

## AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN CULTIVO MIXTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR DDT

Esther CARRILLO-PÉREZ, Arturo RUIZ-MANRÍQUEZ y Haydée YEOMANS-REINA

Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, México, jhyeomans@iq.uson.mx

(Recibido agosto 2002, aceptado marzo 2004)

Palabras clave: aislamiento, biodegradación, cinética de crecimiento, DDT

### RESUMEN

Se aisló un cultivo mixto de bacterias con capacidad para degradar DDT a partir de una mezcla de muestras de agua, suelo y sedimento contaminados de la región del Valle del Yaqui en Sonora, México. El cultivo fue propagado en forma intermitente, en un medio de sales minerales 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 el aumento en peso seco de biomasa. El cultivo tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.072/h y un tiempo de generación de 9.62 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. Los metabolitos DDD y DDE presentes en el DDT comercial fueron completamente degradados sin observarse elevación de su concentración durante el cultivo. La identificación de microorganismos sugirió un cultivo conformado principalmente por bacilos Gram negativos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

Key words: isolation, biodegradation, growth kinetics, DDT

### ABSTRACT

A mixed culture capable of degrading DDT was isolated from a mixture of samples taken from contaminated water, soil, and sediments from the Yaqui Valley in Sonora, México. The culture was grown intermitently in a mineral salts medium supplemented with 133 ppm of centrifuged commercial DDT and incubated at 28 °C and 150 rpm. Growth was evaluated measuring protein increase using the Lowry method. The protein content was correlated to increase of dry mass weight. The culture had a specific growth rate of 0.072/h and a generation time of 9.62 h. The residual DDT was determined by gas chromatography. The growth was sustained by DDT as a sole source of carbon and was completely consumed in the first 40 h. The metabolites DDD and DDE also present in commercial DDT were completely degraded without showing an increase in concentration throughout the culturing. The microbiological identification of this culture suggested that it was formed mainly by a Gram-negative bacilli. These bacilli were identified as members of the genera *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* and *Acinetobacter*.

---

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las sociedades contemporáneas en las últimas décadas ha estado asociado al uso de compuestos sintéticos conocidos como xenobióticos, los cuales entran directa o indirectamente al ambiente, contaminándolo y generando problemas severos a la salud del hombre, además ponen en riesgo la estabilidad de muchas especies. Agentes 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 *et al.* 1994). Tal es el caso del Valle del Yaqui, en el noroeste de México, donde la aplicación intensa de plaguicidas ha sido señalada como la causa principal de la contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Ortiz-Hernández *et al.* 1997). Algunos de ellos ya han sido prohibidos en otros países por su recalcitrancia y toxicidad. 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-Bañuelos y Meza-Montenegro 1991). Cámara-Durán (1992), reporta la detección de plaguicidas en los principales drenajes colectores de aguas residuales del Valle del Yaqui. La mayoría de los plaguicidas detectados son organoclorados y algunos de ellos presentan concentraciones que rebasan las normas mexicanas de la calidad del agua para consumo humano.

La capacidad metabólica de los microorganismos para degradar estos contaminantes, ha sido considerada como una alternativa potencial para contribuir a la disminución de sus niveles en el ambiente (Alexander 1981, Nadeau *et al.* 1994, Park *et al.* 2003). La habilidad de los microorganismos para degradar compuestos persistentes como DDT y sus metabolitos presentes en agua, aguas residuales, sedimento y ambientes marinos ha sido frecuentemente documentada (Wedemeyer 1967, Pfaender y Alexander 1972, Bumpus y Aust 1987, Aislable *et al.* 1999, Foght *et al.* 2001). La presencia de este tipo de organismos en suelo contaminado así como la posibilidad de favorecer su desarrollo puede ser muy conveniente cuando se piensa en la biodegradación como una opción para el tratamiento de sitios contaminados. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad para degradar DDT de un cultivo bacteriano mixto aislado de habitats del Valle del Yaqui así como llevar a cabo la identificación presuntiva de los microorganismos que conforman dicho cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Los estándares de DDT [1,1,-tricloro-2,2-bis (p- clo-

rofenil) etano] (98%); DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (98 %) y DDE [1,1-dicloro-2,2 bis(p-clorofenil)etileno (99%) fueron adquiridos de Supelco Co.; el DDT comercial al 75% se obtuvo a través de la Secretaría de Salud Pública; la albúmina de suero de 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 cromatográfico), éter etílico (grado cromatográfico) y acetona fueron adquiridos de SIGMA.

