



**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**POSTGRADO EN CIENCIAS  
DE LA INGENIERÍA**

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y  
EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO DE  
MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD  
PARA DEGRADAR DDT.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**  
**(Área: Biotecnología)**

**PRESENTA:**

**Q.B. ESTHER CARRILLO PEREZ**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## RESUMEN

Xenobioticos como los plaguicidas, sin negar su contribución al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial, han contaminado el ambiente, afectando principalmente cuerpos de agua debido al uso indiscriminado e inadecuado de ellos, sobre todo en países en desarrollo. Tal es el caso del Valle del Yaqui, en el Noroeste de México, donde se da una aplicación intensiva de plaguicidas, algunos de los cuales ya han sido prohibidos en otros países por su recalcitrancia y toxicidad. Esta práctica ha sido señalada como la causa principal de la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo el aislamiento de un cultivo mixto de bacterias con capacidad para degradar DDT a partir de una mezcla de muestras de agua, suelo y sedimento, de la región del Valle del Yaqui. El aislamiento de los microorganismos se realizó por enriquecimiento del cultivo con medio mínimo y DDT para seleccionar microorganismos capaces de degradar directamente al plaguicida como única fuente de carbono. Por otra parte se realizó un aislamiento en medio mínimo con DDT y glucosa como una fuente de carbono adicional, para favorecer la selección de microorganismos que transformaran al plaguicida por cometabolismo. En ambos casos se utilizó cultivo intermitente. Se evaluó el crecimiento y la capacidad para biodegradar DDT del cultivo mixto aislado y seleccionado. Se caracterizó la morfología celular y de colonia de la población aislada, así como de cada una de las cepas puras que integran el cultivo mixto. Adicionalmente se practicaron pruebas bioquímicas de identificación. La caracterización microbiológica y bioquímica mostró un cultivo conformado principalmente por un consorcio de bacilos Gram negativos presumiblemente identificados como *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona putrefaciens*, *Neisseria flavescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella bovis* así como bacilos Gram positivos no identificados. El cultivo fue propagado en forma intermitente, en un medio de sales minerales suplementado con 133 ppm de

DDT comercial centrifugado, e incubado a 28 °C y 150 rpm. El crecimiento fue evaluado midiendo el incremento de proteína por el método de Lowry correlacionado con peso seco de biomasa. El cultivo mixto tuvo una velocidad específica de crecimiento de  $0.72 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de doblado de 9.6 h. El DDT residual se determinó por cromatografía de gases. El crecimiento fue sustentado por el DDT disponible como única fuente de carbono y fue completamente asimilado en las primeras 40 h, correspondiendo al 40 % del DDT total dosificado. Se evaluó la tolerancia del cultivo a 50, 200 y 400 ppm de DDT, sin observarse efecto tóxico alguno en este rango. Los metabolitos DDD y DDE presentes en el DDT comercial fueron completamente degradados sin observarse incremento de su concentración durante el cultivo.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	4
Contaminación Ambiental por Plaguicidas.....	4
Uso de Plaguicidas.....	5
Clasificación Química de los Plaguicidas.....	6
Plaguicidas organoclorados.....	6
Comportamiento del Plaguicida en el Ambiente.....	7
Análogos del DDT Biodegradables.....	11
Aspectos Toxicológicos de los Plaguicidas.....	11
Bioamplificación.....	12
Toxicidad en humanos.....	13
Contaminación del Valle del Yaqui con Plaguicidas.....	13
Localización.....	13
Detección de plaguicidas.....	14
Biodegradación de Plaguicidas.....	16
Biodegradación asociada al crecimiento.....	16
Cometabolismo.....	17
Reacciones de Biotransformación.....	17
Aislamiento de Microorganismos Biodegradadores de Plaguicidas....	19
Fuentes de aislamiento.....	19
Aislamiento por enriquecimiento.....	20
Métodos de Cultivo de Microorganismos.....	20
Cultivo intermitente.....	21
Cultivo continuo.....	24
Evaluación del Crecimiento.....	25
Turbidimetría.....	25
Medida de la biomasa seca.....	26

## TABLA DE CONTENIDO (Cont.)

	Página
Medición de los componentes celulares.....	26
Evaluación de la Biodegradación.....	27
Biorremediación.....	29
Aspectos a Considerar en la Biorremediación.....	29
La naturaleza físico química del compuesto.....	30
Características metabólicas de los microorganismos.....	30
Factores ambientales.....	31
Técnicas de biorremediación.....	31
MATERIALES Y METODOS.....	34
Descripción General del Trabajo.....	34
Materiales.....	34
Reactivos.....	34
Métodos de Cultivo y Evaluación del Crecimiento.....	36
Muestreo.....	36
Preparación del inóculo.....	37
Aislamiento.....	37
Cultivo intermitente.....	38
Determinación de proteína.....	38
Determinación de peso seco.....	39
Evaluación de la biodegradación.....	40
Extracción de DDT.....	40
Cromatografía de gases.....	40
Evaluación de la Tolerancia del Cultivo a la Concentración de DDT en el Medio.....	41
Caracterización Microbiológica de los Cultivos.....	42
Purificación de los cultivos.....	42
Caracterización microbiológica.....	42

## TABLA DE CONTENIDO (Cont.)

	Página
Identificación bioquímica.....	42
Análisis Estadístico y Manejo de Datos.....	43
RESULTADOS.....	44
Aislamiento de Microorganismos Degradadores de DDT.....	44
Caracterización de Cepas Degradadoras de DDT.....	44
Determinación del Crecimiento Microbiano.....	47
Biodegradación de DDT.....	47
Tolerancia del Cultivo a la Concentración de DDT en el Medio.....	52
DISCUSIÓN.....	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	65
ANEXO.....	71
Glosario.....	71

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ruta metabólica de degradación de DDT.....	9
2	Curva de crecimiento.....	23
3	Descripción general del trabajo.....	35
4	Microorganismos degradadores de DDT aislados.....	45
5	Curva estándar de proteína.....	49
6	Correlación de peso seco vs proteína.....	50
7	Curva de crecimiento de un cultivo mixto.....	51
8	Curva estándar correspondiente a DDT, DDD y DDE.....	53
9	Degradación de DDT por un cultivo mixto.....	54
10	Degradación de DDT residual.....	55
11	Degradación de DDT, DDD y DDE por un cultivo mixto.....	56



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Propiedades físico químicas de DDT, DDD y DDE.....	8
2	Tecnologías de biorremediación.....	32
3	Caracterización morfológica de cepas purificadas a partir de un cultivo mixto con capacidad para degradar DDT.....	46
4	Caracterización bioquímica de cepas purificadas a partir de un cultivo mixto con capacidad para degradar DDT.....	48
5	Tolerancia del cultivo a la concentración de DDT en el medio de cultivo.....	57

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las sociedades contemporáneas en las últimas décadas ha estado asociado al uso de compuestos sintéticos conocidos como xenobióticos, los cuales en los países industrializados representan hasta el 15 % de la producción de biomasa neta (Egli, 1974). Gran parte de estos compuestos químicos entran directa o indirectamente al ambiente, contaminándolo, generando problemas severos a la salud del hombre y poniendo en riesgo la estabilidad de muchas especies. Actualmente se hacen esfuerzos buscando una solución a esta problemática (Ortega y col., 1994; Bandala, 1998).

Durante los primeros años de la década de los ochenta, este fenómeno se convirtió en el principal problema ambiental de la sociedad, debido al potencial que poseen varios residuos para provocar reacciones tóxicas en el ser humano. Inicialmente no se reconocieron las consecuencias de los desechos sobre el medio ambiente y la salud. Solo hasta que algunos casos sobre intoxicaciones de poblaciones de aves por residuos de 1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano (DDT), el envenenamiento de una parte de la población en Japón debido a mercurio y algunos sucesos relacionados con bifenilos policlorados y dioxinas, dejaron claro que los seres humanos también corrían riesgo. Estos acontecimientos y el aumento de la preocupación popular, dieron origen a la promulgación de una legislación que indica el tratamiento que deben recibir actualmente los residuos tóxicos (La Grega y col., 1996).

Xenobióticos como los plaguicidas, sin negar su contribución al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial (Derache, 1990), han contaminado el ambiente, afectando principalmente cuerpos de agua debido al uso indiscriminado e inadecuado de ellos, sobre todo en países en desarrollo (Ortega y col., 1994). Tal es el caso del Valle del Yaqui, en el Noroeste de México, donde se lleva a cabo una aplicación intensiva de plaguicidas, algunos de los cuales ya han sido prohibido en otros países por su recalcitrancia y toxicidad. Esta práctica ha sido señalada como la causa principal de la

contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Ortiz-Hernández y col., 1997). Se ha detectado la presencia de plaguicidas en pozos utilizados para el abastecimiento de agua potable así como en muestras de fluidos humanos en habitantes de poblaciones del Valle del Yaqui (García y Meza, 1991).

Los residuos de DDT son biodegradados muy lentamente y se bioacumulan en los tejidos grasos, produciendo efectos letales en los sistemas nervioso, respiratorio, al aparato digestivo y a las membranas mucosas de los vertebrados (González y Canales, 1991). Cebrain (1998), reportó que existe evidencia de carcinogenicidad por los plaguicidas Clordano, Heptacloro, Clorofenoles y DDT. A estos plaguicidas se les ha asociado con varios tipos de cáncer y además al DDT, con leucemia.

Descontaminar diluyendo o movilizandolos contaminantes del sitio contaminado solo relocaliza el problema, favoreciendo el depósito de tóxicos en los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, suelos y aire, impactando desde allí severamente al ecosistema (Alexander, 1994; Richins y col., 1997).

Dentro de las alternativas que se han planteado para la solución de este problema, se tiene la utilización de la capacidad metabólica de los microorganismos para degradar estos contaminantes, misma que han desarrollado al adaptarse a dichos ambientes (Alexander, 1980). Esta es la base del desarrollo de una tecnología como lo es la biorremediación utilizada actualmente para la descontaminación de sitios mediante el uso de microorganismos o sus productos (Bourquin, 1993).

En base, a la problemática de contaminación por plaguicidas existente en el Valle del Yaqui, el propósito de este trabajo es contribuir en parte a la solución de la contaminación por plaguicidas organoclorados, mediante el aislamiento de microorganismos nativos con capacidad de biodegradar DDT, evaluando la capacidad de biodegradación de la población mixta seleccionada, así como llevando a cabo la caracterización microbiológica y bioquímica de los organismos que conforman el cultivo mixto, tratando de lograr su identificación.

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Aislar y seleccionar un cultivo con capacidad para degradar DDT, conformado por especies nativas de microorganismos de sitios expuestos a plaguicidas.

## Objetivos Específicos

1. Aislar poblaciones de microorganismos degradadores de DDT.
2. Estandarizar las metodologías para la evaluación del crecimiento y capacidad degradadora de DDT.
3. Estudiar la cinética de crecimiento del cultivo seleccionado mediante la obtención de los parámetros de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de doblado ( $t_d$ ).
4. Evaluar la capacidad del cultivo seleccionado para biodegradación del DDT.
5. Caracterizar microbiológicamente el cultivo seleccionado.
6. Identificar los microorganismos que conforman el cultivo mixto.

## REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### Contaminación Ambiental por Plaguicidas

El desarrollo de las sociedades contemporáneas se ha disparado a partir de la última mitad del siglo XX, ocasionado principalmente por el uso de compuestos químicos sintéticos caracterizados como xenobióticos, cuya producción en los países industrializados llega a ser equivalente a alrededor del 15 % de la producción de biomasa neta (Egli, 1974). Sin embargo, gran parte de estos compuestos químicos entran directa o indirectamente al ambiente, generando contaminación, razón por la cual en las últimas décadas se han enfocado esfuerzos a la solución de esta problemática (Ortega y col., 1994; Bandala, 1998).

Originalmente se trató de resolver el problema de la contaminación diluyendo o movilizándolo los contaminantes del sitio contaminado, en muchos casos, relocalizando el problema o aun agudizándolo por la formación de derivados tóxicos de los mismos. Esto a propiciado el depósito de tóxicos en los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, suelos y aire a partir de los cuales alcanzan los sistemas biológicos, impactando severamente el ecosistema (Alexander, 1994; Richins y col., 1997).

Compuestos xenobióticos han sido de gran utilidad como plaguicidas, contribuyendo al incremento de la productividad agrícola a nivel mundial (Derache, 1990). Sin embargo, el uso generalizado y la introducción de agroquímicos a países en desarrollo, a propiciado un uso inadecuado de ellos, así como el desarrollo de plagas resistentes y con esto su excesiva aplicación, generando contaminación de los ecosistemas (Ortega y col., 1994).

En la región Noroeste de México, en el estado de Sonora se encuentra el Valle del Yaqui, una de las regiones agrícolas más desarrolladas y tecnificadas del país donde se han aplicado masivamente plaguicidas, algunos de los cuales por su recalcitrancia y toxicidad ya habían sido prohibidos en Estados Unidos (Ortiz-Hernández y col., 1997). La aplicación intensiva de plaguicidas dentro de

las actividades agrícolas en la región ya ha sido reconocida como una de las principales fuentes de contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Existe evidencia de la presencia de plaguicidas en pozos utilizados para el abastecimiento de agua potable así como en muestras de fluidos humanos en habitantes de poblaciones del Valle del Yaqui (García y Meza, 1991).

Sin dejar de reconocer los beneficios que el uso de plaguicidas ha traído a la región, es importante reconocer la problemática ambiental que paralelamente se está generando y buscar alternativas de solución.

La degradación abiótica de xenobióticos ha sido documentada; sin embargo, los sistemas biológicos, en especial, la actividad metabólica de los microorganismos ha sido señalada como la principal responsable de la degradación de contaminantes en hábitats naturales. Allí, los compuestos químicos pueden ser transformados total o parcialmente en compuestos inocuos o de menor toxicidad utilizando la capacidad metabólica que los microorganismos han desarrollado al adaptarse a dichos ambientes (Alexander, 1980a).

Surge con esto la biorremediación como una tecnología alternativa para la descontaminación de sitios mediante el uso de microorganismos y la cual por sus características ha recibido mucha atención en la última década (Bourquin, 1993).

### **Uso de Plaguicidas**

Se denomina plaguicida a toda sustancia química natural o sintetizada, utilizada en agricultura para controlar los diversos organismos perjudiciales, como pueden ser todo animal o planta (virus, bacterias, setas, hierbas, gusanos, moluscos, insectos, roedores y mamíferos), a excepción de los productos de uso en veterinaria (Ware, 1998).

Los plaguicidas son utilizados principalmente para combatir a las plagas que atacan los cultivos agrícolas y controlar a los vectores de enfermedades transmisibles como la malaria, fiebre amarilla, enfermedad de chagas, tifo,

paludismo, dengue, entre otras. También han tenido influencia en el desarrollo agrícola, controlando insectos, hierbas y otras plagas que destruyen gran parte de los cultivos (Ortiz-Hernandez y col., 1997; INEGI, 1995).

Debido a la resistencia desarrollada por algunas plagas dado al uso constante de los plaguicidas, cada vez se necesita aplicar mayores cantidades de plaguicidas para mantener los rendimientos promedio en cada cultivo. La aplicación constante de los plaguicidas ha ocasionado que los productos agrícolas sean cada vez más tóxicos por lo que están siendo controlados y restringidos en diversos países. La mayoría de los plaguicidas utilizados en México se aplican en las cosechas de algodón, caña de azúcar y arroz. Su frecuencia de utilización se ha incrementado en el caso del algodón, donde se aplicaban de 5 a 7 veces por ciclo de cultivo y ahora sobrepasan las 30 aplicaciones (INEGI, 1995).

### **Clasificación Química de los Plaguicidas**

Casi todos los plaguicidas son compuestos orgánicos por contener carbono en sus moléculas; la mayoría son de origen sintético fabricados a partir de compuestos químicos básicos. Los plaguicidas sintéticos se clasifican en organoclorados, organofosforados, carbámicos, piretróides, organometálicos, feromonas y reguladores de crecimiento, que son los de más amplio uso y que mayor alteración han provocado en las prácticas agrícolas y en los sistemas de tratamiento a la salud pública (INEGI, 1995).

#### **Plaguicidas organoclorados**

Los pesticidas organoclorados son compuestos orgánicos que incluyen en su molécula uno o más átomos de cloro, los cuales empezaron a ser utilizados como plaguicidas a partir de la década de 1940. Son compuestos por lo general hidrofóbicos, que tienden a acumularse en los tejidos grasos y debido a su persistencia han sido asociados a fenómenos de biomagnificación de

contaminantes a través de la cadena alimenticia, alcanzando de esa manera niveles de toxicidad.

El 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano (DDT) es el insecticida organoclorado mejor conocido y más ampliamente discutido. Su alta solubilidad en grasas y estabilidad a la fotooxidación, hacen de éste un insecticida altamente persistente. La molécula del DDT es de baja reactividad dado que su estructura química está formada por dos anillos bencénicos unidos a una molécula de tricloroetano; a su vez, cada anillo benceno tiene unido un átomo de cloro en posición *para* y esto hace que tienda a acumularse, así como a biomagnificarse en la cadena alimenticia (Quraishi, 1977). Algunas propiedades físico químicas del DDT y algunos de sus metabolismos se dan en la Tabla 1.

