 XOXIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARQUEOLOGICO HISTORICO

T
253

84425

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

BIODEGRADACIÓN ANAEROBIA Y AEROBIA DE DDT
POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

IQI. Alma Irene Corona Cruz, M en C.

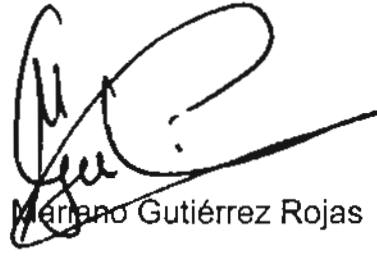
JULIO DEL 2000

El jurado designado por las
Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

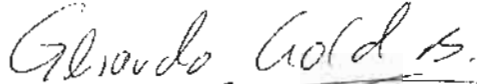
I.Q.I. Alma Irene Corona Cruz M. en C.

El día 14 de julio del año 2000

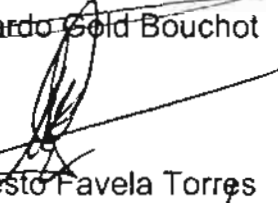
Comité Tutorial:



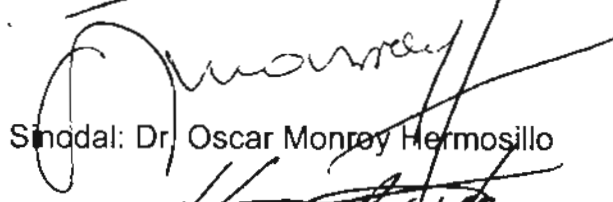
Tutor: Dr. Merlano Gutiérrez Rojas



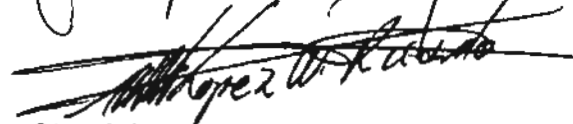
Asesor: Dr. Gerardo Gold Bouchot



Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres



Sinodal: Dr. Oscar Monroy Hermsillo



Sinodal: Dr. Ricardo López Wilchis

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Exelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP - 20 - 93.

DEDICATORIA

A
ALVARO
ANDREA SOFIA Y
ALVARO SEBASTIAN
CON TODO MI AMOR

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial: Drs. Mariano Gutiérrez Rojas, Gerardo Gold Bouchot y Ernesto Favela Torres quienes me ayudaron a darle forma a la tesis mediante sus pacientes revisiones.

Al Dr. Oscar Monroy Hermosillo por su amistad y asesoría a lo largo de todo el trabajo realizado.

Al Dr. Don Crawford por sus acertados comentarios y sugerencias.

A mis amigos y colegas de los laboratorios de biotecnología de la FIQ-UADY, de geoquímica marina del CINVESTAV, de aguas residuales y planta piloto de la UAM-I con quienes compartí largas horas de trabajo y satisfacciones.

A Omar Zapata, Elsa Noreña, Margarita Salazar y Juan Manual Pérez Aviña, por su apoyo incondicional.

A mi gran familia por su apoyo y cariño.

A mi querida Rosy por su invaluable ayuda.

Al Ing Jorge Lechuga y al Dr Ramón Rodríguez, por darme todas las facilidades para la realización de este doctorado.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, por permitirme superarme

A la Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa), a la Universidad Autónoma de Yucatán y al Centro de investigaciones y estudios Avanzados del IMP, por el apoyo material para la realización de este trabajo de tesis.

CONTENIDO.

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	5
III. ANTECEDENTES	6
III.1. PLAGUICIDAS	6
III.2. FABRICACIÓN DEL DDT	7
III.3. PRODUCCIÓN Y USO DEL DDT	10
III.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD POR EXPOSICIÓN AL DDT	11
III.5. DDT EN EL MEDIO AMBIENTE	14
III.6. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DEL DDT	21
III.7. PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN	26
III.8. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELO	31
IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	34
IV.1. OBJETIVO GENERAL	34
IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES	34
IV.3. HIPÓTESIS	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36
V.1. RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO	36
V.1.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	37
V.1.2. CUANTIFICACIÓN DEL DDT, DDE Y DDD	41
V.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL SUELO	45
V.2. INÓCULOS EMPLEADOS.	47
V.3. MEDIOS DE CULTIVO.	48
V.4. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE DDT CON ADICIÓN DE INÓCULOS EN SISTEMAS ANAEROBIO Y AEROBIO POR SEPARADO	51

V.5. ADAPTACIÓN DE INÓCULOS AL DDT	52
V.6. FERMENTACIÓN ANAEROBIA-AEROBIA SECUENCIAL Y AEROBIA	53
V.7. MEDICION DE LAS ACTIVIDADES MICROBIANAS	58
V.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS: REDUCTASAS Y PEROXIDASA EN LA DEGRADACIÓN DEL DDT.	59
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
VI.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS A Y B	64
VI.2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL SUELO	68
VI.3. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE DDT CON ADICIÓN DE INÓCULOS EN SISTEMAS ANAEROBIO Y AEROBIO POR SEPARADO	69
VI.4. EVALUACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ANAEROBIA-AEROBIA SECUENCIAS Y AEROBIA EN LA DEGRADACIÓN DEL DDT	71
VI.5. CINÉTICA DE LA TRANSFORMACIÓN DE DDT EN LA FERMENTACIÓN ANAEROBIA-AEROBIA	84
VI.6. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS REDUCTASAS Y PEROXIDASAS EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL DDT.	90
VII. CONCLUSIONES	92
VIII. RECOMENDACIONES	94
IX. REFERENCIAS	96
X. ANEXOS	103

ÍNDICE DE FIGURAS.

CAPITULO III

Figura 1. Reacciones durante la producción del DDT.	7
Figura 2. Máximos valores de DDT reportados en el ambiente.	20
Figura 3. Vías alternativas en la degradación del DDT	21
Figura 4. Esquema de las ventajas y desventajas de la FES.	30

CAPITULO V

Figura 5. Diagrama de la metodología seguida para la determinación del DDT.	44
Figura 6. Matraz biométrico del modelo de respirómetro de Bartha .	46
Figura 7. Fermentador anaerobio.	55
Figura 8. Fermentación aerobia.	57
Figura 9A. Cámara anaerobia.	61
Figura 9B. Accesorios en torno a la cámara anaerobia.	62

CAPITULO VI

Figura 10. Esquema de la estrategia de trabajo	63
Figura 11. Producción de CO ₂ como respuesta de actividad microbiana nativa en muestras de suelo B.	69
Figura 12. Producción de CH ₄ y CO ₂ en reactores anaerobios en presencia de DDT con: a) suelo y agua, b) suelo y nutrimentos y c) suelo, nutrimentos y lodos.	73

Figura 13. Producción de CO ₂ en cultivos aerobios. Instantánea (A) y acumulada (B). Ana-aer HAB, precultivo anaerobio inoculado en la etapa aerobia con cultivo mixto (HAB) adaptado; PreAna-Pchry, precultivo anaerobio inoculado en la etapa aerobia con <i>P.chrysosporium</i> ; AerHAB, sin precultivo anaerobio inoculado con cultivo mixto (HAB) adaptado; AerP.chry, sin precultivo anaerobio inoculado con <i>P.chrysosporium</i> .	76
Figura 14. Gráfico de cajas, de los 8 tratamientos: 1) ana-aer + H ₂ O, 2) ana-aer + N, 3) ana-aer P.chry, 4) ana-aer HAB, 5) aer P.chry, 6) aer HAB., 7) aer + H ₂ O, 8) aer + N.	82
Figura 15. Gráfico de la normalización de las concentraciones de DDT, DDE y DDD reportadas a los diferentes tiempos.	86
Figura 16. Gráficos de las velocidades de biodegradación contra la concentración inicial de DDT	89
Figura 17. Actividad peroxidasa encontrada en la fermentación aerobia bajo los tratamientos: A) con adición de inóculo, B) sin adición de inóculo y C) sometido a esterilización.	92

ÍNDICE DE TABLAS.

CAPITULO II

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del DDT, DDE y DDD.	9
Tabla 2. Biodegradabilidad de desechos orgánicos peligrosos.	27

CAPITULO V

Tabla 3. Medio A. Composición del medio utilizado en el cultivo anaerobio.	49
Tabla 4. Medio B. Composición del medio mineral utilizado en el cultivo aerobio.	50
Tabla 5. Medio C. Composición de la solución de minerales utilizada en el cultivo aerobio.	50

Tabla 6. Composición de la mezcla del cultivo aerobio.	50
Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación de la biodegradación de DDT con adición de inóculos en sistemas anaerobio y aerobio.	52
Tabla 8. Diseño experimental de la bioaumentación del suelo.	53
CAPITULO VI	
Tabla 9. Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de suelo A y B.	64
Tabla 10. Textura de las muestras de suelo.	65
Tabla 11. Resultados del análisis de DDT y sus productos de degradación de las muestras de suelo	67
Tabla 12. Concentraciones finales de DDT encontradas en las muestras de suelo adicionadas inicialmente con 10×10^3 ng DDT/g de suelo.	71
Tabla 13. Producción de CO ₂ en cultivos aerobios.	77
Tabla 14. Resultados del análisis de las concentraciones de DDT y DDE y sus reducciones en suelo sometido a diferentes tratamientos de fermentación sólida.	80
Tabla 15. Resultados de las transformaciones de DDT, DDE y DDD de la cinética del tratamiento 3 en el suelo B.	85
Tabla 16. Velocidades de biodegradación del DDT a diferentes concentraciones iniciales y bajo diferentes tratamientos.	88

RESUMEN.

El DDT es un plaguicida organoclorado de alta resistencia a la degradación, su uso se ha restringido en muchos países por los daños ambientales y de salud a los cuales se le asocia. En México su uso es aún común en campañas sanitarias y para la protección de cultivos agrícolas, lo que ha provocado la contaminación por este compuesto principalmente en el suelo.

En este trabajo se propone degradar el DDT mediante bioaumentación en sistemas anaerobio y aerobio en fermentación sólida. El estudio se realizó sobre un suelo agrícola de Yucatán, que se caracterizó en cuanto a textura y nutrientes. La muestra se contaminó artificialmente con una concentración conocida de DDT.

Se realizó un diseño factorial que incluyó el efecto del inóculo y las condiciones de cultivo. Las variables de respuesta fueron las concentraciones de DDT, DDE y DDD, que se midieron por cromatografía de gases. Los inóculos aerobios evaluados consistieron en un cultivo mixto (comercial) y uno puro de *Phanerochaete chrysosporum*. Las condiciones de cultivo evaluadas fueron dos: aerobias exclusivamente y un pretratamiento anaerobio en el que se utilizaron lodos activados provenientes de una planta de tratamiento de una industria refresquera. El período total de tratamiento fue de 28 días. Los cultivos mixtos, tanto aerobios como anaerobios fueron alimentados semanalmente con nutrientes y 0.5µg de DDT por ml de medio.

Se demostró que la degradación del DDT es mejor con la combinación del

pretratamiento anaerobio y el uso del hongo en condiciones aerobias. La máxima desaparición alcanzada fue del 84%. Para el caso del DDE, también el método combinado fue el más adecuado logrando una desaparición del 69%.

El análisis estadístico de los resultados para diferentes tiempos de cultivo, mostraron diferencias significativas durante la etapa anaerobia (de 0 a 14 días) y las concentraciones finales de DDT $H(6, N = 21) = 13.5152; p = 0.0356$, lo que deja claro la eficiencia del tratamiento anaerobio en la biotransformación del DDT principalmente hacia la formación de DDD ya se que obtuvieron aumentos en la concentración de este compuesto durante esta etapa de cultivo.

No se encontró diferencia significativa entre la concentración de DDE y las condiciones de cultivo, sin embargo, existe una tendencia a la disminución en su concentración durante los 28 días de cultivo anaerobio-aerobio.