### Aislamiento

Las muestras de suelo, sedimento y aguas residuales fueron colectadas de sitios con un historial de contaminación o manejo de plaguicidas entre 15 a 25 años, situados en la región del Valle del Yaqui, en el noroeste de México. Se tomaron 500 g de muestras de sedimento y suelo a una profundidad de 4 a 10 cm de la superficie y se almacenaron en bolsas de plástico. Adicionalmente se recolectaron muestras de aguas residuales y se almacenaron en frascos de nalgene estériles. Las temperaturas de los sitios de muestreo fluctuaron entre 31° y 39° C.

Todas las muestras fueron procesadas antes de las 48 horas, colocando en un vaso de precipitados 250 g de la mezcla homogénea de suelo y sedimento, 250 mL de la muestra de agua residual y 700 mL de agua destilada. Se homogeneizó la mezcla, se midió el pH y se determinó el contenido de DDT, DDD y DDE para los cuales se obtuvieron valores de 46 ppb, 11 ppb y 37 ppb, respectivamente. Una alícuota del sobrenadante de la preparación anterior se utilizó como inóculo.

Se preparó una solución 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, la cual se esterilizó a 121 °C por 15 minutos (Stanlake y Finn 1982). Se distribuyeron 25 mL de esta solución en matraces Erlenmeyer de 250 mL, previamente dosificados con 133 ppm de DDT comercial disuelto en acetona y centrifugado. En este medio de cultivo, con DDT como única fuente de carbono, se inocularon los matraces con 5% (v/v) del sobrenadante y se incubaron a 28 °C y 150 rpm en una incubadora con agitación hasta observar crecimiento. Los microorganismos fueron aislados por la técnica de cultivo de enriquecimiento.

Se cosechó el paquete celular por centrifugación del caldo de cultivo a 14,000 x g por 15min; se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.0 (Hunter-Cervera *et al.* 1986). Posteriormente se transfirió a tubos de ensaye estériles, se resuspendió en 3 ml de solución de sales minerales y se almacenó en refrigeración.

### Métodos analíticos

*Determinación de proteína.* Se utilizó el método de

Lowry adaptado para el análisis de microorganismos (Herbert *et al.* 1969). A una alícuota de 0.5 ml de suspensión de microorganismos se adicionaron 0.5 ml de NaOH 1.0 N, se colocó en un baño de agua hirviendo por 5 minutos y se enfrió con agua fría. Se añadieron 2.5 mL de una mezcla de reactivos recién preparada: 50 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5 %, 2 mL de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O al 0.5 % en tartrato de potasio al 1 % y se dejó reposar 10 minutos. Se agregaron 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1.0 N, se agitó inmediatamente el tubo y se dejó reposar 30 minutos para desarrollo de color. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro previamente calibrado con un blanco de reactivos. Cada punto de muestreo se analizó por triplicado y se calculó la cantidad de proteína con base en una curva de calibración empleando albúmina de suero de bovino como proteína estándar, la cual recibió el mismo tratamiento que las muestras de cultivo.

**Determinación de peso seco.** Para la determinación de peso seco del paquete celular se utilizó una serie de matraces Erlenmeyer de 500 mL por duplicado. Los matraces con 50 mL de medio de cultivo se inocularon con un cultivo en crecimiento exponencial y se incubaron a 28 °C y 150 rpm. Se realizaron muestreos periódicos durante el crecimiento, sacrificando matraces. Se cosechó el paquete celular por centrifugación, usando tubos de nalgene de 50 mL, previamente tarados y mantenidos en un desecador. Se descartó el sobrenadante de cada tubo y se secaron las células a 50 °C hasta obtener peso constante (Mallete 1971).

Las determinaciones de proteína y peso seco se realizaron simultáneamente y la correlación entre ellas fue analizada por regresión lineal utilizando el paquete Sigma Plott 2.0

**Determinación de DDT, DDD y DDE.** Para evaluar el contenido de DDT residual se siguieron las recomendaciones del método oficial 608 de la EPA (1984).

