



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE *Eisenia phoetida* SOBRE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ALGUNOS HAPs EN SUELO
DE LA REGIÓN DE SAN NICOLÁS, QUERÉTARO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO AGRÍCOLA

PRESENTA

JUAN MANUEL VERA MORALES

DIRIGIDA POR

M. EN C. BEATRIZ DEL ROCÍO VERDUZCO CUÉLLAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009

H73579

FS

363.7396

V474e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE *Eisenia phoetida* SOBRE DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE ALGUNOS HAPs EN SUELO
DE LA REGIÓN DE SAN NICOLÁS, QUERÉTARO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO AGRÍCOLA
PRESENTA**

JUAN MANUEL VERA MORALES

DIRIGIDA POR

M. EN C. BEATRIZ DEL ROCÍO VERDUZCO CUÉLLAR

SINODALES

**M. en C. BEATRIZ DEL ROCÍO VERDUZCO
CUÉLLAR**
DIRECTOR

Dr. JUAN RAMIRO PACHECO AGUILAR
SINODAL

M. en C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
SINODAL

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL RICO RODRÍGUEZ
SINODAL

DEDICATORIA

Este trabajo ha significado un enorme esfuerzo de paciencia y perseverancia, no solo de mi parte, sino de toda la gente que ha convivido conmigo y que de una u otra forma me han animado a continuar.

Gracias a Dios por la fortaleza, inteligencia y ánimo que me ha brindado en toda mi vida.

Agradezco a mi familia, que nunca me ha dejado de apoyar y motivar, que a lo largo de mi vida han estado al pendiente de mí, que tuvieron paciencia estos tres años y que sobre todo, nunca me han negado lo que es posible para ellos.

A mis amigos de siempre, Xavier, Iván, Checho, Raúl, Adrian R., Fernando V., Ale, Lizete, Marisol, Renán, Adrian, Edgar, Ricardo, Chino, Pablo, Yec, Daniela, Gallegos, Ram, José Luis, Rafa, David, Pedro, Alejandra, Caro, Thomas, David I., David G., Anael, Matteo, Re, Co, Leslie, Melanie y demás.

A todos mis compañeros y amigos de la facultad de Química, por nunca dejarme solo durante la carrera, Aideé, compa Alma, Ani, Arturo, Beto, Carlos, Checo, Chris, Dioni, Eva, Fidel, Franco, Gaby, Julio, Leo, Marco, Mate, Pancho, Pau, Pepe, Salo, Sandy, Vane, Vero, Yadi, etc.

Al área de Química Agrícola y a todos mis compañeros, especialmente a mi grupo original, Cecilia, Coco y Lucy, por hacer tan especial la carrera, y seguir haciendo especial mi vida. A Linka, Rodrigo, Jerry, Jerry 2, Agrocheco, Paty, Tere, Cris, Alma, Pau, Lupita y demás agrícolas.

A mis profesores, especialmente a Poncho, Fidel, Saúl, Rosario, Francisco, Jorge, Alejandro Camacho, Gustavo Cornejo, Chava Pérez, Chava Rodríguez, Candelario y Ramón Peniche.

A mis sinodales, Gustavo Pedraza, que me ha apoyado durante toda la carrera, Juan Ramiro, que me inspiró a realizar este trabajo sin saberlo, a Miguel Rico

que nunca me ha negado su apoyo. Agradecimiento especial a mi directora, la maestra Beatriz, por brindarme su tiempo y ayuda incuestionable para completar mi servicio social y tesis.

A las personas que fueron una razón para continuar la tesis, Teté, Pilar, Jary y Dianita, a la familia Ledesma por ofrecerme amistad y trabajo, a la gente de Derramadero de Juárez, Agua Amarga, Pinal de Amoles, Los Hernández, Los Herrera, Maravillas, Nuevo San Joaquín, Los Lirios, La Veracruz, El Doctor, Chavarrías, Loma de Guadalupe, San José Itho, San Juan Dehedo, Tenazda y San Pablo, por hacerme amar mi trabajo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 San Nicolás, Tequisquiapan	2
II.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	2
II.3 Función ambiental de los suelos	9
II.4 Biotransformación y biodegradación	13
II.5 Macrofauna del suelo y sus funciones	17
II.6 <i>Eisenia phoetida</i>	18
II.7 Biotransformación de contaminantes por anélidos	19
II.8 Cuantificación de los HAPs en el suelo	21
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	24
IV.1 General	24
IV.2 Específicos	24
V. METODOLOGÍA	25
VI. RESULTADOS	31
VII. DISCUSIÓN	38
VIII. CONCLUSIONES	42
IX. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Los 16 HAPs prioritarios de la EPA	4
2	Relación de del medio, mecanismos y factores de transporte	11
3	Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA	12
4	Condiciones de las unidades experimentales	28
5	Resultados de la mortandad de lombrices al final del experimento	31
6	Cambio en el peso de las lombrices después del experimento	31
7	Parámetros de la regresión lineal	32
8	Concentraciones de HAPs en las unidades experimentales	34
9	Porcentajes de reducción de naftaleno y fenantreno	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	HAPs de varios pesos moleculares y estructuras	3
2	Movilidad de los HAPs en el suelo y en el agua	6
3	Estructuras de los HAPs de interés en este estudio	8
4	Mecanismos típicos de biotransformación de HAPs	14
5	Punto de muestreo de suelo	26
6	Curva de calibración del naftaleno	32
7	Curva de calibración del fenantreno	33
8	Cambios en la concentración de naftaleno	35
9	Cambios en la concentración de fenantreno	35
10	Cambios en el porcentaje remanente de naftaleno	36
11	Cambios en el porcentaje remanente de fenantreno	37
12	Respuesta del equipo para el benzo (a) antraceno	37

RESUMEN

Este trabajo abordó el efecto de la lombriz roja (*Eisenia foetida*) sobre tres hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelo de la localidad de San Nicolás en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro. La contaminación del suelo con HAPs en esta zona productora de ladrillo se debe a la práctica de usar como combustible aceites gastados en hornos poco tecnificados así como al mal almacenamiento de estos. La gestión de los HAPs en el mundo se ha regulado debido a sus características de persistencia en los medios ambientales, bioacumulación y a los daños asociados a la salud de las personas expuestas. En este contexto es necesario buscar medios de remediación viables económica y ecológicamente. Se colocaron lombrices rojas en muestras artificialmente contaminadas y se analizaron los niveles de HAPs remanentes después de 30 días. Los HAPs se cuantificaron mediante HPLC. Los resultados indican que *E. foetida* es capaz de disminuir altos niveles de HAPs en un periodo breve de tiempo, presentando poca respuesta a niveles bajos de contaminación. Se propone este como un método viable de biorremediación de sitios contaminados con HAPs en un periodo breve de tiempo.

I. INTRODUCCIÓN

La gran cantidad de compuestos químicos que se han sintetizado en la actualidad han traído consigo una serie de nuevos problemas ambientales. Uno de ellos es la contaminación del suelo con productos tóxicos, la cual puede deberse al uso inadecuado de estos compuestos, a una contaminación accidental o a una exposición prolongada.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes muy difundidos en la atmosfera, son emitidos como resultado del proceso de combustión. Los HAPs se depositan en suelos y sedimentos, donde permanecen largo tiempo y son considerados una amenaza potencial a los organismos que entran en contacto con el suelo contaminado.

Un ejemplo importante de contaminación en suelo por HAPs es la zona ladrillera de San Nicolás, en el estado de Querétaro, al ser quemados los aceites usados en los hornos, los HAPs son emitidos al aire y depositados en el suelo. Dadas estas condiciones los residuos provenientes de la combustión de aceites están acumulándose en el suelo y debido que los hornos en esta zona se encuentran en los patios de las casas, puede conllevar la exposición a HAPs de la población que habita en este sitio con sus consecuentes efectos adversos a la salud.

Debido a lo anterior es necesario buscar alternativas para disminuir los niveles de HAPs. Los procesos de biorremediación han sido estudiados desde hace tiempo y actualmente se conocen bien algunos mecanismos comunes en los organismos capaces de biotransformar contaminantes. Sin embargo, aún faltan muchos procesos por estudiar, y comprobar su eficacia en el medio ambiente.

Uno de estos organismos es la lombriz roja californiana (*Eisenia phoetida*), la cual es usada ampliamente como productora de humus ya que se alimenta de materia orgánica, de la misma manera la lombriz roja es capaz de degradar algunos compuestos orgánicos artificiales como los HAPs cuando las condiciones son propicias.

II. ANTECEDENTES

II.1 San Nicolás, Tequisquiapan

La población de San Nicolás, municipio de Tequisquiapan, Qro., cuenta con alrededor de 4,000 habitantes, de los cuales una gran parte se dedica a la fabricación del ladrillo. La importancia económica de dicha actividad puede estimarse bajo el conocimiento de que en este sitio se ubican aproximadamente 300 ladrilleras, las cuales operan sistemáticamente, sin algún tipo de control ambiental de las emisiones derivadas de la combustión. La producción artesanal de los ladrillos consiste en preparar una mezcla de arcilla (suelo común en San Nicolás) y agua, dejándolos secar por uno o dos días, para finalmente ser cocidos en un horno artesanal usando como combustibles aceites gastados. Por otro lado, la contaminación del suelo con productos derivados de la combustión de los hornos en la región ladrillera de San Nicolás puede deberse tanto a las características del horno como a las de los combustibles utilizados, lo cual propicia una combustión ineficiente, contribuyendo tanto a que el combustible no sea aprovechado adecuadamente como a la emisión de contaminantes como son los HAPs (Barrán, datos por publicar).

II.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los HAPs son un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman normalmente durante la combustión incompleta del carbón, petróleo y gasolina, basuras y otras sustancias orgánicas como tabaco y carne preparada en la parrilla. Los HAPs se encuentran generalmente como una mezcla de dos o más de estos compuestos, como en el hollín (ATSDR, 1995).

Por definición, los HAPs consisten solamente de carbono e hidrógeno y su estructura está formada por dos o más anillos aromáticos fusionados en arreglos lineales, angulares o de racimo. La Figura 1 muestra las estructuras de algunos HAPs (Yu, 2001).

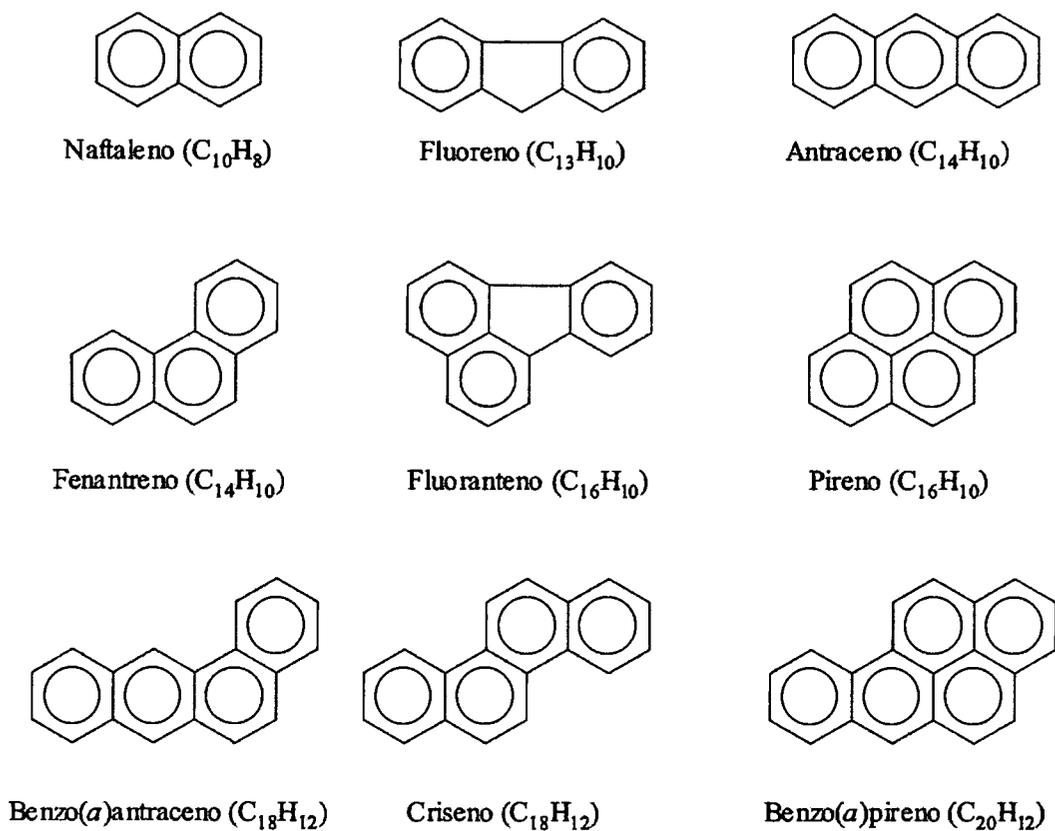


Figura 1. HAPs de varios pesos moleculares y estructuras.