DDT es metabolizado por microorganismos y otros organismos para dar los productos 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano (DDD), y 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno (DDE). Este último es formado mediante la dehidrodeclorinación de DDT mientras que DDD es formado a través de la declorinación reductiva de DDT, principalmente por microorganismos (Wedemeyer, 1966). Los estudios realizados a la fecha parecen indicar que la ruta de degradación más frecuente es la declorinación reductiva de DDT a DDD el cual sufre adicionales reacciones de oxidación y descarboxilación para formar bis(4-clorofenil) metano (DDM) el cual presenta reacciones de ruptura del anillo aromático para formar ácido bis(*p*-clorofenil) acético (DDA); este último forma intermediarios del ciclo de Krebs degradables, después de ruptura del anillo, lográndose con esto la completa mineralización del compuesto (Bumpus y Aust, 1987). En la Fig. 1 se muestra la ruta metabólica mediante la cual los organismos podrían metabolizar DDT.

### **Comportamiento del Plaguicida en el Ambiente**

La aplicación frecuente de plaguicidas ha sido una práctica común entre los agricultores, tendiente a evitar el desarrollo de plagas, maleza o patógenos vegetales como los hongos. Esas prácticas han sometido a la población nativa



Tabla 1. Propiedades físico químicas de DDT<sup>2</sup>, DDD<sup>3</sup> y DDE<sup>4</sup>.

Compuesto	Peso molecular	Punto de Ebullición (°C)	Presión de vapor (mm de Hg)	Solubilidad (25°C) (µg/l)
4, 4'- DDT	354.5	183.3	$3 \times 10^{-7}$ mm/25° C	1.2 µg/l <sup>(1)</sup>
4, 4'- DDD	320.0	n.d.	$1.0 \times 10^{-6}$ mm/30°C	
4, 4'- DDE	316.0	183.3	$6.5 \times 10^{-6}$ mm/25°C	

(1) Solución saturada

(2) DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano]

(3) DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano]

(4) DDE [1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etileno]

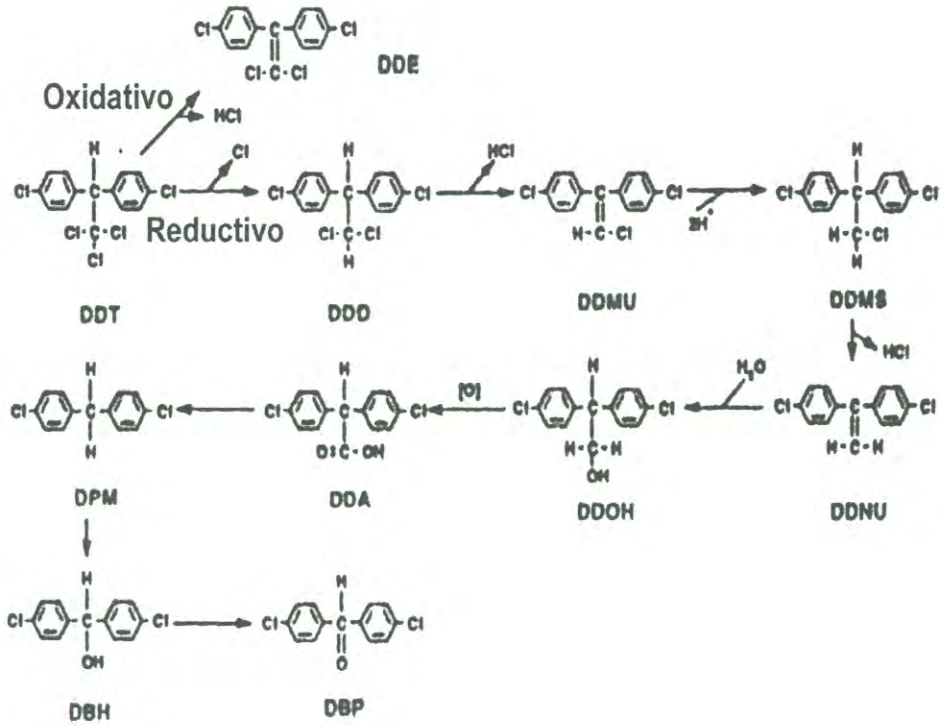


Figura 1. Ruta metabólica de degradación de DDT

DDT = 1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano

DDD = 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano

DDMU = 1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno

DDMS = 1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano

DDNU = unsyn-bis(*p*-clorofenil) etileno

DDOH = 2,2-bis(*p*-clorofenil) etanol

DDA = dicloro difenil acetato

DPM = dicloro difenil metano

DBH = dicloro benzydrol

DBP = dicloro benzofenona

DDE = 2,2-bis(*p*-clorofenil) 1,1-dicloroetileno

**Fuente: You y col. (1996)**

del sitio al contacto con el compuesto, generando diversas respuestas. Una de ellas es la biodegradación aumentada debido a la aclimatación de los organismos al plaguicida, ya sea por la generación o inducción de rutas metabólicas para degradarlos o bien por la utilización, de manera gratuita, de rutas ya existentes para la transformación de metabolitos convencionales. En este caso la consecuencia a corto plazo es la pérdida de efectividad del plaguicida para controlar la plaga. Cabe hacer notar que en otras ocasiones la ineffectividad del plaguicida se debe al desarrollo en la plaga de resistencia al mismo (Alexander, 1994).

En otros casos, una tasa alta de aplicación y el hecho de que los plaguicidas tienden a ser muy tóxicos por su composición química, afectan la actividad microbiológica del hábitat. De esta manera, estos compuestos tienden a permanecer en el ambiente por largo tiempo sin sufrir cambio aparente en su estructura química, es decir, se hacen persistentes; tal es el caso de los plaguicidas organoclorados los cuales se siguen detectando en el suelo después de 24 años. La persistencia de un compuesto químico se le ha relacionado, por un lado, a la estructura química la cual determina su reactividad así como su solubilidad y por tanto su disponibilidad para la degradación; por otro lado, también a las condiciones ambientales a las que esta sujeta la población degradadora para poder transformar dicho compuesto, como serían, temperatura, nutrientes, pH, ausencia de inhibidores del crecimiento, entre otros (Alexander, 1980a).

Como una consecuencia de la persistencia de los plaguicidas en el ambiente se tiene un aumento de la probabilidad de movilización de estos, llegando a sitios limpios como serían mantos acuíferos mediante la percolación durante las precipitaciones; la contaminación puede alcanzar también aguas superficiales, o aun sitios alejados mediante el fenómeno de magnificación a través de la cadena alimenticia. De igual forma, contaminantes presentes en bajas concentraciones, si son persistentes, pueden llegar a alcanzar niveles tóxicos. Reiteradamente se ha citado la movilización del DDT en relación a su

persistencia, sin embargo, también no se ha podido explicar esta en ambientes acuáticos tomando en cuenta que el DDT tiene una baja solubilidad en agua (Laws, 1993).

### **Análogos del DDT Biodegradables**

El DDT y DDE son moléculas químicas muy estables las cuales no presentan un sitio de unión o ataque para enzimas oxidasas de los organismos vivos. Tomando en cuenta que una gran estabilidad no es necesaria para la acción insecticida, análogos del DDT como el metoxiclor; en el cual los átomos de cloro en la posición *para* de los anillos bencénicos de la molécula han sido sustituidos por grupos metoxi, han servido a su vez para la síntesis de otros análogos. Algunos de estos compuestos incluyen metilclor, etoxiclor y metioclor, los cuales poseen una acción insecticida comparable a la del DDT, en donde los átomos de cloro han sido sustituidos por grupos  $\text{CH}_3$  -,  $\text{CH}_3\text{O}$  -,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  - y  $\text{CH}_3\text{S}$  -. La unión de estos grupos funcionales a la molécula del DDT la hacen menos tóxica proporcionándole sitios de ataque para las enzimas oxidasas (Quraishi, 1997).

### **Aspectos Toxicológicos de los Plaguicidas**

Los efectos adversos causados por la exposición de un organismo viviente frente a las sustancias químicas tóxicas, son tratados en toxicología.

Algunos plaguicidas son más tóxicos que otros. La toxicidad la determina la dosis letal ( $\text{LD}_{50}$ ) de cada plaguicida y esta se define como *la dosis que mata el 50 % de los animales de prueba para el cual este es administrado dentro de condiciones experimentales, expresada como miligramos del tóxico por kilogramo de peso corporal*. Las pruebas para determinar este parámetro se llevan a cabo en el laboratorio con ratas y evaluando el efecto del plaguicida suministrado en forma oral, dérmica y respiratoria, ya que son éstas las principales rutas de exposición en los seres vivos. La forma oral presenta mayor toxicidad seguida en orden de toxicidad decreciente por inhalación y adsorción

dérmica (La Grega y col., 1996; y Ware, 1998). La dosis letal ( $DL_{50}$ ) del DDT en ratas en forma oral es de 500 mg/Kg y epidérmica de 1000 mg/Kg (Zweig, 1964).

La toxicidad de los plaguicidas es variable y al parecer decrece en el orden:

Insecticidas > Defoliantes > Desecantes > Herbicidas > Fungicidas.

Desde el punto de vista del riesgo asociado a su exposición se pueden distinguir dos tipos de toxicidad: una toxicidad aguda derivada del manejo y aplicación del tóxico, la cual es importante para el personal de industrias manufactureras de plaguicidas así como para los involucrados en la aplicación y distribución de los mismos, y la toxicidad crónica, como resultado de la exposición por períodos grandes de tiempo a pequeñas cantidades de ellos. Este último caso es de importancia para el sector salud, ya que se presenta en el grueso de la población, que inadvertidamente esta expuesta como consumidores de agua y alimentos conteniendo cantidades residuales de plaguicidas (Ware, 1998).

### **Bioamplificación**

Dada su naturaleza química, los plaguicidas organoclorados son solubles en grasas por lo que se van concentrando en tejidos lipídicos. Cuando una sustancia química se bioacumula y/o bioconcentra puede aumentar su nivel de concentración en los tejidos a medida que se traslada por los diversos niveles tróficos de la cadena alimenticia, conociéndose a este proceso como bioamplificación (La Grega y col., 1996). De esta manera plaguicidas que en el sitio de ingreso al ambiente, por su baja concentración no representan un riesgo para las poblaciones sensibles, alcanzan niveles tóxicos por su bioamplificación en el ecosistema.

## **Toxicidad en humanos**

Dada la alta toxicidad de los plaguicidas organoclorados como el DDT, lindano, dieldrin, endrin, hexaclorobenceno entre otros, se les ha atribuido que son mutagénicos y carcinogénicos por lo que han provocado problemas de salud pública (INEGI, 1995; Ortiz-Hernandez y col., 1997). Cebrain (1998), reporta que en América Latina en poblaciones ocupacionalmente expuestas a los plaguicidas han presentado problemas de salud reproductiva, genotóxicos y del desarrollo, en este mismo estudio se han concluido que existe evidencia de carcinogenicidad por los plaguicidas clordano, heptacloro, clorofenoles y DDT; también se les ha asociado con cáncer de ovarios, de pecho, de páncreas y al DDT con leucemia.

El DDT es un insecticida muy potente de amplio espectro y también es tóxico para mamíferos, peces y pájaros. Los síntomas de envenenamiento indican que ejerce su acción sobre el sistema nervioso (Quraishi, 1997). Estos pueden aparecer casi inmediatamente después de la exposición o pueden ser retrasados por varias horas, dependiendo del químico, la dosis, tiempo de exposición y el individuo. Los síntomas pueden incluir dolor de cabeza, vértigo, nerviosidad, visión borrosa, calambres, diarrea, entumecimiento y tamaño anormal de las pupilas. En algunos casos existe un excesivo sudor, lagrimeo o secreciones en la boca. En casos severos el envenenamiento puede estar seguido por náuseas y vómito, fluidos en los pulmones, golpe de calor, agotamiento de calor, hipoglicemia (baja azúcar en la sangre), gastroenteritis (infección intestinal), neumonía, asma y otras infecciones respiratorias (Ware, 1998).

## **Contaminación del Valle del Yaqui con Plaguicidas**

### **Localización**

El Valle del Yaqui localizado en el Noroeste de México, es una región agrícola que en los últimos años ha experimentado un importante crecimiento

económico, siendo una de las zonas más desarrolladas en materia agrícola, como resultado de la tecnificación de las actividades del campo (Cámara, 1993). Esta región tiene una población de 311,443 habitantes, los cuales cuentan con 1600 millones de m<sup>3</sup>/ año de agua superficial proveniente del Río Yaqui y almacenada en 3 presas y de 340 millones de m<sup>3</sup>/año de aguas subterráneas extraídas del acuífero por 350 pozos. El 95% de este recurso es utilizado para la irrigación de 360,000 Ha de tierras cultivables y para el abastecimiento de agua potable a la población (González y Col., 1997).

La alta productividad agrícola se debe en gran parte al uso intensivo de agroquímicos, cuya aplicación en los cultivos para darles protección contra las plagas y enfermedades ha implicado el uso y abuso de los plaguicidas, sin tomar en cuenta el riesgo que presentan para el ecosistema, para el agua subterránea que es utilizada como fuente de abastecimiento de agua potable y para la población (González y Canales, 1995).

Las actividades agrícolas así como las constantes aplicaciones de plaguicidas y fertilizantes en los campos de cultivo ha sido ampliamente reconocida como fuente de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas (Cámara, 1992). González y Col. (1997) reportan que la carga de contaminación por fertilizantes y plaguicidas usados fue de 233 m<sup>3</sup>/día y la cantidad de plaguicidas aplicados en el área fue estimada en cerca de 0.92 l/hectárea a una tasa de 0.3 m<sup>3</sup>/ día. La concentración de plaguicidas es mayor durante los meses de diciembre a marzo ya que es el período de máxima superficie cultivada.

### **Detección de plaguicidas**

Tanto a nivel mundial como regional se ha venido detectando un incremento progresivo en las concentraciones de plaguicidas principalmente en los suministros de agua potable y subterránea, en las más importantes regiones agrícolas como es en este caso el Valle del Yaqui, en donde en los últimos años se han realizado estudios de monitoreos para evaluar la contaminación por

agroquímicos en los pozos que extraen agua subterránea y freática (Cámara, 1992).

González (1995), realizó estudios de monitoreo en 8 pozos de agua subterránea en el Valle del Yaqui, para evaluar la contaminación por plaguicidas, en los que detectó Lindano (HCH), Dieldrin y Endrin con sus isómeros respectivos en 6 pozos que suministran agua potable de comunidades rurales. La mayoría de los plaguicidas detectados en estos pozos son organoclorados y presentan concentraciones que rebasan las normas mexicanas de la calidad del agua para consumo humano.

Cámara (1992), reporta estudios sobre detección de plaguicidas realizados en los principales drenes colectores de aguas residuales del Valle del Yaqui, producto de las diferentes actividades económicas que ahí se realizan, como son agrícolas, industriales y domésticas. Tanto en agua como en sedimento, la mayoría de los compuestos detectados fueron organoclorados como metabolitos del lindano ( $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\delta$ -BHC), 4,4-DDE y heptacloro. En la mayoría de los casos, estos compuestos rebasan las normas establecidas; además se detectó una mayor concentración de dichos compuestos en los sedimentos que arrojan estos drenes colectores.

La aplicación de plaguicidas altamente solubles en el agua y las inadecuadas prácticas agrícolas, son algunas de las causas que más contribuyen a la presencia de agroquímicos en los mantos acuíferos del Valle del Yaqui (Cámara, 1992). El uso de estos plaguicidas está prohibido, pero su detección hace suponer que aun se siguen utilizando.

En muestreos de agua del estuario "La Atanasia Santo domingo" de la misma región, entre los años de 1986 y 1987 se detectaron los plaguicidas Aldrin, DDT, Dieldrin, Endrin y Lindano los cuales sobrepasan los límites establecidos por la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA). En los sedimentos, las concentraciones fueron 400 a 14, 000 veces superiores a las obtenidas en agua (Cámara, 1993).

Los anteriores plaguicidas también fueron detectados en leche materna



así como en sangre de niños de seis meses de edad, de Pueblo Yaqui, situado en la misma región del Estado de Sonora; sus habitantes están expuestos al esparcimiento aéreo de plaguicidas y un considerable número de mujeres se emplean en las labores agrícolas, los plaguicidas detectados fueron Lindano y Dieldrin mostrando un 100 % de incidencia (García y Meza, 1991).

### **Biodegradación de Plaguicidas**

Para que un compuesto xenobiótico como los plaguicidas sea biodegradado por algún microorganismo, antes que nada, éste debe estar presente en el sitio y tener la información genética que le dé la capacidad de biodegradarlo, es decir, tener la capacidad de sintetizar enzimas en respuesta a la presencia del compuesto; además, se deben tener las condiciones ambientales adecuadas para que esas enzimas puedan catalizar las reacciones a una velocidad significativa (Grady, 1985).

Los plaguicidas pueden ser metabolizados por el microorganismo el cual los usa como fuente de carbono y energía y ocasionalmente de nitrógeno y azufre, es decir, asociado al crecimiento, o bien por cometabolismo, donde el plaguicida es degradado siempre y cuando se suministre al microorganismo una fuente de carbono para su crecimiento (Alexander, 1980a; Grady, 1985).