En un embudo de separación de 30 mL se extrajeron 10 mL del cultivo con 10 mL de una mezcla de hexano-éter etílico 3:1(v/v), acidificando con una gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Se hicieron dos extracciones sucesivas a cada muestra, agitando por 5 minutos y dejando reposar hasta lograr la separación de las fases. Se eliminó el contenido de agua de la fase orgánica del extracto añadiendo 0.5 g de sulfato de sodio anhidro (activado por calentamiento a 400 °C en una mufla por 4 horas). El extracto se concentró en un rotavapor, se llevó hasta sequedad en una campana de extracción y se guardó en refrigeración hasta su análisis.

Los extractos fueron diluidos apropiadamente en hexano 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™-5 de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y espesor de película de 0.25 µm. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 250 °C y 300 °C, respectiva-

mente. La columna fue operada de manera programada iniciando con una temperatura de 140 °C mantenida durante 1 minuto; una rampa de 140 °C hasta 240 °C a razón de 20 °C/min, mantenida por 1 min y una segunda rampa de 240 °C hasta 265 °C a razón de 10 °C/min, mantenida por 2 min. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador a un flujo constante de 1.7 mL/min. Las inyecciones fueron de 1 µL manejadas en modo sin división. La cuantificación se hizo mediante calibración con estándar externo; las concentraciones de DDT, DDD y DDE fueron determinadas por duplicado, con base en una curva de calibración y los datos fueron procesados empleando el programa Start Workstation versión 5.3. La identificación de los plaguicidas se hizo por comparación de los correspondientes tiempos de retención con respecto a los estándares puros. Para el análisis de regresión y la construcción de gráficas se usó el paquete Sigma Plott 2.01.

### Estudios de biodegradación

Para evaluar el crecimiento y la biodegradación del DDT se cultivaron de manera intermitente una serie de matraces Erlenmeyer de 125 mL por duplicado con su respectivo testigo sin inoculación. Cada uno de los matraces se preparó con 10 mL de medio de cultivo, se inocularon con un cultivo en crecimiento exponencial ajustando la concentración celular inicial a 46 µg/mL de proteína y se incubaron a 28 °C y 150 rpm. Se realizaron muestreos a diferentes intervalos durante el crecimiento, sacrificando matraces para el análisis de proteína, DDT, DDD y DDE residual. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue calculada utilizando la siguiente ecuación derivada del balance de masa en un reactor intermitente:  $\text{Ln}(X_2/X_1) = \mu(t_2-t_1)$ . De esta misma ecuación se calculó el tiempo de doblado considerando en la curva de crecimiento el punto en que  $X_2 = 2X_1$ , donde X representa la concentración celular dentro del reactor y t el tiempo transcurrido.

### Identificación de microorganismos

A partir del cultivo mixto se hicieron aislamientos de cepas puras por dilución seriada. Las placas con agar, sales minerales y 133 ppm de DDT se inocularon e incubaron a 28 °C hasta observar crecimiento. Se hicieron resiembras sucesivas de las colonias aisladas para lograr su purificación en agar nutritivo y 133 ppm de DDT.

Se describió la morfología de las colonias aisladas y se practicó la tinción de Gram para observar la morfología celular.

A las cepas puras se les practicaron las pruebas bioquímicas convencionales de identificación tales como catalasa, oxidasa, oxidación y fermentación de glucosa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis, movilidad, pruebas de ornitina y fenilalanina, reducción de nitrato, licuefacción de gelatina así como producción de ácido sulfhídrico (Mac Faddin 1991).

## RESULTADOS

### Identificación de microorganismos

Se aisló un cultivo mixto de bacterias en medio de sales minerales con 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbón. A partir del cultivo mixto se lograron aislar cepas puras, cuyas colonias fueron fácilmente observables a simple vista en las primeras etapas de purificación; en las resiembras sucesivas el crecimiento se hizo lento y el tamaño de las mismas disminuyó, dificultándose su apreciación por la similitud del color de éstas con el medio. El uso de agar nutritivo suplementado con DDT en las subsecuentes etapas de purificación mejoró la formación de colonias y facilitó su diferenciación. Fueron observados al microscopio segmentos de hifas y agrupaciones bacilares ramificadas Gram positivas, presumiblemente de actinomicetos; sin embargo, éstos no pudieron ser aislados. La mayoría de las cepas aisladas fueron bacilos Gram negativos, los cuales formaron colonias convexas, de color crema o blanco, consistencia cremosa, de márgenes enteros y de un diámetro que varió de 0.5 a 2 mm, excepto una cepa de cocobacilos Gram negativo formando colonias blancas umbonadas de 2 mm de diámetro.