Diversos estudios han mostrado que no todos los HAPs son de alto riesgo para la salud, y las regulaciones acerca de los niveles permitidos en el medio ambiente varían dependiendo el país. Sin embargo, la EPA se ha concentrado en 16 HAPs debido a su toxicidad, a su potencial carcinógeno y a su frecuencia de exposición, siendo estos los que a menudo son regulados internacionalmente (Cuadro 1) (Yu, 2001).

Cuadro 1. Los 16 HAPs prioritarios de la EPA.

Nombre	Abreviación	Clasificación carcinogénica
Acenaftileno	Ace	D ^a
Acenafteno	---	D
Antraceno	Ant	D
Benzo(a)antraceno	BaA	B2 ^a
Benzo(a)pireno	BaP	B2
Benzo(b)fluoranteno	BbF	B2
Benzo(k)fluoranteno	BbK	B2
Benzo(g,h,i)perileno	Bpe	B2
Criseno	Chr	B2
Dibenzo(a,h)antraceno	DbA	D
Fluoranteno	Fth	B2
Fluoreno	Fl	D
Idenol(1,2,3-c,d)pireno	IP	B2
Naftaleno	Na	D
Fenantreno	Phe	D
Pireno	Pyr	D

^a D: datos insuficiente para asegurar su potencial carcinógeno; B2: Carcinógenos humanos probables.

II.2.1 Fuentes generadoras de HAPs

La principal fuente generadora de HAPs es la combustión incompleta de materia orgánica. Las fuentes antropogénicas de HAPs son principalmente automóviles, calentadores, producción de aluminio, plantas eléctricas, además de otras menores como alquitrán, petróleo crudo, creosota y alquitrán para techado, aunque unos pocos se usan en medicamentos o para fabricar tinturas y pesticidas. Estos HAPs puros generalmente son sólidos incoloros, blancos o amarillo-verde pálido. No todos los HAPs son el resultado de actividad humana, las erupciones volcánicas e incendios forestales producen naturalmente HAPs, además, hay evidencia de que los HAPs también pueden ser formados por biosíntesis de microbios y plantas (ATSDR, 1995; Yu, 2001).

Los HAPs se encuentran en diversos sitios, incluidas zonas industriales, madereras y de extracción de gases, los suelos contaminados con HAPs merecen atención debido a su resistencia a métodos de biodegradación y el riesgo ecológico que representan (Yu, 2001).

II.2.2 Dispersión y persistencia

Los HAPs, sea cual sea su origen, tienen destinos similares en el ambiente, se dispersan en el aire, se esparcen en el suelo y se incorporan en fase líquida en agua (Figura 2) (Hoffman, 2002).

Los HAPs pueden encontrarse en el aire adheridos a partículas de polvo, ciertas partículas de HAPs pueden evaporarse al aire fácilmente del suelo o de aguas superficiales. Los HAPs pasan al agua a través de desechos de plantas industriales y de plantas de tratamiento de aguas residuales, la mayoría de los HAPs no se disuelven fácilmente en agua. Ciertos microorganismos pueden degradar HAPs en el suelo o en el agua después de un periodo de semanas a meses. En el suelo, es probable que los HAPs se adhieran firmemente a partículas; ciertos HAPs se movilizan a través del suelo y contaminan el agua subterránea, la cantidad de HAPs en plantas y en animales puede ser mucho

mayor que la cantidad en el suelo o en el agua donde viven estos organismos (ATSDR, 1995).

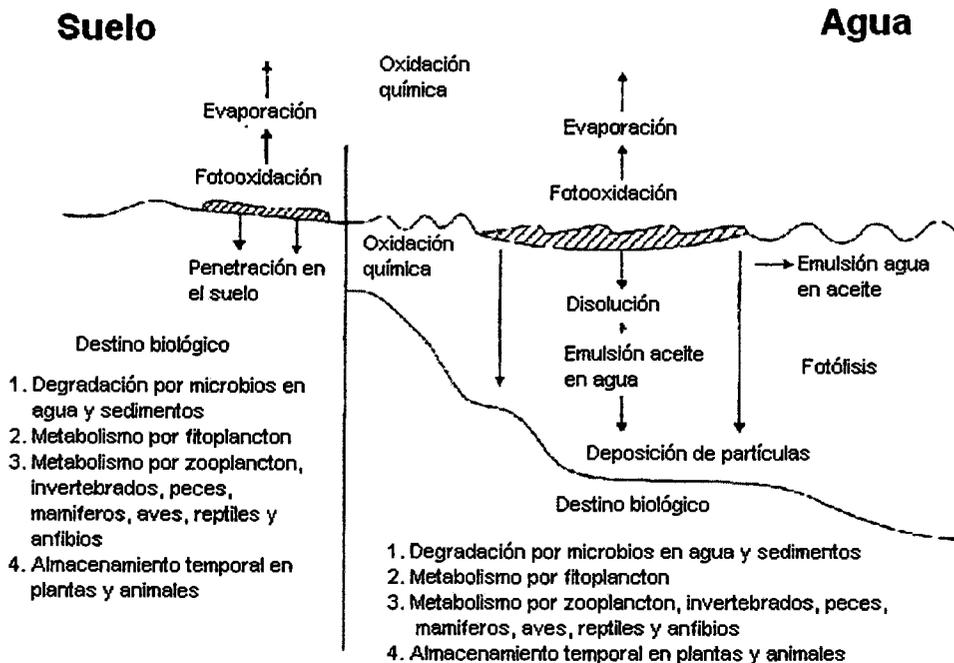


Figura 2. Movilidad de los HAPs en el suelo y en el agua.

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el medio ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP. Son de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos, y la volatilidad, que aumenta en los HAPs de menor peso molecular. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies de las partículas del suelo, lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica (Canals, 2005).

Los HAPs son ingeridos por una variedad de vertebrados e invertebrados además de los microorganismos. Mamíferos, aves, peces y muchos invertebrados (crustáceos, equinodermos, insectos) metabolizan y excretan algunos de los hidrocarburos ingeridos durante su alimentación, aseo y respiración. Normalmente la acumulación de HAPs es inversamente

proporcional a la habilidad del organismo de metabolizarlo. Las plantas terrestres son poco acumuladoras de HAPs, tal vez debido a que los HAPs son fuertemente adsorbidos por la materia orgánica del suelo. La mayor parte de HAPs detectados en plantas parecen venir de la atmósfera y se adhieren o adsorben en el tejido de la planta, la cual, al morir, incorpora los HAPs al suelo. Los HAPs pueden persistir en zonas frías o templadas por 20 o 40 años, la persistencia de HAPs aumenta al incrementarse los anillos de benceno que los forman (Hoffman, 2002).

II.2.3 Consecuencias de la exposición a HAPs

Algunos HAPs presentan riesgo carcinógeno a humanos. Los HAPs carcinógenos se encuentran en todas las superficies sólidas. Las áreas urbanas tienen concentraciones más altas que los suelos agrícolas y boscosos. Las concentraciones típicas de HAPs en el medio ambiente se encuentran en el rango de 5 a 100 µg/kg; en suelo agrícola va de 10 a 100 µg/kg y en suelo urbano llega a ser de 600 a 3000 µg/kg (Jacob, 1996; Yu, 2001).

El mecanismo de toxicidad es reportado como de interferencia con la función de la membrana celular y el sistema de enzimas asociadas con la membrana. Aunque los HAPs sin metabolizar pueden tener efectos tóxicos, un problema mayor en animales es la habilidad de algunos metabolitos de los HAPs, como epóxidos y dihidrodioles, para ligarse a proteínas celulares y ADN. Esto resulta en disfunciones químicas y daño celular que lleva a mutaciones, desarrollo de malformaciones, tumores y cáncer. La adición de grupos alquilo a los HAPs frecuentemente produce o aumenta la carcinogenicidad. La toxicidad de los HAPs puede ser incrementada por exposición a la luz ultravioleta (Hoffman, 2002).

Los HAPs entran al cuerpo humano rápidamente por diversas rutas: inhalación, ingestión y contacto dermal. La tasa de absorción se incrementa si los HAPs están presentes en mezclas aceitosas. Los HAPs son transportados a todos los

tejidos del cuerpo que contengan grasa y tienden a ser almacenados en riñones e hígado (Yu, 2001).

En muestras tomadas de la población de San Nicolás en Querétaro se encontraron altos niveles de Naftaleno (promedio de 185.7mg/kg), una alta incidencia de fenantreno (14 de 46 muestras) y varias muestras que contenían Benzo (a) antraceno en cantidades por encima de lo que marca la Norma Oficial Mexicana (10 mg/kg), cabe mencionar que los dos primeros (Nap y Phe) aún no están normados en nuestro país (Barrán, datos pos publicar).

II.2.4 Naftaleno, Fenantreno y Benzo (a) antraceno

Los HAPs Naftaleno, Fenantreno y Benzo (a) antraceno son HAPs de 2, 3 y 4 anillos (Figura 3), se liberan al aire como productos de la combustión incompleta y se asocian con partículas sólidas en aire, agua y tierra, son fuertemente adsorbidos en el suelo y permanecen en la capa superior del suelo debido a su mínima solubilidad en agua. La biodegradación natural de estos compuestos es muy lenta, en promedio permanecen 2 años antes de biodegradarse. Estos compuestos puros no tienen ninguna utilidad en procesos industriales, de transformación o de producción, a excepción del naftaleno, usado en la producción de plásticos y como insecticida para ropa, y son sintetizados o aislados únicamente con fines de investigación (Hudgings, 2000; Srogi, 2007).

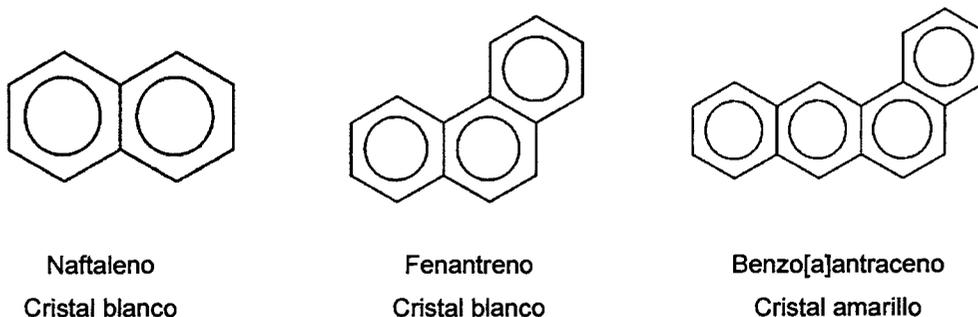


Figura 3. Estructuras de los HAPs de interés en este estudio.