### **Biodegradación asociada al crecimiento**

Cuando los plaguicidas son utilizados como fuente de carbono y energía, lo hacen a través de rutas metabólicas ordinarias donde las reacciones son llevadas a cabo por enzimas de baja especificidad por lo que pueden actuar sobre los compuestos xenobióticos sin ser el sustrato común. En este caso, la densidad de la población de las especies activas aumenta y las células se multiplican a expensas del compuesto. La utilización del xenobiótico como nutriente origina productos que son intermediarios característicos del metabolismo celular, los cuales pueden ser mineralizados a través de las rutas del metabolismo central para mantener el crecimiento de la población

(Alexander, 1980b). Los compuestos degradados de esta forma por lo general no generan subproductos tóxicos. Esta forma de biodegradación ha sido denominada por Grady (1985), como metabolismo gratuito.

### **Cometabolismo**

La otra alternativa es la utilización del plaguicida por cometabolismo, es cuando este no es utilizado como fuente de carbono y energía por lo que el organismo requiere de un sustrato adicional para el crecimiento. En este caso el incremento de especies activas no se da y la velocidad de la pérdida del plaguicida no se incrementa con el tiempo. Así cuando se inicia la biodegradación con una población muy pequeña, la velocidad de degradación es muy lenta. A diferencia de la degradación asociada al crecimiento, en cultivos puros se generan subproductos que pueden ser aún tóxicos de tal forma que la degradación completa del plaguicida no se da; en cultivos mixtos, las diferentes poblaciones microbianas pueden degradar el compuesto tóxico en diferentes etapas hasta su completa mineralización ó bien transformarlo en un compuesto no tóxico (Grady, 1985; y Alexander, 1980b).

### **Reacciones de Biotransformación**

En los diversos ecosistemas impactados por la presencia de compuestos xenobióticos, pueden tener lugar una serie de reacciones metabólicas llevadas a cabo por los sistemas enzimáticos de microorganismos heterótrofos presentes en el sitio. El tipo de biotransformación va a depender de las especies en particular que se encuentren presentes y entre estas reacciones se pueden mencionar:

- a) Destoxicación. En donde se da la transformación de una molécula inhibitoria a la concentración en la que es usada, en un producto no tóxico.
- b) Degradación. Mediante la cual se lleva a cabo la transformación de un sustrato complejo en productos simples.

- c) Conjugación. Donde la acción microbiana de un organismo hace al sustrato más complejo o bien, combina al pesticida con los metabolitos celulares.
- d) Activación. Donde un sustrato no tóxico o pesticida potencial, es convertido en una molécula tóxica, que es el pesticida real y que resulta peligroso para una u otras especies sensibles.
- e) Defusión. Caracterizada por la conversión de una molécula no tóxica, como podría ser un plaguicida, en los lugares donde esté sujeta a activación enzimática, en un producto no tóxico que ya no está sujeto a activación.
- f) Cambio de espectro de toxicidad. Algunos pesticidas son tóxicos para un grupo de organismos pero son metabolizados para formar productos que inhiben organismos totalmente diferentes (Alexander, 1980a).

Este tipo de reacciones puede ser llevado a cabo en una molécula de plaguicida por una o más poblaciones presentes en una comunidad biodegradadora donde la biodegradación puede ser extensiva mediante la acción de la población mixta (Alexander, 1980a). La mayoría de los plaguicidas y otros contaminantes son transformados por los organismos a través de reacciones de las principales rutas metabólicas en las cuales el plaguicida es oxidado, hidrolizado, reducido o conjugado, pudiéndose señalar entre ellas a las siguientes reacciones: oxidación, unión de éter, hidrólisis de éter y amida, oxidación de alcoholes y aldehidos, desalquilación, hidroxilación, dehidrohalogenación, epoxidación, dehalogenación reductiva y N-desalquilación. Los plaguicidas lipofílicos son metabolizados a través de estas reacciones en compuestos más solubles en agua y metabolitos menos tóxicos. Los productos finales de transformación en el suelo y sustancias húmicas son  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , sales minerales y metabolitos (Alexander, 1980a; Cornell y Miller, 1984).

## Aislamiento de Microorganismos Biodegradadores de Plaguicidas

En la naturaleza existen diversos géneros heterótrofos con capacidad de actuar sobre plaguicidas ya sea biotransformándolos ó utilizándolos como nutrientes; entre estos géneros se encuentran bacterias, hongos y actinomicetos. Entre las bacterias tenemos especies de *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* (Alexander, 1980a). *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Acinetobacter* (Camara, 1992). De los hongos se pueden citar *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rizoctonia*, *Trichoderma*; y actinomicetos tales como, *Micromonospora*, *Nacordia* y *Streptomyces* (Alexander, 1980a).

### Fuentes de aislamiento

Los hidrocarburos clorinados fueron utilizados extensivamente durante la década de los 50s y 60s, lo que ha dado como resultado que estos insecticidas y sus metabolitos se hallan acumulado en el suelo. Sin embargo, hay algunos estudios realizados bajo condiciones de laboratorio los cuales revelan que estos compuestos son transformados por microorganismos del suelo (Patil y col., 1970; Matsumura y Boush, 1967; Stanlake y Finn, 1982). Hábitats como suelo y sedimentos proveen a los investigadores de una gran riqueza y variedad de microorganismos, ya que estos cuentan con una gran carga microbiana. Otros de los ecosistemas en los que se han aislado microorganismos son el agua de mar y lagos, ya que allí también se ha detectado contaminación por compuestos organoclorados (Stanlake y Finn, 1982; Patil y col., 1972). Otra fuente de aislamiento es la utilización de aguas residuales y los lodos activados que ofrecen una gran posibilidad para el aislamiento de especies con capacidad de biodegradar compuestos recalcitrantes (Grady, 1985).

Grady (1985) y Alexander (1980a) han indicado que para tener éxito en el aislamiento de microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos, es requisito que el microorganismo esté presente en el sitio contaminado, y que

este haya sido impactado durante muchos años, para que los microorganismos habitantes del sitio hayan evolucionado hacia el desarrollo de enzimas en su metabolismo que sean capaces de actuar sobre el xenobiótico.

### **Aislamiento por enriquecimiento**

Esta técnica es utilizada con la finalidad de incrementar el número de organismos que se encuentran en pequeñas cantidades en un nicho ecológico y por el que se tiene un interés especial para investigación; tal es el caso de los microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos (Tortora, 1992). La técnica de enriquecimiento más utilizada ha sido el cultivo estacionario en el cual una población mixta de microorganismos, obtenido de una fuente específica, es inoculado en medio mínimo conteniendo el compuesto xenobiótico que se desea degradar como única fuente de carbono y energía para sustentar el crecimiento. Bajo estas condiciones se somete a la población a una presión de selección donde los diferentes organismos compiten por el sustrato de tal manera que el cultivo se enriquece con la cepa microbiana capaz de crecer más rápido bajo las condiciones impuestas (Egli, 1974). De esta manera se activan microorganismos para que sean capaces de crecer en una concentración de sustrato mucho mayor a la que tendrían en su hábitat, hasta alcanzar una densidad celular alta y así ser seleccionados, aprovechando la ventaja, sobre el resto de la población, de crecer en el xenobiótico (Hunter-Cerver y col., 1986; Queener and Lively, 1986).

### **Métodos de Cultivo de Microorganismos**

La forma en que los microorganismos modifican o destruyen el sustrato se establece cultivándolos en medios que les provean de los nutrientes necesarios en forma disponible y las condiciones ambientales adecuadas ó bien utilizando enzimas obtenidas de dichos microorganismos (Trevan y col., 1987).

Entre los principales métodos de aislamiento utilizadas para obtener microorganismos biodegradadores de plaguicidas tenemos: cultivo intermitente y cultivo continuo (Trevan y col, 1987).

### **Cultivo intermitente**

Es la forma de cultivar más sencilla en donde los microorganismos crecen en una cantidad de medio, hasta que alguno de los nutrientes esenciales para el crecimiento se agota, o bien hasta que hay acumulación de productos tóxicos que inhiban el crecimiento (Trevan y col., 1987).

Este tipo de cultivo se lleva a cabo en frascos de fermentación, matraces Erlenmeyer o tubos de ensaye sujetos a agitación, que varía de 100 a 500 rpm, suministrada a través de mecanismos de agitación recíprocos o rotatorios y durante la cual el oxígeno se transfiere del aire directamente a las células por absorción, a la vez que los ingredientes del medio son mezclados (Demain y Salomon, 1986).

Crecimiento de una población de microorganismos se define como el incremento en el número de células, o como un incremento en la masa microbiana (biomasa). La velocidad de crecimiento es la velocidad de aumento de número de células o biomasa por unidad de tiempo y el tiempo requerido para que la población celular se duplique se conoce como tiempo de doblado ( $t_d$ ) o tiempo de generación ( $t_{gen}$ ) el cual varía de un microorganismo a otro (Wang y col., 1979).

Información cuantitativa del crecimiento de un cultivo es presentada por lo general como una gráfica del incremento del crecimiento contra tiempo, en la cual se pueden distinguir tres fases: una fase lag inmediatamente después de la inoculación del medio, la cual es un período de adaptación de la población a las nuevas condiciones de crecimiento, donde se da la inducción de enzimas y componentes celulares; una fase de crecimiento logarítmico durante la cual la velocidad de crecimiento es constante; y una fase estacionaria, donde las células han dejado de multiplicarse o en la cual el número de células viables

esta en equilibrio con el número de células muertas; después de estos estadios se puede apreciar un decline drástico del crecimiento celular (Fig. 2) (Trevan y col., 1987).

La cinética del crecimiento puede ser analizada a través del cálculo de algunos parámetros como la velocidad específica de crecimiento, denominada como  $\mu$  y el tiempo de doblado de la biomasa  $t_d$ , entre otros (Wang y col., 1979).

Para la propagación de un microorganismo se requiere contar con un inóculo viable, una fuente de energía, nutrientes esenciales para el crecimiento, ausencia de inhibidores del crecimiento y condiciones físico químicas adecuadas (Wang y col., 1979).

Una vez satisfechos estos requisitos, se tiene que para un intervalo de tiempo ( $dt$ ) el incremento en biomasa esperado ( $dX$ ) es proporcional a la cantidad inicial de células ( $X$ ). Así las relaciones cuantitativas del crecimiento se pueden expresar mediante la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Donde  $X$  es el número de células o biomasa o algún componente celular específico, como proteína, y  $\mu$  es la velocidad de crecimiento específica. Al integrar la ecuación anterior se tiene la ecuación:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (2)$$

donde  $X_0$  es la biomasa cuando  $t = 0$  y  $t$  es el tiempo transcurrido durante el crecimiento (Madigan y col., 1998).

La gráfica de  $X$  contra  $t$  es una línea recta donde la pendiente es  $\mu$ , y se adapta fácilmente a los datos experimentales de la fase exponencial de crecimiento de los cultivos bacterianos. La ecuación (2) se puede expresar de la siguiente forma:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

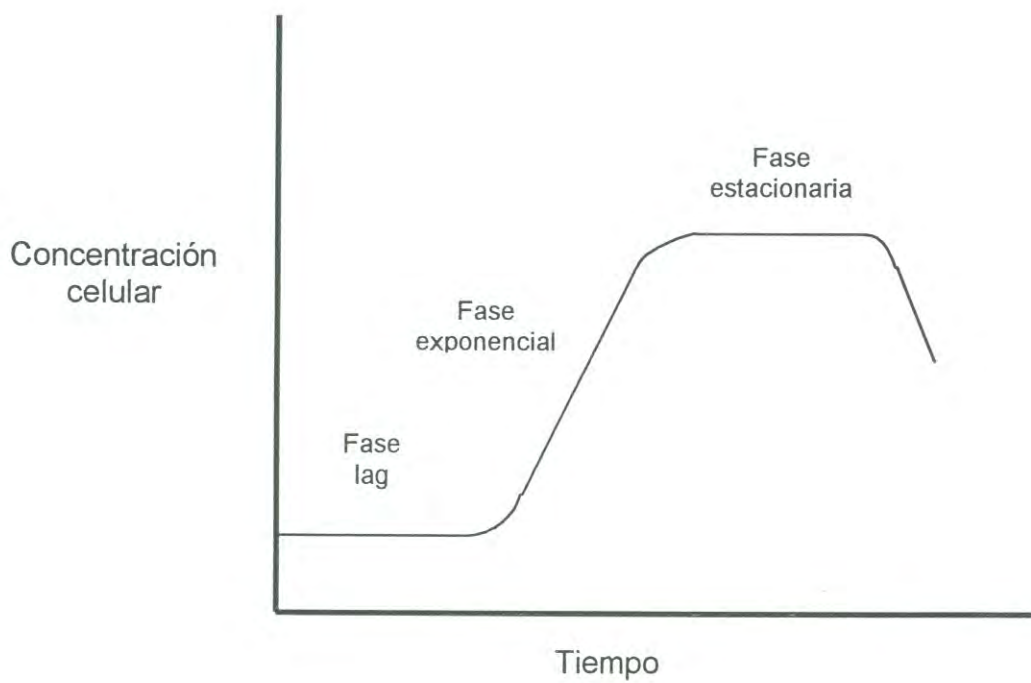


Figura 2. Curva de crecimiento de microorganismos.



Esta ecuación permite predecir la densidad de la población de células en un tiempo dado a partir de la población inicial inoculada y el valor de  $\mu$ . Un parámetro constante muy útil de una población creciendo exponencialmente es el tiempo de doblado ( $t_d$ ) o tiempo de generación ( $t_{gen}$ ), la cual ocurre cuando, de tal forma que reordenando la ecuación (3) para este parámetro se tiene:

$$2 = e^{\mu(t_d)} \quad (4)$$

tomando el logaritmo natural de cada lado y reorganizando se tiene:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (5)$$

El cultivo intermitente es utilizado como parte de las etapas iniciales de producción de inoculo en procesos industriales, en la etapa previa del cultivo continuo. De igual forma es frecuentemente usado para el aislamiento de microorganismos con propiedades degradadoras específicas usando el compuesto a degradar como única fuente de carbono (Egli, 1974).

### **Cultivo continuo**

En cultivo continuo la población celular crece indefinidamente en un ambiente cuyas condiciones no varían de tal forma que la fisiología microbiana permanece constante. Esto se logra suministrando continuamente medio al frasco de fermentación y paralelamente removiendo el caldo completo para mantener un volumen fijo (Madigan y col. 1998). Operado en el modo turbidostato las células son crecidas a su máxima velocidad de crecimiento, la densidad celular es mantenida constante mediante la alimentación y la extracción continua de medio del reactor. En la modalidad de quimiostato, donde la composición química del medio de cultivo se mantiene constante, el sistema es operado de tal forma que el crecimiento es limitado por un nutriente seleccionado, y la velocidad con la cual el medio se suministra determina la velocidad de crecimiento del organismo (Demain and Solomon, 1986).

Con respecto a la los estudios de biodegradación la mineralización de

compuestos xenobióticos algunas veces requiere la actividad concertada de cultivos mixtos donde un producto puede acumularse hasta que un organismo que pueda degradarlo se haya establecido. En este caso el desarrollo de la comunidad sugiere que se lleve a cabo una continua inoculación; además por el efecto del control metabólico, la concentración de la fuente de carbono auxiliar, debe ser mantenida a baja concentración. Estas condiciones se pueden llevar a cabo con más eficiencia con la técnica de cultivo continuo a una baja velocidad específica de crecimiento (Grady, 1985).

### **Evaluación del Crecimiento**

El crecimiento de la población degradadora es un reflejo del consumo de sustrato que le sirve como fuente de carbono y energía, que en este caso, es el plaguicida que se pretende degradar, por lo que es fundamental contar con métodos que nos permitan evaluarlo. Algunas de las técnicas para llevar a cabo la evaluación del crecimiento se presentan a continuación.

#### **Turbidimetría**

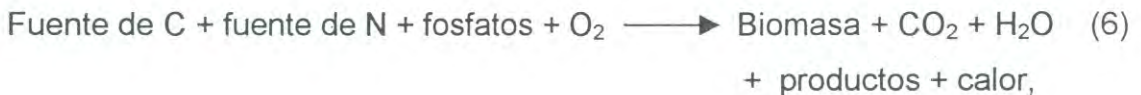
Las suspensiones de microorganismos dispersan la luz y producen turbidez cuando el Índice de refracción del medio es diferente del índice de refracción del microorganismo. Esta turbidez se puede medir a partir de una densidad de población de  $10^6$ /ml. La estimación del crecimiento microbiano por turbidimetría consiste en medir la absorbancia de la luz no dispersada de una suspensión celular la cual es proporcional, dentro de ciertos límites, a la masa celular o al número de células. Esta se lleva a cabo en un espectrofotómetro previa construcción de una curva de calibración que relacione la turbidez con un método directo tal como cuenta directa, cuenta en placa de células o peso seco de la biomasa. El incremento en la población microbiana en el medio de cultivo de prueba, sería un reflejo de la degradación del plaguicida, en el caso de que este fuera la única fuente de carbono y energía (Tortora y col., 1992; Grady, 1985).