Las pruebas bioquímicas y nutricionales practicadas a cada una de las cepas que conformaron el cultivo mixto permitieron la identificación de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*.

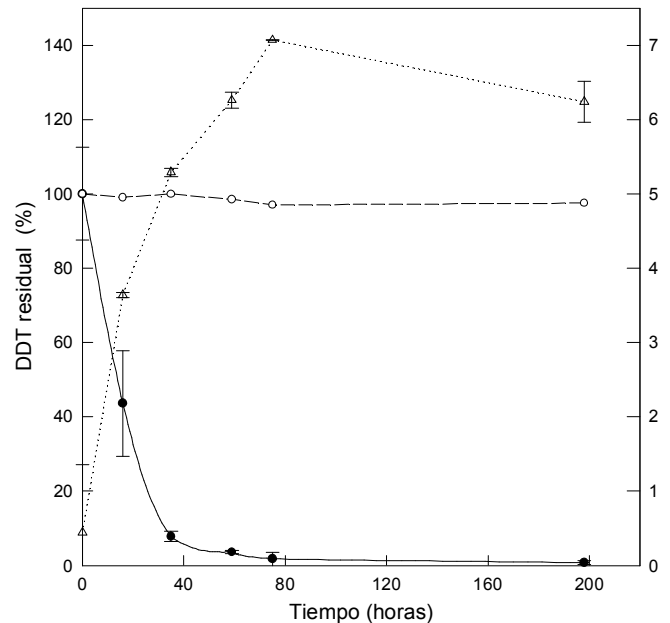
### Cinética de crecimiento y biodegradación

La curva de crecimiento del cultivo se realizó en el mismo medio utilizado para el aislamiento. La determinación de proteína total resultó un buen método de estimación del crecimiento dada la heterogeneidad del cultivo. El coeficiente de correlación entre el contenido de proteína y el peso seco de biomasa fue de 0.98. Del análisis de la fase de crecimiento exponencial del cultivo se obtuvo un valor de velocidad específica de crecimiento de 0.072/h y un tiempo de generación de 9.62 h. La mayor parte del DDT disponible fue asimilado en las primeras 40 horas y el crecimiento continuó hasta alrededor de las 80 horas. La concentración de DDT en el testigo sin inocular no varió durante el tiempo de incubación. Estos resultados pueden observarse en la **figura 1**.

Las muestras analizadas para la obtención de la curva de biodegradación de DDT fueron tomadas del caldo de cultivo libre de paquete celular, en el cual se determinó un contenido de 40 ppm de DDT disponible al inicio del cultivo.

Cuando la cinética de biodegradación se siguió, incluyendo el paquete celular en las determinaciones, se encontró que 57% del DDT suministrado no fue asimilado por el cultivo mixto (**Fig. 2**).

DDD y DDE que son productos de la degradación de DDT también fueron degradados completamente durante las primeras horas de cultivo (**Fig. 3**).



**Fig. 1.** Degradación de DDT por un cultivo bacteriano mixto. Crecimiento a 28 °C en sales minerales y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono. DDT (•) se reporta como porcentaje de la concentración de DDT inicial. Crecimiento celular (Δ) se reporta como concentración de proteína en el paquete celular Testigo (○), medio sin inocular

## DISCUSIÓN

Alexander (1981) y Grady (1985) sugirieron la conveniencia de buscar microorganismos degradadores en sitios previamente expuestos al compuesto xenobiótico de interés para tener mayor probabilidad de éxito en los aislamientos. La evidencia durante la primera semana de crecimiento del cultivo y haber seleccionado un sitio de muestreo adecuado hacen que los resultados de este trabajo concuerden con lo establecido por los autores referidos. Aun cuando el DDT es difícil de degradar, la exposición prolongada de microorganismos a éste provoca que se genere una presión selectiva que permite la selección de organismos degradadores, o bien el tiempo en que los microorganismos presentes en el hábitat muestreado estuvieron expuestos posiblemente les permitió evolucionar hacia el desarrollo de enzimas en su metabolismo capaces de actuar sobre él. Algunas de las cepas que se lograron aislar e identificar ya han sido reportadas como degradadoras de plaguicidas (Kobayashi y Rittmann 1982, Cámara-Durán 1992, Kiyofumi *et al.* 1996, Karpouzaz *et al.* 2000, Shimazu *et al.* 2001)