II.3 Función ambiental de los suelos

Los suelos funcionan como “filtros” químicos y biológicos que reducen el impacto ambiental de químicos introducidos a la biosfera intencional o accidentalmente. Por tanto los suelos forman la primera línea de defensa contra la introducción de estos componentes en el agua subterránea y la biosfera. Los suelos restringen la movilidad de los químicos de dos maneras: por sorción y por degradación química o biológica. En consecuencia, la base para predecir el comportamiento de contaminantes en el suelo, y para evaluar el riesgo que un químico puede causar en el agua del subsuelo, viene de un entendimiento de la naturaleza y extensión de estos procesos de sorción y degradación (Canals, 2005).

La adsorción y la desorción de moléculas orgánicas en suelos son controladas por las propiedades químicas de las moléculas y las propiedades de superficie del suelo en particular. Las propiedades importantes del adsorbato orgánico son: la identidad de grupos funcionales en la molécula, la acidez o basicidad de los grupos funcionales, el tamaño y forma de la molécula, la polaridad y la carga y su polarizabilidad. Estas propiedades determinan la solubilidad en agua de la molécula y, por tanto, la tendencia de las moléculas a adsorberse en la superficie del suelo (McBride, 1994).

La existencia de tres fases en el suelo (sólida, líquida y gaseosa), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimiento ambiental muy complejo. La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por estas características, pudiéndose encontrar adsorbidos sobre el particulado o materia orgánica (mayoritariamente aquellos compuestos de elevada hidrofobicidad como los HAPs y los aceites minerales), en disolución, o en fase de vapor. Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la superficie pueden sufrir evaporación o fotooxidación. De este modo en el conjunto del suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir biodegradación. El proceso de transformación más

importante es la biodegradación. Además, los productos de oxidación parcial procedentes de los compuestos orgánicos (como los HAPs y otros hidrocarburos) pueden ser movilizados en la fase acuosa (son más polares), y ser transportados hasta otros suelos o ambientes acuosos (Canals, 2005).

Debido a estos factores, normalmente los contenidos totales no predicen la fracción biodisponible de contaminantes orgánicos en el suelo, pues esto depende de diversos factores químicos, físicos y biológicos (Cram y col., 2006).

II.3.1 Transporte ambiental de los compuestos contaminantes

Un compuesto contaminante se transporta en el ambiente a través de gases, líquidos y partículas sólidas a través de interfaces entre aire, agua, sedimentos, suelo, animales y plantas. Cuando una sustancia es emitida al ambiente, pueden ocurrir movimientos, transformaciones químicas, físicas y biológicas y acumulaciones en el medio. Los mecanismos de transporte y el destino de los contaminantes pueden resumirse en 4 categorías: emisión, la liberación o descarga del contaminante; advección o convección, la migración normal y el movimiento a través del medio; dispersión, la distribución del contaminante en otra fase; y atenuación, la degradación o adsorción del contaminante. Para cada contaminante puede haber varios mecanismos de transporte, las propiedades fisicoquímicas, tales como solubilidad y densidad, influyen en el destino y transporte del compuesto a través de las interfases y los medios ambientales.

La solubilidad en agua es importante para entender la habilidad del contaminante para migrar en un medio ambiental. Condiciones como la temperatura y el pH pueden influir en la solubilidad. Los agentes químicos muy solubles en agua se adsorben con baja afinidad a los suelos. La presión vapor es otro de los factores que afectan el transporte del contaminante. En general, los agentes químicos con presiones vapor relativamente bajas y una alta afinidad por suelos o agua tienden menos a llegar al aire. La constante de la Ley de Henry toma en cuenta la solubilidad, el peso molecular y la presión de vapor para indicar el grado de volatilidad de un químico en una solución. El coeficiente

de partición de carbono orgánico (K_{oc}), o coeficiente de adsorción, es una medida de la tendencia de un compuesto orgánico para ser adsorbido por suelos o sedimentos, el K_{oc} es específico de cada químico y es independiente de las propiedades del suelo, un K_{oc} alto indica que el químico orgánico se fija con firmeza a la materia orgánica del suelo, por lo que poca cantidad del compuesto se mueve a las aguas superficiales o a los acuíferos. El coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) predice el potencial del agente químico para acumularse en la grasa animal, los organismos tienden a acumular compuestos con valores altos de K_{ow} en las porciones lipídicas de sus tejidos. El factor de bioconcentración (FBC) es una medida de la distribución química al equilibrio entre un medio biológico y un medio externo, en general, un alto valor de K_{ow} indica un alto valor de FBC. En el Cuadro 2 se indica la relación entre el medio, los mecanismos de transporte y los factores que afectan el transporte. En el Cuadro 3 se presentan los valores de las propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA (ATSDR, 1995).

Cuadro 2. Relación de del medio, mecanismos y factores de transporte.

MEDIO	MECANISMO DE TRANSPORTE	FACTORES QUE AFECTAN EL TRANSPORTE
Suelo	Escurremientos (erosión de suelos)	Solubilidad en agua K_{oc}
	Filtración (lixiviación)	Solubilidad en agua K_{oc}
	Volatilidad	Presión de vapor Constante de la Ley de Henry
	Captación biológica	K_{ow} FBC

Cuadro 3. Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA.

Compuesto	PM ^a	Densidad (mg/ml)	Punto Fusión (°C)	Punto Ebull. (°C)	Solubilidad agua (mg l ⁻¹) ^b	log K _{ow} ^c	log K _{oc} ^d	P. Vapor (mm Hg a 25°C)	Cta. de Ley de Henry
Naftaleno	128	ND ^e	80	218	30,0	3,37	3,1	ND	ND
Acenaftileno	152	ND	92	265	16,1	4,07	ND	2.9x10 ⁻²	1.45x10 ⁻³
Acenafteno	154	1.225	96	279	3,47	4,33	3,8	4.47x10 ⁻³	7.91x10 ⁻⁵
Fluoreno	166	ND	116	298	1,8	4,18	3,9	3.2x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴
Fenantreno	178	0.98	101	340	1,29	4,46	4,1	6.8x10 ⁻⁴	2.56x10 ⁻⁵
Antraceno	178	ND	218	342	0,073	4,45	4,3	1.7x10 ⁻⁵	1.77x10 ⁻⁵
Fluoranteno	202	ND	110	375	0,260	5,33	4,3	5x10 ⁻⁶	6.5x10 ⁻⁶
Pireno	202	1.271	150	404	0,135	5,32	4,8	2.5x10 ⁻⁶	1.14x10 ⁻⁵
Benzo(a)antraceno	228	1.274	159	435	0,014	5,61	4,8	2.2x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶
Criseno	228	ND	256	448	0,0006	5,86	4,9	6.3x10 ⁻⁷	1.05x10 ⁻⁵
Benzo(b)fluoranteno	252	ND	165	ND	0,0012	6,57	6,2	5x10 ⁻⁷	1.22x10 ⁻⁵
Benzo(k)fluoranteno	252	ND	217	480	0,00055	6,84	5,6	9.59x10 ⁻¹¹	3.87x10 ⁻⁵
Benzo(a)pireno	252	1.351	179	495	0,0038	6,04	5,3	5.6x10 ⁻⁹	4.9x10 ⁻⁷
Dibenzo(a,h)antraceno	278	1.282	267	524	0,0005	6,75	6,3	1x10 ⁻¹⁰	7.3x10 ⁻⁸
Benzo(g,h,i)perileno	276	ND	278	ND	0,00026	7,23	ND	1.03x10 ⁻¹⁰	1.44x10 ⁻⁷
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	ND	162	ND	0,062	7,66	6,2	ND	6.95x10 ⁻⁸

^a PM: Peso molecular; ^b 20°C; ^c K_{ow}: equivale a la proporción del número de moléculas que existirían en la fase octanol respecto a la fase agua si utilizáramos una mezcla octanol:agua 1:1 como solvente; ^d K_{oc} es la proporción de moléculas de HAP que se encontrarían en la materia orgánica del suelo respecto a las que encontraríamos en la fase agua, en un suelo saturado de agua; ^eND: No determinado.

II.4 Biotransformación y biodegradación

II.4.1 La biotransformación

Cuando un compuesto químico entra en un organismo se le conoce como compuesto xenobiótico, diversas reacciones ocurren dentro del cuerpo, resultando en cambios estructurales del compuesto. Este proceso metabólico de conversión es conocido como biotransformación y puede ocurrir en cualquier tejido u órgano. Los procesos de biotransformación ocurren en 2 fases, llamadas I y II. La mayor parte de las reacciones en la fase I son oxidaciones, reducciones e hidrólisis. Entre las oxidaciones más representativas están la hidroxilación, dealquilación, deaminación y formación de sulfóxido. Ejemplos de reducción incluyen azo reducción y adición de hidrógeno, mientras que en las hidrólisis la separación de ésteres y amidas es común. Una de las más importantes características de las reacciones de la fase I es que el compuesto tóxico puede adquirir un grupo funcional, como OH, NH₂, COOH o SH, para formar un producto llamada metabolito primario. Las reacciones de la fase II, por otro lado, son reacciones de conjugación o síntesis. Aquí un compuesto tóxico se puede combinar directamente con una sustancia endógena, o puede ser convertida en un metabolito primario en la fase I seguido de una conjugación. Las sustancias endógenas asociadas con las reacciones en la fase II incluyen glicina, cisteína, GSH, ácido glucurónico, sulfatos y otras sustancias hidrosolubles. Muchos compuestos xenobioticos experimentan secuencialmente las reacciones de las fases I y II, mientras que otras participan sólo de una. Algunos mecanismos típicos de biotransformación de HAPs en algunos organismos se muestran en la Figura 4 (Yu, 2001).

II.4.2 Consecuencias de la biotransformación

La remoción de compuestos xenobioticos ocurre principalmente por mecanismos de biotransformación y excreción. Algunos compuestos xenobioticos, especialmente los lipofílicos, son fácilmente reabsorbidos (Yu, 2001).