## Medida de la biomasa seca

Una estimación directa de la biomasa consiste en cosechar los microorganismos, centrifugarlos, secarlos y determinar el peso seco. Se deben tomar precauciones para evitar la lisis por choque osmótico durante los lavados de las células, sobre todo durante las etapas de crecimiento exponencial, por lo que el uso de soluciones isotónicas durante esta operación son muy convenientes. Este es probablemente el método más exacto para medir la biomasa, aunque tiene la desventaja de requerir una muestra relativamente grande de células y de ser un método tedioso (Wang y col., 1979).

## Medición de los componentes celulares

Cuando la composición del medio dificulta la medición directa de la masa o densidad celular, se tiene que recurrir a métodos indirectos. Considerando la estequiometría general del crecimiento:



se puede medir el consumo de nutrientes o la formación de algún producto y correlacionarlo con el crecimiento microbiano (Wang y col., 1979).

Uno de los métodos más utilizados para medir indirectamente el crecimiento microbiano es el contenido de proteína, ya que es constante durante el metabolismo celular, de tal forma que su incremento solo se da por efecto del crecimiento. Los métodos más comunes para determinar proteína durante el crecimiento celular son el método de Biuret, que determina uniones peptídicas en células integras o lisadas por tratamiento alcalino; y el de Lowry que mide amino ácidos aromáticos después de la hidrólisis alcalina de la proteína. Este método es dependiente de la composición de amino ácidos de la proteína y algunos compuestos como glucosa y urea son interferentes, aunque

es 60 veces más sensible que el anterior (Wang y col., 1979; Agar, 1985).

Otros parámetros que son relacionados al crecimiento y que pueden ser indicadores del metabolismo de la degradación de un compuesto químico son el consumo de oxígeno, expresado como demanda bioquímica de oxígeno (DBO), producción de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y carbón orgánico disuelto, entre otros (Malette, 1971).

### **Evaluación de la Biodegradación**

Una vez que se ha obtenido un cultivo puro o mixto con capacidad de biodegradar o biotransformar el compuesto xenobiotico, se deben hacer estudios tendientes a evaluar en forma precisa la capacidad de biodegradación del plaguicida (Alleman y col., 1993). No se debe olvidar que los microorganismos a pesar de ser microscópicos son también seres vivos los cuales pueden estar sujetos a los efectos adversos causados por la exposición a sustancias químicas (La Grega y col, 1996).

La mayoría de los plaguicidas son volátiles a las condiciones de operación de la cromatografía de gases por lo que esta técnica es la más empleada para determinar este tipo de compuestos. Ciertos plaguicidas no volátiles pueden ser derivatizados antes de su determinación por cromatografía de gases. La separación y purificación de los plaguicidas depende de su polaridad, carácter iónico así como de su estabilidad, por lo que la forma de extracción de los compuestos depende del tipo de matriz en la que se lleva a cabo la determinación. En el caso de matrices líquidas como sistemas acuosos (agua potable, residual, subterránea, caldos de cultivo, entre otros) la extracción por lo general se hace mediante el clásico método de extracción líquido- líquido usando un disolvente orgánico adecuado. Recientemente se ha desarrollado una técnica sensible, rápida y con buena recuperación de productos como lo es la extracción en fase sólida, la cual utiliza fases no polares para este propósito (Jain y Ali, 1997; Bandala, 1998).

La cromatografía de gases consiste en separar los compuestos de una mezcla disuelta en una fase móvil, al pasar a través de una fase estacionaria,

forzada por una corriente de un gas inerte. Los componentes de la mezcla se separan en el recorrido por la distribución diferencial de cada uno de ellos entre las dos fases, provocando un retardo en la movilidad de un componente con respecto a los otros y separándose. Esto se refleja en un parámetro denominado tiempo de retención ( $t_R$ ) que bajo las mismas condiciones de operación, es característico para cada compuesto y es el tiempo que transcurre entre la inyección de la muestra y la detección de cada compuesto (Storbel, 1973).

Para lograr una buena separación es necesario obtener picos esbeltos y bien separados, es decir resueltos, lo cual se logra escogiendo la columna con una fase estacionaria adecuada y operando bajo las condiciones óptimas. Recientemente la eficiencia de separación ha sido mejorada con el empleo de columnas capilares de 10 a 100 m de largo, con un diámetro interno del orden de 0.05 a 0.53 mm donde una película de 0.1 a 10  $\mu\text{m}$  de un polímero de alto peso molecular constituye la fase estacionaria que recubre la superficie interna (Storbel, 1973).

Una vez separados los compuestos son detectados a la salida de la columna, al pasar por un detector. Existen diferentes tipos de detectores unos universales como el de conductividad térmica y otros específicos para determinado tipo de compuestos como es el caso del detector de captura de electrones que es selectivo para compuestos organoclorados (Storbel, 1973).

El instrumento consta de una fuente de gas acarreador el cual puede ser un gas inerte como He, Argón o nitrógeno, un puerto de inyección el cual es mantenido a una temperatura que favorezca la volatilización de la muestra; una columna localizada en un horno con temperatura controlada para promover la separación de la muestra y finalmente un detector apropiado. El tamaño de la señal del detector es registrada para generar un patrón gráfico en forma de picos resueltos de los compuestos con respecto al tiempo. El tiempo de retención

identifica al compuesto por comparación con un estándar y la integración del área bajo el pico nos da una estimación de la cantidad de compuesto en la muestra (Storbel, 1973).

### **Biorremediación**

La biorremediación consiste en utilizar organismos vivos para reducir o eliminar el riesgo ambiental que representa la acumulación de compuestos tóxicos y otros desechos peligrosos. La biotecnología desde hace tiempo se ha encargado de la eliminación de sólidos orgánicos a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales pero con la biorremediación se intenta acelerar e intensificar los procesos de degradación de contaminantes (Hill, 1996).

La biorremediación ha sido utilizada exitosamente en la degradación de varios tipos de compuestos del petróleo en suelos y aguas subterráneas contaminados, como lo representa el caso de la limpieza del sitio en Alaska ocasionado por el derrame masivo de hidrocarburos. Sin embargo, existen numerosos casos donde la biorremediación ha sido efectiva como son sitios expuestos a derrames de químicos, fugas de tanques de almacenamiento de hidrocarburos y derivados del petróleo así como de desechos industriales. Estas tecnologías resultan ser una alternativa atractiva para la descontaminación de suelos y acuíferos ya que son económicas, limpias y están unidas a los procesos naturales (Caplan, 1993).

### **Aspectos a Considerar en la Biorremediación**

Existen algunos factores que deben ser considerados al aplicar una tecnología de biorremediación de un compuesto tóxico como es la naturaleza físico química del compuesto, las características metabólicas de los microorganismos presentes en la naturaleza así como las condiciones ambientales del sitio.

## **La naturaleza físico química del compuesto**

Los compuestos orgánicos sintetizados en la naturaleza son más fácilmente biodegradados por los microorganismos con relación a los sintetizados industrialmente por el hombre, ya que estos difieren de los compuestos naturales en la estructura química, por tener unidos átomos de cloro o grupos hidroxilos en diferentes posiciones de la molécula que hacen difícil el reconocimiento de las enzimas de los microorganismos por ellos; esto determina su persistencia en la naturaleza, es decir el tiempo que permanecerán sin ser degradados. Algunos compuestos xenobióticos como el Clordano, Dieldrin y DDT aun se siguen detectando después de 21 y 24 años (Cámara, 1992; Alexander, 1980b; Grady, 1985).

Las características físico químicas del compuesto xenobiótico determinan las interacciones de este con los constituyentes del suelo, como se da en ciertos coloides que adsorben ciertas sustancias tóxicas ocasionando una pérdida de potencia del compuesto por su indisponibilidad. Algunos compuestos que pueden tener poca retención en el suelo ya que son muy volátiles movilizándose del suelo al aire. Algunos son solubles en agua y también pueden ser transportados por las corrientes de agua, originando la desaparición del sitio donde fueron aplicados relocalizándose frecuentemente en mantos subterráneos. Esto no significa que haya desaparecido, simplemente que se dio un cambio de lugar. En algunos casos sufren reacciones hidrolíticas abióticas modificando su toxicidad sin eliminarla por completo, mientras que la participación de organismos vivos en la degradación puede lograr a la mineralización completa del xenobiótico (Alexander, 1980b).

## **Características metabólicas de los microorganismos**

La capacidad biodegradadora que en la actualidad presentan muchas especies de microorganismos se ha dado a través de su evolución en la naturaleza en aproximadamente cuatro millones de años. Los plaguicidas y otros compuestos xenobióticos, podrían ser degradados únicamente si se

presentan como sustratos de las enzimas adaptadas y que han sido adquiridas por los microorganismos durante su evolución, para lo cual se requiere que los xenobióticos presenten estructuras similares a la de los sustratos naturales; a su vez esto los habilita para ser utilizados como fuentes múltiples de nutrientes y de energía (Cámara, 1992; Grady, 1985).

### **Factores ambientales**

Entre los principales factores ambientales a considerar en la biorremediación de un sitio contaminado, están aquellos que tienen que ver con proveer a los microorganismos de las condiciones adecuadas para su desarrollo y actividad degradadora como serían la disponibilidad de nutrientes, humedad del sitio, pH, temperatura, principalmente (Ortiz.-Hernández y col., 1997).

En suma, para que la biorremediación tenga éxito se deberá contar con una población de organismos con la capacidad de biodegradar el contaminante y a una velocidad razonable sin generar productos tóxicos. De igual manera deberá asegurarse la ausencia en el sitio de inhibidores que pudieran impedir la acción de los organismos, los cuales deberán a su vez contar con los nutrientes necesarios para su crecimiento o actividad. De gran importancia es el generar una tecnología que sea costeable en comparación con otras que también degraden el químico (Alexander, 1994).

### **Técnicas de biorremediación**

Se han generado algunas tecnologías de restauración algunas de las cuales están diseñadas para aplicarse *in situ*. Es decir donde los organismos degradan el contaminante directamente en el sitio o bien, *ex situ*, que involucra la movilización del material contaminado a un área que facilite su tratamiento. En la Tabla 2, se resumen algunas de las principales tecnologías aplicadas.

En la aplicación de estas tecnologías se han utilizado dos enfoques: uno que tiene que ver con el aprovechamiento del potencial de microorganismos nativos para degradar xenobióticos a los que han sido previamente expuestos, y



Tabla 2. Tecnologías de biorremediación.

Tecnología	Característica
Bioaumentación	Adición de microorganismos nativos al sitio contaminado
Bioestimulación	Adición de nutrientes para estimular la actividad microbiana
Bioventeo	Introducción de oxígeno a través del suelo para estimular el crecimiento de microorganismos aeróbicos
Composteo	Formación de pilas con el material contaminado; se aplica aire para favorecer condiciones termofílicas
Biocultivo	Tratamiento en fase sólida en sitios confinados para tener los lixiviados que se forman
Biosorción	Uso de microorganismos con afinidad para adsorber metales

**Fuente: Ortiz-Hernandez, (1997).**

por tanto adaptados a los sitios contaminados; el otro enfoque es el de aprovechar microorganismos genéticamente diseñados para degradar determinados xenobióticos, los cuales deberán adaptarse a las condiciones del sitio donde serán aplicados (Alexander, 1994).

# MATERIALES Y METODOS

## Descripción General del Trabajo

Para el aislamiento de microorganismos nativos con capacidad de degradar DDT de la región del Valle del Yaqui, se tomaron muestras de sitios de suelo, agua y sedimento donde se hubieran utilizado y aplicado este plaguicida.

Se preparó un inóculo mezclando muestras de suelo, agua y sedimento previamente homogeneizadas. El aislamiento de los microorganismos se realizó por enriquecimiento del cultivo siguiendo dos procedimientos paralelos: 1) con medio mínimo y DDT para seleccionar microorganismos que degradaran directamente al plaguicida como única fuente de carbono; 2) inoculando el medio mínimo con DDT y glucosa como una fuente de carbono adicional, para favorecer la selección de microorganismos que transformaran al plaguicida por cometabolismo. En ambos casos se utilizó cultivo intermitente.

Se evaluó el crecimiento y la capacidad para biodegradar DDT del cultivo mixto aislado y seleccionado. Se caracterizó la morfología celular y de colonia de la población aislada. Se realizó la caracterización microbiológica de cada una de las cepas puras que integran el cultivo mixto logrando su identificación mediante pruebas bioquímicas.

En la Fig. 3 se muestra el diagrama de flujo que describe la estrategia general utilizada en el desarrollo de este trabajo.

## Materiales

### Reactivos

DDT estándar [1,1,1- Tricloro-2,2-bis (p- clorofenil) etano] con una pureza de 98 % ; DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano y DDE [1,1-dicloro-2,2 bis(p-clorofenil)etileno fueron adquiridos de Supelco Co.; DDT comercial al 75% obtenido a través de la Secretaría de Salud Pública; Albumina de suero de

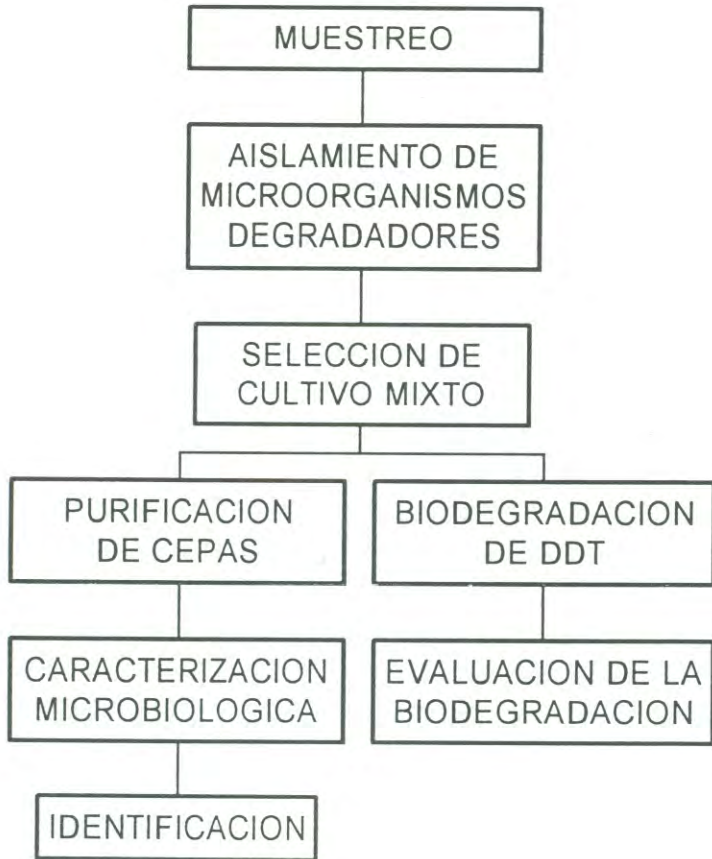


Figura 3. Descripción general del trabajo.

bovino (BSA),  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $NH_4SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , NaOH,  $Na_2SO_4$  anhidro, Hexano (grado cromatografico), Eter etílico (grado cromatográfico) y Acetona fueron adquiridos de SIGMA.

## **Métodos de Cultivo y Evaluación de Crecimiento**

### **Muestreo**

Se hicieron muestreos en la región del Valle del Yaqui de sitios contaminados que tuvieran un historial de contaminación o de manejo de plaguicidas de entre 15 a 25 años, ya que es en estos lugares donde existe mayor probabilidad de aislar microorganismos con capacidad de biodegradarlos.

Se tomaron seis muestras de suelo del sitio donde se encontraba ubicada una bodega de insecticidas que estuvo en funcionamiento 15 a 20 años atrás, dentro de las instalaciones de los terrenos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Se tomaron dos muestras de sedimento de la parte superficial de un canal situado a un costado de la mencionada bodega. Se tomaron dos muestras de un campo agrícola y tres muestras de los hangares de una pista de aterrizaje de avionetas fumigadoras abandonada. Todas las muestras fueron de aproximadamente 500 g recolectadas a una profundidad de 4 a 10 cm utilizando una pala de jardín y fueron almacenadas en bolsas de plástico. Las temperaturas de los sitios de muestreo fluctuaron entre 31° y 39° C. Adicionalmente se tomó una muestra de agua residual de la parte superficial del cauce del colector número 1 de la ciudad, utilizando un frasco de 1 litro de Nalgene estéril con tapón de rosca. Todas las muestras se guardaron en una hielera de frigolit, para su transporte y almacenamiento manteniéndose ahí hasta su utilización por un tiempo no mayor de 24 horas.

## Preparación del inóculo

Las muestras de suelo y sedimento se vaciaron en un recipiente de plástico y se mezclaron durante una hora hasta lograr una mezcla homogénea. En un vaso de precipitado se colocaron 250 g de la mezcla anterior, se añadieron 250 ml de la muestra de agua residual previamente homogenizada y 700 ml de agua destilada. Se homogenizó la mezcla con una espátula metálica y se midió el pH. Esta suspensión se dejó reposar hasta que los sólidos sedimentaron. Se tomó una alícuota del sobrenadante para utilizarla como inóculo.

