones serán proporcionales a la concentración de enzimas de estrés oxidativo presentes en los organismos empleados.

## **1.7. Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo General.**

Determinar si existe una correlación significativa entre la concentración de enzimas de estrés oxidativo en el organismo *Eisenia andrei* empleado para el experimento, y la concentración de metales presente en los suelos.

### **1.7.2. Objetivos específicos.**

- a) Determinar diferentes puntos de la ZMVT en base a la dinámica de vientos y a su posición natural y obtener muestras de suelos.
- b) Cultivar organismos de la especie *Eisenia andrei* hasta tener organismos adultos con clitellum visible para llevar a cabo los bioensayos.
- c) Determinar la toxicidad aguda de las muestras de suelo utilizando como organismo bioindicador a la *Eisenia andrei*.
- d) Determinar la toxicidad aguda de los elutriados de las muestras de suelo utilizando como organismo bioindicador a la *Eisenia andrei*.
- e) Determinar la concentración de Ti, Cu, Pb, Zn, Mn y Fe presente en cada muestra de suelo.
- f) Determinar la correlación entre el estrés oxidativo en los organismos y las concentraciones de metales en las diferentes muestras.

# CAPITULO 2

## Metodología

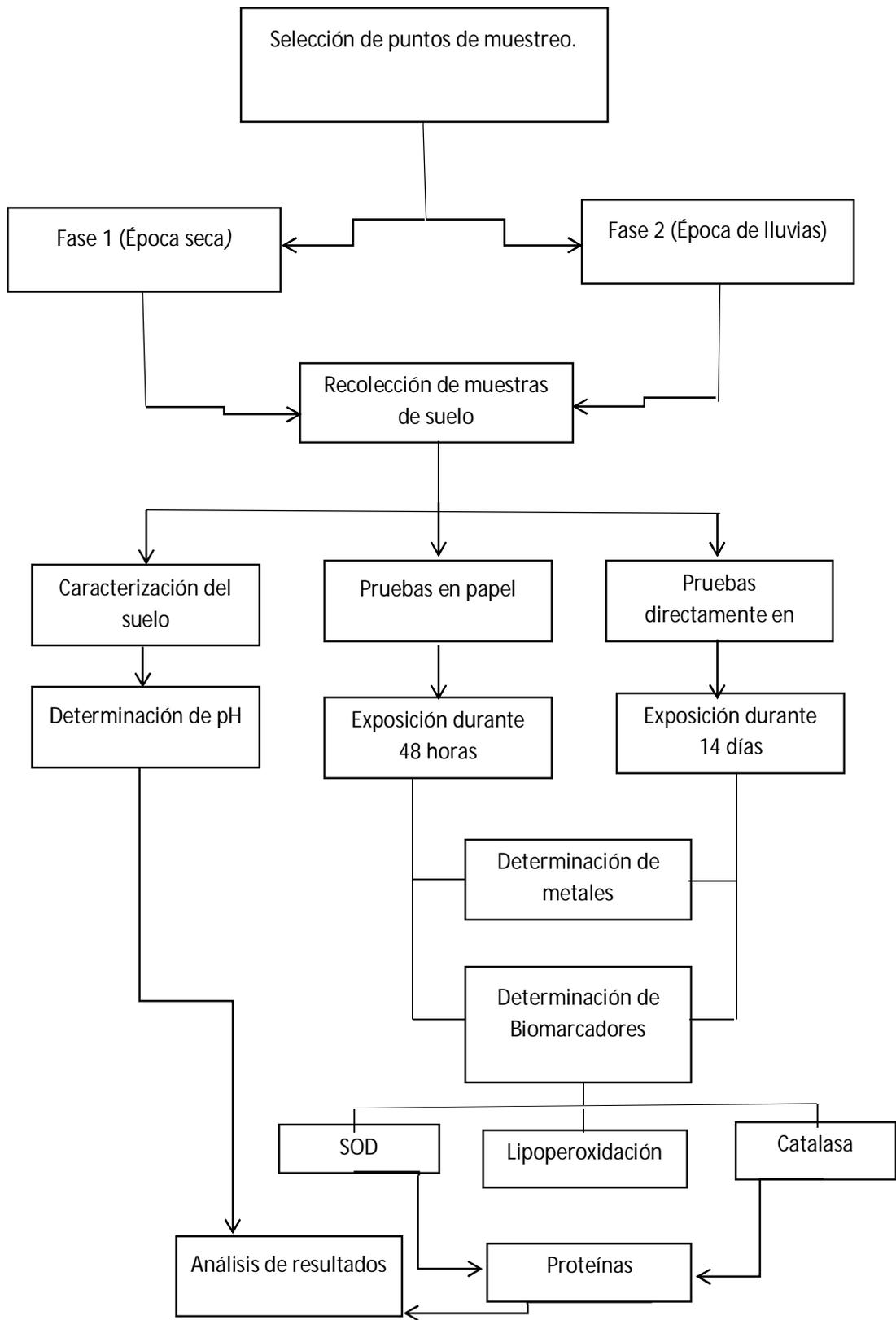


Figura 2.1: Diagrama de metodología.

## **2.1. Determinación y recolección de puntos de muestreo de la ZMVT.**

Por su posición geográfica con respecto al territorio nacional, la ZMVT se encuentra bajo la influencia de sistemas meteorológicos tropicales durante la época de lluvia.

El paso constante de ondas y ciclones tropicales aportan la humedad más importante del año en forma de nublados y lluvias abundantes sobre la zona; lo cual contribuye a la remoción de los contaminantes presentes en la atmósfera. Sin embargo, en la época seca-fría el desplazamiento de frentes fríos y masas de aire polar son los sistemas meteorológicos que predominan; cuando son intensos estos fenómenos la ZMVT se ve afectada con sistemas anticiclónicos (tiempo atmosférico estable y seco) que pueden generar inversiones térmicas, originando condiciones desfavorables para la dispersión de los contaminantes. La ZMVT no está encerrada por completo por barreras naturales como sucede con la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), lo cual favorece la circulación del viento y, por tanto, su ventilación se ve favorecida la mayor parte del año. (Gobierno del Estado de México, 2004).

En esta zona la circulación del viento en dirección y frecuencia es muy compleja y variada en gran medida en función del relieve, pero en general (figura 1.3) , el Valle de Toluca se encuentra en la zona de influencia de los vientos alisios, cuya intensidad se expresa más bien débil e incluso estable en el período que comprende la época fría (finales de noviembre a finales de febrero) predominando los vientos provenientes del sur y con dirección norte, con una ligera curvatura desviada a favor de las manecillas del reloj, todo esto en función del relieve, es el caso del volcán “Nevado de Toluca” que no permite que circulen libres los vientos que llegan por el sur provocando el cambio de su trayectoria y haciendo que se deslicen hacia el valle por su flanco sureste.

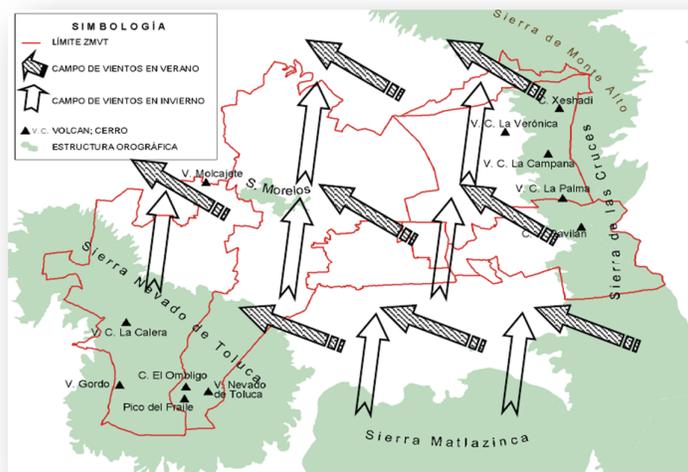


Figura 2.2: Dinámica de Vientos sobre la ZMVT (Programa Aire Limpio SEMARNAT 2007-2011)

En base a esta dinámica de vientos se eligieron los 13 puntos para llevar a cabo el muestreo.

Las muestras fueron obtenidas mediante nucleador, recolectando suelo superficial, aproximadamente 5 kilogramos de muestra en cinco puntos diferentes de cada sitio de recolección. La toma de muestra se llevó a cabo durante la última semana de noviembre de 2010 para el caso de la época de sequía, y durante la última semana de agosto de 2011 para el caso de la época de lluvia.

## 2.2. Determinación de pH en suelos.

Se tomaron muestras de 10 gr de suelo, previamente homogenizado, se agregaron 100 mL de agua destilada y se mezcló con agitador magnético durante 10 minutos, la mezcla se dejó reposar durante 10 minutos. Se calibró el potenciómetro con soluciones amortiguadoras pH 7 y pH 10. Una vez calibrado el potenciómetro se llevó a cabo la lectura del pH de cada una de las muestras, esta lectura se llevó a cabo por duplicado (Norma Mexicana NMX-AA-052).

### **2.3. Incubación y obtención de cultivos de *Eisenia andrei*.**

Se realizaron cultivos de *Eisenia andrei* en el laboratorio de la Facultad de Química UAEMEX, tomando en cuenta factores como: temperatura, pH y humedad (Ver anexo 1). Las lombrices fueron colocadas en contenedores de plástico donde se colocó una cama de suelo artificial; cuya composición fue 10%, materia orgánica, 20% arcilla y 70% arena (Cuevas .et al, 2008) con la finalidad de crear un ambiente ideal para la reproducción de las lombrices y evitar una interferencia de algún otro elemento presente en suelos comunes, para alimentar a las lombrices; colocho plátano y jitomate previamente licuado en medio de la cama de tierra y se cubrió con el mismo suelo, esto con la finalidad de brindar alimento a las lombrices.

### **2.4. Realización de pruebas de toxicidad aguda.**

#### **2.4.1. Exposición de organismos a elutriados.**

Se tomaron 40 gramos de cada muestra de suelo, previamente homogenizado, se adicionaron 40 mL de agua destilada, se agito hasta obtener una mezcla homogénea y se dejó reposar durante 15 minutos.