Con el propósito de observar la actividad enzimática adjudicable a los microorganismos se evaluó la actividad reductasa (cualitativamente) y peroxidasa (cualitativamente) durante el cultivo. Se observó que la actividad reductasa, se presenta sólo en la etapa anaerobia y que este tipo de enzimas son intracelulares o asociadas a membrana. La actividad peroxidasa presente en la etapa aerobia, proviene de extractos extracelulares. En ambos casos la mayor respuesta de actividad se obtuvo en el cultivo bioaumentado.

Este estudio contribuirá al conocimiento de los efectos esperados al biodegradar un compuesto organoclorado persistente en un sistema de fermentación secuencial anaerobia-aerobia en estado sólido.

ABSTRACT

DDT is an organochlorine pesticide with a high resistance to degradation. Its use has been restricted in many countries because of both the environmental and health damages to which it is related. In Mexico, its use is still common in health campaigns to protect agricultural areas and as result of this, pollution by this compound has been observed in soils and sediments.

This study proposes the degradation of DDT by bioaugmentation under anaerobic and aerobic systems in soil fermentation. The study was conducted using an agricultural soil of the Yucatan Peninsula, and texture and nutrients of the soil were characterized prior to the analysis. The sample was artificially contaminated with a known concentration of DDT.

A factorial experimental design was carried out and it included the effect of inocula and culture conditions. The response variables were the concentrations of DDT, DDE and DDD, which were measured by gas chromatography. The aerobic inocula consisted of a mixed culture (commercial) and a pure culture of *Phanerochaete chrysosporum*. Two culture conditions were tested: (i) aerobic conditions and (ii) an anaerobic pre-treatment in which activated sludges from a treatment plant of a softdrink facility were used, followed by aerobic condition. Total treatment lasted 28 days. Mixed cultures, including anaerobic and aerobic, were adapted to DDT for 40 days. These cultures were fed weekly with nutrients and 0.5 µg of DDT per ml of the

culture media.

It was demonstrated that degradation of DDT was more efficient with a combination of the anaerobic pre-treatment, and the use of the fungus under aerobic conditions. Maximum degradation was 84%. For DDE, the combined method was also the most suitable, with a 69% of degradation.

The statistical analysis of the results for different times of culture showed significant differences during the anaerobic stage (from 0 to 14 days) and the final concentrations of DDT $H(6, N=21) = 13.5152$; $p = 0.0356$, which shows clearly that the efficiency of the anaerobic treatment in the biotransformation of DDT mainly oriented towards the formation of DDD, since an increase in the levels of this compound was obtained during this culture stage.

No significant differences in DDE concentration between culture conditions were found; however, a decreasing tendency in concentration was observed during the 28 days treatment of anaerobic-aerobic culture.

In order to observe the enzymatic activity related to microorganisms, reductase (qualitatively) and peroxidase (quantitatively) activities were evaluated during the culture. Reductase activity was only detected in the anaerobic stage and this group of enzymes was observed to be intracellular or linked to the membrane. The peroxidase activity present in the aerobic stage came from extracellular extracts. In both cases, a major increase of activity was observed in bioaugmented culture.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha presentado un notable interés por los compuestos organoclorados debido a los daños ambientales y de salud que su uso indiscriminado a largo plazo ha ocasionado; un ejemplo de ellos es, el insecticida 1,1,1-tricloro-2,2-di-(p-clorofenil) etano, mejor conocido como DDT. La exposición a este compuesto se ha asociado con la incidencia de cáncer de seno (Wolff y col. 1993), pancreático y leucemia, así como por producir alteraciones hormonales o en las funciones reproductoras masculinas (Kelce y col., 1995; Jégou, 1996; Cebrián, 1998). El uso del DDT está restringido en muchos países pero su presencia en el ambiente es el resultado de su extensivo uso en el pasado, aunque no ha dejado de introducirse en el ambiente en algunas partes del mundo, en donde su uso es aún común.

En México su consumo es más alto que en otros países de América Latina ya que se ha empleado sistemáticamente en campañas sanitarias desde 1960 para el control de la malaria y dengue. Hasta ahora no se ha encontrado ningún otro compuesto que reúna sus propiedades y su eficacia (Cebrián, 1998; López y col., 1996; Wayland y col., 1992).

El DDT es un compuesto orgánico de alta resistencia a la degradación por medios biológicos, fotolíticos o químicos, ya que su molécula contiene estructuras alifáticas y aromáticas que le dan gran estabilidad. Se considera como un compuesto contaminante persistente (Kannan y col., 1992) y de ahí el interés de realizar

estudios de biodegradación.

La naturaleza lipofílica, entre otras características, ha propiciado que el DDT y sus metabolitos persistan en el ambiente, principalmente en suelos y sedimentos. Estudios de transformación del DDT en el suelo indican una prolongada persistencia por períodos extensos de tiempo, ya que este compuesto está sometido a una extensiva adsorción a partículas sólidas (U.S. Dep. of Health and Human Services, 1994).

Algunos desechos y contaminantes químicos han sido eliminados por procesos de biorremediación, la cual involucra la estimulación de las vías naturales de degradación, éstas integran reacciones fotoquímicas en donde los microorganismos juegan un papel importante en la formación de centenares de ecosistemas.

Hoy día se usan bacterias aerobias para degradar petróleo y otros desechos peligrosos, pero se ha visto que los sistemas anaerobios son capaces de degradar contaminantes clorados vía de cloración reductiva (Leahy y Brown, 1994). Algunos compuestos pueden ser degradados parcialmente por bacterias anaerobias y los productos de esta reacción pueden ser degradados por procesos aerobios.

Los productos de degradación del DDT, son principalmente el 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno (DDE) y el 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDD), la ruta puede ser de DDT a DDE y posteriormente a DDD o de DDT a DDD directamente. Estas rutas no han sido del todo aclaradas, aún después de 40 años de estudio (Wayland y col., 1992). Así por ejemplo Wedemeyer (1966) propuso que bajo condiciones aerobias, en el caso del DDT, se presenta una lenta conversión a DDE,

mientras que bajo condiciones anaerobias la conversión hasta DDD resulta más rápida.

Se han realizado varios trabajos de biodegradación en medio líquido, empleando diversos microorganismos y sistemas para degradar el DDT, como por ejemplo: *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus y Aust, 1987) y *Alcaligenes eutrophus* (Nadeau y col., 1994) en condiciones aerobias; en aislados de lodos (Pfaender y Alexander, 1972) y cultivos mixtos inmovilizados (Beunink y Rehm, 1988) en sistemas anaerobios-aerobios; pero no se conoce aún ningún microorganismo que utilice el DDT como única fuente de carbono y energía.

La degradación del DDT puede tomar vías diferentes en función de las condiciones ambientales y formar mediante una dechloración reductiva DDD o a través de una dehidrocloración DDE (Quensen y col., 1998)

El principal problema de la presencia del DDT en el ambiente es su inclusión en la cadena alimenticia, en donde conforme avance en ella la contaminación tiende a magnificarse, una forma de reducirlo es eliminarlo o al menos reducir su concentración en el suelo, que es su principal reservorio.

En este trabajo el objetivo fue evaluar la capacidad de degradación del DDT con adición de diferentes inóculos (puro o mixto) en sistemas: anaerobio-aerobio o sólo aerobio en un sustrato sólido, dada la importante persistencia de este xenobiótico en el suelo. Para cumplir con este objetivo se realizó un diseño factorial que incluyera los factores a evaluar: inóculo y condiciones de fermentación. El estudio se efectuó sobre un suelo agrícola contaminado con una concentración conocida de DDT.

El trabajo se dividió en tres partes, en la primera se caracterizaron dos tipos de suelo a tratar a fin de analizar y evaluar la capacidad de los mismos para biodegradar un compuesto organoclorado bajo condiciones adecuadas. Se seleccionó uno de ellos para usarse como modelo de trabajo en un proceso de biodegradación. Se puso a punto la técnica cromatográfica para la determinación del DDT a fin de evaluar la concentración de este plaguicida en muestras de suelo agrícola del estado de Yucatán.

En la segunda parte se realizó una selección de cultivos mixtos anaerobios y aerobios pre-adaptados a la presencia de DDT, que posteriormente se emplearon en la bioaumentación del suelo. Se realizaron fermentaciones en medio sólido dada las características físicas y de contenido de humedad del suelo modelo, bajo un diseño experimental que permitió la evaluación de la influencia de un pretratamiento anaerobio.

En la tercera parte se cuantificó la concentración de los dos principales productos de degradación del DDT a fin de encontrar las rutas de biodegradación que sigue el DDT en suelos tropicales bajo condiciones anaerobias y aerobias.

Con el propósito de observar la actividad enzimática adjudicable a los microorganismos se evaluó, la actividad reductasa (cualitativamente) y peroxidasa (cuantitativamente) durante el cultivo.

La principal motivación de este trabajo fue, contribuir al conocimiento del efecto que ejercen los microorganismo y las condiciones ambientales presentes en un proceso de biodegradación de un suelo contaminado con DDT.

II. JUSTIFICACIÓN.

El uso continuo del DDT en nuestro país, así como, la naturaleza lipofílica y su relativamente baja velocidad de degradación química y biológica, ha propiciado la persistencia de este compuesto y de sus metabolitos en el ambiente, principalmente en suelos y sedimentos. Esto ha contribuido directa e indirectamente a su acumulación en tejidos biológicos y su subsecuente magnificación en organismos, que se encuentran dentro de la cadena alimentaria, entre ellos el hombre.

Las implicaciones que tienen los compuestos contaminantes persistentes sobre la salud humana, desde trastornos en el sistema respiratorio, nervioso y reproductivo, hasta la asociación con cáncer de diferentes tipos, ha propiciado la implementación de normas para su uso o su eliminación en el ambiente.

De ahí que se considera adecuado e importante contribuir al conocimiento de las rutas que lleven a la eliminación del DDT presente en el ambiente, empleando para ello sistemas microbianos que puedan acelerar su degradación, particularmente en suelos tropicales. Para ello se propone utilizar sistemas de estudio similares al ambiente en donde se presenta la contaminación.

Este estudio contribuirá al conocimiento de los efectos que se pueden esperar al biodegradar un compuesto organoclorado de alta persistencia en un sistema de fermentación secuencial anaerobio aerobio en estado sólido.

III. ANTECEDENTES.

III.1. PLAGUICIDAS.

La industria de los plaguicidas tomó auge en la segunda guerra mundial, propiciada por el descubrimiento de las propiedades insecticidas de algunos compuestos sintéticos. Desde entonces los laboratorios de la industria química han proporcionado a los agricultores una serie de poderosos venenos contra los diferentes tipos de plagas, siendo la mayoría de ellos organoclorados y organofosforados (Cremllyn, 1995).

Los insecticidas se clasifican dentro de las sustancias químicas más tóxicas para todo el reino animal. En numerosos estudios se hace énfasis sobre los peligrosos efectos tóxicos de los plaguicidas, ya que al estar presentes en aire, agua, suelo y alimentos, repercuten gravemente sobre la salud y desequilibran las poblaciones, animales y vegetales (Restrepo, 1988).

Entre los insecticidas más importantes destaca el 1,1,1-tricloro-2,2-di-(p-clorofenil)etano, también llamado diclorodifeniltricloroetano o más comúnmente, DDT. Cuando se descubrió, se identificaron como sus principales ventajas: su estabilidad, su persistencia y amplio espectro en actividad insecticida, su bajo costo de fabricación y la supuesta baja toxicidad para los mamíferos (DL₅₀ oral en ratas: 300 mg/kg)

(Cremllyn, 1995). Entre sus desventajas se cita, el que muchos insectos han desarrollado resistencia, el tiempo de biodegradación de 10 años o más y la capacidad de acumularse en el hígado (Domínguez, 1980).

III.2. FABRICACIÓN DEL DDT.