La degradación de DDT por el cultivo mixto así como el crecimiento se iniciaron sin una fase lag de inducción, característica de un cultivo que al momento de inocularlo está activo y en fase exponencial de crecimiento, lo cual es conveniente cuando se expone la población celular a un compuesto tóxico del medio (**Fig. 1**).

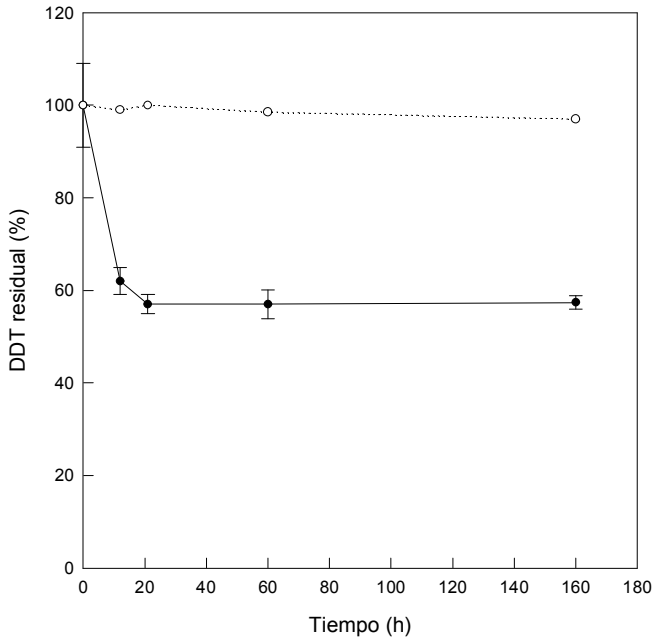


Fig. 2. Degradación del DDT residual determinado en una suspensión celular de un cultivo bacteriano mixto. Crecimiento a 28 °C en sales minerales y 133 ppm de DDT comercial. DDT (●) se reporta como porcentaje del DDT inicial. Testigo (○), medio sin inocular

La **figura 2** muestra que cuando se considera en las muestras analizadas el paquete celular, solo el 43 % del DDT es utilizado en el crecimiento y el restante 57 % no queda disponible, debido probablemente a su baja solubilidad en el medio acuoso. Otra posibilidad es que el DDT se adsorba a las paredes de las células dificultando su degradación; este comportamiento ya ha sido reportado en el trabajo de Bumpus y Aust (1987), y el mismo patrón de degradación ha sido indicado por Massé *et al.* (1989). También se ha propuesto que la interrupción de la degradación pueda deberse a un fenómeno de inhibición por acumulación de algún metabolito tóxico y/o agotamiento de algún factor esencial para el crecimiento. Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron los datos mostrados en la **figura 2** sugieren que el DDT no disponible se encuentra asociado al paquete celular; la adsorción de metabolitos a las paredes de los microorganismos ya ha sido establecida como causa de la indisponibilidad del sustrato (Juengst y Alexander 1976). Según lo descrito por You *et al.* (1996) esta adsorción se debe a la solubilización del DDT en los lípidos de la pared celular mismos que se encuentran en mayor proporción en los organismos Gram negativos. You *et al.* (1996) también sugieren que los surfactantes podrían competir con los lípidos del microorganismo por el DDT haciéndolo disponible para las reacciones de biotransformación. El estudio del fenómeno de adsorción resulta potencialmente interesante debido a la gran contribución que significaría en el proceso de separación del DDT.

La biodegradación de 43 % del DDT dosificado, la cual se dio en 80 horas de cultivo resulta atractiva comparándola con los resultados obtenidos por Massé *et al.* (1989) quienes reportan degradación del 50 % del sustrato en 9 días ó en 30 días como lo mencionan Bumpus y Aust (1987) para un cultivo de hongos.