Posteriormente se colocó el sobrenadante de cada muestra en tubos de ensayo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. Una vez obtenido el sobrenadante se colocaron 3 mL del sobrenadante en frascos previamente preparados con papel filtro 80 g/m<sup>2</sup> aproximadamente 0.2 mm de espesor, hasta distribuir dicha cantidad sobre todo el papel filtro. Para el caso del control se adicionaron 3 ml de agua destilada sobre el papel filtro dentro de cada uno de los frascos de exposición.

Se colocó un organismo por cada frasco, para cada muestra, se prepararon 10 individuos adultos con clitellum visible previamente pesados con rango de peso entre 200 y 300 miligramos; y se colocaron uno en cada frasco previamente preparado con las muestras del suelo. Los frascos con los organismos fueron

colocados en una incubadora a una temperatura constante de 20 °C, durante un periodo de 48 horas de acuerdo al método OECD modificado. (OECD, 1984).

Después de la exposición, se observó si los organismos presentaban alguna diferencia morfológica que pudiera dar indicio acerca de algún daño en cada individuo, se hicieron las observaciones correspondientes, se pesaron cada uno de los organismos y se eligieron 5 organismos de cada punto de muestra de suelo para la determinación de enzimas de estrés oxidativo en tanto los otros cinco fueron congelados para la determinación de metales presentes en cada uno a través de fluorescencia de rayos X. (OECD, 1984),



Figura 2.3: Pruebas toxicológicas en papel, método OECD

#### **2.4.2. Exposición directa de organismos en suelo.**

Para determinar la toxicidad aguda, se llevaron a cabo bioensayos con *E. andrei*, obtenida de los cultivos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Para ello se emplearon frascos de plástico de 250 mL. Se pesaron 200 gramos de suelo previamente homogenizado, ajustando la humedad a un 80% en cada muestra. En el bioensayo se incubaron 5 individuos de lombriz adulta con clitellum visible, previamente lavadas con agua destilada y dejadas durante dos

horas en cajas Petri con la finalidad de limpiar el aparato digestivo de los individuos, secadas en papel filtro y pesadas individualmente.

Posteriormente y se realizó la exposición directa a suelos; colocando 5 individuos en cada frasco de suelo bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, parámetros que fueron mantenidos entre 72 y 70°F y 80% de humedad; cada exposición se llevó por duplicado en cada uno de los suelos durante un periodo de 14 días, posteriormente a la exposición se sacaron los organismos de los suelos, se lavaron con agua destilada y se dejó que vaciaran su intestino durante un periodo de dos horas en cajas Petri aisladas de la luz con la finalidad de evitar condiciones de estrés por exposición a la luz.

## **2.5. Determinación de enzimas de estrés.**

Posteriormente se tomaron los cinco individuos y fueron pesados de manera individual, y los cinco fueron colocados en tubos de ensayo protegidos de la luz, justo antes de llevar a cabo la homogenización se agregaron 5 ml de buffer de carbonatos, posteriormente el homogenizado se centrifugo a 3500 rpm durante diez minutos y el sobrenadante se utilizó para llevar a cabo las determinaciones de las enzimas de estrés, lipoperoxidación y proteínas.

### **2.5.1 Determinación de Superóxido dismutasa (SOD).**

Se determinó espectrofotométricamente a través del método con modificaciones de Misra y Fridovichch (1972), midiendo la oxidación de la adrenalina por el radical superóxido a una longitud de onda de 480 nm y empleando un coeficiente de extinción molar de  $0.025 \text{ min}^{-1}$ . (P Misra Hara, Fridovich Irwin, 1972). (Ver anexo 2)

### **2.5.2. Determinación de catalasa (CAT).**

Se realizó determinando la cinética de degradación del peróxido de hidrogeno, que se acelera en presencia de esta enzima. La lectura de este proceso se llevó a cabo a una longitud de onda de 240 nm durante dos minutos; de acuerdo al método de Radi et al (Ver Anexo 3)

### **2.5.3. Determinación de lipoperoxidación (LIPO).**

Determinación de lipoperoxidación. Basado en la determinación de productos reactivos con el ácido tiobarbitúrico. La lipoperoxidación produce mayoritariamente malondialdehido (MDA), este compuesto al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico genera un compuesto colorido en el que es posible leer a una longitud de onda de 535 nm., de acuerdo a la metodología de Buege Aust. La concentración de malonaldehido fue calculada usando un coeficiente de extinción molar de  $156 \text{ mM}^{-1}$ . (Buege y Aust, 1978) (Ver anexo 4).

### **2.5.4. Determinación de proteínas.**

Se basa en la unión de un colorante, Cromassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre., empleando una curva de calibración de albumina como estándar (Bradford MM (1976). (Ver Anexo 5).

# CAPITULO 3

## Resultados y discusión

### 3.1 Puntos de muestreo

Los puntos de muestreo elegidos en base a su dinámica de vientos y a su posición geográfica de la ZMVT fueron los siguientes:

Tabla 1: Localización geográfica de los puntos de muestreo.

NOMBRE DEL LUGAR	COORDENADAS		
	Lat N	Long W	Altitud msnm
SAN MIGUEL (SM)	2131541	451981	2683
HÍPICO	2130170	433610	2668
FIDEL NEGRETE	2129427	431763	2685
LA CIERVITA	2121835	414849	3317
SANTÍN	2139978	437812	2596
LOMAS ALTAS	2134171	431978	2676
SAN ANTONIO LA FE	2147604	446870	2705
REFORMA	2133176	432588	2644
AMEYALCO	2135936	450973	2500
ALAMEDA	2133062	430448	2662
TOLLOCAN	2132623	442543	2589
LA PILITA	2129735	438249	2623
CACALOMACÁN	2123038	422770	3100

:

### 3.2. pH en suelos.

Durante la primera fase del estudio, se encontró que los pH de los suelos tuvieron una tendencia a ser suelos ácidos, en tanto durante la segunda etapa del estudio se pudo observar que los suelos de manera general incrementaron su alcalinidad de manera muy marcada, tabla 2.

Tabla 2: Resultados de la determinación pH de muestras de la primer y segunda etapa del estudio.

LUGAR	pH PRIMERA ETAPA	pH SEGUNDA ETAPA
SN MIGUEL	5,13	7,55
HIPICO	5,32	7,1
FIDEL NEGRETE	5,13	7,14
LA CIERVITA	5,95	7,13
SANTIN	5,32	7,16
LOMAS ALTAS	5,92	7,6
SN ANTONIO LA FE	5,12	7,13
REFORMA	5,8	7,07
AMEYALCO	5,18	7,57
ALAMEDA	5,07	7,45
TOLLOCAN	5,2	7,05
PILITA	5,12	7,23
CACALOMACAN	5,7	7,32

### 3.3. Exposición de organismos a elutriados.

Posterior a las 48 horas de exposición, se pesaron nuevamente los organismos y tomando como base la pérdida de peso en los organismos expuestos al control, se determinó la pérdida de peso porcentual respecto de este, teniendo un peso promedio inicial de 0.2675 g y un peso final de 0.2108 g, con una pérdida de peso de 0.056 g, y tomando este último como peso base para calcular las pérdidas de los otros organismos, los resultados se muestran a continuación en la figura 3.1.

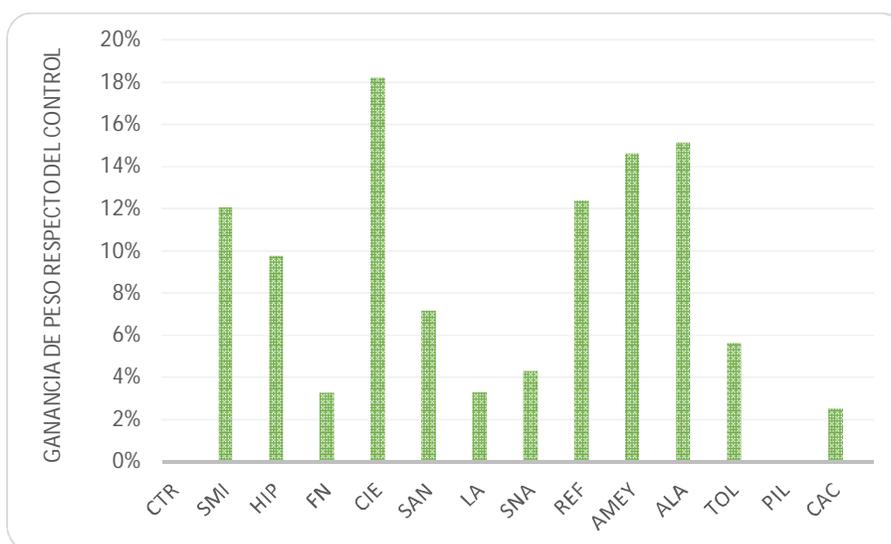


Figura 3.1: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a elutriados de la primera fase del estudio, respecto del control.

En este caso se observa que tanto para el caso del control tiene un 0% de pérdida, pues este es la base para el cálculo de los demás puntos, sin en cambio para el caso de los organismos expuestos a las muestras obtenidas de La Ciervita, Alameda y Ameyalco presentan las pérdidas de peso más elevadas respecto del control, por otra parte, el punto ubicado como La pilita presenta la misma pérdida porcentual de peso respecto del control, lo cual indica que en el caso de la primera etapa de este estudio, existe un factor común entre el control

y la muestra de la Pilita que permite un mismo comportamiento en cuanto la pérdida de peso de los organismos expuestos.

Por otra parte, en cuanto a la variación en peso que corresponde a los organismos expuestos durante la segunda etapa del estudio se puede observar que existe una mayor pérdida de peso respecto a la del control, lo cual implica que existen factores presentes en este suelo que de alguna manera favorecen esta pérdida más notable en pesos, tomando como base que el promedio de peso inicial de los organismos del control fue de 0.2403 g, y el final de 0.2296 g, teniendo una pérdida real de 0.0107 g, y tomando este dato como dato base para determinar la pérdida de peso de cada uno de los diferentes puntos a partir de la pérdida que presentó el control, tal como se muestra en la figura 3.2.