El DDT es el insecticida más importante del grupo de los plaguicidas organoclorados. En la figura 1, se muestra la reacción efectuada para su fabricación, en la cual se efectúa una condensación del cloral y el clorobenceno en presencia de un exceso de ácido sulfúrico concentrado (Cremllyn, 1995):

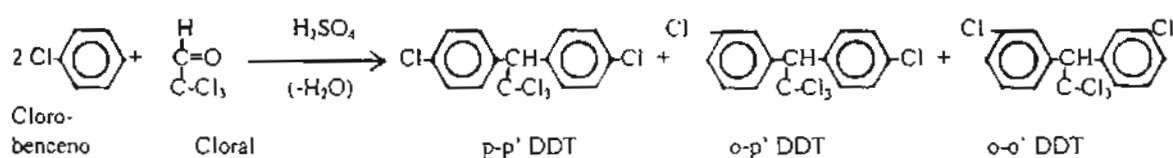


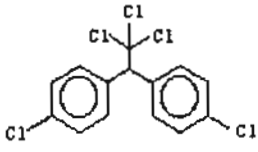
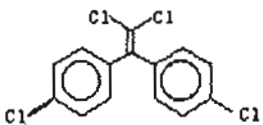
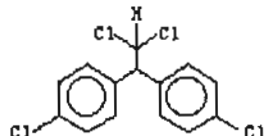
Figura 1. Reacciones durante la producción del DDT.

El producto crudo consiste de un 80% del compuesto p,p'DDT deseado, junto con aproximadamente un 20% del isómero o,p'DDT y trazas del isómero o,o'DDT. Sólo el isómero p,p'DDT tiene actividad insecticida significativa. El DDT fue fabricado a gran escala durante la segunda guerra mundial y se ha usado para combatir vectores de enfermedades epidémicas como el tifus, paludismo, malaria y dengue; también se ha empleado en la protección de semillas y cultivos como el algodón, plátano y arroz, entre otros.

A finales de los años cincuenta, su producción anual mundial fue de más de 100,000 toneladas. A partir de entonces la producción anual ha disminuido hasta en un 50% (Cremllyn, 1995).

En la tabla 1, se presentan algunas características importantes del DDT y de sus principales productos de degradación que son: el DDE y el DDD (también usados como plaguicidas). Se puede observar que la diferencia entre estas sustancias radica en su contenido de cloro e hidrógeno. En cuanto sus características fisicoquímicas se presentan similitudes. La solubilidad en agua es prácticamente nula en los tres compuestos. Su persistencia en suelo se debe a su extensiva adsorción a partículas sólidas, como lo predicen sus coeficientes de partición (K_{oc}). La tendencia de estos compuestos a volatilizarse del agua puede ser predicha por sus constantes de Henry y de la superficie de sólidos por sus presiones de vapor. El DDT es el que más fácil se volatiliza del agua y el DDD de sólidos.

TABLA 1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL DDT, DDE Y DDD

Características	DDT	DDE	DDD
Sinónimos	p,p'-DDT; 1,1,1-tricloro-2,2-bis (p-clorofenil)etano; diclorodifenil tricloroetano; 4,4'-DDT	DDT dihidrocloro; p-p'DDE; Diclorodifenildicloroetileno; 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno	1,1-bis(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano; 4,4'-DDT; 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil)etano(Alemán); 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano(frances);TDE
Nombres Registrados	Genitox, Anofex, Detoxan, Pentaclorin, Dicofano, Clorofenotano	No hay datos	DDD; Rotano; Dileno, TDE
Fórmula Química	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄
Estructura química			
Peso molecular	354.49	318.03	320.05
Color	pólvo blanco, cristales incoloros	blanco	povo blanco, cristales
Estado físico	sólido	sólido cristalino	sólido
Punto de fusión	108-109°C(p,p'), 74-75°C(o,p')	88.4-90°C	109-110°C
Punto de ebullición	260°C	no hay dato	193°C a 1mmHg
Densidad	0.98-0.99 g/cm ³	no hay dato	1.385 g/m ³
Olor	inodoro, aromático ligero	no hay dato	inodoro
Umbral de olor:			
-agua	0.35 mg/Kg	no hay dato	
Solubilidad:			
-agua	insoluble(max.0.0034mg/L a 25°C)	0.12 mg/L a 25°C	Insoluble(max.0.16mg/L a 24°C)
-solventes orgánicos	muy soluble en eter etílico, acetona benceno y otros solventes orgánicos	lípidos y la mayoría de los solventes orgánicos	no hay dato
Coef. de partición - Koc *	2.4X10 ⁵	4.4X10 ⁶	7.8X10 ⁶
Presión de vapor	5.5X10 ⁻⁶ a 20°C, torr	6.5X10 ⁻⁶ (p,p') 20°C, torr 6.2X10 ⁻⁶ (o,p') 20°C, torr	1.02X10 ⁻⁶ a 30°C, torr
Constante de la Ley de Henry	5.13X10 ⁻⁴ atm-m ³ /mol	6.8X10 ⁻⁵ atm-m ³ /mol	2.16X10 ⁻⁵ atm-m ³ /mol

* Coeficiente de partición del carbono orgánico.

Fuente (U.S. Department of Health and Human Services, 1994).

III.3. PRODUCCIÓN Y USO DEL DDT.

En los Estados Unidos de Norteamérica, así como en otros países desarrollados ya no está permitido el uso del DDT como plaguicida, excepto en casos de emergencia de salud pública (U.S. Department of Health and Human Services, 1994). En países en vías de desarrollo persiste el uso del DDT, principalmente para el control de la malaria, probablemente excediendo el nivel usado históricamente. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en base a datos recabados de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), reporta que en 1992, México y Brasil usaron, cada uno 1,000 toneladas de DDT para el control de la malaria (Sharpe, 1995).

La OMS considera que para contener el paludismo deberá mantenerse el uso del DDT, ya que no existen actualmente insecticidas competentes y accesibles (Cremllyn, 1995).

No se encontraron datos actuales sobre la producción de DDT, DDE y DDD en el país, ni a nivel mundial. Aunque se sabe que se usa al menos para el control de vectores de enfermedades tropicales. Este tipo de información es importante para poder calcular la cantidad liberada al ambiente resultado de su uso y estimar de manera rápida la carga que soporta.

Se sabe que la disposición de DDT, DDE y DDD en algunos países es limitada por los daños sobre la salud que se le han asociado, sin embargo, no hay información accesible sobre la cantidad disponible y sobre los sitios de confinamiento de estos compuestos.

III.4. EFECTOS SOBRE LA SALUD POR LA EXPOSICIÓN AL DDT.

La agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos de América (US EPA) ha clasificado al DDT como moderadamente tóxico de clase II (U.S. Department of Health and Human Services, 1994). El DDT no causa intoxicaciones agudas, con base en su estructura y a estudios toxicológicos (excepto en grandes dosis), sin embargo, debido a su estabilidad y a su lipofiliidad es de esperarse que cause efectos adversos a mediano y largo plazo sobre el ambiente y la salud (Albert, 1990).

La toxicidad aguda de una sustancia se relaciona con la DL_{50} (dosis letal media) e indica la gravedad y magnitud de los efectos tóxicos inmediatos; debe enfatizarse que la DL_{50} no da ninguna información acerca de la toxicidad a mediano y largo plazo de una sustancia (toxicidad crónica). Para el DDT, se reportan valores de DL_{50} para rata, en un rango de 113 a 800 mg/kg, para DDE el rango es de 810 a 880 mg/kg y para DDD de 1507 a 4000 mg/kg.

Las personas pueden introducir el DDT a su cuerpo por inhalación, por vía dérmica o principalmente por la ingesta de alimentos que contienen pequeñas cantidades de este compuesto. La carne de res, puerco y pescado; así como alimentos ricos en grasa tienen una mayor probabilidad de estar contaminados con este compuesto. Los bebés están también expuestos por ingesta de leche materna, la cual por su alto contenido graso lleva parte de la acumulación de DDT que la madre ha adquirido en el transcurso de su vida.

La eliminación del DDT y DDE del cuerpo humano no es un proceso eficiente, de ahí

que los niveles en los tejidos se pueden incrementar con las exposiciones repetidas y en función de la concentración. En general, los niveles de DDT se incrementan con la edad de las personas (Gomez-Catalan, y col., 1995; Ludwicki y Goralczyk 1994), a excepción de los primeros años de vida en donde se han encontrado niveles mayores que posteriormente se estacionan, para luego continuar con una pendiente positiva en personas adultas. Lo anterior se debe a que en la etapa prenatal y al amamantamiento, la madre traspasa parte de su carga de DDT por vías transplacentaria y láctea (Beretta y Dick 1994).

Los efectos que el DDT pueden causar sobre el humano pueden ser, sistémicos, inmunológicos, neurológicos, reproductivos, genotóxicos, de desarrollo, carcinogénicos y la muerte, éstos pueden estar en función del nivel o concentración, de la ruta de exposición, así como de la duración de ésta, la cual puede ser aguda (14 días o menos), intermedia (de 15-364 días) y crónica (más de 365 días).

A pesar de que se ha usado gran cantidad de DDT se sabe comparativamente poco acerca de su modo preciso de acción. Los síntomas generales de envenenamiento por el DDT en los insectos y vertebrados son temblores violentos, pérdida de movimiento seguido de convulsiones y muerte. El DDT actúa sobre el sistema nervioso a concentraciones mucho menores que las que inducen efectos tóxicos en otros tejidos y sistemas de enzimas.

Aparentemente, el DDT ejerce su capacidad tóxica al unirse a la membrana nerviosa, interfiriendo la transmisión de impulsos nerviosos, posiblemente perturbando el equilibrio iónico del sodio o del potasio a través de las membranas

nerviosas (Cremllyn, 1995).

A largo plazo pueden resultar efectos secundarios por daños a tejidos o alteraciones metabólicas, por exposición crónica a residuos en alimentos, agua y aire.

Personas que accidentalmente han ingerido DDT pueden caer en estado de excitación, así como presentar ataques nerviosos.

Estudios en animales han sugerido que una exposición a alimentos contaminados con DDT por corto tiempo puede causar efectos irreversibles sobre el sistema reproductor, así también, pruebas realizadas en animales han mostrado que exposiciones por largos periodos al DDT pueden causar daños carcinogénicos en el hígado. Se reporta un efecto sub-letal en aves por causa del DDT y sus residuos ya que, estas moléculas interfieren en el metabolismo del calcio, al observarse una gran disminución en el grosor de las cáscaras de sus huevos (Clark, 1988).

Recientes estudios (Sharpe, 1995), revelan conexiones entre el DDT y algunos padecimientos del sexo masculino, ya que el principal metabolito del DDT en el cuerpo humano (p-p' DDE), es un potente anti-andrógeno. Este hecho ha despertado interés en el estudio de los posibles efectos y cambios que sobre la reproducción en hombres se vienen presentando a partir de los años cincuentas.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), La Agencia de Protección al Ambiente (EPA), así como el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos han determinado que el DDT, DDE y DDD son probables carcinógenos humanos. El riesgo a la exposición estará en función del ambiente en el cual cada persona se desarrolle.

III.5. DDT EN EL MEDIO AMBIENTE

Dado el extensivo uso que se le dio en el pasado (a partir de la 2^a Guerra Mundial) a lo largo y ancho del mundo y a su persistencia, el DDT y sus productos de degradación, se encuentran en todas partes, además de que continuamente se redistribuyen en el ambiente.

Mucho del DDT que se encuentra en el ambiente, especialmente en los países en donde se ha prohibido o restringido su uso, es resultado de su extensivo uso en el pasado, aunque éste no ha dejado de introducirse en el ambiente en algunas partes del mundo (países en desarrollo localizados en zonas tropicales) en donde su uso es aún común.

El DDT puede movilizarse atrapado en partículas suspendidas por aire y agua, aún siendo insoluble en agua (Vu-Duc y col., 1993).

En el Aire.