## Aislamiento

Para el aislamiento de bacterias que utilizan DDT como única fuente de carbono se utilizó un medio de cultivo a base de sales minerales y DDT comercial. Para el aislamiento por cometabolismo se agregó además glucosa como una fuente de carbono adicional. Se preparó un medio a base de sales minerales con la siguiente composición en g/l:  $K_2HPO_4$ , 1.73 ;  $KH_2PO_4$ , 0.68;  $NH_4SO_4$ , 1.0;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0.02;  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0.03; y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.03 (Gary y col., 1982). Se esterilizó el medio de cultivo a 121 °C por 15 minutos y se distribuyó en dos series de 3 matraces Erlenmeyer de 250 ml, dosificado cada matraz con 1, 25 y 100 ppm de DDT, a partir de una solución madre de 10, 000 ppm de DDT comercial al 75 % de pureza, disuelto en acetona y centrifugado para remover el emulsificante que lo acompaña. A una serie de matraces se le adicionó además glucosa al 0.1% como una fuente de carbono adicional. Los matraces se inocularon con 5% del inóculo descrito anteriormente y se ajustó el volumen final a 25 ml. La boca de los matraces fue cubierta con torundas de algodón para favorecer el intercambio de oxígeno y se incubaron a 28 °C en una incubadora agitada ( New Brunswick Scientific Co., INC, serie 25) a 200 rpm hasta observar crecimiento.

De los cultivos que presentaron crecimiento se seleccionó el que creció en 100 ppm de DDT como única fuente de carbono, por haber soportado la mayor concentración de este insecticida en su crecimiento.

Se cosechó el paquete celular por centrifugación del caldo de cultivo a 14, 000 x g por 15 minutos en una centrífuga (Biofuge 17 R de Baxter Scientific Products) descartando el medio de cultivo agotado. El paquete celular se lavó tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.0 previamente esterilizada (Hunter-Cervera y Col., 1986) y se centrifugó después de cada lavado. El paquete celular lavado se transfirió a tubos de ensaye estériles de 18 por 150 mm y se resuspendió en 3 ml del mismo medio fresco en el que fue aislado y se almacenaron en refrigeración hasta ser utilizados.

### **Cultivo intermitente**

Para evaluar el crecimiento y la biodegradación del DDT se utilizó una serie de matraces Erlenmeyer de 125 ml por triplicado. A cada uno de los matraces se le adicionó medio de sales minerales y se dosificaron con 133 ppm de DDT comercial centrifugado. Un matraz de cada serie fue utilizado como control sin inocular.

### **Determinación de proteína.**

Se inocularon los dos matraces restantes de cada serie con el cultivo mixto en crecimiento logarítmico, se ajustó a una concentración celular inicial correspondiente a 46  $\mu\text{g/ml}$  proteína y se aforó a un volumen final a 10 ml. Se inició la corrida incubando a 28 °C con una agitación de 150 rpm. Se realizaron muestreos a diferentes intervalos de tiempo durante el crecimiento, sacrificando para análisis tres matraces en cada muestreo. Para evaluar el crecimiento se determinó proteína y peso seco al paquete celular. Para evaluar la biodegradación de DDT, se determinó DDT residual por cromatografía de gases.

Se determinó el contenido de proteína en el paquete celular por el método de Lowry, adaptado para el análisis de microorganismos (Norris, 1969). Para lo

anterior, se colocó en un tubo de ensaye una alícuota de 0.5 ml de la suspensión de microorganismos previamente lavada. Se adicionaron 0.5 ml de NaOH 1.0 N, el tubo se colocó en un baño de agua hirviendo por 5 minutos y posteriormente se enfrió con agua fría. Se añadieron 2.5 ml de una mezcla de reactivos recién preparada, consistiendo en 50 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5 %, 2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en tartrato de potasio al 1% y se dejó reposar 10 minutos. Después se agregaron 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu 1.0 N, se agitó el tubo inmediatamente en un agitador vortex y se dejó reposar 30 minutos para desarrollo de color. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 3) previamente calibrado con un blanco de reactivos. Se cuantificó la proteína en base a una curva de calibración utilizando como proteína estándar albúmina de suero de bovino en un rango de concentraciones de 50 – 200  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de aforo de 0.5 ml. A estas muestras se les dio el mismo tratamiento que a la muestra problema, incluyendo la etapa de calentamiento previamente descrita.

### **Determinación de peso seco**

Para la determinación de peso seco del paquete celular, se utilizó una serie de nueve matraces Erlenmeyer de 500 ml por duplicado, a cada uno de los cuales se adicionó medio mínimo de sales minerales estéril dosificado con 133 ppm de DDT comercial centrifugado. Los matraces se inocularon con 5% de un cultivo en fase logarítmica en un volumen total de 50 ml y se incubaron a 28 °C en una incubadora con agitación a 150 rpm. Se realizaron muestreos a diferentes intervalos de tiempo durante el crecimiento, sacrificando en cada muestreo matraces por duplicado. Simultáneamente se evaluó el contenido de proteína. Se obtuvo el paquete celular centrifugando el contenido de cada muestra a 14, 000 x g por 10 minutos, usando tubos de Nalgene de 50 ml, previamente tarados y mantenidos en un desecador con Silica gel con indicador de humedad para su equilibrio. Se extrajo el sobrenadante de cada tubo con una pipeta Pasteur cuidando de no acarrear células. Se secaron las células a 50 °C en una incubadora (VWR 1510E), hasta obtener peso constante.



Los paquetes celulares secos se guardaron en el desecador; se pesaron en una balanza analítica (Metler Toledo) y se registro el peso seco de cada muestra (Mallete, 1971).

### **Evaluación de la biodegradación**

Para evaluar el contenido de DDT residual se siguieron las recomendaciones del método oficial 608 del "EPA Methods for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater" el cual fue adaptado para este trabajo.

**Extracción de DDT.** En un embudo de separación de 30 ml se extrajo el volumen total de 10 ml del cultivo con una mezcla de hexano-eter etílico 3:1(v/v), en una proporción 1:1 de muestra/solvente. Las muestras se acidificaron adicionando una gota de  $H_2SO_4$  concentrado. Se hicieron dos extracciones a cada muestra agitando el embudo por 5 minutos y dando un reposo de 15 minutos después de cada extracción para facilitar la separación entre las fases orgánica y acuosa. Se juntaron los extractos orgánicos en el embudo de separación y se agregaron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro (previamente activado por calentamiento a 400 °C en una mufla por 4 horas) para eliminar el contenido de agua de la muestra. Se recolectó el extracto seco, se enjuagó el sulfato de sodio con 4 ml de solvente para extraer el DDT adsorbido mezclándose con el extracto anterior. El extracto seco se evaporó en un rotavapor (Labconco Rotary Evaporator) hasta reducir su volumen a 2 ml, se vació en un vial de vidrio de 12 ml, se evaporó hasta sequedad en una campana de extracción y se guardó en congelación hasta su análisis.

**Cromatografía de gases.** Para determinar la degradación de pesticidas organoclorados DDT, DDD y DDE en los caldos de cultivo, los extractos fueron diluidos apropiadamente en hexano grado cromatográfico y analizados en un cromatógrafo de gases (Varian 3800) equipado con detector de captura de electrones. Para la separación de los compuestos se utilizó una columna

DB<sup>TM</sup> -5 (5% fenil, metil-polisiloxano) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0.25  $\mu$ m. La columna fue operada a una temperatura inicial de 140 °C mantenida durante 1 minuto; después se incrementó hasta 240 °C mediante un programa de temperatura a razón de 20 °C/min, y se mantuvo 1 min; finalmente se elevó a 265 ° a razón de 10° C/min, manteniendo esta temperatura por 2 min. La columna fue operada a un flujo constante de 1.7 ml/min. El gas acarreador fue nitrógeno de alta pureza. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 250° C y 300° C respectivamente. Las inyecciones fueron de 1  $\mu$ l manejadas en modo sin división. La cuantificación se realizó en base a una curva estándar elaborada para cada uno de los compuestos a ser analizados, en un rango de concentración de 0 a 100 ppb, mediante calibración con estándar externo. La identificación de DDT, DDD y DDE se hizo por comparación de los correspondientes tiempos de retención con respecto a los estándares puros.

### **Evaluación de la Tolerancia del Cultivo a la Concentración de DDT en el Medio**

Para evaluar la tolerancia del cultivo creciendo en DDT, se llevaron a cabo una serie de cultivos intermitentes independientes dosificados con 50, 200 y 400 ppm de DDT estándar en el medio. Se utilizaron por duplicado matraces Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo a base de sales minerales suplementado cada uno con diferente concentración de DDT. Los matraces se incubaron a 28 °C agitando a 150 rpm durante 3 semanas. Se determinó por sacrificio de matraz la proteína y DDT residual al inicio y al final de la corrida por los métodos ya descritos.

## **Caracterización Microbiológica del los Cultivos**

### **Purificación de los cultivos**

La purificación del cultivo mixto se llevó a cabo mediante el método de placa vaciada de una dilución apropiada en medio de agar sales minerales suplementado con 100 ppm de DDT. Las placas se incubaron a 28 °C hasta observar su crecimiento. A partir del crecimiento de colonias aisladas se hicieron varias resiembras sucesivas para su purificación en medio de agar nutritivo suplementado con 100 ppm de DDT.

### **Caracterización microbiológica**

La morfología colonial se determinó de acuerdo a la observación de su apariencia general (forma), color, diámetro, consistencia, elevación y margen (Johnson y Case, 1989). La caracterización celular se llevó a cabo por medio de la tinción gram, utilizando un microscopio óptico de contraste de fases (LEICA ATC™ 2000).

### **Identificación bioquímica**

A las cepas puras se les practicaron pruebas primarias de identificación consistentes en su examen microscópico, tinción gram para determinar su forma y agrupación, así como las pruebas bioquímicas convencionales como catalasa, oxidasa, óxido-fermentación, fermentación de glucosa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, así como motilidad. Adicionalmente se realizaron pruebas secundarias y terciarias para poder determinar género, familia y especie. En estas pruebas se determina la actividad de una vía metabólica mediante un conjunto de reacciones químicas a partir de un sustrato que se incorpora al medio de cultivo y que la bacteria al crecer puede o no transformar (Mac Faddin, 1991).

## Análisis Estadístico y Manejo de Datos

Los parámetros que se consideraron como representativos para seguir el comportamiento del sistema experimental fueron proteína, peso seco y concentración de plaguicida.

Determinación de proteína: cada punto de muestreo se analizó por triplicado, cuantificados en una curva de calibración previamente construida.

La curva de calibración se construyó usando BSA como proteína patrón. Del análisis de regresión lineal se obtuvo el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) y la pendiente de la recta ( $m$ ).

En la determinación de peso seco, los análisis se realizaron por duplicado y los valores promedio obtenidos se correlacionaron con los correspondientes valores de la determinación de proteína. Del análisis de regresión lineal, se obtuvo el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) y la pendiente de la recta ( $m$ ).

En la determinación de la concentración de DDT, DDD y DDE residual, el análisis de cada muestra se realizó por duplicado y las concentraciones fueron estimadas en base a una curva de calibración previamente construida con estándares puros para cada uno de los compuestos a analizar. Se determinó el error estándar en cada punto de muestreo. Los picos generados fueron procesados e integrados automáticamente para obtener el área y calcular la concentración usando el software Start Workstation versión 5.3.

Para el análisis de regresión y la construcción de gráficas se utilizó el paquete Sigma Plott versión 2.01.

## RESULTADOS

### **Aislamiento de Microorganismos Degradadores de DDT**

En todos los procedimientos de aislamiento implementados, tanto para bacterias como para hongos se observó crecimiento en presencia de DDT en el medio como fuente de carbono. Como se reporta en la Fig. 4, se aislaron algunos cultivos mixtos mediante enriquecimiento del cultivo. Se seleccionó el cultivo mixto de bacterias aisladas en medio mínimo suplementado con 1, 25 y 100 ppm de DDT para evaluar su capacidad para biodegradarlo. Estas poblaciones fueron aisladas de un hábitat cuyo análisis reportó un contenido de 46 ppb de DDT, 11 ppb de DDD y 37 ppb de DDE. El cultivo mixto seleccionado para el estudio mostró un crecimiento aparente en medio de sales minerales, utilizando DDT como única fuente de carbono y no fue necesario, en esta fase, agregar al medio factores que estimularan su crecimiento.

### **Caracterización de Cepas Degradadoras de DDT**

En la Tabla 3 se muestra la morfología celular y de colonia de las cepas purificadas a partir del cultivo mixto seleccionado por su habilidad para crecer en DDT como única fuente de carbono. En las primeras etapas de purificación de cepas las colonias fueron fácilmente observables a simple vista, pero a medida que se hicieron las resiembras sucesivas el crecimiento se hizo lento y el tamaño de las mismas disminuyó, dificultándose además la apreciación de las colonias por la similitud del color de éstas con el medio. La utilización de agar nutritivo suplementado con DDT en las subsecuentes etapas de purificación permitió un crecimiento y formación de colonias más vigoroso que facilitaron su diferenciación. Además fueron observados al microscopio, segmentos de hifas y agrupaciones ramificadas morfológicamente bacilares Gram (+) presumiblemente de actinomicetos; sin embargo éstos no pudieron ser aislados en el cultivo.

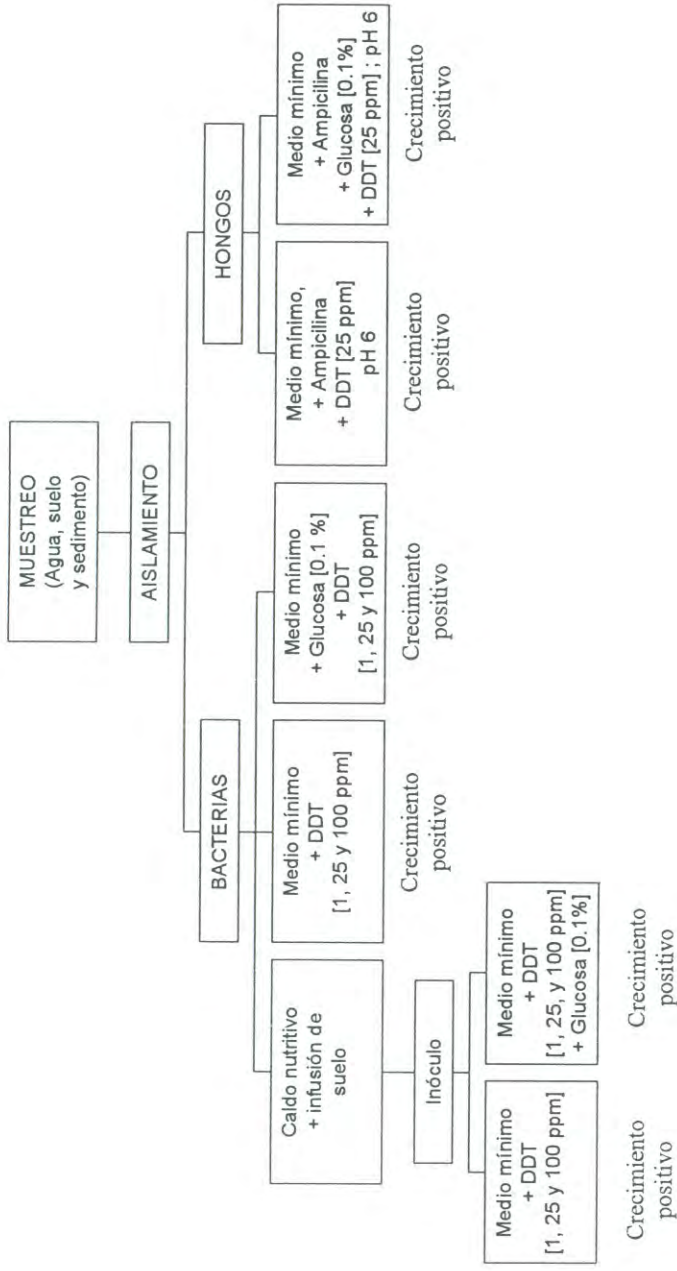


Figura 4. Microorganismos degradadores de DDT aislados

Tabla 3. Caracterización morfológica de cepas purificadas a partir de un cultivo mixto con capacidad para degradar DDT.

Cepa	Tinción Gram	Morfología celular	Color	Forma	Consistencia colonia	Margen colonia	Elevación colonia	Diámetro colonia (mm)
8S	-	cocobacilos	blanca	circular	cremosa	entero	umbonada	2
3AN	-	bacilos	crema	circular	cremosa	entero	convexa	2
MAN	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	> 0.5
GASM	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	> 0.5
2AN	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	1
3S	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	1
4S	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	1
AS	-	bacilos	blanca	circular	cremosa	entero	convexa	1

Adicionalmente, los resultados de las pruebas bioquímicas practicadas a cada una de dichas cepas se pueden observar en la Tabla 4, los resultados arrojan un cultivo mixto conformado tentativamente por cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Neisseria flavescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella bovis* y dos cepas aun no identificadas, presumiblemente del género *Neisseria*.

### **Determinación del Crecimiento Microbiano**

La determinación del crecimiento microbiano se realizó midiendo tanto proteína total como peso seco de la biomasa. En la Fig. 5, se muestra la curva estándar de proteína usando BSA como proteína patrón. La correlación de proteína con respecto al peso seco de células del cultivo seleccionado, creciendo en DDT como única fuente de carbono, se puede apreciar en la Fig. 6.