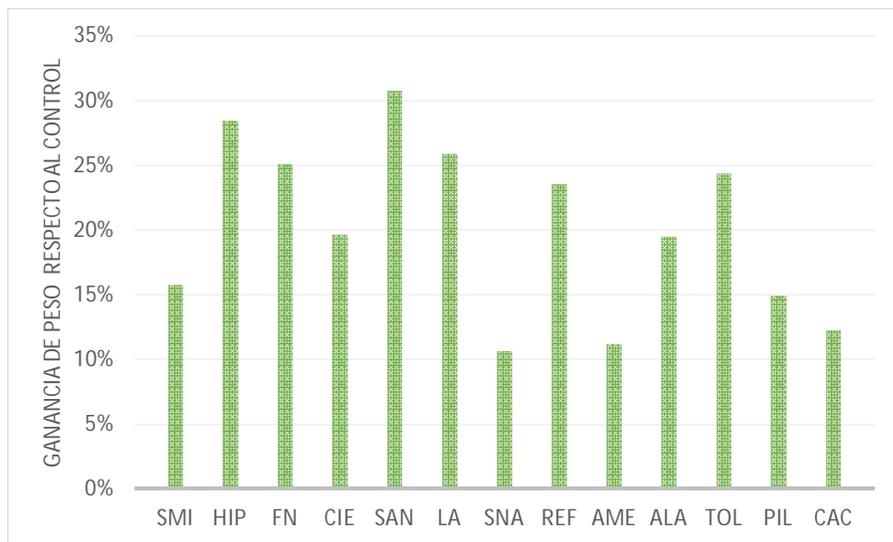


Figura 3.2: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a elutriados de la segunda fase del estudio, respecto del control

En este caso es posible observar que el punto que presenta una mayor pérdida de peso respecto del control es el punto identificado como Santín, seguido por El Hípico y el parque Fidel Negrete, además de que se puede observar una pérdida mucho más notable de peso en los organismos expuestos en todos los puntos respecto a las diferencias de peso que se observaron durante la primera etapa, esto implica que en los suelos recolectados durante la segunda etapa de

muestreo pudieran contener en su composición elementos que propicien esta pérdida de peso que es mucho más notable que en la primera etapa del estudio.

### 3.4. Exposición directa de organismos en suelos.

Para el caso del análisis de los datos de suelo, se observa una pérdida en peso muy elevada, este fenómeno se presenta debido a que la diferencia en peso del control fue tomada como base para calcular los porcentajes de pérdida de los demás datos, esto implica que al haber ganado peso el control, los organismos expuestos a los demás puntos perdieron peso y esto explica la diferencia tan grande en pérdidas de peso respecto de los observados en los organismos expuestos en los elutriados, para ello se toma como base un peso promedio inicial del control de 0.2489, un peso final de 0.2781, con una ganancia de peso de 0.02925 g, en el caso de los organismos expuestos a las muestras de los diferentes puntos de muestreo, de manera generalizada perdieron peso, esto se aprecia en la figura 3.3.



Figura 3.3: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a suelos de la primera fase del estudio, respecto al peso inicial.

En este caso, se observa una pérdida muy por encima del cien por ciento de peso, es decir que la ganancia de peso de los organismos expuestos en el control no se ve reflejada en los demás organismos expuestos a los diferentes sitios,

motivo por el cual se supone aun con mucho mayor fundamento que el suelo en su composición tiene algún elemento que permite este comportamiento en cuanto la pérdida de peso de los organismos. Y es precisamente para esta etapa del estudio en que la mayor pérdida de peso se ve reflejada en el punto San Miguel, seguido por La Pilita y La ciervita por ello es importante mencionar que mientras el control gano peso, todos los organismos expuestos a los puntos de muestreo perdieron peso de manera general. Por otra parte es importante observar y comprender como es que se comportaron las variaciones de peso durante la segunda etapa del estudio, por lo cual se lleva un tratamiento igual a los datos, donde se tiene un peso inicial de los organismos control de 0.2323 g, y un peso final de 0.3596g, teniendo una ganancia en peso después de 14 días de 0.1273 g, esto implica que esta ganancia se normaliza como cero para poder llevar a cabo la cuantificación de le perdida porcentual en peso de los organismos expuestos a los diferentes puntos de muestreo, obteniendo los siguientes resultados:

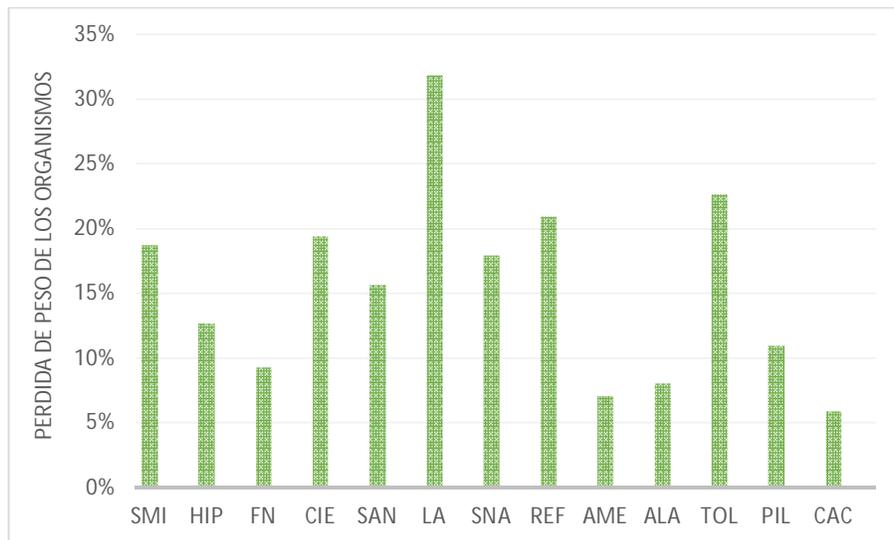


Figura 3.4: Pérdida porcentual de peso en organismos expuestos a suelos de la segunda fase del estudio, respecto su peso inicial.

En este caso se observa que si bien hay una pérdida de peso bastante notable, es mucho menos notable que en el caso de los organismos de la primera etapa, teniendo en cuenta que en ambos casos los organismos expuestos al control ganaron peso, sin en cambio para este caso la pérdida de peso es grande pero no tanto como en el caso de la primera etapa.

### 3.5. Determinación de enzimas de estrés, lipoperoxidación y proteínas en organismos expuestos a elutriados y suelos.

#### 3.5.1. Determinación de Superóxido dismutasa.

En la figura 3.5 se muestra una comparación entre la actividad enzimática de SOD registrada en las lombrices incubadas tanto en suelos como en elutriados. Se puede apreciar que en suelos la mayor actividad de esta enzima está presente en Ameyalco y la menor actividad de la enzima se registra en organismos expuestos al suelo de Fidel Negrete, en tanto en el caso de las pruebas rápidas en papel se observa en Tollocan la menor actividad de esta enzima y la mayor actividad en el punto Lomas Altas. Cabe mencionar que la mayor actividad comparativamente hablando se presenta en los organismos expuestos en elutriado respecto de los organismos expuestos a suelo.

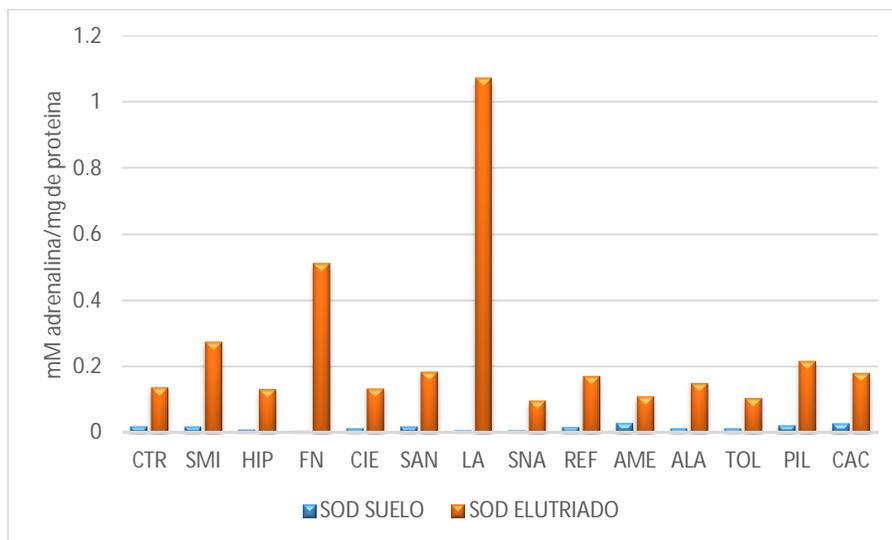


Figura 3.5: Comparación de actividad de SOD presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la primera fase.

Durante la segunda etapa del estudio se observa que existe una notable diferencia en cuanto a la actividad de SOD, en este caso, al igual que durante la primera fase; se observa una mayor actividad en los organismos que fueron expuestos a elutriado que los que fueron expuestos a suelos.

En lo que corresponde a las determinaciones realizadas en organismos expuestos a elutriados, se puede apreciar en la figura 3.6, que los mayores niveles de actividad de SOD, se encuentran en San Antonio, y los menores niveles de actividad enzimática de la SOD, se encuentran en Reforma,. Y en el caso de las pruebas realizadas en suelos se registra una mayor actividad en La Pilita, y la menor actividad se presenta en Santín.

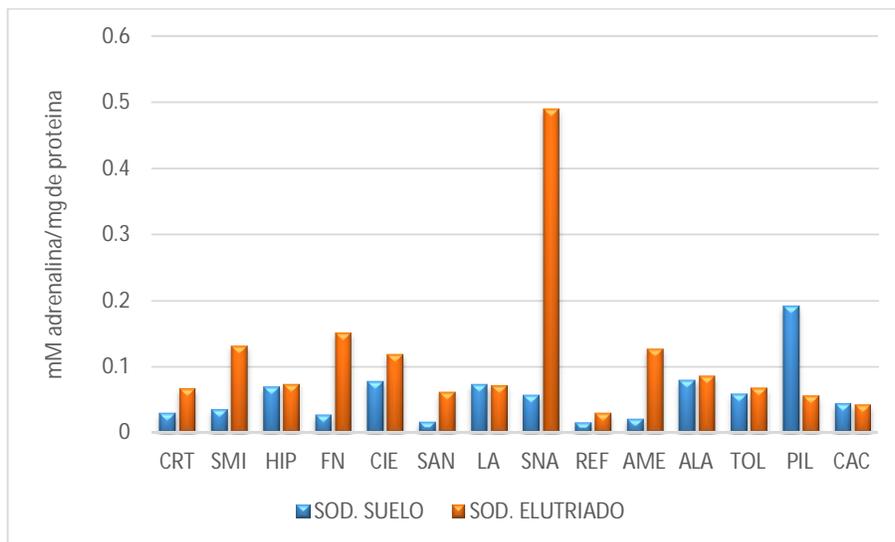


Figura 3.6: Comparación de actividad de SOD presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la segunda fase.