Pequeñas cantidades de DDT pueden encontrarse en el aire, debido a:

- 1) Su volatilidad del suelo y cuerpos de agua; esta tendencia a volatilizarse del agua se puede predecir por su valor de la constante de Henry (5.13×10^{-4} atm-m/mol) y de la superficie del suelo por su presión de vapor 5.5×10^{-6} torr.
- 2) La contaminación directa: al ser aplicado, o al ser fabricado como resultado de emisiones no controladas.

El DDT en el aire permanece poco tiempo, desde unas cuantas horas hasta 50 horas, considerándose que la mitad se pierde distribuyéndose en la atmósfera en dos días. Esta molécula puede viajar con el viento atrapada en partículas sólidas (U.S. Department of Health and Human Services, 1994).

Stanley y col. (1971), midieron los niveles atmosféricos de plaguicidas en E.U. cuando aún el DDT se usaba de manera rutinaria. El aire de nueve localidades fueron muestreadas, representando áreas urbanas y agrícolas. De los doce plaguicidas evaluados sólo el DDT se detectó en todas las localidades. Los valores de DDT se encontraron dentro del rango de 1.4×10^{-6} a 1.56×10^{-3} ng/ml y para el DDE dentro del rango de 1.9×10^{-6} a 1.31×10^{-4} ng/ml; se observa lo reciente de la dosificación del plaguicida, al ser mayor el contenido de DDT que de DDE, su principal producto de degradación. Los niveles más altos se encontraron en las áreas agrícolas, probablemente por que esta actividad es la que demanda mayores cantidades de plaguicidas.

A partir de entonces la concentración del DDT en aire ha disminuido considerablemente, como lo demuestra un estudio realizado por Bidleman y col. (1981), en el que se tomaron diez muestras en la zona costera del Golfo de México durante 1977, encontrándose niveles con un promedio de 3.4×10^{-8} ng/ml de DDT, sin embargo, los datos se deben tomar con reserva ya que estudios posteriores realizados por Rapaport y col. (1985), reportaron que muestras de nieve tomadas en una latitud media de Norte América durante 1982 y 1983, contenían en promedio 6.0×10^{-4} ng/ml, mientras que muestras tomadas durante 1983 y 1984 presentaron

niveles de 1.8×10^{-4} ng/ml de DDT, esto puede deberse a la reincidencia en su uso. Muestras de lluvia tomadas en 1983 en los mismos sitios en donde se tomaron las de nieve, contenían en promedio 3.0×10^{-4} ng/ml del insecticida, probablemente debido a la movilidad que tiene el compuesto.

En el Agua.

DDT, DDE y DDD son poco solubles en agua (Tabla 1) por lo que la presencia de estos compuestos en las aguas de desecho es debida principalmente al transporte de partículas a las cuales están unidos. La fuerte unión de estos compuestos al suelo no facilita su desplazamiento de su sitio de aplicación (excepto por erosión), ni tampoco tienden a lixiviarse al manto freático, razón por la cual, una cantidad apreciable puede permanecer en el suelo por largos períodos de tiempo (Verschueren, 1983).

El DDT puede ser adsorbido por los sedimentos o puede también unirse a partículas y asentarse en el fondo de los cuerpos de agua. Actuando así, como un reservorio primario en donde están disponibles, para la alimentación de los organismos que se encuentran al inicio de la cadena alimentaria.

Los compuestos organoclorados son extremadamente peligrosos en ambientes acuosos ya que debido a su gran estabilidad química, a su baja solubilidad en el agua y su alta lipofilicidad, se concentran en los componentes vivientes del ecosistema, magnificándose de esta forma su efecto dañino (Tan y col. 1994).

La cantidad de DDT se biomagnifica conforme se avanza en la cadena alimentaria, lo cual puede resultar en altas concentraciones de DDT en los organismos que se encuentran al final de la cadena, ya que esta sustancia aumenta su concentración de manera progresiva a lo largo de dicha cadena. Evans y col. (1991) reportaron una biomagnificación de 28.7 veces de plancton a peces y de 21 veces de sedimento a anfípodos en el lago de Michigan, esto debido a que cada vez que el pez consume placton, aumenta la concentración del contaminante en su cuerpo. Los niveles de DDT en animales y peces puede ser más alto que el que se encuentra en el ambiente, dado que las células de grasa acumulan esta molécula (U.S. Department of Health and Human Services, 1994).

El mar, y en general el hábitat acuático, ha sido foco de numerosos estudios de cuantificación y acumulación del DDT y se ha visto por ejemplo que los mamíferos marinos en el mar Báltico concentran alrededor de 1.0×10^5 ng/g de DDT y hasta 1.0×10^6 ng/g en tejido graso, en los del mar del Norte y el Golfo de San Lorenzo, en la costa Occidental de Estados Unidos (Restrepo, 1988).

En una base computarizada de la EPA, llamada "STORET" que mide la calidad del agua, Staples y col. (1985) reportaron información colectada de 1980 a 1983 de 5700 muestras de agua de diversos sitios localizados en la Unión Americana. El 45% de ellas contenía DDT, DDE o DDD. El nivel medio reportado para DDT y DDE fue de 1.0×10^{-3} ng/ml, para DDD fue cero. Aproximadamente 50 muestras de efluentes industriales fueron analizadas y mostraron una media de 0.01 ng/ml para los tres compuestos.

En el Suelo.

Algunas investigaciones han reportado que el DDT que se encuentra en el suelo puede ser degradado en dos años, aunque otras han demostrado que le toma al menos de quince a veinte años (Alexander, 1994). Estudios de transformación del DDT en suelo, indican una prolongada persistencia por períodos extensos de tiempo, debido a que este compuesto está sometido a una extensiva adsorción a partículas sólidas como puede predecirse por su coeficiente de partición (EPA, 1986).

Aunque existe una fuerte unión entre el suelo y el DDT, DDE y DDD, estos compuestos están disponibles para las plantas e invertebrados del suelo. Pueden encontrarse residuos principalmente en las raíces y en menor concentración en los retoños de las plantas, indicando una baja movilidad del DDT en la planta. Las lombrices de tierra son capaces de ayudar a la movilización de residuos de DDT unido al suelo dejándolos en formas biodisponibles (Verma y Pillai, 1991).

En los Estados Unidos fueron analizadas aproximadamente 1,100 muestras de sedimentos de cuerpos de agua de 1980 a 1983. Los niveles promedio para DDT, DDE y DDD fue 0.1, 0.1 y 0.2 ng/g (peso seco), respectivamente. En biota seleccionada de ciertos sitios se encontró que contenía los tres compuestos, con niveles promedio de DDT, DDE y DDD de 1.4×10^4 , 2.6×10^4 y 1.5×10^4 ng/g respectivamente (Staples y col., 1985).

Muestras de sedimento de una región del Río Mississippi contenían en promedio 25,

70 y 30 ng/g (peso seco) de p,p'-DDT, p,p'-DDE y p,p'-DDD, respectivamente. El rango de frecuencia de aparición del DDT, DDE y DDD en las muestras fue de 71, 86 y 75% respectivamente (Ford y Hill, 1991). Los sedimentos del Río Yakima en el estado de Washington, en donde se usó DDT y se dejó de usar a partir de 1972, contienen de 1.0×10^5 a 2.34×10^8 ng/g (peso seco) de DDT y sus metabolitos (Johnson y col., 1988).

Estudios de los sedimentos de un río al norte de Alabama contaminado con DDT al recibir la descarga de aguas residuales de una fábrica que lo producía, mostraron niveles de 1.2×10^4 a 2.7×10^6 ng/g (peso seco), los niveles disminuyeron en muestras alejadas de la fuente de contaminación (Webber y col., 1989).

Hitch y Day (1992) reportaron altos niveles de DDT y DDE, 4.9×10^3 y 4.6×10^2 ng/g, respectivamente en muestras tomadas en un lugar cercano a Dell, Texas en 1980. Como las concentraciones de DDT fueron más altas que las de DDE se pensó en un uso ilegal del insecticida en esa zona, por lo que se hicieron pruebas de metabolismo aerobio (120 días) indicando que la degradación del DDT en ese suelo fue mucho más lenta que la que se había encontrado en otros suelos, por lo que se determinó que el DDT presente se atribuía a su persistencia por muchos años.

En un estudio realizado por la EPA en 1986, se recalca la ya mencionada persistencia del DDT y sus metabolitos en suelos, haciendo un énfasis particular para el DDE (U.S. Department of Health and Human Services, 1994). En una investigación realizada por Boul y col. (1994), en suelo a diferentes profundidades,

en tres sitios de Nueva Zelanda destinados para pastura, se reporta la predominancia del DDE en todas sus muestras, observando también que aún con las prácticas de riego, el DDT ha permanecido en el suelo y que la aplicación de superfosfatos como fertilizantes pudiera favorecer la degradación de DDT a DDE.

Como se puede notar en los párrafos anteriores existe bastante información sobre los niveles de DDT, DDE y DDD entre los años setentas y ochentas, sin embargo es necesaria nueva información sobre los niveles en el mundo, a fin de conocer la localización, concentración y en general el curso que han tomado estos compuestos a fin de despejar la duda si los niveles han disminuido o aumentado.

En la figura 2, se presenta de una manera esquemática los máximos de las concentraciones reportadas en aire, agua y sólidos (suelo y sedimentos), es importante notar el mayor nivel en sólidos y en donde se recomendaría realizar estudios sobre degradación.

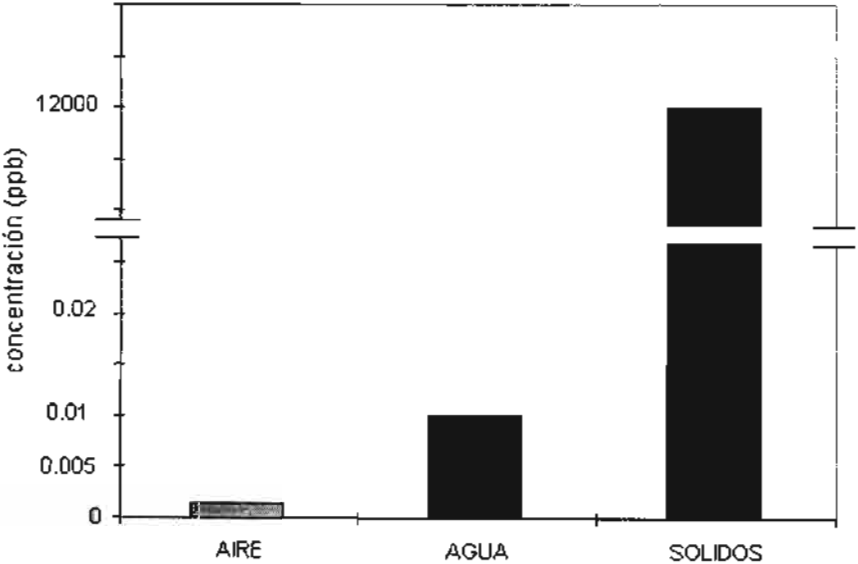


Figura 2. Máximos valores de DDT reportados en el ambiente

III. 6. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN DEL DDT.

Aunque los compuestos de degradación del DDT pueden ser generados por reacciones fotoquímicas, los microorganismos juegan un papel importante en su formación en centenares de ecosistemas. Estos microorganismos pueden estar presentes de manera natural o ser inoculados (Quensen y col., 1998; Renner, 1998). La degradación del DDT en el ambiente puede tomar vías diferentes en función de las condiciones a las cuales se someta, como se puede observar en el esquema de la figura 3.