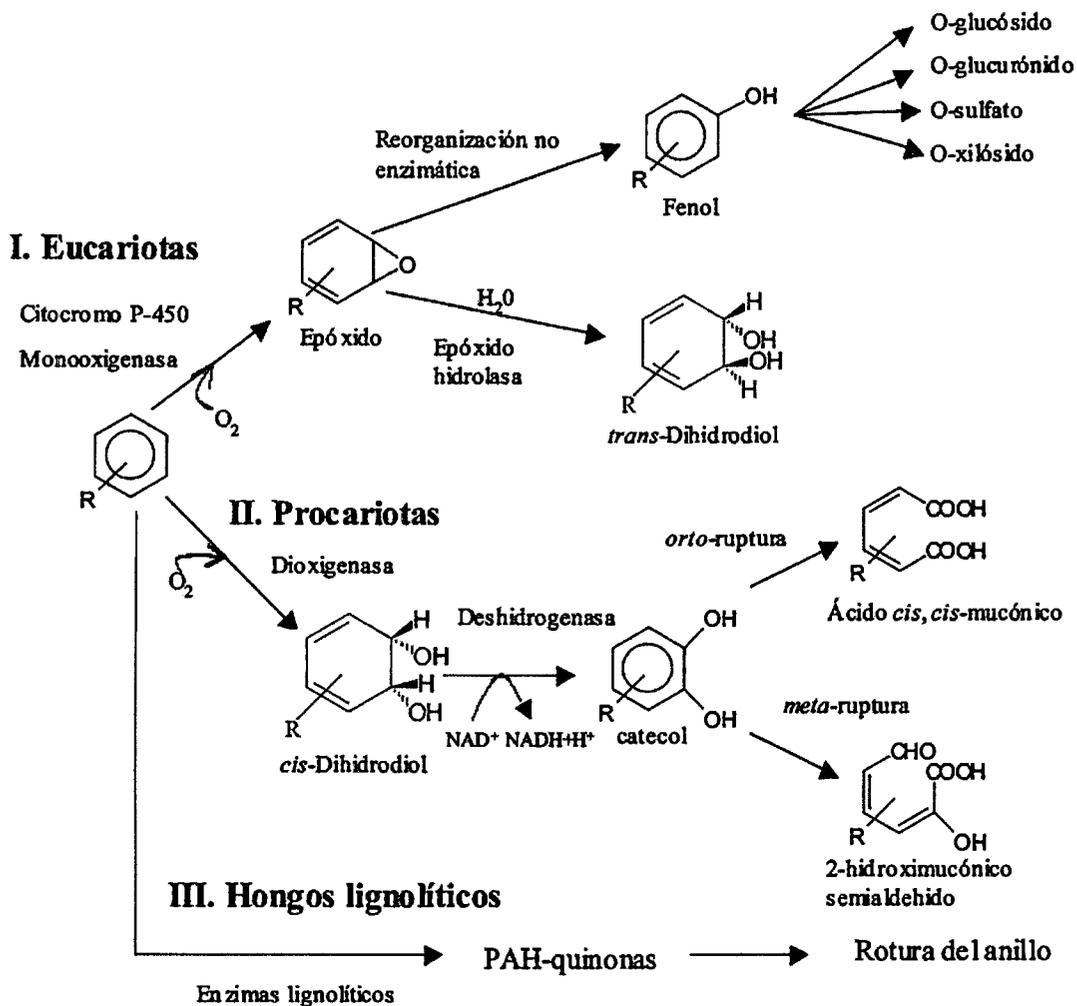


Figura 4. Mecanismos típicos de biotransformación de HAPs.

A menos que los químicos sean metabolizados a metabolitos más polares que son eventualmente excretados, permanecerán en el cuerpo, principalmente en tejidos grasos, por un largo periodo. Los productos biotransformados son normalmente, pero no siempre, más polares que los componentes originales, y por tanto, más fácilmente excretados. Sin embargo, otros ejemplos de mecanismos de biotransformación existentes transforman los compuestos xenobioticos en especies electrofílicas reactivas. Estas especies químicas reactivas necesitan ser metabolizadas; de otra manera pueden interactuar con un sitio nucleofílico en un constituyente de alguna célula, causando daño celular.

Muchos químicos presentes en el ambiente pueden estimular o inhibir enzimas que influyen en la biotransformación. Algunos de los agentes que pueden estimular las enzimas incluyen insecticidas halogenados, herbicidas, HAPs, nicotina y otros alcaloides. Algunos de los agentes inhibitorios incluyen CO, O₃, CCl₄ e insecticidas organofosforados (Yu, 2001).

II.4.3 Factores limitantes en la biorremediación del suelo.

La biodegradabilidad de contaminantes presentes en un suelo depende de diversos factores como son: la presencia de una población degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles. Todos los organismos tienen un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos la biodegradación se ve disminuida, siendo los rangos óptimos para la biodegradación un pH entre 6 y 8 y temperaturas de 20 a 30°C. La variación del pH del suelo afecta a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes. Se ha conseguido duplicar la biodegradación bacteriana de un suelo contaminado con gasolina incrementando el pH de 4,5 a 7,4. Sin embargo, con poblaciones microbianas adaptadas también se ha descrito biodegradación de HAPs en suelos extremadamente ácidos a pH 2. La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los organismos y la tasa de biodegradación. La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20 a 30°C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados. No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos, 5°C en suelos árticos y hasta 60°C por una cepa

termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Canals, 2005).

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua. Se ha descrito un rango de humedad óptimo del 30 al 90% de la capacidad de campo para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo. De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los HAPs que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad. La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los organismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes (Yu, 2001).

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población del suelo, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo. La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. Se ha descrito una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación (Canals, 2005).

II.5 Macrofauna del suelo y sus funciones

La macrofauna del suelo afecta la acción de los microorganismos, la estructura del suelo y la descomposición de la materia orgánica en el suelo. La macrofauna muele y macera la materia orgánica, aumentando la superficie de contacto de las partículas con el medio. Este aumento de superficie incrementa su nivel de descomposición pues cuanto mayor superficie, mayor la disponibilidad de materia orgánica para el ataque de los microbios. Cuando la macrofauna fabrica galerías y túneles, mejora la filtración del agua y ventilación del suelo, gran parte del suelo removido va a parar a la superficie, de esta manera se reutilizan los nutrientes, como el potasio, que se lixivian de la superficie (Hoffman, 2002).

II.5.1 Acción de las lombrices en el suelo

Las lombrices pertenecen a la clase anélida del orden oligochaeta que comprende organismos elongados compuestos de segmentos anulares. Son hermafroditas, la madurez sexual se hace presente por la aparición del clitelio, que es un anillo blanco que conforma los órganos reproductivos del animal. Existen aproximadamente 8000 especies de lombrices de tierra, algunas de las más importantes pertenecen a la familia Lumbricidae. En los suelos de prados y

bosques del hemisferio norte pueden existir más de 1000 lombrices por metro cuadrado en los 15 cm superiores del suelo. Las lombrices de tierra son menos numerosas en los trópicos que en el hemisferio norte. Las lombrices de tierra sólo actúan en presencia de agua. Ésta les permite segregar una mucosidad que facilita su movimiento por el suelo. Por otra parte, necesitan un cuerpo turgente para desplazarse y cavar. Su piel debe estar húmeda para la respiración, por lo que en consecuencia, su población es más numerosa en tiempo de lluvias. Por regla general, cuando aumenta el carbono orgánico en el suelo, las poblaciones de lombrices de tierra también lo hacen. En consecuencia, la tierra no destinada al cultivo, con gran cantidad de residuos de cosecha, tiene un contenido de lombrices mucho mayor. Los suelos de texturas más finas, que suelen contener más materia orgánica y mayor capacidad de retención de agua, también tienden a albergar un mayor número de lombrices. Las lombrices de tierra desempeñan una labor directa en la descomposición de la hojarasca. Así, fragmentan las hojas en descomposición y las mezclan con la tierra, al cavar galerías. También segregan una mucosidad rica en materia orgánica. La materia inorgánica que pasa por los intestinos de la lombriz es, en cierta medida, hidroestable. Las lombrices contienen en sus intestinos celulasa y quitinasa, que facilitan la degradación de la celulosa y los polímeros de la quitina, las cuales siguen actuando aún al ser excretadas. Las lombrices también facilitan el movimiento de microorganismos al transportarlos dentro de sus cuerpos o adheridos a su piel (Hoffman 2002).

II.6 *Eisenia phoetida*

La lombriz de la especie *Eisenia phoetida* ha mostrado excelente comportamiento en todos los aspectos. En los cultivos es frecuente encontrar lombrices nativas, las cuales llegan por atracción al medio, que es favorable ha algunas especies. La presencia de estas no tiene incidencias ni afecta a la lombriz roja californiana, ya que sus tasas de producción son muy bajas. La explotación de la lombriz adquiere relevancia en los últimos años, como medio de descontaminación ambiental y de mejoramiento de suelos. La incorporación directa de lombrices en el suelo y el mejoramiento de las condiciones del mismo

con estiércol de animal incrementa la población existente y atrae nuevas especies. Todo suelo rico en lombrices tiene posibilidades de mejoramiento. *E. phoetida* es una lombriz que a los 3 o 4 meses, alcanza una longitud de 6 a 8 cm y un peso aproximado de 0.8 g. Cuando está irritada secreta un mucus amarillento mal oliente a través de los poros de la epidermis, por ello su denominación. Habita en medios ricos en materia orgánica como estiércol, composta, etc. La lombriz roja puede aclimatarse a los diferentes pisos térmicos, pero vive en óptimas condiciones entre 18 y 25°C. Vive en densidades relativamente altas, es de manejo sencillo con riesgos bajos. La longevidad es de 16 años, superior a la lombriz de tierra que es de 3 a 4 años aproximadamente; la proliferación es alta, una vez llegada su madurez sexual puede aparearse cada 10 días y desarrollar una capsula con un promedio de 20 lombrices en cada una. Se adapta fácilmente al consumo de materia orgánica de origen vegetal y animal. La lombriz de tierra ingiere todo tipo de residuos orgánicos en descomposición, encontrando en ellos principalmente altas concentraciones de microorganismos que son de gran valor nutritivo. No tiene dientes y por tanto requiere de humedad para succionar la materia orgánica, que debe ser fraccionada suficientemente para acelerar el proceso de conversión de humus. Su aparato digestivo, por tener glándulas calcáreas que segregan carbonato cálcico, le permite neutralizar la acidez de los alimentos que recibe. Esta característica hace que el humus o lombricomposta final esté cercano a la neutralidad y sea de gran interés para la corrección de los suelos ácidos y básicos. Sus movimientos dependen de un sistema muscular muy desarrollado. Se desplaza a través de sus anillos, que fija en el suelo mediante pequeñas vellosidades y luego encoge la parte anterior empujando posteriormente hacia delante. Las células de su cuerpo son sensibles a la luz y por tanto los rayos solares directos pueden matarla rápidamente. Por esta razón las lombrices al ser descubiertas se hunden para protegerse de la radiación (Castro, 2000).

II.7 Biotransformación de contaminantes por anélidos

E. phoetida ha sido usada en diversos experimentos de biorremediación, tanto para biotransformar compuestos como para medir factores de bioacumulación,

su fácil manejo, rápida reproducción y su interacción natural con el suelo la hacen un organismo ideal para este tipo de pruebas. Se ha estudiado la bioacumulación de pentaclorofenol en *E. phoetida* en dos suelos artificialmente contaminados, describiendo la cinética de absorción y demostrando que esta se ve influenciada por la textura del suelo, su porosidad, el pH y los lípidos de la lombriz. De igual manera se ha estudiado la bioacumulación de mercurio y monometil-mercurio y su tasa de absorción a diferentes concentraciones, observando un límite de absorción y acumulación por parte de *E. phoetida*. En otro trabajo se ha evaluado la relación entre el contenido de materia orgánica en un suelo y el factor de bioconcentración de C-simazina en la lombriz. Todos estos estudios demuestran la alta relación entre el suelo y los procesos de biotransformación atribuidos a *E. phoetida* (Hu y col., 2005; Andrea y Papini, 2005; Burton y col, 2006).

En contraste con los resultados positivos se han realizado estudios con compuestos organoclorados tales como el DDT, y DDE y su persistencia en la cadena trófica al ser acumulados por las lombrices y en consecuencia a otras especies depredadoras de estas. También se sabe que la biodegradación de HAPs puede resultar en metabolitos aún más tóxicos o genotóxicos que los componentes principales, por lo que los niveles de HAPs remanentes en *E. phoetida*, así como la mortandad sirven de indicador de la eficacia de un proceso (Beyer y Gish, 1980; Kotterman y col. 1998).

Otras especies de anélidos se han propuesto como organismos degradadores de HAPs con diferentes resultados, se ha comprobado que la coaplicación de composta animal junto a *Dendrobaena veneta* disminuye efectivamente la concentración de HAPs, *Aporrectodea longa*, *Lumbriculus variegatus*, *Enchytraeus crypticus* y *Eisenia andrei* son organismos igualmente capaces de degradar HAPs (Achazi y col., 1998; Johnson y col., 2002; Verrengia-Guerrero y col., 2002; Hickman y Reid, 2008).

Se ha demostrado experimentalmente que la introducción de *E. phoetida* en sustratos artificiales contaminados con HAPs resulta en una reducción de estos.