### 3.5.2. Determinación de catalasa.

A continuación se muestra un comparativo entre la actividad de catalasa determinada en suelos y la actividad determinada en elutriados.

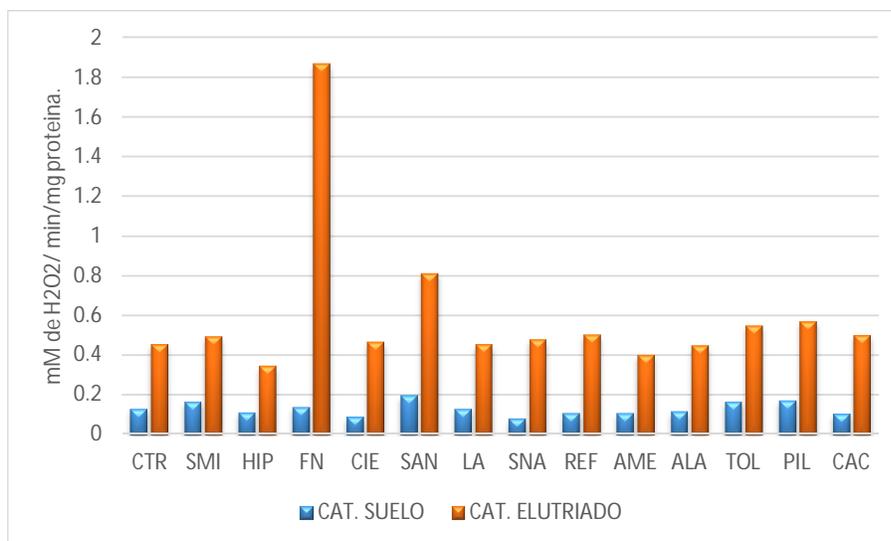


Figura 3.7: Comparación de actividad catalasa presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la primera fase.

Se puede apreciar en la figura 3.7, que: entre las pruebas, los organismos que muestran una mayor actividad de esta enzima son que fueron evaluados en elutriado, y en el caso de los suelos no se observa una presencia tan elevada de la actividad de esta enzima. En el caso de los elutriados la mayor actividad de esta enzima se registra en los organismos expuestos al punto Fidel Negrete, y la menor actividad en los organismos del Hípico. Por otra parte en el caso de los organismos expuestos a los suelos, la mayor actividad se registra en los organismos expuestos a los suelos de Santín y la menor actividad en San Antonio.

Durante la segunda etapa del estudio se observó que en los elutriados es donde hubo una mayor actividad enzimática, respecto de la actividad detectada en los organismos expuestos a suelos. Para los suelos la mayor actividad se encontró en los organismos expuestos a las muestras de Fidel Negrete y la menor en el control, por otro lado; para las pruebas realizadas en elutriado se encuentra que la mayor actividad está registrada en el control y la menor en el Cacalomacán.

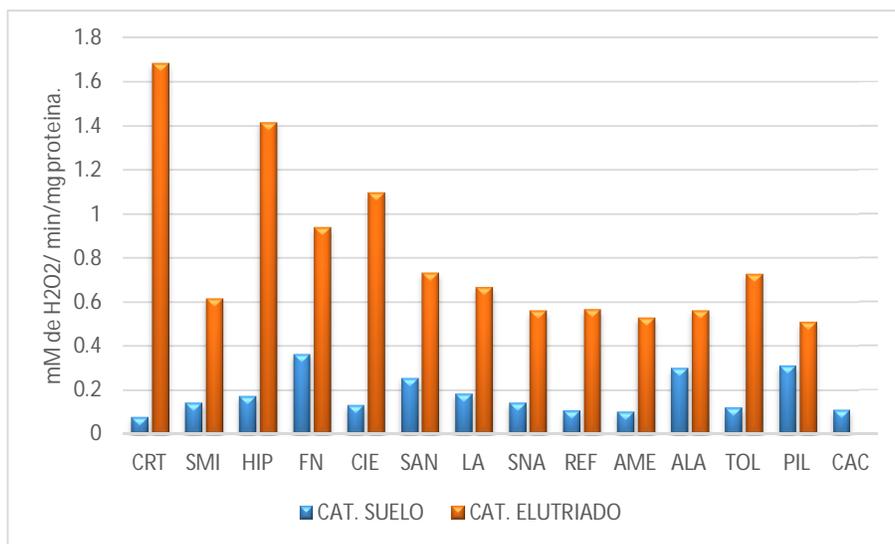


Figura 3.8: Comparación de actividad catalasa presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de las muestras de la segunda fase.

### 3.5.3. Determinación de lipoperoxidación.

Para el caso de la evaluación de la peroxidación lipídica se observan los resultados obtenidos en la figura 3.9

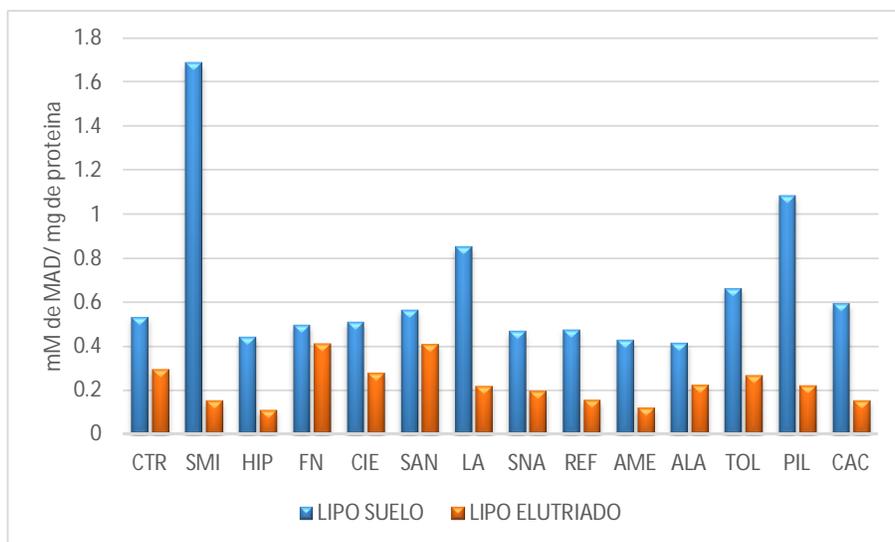


Figura 3.9: Comparación de Lipoperoxidación presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de los suelos de la primera fase.

En este caso es posible apreciar que la mayor presencia de lipoperoxidación se encontró en el suelo, teniendo como máximo en los organismos expuestos al suelo tomado en San Miguel, y el menor en los organismos expuestos al punto de Alameda, por otra parte es menos notable la peroxidación lipídica en los organismos expuestos a elutriado respecto de los organismos expuestos a suelos teniendo como máxima concentración presente en los organismos expuestos a elutriado: Santín y como mínimo a los organismos expuestos en el punto denominado Hípico..

Para la segunda fase del estudio se observa que la lipoperoxidación se nota más en las determinaciones realizadas en suelos, sin en cambio también se nota que en elutriados hay cantidades importantes de lipoperoxidación. En suelos el punto que registra la más elevada la lipoperoxidación fue: La Pilita y el que registro menor fue: Cacalomacán, después del control, En el caso de los elutriados el punto que mayor lipoperoxidación registro fue: Fidel Negrete y el que menor registro tuvo fue La Ciervita.

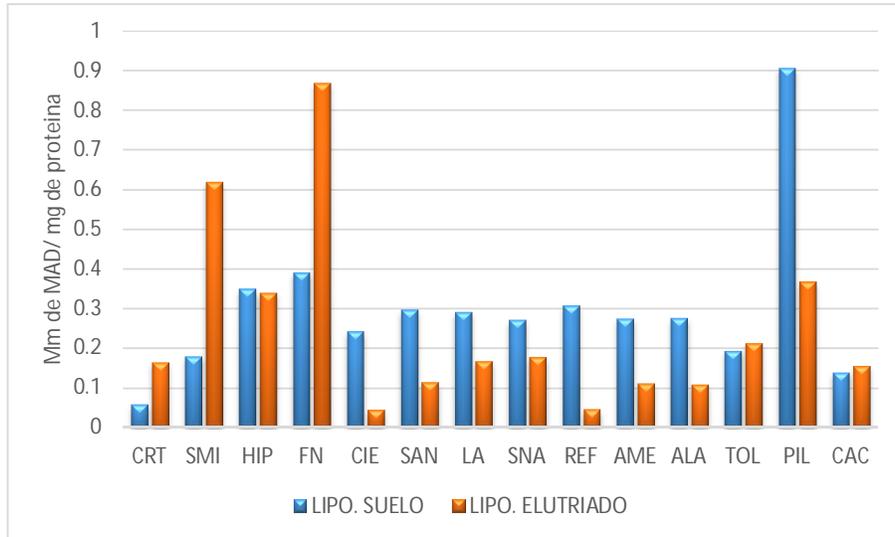


Figura 3.10: Comparación de lipoperoxidación presente en organismos expuestos a suelos y elutriados de los suelos de la segunda fase.

Finalmente para poder determinar si los niveles de estrés oxidativo presentes en los organismos expuestos a los distintos tipos de prueba corresponden a la concentración de metales presentes en cada una de las muestras, es importante saber cuáles fueron las concentraciones de metales en cada una de las etapas del estudio y de esta manera poder llevar a cabo las correlaciones pertinentes.