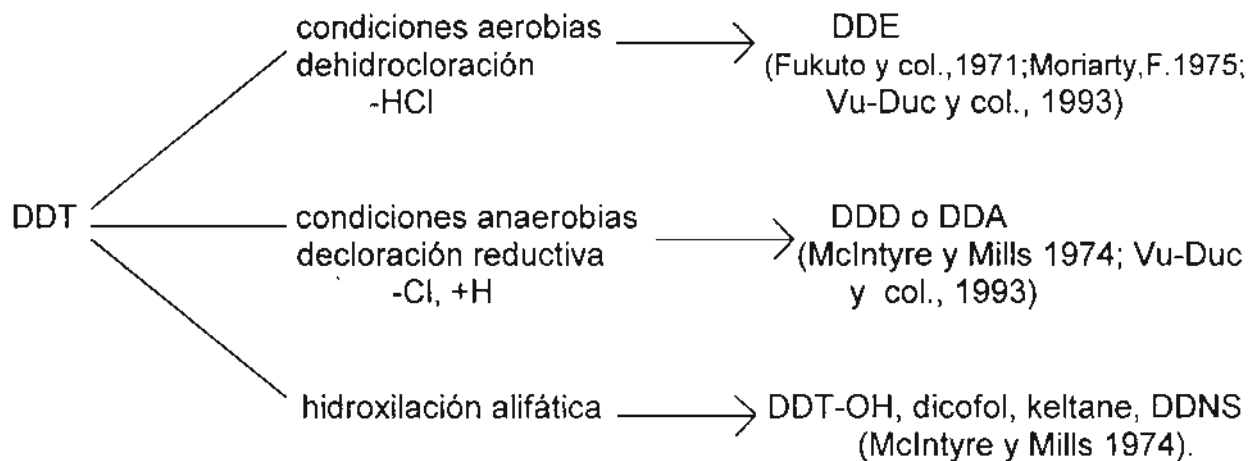


Figura 3. Vías alternativas en la degradación del DDT

Para el suelo en específico, se han sugerido cuatro mecanismos para explicar la pérdida del DDT: volatilización, remoción por cosecha de materia orgánica (por ejemplo cosechas de plantas), desagüe o arrastre por agua y transformación química. La velocidad de volatilización del DDT del suelo, está asociada

significativamente a la temperatura, luz solar e inundaciones del terreno. La velocidad de transformación química hacia DDE, se incrementa bajo condiciones de encharcamiento (Samuel y Pillai, 1990) así como de aireación (Nair y col. 1992). Otros parámetros a considerar en la degradación del DDT en suelos, son las condiciones fisicoquímicas como el pH y el potencial redox. Gambrell y col. (1984), observaron que una condición reductiva ayuda a una rápida degradación, mientras que el pH no muestra influencia. También establecieron la relación entre los niveles del hierro en su forma ferrosa y la degradación del DDT ya que éste contribuye a la reducción por un proceso de transferencia de electrones. En la superficie del suelo se sabe que ocurre la fotooxidación, como lo demuestran los estudios realizados por Nair y col. (1992), al observar la degradación a DDD y DDE en tres tipos diferentes de suelo confinados en tubos y que fueron expuestos a luz. Sin embargo, no se sabe que ocurran reacciones de hidrólisis (Lichtenstein y Schultz, 1959).

La biodegradación puede ocurrir bajo condiciones aerobias o anaerobias en presencia de ciertos microorganismos (aerobios o anaerobios) los cuales son introducidos al sistema. Bajo condiciones aerobias se presenta una lenta conversión a DDE, mientras que bajo condiciones anaerobias la conversión hasta DDD resulta mucho más rápida por reacciones de dechloración reductiva (Atlas y Bartha, 1993). Wedemeyer (1966) establece que la reducción de la citocromo oxidasa en la célula interviene en la dechloración reductiva del DDT a DDD, pero al no darse las condiciones adecuadas para que el complejo enzimático se forme se impide la

decloración del DDT.

Se han realizados diversos trabajos con el fin de describir la ruta de degradación que sigue este compuesto a fin de llegar a la mineralización (degradación de un compuesto hasta dióxido de carbono y agua) de la molécula del DDT. Algunos ejemplos se presentan a continuación.

Subba y Alexander (1977a) emplearon cultivos de *Pseudomonas putida* y sustratos análogos no clorados de metabolitos del DDT como el difenilmetano (DPM), benzidrol (BH) y la benzofenona (BP) con el fin de obtener información sobre las posibles rutas metabólicas. Sin embargo, sólo propusieron la formación de intermediarios posibles a través de tres vías diferentes. En un trabajo posterior de estos mismos autores (1985) incluyeron además de bacterias, hongos y usaron el DDT, junto con productos de degradación de este compuesto como sustrato y obtuvieron resultados similares, ya que encontraron más de 20 compuestos diferentes a los introducidos en el medio de cultivo y sugirieron que el metabolismo del DDT puede ocurrir por dos rutas; una dehidrocloración para formar DDE y una decloración reductiva para formar DDD ó una decloración reductiva de DDT a DDD bajo condiciones aerobias.

Otros trabajos se han dado a la tarea de establecer, si la degradación ocurre por vía anaerobia o aerobia como es el caso de los trabajos que se presentan a continuación.

Pfaender y Alexander (1972), realizaron un estudio sobre la degradación microbiana del DDT empleando una cepa de *Hydrogenomonas* y otra de *Aerobacter* aisladas de

aguas residuales. En una primera etapa anaerobia con *Hydrogenomonas* obtuvieron la degradación a DDD, 1 cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano (DDMS), 4-4'-diclorobenzofenona (DBP) entre otros. Al adicionar oxígeno e inocular la cepa de *Aerobacter* en una segunda etapa, se formó el ácido p-clorofenilacético, lo que los llevó a establecer el requerimiento de oxígeno para el rompimiento del anillo aromático de la molécula.

La idea del empleo del oxígeno para el rompimiento de los anillos aromáticos de la molécula del DDT ha sido reforzada por Nadeau y col., (1994), solo que ellos atribuyen el éxito del rompimiento a una dioxigenasa.

Empleando una cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, por vía aerobia exclusivamente, Bumpus y Aust (1988) demostraron la desaparición y mineralización del DDT, la cual fue dependiente del mecanismo de degradación de la lignina que es inducida durante el metabolismo idiofásico en un medio deficiente de nitrógeno y dependiente de la concentración de glucosa en el medio. En los primeros estudios con *P. chrysosporium* (ME-446) se observó una mineralización de 4.2 % de 1.77 ppm de DDT en 30 días y en trabajos posteriores se obtuvieron valores de 13.5% para el mismo período de tiempo (Higson, 1991).

Con el fin de estimular la degradación del DDT Subba y Alexander (1977b) y Focht y Alexander (1971), estudiaron el cometabolismo, en el cual un microorganismo crece sobre una fuente de carbono, degradando de manera gratuita otro compuesto orgánico (Alexander, 1994), en este caso del DDT. Encontraron que al tener sustratos alternos, que son análogos de los metabolitos del DDT, los

microorganismos no efectúan reacciones de deshalogenación en los metabolitos reales del DDT que se adicionan como co-sustrato. Sin embargo, es posible establecer aunque con baja eficiencia por problemas de transferencia de oxígeno, la dechloración reductiva del DDT y la degradación oxidativa del 4,4 - diclorodifenilmetano (DDM) y del difenilmetano simultáneamente en cultivos sincrónicos anaerobios-aerobios (Beunink y Rehm, 1988).

Todos los trabajos anteriormente presentados fueron llevados al cabo en fermentaciones en estado líquido lo cual resulta un tanto incongruente ya que como se ha citado anteriormente el principal receptor de DDT en la naturaleza es el suelo. En la revisión de los trabajos sobre degradación del DDT no se logra elucidar si el cultivo anaerobio es más eficiente que el aerobio, o si se requiere de las dos condiciones de fermentación para la completa mineralización de la molécula de DDT. Se reporta una gran variedad de microorganismos para el proceso de degradación, sin embargo, se observa que el origen de las bacterias es siempre de aguas residuales. Para la selección de los hongos se tomó en cuenta el poder oxidativo de sus enzimas.

Algunos factores pueden impedir que un proceso de biodegradación sea efectivo o bien considerarlo como un tratamiento alternativo mediante la complementación de los componentes o condiciones necesarias.

La aplicación de estos tratamientos biológicos para la limpieza de suelos contaminados con compuestos químicos peligrosos se conoce hoy día como biorremediación.

III. 7. PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN.

Los compuestos contaminantes persisten en la naturaleza porque las condiciones ambientales no son apropiadas para que la actividad microbiana ejerza sobre ellos una degradación bioquímica o porque no se encuentran presentes los microorganismos apropiados para tal degradación. La biorremediación es la aplicación de los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales, suelos y lodos, conteniendo desechos químicos peligrosos. Cookson (1995) propone que la biorremediación conlleva el uso de enzimas provenientes de microorganismos, como catalizadores de la destrucción de un compuesto peligroso específico, esta sustancia puede o no ser el sustrato. Para que un proceso de biorremediación sea exitoso se requiere que los contaminantes sean biodegradables y estén disponibles para los microorganismos.

Ejemplos de contaminantes con diferentes niveles de biodegradabilidad, se presentan en la tabla 2, se observa el origen orgánico de todos ellos y que predominan los contaminantes en fase líquida sobre los de fase sólida. Las actividades de remediación que se realizan actualmente, se distribuyen de la siguiente manera: petróleo 33%, creosota 28%, solventes 22%, plaguicidas 9% y otros 8% (Cookson, 1995). El DDT es considerado como un compuesto de difícil biodegradación.

Tabla 2. Biodegradabilidad de desechos orgánicos peligrosos

Fácilmente degradable	Moderadamente degradable	Difícil de degradar
Gasolina Gasavión Diesel Tolueno Benceno Alcohol isopropílico Metanol Acetona Fenoles Acilonitrilo	Aceite #6 Aceite crudo Aceites lubricantes Pentaclorofenol Nitrobenceno Anilina Alifáticos de cadena larga Ftalatos	TCE PCE Cloruro de vinilo PCBs DDT Clordano Heptaclor

Fuente: Leahy y Brown, 1994.

Los contaminantes se pueden encontrar distribuidos en la naturaleza en cualquiera de las cuatro formas que se mencionan a continuación (Leahy y Brown, 1994):

1. Adsorbido a sólidos (suelo o sedimentos) de manera saturada o insaturada.
2. Disuelto en el agua
3. En fase líquida flotando sobre el mar o fijado o confinado en alguna capa geológica.
4. En fase vapor.

Para la selección del sistema de biorremediación y su integración con otras tecnologías, es importante el conocimiento de las propiedades químicas y físicas del xenobiótico o contaminante.

Los contaminantes muy solubles en agua, además de ser muy dinámicos en el ambiente, frecuentemente son muy fáciles de degradar. Dependiendo de la volatilidad del compuesto y de la velocidad de flujo del aire en algunos casos, así como de los requerimientos microbianos, se removerá el xenobiótico. El problema se complica en aquellos contaminantes que son poco solubles en agua y son

adsorbidos por un material particular lo que los hace menos accesibles al ataque microbiano.

Para el caso de los contaminantes adsorbidos a una fase sólida, como el DDT en los suelos o sedimentos, se presenta una complicación extra ya que se tiene que considerar la fuerte unión entre contaminantes especialmente orgánicos y las partículas sólidas, de manera que la disponibilidad de éstos para ser degradados por microorganismos no es siempre posible.

Conviene aclarar que existe una menor biodisponibilidad para la degradación para aquellas sustancias (entre ellos los organoclorados) que fueron introducidas al sólido (suelo o sedimentos) tiempo atrás que las que se han introducido en fechas recientes (Renner 1998), incluso se dice de fracciones que son adsorbidas de manera irreversible (Kan y col.,1998). Para incrementar la biodisponibilidad se han desarrollado tres estrategias, (i) el uso de biosurfactantes, (ii) la adición de solventes orgánicos, (iii) la adición de surfactantes sintéticos. La selección de la estrategia dependerá de la concentración del contaminante en el sólido (Gutiérrez-Rojas, 1999)

El desarrollo del proceso de biorremediación en fase sólida requiere de los conocimientos básicos de una fermentación sólida, ya que de acuerdo a las características físicas del suelo ésta se asemeja más que la fermentación en estado líquido.