Algunos de los metabolitos del DDT como DDD y DDE, fueron detectados como impurezas del DDT comercial. Sin embargo, éstos fueron completamente degradados por el cultivo, como se puede observar en la **figura 3**. Durante el tiempo que duró el crecimiento no se detectó incremento de estos metabolitos en el medio lo 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 descrito que DDD y DDE resultan ser también tóxicos y relativamente estables (Laws 1993, You *et al.* 1996).

Durante la experimentación para evaluar la biodegradación, el contenido de DDT en el testigo sin inocular no varió demostrando que la degradación abiótica no ocurrió. Aún cuando en la literatura existen evidencias de degradación abiótica de DDT al parecer por reacciones fotoquímicas (Patil *et al.* 1972, Juengst y Alexander 1976), la degradación microbiana también es señalada como la principal causa de degradación (Pfander y Alexander 1972).

Muchos estudios han demostrado que poblaciones mixtas de microorganismos pueden degradar DDT bajo

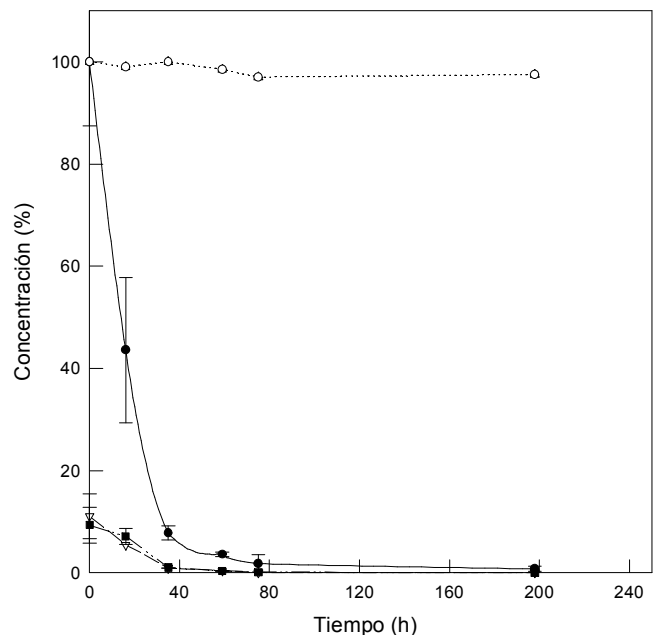


Fig. 3. Degradación de DDT (●), DDD (▽) y DDE (■) por un cultivo bacteriano mixto. Crecimiento a 28 °C en sales minerales y 133 ppm de DDT comercial como única fuente de carbono. Testigo (○), medio sin inocular

condiciones anaeróbicas generando DDD como producto de la desclorinación reductora del mismo, donde es removido un cloro de la parte alifática de la molécula. Este a su vez puede seguir degradándose bajo condiciones reductoras y oxidantes hasta formar diclorobenzofenona. Es más, algunos de los intermediarios pueden sufrir meta fisión del anillo aromático habiéndose identificado ácido p-clorofenilacético como producto final. Sin embargo, son poco los estudios que demuestran la degradación aeróbica de DDT el cual, bajo estas condiciones, forma principalmente DDE.

## CONCLUSIONES

Se aisló con relativa facilidad un cultivo bacteriano mixto conformado por cepas autóctonas de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter*, con capacidad para degradar hasta 43 % del DDT dosificado cuando creció bajo condiciones aeróbicas, a 28 °C en un medio de sales minerales y 133 ppm de DDT como única fuente de carbono. La degradación ocurrió en un tiempo relativamente corto de 80 horas, tiempo en el cual los metabolitos DDE y DDD presentes en el medio o generados durante el proceso también fueron degradados. Sin embargo el 57 % del sustrato no fue metabolizado quedando asociado al paquete celular. En este sentido, el empleo de sistemas biológicos autóctonos se presenta como una alternativa para la biorremediación de sitios contaminados con este tipo de compuestos.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Educación Superior e Investigación Científica (SESIC-SEP) el apoyo al proyecto PROADU 2000-26-001-027 para la realización de este estudio.