Otro estudio demuestra que la adición de *E. phoetida* a suelo del Estado de México con altas concentraciones de antraceno, benzo (a) pireno o fenantreno, disminuye eficientemente la concentración de estos entre 47 y 51% (Eijsackers y col., 2004; Contreras-Ramos y col., 2005).

II.8 Cuantificación de los HAPs en suelo

Una de las dificultades asociadas con la determinación de HAPs en muestras ambientales es la complejidad de mezcla de HAPs en estas muestras. Incluso después de la limpieza extensa y rigurosa, la fracción de HAPs puede contener cientos de compuestos. Por lo general se requieren métodos analíticos que ofrezcan las combinaciones que permitan una buena resolución cromatográfica y que el detector presente una buena selectividad de los compuestos a cuantificar. Existen dos procedimientos esenciales para el análisis y la determinación de HAPs en muestras ambientales: la extracción y aislamiento de HAPs de la matriz de la muestra; y la identificación y cuantificación de los componentes (Hua y col., 2005).

Se han usado una variedad de métodos analíticos para determinar las concentraciones de HAPs en muestras ambientales. Entre éstos se encuentra la cromatografía de gases (GC) con varios detectores y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con varios detectores. Los métodos más usados para la determinación y cuantificación de HAPs son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y HPLC con detector de fluorescencia (Miege y col., 2003).

El HPLC ha sido ampliamente usado ya que el desarrollo de una fase estacionaria químicamente no polar para HPLC proporciona una selectividad única para la separación de los isómeros HAPs que son a menudo difíciles de separarse por columnas GO. Por ejemplo, el criseno, benzo(a)antraceno, y trifenileno tiene una separación muy clara usando una columna de fase de reversa de C-18. Además el HPLC presenta ventajas inherentes como los

tiempos de separación cortos, la alta resolución y así como una alta sensibilidad, en el caso de los HAPs es capaz de detectar picogramos (Hua y col., 2005).

Debido a las propiedades de fluorescencia de los HAPs, el usar un detector de fluorescencia provee de una gran especificidad. El límite de detección alcanzado en HPLC con un detector de fluorescencia para el análisis de HAPs es a nivel de picogramos y en ocasiones hasta de nanogramos (DIONEX, 1994, Nieva-Cano y col., 2001).

Numerosos estudios se ha mostrado que la mejor separación se logra usando un gradiente de elusión con una mezcla de solventes acetonitrilo-agua (Barra y col., 2006, DIONEX, 1994, Flotron y col., 2003, Miede y col., 2003, Nieva-Cano y col., 2001, Sanz-Landaluze y col., 2006).

Debido a lo anterior el método más recomendado para el análisis de HAPs es HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, usando como fase móvil una mezcla acetonitrilo-agua (Sanz-Landaluze y col., 2006).

III. HIPÓTESIS

La lombriz roja californiana (*Eisenia phoetida*) puede disminuir la concentración de algunos HAPs en el suelo de la región de San Nicolás, Tequisquiapan en un periodo reducido de tiempo bajo condiciones *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Evaluar la disminución de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) promovida por la lombriz roja californiana (*Eisenia phoetida*) después de 30 días en suelo de la región de San Nicolás, Tequisquiapan, Qro.

IV.2 Específicos

- Observar el nivel de mortandad de las lombrices al final del experimento.
- Evaluar el cambio en el peso y la mortandad de las lombrices después de 30 días.
- Medir las concentraciones remanentes de HAPs en el suelo después de 30 días mediante HPLC.
- Evaluar las variaciones en la concentración de HAPs y su relación con *E. phoetida*.

V. METODOLOGÍA

V.1 Reactivos, materiales e instrumentación

V. 1 .1 Reactivos

Naftaleno (Supelco)
Fenantreno (Supelco)
Benzo (a) antraceno (Supelco)
Acetonitrilo grado HPLC (Baker)
Acetona grado HPLC (Baker)
Hexano grado HPLC (Baker)
Sulfato de sodio Anhidro (Baker)
Agua destilada grado HPLC
Nitrógeno ultra puro (AGA)

V.1.2 Materiales

Viales de 1 ml
Viales de 10 ml
Recipientes de vidrio de 600 ml de capacidad
Matraces Erlenmeyer de 125 ml
Pipeta Eppendorf de 1-10 μ l
Pipeta Eppendorf de 10-100 μ l

V.1.3 Instrumentación

Termoagitador Cole-Parmer Polystat 1200-00
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC 1100 Agilent
Columna Zorbax Extend-C18 fase reversa, 5 μ m de diámetro de partícula,
4.6x150 mm, tamaño de poro 80A.
Detector de Fluorescencia (FLD) Agilent G13221A

V.2 Diseño experimental

V.2.1 Mezclas de naftaleno, fenantreno y benzo (a) antraceno

La muestra de suelo fue obtenida en la zona ladrillera de la región de San Nicolás, Tequisquiapan. Para evitar el uso de suelo contaminado se seleccionó dentro del mismo valle un lote sin actividad agrícola en los últimos cinco años, lo más alejado posible de ladrilleras, carreteras y casas (Figura 5). Se tomó la muestra con una profundidad de entre 5 y 25 cm, descartando la fracción superficial por su mayor contenido de materia orgánica y evitando profundizar hasta una capa rocosa. El suelo fue puesto a secar a temperatura ambiente por tres días antes de iniciar el experimento y pasado por un tamiz de 0.5 mm para eliminar piedras y partículas de gran tamaño que pudieran causar variaciones en la adsorción total de los HAPs y el comportamiento de las lombrices.

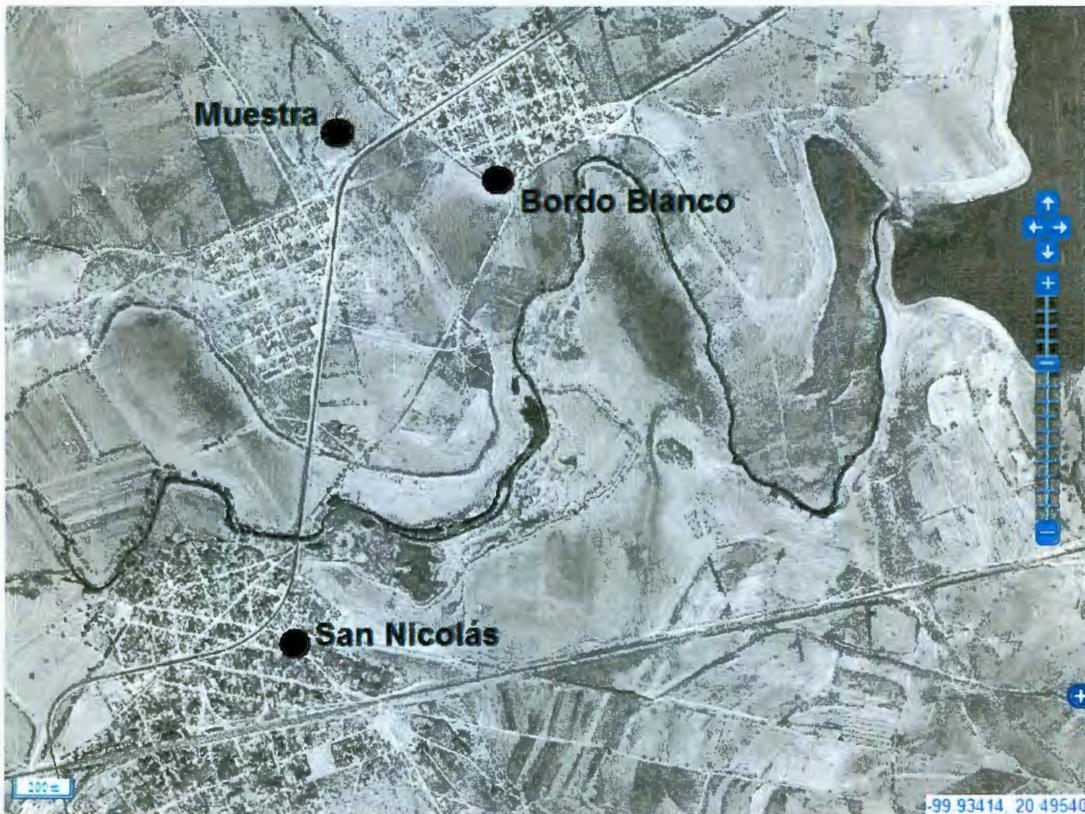


Figura 5. Sitio de muestreo del suelo usado en el experimento.

Se formaron 20 unidades experimentales a partir del suelo homogeneizado, las cuales se dividieron en cinco tratamientos con diferentes niveles de una mezcla de los HAPs naftaleno, fenantreno y benzo (a) antraceno. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones además de un testigo, al cual no se le añadió lombrices, con el fin de considerar la posible degradación de HAPs debido a otros factores.

La unidad experimental estuvo compuesta por 250 g de suelo. Las muestras de suelo se colocaron en un recipiente de vidrio de 600 ml de capacidad, posteriormente se añadió agua destilada hasta alcanzar un contenido de humedad entre 50 y 80 % con respecto al peso del suelo, además se añadió a cada unidad experimental cuatro lombrices en estado clitelado.

V.3 Métodos

V. 3.1 Enriquecimiento de HAPs en suelo.

Los HAPs en el ambiente normalmente se encuentran en mezclas de más de 10 compuestos. Los HAPs seleccionados para el modelo experimental fueron el naftaleno, fenantreno y benzo (a) antraceno, los criterios para la elección de estos HAPs fueron: abundancia y distribución en la zona, normas internacionales así como su diferencia en peso molecular (bajo, medio y alto) lo que les confiere características fisicoquímicas que los hacen adherirse a las partículas del suelo y a la materia orgánica de manera diferente, por lo que no son lixiviados o evaporados de la misma forma (Cuadro 2). Estas características permitieron por un lado evitar pérdidas experimentales de los analitos y por otra parte estos HAPs son de interés dado que sus mismas características fisicoquímicas pueden aumentar el tiempo de exposición de la población en contacto con el suelo contaminado. También se consideró su perfil toxicológico como probables carcinógenos en humanos.

La mezcla de HAPs en solución saturada de acetona se adicionó a una tercera parte del suelo de cada una de las unidades experimentales, a excepción del tratamiento 0, posteriormente se evaporó en una cámara de extracción durante

un día y se mezcló de manera homogénea al suelo restante, el cual fue homogeneizado y nuevamente puesto a secar por ocho horas (Brinch y col, 2002; Canals, 2005; Contreras-Ramos, 2005).

Después del experimento, se mezclaron 200 g de las repeticiones de cada tratamiento y se agregaron cuatro lombrices por tratamiento, esto se prolongo por 15 días, revisando la supervivencia de estas, para comprobar la toxicidad remanente o una posible toxicidad por metabolitos secundarios.

El orden y las condiciones de las unidades del experimento se resumen en el Cuadro 4, donde cada unidad es identificada por una letra que indica la repetición y un número que indica el nivel de enriquecimiento.

Cuadro 4. Condiciones de las unidades experimentales.