El término de fermentación en estado sólido (FES), se refiere al crecimiento de microorganismos en materiales sólidos, sin la presencia de líquido libre o de escurrimiento. Es importante aclarar que este término no se refiere a la fermentación

de sustratos sólidos en un medio líquido, ni a la fermentación de líquidos con niveles elevados de sólidos insolubles (Doelle y col, 1992).

La principal característica de la FES, es el contenido de humedad del medio. El agua es esencial para el crecimiento de microorganismos y es por eso que sólo aquellos microorganismos que crecen a bajos niveles de actividad de agua (a_w) (0.93-0.98) podrán desarrollarse en este tipo de sistemas. El agua cumple con una función distinta a medida que el proceso se lleva a cabo, (i) contiene a los nutrientes solubles en forma solvatada, (ii) hidrata las esporas y promueve la germinación, en el caso de hongos filamentosos y bacterias, (iii) transporta nutrientes a las células desde la fase sólida, (iv) disuelve el oxígeno desde la fase gaseosa y lo incorpora a las células en forma soluble y (v) disuelve los metabolitos producidos y es el vehículo para la exportación de compuestos extra celulares (Doelle y col, 1992).

En las FES, el agua es escasa, por definición y si se le suma la necesidad de incorporar aire en continuo, el riesgo de deshidratación esta siempre presente. Por lo tanto es prácticamente obligatorio incorporar siempre agua exógena, para esto se han propuesto diversas estrategias:

1. Humidificar el medio a través de la humedad del aire que se alimenta en continuo.
Esto también ayudara a la eliminación de calor vía convección forzada.
2. Adición directa de agua en sistemas con agitación.
3. Incorporación de soportes inertes con alta capacidad de retención de agua.

Las FES son cultivos que se desarrollan, en su mayoría, en presencia de oxígeno en forma gaseosa y bajo condiciones controladas. Los organismos que se emplean con

mayor frecuencia en este tipo de fermentaciones son los hongos filamentosos dado su bajo requerimiento de a_w para su desarrollo, la forma y velocidad con que colonizan las superficies sólidas y la eficiencia con que transforman los sustratos (Doelle y col, 1992).

En la figura 4, se presentan las ventajas y desventajas de la FES, las cuales deben considerarse para su empleo en procesos de biorremediación. La sencillez en la preparación y requerimientos del sustrato es una importante ventaja, el bajo contenido de humedad, el cual fluctúa entre 0.30 y 0.8 kg de agua Kg^{-1} de material húmedo, y el bajo requerimiento de aire podrá manejarse como ventaja o desventaja en función del tipo de microorganismo que se pretenda desarrollar en la FES. La disponibilidad de dispositivos eficientes de monitoreo y las limitaciones de transferencia de masa por las características del sistema *per se*, se deben de considerar como desventajas y resolverlas de la manera más conveniente.

FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> • Se emplea un medio de cultivo simple, algunos sustratos utilizados son enriquecidos con nutrientes. Generalmente no se requiere de un pretratamiento del sustrato. • La limitación de agua ayuda a limitar las contaminaciones indeseables. • Debido a la naturaleza del sustrato, la aireación tiende a requerir menores presiones que la necesaria para una fermentación líquida. 	<ul style="list-style-type: none"> • La determinación de parámetros cinéticos constituye un problema debido a la falta de dispositivos de monitoreo. • El crecimiento microbiano, está restringido a la superficie del sólido por la disponibilidad de oxígeno. • Generalmente la transferencia de masa esta limitada por las características del sistema. • La limitación de microorganismos que pueden crecer a niveles reducidos de humedad.

Figura 4. Esquema de las ventajas y desventajas de la FES (Doelle, 1992).

En las FES, es común el uso de soportes que ayuden a la retención de agua en el sistema, le den mayor porosidad que permita la colonización de los microorganismos. Un soporte ampliamente usado y estudiado es el bagazo de caña, el cual puede retener hasta 4 Kg de agua Kg⁻¹ bagazo seco y puede mejorar las condiciones de un sustrato de una FES (Gutiérrez, 1995).

La biorremediación requiere de la integración de muchos conocimientos científicos entre ellos de microbiología, bioquímica, geoquímica, hidrología, ciencia del suelo, operaciones unitarias, así como, del manejo de diversos materiales de acuerdo al sistema que se maneje y a las características del contaminante a biodegradar. Para el caso del DDT, en donde como ya se ha discutido, su principal sitio de confinamiento es el suelo, será necesario conocer las características principales de este ambiente.

III. 8. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS.

El suelo es un cuerpo naturalmente desarrollado en el que tienen lugar procesos físicos, químicos y biológicos. Este ambiente resulta ser objeto de interés en muchos estudios, por el hecho de constituir el soporte físico de las plantas y ser fuente de suministro de agua y nutrimentos que permiten el crecimiento de diversas especies de manera directa o indirecta, las cuales son cultivadas con miras a la obtención de productos de interés biológico y social. De ahí la importancia de liberar a este cuerpo

de cualquier tóxico, en este caso particular el DDT.

El comportamiento de los contaminantes en el suelo está en función de varios aspectos pero principalmente de: su contenido de nutrientes, del tipo de suelo, de sus características fisicoquímicas y materia orgánica, así como, de las precipitaciones pluviales y de la temperatura ambiental.

Entre los nutrientes de mayor relevancia en el suelo se encuentran, el nitrógeno el fósforo y el potasio. Diversas citas coinciden en señalar al nitrógeno como el principal limitante por su intervención en la formación de proteínas (Soil Fertility Manual, 1988; Manuales para educación agropecuaria, 1992). No sólo el contenido de nutrientes sino también la textura del suelo, juegan un papel importante en la actividad metabólica de las poblaciones microbianas.

La textura se refiere a la composición del mismo en grupos de partículas de diferentes tamaños, de ahí que los suelos puedan clasificarse en arenosos, limosos y arcillosos, dependiendo del grupo de partículas que predomine en ellos.

Los suelos de textura fina (arcillosos) se compactan con más facilidad. Esto reduce el espacio poroso, lo que limita tanto el paso del aire como del agua a través del suelo, limitándose así el transporte de nutrientes y proliferación de microorganismos aerobios (Manuales para educación agropecuaria, 1992).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) es el número total de cationes de intercambio que un suelo puede retener (la magnitud de sus cargas negativas). La CIC aumenta a medida que aumenta la materia orgánica y con ello la actividad

metabólica del suelo, lo cual es importante para el recambio y degradación de compuestos presentes en él. El pH es otro parámetro de influencia en la actividad que se desarrolla en el suelo, la mayoría de ellos tienen pH que oscila entre 4.9 y 9.0 (Soil Fertility Manual, 1988). En base al pH será el tipo de microorganismos que se desarrollen en el suelo.

En el caso particular del Estado de Yucatán desde el punto de vista edáfico, se distingue por la dominancia de suelos someros. Asimismo, éstos muestran, por lo general, un abundante contenido de piedras, tanto en la superficie como en el interior de su breve perfil. Debido a esto en algunos lugares se adiciona al suelo bagazo de henequén para mejorar la textura, contenido de material orgánico y retención de agua.

En general, los suelos del Estado de Yucatán, a pesar de algunas marcadas diferencias morfológicas, muestran una serie de características comunes que permiten plantear algunas consideraciones aplicables a todos ellos. Tal es el caso de su aparente origen a partir de materiales calcáreos. El contenido de materia orgánica es en general relativamente alto, siendo éste mayor del 5%, lo cual junto con sus características de pH casi neutro lo hace candidato para el desarrollo de la mayoría de los cultivos productivos del país (Duch, 1988) y así también, para el desarrollo de actividad microbiana.

IV. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

IV. 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biodegradación del DDT mediante un sistema de fermentación en medio sólido anaerobio-aerobio, en suelo del Estado de Yucatán contaminado artificialmente.

IV. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar las características bióticas y fisicoquímicas del suelo para su biorremediación.
2. Evaluar la biodegradación de DDT mediante la bioaumentación en sistemas anaerobio y aerobio
3. Evaluar los principales productos de la degradación del DDT.

IV. 4. HIPÓTESIS

La bioaumentación en cooperación de poblaciones microbianas de manera secuencial anaerobia-aerobia en un sistema de fermentación en estado sólido, es un modelo útil para la biodegradación de compuestos organoclorados persistentes presentes en suelo tropicales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

V. 1. RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS.

El suelo del estado de Yucatán, al igual que todo el territorio peninsular, se caracteriza por la relativa uniformidad que presenta el sustrato geológico, en particular el manto rocoso superficial, por esta razón se decidió caracterizar sólo dos tipos de suelos en cuanto su contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, pH, humedad, textura y su contenido de DDT, DDE y DDD para posteriormente seleccionar uno de ellos para el estudio de biodegradación de DDT.

Las muestras de los tipos de suelo que se emplearon en el presente trabajo, se colectaron en dos sitios de la zona agrícola del estado de Yucatán. Se tomaron de 10 a 15 muestras por terreno, se utilizó una pala para hacer una excavación de 20 cm de profundidad en forma de "V", se eliminó la tierra suelta y se tomó aproximadamente 1 Kg de muestra del centro de la excavación. En el laboratorio, las muestras de cada terreno se mezclaron para obtener una muestra de 10 Kg homogénea y representativa de cada terreno y se almacenaron en condiciones ambientales. Las muestras se identificaron como: suelo A, que localmente se conoce como tzekel y suelo B, el cual es enriquecido con bagazo de henequén por parte del agricultor con el fin de aumentar el espesor de la capa de suelo.

A) SUELO A.

Los suelos de tipo Tzekel predominantes en la Península de Yucatán, son de naturaleza pobre en materia orgánica.

El cultivo predominante del terreno en donde se realizó el muestreo (8,000 m²) es de hortalizas menores (hierbabuena, rábano, lechuga, etc.), la profundidad del terreno es reducida (30 cm) y los terrenos circundantes son de monte bajo.

B) SUELO B.

Debido a la pobreza orgánica del suelo de Yucatán, una práctica antigua por parte del agricultor es su enriquecimiento con bagazo de henequén, el cual se colecta de desfibradoras localizadas en las cercanías al lugar de aplicación.

La muestra de este tipo de suelo se tomó de un terreno de 6,400 m² y con una profundidad aproximada de 30 cm, en donde el cultivo predominante son hortalizas menores (hierbabuena, rábano, lechuga, etc.). Los terrenos circundantes son predios urbanos (cercaños al poblado de Mocochoá, Yuc.) y monte bajo.

Para los análisis realizados a las muestras fueron empleadas tres muestras de cada tipo de suelo, los ensayos se realizaron por duplicado.

V.1.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.

a) Materia Orgánica.

La determinación se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-21-1985. El procedimiento para el análisis fue el siguiente: se tomó aproximadamente 1

g de muestra y se trituró en mortero hasta obtener una consistencia similar al talco, se pesó 0.1g y se transfirió a un matr az erlermeyer de 500 ml, se agregaron 10 ml de dicromato de potasio 1N y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agitó energicamente por un minuto y se dejó reposar por 30 minutos, posteriormente se agregó 100 ml de agua, 10 ml de ácido fosfórico al 95% y se adicionó 0.5 ml de difenilamina. Se tituló con sulfato ferroso 0.5 N hasta el vire de violeta oscuro a verde. Se corrió un blanco sin materia orgánica. Los c culos se hicieron en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Materia orgánica en \%} = \frac{(V_1 - N_1 - VNF) K}{P}$$

En donde

V_1 = ml de dicromato de potasio empleado en la muestra

N_1 = normalidad del dicromato de potasio

V = ml de sulfato ferroso gastado en la titulación de la muestra

N = normalidad del sulfato ferroso

P = peso de la muestra

$$F = V_0 N_1 / V_B N$$

V_0 = ml del dicromato de potasio en el blanco

V_B = ml de sulfato ferroso gastado en la titulación del blanco

$K = 0.69$ factor de corrección

b) Nitrógeno.