## REFERENCIAS

- Aislable J., Davison A. D., Boul H. L., Franzmann P. D., Jardine D. R. y Karuso P. (1999). Isolation of *Terrabacter* sp. strain DDE-1, which metabolizes 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene when induced with biphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5607-5611.
- Alexander M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science* 211, 132-138.
- Bumpus J.A. y Aust S.D. (1987). Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2001-2008
- Cámara-Durán O. A. (1992). Biología molecular y metabolismo de degradación de suelos contaminados con pesticidas. *ITSON-DIEP* 1, 47-64.
- Derache R. (1990). *Toxicología y seguridad de los alimentos*. Ediciones Omega, Barcelona, pp. 269-270.
- EPA (1984). EPA Method study 18 method 608-organochlorine pesticides and PCBs, EPA 600/4-84-061, National Technical Information Service, PB84-211358, Springfield, Virginia 22161.
- Foght J., April T., Biggar K. y Aislable J. (2001). Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. *Bioremediation J.* 5, 225-246.
- García-Bañuelos M. L. y Meza-Montenegro M. M. (1991). Principales vías de contaminación por plaguicidas en neonatos-lactantes residentes en Pueblo Yaqui, Sonora, México. *ITSON-DIEP* 1, 33-42.
- Grady L. Jr. (1985). Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 660-674.
- Herbert D., Phipps P.J. y Strange R.E. (1969). Chemical analysis of microbial cells. En: *Methods in microbiology* (J.K. Norris y L.W. Ribbons, Eds.). Academic Press, Nueva York, Vol. 5B, pp. 249-252.
- Hunter-Cevera J.C., Fonda M.E. y Belt A. (1986). Isolation cultures. En: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. (A.L. Demain y N.A. Solomon, Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 3-23.
- Juengst F.W. y 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, 111-115.
- Karpouzias D. G., Morgan J. A. W. y Walker A. (2000). Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 353-358.
- Kiyofumi S., Tatsuo Y., Fumiko N. y Tatsuhiko O. (1996). Biodegradation of cellulose acetate by *Neisseria sicca*. *Bios. Biotech. Biochem.* 60, 1617-1622.
- Kobayashi H. y Rittmann B.E. (1982). Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 16, 170A-182A.
- Laws E.A. (1993). *Aquatic pollution: an introduction text*. Wiley FALTA CIUDAD, pp. 255-258.
- Mac Faddin J.F. (1991). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Médica Panamericana, México, D.F., pp. 247-258.
- Mallette M.F. (1971). Evaluation of growth by physical and chemical means. En: *Methods in microbiology* (J.K. Norris y L.W. Ribbons, Eds.). Academic Press, Nueva York, Vol. 1, pp. 521-566.
- Massé R., Lalanne D., Messier F. y 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. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 18, 741-752.
- Nadeau L. J., Menn F.-M., Breen A. y Sayler G. S. (1994).

- Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. Appl. Environ. Microbiol. 60, 51-55
- Ortega-Ceseña J., Espinosa-Torres F. y 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, 1-15.
- Ortiz-Hernández M.L., Sánchez-Salinas E., Vázquez-Duhalt R. y Quintero-Ramírez R. (1997). Plaguicidas organofosforados y ambiente. Biotecnología 2, 129-151.
- Park J.-H., Feng Y., Ji P., Voice T. C. y Boyd A. (2003). Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3288-3298.
- Patil K. C., Matsumura F. y Boush G.M. (1972). Metabolic transformation of DDT, dieldrin, endrin by marine microorganisms. Environ. Sci. Technol. 6, 629-632.
- Pfander F.K. y Alexander M. (1972). Extensive microbial degradation of DDT *in vitro* and DDT metabolism by natural communities. J. Agric. Food Chem. 20, 842-846.
- Shimazu M., Mulchandani A. y Chen W. (2001). Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. Biotech. Bioengin. 76, 318-324.
- Stanlake G.J. y Finn R.K. (1982). Isolation and characterization of a pentachlorophenol degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 44, 1421-1427.
- Wedemeyer G. (1967). Dechlorination of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes*. I. Metabolic products. Appl. Microbiol. 15, 569-574.
- You G., Sayles G.D., Kupferle M.J., Kim I.S. y Bishop P.L. (1996). Anaerobic DDT biotransformation: enhancement by application of surfactants and low oxidation reduction potential. Chemosphere 32, 2269 - 2284.