A0		B0		C0		D0	
Nap	0 mg/kg						
Phe	0 mg/kg						
BaA	0 mg/kg						
Peso de lombrices:	1.9870 g	Peso de lombrices:	1.7420 g	Peso de lombrices:	1.6951 g	Peso de lombrices:	0 g
A1		B1		C1		D1	
Nap	25 mg/kg						
Phe	10 mg/kg						
BaA	1.68 mg/kg						
Peso de lombrices:	2.092 g	Peso de lombrices:	1.4135 g	Peso de lombrices:	1.6340 g	Peso de lombrices:	0 g
A2		B2		C2		D2	
Nap	50 mg/kg						
Phe	25 mg/kg						
BaA	4.36 mg/kg						
Peso de lombrices:	1.5699 g	Peso de lombrices:	1.6584 g	Peso de lombrices:	1.5004 g	Peso de lombrices:	0 g
A3		B3		C3		D3	
Nap	100 mg/kg						
Phe	50 mg/kg						
BaA	11.9 mg/kg						
Peso de lombrices:	1.5524 g	Peso de lombrices:	1.9712 g	Peso de lombrices:	1.8950 g	Peso de lombrices:	0 g
A4		B4		C4		D4	
Nap	200 mg/kg						
Phe	75 mg/kg						
BaA	22.5 mg/kg						
Peso de lombrices:	1.9690 g	Peso de lombrices:	1.8179 g	Peso de lombrices:	1.3031 g	Peso de lombrices:	0 g

V.3.2 Condiciones del experimento

Las unidades experimentales se colocaron en un contenedor de plástico y se mantuvieron a temperatura constante y escasa luminosidad para evitar degradación de los HAPs por luz y calor, además se mantuvo una humedad constante de entre el 50 y 80%, la cual se considera como óptima para el desarrollo de las lombrices. Los experimentos se prologaron por 30 días, al cabo de los cuales se midieron los niveles de HAPs (naftaleno, fenantreno y benzo (a) antraceno) en el suelo, también se midieron los cambios en la población de lombrices, así como su peso. El contenido de HAPs en las lombrices no se considero debido a que se sabe que estas no bioacumulan las formas puras por tiempo prolongado (Jager, y col., 2003; Contreras-Ramos, 2005).

V.3.3 Preparación de las muestras para la extracción

Se tomó una muestra de suelo de cada unidad experimental y se dejó secar a temperatura ambiente por 12 horas, se pesó un gramo de cada muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 ml al cual se le añadieron 10 ml de una mezcla acetona-hexano 50:50, las muestras fueron selladas y colocadas en un termoagitador a 25°C por 120 minutos (Hickman y Reid, 2008).

Después de finalizar la extracción, el sobrenadante fue recolectado en viales y cada uno fue sometido a un proceso de evaporación con N₂ a contraflujo hasta un volumen de 1 ml, posteriormente se agregaron 12 ml de acetonitrilo y se repitió el proceso hasta un volumen aproximado de 8 ml, finalmente cada muestra se aforó a 10 ml con acetonitrilo y se guardó a 4°C hasta su posterior análisis.

V.3.4 Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Para la identificación de los HAPs se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución. La separación y cuantificación se realizó usando como

disolvente una mezcla acetonitrilo-agua con un gradiente de elusión, iniciando en 40% acetonitrilo y 60% agua y llevando hasta el 100% acetonitrilo en 25 min.

La longitud de onda utilizada para la detección de los HAPs fue de 280 nm y una emisión de 389nm. El volumen de inyección fue de 10 μ l y la temperatura de la columna se mantuvo constante a 25°C.

V.4 Análisis estadístico

Al finalizar el experimento se evaluó el porcentaje de supervivencia de lombrices y los cambios en el peso de estas mediante análisis de varianza (prueba f).

VI. RESULTADOS

VI.1 Peso y mortandad de lombrices

Los niveles de mortandad en las lombrices y las diferencias entre el peso inicial y final se pueden observar en los Cuadros 5 y 6:

Cuadro 5. Resultados de la mortandad de lombrices al final del experimento.

U.E.	Lombrices vivas	U.E.	Lombrices vivas	U.E.	Lombrices vivas
A0	3	B0	4	C0	2
A1	4	B1	3	C1	2
A2	4	B2	4	C2	1
A3	3	B3	2	C3	4
A4	3	B4	4	C4	3

U.E. Unidad experimental

Cuadro 6. Cambio en el peso de las lombrices después del experimento.

U.E.	W ₀	W _f	ΔW	U.E.	W ₀	W _f	ΔW	U.E.	W ₀	W _f	ΔW
A0	0.416	0.185	0.231	B0	0.435	0.193	0.242	C0	0.424	0.148	0.276
A1	0.523	0.251	0.272	B1	0.435	0.276	0.159	C1	0.408	0.156	0.252
A2	0.392	0.252	0.14	B2	0.414	0.229	0.285	C2	0.395	0.204	0.191
A3	0.388	0.269	0.119	B3	0.493	0.221	0.272	C3	0.474	0.215	0.259
A4	0.492	0.221	0.271	B4	0.454	0.184	0.27	C4	0.328	0.175	0.153

U.E. Unidad experimental; W₀ peso inicial promedio; W_f peso final promedio; ΔW diferencia

El porcentaje promedio de supervivencia fue de 76.6 %. Un análisis estadístico (prueba f para diferencias entre tratamientos) muestra que no hay diferencia significativa entre los tratamientos en lo que se refiere a la mortandad (f=0.0526), y en cuanto a la diferencia en el peso (f=0.1937).

VI.2 Curvas de calibración

Para las curvas de calibración de los HAPs se prepararon cuatro niveles de concentración para el naftaleno y el fenantreno, para el benzo (a) antraceno

únicamente se tomó en cuenta la respuesta del equipo a las unidades experimentales. En el Cuadro 7 se encuentran los valores obtenidos de la regresión lineal, adecuados a la ecuación de la recta de acuerdo a la fórmula $y = a + bx$ donde:

y = Respuesta del equipo.

b = Pendiente.

a = Ordenada al origen.

x = Concentración del analito.

Cuadro 7. Parámetros de la regresión lineal.

Compuesto	Pendiente (b)	Ordenada al origen (a)	Linealidad (r)	Coefficiente de determinación (r^2)
Naftaleno	6138.535	1768.756	0.9982	0.9965
Fenantreno	3889.395	500.002	0.9985	0.9972

En las Figuras 6 y 7 se presentan las curvas de calibración para el naftaleno y fenantreno en las que se muestra la cantidad del analito en mg/L en el eje de las abscisas y en el eje de las ordenadas la respuesta del equipo a los cuatro niveles de concentración.

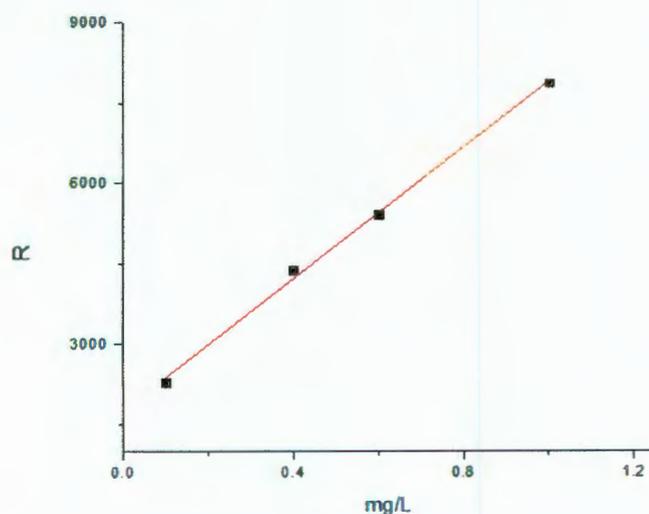


Figura 6. Curva de calibración del naftaleno.

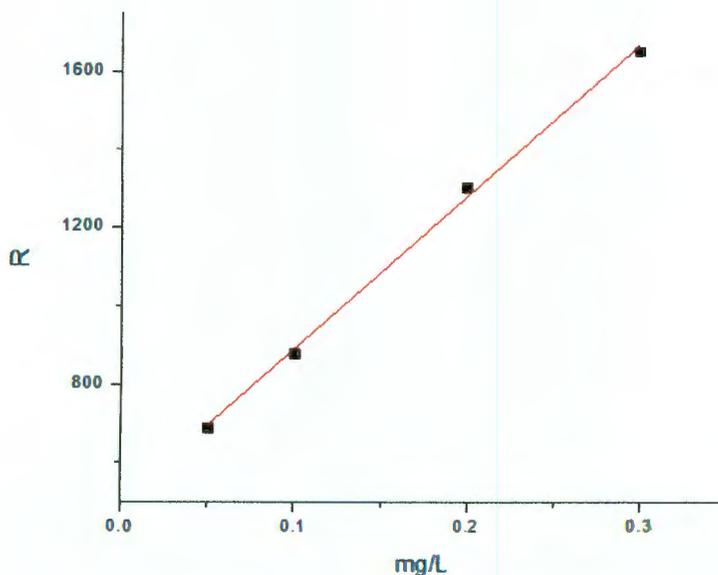


Figura 7. Curva de calibración del fenantreno.

VI.3 Concentraciones de HAPs

El análisis de los cromatogramas para determinar la concentración de los HAPs al final del experimento se resume en el Cuadro 8, la muestra C1 se perdió durante el proceso de dilución, por lo que no se tomó en cuenta en el análisis. Las gráficas de estos resultados se muestran en las Figuras 8 y 9. Los porcentajes de reducción en las repeticiones de los tratamientos, incluido el testigo, se muestran en el Cuadro 9 y las Figuras 10 y 11. El testigo del tercer tratamiento para el fenantreno se consideró una muestra contaminada por lo que no se incluye en la gráfica.

Aunque no se contó con curva de calibración se presentan los resultados de la respuesta del equipo para el benzo (a) antraceno en la Figura 12.

Cuadro 8. Concentraciones de HAPs en las unidades experimentales.

Unidad	[NAP] _{is}	Área Nap	[NAP] _m	[NAP] _{fs}	% R _{NAP}	Área Phe	[PHE] _{is}	[PHE] _m	[PHE] _{fs}	% R _{PHE}	Área BaA
A0	0	766	ND	ND	NA	101	0	ND	ND	NA	0
A1	25	3275	0.245	24.538	98.152	941	10	0.113	11.345	113.448	242
A2	50	2930	0.189	18.921	37.842	1029	25	0.136	13.610	54.441	1114
A3	100	2873	0.180	17.987	17.986	1827	50	0.341	34.130	68.260	1736
A4	200	1679	ND	ND	NA	829	100	0.085	8.466	8.466	1688
B0	0	451	ND	ND	NA	79	0	ND	ND	NA	47
B1	25	3017	0.203	20.341	81.363	981	10	0.124	12.371	123.711	220
B2	50	2843	0.175	17.501	35.002	603	25	0.129	12.953	51.811	1027
B3	100	2913	0.186	18.636	18.635	1754	50	0.322	32.251	64.502	1506
B4	200	1656	ND	ND	NA	926	100	0.109	10.947	10.947	3112
C0	0	2271	ND	ND	NA	105	0	ND	ND	NA	0
C1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
C2	50	2390	0.101	10.116	20.232	771	25	0.069	6.974	27.897	695
C3	100	2528	0.124	12.368	12.368	1,577	50	0.277	27.701	55.402	515
C4	200	246	ND	ND	-12.396	1,126	100	0.161	16.094	16.094	2889
D1	25	2838	0.174	17.411	69.643	1477	10	0.026	2.651	26.519	358
D2	50	2485	0.132	13.185	26.370	2578	25	0.160	16.017	64.068	644
D3	100	4143	0.387	38.670	38.670	13952	50	1.406	140.663	281.326	3175
D4	200	3397	0.265	26.524	13.262	6922	100	0.491	49.126	49.126	3488

[NAP]_{is}: concentración inicial de naftaleno en suelo; Área Nap: área del pico para el naftaleno en el cromatograma; [NAP]_m: concentración de naftaleno en la muestra extraída; [NAP]_{fs}: concentración final de naftaleno en suelo; %R_{NAP}: porcentaje de naftaleno remanente; [PHE]_{is}: concentración inicial de fenantreno en suelo; Área Phe: área del pico para el fenantreno en el cromatograma; [PHE]_m: concentración de fenantreno en la muestra extraída; [PHE]_{fs}: concentración final de fenantreno en suelo; %R_{PHE}: porcentaje de fenantreno remanente; Área BaA: área del pico para el benzo (a) antraceno en el cromatograma; ND: no detectado; NA: no aplica el dato.