La determinación se realizó para suelos orgánicos de acuerdo al *Manual of ASTM Standards*, D 2973-71 (1992). El procedimiento es una variante del método Kjeldahl y fue el siguiente: una muestra seca de 10 g se digirió con 0.7 g de HgO, 15 g de K₂SO₄ y 35 ml de H₂SO₄ concentrado, hasta que la solución fue traslúcida. Se dejó calentar por 30 minutos más. Ya fría la solución se le adicionó 300 ml de agua y 25 ml de K₂S al 4%, se mezcló y se adicionó una pizca de Zn y 50 ml de NaOH al 45% y sin agitar se colocó en el equipo condensador cuidando recibir el condensado (aprox. 150 ml) en un frasco con H₃BO₃ al 4%. La solución obtenida se tituló con H₂SO₄ 0.1 N usando rojo de metilo/azul de metileno (1:2) en alcohol. Los cálculos se hicieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrógeno \%} = (V \times N) \times 0.14$$

donde:

V = ml de H₂SO₄ requeridos para la titulación

N = normalidad del H₂SO₄.

c) Fósforo.

La determinación se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-94-1985. El procedimiento para el análisis fue el siguiente: Se pesó 10 g de muestra en un vaso de precipitados de 250 ml, se adicionó 20 ml de ácido nítrico y perlas de

ebullición, se cubrió con un vidrio reloj y se llevó a ebullición por 30 minutos, se dejó enfriar y se agregó 10 ml de ácido perclórico y se calentó suavemente por 10 minutos, se dejó enfriar nuevamente y se adicionó 50 ml de agua, se puso a ebullición 5 minutos. Se filtró y se aforó el filtrado a 100 ml, de ahí se tomó 50 ml de muestra a lo que adicionó 20 ml de una solución de vanadomolibdato para el desarrollo de color. Se realizó una curva patrón con pentóxido de fósforo de 0 al 1.5%.

d) pH

La determinación de pH de suelos se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Alef y Nannipieri (1995). A 10 g de suelo seco en matraz de 250 ml, se añadió 25 ml de agua destilada, se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar 1 hora, se midió el pH en el sobrenadante. Se volvió a agitar y se midió, inmediatamente el pH.

e) Humedad

La determinación del contenido de humedad se realizó empleando una balanza para esos fines marca AND (Infrared Moisture Determination Balance) modelo AD-4713.

f) Textura

La determinación de la textura se realizó de acuerdo al método reportado en el Manual para educación agropecuaria (1992). Se tamizó el suelo con mallas de 0.002 y 0.05 mm de abertura y se clasificó de acuerdo a la siguiente especificación:

1. ARCILLA. Son partículas menores que 0.002 mm
2. LIMO. Son partículas de 0.002 hasta 0.05 mm
3. ARENA. Son partículas mayores que 0.05 mm

Con la mezcla de estos tres materiales se obtienen los diferentes tipos de suelos:

ARCILLOSO. 60% de arcilla, 20% de arena y 20% de limo

FRANCO-ARCILLOSO. 40% de arcilla, 30% de arena y 30% de limo

FRANCO 20% de arcilla, 40% de limo y 40% de arena

FRANCO-ARENOSO. 15% de arcilla, 20% de limo y 65% de arena

ARENOSO. 5% de arcilla, 5% de limo y 90% de arena

FRANCO-LIMOSO. 15% de arcilla, 20% de arena y 65% de limo

LIMOSO. 10% de arcilla, 5% de arena y 85% de limo.

V.1.2. CUANTIFICACIÓN DE DDT, DDE y DDD.

La cuantificación de DDT así como de sus principales productos de degradación se realizó mediante la técnica reportada por el Programa Ambiental de la Naciones Unidas (UNEP) revisada en 1992. La técnica se describe esquemáticamente en la figura 5 y a continuación se detalla.

1. Se tomó una muestra del lote a evaluar.
2. Se sometió a un proceso de liofilización.

3. Se pesó aproximadamente 20 g de muestra seca en un cartucho de extracción. Se prepararon dos cartuchos más, uno sirvió como blanco de reactivos y el segundo se le adicionó al igual que a la muestra problema de suelo, estándares internos para el cálculo del porcentaje de recuperación (anexo 1a) que en este caso fueron: hexaciclohexano (HCH) en una concentración de 20 ng/ml y toxiclorobifenil (2,4,5 TCB) en concentración de 25 ng/ml. Los cartuchos se colocaron en equipos soxhlet con 270 ml de hexano y cuerpos de ebullición, se ajustó la temperatura que permitió 11 reflujos por hora. Todos los equipos se forraron con papel aluminio para evitar fotodegradación y para la mejor distribución del calor, se realizó la extracción por 8 horas. Los blancos se realizaron en cada lote de extracciones para asegurar el procedimiento analítico.
4. Se dejó enfriar los equipos y se realizó una segunda extracción con diclorometano por otras 8 horas en las mismas condiciones anteriores, el hexano recuperado de la primera extracción se guardó en refrigeración al igual que el diclorometano de la segunda extracción.
5. Se concentraron los extractos (hexano-diclorometano) con columnas Snyder hasta un volumen final aproximado de 6-10 ml.
6. El solvente remanente se evaporó con una corriente de N₂ hasta un volumen de 0.5-1 ml. Estos extractos se guardaron en refrigeración.
7. Para la separación de las fracciones se empleó columnas de vidrio de 1.5 cm de diámetro por 60 cm de largo, empacadas con 16 g de florisil de malla 60-100. (7a)

El florisil se activó al calentarlo por 6 horas a 300°C y se desactiva parcialmente al adicionarle 5% de agua. (7b) Antes de empacar las columnas, se cubrió el florisil con hexano a fin de realizar el empaque en húmedo. Se adiciona finalmente un cm de sulfato de sodio anhidro.

8. Se depositó el extracto de la muestra en la columna empacada y se eluyó con 70 ml de hexano (F1) a fin de obtener el DDE; sin dejar que se secase la columna, se eluyó una segunda fracción (F2) que consistió de 50 ml de hexano:diclorometano al 50% para obtener el DDT y el DDD.
9. Se concentraron separadamente las fracciones F1 y F2 con columnas Snyder hasta 6-10 ml.
10. Cada muestra se concentró hasta 0.5-1 ml mediante una corriente de N₂.
11. Las fracciones se inyectaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II, con detector de captura de electrones y un inyector split/splitless. Columna capilar HP SE-54 (200 micras de Di y 30 m de largo). Software HP chemstation 3365 serie II. Las condiciones del cromatógrafo fueron: temperatura inicial 70°C por 2 min., rampa con un incremento de 3°C/min. hasta 265°C, sostenida por 25 min. El gas portador fue helio (1-2 ml/min), el gas auxiliar fue una mezcla de argón-metano (30 ml/min). La temperatura del detector fue de 300°C y la del inyector de 280°C.
12. La identificación de los compuestos se realizó en base a un estándar de plaguicidas (ULTRA Scientific)
13. Se calculó el volumen final del concentrado.

14. Se refiere a curvas de calibración de DDT, DDE y DDD, las cuales se construyeron a partir de soluciones de reciente preparación (el mismo día) para reducir al mínimo la presencia de compuestos de degradación.

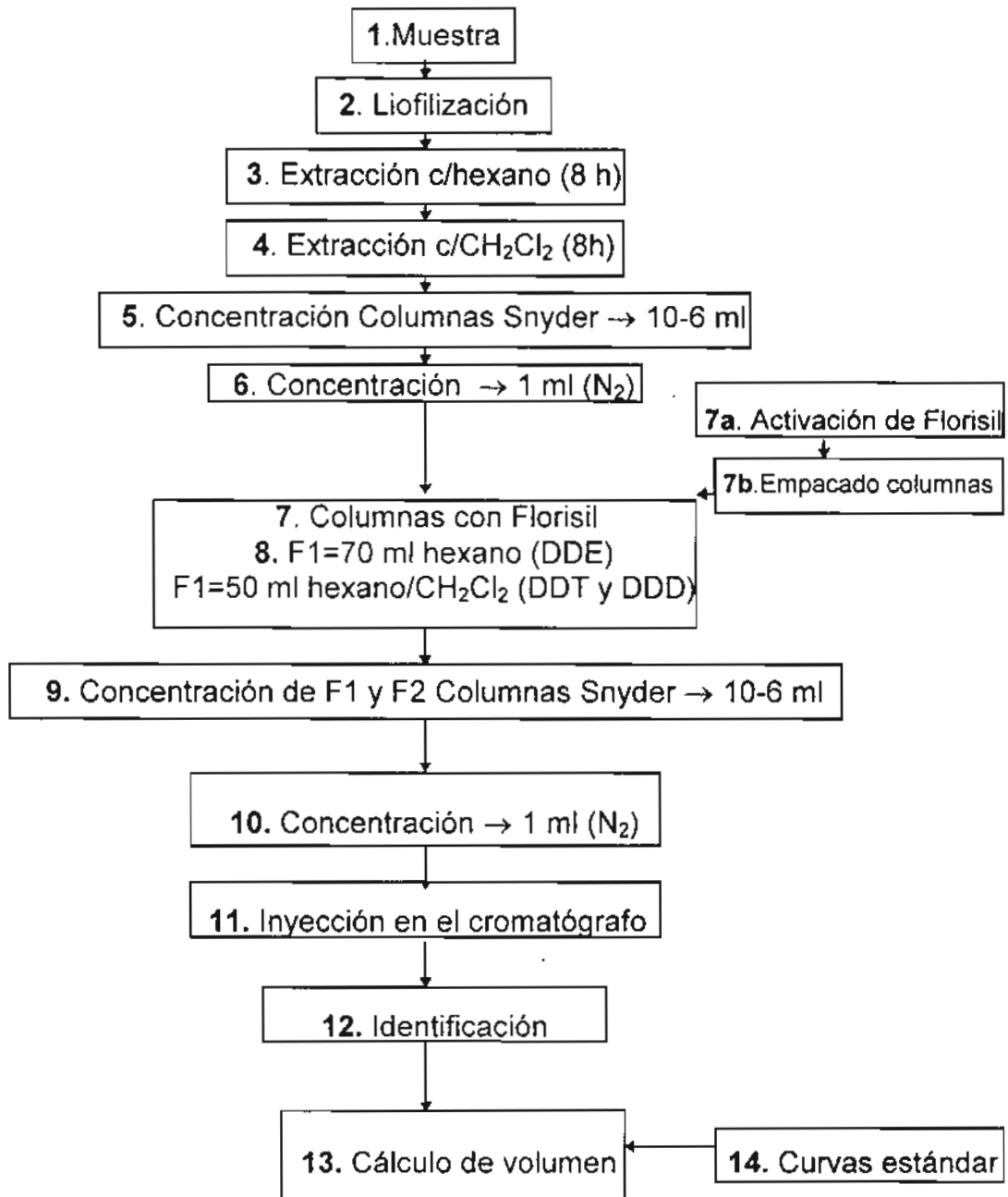


Figura 5. Diagrama de la metodología seguida para la determinación del DDT.

V.1.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL SUELO.

La respiración de los microorganismos en el suelo es uno de los más antiguos y frecuentes parámetros para medir actividad microbiana (Kieft y Rosacker, 1991). La actividad metabólica de los microorganismos presentes en el suelo se cuantificó midiendo la producción de CO₂ (Alef y Nannipieri, 1995).

El modelo que se usó en este trabajo fue el respirómetro de Bartha (Bartha y Shen, 1996), que se ilustra en la figura 6. El respirómetro tiene un reservorio en el que se adicionó 20 ml de solución de NaOH 0.05M, con la ayuda de una jeringa hipodérmica. La solución de NaOH se cambió cada 6 horas durante un período de 96 horas. La temperatura de incubación fue de 25°C.