### 3.6. Determinación de la concentración de metales presentes en suelo.

Posteriormente a la recolección de suelos, se removieron impurezas visibles y componentes ajenos al suelo como la basura, y se cuantificaron los metales presentes en cada una de las muestras de los diferentes puntos de muestreo.

Para el titanio, se puede observar que durante la primera y la segunda fase, la correlación que existe es una correlación positiva de 0.973; obtenida por un coeficiente de relación de Spearman, se observa que entre las concentraciones de Ti entre la primera y segunda fase existe un incremento en la concentración de estos metales, para determinar si este incremento es significativo se realizó una prueba de T-student pareada encontrando que esta diferencia es significativa ( $p < 0.05$ ), determinando que para este caso la variación si es significativa, ya que se obtiene una  $p = 0.037$ , que representa una variación en concentraciones que si tiene significancia para el estudio (Figura 3.11).

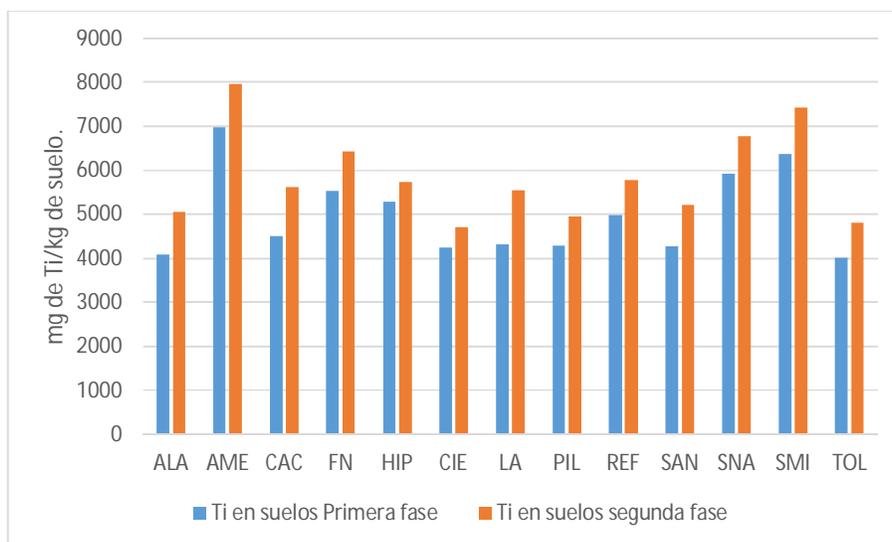


Figura 3.11: Comparación de presencia de Titanio en suelos de la primera y segunda fase

Para la evaluación de este metal se obtiene la mayor concentración durante la primera fase del estudio en Ameyalco y la menor concentración se encuentra en La Ciervita, tendencia que se cumple nuevamente durante la segunda etapa del estudio para el sitio de mayor concentración, sin en cambio para el caso del punto con menor concentración de este metal se observa que es Alameda.

Para manganeso, se puede apreciar en la figura 3.12 que, durante la segunda fase hubo un incremento en cuanto a la concentración de este metal en suelo, la correlación entre las cantidades presentes en la primera y la segunda fase es de 0.932, lo cual implica que si existe correlación lineal, y al aplicar la prueba de T-student, se obtiene un valor p de 0.102., que al tomar una significancia de  $p < 0.05$ , no indica una variación significativa entre las concentraciones de la primera y segunda etapa del estudio.

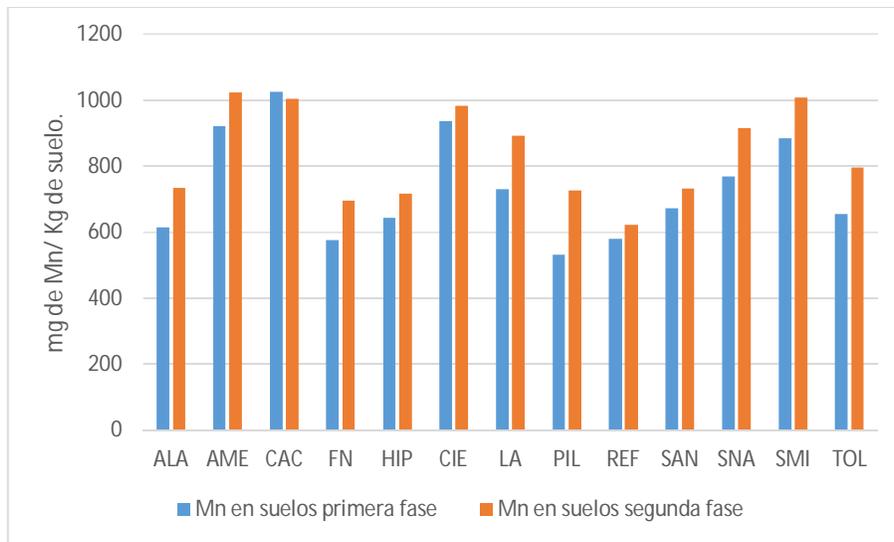


Figura 3.12: Comparación de presencia de Manganeso en suelos de la primera y segunda fase.

El manganeso se encontró en mayor cantidad durante la primera etapa en Cacalomacán, y en la segunda etapa en Ameyalco, por otra parte las menores concentraciones en la primer etapa se localizaron en La Pilita, y en la segunda en Reforma, sin embargo de acuerdo a la p calculada no hay una significancia para las concentraciones detectadas entre la primera y segunda etapa del

estudio, esto indica que esta aparente variación que se observa en las gráficas no tiene impacto para la realización del estudio.

En el caso de las concentraciones de Zinc, se observa en la figura 3.13, que hay un incremento en las concentraciones del metal en suelo durante la segunda fase del estudio, por otra parte, se puede observar que la correlación entre las concentraciones de la primera y la segunda fase del estudio es significativa al obtenerse un coeficiente de correlación de 0.992. Al aplicar la prueba de distribución se obtiene una p de 0.474, que de igual manera que el manganeso no tiene una significancia relevante en cuanto a la variación de las concentraciones entre una etapa y otra.

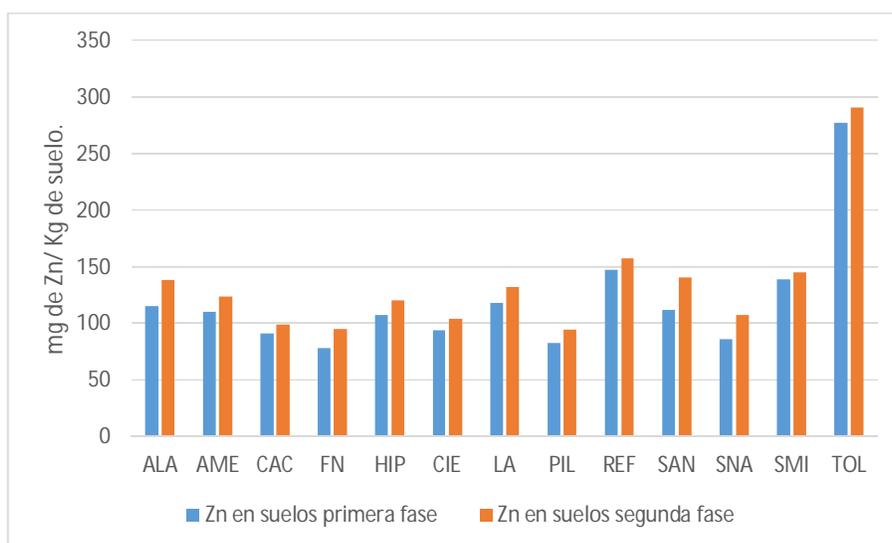


Figura 3.13 Comparación de presencia de Zinc en suelos de la primera y segunda fase.

Es importante tener en cuenta que la mayor concentración de este metal tanto en la primera fase como en la segunda se encuentre en Tollocan, en tanto la menor concentración para el caso de la primera etapa y la segunda, se localiza en el punto determinado como Fidel Negrete.

Para el hierro presente en suelos se puede observar que la correlación entre las cantidades de hierro en la primera fase y en la segunda etapa existe, al obtenerse una correlación de 0.983. Por otro lado, como se aprecia en la figura 3.14, se observa un incremento en la concentración de este metal en las

muestras de la segunda fase, no obstante al llevar a cabo la aplicación de una prueba de T-student se obtiene p de 0.054, lo cual nos indica que este incremento no es significativo para la prueba y que la variación en las concentraciones del metal tanto en la primera como en la segunda fase no es significativa.

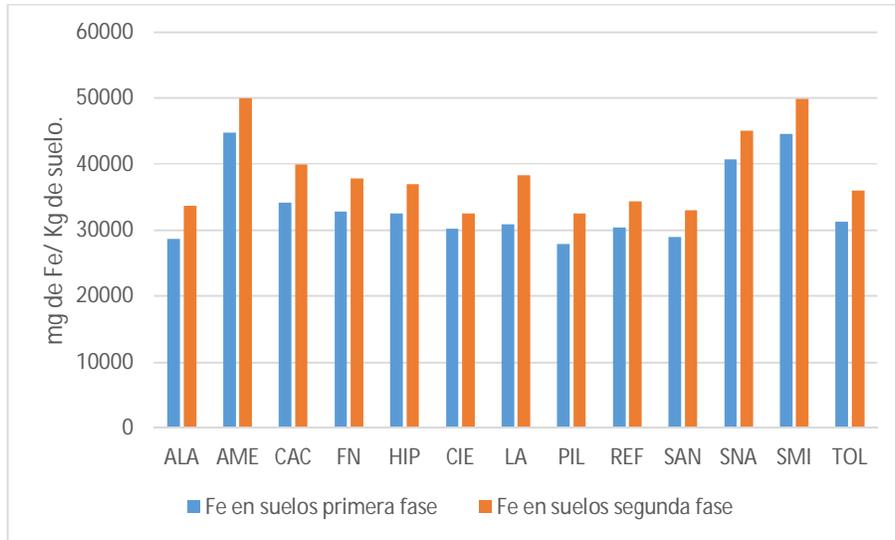


Figura 3.14 Comparación de presencia de Hierro en suelos de la primera y segunda fase del estudio.

En la gráfica se puede apreciar que los puntos con mayor presencia de este metal fueron durante la primera etapa y segunda etapa: Ameyalco y los puntos con menor presencia de este metal fueron para la primer y segunda etapa La Pilita.