*muestra perdida

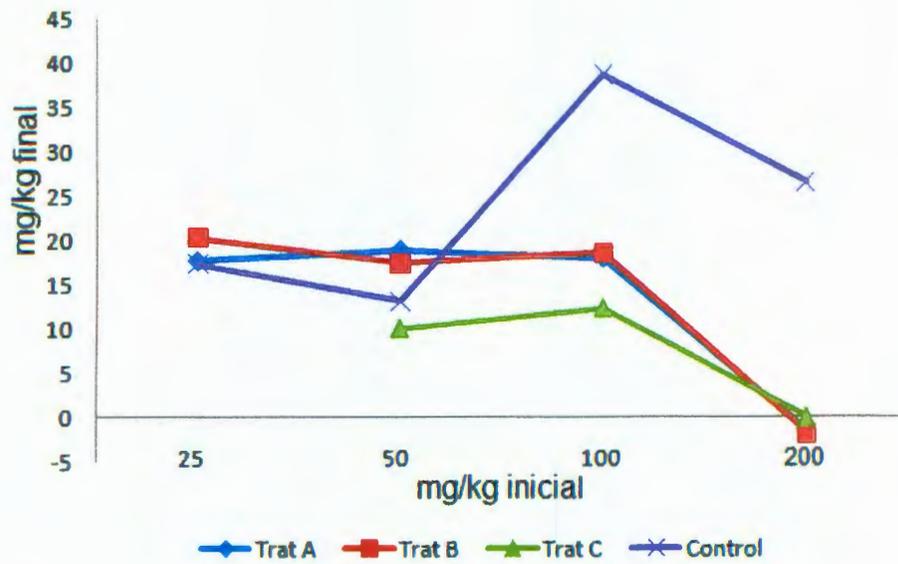


Figura 8. Cambios en la concentración de naftaleno.

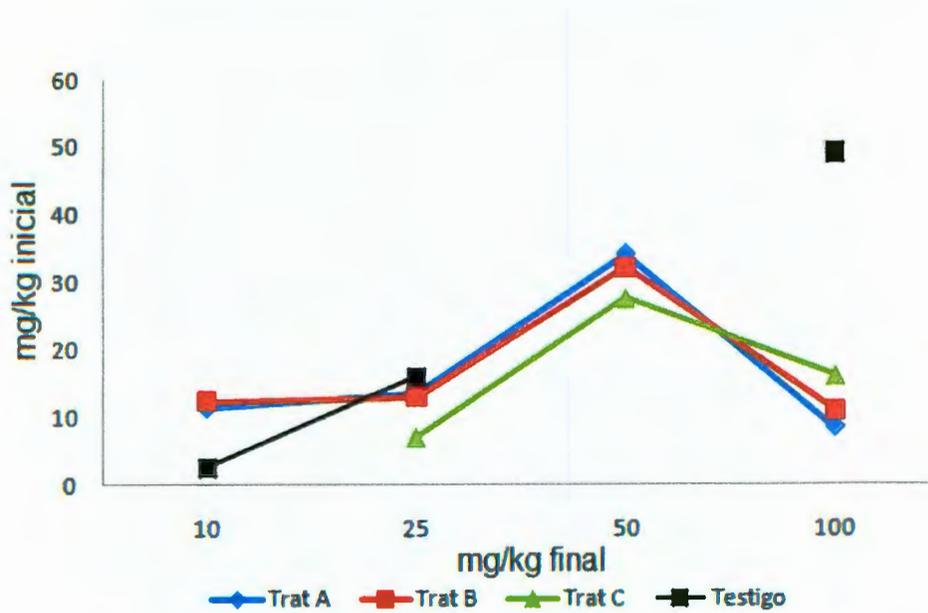


Figura 9. Cambios en la concentración de fenantreno.

Cuadro 9. Porcentajes de reducción de naftaleno y fenantreno

	A	B	C	Media	Testigo
Trat 1 NAP	70.639	81.364	*	76.001	69.644
Trat 2 NAP	37.843	35.002	20.232	31.026	26.371
Trat 3 NAP	17.987	18.636	12.368	16.330	38.670
Trat 4 NAP	ND	ND	ND	NA	13.262
Trat 1 PHE	113.448	123.712	*	118.580	26.519
Trat 2 PHE	54.442	51.812	27.898	44.717	64.069
Trat 3 PHE	68.260	64.502	55.402	62.722	281.326
Trat 4 PHE	8.466	10.948	16.095	11.836	49.127

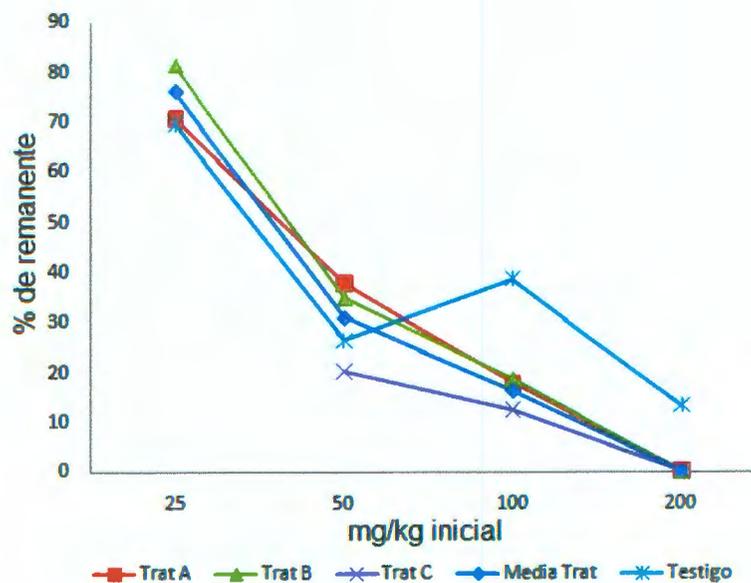


Figura 10. Cambios en el porcentaje remanente de naftaleno.

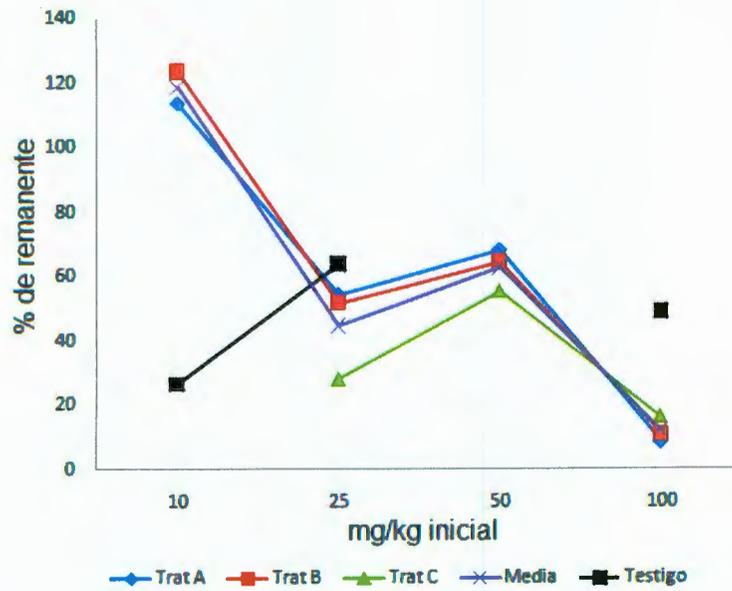


Figura 11. Cambios en el porcentaje remanente de fenantreno.

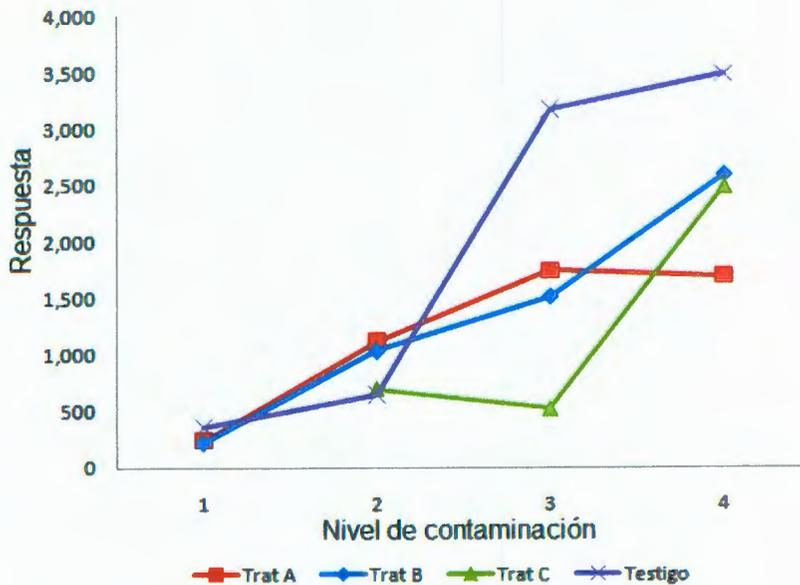


Figura 12. Respuesta del equipo para el benzo (a) antraceno.

Las lombrices colocadas para medir la toxicidad residual presentaron un porcentaje de supervivencia de 100 %.

VII. DISCUSIÓN

VII.1 Efecto de los HAPs sobre el peso y mortandad de lombrices

En cuanto a mortandad y cambio en el peso de las lombrices, estadísticamente no hay diferencia entre las unidades experimentales ni entre los diferentes tratamientos de HAPs, por lo que se puede considerar que los niveles de contaminación usados en el experimento no son un factor importante en la supervivencia de *E. phoetida*. El porcentaje de supervivencia de 76.6% se puede atribuir a la exposición a los HAPs, a la mortandad natural, o a la poca disponibilidad de alimento.

En este estudio no se añadió materia orgánica debido a que el objetivo es diseñar un método de remediación fácil y económico, además de favorecer a los HAPs como fuente de carbono para la lombriz. Los resultados de supervivencia sugieren que la materia orgánica existente es suficiente para mantener la actividad de la lombriz por 30 días.

En un experimento similar en suelo con mayor contenido de materia orgánica se presentaron niveles de supervivencia de 83-91% en el mismo lapso de tiempo y concentraciones similares de HAPs, en otro caso se obtuvo un 70% de supervivencia en suelo enriquecido con composta y un 15% en suelo natural después de una exposición de 84 días a niveles 5 veces mayores que los del presente estudio (Contreras-Ramos y col., 2005; Hickman y Reid, 2008).

En el experimento de contaminación residual se observó un porcentaje de supervivencia de 100%, esto puede ser atribuido a la disminución significativa de contaminantes, además de una mayor disponibilidad de alimento, en el primer experimento en promedio cada lombriz disponía de 50 g de suelo mientras que en el de contaminación residual disponían de 125 g. Igualmente este dato puede indicar la no toxicidad de los metabolitos generados en el primer proceso, de lo cual no se tiene evidencia definitiva ya que no fueron evaluados.

VII.2 Efecto de la adición de *E. phoetida* sobre la concentración de HAPs

Para las tres repeticiones de tratamiento 0 así como para una muestra de suelo sin tratar no se identificaron los HAPs estudiados.

Los niveles de HAPs al final del experimento muestran que en los dos tratamientos más bajos no existe diferencia en relación con el testigo, e incluso se puede notar que el nivel más bajo no es evidente una disminución en ambos HAPs. Sin embargo, se puede apreciar que el segundo tratamiento presentó una disminución a niveles semejantes de concentración del primer tratamiento. Estos niveles semejantes pueden indicar la fracción adsorbida por el suelo que queda menos disponible para la lombriz.

A partir del tercer tratamiento es apreciable en el naftaleno una disminución en la concentración con relación al testigo. En el tratamiento más alto es muy evidente la disminución de la concentración, llegando a niveles no cuantificables en el caso del naftaleno y una disminución del 89% en el caso del fenantreno.