En un primer estudio de biodegradación se obtuvo la curva de crecimiento del cultivo mixto seleccionado creciendo en medio mínimo y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono. En la Fig. 7 se muestra el Ln de la concentración de proteína con respecto al tiempo y en el recuadro se tiene la regresión lineal correspondiente a la fase de crecimiento exponencial del cultivo. La pendiente de la recta permitió obtener el valor de la velocidad específica de crecimiento el cual fue de  $0.072 \text{ h}^{-1}$ , y a partir de este valor se calculó un tiempo de doblado de 9.62 h.

### **Biodegradación de DDT**

El DDT residual así como sus metabolitos DDD y DDE en el cultivo implementado para evaluar la biodegradación del plaguicida, fueron estimados por cromatografía de gases de los extractos orgánicos de las muestras

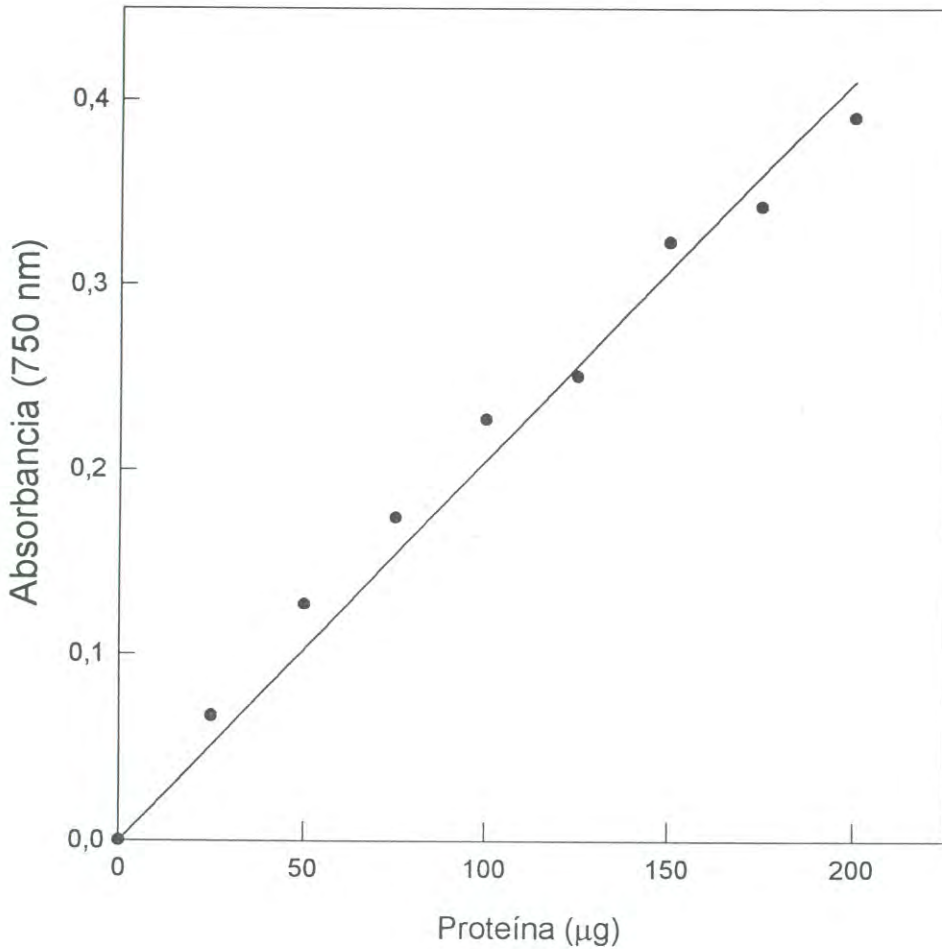


Tabla 4. Caracterización bioquímica de cepas purificadas a partir de un cultivo mixto con capacidad para degradar DDT.

PRUEBA BIOQUÍMICA	C E P A									
	8S	3N	MAN	GASM	2AN	3S	4S	AS		
Catalasa	+	+	-	-	-	+	+	+		
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+	+		
Requerimiento de O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	AF	A	A	A	A	AF	A	AF		
Oxidación de glucosa	+	-	-	-	-	-	-	-		
Fermentación de glucosa	+	+	-	-	-	-	-	-		
Motilidad	+	+	-	-	-	-	-	-		
Ornitina	+	+	-	+	+	+	+	+		
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-		
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-		
Licuefacción de gelatina	-	-	-	+	-	-	-	-		
H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	+	+	+	+		

1. AF = Anaerobio facultativo

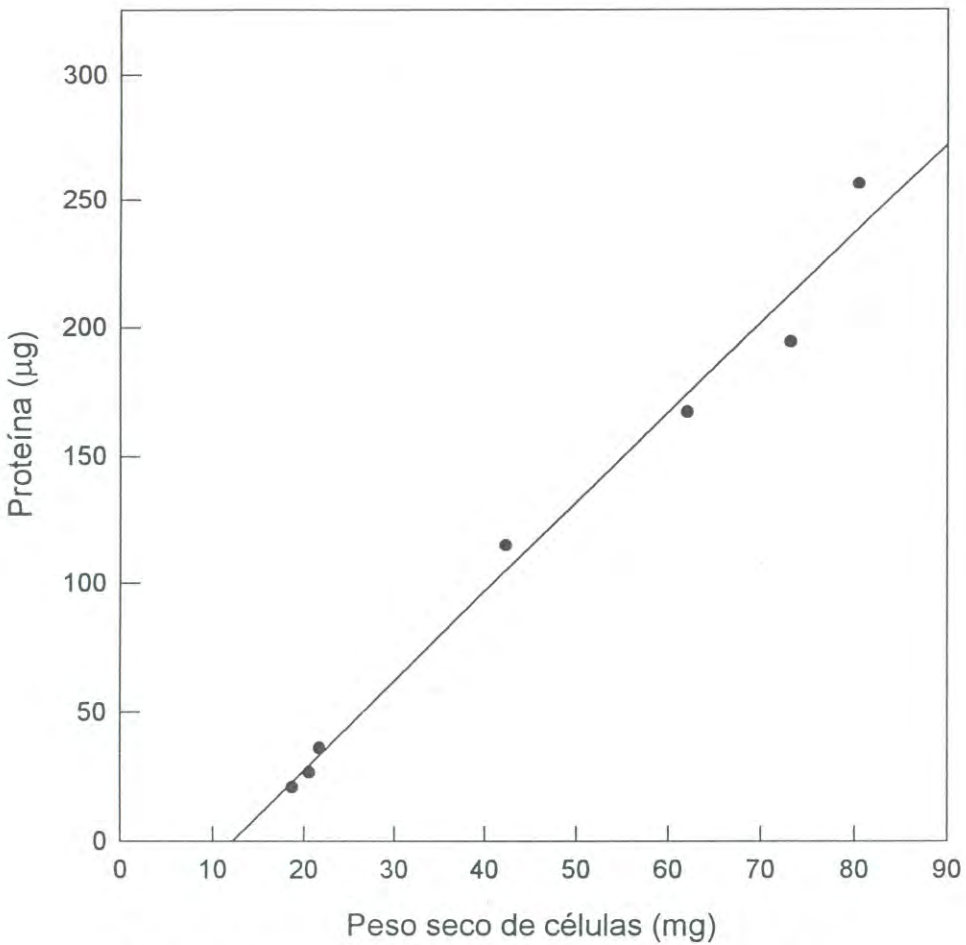
A = Aeróbico



**Figura 5. Curva estándar de proteína.**

Albúmina de suero de bovino (BSA) como proteína patrón.

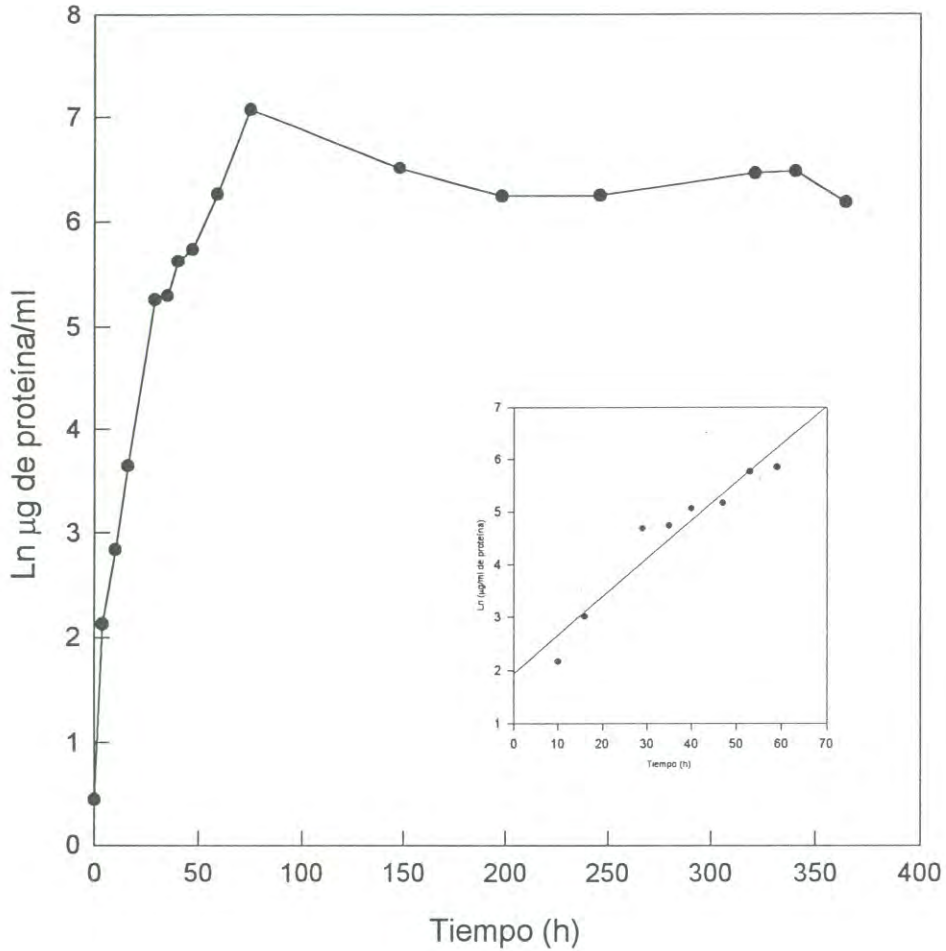
$$r^2 = 0.98$$



**Figura 6. Correlación de peso seco vs proteína**

Crecimiento de un cultivo mixto en medio de sales minerales y 133 ppm de DDT como única fuente de carbono.

$$b = -42,6 \quad m = 3,49 \quad r^2 = 0,98$$



**Figura 7. Curva de crecimiento de un cultivo mixto**

Crecimiento en medio mínimo y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono.

En el recuadro se presenta la regresión lineal en la región logarítmica. La pendiente de la recta da un valor de  $0.072 \text{ h}^{-1}$

correspondientes. Las curvas estándar obtenidas se muestran en la Fig. 8. Los picos se identificaron por sus tiempos de retención los cuales fueron de 9.02, 8.44 y 7.83 min para DDT, DDD y DDE respectivamente.

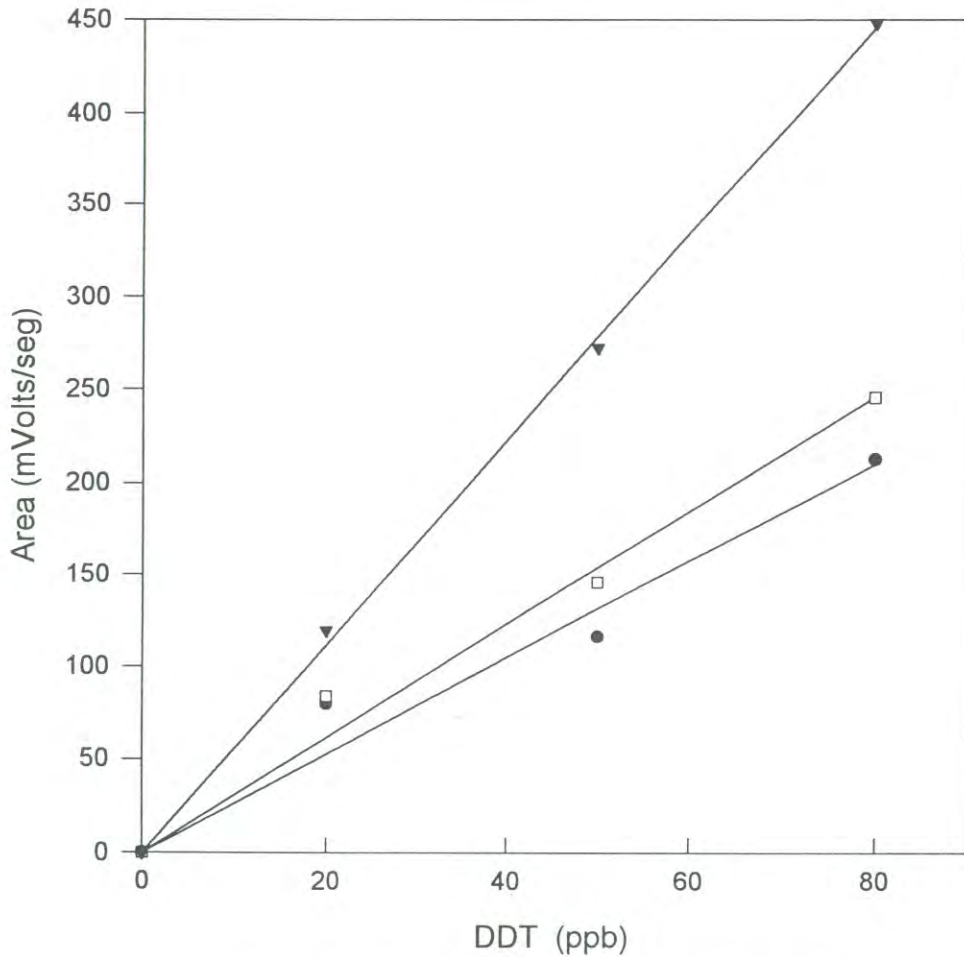
La Fig. 9 muestra la biodegradación de DDT por el cultivo mixto determinado en el caldo de cultivo sin el paquete celular. Paralelamente se muestra el crecimiento celular medido por el incremento en el contenido de proteína del paquete celular. El crecimiento fue sustentado por el DDT disponible como única fuente de carbono y fue casi completamente asimilado en las primeras 40 horas. El crecimiento continuó hasta alrededor de las 80 horas en las que el sustrato estuvo disponible en el medio, después de lo cual este declinó. La concentración de DDT en el blanco no varió durante el tiempo de incubación y fue equivalente a la concentración de DDT en el tiempo cero.

Cuando el contenido de DDT residual se determinó utilizando el cultivo completo (incluyendo el paquete celular) se observó que solo se asimiló aproximadamente el 40 % del DDT alimentado (Fig. 10). Aparentemente, alrededor del 60 % del DDT queda indisponible al parecer adsorbido al paquete celular. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente cuando se determinó el DDT disponible en el caldo libre de células.

En la Fig. 11 se puede observar que la degradación de DDD y DDE presentes en el medio original como impurezas acompañantes de DDT comercial ocurre paralelamente. El cultivo también los degradó completamente y no se observó incremento de estos metabolitos en ninguna fase del crecimiento.