El cobre determinado en las muestras de suelo los resultados se muestran en la figura 3.15, en donde se aprecia una disminución del contenido del metal entre las muestras de la segunda fase respecto al contenido del metal en las muestras de la primera fase. Al realizar las pruebas de coeficiente de Pearson y T-student se puede apreciar para el primer caso que la correlación entre las concentraciones de las muestras de la primera fase y de la segunda tiene una muy buena correspondencia, sin en cambio para el caso de la prueba de T, se

obtiene una p de 0.022, lo cual implica que el aumento del metal es significativo para el estudio.

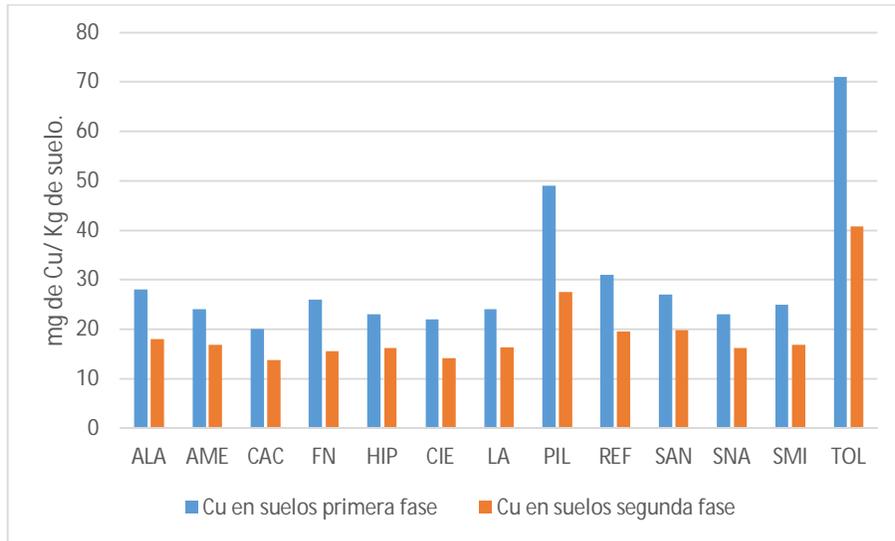


Figura 3.15 Comparación de presencia de Cobre en suelos de la primera y segunda fase del estudio.

Se puede apreciar que el cobre tiene una mayor presencia durante la primera etapa del estudio respecto de la segunda, no obstante para este metal durante la primera y segunda etapa de estudio se detecta la mayor concentración en el suelo del punto Tollocan y la menor concentración de este metal en Cacalomacán, por otra parte; durante la segunda etapa de estudio se observa la menor concentración en el punto determinado como San Antonio.

Finalmente las concentraciones de plomo encontradas en las muestras de suelo correspondientes a la primera y la segunda fase, que se muestran en la figura 3.16, se encontró una correlación de 0.909, y a pesar de que hubo un aumento en la concentración del metal en las muestras de la segunda fase respecto las de la primera, este incremento no es significativo, ya que se obtiene una p de 0.854. Además es importante tener en cuenta que en este caso se puede apreciar que las máximas concentraciones del metal se encuentran para la primera etapa del estudio en Reforma y para la segunda etapa en La Alameda, y las menores concentraciones del metal se encuentran tanto para la primera como para la segunda etapa en el punto localizado como Fidel Negrete.

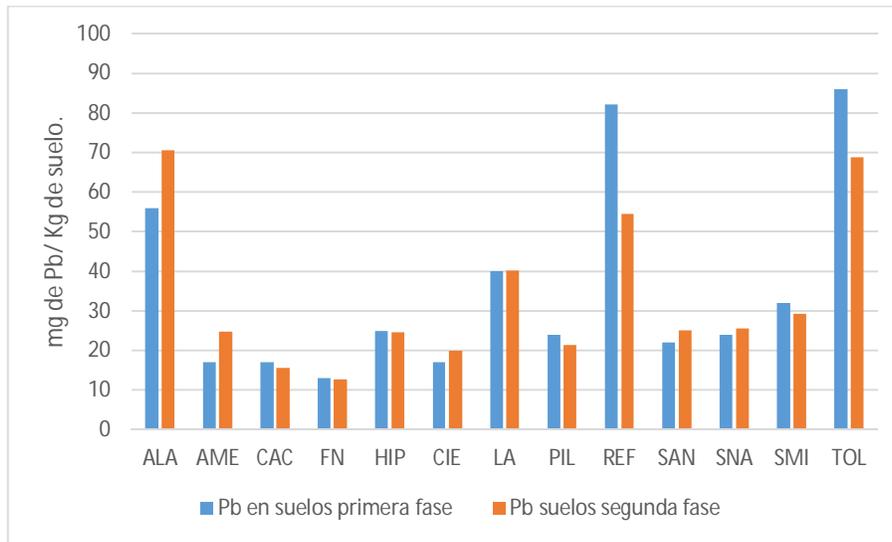


Figura 3.16: Comparación de presencia de Plomo en suelos de la primera y segunda fase del estudio.

### 3.7. Análisis de resultados.

Al llevar a cabo el análisis de los datos obtenidos entre metales y enzimas de estrés oxidativo, se aplicó la prueba de coeficiente de Pearson y una prueba de T-student con la finalidad de determinar las correlaciones entre las concentraciones de los metales entre ambas etapas del estudio, así como para relacionar las concentraciones de metales encontrados ambas etapas del estudio; como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Relación de Pearson (r) de las concentraciones de metales pesados en suelo de la primera fase de estudio.

	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Pb
Ti	1					
Mn	0.314	1				
Fe	0.909**	0.569*	1			
Cu	-0.390	-0,446	-0,307	1		
Zn	- 0.247	-0,143	-0,055	0.769**	1	
Pb	- 0.348	-0,415	-0,286	0.614*	0.803**	1

En este caso es posible apreciar que existen correlaciones entre las concentraciones de diferentes metales, resultado que se observa también durante la segunda etapa, de igual manera que la relación entre el titanio y el manganeso, sin embargo una observación muy importante que se puede realizar es la relación que aparece durante la segunda etapa del manganeso con el titanio, la cual no es observada durante la primer etapa. (Tabla 4)

Tabla 4. Relación de Pearson (r) de las concentraciones de metales pesados en suelo de la segunda fase de estudio.

	Ti	Mn	Fe	Cu	Zn	Pb
Ti	1					
Mn	0.850**	1				
Fe	0.951**	0.879*	1			
Cu	-0,304	-0,347	-0,328	1		
Zn	-0,049	-0,072	-0,027	0,800**	1	
Pb	-0,208	-0,283	-0,261	0,626*	0.739**	1

Para las dos etapas del estudio se observó un comportamiento similar en cuanto a las variaciones de peso en suelos y elutriados respectivamente, para los elutriados se observó pérdida de peso en todos los organismos, en el caso de los suelos hubo ganancia de peso solamente en los controles, y en todas las demás muestras se observó pérdida, lo cual permite suponer que existen elementos presentes en los suelos de manera general que provocan esta pérdida de peso.

Por otra parte al realizar las pruebas de correlación entre las concentraciones de metales encontradas en suelo y las actividades de estrés oxidativo detectadas en los organismos expuestos, se observa que en muy pocos casos existe la relación entre ambos parámetros, y que en algunos casos la dependencia de la actividad enzimática respecto de las concentraciones de los metales presentes en los suelos es negativa. (Ver Tabla 5) .

Tabla 5: Tabla de correlaciones entre metales y enzimas de estrés oxidativo de la primera y segunda fase de estudio.

Metal en suelo/Fase	Indicador de estrés oxidativo	rho	P <
<b>Fase 1</b>			
<b>F1TiS</b>	F1ECAT	- 0.610	0.027
<b>F1MnS</b>	s/c		
<b>F1FeS</b>	F1ECAT	- 0.555	0.049
<b>F1CuS</b>	F1SLIPO	<b>0.725</b>	<b>0.005</b>
<b>F1ZnS</b>	s/c	-	-
<b>F1PbS</b>	s/c	-	-
<b>Fase 2</b>			
<b>F2TiS</b>	F2SSOD	- 0.626	0.022
<b>F2MnS</b>	F2SCAT	- 0.813	0.001
<b>F2FeS</b>	s/c	-	-
<b>F2CuS</b>	s/c	-	-
<b>F2ZnS</b>	s/c	-	-
<b>F2PbS</b>	s/c	-	-

Se aprecia que para la evaluación del Titanio, existe una relación negativa al realizar la prueba de rho, esto implica que la concentración del metal impacta de tal manera la actividad de la catalasa, que al crecer la concentración de Titanio en suelos; la actividad de la catalasa se ve disminuida.

En la segunda etapa del estudio este mismo metal presenta nuevamente una relación negativa, pero ahora con la actividad de superóxido dismutasa, y en los organismos evaluados de la exposición de suelos. Esto implica que de una a otra

etapa el mismo metal tiene el mismo comportamiento de disminución de la actividad enzimática en dos pruebas diferentes es decir que entre mayor concentración existe de este metal la actividad enzimática se ve disminuida, pero en diferentes enzimas, por lo cual se puede decir que la biodisponibilidad entre las dos etapas es muy diferente, además de que un mismo metal puede constituir dos diferentes compuestos que favorezcan el comportamiento previamente descrito. Esto debido a factores como el pH, que varía de una etapa a otra como ya se ha observado, además de las diferentes estaciones del año en que se lleva el muestreo y las variaciones entre las concentraciones de los metales entre una etapa y otra, aunque cabe mencionar que en este caso, la concentración no es un factor que altere el comportamiento de las enzimas respecto del metal.

Al llevar a cabo el análisis entre manganeso y los marcadores de estrés oxidativo, se observó que para la primera etapa, este metal no presento relación alguna, por otro lado: durante la segunda etapa del estudio, existe una relación entre la presencia de manganeso y la actividad de catalasa registrada en los organismos expuestos directamente a suelos, y aunque es una relación relativamente buena, es negativa, esto implica que a mayor concentración de manganeso la actividad enzimática de la catalasa se ve disminuida, este efecto debe evaluarse en base a las condiciones de los diferentes suelos.