La disminución de las concentraciones en los testigos se puede atribuir a causas naturales tales como la acción de microorganismos nativos, la degradación natural, volatilización o fijación en el suelo. En promedio se observó una disminución del 36 % en el caso del naftaleno y de 46 % para el fenantreno. Comparado con la disminución promedio en los tratamientos con lombrices (30% en naftaleno y 58% en fenantreno) no parece haber diferencia, sin embargo, un cambio en este comportamiento es observado en el tratamiento más alto, lo que sugiere que *E. phoetida* no inicia un proceso de biotransformación para niveles bajos de contaminación del suelo con HAPs. Esto concuerda con la nula disminución en el tratamiento más bajo y niveles remanentes semejantes en el resto de los tratamientos a excepción del naftaleno.

Los niveles tan bajos de naftaleno en el tratamiento más alto pueden indicar que aun la fracción adsorbida desaparece debido a la alta volatilidad de este compuesto, permaneciendo los niveles de fenantreno y benzo (a) antraceno.

Estos resultados son concordantes con la grafica de los cambios en la concentración de benzo (a) antraceno, en la cual la respuesta del equipo a las muestras de los tratamientos y el testigo son similares en los 2 primeros tratamientos y se observa una disminución para los 2 más altos.

La disminución en la concentración de HAPs en el suelo parece ser más pronunciada en el caso del naftaleno, y menor para el benzo (a) antraceno, lo que indica una mayor facilidad de degradación para HAPs de bajo peso molecular. Estos resultados también sugieren una mayor adsorción en el suelo conforme aumenta el peso molecular, debido probablemente a que aun siendo adsorbidos, los HAPs de bajo peso molecular continúan volatilizándose con mayor facilidad (Hickman y Reid, 2008).

Si la concentración de HAPs es un factor importante en la acción de *E. phoetida* sobre estos, se puede pensar que la activación del citocromo p450 ocurre a concentraciones bajas, concordando con resultados anteriores, que indican que no hay cambios en la concentración y actividad de las monooxigenasas mas importantes relacionadas con el citocromo p450 en niveles de hasta 100 mg de fluoranteno o benzo (a) pireno por kg de suelo (Achazi y col, 1998).

Otros estudios con benzo (a) pireno demuestran que a bajas concentraciones la biotransformación de HAPs se da por una reacción enzimática dependiente del citocromo p450 y que a altas concentraciones se activan rutas no enzimáticas que incluyen reacciones con radicales libres, como la peroxidación lipídica (Saint-Denis y col., 1999).

Así mismo, en estudios de bioacumulación de monometil-mercurio en *E. phoetida* se ha observado que a concentraciones bajas la acumulación es constante mientras que a concentraciones altas hay un incremento considerable

después de un periodo de 14 días, pudiendo concordar esto con la activación de rutas no enzimáticas a altas dosis de compuestos xenobioticos (Burton y col., 2006).

La lombriz, al consumir y excretar partículas solidas, al formar túneles y al remover el suelo puede favorecer la degradación natural de los HAPs, mejorando la aireación y las condiciones para el crecimiento de microorganismos biotransformadores. Incluso la flora intestinal de la lombriz pudiera contener microorganismos capaces de degradar los HAPs, por lo que no se puede descartar un efecto en conjunto de varios de estos factores en el proceso de transformación de los HAPs en el suelo.

Si *E. phoetida* puede tolerar altas concentraciones de HAPs e incluso disminuirlos, se debe reconsiderar su utilización como organismo para ensayos de bioacumulación de suelos contaminados (Leppänen y Kukkonen, 2000; Verrengia y col., 2002; Stroomberg y col., 2004; Johnson y col., 2005).

VIII. CONCLUSIONES

Los resultados indican que la presencia de *E. phoetida* por un periodo de 30 días en suelo contaminado por HAPs puede favorecer la disminución de estos, aumentando su efecto cuanto mayor sea la contaminación, sin necesidad de agregar composta o materia orgánica como fuente de alimento para las lombrices, siendo estas resistentes a altas concentraciones. Además, los metabolitos generados en este proceso parecen no afectar la supervivencia de lombrices no sometidas a dichas condiciones por lo que es probable que no haya ningún problema de residualidad toxica.

El periodo de 30 días presentado en este estudio puede coincidir con la época de mayor frecuencia pluvial en la zona de San Nicolás, Tequisquiapan, manteniéndose la humedad necesaria para favorecer las acciones naturales de la lombriz. Por tanto, el experimento aquí presentado puede considerarse un método de biorremediación muy accesible, ya que evita los dos mayores problemas para mantener la actividad de *E. phoetida*, la necesidad de agua y alimento, además de ser un proceso con muy poco impacto ambiental.

Si *E. phoetida* presenta mejores tasas de biodegradación a altas dosis de HAPs es muy posible que la vía del citocromo p450 no sea el único proceso de biodegradación y que esta tenga un límite específico de tolerancia, después del cual se activen diferentes mecanismos como las reacciones peroxidativas. La activación de este tipo de reacciones puede ser la causa de mayor mortandad en las lombrices cuando los niveles de contaminación son muy elevados.

E. phoetida puede también favorecer condiciones ambientales para provocar la degradación de HAPs por factores físicos, químicos y biológicos.

Mayores estudios se necesitan para encontrar el límite de tolerancia de *E. phoetida* hacia estos contaminantes y su respuesta a cambios de temperatura y humedad, factores muy importantes a tomar en cuenta para considerar este proceso como un método de biorremediación efectivo *in situ*.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Andrea, M. M., Papini, S. 2005.** Influence of Soil properties on bioaccumulation of ^{14}C -Simazine in Earthworms *Eisenia foetida*. *Journal of Environmental Science and Health*. 40: 55-58.
- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). 1995.** Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Barra, R., Poop, P., Quiroz, R., Treutler, H.C., Araneda, A., Bauer, C., Urrutia, R. 2006.** Polycyclic aromatic hydrocarbons fluxes during the past 50 years observed in dated sediment cores from Andean mountain lakes in central south Chile. *Ecotoxicology. Environmental Safety*. 63 (1), 52-60.
- Beyer, W. N., Gish, C. D. 1980.** Persistence in earthworms and potential hazards to birds of soil applied DDT, dieldrin and heptachlor. *Journal of Applied Ecology*. 17: 295-307.
- Brinch, U.C., Ekelund F., Jacobsen, C.S. 2002.** Method for spiking soil samples with organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (4): 1808-1816.
- Burton, D. T., Turley, S. D., Fisher, D. J., Green, D. J., Shedd T. R. 2006.** Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. *Water, Air, and Soil Pollution*. 170: 37-54.
- Canals, M.V. 2005.** Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Barcelona, España. Universitat de Barcelona. Tesis para obtener el título de Doctor en Biología. 70-72, 142-143. 151-156.
- Castro, G. 2000,** <http://www.geocities.com/lombricultivo2000/marcoteorico.htm>
- Contreras-Ramos, S. M., Álvarez-Bernal, D., Dendooven, L. 2005.** *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Pollution* 20: 1-6
- Cram, H. S., Ortiz-Salinas, R., Paez-Bistrain, R. 2006.** Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las sustancias tóxicas persistentes en México. Perfil y perspectivas para reducir sus riesgos. Primera edición. INE, SEMARNAT. México D.F. 14.

DIONEX, 1994, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Determination. Dionex International Subsidiaries Application Note 95.

Eijsackers, H., Van Gestel C. A. M., De Jonge S., Muijs B., Slijkerman D. 2004. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Polluted Dredged Peat Sediments and Earthworms: A Mutual Interference. *Ecotoxicology*. Vol. 10 No. 1: 35-50.

Flotron, V. A., Janseen, C. R., Brits, E., Van Larebeke, N. 2005. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutat Res.* 588 (2): 106-17.

Hickman, Z.A., Reid B.J. 2008. The co-application of earthworms (*Dendrobaena veneta*) and compost to increase hydrocarbon losses from diesel contaminated soils. *Environmental International*. 34: 1016-1022.

Hoffman, D. J., Rattner, B.A., Burton Jr., G.A., Cairns Jr, J. 2002. Handbook of Ecotoxicology. Segunda Edición. Lewis Publishers. United States: 168-186, 346-349.

Hu, X., Wen, B., Shan X., Zhang S. 2005. Bioavailability of pentachlorophenol to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health*. 40: 1905-1916.

Hua, G., Killham, K., Singleton, I. 2005. Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determinate benzo[a]pyrene in soil extracts. *Environmental Pollution*. 139 (2): 272-278.

Hudgings, D. 2000. <http://web99.arc.nasa.gov/~astrochm/pahdata/nindex.html>

Jacob, J. 1996. The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Pure and Applied Chemistry*. 68: 301-308.

Jager, T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., De Jong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. 2003. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, *oligochaeta*) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (4): 767-775.

Johnson, D.L., Jones K.C., Langdon C.J., Pearce T.G., Semple K.T. 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 34: 1363-1370.

Kotterman, M. J. J., Rietberg H., Hage A., Field J. A. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in

the presence of nonionic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 57, No. 2: 220-227.

Leppänen, M.T., Kukkonen J.V.K. 2000. Fate of sediment-associated pyrene and benzo(a)pyrene in the freshwater oligochaete *Lumbricus Variegatus* (Müller). *Aquatic Toxicology*. 49: 199-212.

Lyytikäinen, M., Pehkonen S., Akkanen J., Leppanen M., Kukkonen J.V.K. 2007. Bioaccumulation and biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons during sediment tests with oligochaetes (*Lumbricus variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (12): 2660-2666.

McBride, M. 1994. *Environmental Chemistry of Soils*. Primera Edición. Oxford.: 342-345.

Miege, C., Dugay, J., Hennion, M. C. 2003. Optimization, validation and comparison of various extraction techniques for the trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode-array and fluorescence detection. *J Chromatographer A*. 1995 (1-2): 87-97.

Nieva-Cano, M. J., Rubio-Barroso, S., Santos-Delgado, M. J. 2001. Determination of PAH in food samples by HPLC with fluorimetric detection following sonication extractions without simple clean-up. *Analyst*. 126 (McBride, 1994): 1326-31.

Saint-Denis, N., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Thybaud, E., Ribera D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* Andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. *Soil Biology and Biochemistry*. 31: 1837-1846.

Sanz-Landaluze, J., Bartolome, L., Zuloaga, O., Gonzalez, L., Dietz, C., Camara, C. 2006. Accelerated extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *Analytic and Bioanalytic Chemistry*. 384 (6): 1331-40.

Sâsêk, V., Bhatt, M., Cajthaml, T., Malachova, K., Lednicka, D. 2002. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Environmental Contamination and Toxicology*. 44: 336-342.

Srogi, K. 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 5: 169-195.

- Stroomberg, G.J., Zappey H., Steen R.T.C.A., van Gestel C.A.M., Ariese F., Velthorst N.H., van Straalen N.M. 2004.** PAH biotransformation in terrestrial invertebrates—a new phase II metabolite in isopods and springtails. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138 (C): 129–137.
- Verrengia-Guerrero, N.R., Taylor M.G., Davies N.A., Lawrence M.A.M., Edwards P.A., Simkiss K., Wider E.A. 2002.** Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates. *Environmental Pollution*. 117: 523-530.
- Yu, M. 2001.** *Environmental Toxicology*. Primera Edición. Lewis Publishers. United States: 67-76, 145-149.
- Yang, H., Su, Y.S., Zhu, Y.G., Chen, M.M., Chen, B.D., Liu, Y.X. 2007.** Influences of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on soil microbial community composition with or without vegetation. *Journal of Environmental Science and Health*. 42 (A): 65-72.