### **Tolerancia del Cultivo a la Concentración de DDT en el Medio**

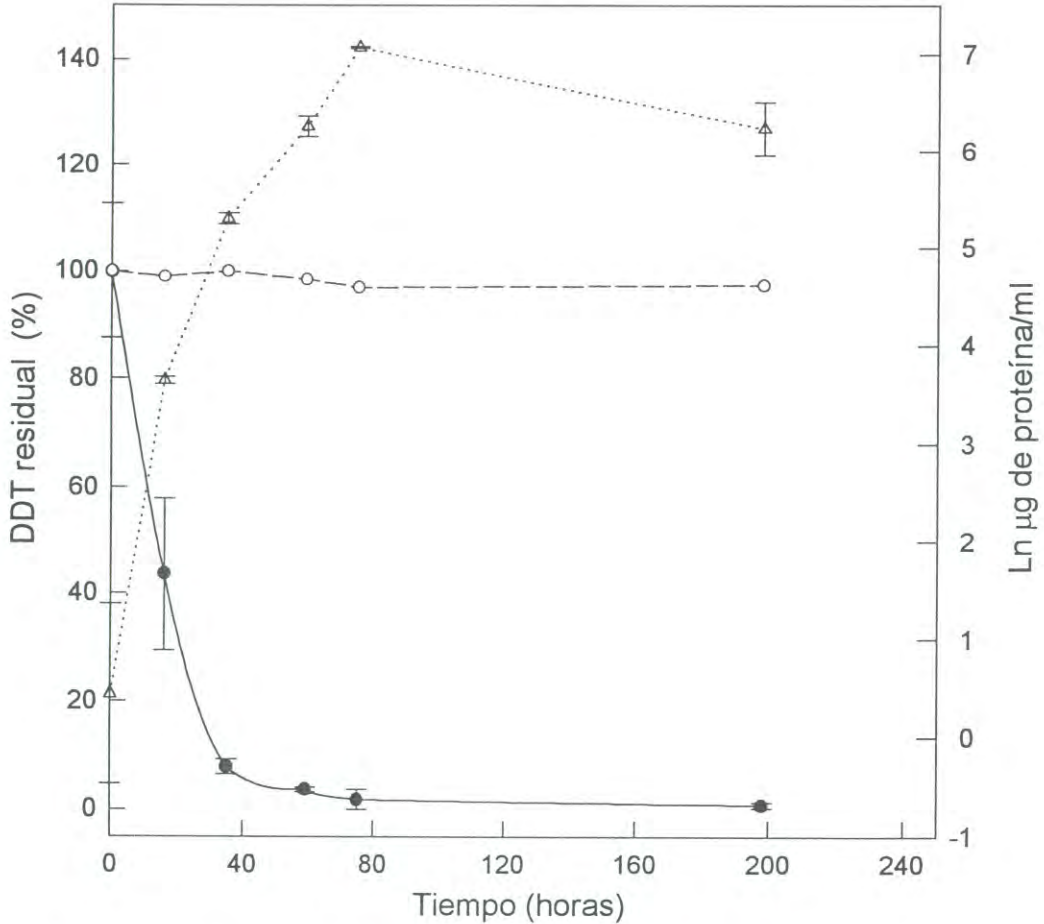
Experimentos tendientes a detectar el comportamiento de la población mixta al incorporarse en el medio una concentración creciente de DDT como única fuente de carbono se muestran en la Tabla 5. Se puede observar que el



**Figura 8. Curvas estándar correspondientes a DDT, DDD y DDE.**

La línea continua corresponde a una regresión lineal

● DDT    ▼ DDE    □ DDD

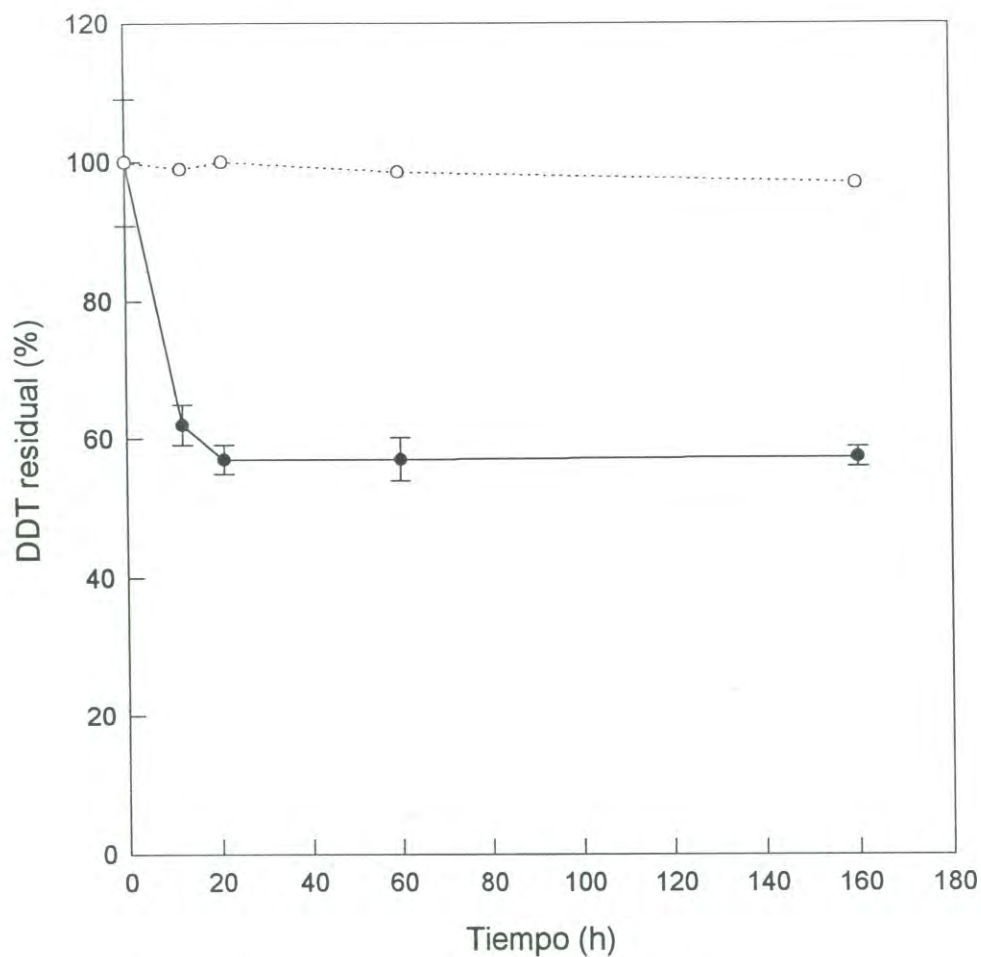


**Figura 9. Degradación de DDT por un cultivo mixto.**

Crecimiento en medio mínimo y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono

La concentración de DDT residual fue determinada por CG de extractos de caldo de cultivo libre de células y se reporta como porcentaje de la concentración de sustrato inicial.

- Concentración de DDT
- △··· Crecimiento celular
- Control, sin inocular

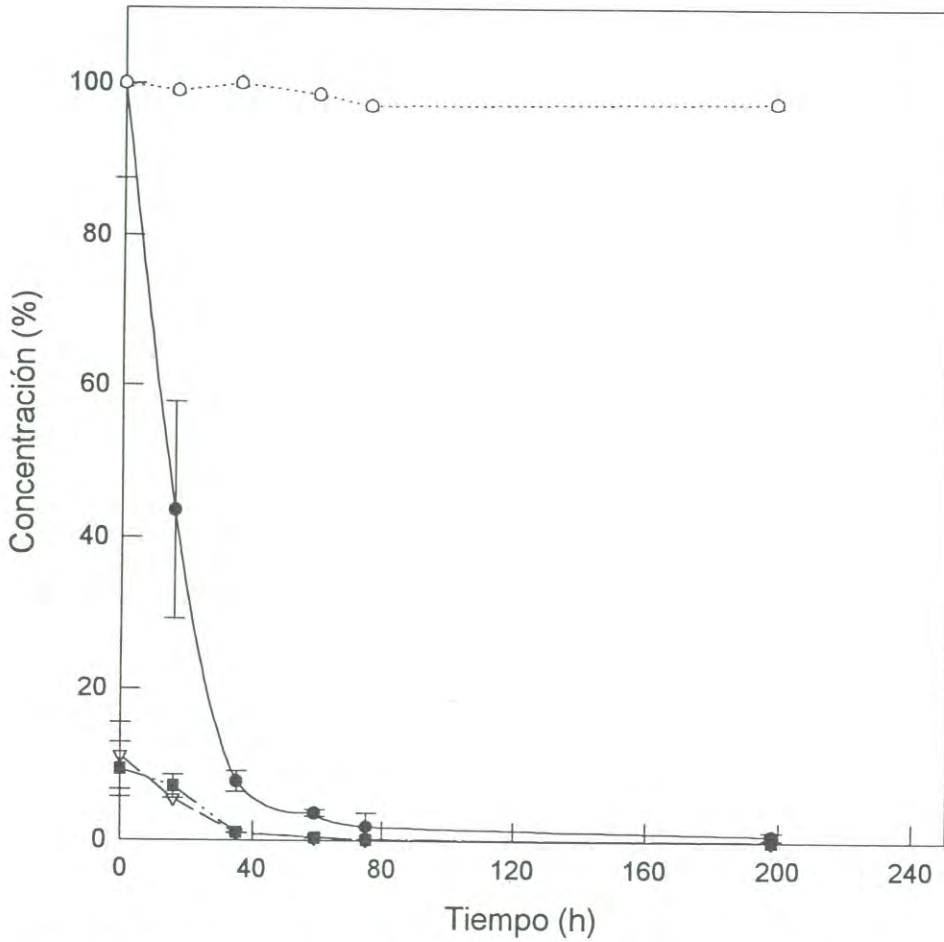


**Figura 10. Degradación de DDT residual**

El DDT se determinó por CG de extractos de una suspensión celular de un cultivo crecido en medio mínimo y 133 ppm de DDT comercial y se reporta como porcentaje del DDT inicial.

- Degradación de DDT
- Control sin inocular





**Figura 11. Degradación de DDT, DDD y DDE por un cultivo mixto**

Crecimiento en medio mínimo y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono. DDT, DDD y DDE se determinaron por CG.

—●— DDT    -▽- DDD    —■— DDE    ···○··· Control sin inocular

Tabla 5. Tolerancia del cultivo mixto a la concentración de DDT<sup>1</sup> en el medio de cultivo.

DDT dosificado (ppm)	Incremento proteína (g/ml)	Degradación DDT (%)
50	342	49.1
200	373	50.3
400	279	49.7

1. DDT estándar.

cultivo sostiene su crecimiento hasta concentraciones de 400 ppm en el medio, degradando el mismo porcentaje de sustrato sin observarse ningún efecto tóxico para la población degradadora, hasta este nivel de concentración.

## DISCUSIÓN

Para el aislamiento de organismos degradadores se utilizó como fuente de carbono DDT comercial con una pureza del 75 %, el cual viene formulado con 25 % de emulsificante. Esta es una de las principales formulaciones que se utilizaron en la agricultura años atrás a la que los microorganismos estuvieron expuestos en su hábitat, razón por la cual se decidió utilizarla en el aislamiento, considerando que de esta forma sería fácilmente reconocido por el metabolismo de los microorganismos ya adaptados a crecer en la presencia de este insecticida.

En la propagación del cultivo así como en el estudio de biodegradación se eliminó, por centrifugación, el emulsificante de la suspensión de DDT, con el fin de asegurar el crecimiento en DDT como única fuente de carbono y no en los otros componentes de la fórmula.

En este estudio se pudieron aislar exitosamente diversas poblaciones tanto en medios a base de DDT como única fuente de carbono, así como en aquellos medios suplementados con infusión del hábitat y con glucosa como fuente adicional de carbono. El éxito en el aislamiento se debió en parte a la selección adecuada del sitio de muestreo el cual proporcionó un hábitat previamente expuesto a plaguicidas organoclorados; de hecho se detectó la presencia de DDT, DDD y DDE en el análisis practicado a muestras del mismo. Aun cuando el DDT es una molécula difícil de degradar, el tiempo en que los microorganismos presentes en el hábitat muestreado estuvieron expuestos a él les permitió, posiblemente, evolucionar hacia el desarrollo de enzimas en su metabolismo capaces de actuar sobre el xenobiótico. Grady (1984) y Alexander (1980) han sugerido basados en sus observaciones, la conveniencia de que el microorganismo esté presente en el sitio contaminado para tener éxito en el aislamiento de degradadores de compuestos xenobióticos.

Del cultivo mixto se lograron purificar e identificar tentativamente algunas cepas como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Neisseria*

*flavescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella bovis* y dos cepas aun no identificadas, presumiblemente del género *Neisseria*, algunas de las cuales ya han sido reportadas como degradadoras de plaguicidas ( Kobayashy y Rittmann, 1982; Camara, 1992). Aun cuando no se comprobó la capacidad degradadora en cada una de ellas de manera individual, seguramente algunas de las cepas del consorcio tienen las enzimas necesarias para degradar DDT.

Aunque se obtuvo crecimiento en todos los procedimientos de aislamiento implementados, se seleccionó un cultivo mixto de bacterias creciendo en DDT como única fuente de carbono. Sin embargo, el resto de los cultivos aislados se conservaron para posterior evaluación, ya que se sabe de anteriores estudios de degradación de ciertos plaguicidas (Chaudhry y col., 1988) que los cultivos mixtos pueden modificar sus características degradativas y metabólicas con las resiembras.

La degradación de DDT por el cultivo mixto fue evidente, el cual permaneció viable durante el tiempo en que transcurrió la degradación, como se muestra en la Fig. 9. En esta gráfica también se puede apreciar que alrededor de las 40 horas se da el mayor consumo de DDT, sin mostrar una fase lag de inducción, característica de un cultivo que al momento de inocularlo está activo y en fase exponencial de crecimiento, por tener ya disponibles las enzimas para la utilización del xenobiótico. Lo anterior también se ve reflejado en la gráfica de crecimiento de la misma figura, donde tampoco se aprecia una fase lag. En estos casos, es de suma importancia el contar con un cultivo activo y vigoroso pues se está exponiendo a la población celular a condiciones adversas de crecimiento por la adición de un compuesto tóxico.

También se puede observar que se deja de consumir el DDT hasta que el cultivo llega a su fase estacionaria a partir de las 80 horas de crecimiento; solo alrededor del 40 % del DDT es utilizado en el crecimiento y el restante 60 % no parece haber sido utilizado, esto debido probablemente a la baja solubilidad del DDT en medio acuoso, la cual en solución saturada es de 1.2 ug/l (Zweig, 1967). Otra posibilidad es que el DDT se adsorba a las paredes de las

*flavescens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Moraxella bovis* y dos cepas aun no identificadas, presumiblemente del género *Neisseria*, algunas de las cuales ya han sido reportadas como degradadoras de plaguicidas ( Kobayashy y Rittmann, 1982; Camara, 1992). Aun cuando no se comprobó la capacidad degradadora en cada una de ellas de manera individual, seguramente algunas de las cepas del consorcio tienen las enzimas necesarias para degradar DDT.

Aunque se obtuvo crecimiento en todos los procedimientos de aislamiento implementados, se seleccionó un cultivo mixto de bacterias creciendo en DDT como única fuente de carbono. Sin embargo, el resto de los cultivos aislados se conservaron para posterior evaluación, ya que se sabe de anteriores estudios de degradación de ciertos plaguicidas (Chaudhry y col., 1988) que los cultivos mixtos pueden modificar sus características degradativas y metabólicas con las resiembras.

La degradación de DDT por el cultivo mixto fue evidente, el cual permaneció viable durante el tiempo en que transcurrió la degradación, como se muestra en la Fig. 9. En esta gráfica también se puede apreciar que alrededor de las 40 horas se da el mayor consumo de DDT, sin mostrar una fase lag de inducción, característica de un cultivo que al momento de inocularlo está activo y en fase exponencial de crecimiento, por tener ya disponibles las enzimas para la utilización del xenobiótico. Lo anterior también se ve reflejado en la gráfica de crecimiento de la misma figura, donde tampoco se aprecia una fase lag. En estos casos, es de suma importancia el contar con un cultivo activo y vigoroso pues se está exponiendo a la población celular a condiciones adversas de crecimiento por la adición de un compuesto tóxico.

También se puede observar que se deja de consumir el DDT hasta que el cultivo llega a su fase estacionaria a partir de las 80 horas de crecimiento; solo alrededor del 40 % del DDT es utilizado en el crecimiento y el restante 60 % no parece haber sido utilizado, esto debido probablemente a la baja solubilidad del DDT en medio acuoso, la cual en solución saturada es de 1.2 ug/l (Zweig, 1967). Otra posibilidad es que el DDT se adsorba a las paredes de las

células indisponiéndose a las células; este comportamiento ya ha sido observado en el trabajo de Bumpus y Aust (1987), quienes reportan el crecimiento de un cultivo a medida que se va dando el consumo de DDT, degradándose solo alrededor del 50% del insecticida dosificado. El mismo patrón de degradación ha sido señalado en los trabajos de Massé y col., (1980), en un cultivo creciendo en DDT. Se ha sugerido que la interrupción de la degradación pudiera deberse a un fenómeno de inhibición por acumulación de algún metabolito tóxico y/o agotamiento de algún factor esencial para el crecimiento. En el presente trabajo se pudo observar la presencia de DDT adherido al paquete celular en porcentaje que concuerdan con los reportados.

Si tal fuera el caso, se estarían presentando en el cultivo dos procesos simultáneos: la biodegradación del DDT disponible en solución y la inmovilización, quizá por biosorción, del resto de DDT en la biomasa. La adsorción de metabolitos a las paredes de los microorganismos ya ha sido señalada como causa de la indisponibilidad del sustrato (Juengst y Alexander, 1976). Posteriores estudios podrían clarificar y sugerir la forma de remover una mayor parte del DDT en el sistema. Una opción podría ser el uso de surfactantes los cuales se sabe incrementan la solubilidad del DDT al parecer compitiendo con los lípidos de la pared celular por el compuesto (You y col., 1996); cabe hacer notar que la mayoría de las cepas que conforman el cultivo son Gram (-) con paredes con gran proporción de lípidos.

Comparando los resultados obtenidos con otros reportados en la literatura este cultivo mixto degrada el 40% de DDT en alrededor de 3 días mientras que otros degradan 50% del sustrato en 9 días (Massé y col., 1989) o en 30 días como lo reporta Bumpus y col., (1987) para un cultivo de hongo, lo cual resulta ser ventajoso.

Algunos de los metabolitos conocidos de DDT como DDD y DDE, fueron detectados como impurezas acompañantes del DDT comercial usado en el medio. Sin embargo, estos fueron completamente degradados por el cultivo, como se puede observar en la Fig. 11. Durante el tiempo que duró el

que hace suponer que si estos fueron formados durante la degradación del DDT, el cultivo tuvo la capacidad metabólica de degradarlos. Esto es importante ya que se ha reportado que DDD y DDE resultan ser también tóxicos y relativamente estables (Laws, 1993; You y col., 1996).