Las concentraciones de hierro durante la primera etapa del estudio tienen una relación significativa no tan buena como en el caso de metales como el titanio, sin embargo nuevamente se observa un comportamiento de relación negativa con la actividad de la catalasa, lo que implica que a mayor concentración de Hierro la actividad enzimática de la catalasa se ve disminuida. Y en el caso de la segunda etapa del estudio, las concentraciones de hierro no son correspondientes con ningún biomarcador de estrés oxidativo.

En cuanto a la relación existente entre el cobre y los marcadores de estrés oxidativo, se puede apreciar que durante la primera etapa de estudio existe una relación positiva con la lipoperoxidación, es decir que conforme aumenta la concentración de este metal, la peroxidación lipídica es mayor, y esto nos indica

que hay una relación real entre estos dos parámetros por lo menos para la primera etapa del estudio.

Lo que corresponde a la segunda etapa del estudio para las relaciones entre cobre y los marcadores de estrés oxidativo no hay relación alguna entre las concentraciones del metal y los marcadores de estrés oxidativo, este es un fenómeno interesante, dado que debido a sus propiedades redox, el cobre puede catalizar la formación de radicales libres muy dañinos tales como especies reactivas del oxígeno y peróxidos (Bacouch., et al, 1998; Richard , et al, 1998; Weck , et al, 1996), por lo cual se esperaría que por lo menos en esta etapa se observara una relación ya sea con la catalasa o la peroxidación lipídica, fenómeno que no es observado y esto permite pensar que efectivamente además de la época en que fueron tomadas las muestras, las condiciones del suelo influyen en gran medida sobre la disponibilidad de este metal.

Por otro lado lo que respecta a las determinaciones de zinc y plomo, no se encontró ninguna relación con los marcadores de estrés oxidativo en ninguna de las dos etapas de estudio, lo cual determina que el comportamiento de estos dos metales específicamente es el mismo en ambas etapas, por tal motivo es muy importante tener en cuenta que los metales interactúan con otro tipo de contaminantes que pueden alterar factores como la biodisponibilidad de los metales y su toxicidad potencial por lo cual es muy difícil evaluar de manera puntual las concentraciones del metal y su toxicidad relativa. (Marinussen et al. 1996; Weltje 1997), así mismo un pH básico puede ocasionar que la solubilidad de los metales sea baja (Janssen et al., 1997; Sauve et al., 2000; Van Leeuwen, 1999).

También es importante mencionar que el pH es solamente uno de los factores que alteran la disponibilidad de los metales en el suelo, dado que: como se ha mencionado estos interactúan con otros contaminantes que pueden ser propios del suelo o agregados por actividades humanas.

# CAPITULO 4

## Conclusiones

De manera general se observa que el estudio tiene diferentes variables que pueden ser la causa del daño por estrés oxidativo en los organismos y no precisamente los metales presentes en las muestras, para determinar cuál es el factor crucial que ocasiona el daño en los organismos se requiere de más elementos, por lo cual se tienen las siguientes conclusiones:

Durante la primera etapa del estudio se observa que el titanio tiene una relación tal que a mayor presencia de este metal, la lipoperoxidación va disminuyendo; esto permite concluir que es el titanio el elemento que de alguna forma está llevando a cabo un papel de protector hacia la célula de los radicales libres, impidiendo que la lipoperoxidación se eleve ocasionando daños a la célula.

Sin embargo es importante enmarcar que para el hierro existe una relación similar. Lo cual permite concluir que ambos elementos tienen un efecto protector sobre la célula de los organismos frente a la lipoperoxidación.

Debido a que el cobre es el único metal que conserva su relación con una enzima específica (catalasa) en ambas etapas del estudio, se concluye que el cobre en mayor proporción de los metales evaluados es el que más daño oxidativo ocasiona, pero también es necesario determinar las condiciones que permiten que este metal tenga el potencial toxicológico para ocasionar este daño.

Durante la segunda etapa del estudio se observó un incremento de pH, por lo cual se concluye que el pH es uno de los elementos clave que permiten al Hierro y Titanio un mayor efecto protector sobre los organismos.

Se observó una mayor relación entre metales y enzimas de estrés durante la segunda etapa del estudio, y tomando en cuenta que esta etapa fue una etapa en la cual las muestras fueron tomadas en una estación del año lluviosa y que la dirección del viento cambia durante la etapa de clima lluvioso y seco, se concluye que la etapa en que se tomen las muestras es un factor clave que pudiera tener efecto sobre una mayor o menor concentración de un metal determinado que sea causante de estrés.

En el caso de correlaciones entre los metales, permite tener una base más para afirmar que tal o cual metal es el que pudiera estar ocasionando el estrés oxidativo en los organismos de prueba, no obstante, es importante conocer de manera más certera si los resultados obtenidos al evaluar el estrés oxidativo provienen de la presencia de los metales evaluando la presencia de estos en los organismos de prueba y compararlos entre sí, para determinar si son los metales los causantes directos de la presencia de estrés oxidativo en los organismos o si existe algún otro factor que influya sobre este, como pueden ser la composición del suelo, la estación del año en que se toman las muestras: pues ya se ha visto durante dos etapas diferentes los vientos tienen direcciones distintas y esto pudiera ser un factor que influye en la distribución de estas mezclas, pues algunos elementos como la lluvia y la producción de vapores industriales al mezclarse generan el fenómeno de lluvia ácida, provocando que este altere el pH y la composición general de los suelos, así como la liberación o la reacción de metales con otros componentes orgánicos para generar complejos o de manera contraria para descomponer la materia orgánica y liberar los metales dejándolos más o menos disponibles según las características fisicoquímicas de cada metal.

También es importante llevar a cabo la evaluación de las características físicas del suelo de una manera más detallada, debiera analizarse cantidad de materia orgánica, conductividad e incluso si existe algún agente causante de estrés como pesticidas, herbicidas o solventes provenientes de actividades antropogénicas, e incluso que pudieran estar acumulados en los suelos por arrastres del viento o del agua. No obstante, también es importante evaluar la calidad del agua con las que en su caso sean regados los suelos, así como las características del agua que se encuentra dentro de la misma composición del suelo, y el agua de la lluvia: esto con la finalidad de descartar o comprobar que son o no estos agentes los causantes del estrés oxidativo en los organismos y definir si dentro de las mismas composiciones de los suelos existen elementos que pudieran servir como agentes que protejan al organismo o en su momento permitan la detoxificación de los metales en su forma elemental o como compuestos .

Se sugiere realizar una evaluación del tipo de compuestos que forma cada metal que se encuentran presentes en cada uno de los suelos y la solubilidad de estos, ya que por un lado de esta solubilidad depende la biodisponibilidad para los organismos de prueba y por otro lado se sabe que hay muchos compuestos que interactúan con los metales y que el resultado de estas interacciones ocasionan daño a los organismos, pero también se sabe que hay muchas condiciones que permiten que estos sean mucho mas o mucho menos solubles y por consecuencia sean más fáciles de absorber o no.

# ANEXOS

## **Anexo 1 Factores a considerar en el manejo de lombrices.**

Temperatura: La temperatura ideal para el buen desarrollo de la lombriz es de 25°C; en condiciones controladas, esta es fácil de mantener, sin embargo cuando se trabaja al aire libre se debe de tener un buen control, alcanzarla y mantenerla.

pH: Al igual que la temperatura el pH es sumamente importante; lo ideal es que se encuentre entre 6.5 y 7.5, un pH básico o ácido puede ocasionar serios problemas a la lombriz y llegar a ocasionar su muerte. El método más eficiente para medir el pH es utilizando la misma lombriz, ella indicará si el material listo para poder vivir en él.

Humedad: Como se mencionó, la lombriz necesita de mucha humedad, ésta es requerida para que pueda moverse dentro de los desechos y facilitar la fragmentación de los mismos, así como para su respiración. La humedad recomendada es del orden de 75 a 80%.

## **Anexo 2 Actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa.**

Se llevó a cabo mediante el método de Misra y Friedrich (1972) con algunas modificaciones. Se toman alícuotas del homogenado, obtenido de 500 µL del extracto de la planta en 4 mL de agua destilada sonicados durante 15 min y posteriormente añadir 2.5 mL de etanol/cloroformo 1:1 agitados y centrifugados a 3000 rpm durante 15 min.

En una celda de cuarzo agregar 150 µL del homogenado + 750 µL se solución reguladora de carbonatos (bicarbonato de sodio 50 mM, EDTA 0.1 mM ajustada a pH 10.2 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en polvo).

Se agrega inmediatamente 600 µL de sustrato (adrenalina 30 mM en ácido acético al 0.05%) registrando la lectura inicial, a los 30 segundos y a los 5 minutos con una longitud de onda de 480 nm. Resultados unidades de SOD.

### **Anexo 3 Determinación del grado de lipoperoxidación. Método de Buege y Aust**

Se toman 0.5 mL de sobrenadante y se completan con 1 mL de buffer Tris-HCl pH 7.4; (tomar 1 mL de sobrenadante) posteriormente se incuban a 37°C durante 30 minutos. Enseguida se agregan 2.0 mL del reactivo TCA-TBA (0.127 g de ácido tiobarbitúrico, 4.0 g de ácido tricloroacético y 0.165 mL – 165 µL- de HCl concentrado llevado a 25 mL con agua desionizada), se calientan las muestras a ebullición durante 45 minutos, se dejan enfriar colocando las muestras en baño de hielo durante 15 minutos y se remueve el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Se determina la absorbancia de la muestra a 535 nm contra un blanco de reactivo. (Blanco: 1 mL de agua destilada + 2 mL de reactivo TCA-TBA).

### **Anexo 4 Actividad enzimática de la Catalasa.**

La catalasa (CAT) de los peroxisomas fue calculada de acuerdo al método de Radi et al, (1991). Se tomaron 20 µl del homogenado obtenido de 500 µL de extracto de plantas y 4 mL de PBS sonicados durante 15 minutos y posteriormente centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos, + 1 mL de solución reguladora de aislamiento (0.3 M de sucrosa, 1.0 mM de HEPES, 5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH ajustado a 7.4). Posteriormente 0.2 mL - 200 µL – de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20mM, evaluando la absorbancia inmediatamente y a los 60 segundos a una longitud de onda de 240 nm en celdas de cuarzo.

La actividad de la enzima fue calculada con un coeficiente de extinción molar de  $00.43 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

NOTA: Se ajusta el pH antes de aforar.

Blanco: 20 µL de agua destilada + 1 mL de solución reguladora.

## **Anexo 5 Determinación de proteínas (Bradford, M. M. 1976)**

De la solución de extracción tomar 100  $\mu$ L (20  $\mu$ L) y se adicionan 5mL (1mL) del reactivo de Bradford, y se agita por 15 segundos en vórtex. Dejar reposar durante 5 minutos y medir la absorbancia del complejo azul a 595 nm. Las absorbancias se interpolan en una curva estándar preparada con diferentes concentraciones de una solución de albúmina bovina a una concentración de 1mg/ml para calcular la concentración de proteínas en las muestras.

Utilizar como blanco el reactivo de Bradford.

Reactivo de Bradford:

100 mg de azul de cromassie

100 mL de ácido fosfórico al 85%

50 mL de etanol al 95%, aforar con agua destilada a 1000 mL.

NOTA: Diluir el azul de cromassie con el etanol como primer paso, luego agregar una parte de agua para lograr la dilución completa del azul; agregar el ácido fosfórico y aforar con agua destilada. Colocar el reactivo de Bradford en recipientes cubiertos con papel aluminio para evitar que tenga contacto con la luz puesto que se degrada tornándose de color rosa.

# BIBLIOGRAFÍA

Alexander, M., (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology* 34, 4259–4265.

Alloway, B. J. (1995). The Mobilisation of Trace Elements in Soils. En: *Contaminated Soils. 3rd International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Edit. INRA, París, 525 pp.

Baccouch, S. (1998); Chaoui, A.; Ferjani, E. E.; *Plant Physiol. Biochem.* , 36, 689

Baerselman Rob., Peijnenburg Willie J.G.M. (1999). Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*, National Institute of Public Health and the Environment, Laboratory for Ecotoxicology, P.O. Box 1, 3720 BA Bilthoven.

Banat, K. M., Howari, F. y Al-Hamad, A. A. (2005) Heavy metals in urban soils of central Jordan: Should we worry about their environmental risks? *Environmental Research*, 97, pp. 258-273.

Bohlen, Edwards, C.A., P.J. (1992). Effects of toxic chemicals on earthworm. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 125, 23-99.

Bourg, A.C. (1995): Speciation of heavy metals in soils and groundwater and implications for their natural and provoked mobility. In "Heavy Metals", W. Salomons, U. Förstner & P. Mader, eds. Springer-Verlag, Berlin, 19-31.

Bourg, A.C.(1995). Speciation of Heavy metals in soils and groundwater and implications for their natural and provoked mobility. En: *Heavy Metals. Problems and Solutions*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. 414 pp.

Bradford M (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254.1976.

Buege J.A. y Aust S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzimology. (52: 302 -310).

Caballero S. B. (2009). Estudio de aeropartículas del Valle de Toluca mediante la recolección de agua de lluvia en las estaciones de monitoreo de la RAMAT por microscopía electrónica de barrido. Tesis de Licenciatura. Toluca México. Facultad de Química Universidad Autónoma del Estado de México, 180 pp.

Colbeck I. (2008). Environmental Chemistry of Aerosols. Blackwell Publishing. U.K. 255 pp.

Cuevas Diaz, MdC., Ferrera Cerrato R., Roldan Marin A., Rodriguez Vazquez R. (2008). Ensayo de toxicidad subcronica con la lombriz de tierra *Eisenia Andrei*: 275-283.

Das P, Samantaray S, Rout GR (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. Environ. Pollution (98:29-36).

Dorronsoro, C.; Aguilar, J; Galán, E. & Gómez Ariza, J.L.(1999): Los criterios y estándares para declarar un suelo como contaminado en Andalucía y la metodología y técnica de toma de muestras y análisis para su investigación. In "Investigación y Desarrollo Medioambiental en Andalucía". OTRI. Universidad de Sevilla, pp. 61-64.

Edwards, C. A. y P. J. Bohlen. (1996). Biology and Ecology of Earthworms. Tercera edicion. Chapman & Hall, Gran Bretana, 426 pp.

Elkahoui, S., Hernández, J. A., Abdelly, C., Ghrrir, R. y Limam, F. (2005). Effects of salt on lipoperoxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharantus roseus* suspension cells. *Plant Sci.* (168: 607-613).

Esterbauer, H., Schaur, R. J. y Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radicals Biology Medicine.* 11: 81-128.

Fernández Linares L., Rojas Avelizapa G. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados, Secretaria del medio ambiente y recursos naturales, México D.F, pp. 19-21.

Gaete, H., et al (2010); Evaluación de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo, *Eisenia foetida*; *Quim Nove*, vol 33, No 3.

Galán, E. (2000): The role of clay minerals in removing and immobilising heavy metals from contaminated soils. In "Proceedings of the 1st Latin American Clay Conference", vol. 1, C. Gomes, ed. Funchal, 351-361.

Giménez, R.; Della Penna, A.; Odello, E. (2004); *Agricultura técnica (Chile)*, 64, 347

Gobierno del Estado de México, Secretaria del Medio Ambiente (2007) , Aire Limpio Programa para el Valle de Toluca 2007-2011, Primera Edición, .

Gobierno del Estado de México, Secretaria del Medio Ambiente (2004), Inventario de Emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca,

Janssen, R.P.T., Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Van den Hoop, M.A.G.T., (1997). Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationship between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, pp 16.

Kaplan, D. L., Hartenstein R., Neuhauser E. F., & Maleckit M .R. (1980). Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry* (12: 347-352)

Kohen, P.; Nyska, A.(2002); *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22, 14.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N.,( 2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 39–47.

Lavelle, P. (1997). Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research.* (24: 93-132).

Marinussen, M. P. J. C., Van der Zee, S. E. A.T. M., De Haan, F. A. M. (1997) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36, 17–26.

Niess DH (1999) Microbial heavy -metal resistance. *Applied Microbiol. Biotech.* 51:730-750.

NMX-AA-25-1984, Protección al ambiente, contaminación del suelo- residuos solidos, determinación de pH –Método potenciométrico.

Novotny, V. (1995) Diffuse sources of pollution by toxic metals and impact on receiving waters. En: *Heavy Metals. Problems and Solutions.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 414 pp.

OECD (1984), Guide for testing of chemicals “Earthworm , acute toxicity test”.

P .Misra H., Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the eutoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *The Journal of Biological chemistry*, 274(10), 3170-3175.

Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V., Toro, L. (2004). Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series. *Environmental Pollution*, 132, pp. 189-201.

Plant, J., Smith, D., Smith, B. & Williams, L. (2001): Environmental geochemistry at the global scale. *Applied Geochemistry*, pp. 16, 1291- 1308

Plumlee, G: (1994). Environmental geology models of mineral deposits. *SEG Newsletter*, nº 16, 5-6,

Purvis, A. C. (1997). The role of adaptative enzymes in carbohydrate oxidation by stressed and senescing plant tissues. *HortSci*. 32: 1165-1168.

Räty, M.; Huhta, V.(2004), Earthworm communities in birch stands with different origin in Central Finland. *Pedobiologia*, v.48, p.283-291.

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: pp 208-215.

Richards K. D., Schott, E. J., Sharma, Y. K., Davis, K. R., Gardner, R. C. (1998); *Plant Physiol*, 116, 409.

Rios, Y. (2005). Importancia de las Lombrices en la Agricultura. En: Nieves, D., Vivas, J., Zambrano, C. (editores). *Sistemas integrados de producción con especies no rumiantes. VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos*. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Venezuela.

Romero Guzmán Elizabeth T, Reyes Gutiérrez Lázaro R (2008), Influencia de Emisiones naturales y antropogénicas en el material aerotransportado en el Valle de Toluca, *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares* 13-15,

Rulkens, W.H., Grotenhuis, J.T.C. & Tichy, R. (1995): Methods for cleaning contaminated soils and sediments. In "Heavy Metals", W. Salomons, U. Förstner & P. Mader, eds. Springer-Verlag, Berlin, 165-191.

Santamaría, R. S. (1996). Aspectos biotecnológicos del proceso de vermicomposteo y su aplicación agronómica. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana, México.

Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E., (2000). Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burden and organic matter. *Environmental Science and Technology* 34.

Secretaria del Medio Ambiente, Inventario de Emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca 2004,(2007), Direccion General de Prevencion y Control de la contaminacion atmosferica, 8-10.

Selinus, O., Alloway, B.J., Centeno, J.A., Finkelman, R.B., Fuge, R., Lindh, U. & Smedley, P. (2005). *Essentials of Medical Geology. Impacts of the natural environment on public health.* Elsevier Academic Press.

Shewfelt, R. L. y del Rosario, B. A. (2000). The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. *HortSci.* 35: 575-579

Shewfelt, R. L. y Purvis, A.C. (1995). Toward a comprehensive model for lipoperoxidation in plant tissue disorders. *HortSci.* 30: 213-218.

Snaich, K. M. (1992). Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. *Lipids.* 27: 209-218.

Spurgeon, D.J.; Hopkin, S.P.(1996), Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia foetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.35, p.86-95.

Subler, S., Baranski, C.M. Edwards, C.A. (1997). Earthworms additions increased short-term nitrogen availability and leaching in two grain-crop agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*. 29, 413-421.

Van Leeuwen, H.P., (1999). Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environmental Science & Technology*.

Vavilin, D.; Ducret, J.; Matorin, D.; Venediktov, P.; Rubin, A.; J. (1998). Photochem. *Photobiol.*, 42, 233.

Weckx, J. E. J.; Clijsters, H. M. M.(1996); *Physiol. Plant*, 96, 506

Weltje, L. (1997) Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere* 12, 2643–2660.

Winston, G.W. y Cederbaum, A.I. (1983). Oxyradical production by purified components of the liver microsomal mixed-funtion oxidase system 1: Oxidation of hidroxyl radical scavenging agents. *Journal of Biology Chemistry*. 258: 1508-1513.