Durante la experimentación para evaluar la biodegradación, el contenido de DDT en el blanco sin inocular no varió durante el tiempo en que se siguió el crecimiento, demostrando que la degradación abiótica no ocurrió al menos durante este periodo. Aun cuando en la literatura se muestra evidencias de degradación abiótica de DDT al parecer por reacciones fotoquímicas, (Juengst y Alexander, 1976; Patil y col., 1972), la degradación microbiana es también señalada como la principal y más frecuente (Pfander y Alexander, 1972)

El efecto tóxico del DDT sobre la población del cultivo fue indagado, no habiéndose detectado toxicidad aparente hasta una concentración de DDT en el medio de 400 ppm. Como se aprecia en la Tabla 5, el porcentaje de degradación fue similar en el rango de 50 a 400 ppm y solo se apreció un ligero descenso del crecimiento a 400 ppm. Es probable que a niveles mayores de concentración de sustrato se empiece a ver un efecto inhibitorio del crecimiento, como podría ser confirmado en futuros estudios.



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se logró aislar un consorcio de bacterias con capacidad para degradar DDT.
2. Los sitios seleccionados para la búsqueda y aislamiento de microorganismos con potencial para degradar DDT fueron adecuados, ya que estuvieron expuestos a este plaguicida hace más de 15 años.
3. El cultivo seleccionado fue capaz de crecer a 28 °C, bajo condiciones aeróbicas en un medio a base de sales minerales y DDT como única fuente de carbono.
4. No se observó degradación abiótica del DDT durante el tiempo que duró el estudio, lo que indica que la degradación fue realizada por el cultivo seleccionado.
5. La degradación total del DDT se ve afectada por la adsorción del mismo al paquete celular del cultivo, el cual solo pudo asimilar el 40 % del DDT dosificado.
6. Los metabolitos DDD y DDE fueron degradados por el cultivo mixto paralelamente al DDT, lo que representaría una ventaja de este cultivo en estudios de biorremediación.
7. El cultivo seleccionado presentó la ventaja de crecer en un tiempo relativamente corto de tres días, comparado con cultivos reportados en otros estudios.
8. No se observó efecto tóxico sobre el cultivo seleccionado cuando el DDT se adicionó en el medio de cultivo hasta una concentración de 400 ppm.

9. Se recomienda realizar estudios tendientes a dilucidar los mecanismos que determinan la inmovilización en el paquete celular y/o la disponibilidad del DDT en el medio de cultivo.
10. Se recomienda estudiar la interrelación entre los organismos que conforman el consorcio con el objeto de determinar su papel en el proceso de degradación de DDT.
11. Se recomienda evaluar si el proceso degradativo llega hasta la mineralización del sustrato.

## BIBLIOGRAFIA

- Agar D.W. 1985. Microbial Growth Rate Measurement Techniques. In Comprehensive Biotechnology. Moo-Young M.(Ed.). Ed. Pergamon Press. Oxford. pp. 305-327.
- Alexander M. 1980 (a). Introducción a la Microbiología del Suelo. 2da Ed. AGT Editor, S. A. Mexico D. F. pp. 463-481.
- Alexander M. 1980 (b). Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. Science 211(9): 132-138.
- Alexander M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, Inc. San Diego, Cal.
- Alleman B. C., Logan B. E. and Gilbertson R.L. 1992. Toxicity of Pentachlorophenol to six Species of White Rot Fungi as a Function of Chemical Dose. Applied and Environmental Microbiology. 58(12): 4048-4050.
- Bandala E. R. 1998. Análisis de Plaguicidas Clorados en Muestras. Biotecnología. Vol. 3. pp. 36-40.
- Bourquin, A. W. (Editor). 1993. Special Issue on Biodegradation. Biodegradation. 4(4):205-327.
- Bumpus J.A. and Aust S.D. 1987. Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology. 53(9): 2001-2008.
- Cámara-Duran O. A. 1992. Biología Molecular y Metabolismo de Degradación de Suelos Contaminados con Pesticidas. ITSON-DIEP. 1(3): 47-64.
- Cámara-Duran. 1993. Efecto del Uso del Agua y Agroquímicos, sobre la Calidad del Agua en el Valle del Yaqui. ITSON-DIEP. 1(4): 50-65.
- Caplan J.A. 1983. The World Wide Bioremediation Industry: Prospect for Profit. Trends in Biotechnology. 11(8): 320-323.

- Cebrián M.E. 1998. Efectos de los Plaguicidas sobre la Función Reproductiva Humana: una Asignatura Pendiente. *Avance y Perspectiva*. Vol. 17. pp. 205-213.
- Chaudry G.R., Ali A. N. and Wheeler W. B. 1988. Isolation of a Methyl Paration-Degrading *Pseudomonas sp.* That Possesses DNA Homologous to the *opd* Gene from a *Flavobacterium sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 54(2): 288 – 293.
- Connell D.W. y Miller G. J. 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Demain A. L. and Solomon N.A. (Ed.). 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Derache R. 1990. *Toxicología y Seguridad de los Alimentos*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.
- Egli, T.W. 1974. General Strategies in the Biodegradation of Pollutan: In *Metal Ions in Biological Systems*. Vol. 28. Sigel, H. and Sigel A. Editors. Ed. Dekker, Inc. New York. pp 1-37.
- “EPA Method Study 18 Method 608-Organochlorine Pesticides and PCBs”, EPA 600/ 4-84-061, National Technical Information Service, PB84-211358, Springfield, Virginia 22161, June 1984.
- García-Bañuelos M. L. y Meza-Montenegro M. M. 1991. Principales Vias de Contaminación por Plaguicidas en Neonatos-Lactantes Residentes en Pueblo Yaqui, Sonora, México. *ITSON-DIEP*. 1(2): 33-42.
- Gary J. Stanlake and Finn R.K. 1982. Isolation and Characterization of a Phentachlorophenol Degrading Bacterium. Pp.1421-1427. *Applied and Environmental Microbiology*.
- González R. y Canales A.G. 1995. Contaminación por Plaguicidas en el Acuífero del Valle del Yaqui. *Agua Salud y Derechos Humanos*. Comisión Nacional de Derechos Humanos. Ivan Restrepo Coordinador.

- González R., Marín L.E. and Córdova G. 1997. Hydrogeology and Groundwater Pollution of Yaqui Valley, Sonora, México. *Geofísica Internacional*. 36(1): 49-54.
- Grady L. Jr. 1985. Biodegradation: its Measurement and Microbiological Basis. *Biotechnology and Bioengineering*. 27: 660-674.
- Hill D. C. 1996. Waste Remediation Issues & Technologies for the Future. *Professional Safety*. 41(3): 28-31.
- Hunter-Cevera J.C., Fonda M.E., and Belt A. 1986. Isolation Cultures. Ch. 1 in *Manual of Industrial microbiology and Biotechnology*. Demain A. L. And Solomon N. A. (Ed.), pp. 3-23. Cambridge, Massachusetts.
- INEGI (Intituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1995. Estadísticas del Medio Ambiente México 1994. pp. 231-235. Aguas Calientes, Ags.
- Jain C. K. and Ali I. 1997. Determination of Pesticides in Water, Sediments and Soils by Gas Chromatography. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* Vol. 68. pp. 83-101.
- Johnson T. R. and Case Ch. L. 1989. *Laboratory Experiments in Microbiology*. Second Edition. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp. 55.
- Juengst F.W. and Alexander M. 1976. Conversion of 1,1,1- Trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane (DDT) to Water-Soluble Products by Microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 24(1): 111-115.
- Kobayashi H. and Rittmann B.E. 1982. Microbial Removal of Hazardous Organic Compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16(3): 170A – 182A.
- La Grega M.D., Buckinham P. L. y Evans J.C. 1996. *Gestión de Residuos tóxicos. Tratamiento, Eliminación y Recuperación de Suelos*. Vol. I. 1ª ed. De McGraw-Hill, Inc.

- Laws E. A. 1993. Aquatic Pollution. An Introduction Text. Second Edition. Ed. John Wiley & Sons, Inc. pp. 255-258.
- Mac Faddin J.F. 1991. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial Médica Panamericana.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1998. Brock Biología de los Microorganismos. Octava Edición. Ed. Prentice Hall. Madrid, España.
- Mallete M.F. 1971. Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means. Ch. XV. In Methods in microbiology. Vol. 1. pp 521-566. Ed. Academic, New York.
- Massé R., Lalanne D., Messier F. and Sylvestre M. 1989. Characterization of New Bacterial Transformation Products of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl) Ethane (DDT) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Vol. 18, pp. 741-752.
- Matsumura F. and Boush G. M. 1967. Dieldrin: Degradation by soil Microorganisms. Science Vol. 156. pp. 959-961.
- Norris J.R. 1969. Methods in Microbiology. Vol. 5B. Ed. Academic Press. pp. 249-252.
- Ortega-Ceseña J., Espinosa-Torres F., López-Carrillo L. 1994. El Control de los Riesgos para la Salud Generados por los Plaguicidas Organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. Salud Pública de México. 36(6):
- Ortiz-Hernández M.L., Sánchez-Salinas E., Vázquez-Duhalt R. y Quintero-Ramírez R. 1997. Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. Biotecnología. 2(3): 129-151.
- Patil K. C., Matsumura F. Boush G.M. 1970. Degradation of Endrin, Aldrin, and DDT by Soil Microorganisms. Applied Microbiology. 19(5): 879-881.

- Patil K. C., Matsumura F. and Boush G.M. 1972. Metabolic Transformation of DDT, Dieldrin, Endrin by Marine Microorganisms. *Environmental Science & Technology*. 6(7): 629-632.
- Pfander, F.K., and Alexander M. 1972. Extensive Microbial Degradation of DDT *in vitro* and DDT Metabolism by Natural Communities. *J. Agric. Food Chem.* 20: 842-846.
- Queener S.W. and Lively D. H. 1986. Screening and Selection for Strain Improvement. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain A. L. And Solomon N.A. (Ed.). pp.162.
- Quraishi M.S. 1977. *Biochemical Insect Control. Its Impact on Economy, Environmental, and Natural Selection.* John Wiley & Sons. New York, NY.
- Richins, R.D., Kaneva I., Mulchandani A. y Chen W. 1997. Biodegradation of Organophosphorous Hydrolase. *Nature Biotechnology*. Vol. 15. pp 984-987.
- Stafford K. 1986. Continuous Fermentation. Ch. 11. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain A. L. And Solomon N.A. (Ed.). pp. 137-151. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Stanlake G.J. and Finn R.K. 1982. Isolation and Characterization of a Pentachlorophenol Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 44(6): 1421-1427.
- Storbel H. A. 1973. *Chemical Instrumentation: A Systematic Approach*. Second Edition. Ed. Addison-Wesley Publishing Company. Massachusetts, California.
- Tortora G.J., Funke B.R. and Case Ch. L. 1992. *Microbiology and Introduction*. 4th ed. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, California.

- Wang, D.I.C., Cooney C. L., Demain A.L., Dunill P., Humphrey A.E. and Lilly M. D. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. Ed. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Ware G.W. 1998. *Pesticides Theory and Application*. Ed. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Wedemeyer G. 1967. Dechlorination of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes*. I. Metabolic Products. *Applied Microbiology*. 15(3): 569 –574.
- Yohnson T. R. and Case Ch. L. 1989. *Laboratory Experiments in Microbiology*. Second Edition. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Pp. 53-56.
- You, G., Sayles G. D., Kupferle M. J., Kim I. S. And Bishop P. L. 1996. Anaerobic DDT Biotransformation: Enhancement by Application of Surfactants and Low Oxidation Reduction Potential. *Chemosphere*, Vol. 32, No. 11, pp 2269 - 2284.
- Zweig G. 1967. *Analytical Methods for Pesticides Plant Growth Regulators, and food Additives. Additional Principles and Methods of Analysis. Volume V*. Ed. Academic Press. New York, N.Y. pp. 83-113.



## ANEXO

### Glosario

**ACLIMATACION.** Proceso biológico por medio del cual un organismo se adapta a un nuevo medio ambiente.

**ACTINOMICETO.** Miembro de la orden bacterial Actinomicetales, familia Actinomycetaceae.

**ADSORCION.** Adherencia superficial de moléculas de sólidos, líquidos o gases, átomos o iones, a un sólido o líquido.

**AGAR.** Extracto deshidratado de polisacáridos de algas rojas (Rhodophyceae), utilizada como agente solidificante en medios microbiológicos.

**AGUA FREATICA.** Aguas acumuladas en el subsuelo.

**AGUAS RESIDUALES.** Desechos líquidos o sólidos (domésticos e industriales), llevados a la alcantarilla.

**BIODEGRADACION.** Degradación de sustancias por agentes biológicos.

**BIOMAGNIFICACION.** Bioacumulación o bioconcentración de un elemento o compuesto el cual aumenta su nivel de concentración en los tejidos a medida que se traslada por los diferentes niveles tróficos a través de la cadena alimentaria.

**BIOMASA.** Material orgánico de origen biológico tal como material microbial y de plantas.

**BIORREMEDIACION.** Limpieza de sitios contaminados mediante el empleo de microorganismos o sus productos activos.

**BIOSORCION.** Unión de un elemento o compuesto, a sitios selectivos de la pared celular de los microorganismos mediante un proceso pasivo.

**CARCINOGENO.** Cualquier agente que induzca el desarrollo de un carcinoma o cualquier otra clase de malignidad.

**CEPA.** Conjunto de células derivadas a partir de una sola célula.

**CONSORCIO.** Grupo de diferentes poblaciones de microorganismos en estrecha asociación formando una comunidad con cierta simbiosis o interrelación en la que cada población contribuye al bienestar general del grupo.

**CULTIVO.** Microorganismos creciendo en un medio específico en un biorreactor.

**CULTIVO MIXTO.** Cultivo conteniendo dos o más tipos de microorganismos.

**DEMANDA BIOQUIMICA DE OXIGENO (DBO).** Medida del incremento de oxígeno consumido en procesos biológicos que desintegran el material orgánico en el agua; es una medida de la carga de contaminación orgánica.

**ECOSISTEMA.** Sistema funcional el cual incluye los organismos de una comunidad natural junto con su medio ambiente.

**ENRIQUECIMIENTO DE CULTIVO.** Un medio de cultivo usado para el aislamiento el cual favorece el crecimiento de un microorganismo en particular.

**ESTERILIZACION.** Tratamiento para la eliminación de organismos vivos y virus de un material.

**FOTOLISIS.** Uso de la energía radiante para producir cambios químicos.

**HABITAT.** Lugar de residencia de un organismo en la naturaleza.

**HERBICIDA.** Agente químico usado para destruir o inhibir el crecimiento de plantas.

**HETEROTROFO.** Organismo que requiere una fuente de carbono orgánico.

**INOCULO.** Material usado para iniciar un cultivo de microorganismos.

**INDUCCION DE ENZIMA.** Proceso por medio del el cual una enzima es sintetizada en respuesta a la presencia de una sustancia externa, el inductor.

*In situ.* En el sitio original.

*Ex situ.* Fuera del sitio original.

**MEDIO DE CULTIVO.** Cualquier sistema de nutrientes para el cultivo artificial de bacterias o de otras células; generalmente una mezcla compleja de materiales orgánicos e inorgánicos.

**METABOLISMO.** Conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en una célula.

**METABOLITO.** Un producto del metabolismo.

**MINERALIZACION.** Conversión de un compuesto químico a dióxido de carbono, agua y varias formas inorgánicas.

**MUTAGENICO.** Sustancia que causa un incremento en la velocidad de mutación.

**NICHO ECOLOGICO.** Combinación de organismos y el lugar en el cual viven.

**PERSISTENCIA.** Duración de la efectividad de un plaguicida, determinada por su estructura química y concentración.

**PLAGUICIDA.** Cualquier agente químico destinado a la prevención o combate de plagas.

**PLAGA.** Todo agente biológico que altere en alguna forma el desarrollo normal de una planta, causándole la muerte o daños a alguno o varios de sus órganos con la consecuente reducción de su rendimiento.

**RECALCITRANTE.** Es la resistencia inherente de un compuesto químico a cualquier grado de biodegradación.

**RESIDUOS TOXICOS.** Sólidos, lodos o gases envasados, distintos a los radioactivos (ó infecciosos), los cuales, debido a su actividad química,

tóxica, explosiva, corrosiva, son fuente eventual de peligros para la salud o para el ambiente, de modo individual o en contacto con otros residuos.

**TOXICIDAD.** La habilidad de una sustancia de producir un efecto perjudicial sobre un organismo por contacto físico, ingestión o inhalación.

**QUIMIOSTATO.** Dispositivo para el cultivo continuo de microorganismos, controlado por la concentración del nutriente limitante y la velocidad de dilución.

**VECTOR.** Un agente, tal como un insecto, capaz de transferir mecánicamente o biológicamente un patógeno de un organismo a otro.

**XENOBIOTICO.** Generalmente, un compuesto químico hecho por el hombre, o uno que no está en la naturaleza como resultado de la actividad biológica.