Se prepararon cuatro respirómetros de 250 ml de capacidad con el propósito de evaluar la respiración basal e inducida.

1.- Respiración basal: definida como la respiración sin la adición de un sustrato orgánico. En el matraz se mezclaron 20 g de suelo seco y 10 ml de agua.

2.- Respiración inducida: se adiciona un sustrato de fácil degradación. En el matraz se mezclaron 20 g de suelo seco, 10 ml de agua y 0.2 g de glucosa.

A fin de evaluar el efecto del DDT sobre la respiración del suelo se incluyeron dos pruebas más adicionando el plaguicida.

3.- Respiración basal con DDT: Se mezclaron 20 g de suelo seco, 10 ml de agua y 5×10^4 ng de DDT.

4.- Respiración inducida con DDT: Se mezclaron 20 g de suelo seco, 10 ml de agua, 0.2 g de glucosa y 5×10^4 ng de DDT.

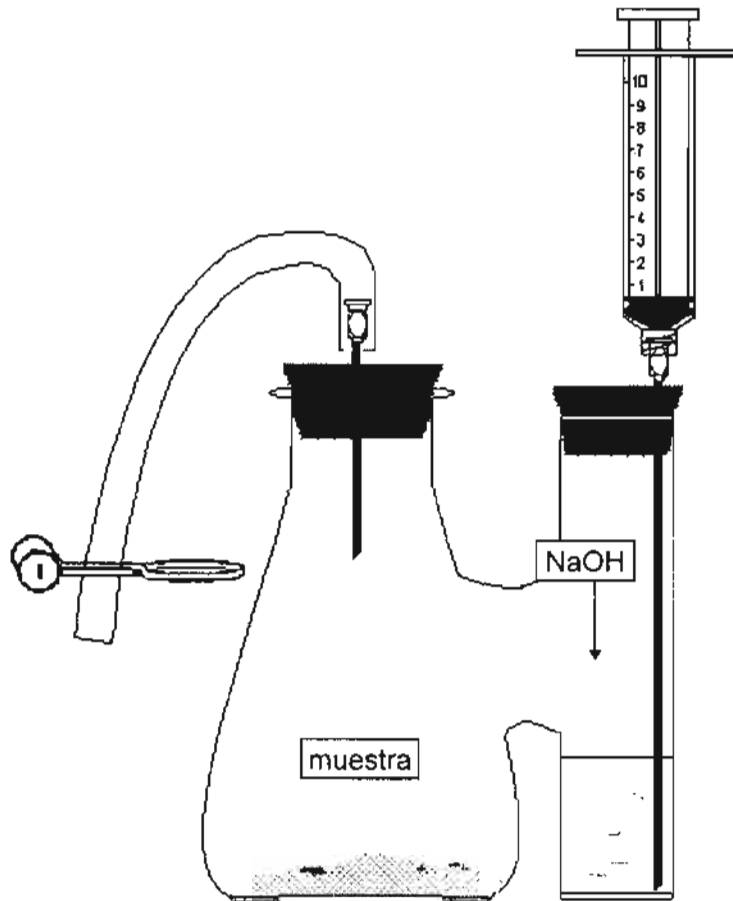


Figura 6. Matraz biométrico del modelo de respirómetro de Bartha.

El CO_2 producido, se midió titulando la solución de NaOH extraída, se le adicionó 0.5 ml de cloruro de bario y unas gotas de fenolftaleína como indicador. Se tituló con HCl, bajo agitación hasta la desaparición del color rosa. El agua que se usó fue libre de CO_2 .

La estimación de CO₂ se realizó de la forma siguiente:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg)} = (\text{V}_0 - \text{V}) \times 1.1 / \text{SW}$$

donde: SW es la cantidad de suelo seco en miligramos, V₀ es el HCl empleado para la titulación (ml) del blanco y V ml gastados en el experimento con suelo y 1.1 es el factor de conversión (1 ml NaOH 0.05 M = 1.1 mg de CO₂).

V.2. INÓCULOS EMPLEADOS.

En este trabajo se emplearon los diferentes inóculos que se describen a continuación:

1. Un lodo anaerobio (LA) procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria refresquera, con una concentración de sólidos suspendidos volátiles de 13.84 g/l. Se mantuvieron a 37°C bajo condiciones anaerobias en un cuarto de incubación, hasta su uso.
2. Un cultivo mixto comercial constituido por: cinco especies de *Pseudomonas*, sp., de una *Klebsiella* sp., de cuatro *Rhodocci* sp. y dos cepas de hongos (HAB de la InterBio Ltd UK), reportadas como degradadoras de compuestos aromáticos halogenados. El cultivo en su presentación liofilizada se mantuvo en un frasco limpio cerrado a temperatura ambiente. El inóculo se preparó haciendo una

suspensión de 4 g de HAB en 200 ml del medio B que se describe en la tabla 4 y 1 mg/ ml de extracto de levadura, se incubó con agitación continua de 100 rpm por 24 horas a 35°C.

3. El hongo *Phanerochaete chrysosporium*, cepa H-298 (CDBB) se adquirió en la colección de Cultivos Microbianos del CINESTAV-IPN. Se propagó en tubos inclinados con PDA incubados por 5 días a 35°C. Las esporas se cosecharon 24 horas antes de iniciar el cultivo aerobio con 30 ml de solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) y el conteo se realizó en cámara de Neubauer a una dilución adecuada que permitiera contar 50 esporas por cuadro (García, 1996).

V.3. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados según las condiciones de cultivo se describen a continuación.

Para los cultivos anaerobios, se empleo el medio A que se detalla en la tabla 3. Los requerimientos se calcularon de acuerdo a lo reportado por Speece (1996) teniendo como base el medio Balch modificado (Monroy y Olguin, 1992). La humedad final de la mezcla se ajustó para alcanzar un 60% propia para el crecimiento microbiano en FSS. Para los microorganismos aerobios cultivados en botellas serológicas, se usó el medio B, que se muestra en la tabla 4, reportado por el proveedor para el

crecimiento del cultivo HAB y se adicionó 1g de glucosa por litro de medio para garantizar el crecimiento inicial de los microorganismos.

Para los cultivos aerobios efectuados en los reactores tubulares de 50 g, se empleó el medio C, además de sacarosa, K_2HPO_4 y urea de acuerdo a la mezcla presentada en la tabla 6. El bagazo de caña, se molió en un equipo Pulvex 200 y se tamizó hasta un tamaño de malla 20 (Tyler). Se lavó con agua caliente y se secó a temperatura ambiente, ya seco (humedad menor del 5%) se guardó en bolsas de plástico hasta su uso posterior.

Tabla 3. Medio A. Composición del medio utilizado en el cultivo anaerobio.

Componente	Concentración (g/L)	Cantidad adicionada (ml/Kg de suelo)
Balch:		26.0
K_2HPO_4	6.0	
NH_4Cl	2.4	
$NaCl$	2.0	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.1	
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0.16	
Oligoelementos:		16.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	
$CoCl_2$	0.1	
Complemento:		
$FeSO_4$	20.0	39.0
$NiCl$	5.0	0.5
NH_4Cl	200	17.5
$CaCl_2 \cdot H_2O$	16.0	7.3

Tabla 4. Medio B. Composición del medio mineral utilizado en el cultivo aerobio.

Componente	Concentración ($\times 10^{-3}$ g/L)
Na ₂ HPO ₄	500
MgSO ₄ ·7H ₂ O	480
(NH ₄) ₂ SO ₄	350
KH ₂ PO ₄	300
Ca(NO ₃) ₂	40
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1
ZnSO ₄	0.07
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.03
MnCl ₂ ·6H ₂ O	0.02
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02
H ₃ BO ₄	0.02
CuCl ₂	0.01

Tabla 5. Medio C. Composición de la solución de minerales utilizada en el cultivo aerobio.

Componente	Concentración
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25.00 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.70 g
NaCl	0.60g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.80g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.10g
ZnSO ₄	0.60g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.10g
HCl 1M	1.00 L

Fuente: Goodhue, 1996

Tabla 6. Composición de la mezcla del cultivo aerobio.

Componente	Fracción (% p/p)
Suelo contaminado	13
Bagazo de caña	14
Lodos activados	2
K ₂ HPO ₄ , urea y minerales(medio C)	4
Sacarosa	7
Agua	60

Fuente: Aguilera, 1998

V. 4. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE DDT CON ADICIÓN DE INÓCULOS EN SISTEMAS ANAEROBIO Y AEROBIO POR SEPARADO.

Con el propósito de evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la degradación del DDT se realizó un experimento preliminar para el cual se prepararon 6 botellas serológicas de 120 ml con una mezcla de 10 g de suelo y el medio A (tabla 3) con 1×10^4 ng de DDT/ g de suelo. Se ensayaron dos condiciones de cultivo: a) anaerobias con y sin inóculo y b) aerobias con y sin inóculo. En ambos casos se utilizaron controles sin DDT. El esquema de los experimentos realizados se muestra en la tabla 7.

Cultivos anaerobios. Fueron inoculados con 3.4 ml de lodos con 6.5 ml del medio A. Las botellas se cerraron herméticamente y se cambió la atmósfera de aire por una mezcla de gases $N_2:CO_2$ (80:20).

Cultivo aerobio. Fueron inoculados con 2 ml del inóculo HAB y 7.5 ml del medio B. Las botellas se cerraron con un tapón de algodón y gasa.

A todas las botellas se les ajustó la humedad al 60% y se incubaron durante 13 días en un cuarto de incubación a 37°C. Al término de la incubación las muestras se liofilizaron para su posterior análisis de DDT.

Tabla 7. Diseño experimental para la evaluación de la biodegradación de DDT con adición de inóculos en sistemas anaerobio y aerobio.

Sistema de cultivo	Anaerobio		Aerobio	
Inóculo	sin inóculo + nut	con inóculo + nut	sin inóculo + nut	con inóculo + nut
Controles	sin DDT+nut		sin DDT+nut	

nut = nutrimentos

V.5. ADAPTACIÓN DE INÓCULOS AL DDT.

Los dos cultivos mixtos: LA y HAB, fueron sometidos a una adaptación de 40 días a la presencia de DDT, con el propósito de lograr una selección de microorganismos que toleren o degraden este tóxico.

Para la adaptación del cultivo aerobio HAB, se emplearon recipientes cilíndricos de vidrio de dos litros provistas de difusores de aire y para los LA, se construyó un biorreactor de flujo ascendente con capacidad de litro y medio de 90 cm de largo por 5 cm de diámetro. Los cultivos fueron alimentados semanalmente con el medio A para los LA y el medio B para los aerobios, más glucosa (1 g/l) y DDT (5×10^2 ng/ml) en ambos casos.

Después de 40 días los inóculos se concentraron, dejando sedimentar y eliminando el sobrenadante.

V.6. FERMENTACIÓN ANAEROBIA-AEROBIA SECUENCIAL Y AEROBIA

a) DISEÑO EXPERIMENTAL.

Las fermentaciones se realizaron siguiendo un diseño factorial 2X2, dos factores con dos niveles y tres réplicas por tratamiento. Los factores fueron: las condiciones o sistemas de cultivo (anaerobio-aerobio o aerobio únicamente) y los inóculos aerobios empleados (cultivo mixto HAB o *P.chrysosporum*). El esquema del diseño se presenta en la tabla 8. Las fermentaciones se prepararon para tener una duración de dos o cuatro semanas y comparar el proceso secuencial anaerobio-aerobio con el aerobio.

Se establecieron 4 controles con dos réplicas, sin inóculo externo, para determinar el efecto de la adición de nutrientes en el suelo (tabla 8).

Las variables de respuesta fueron las concentraciones de DDT, DDE y DDD, que se midieron al finalizar las fermentaciones.

Tabla 8. Diseño experimental de la bioaumentación del suelo.

Sistema de cultivo	Anaerobio-Aerobio				Aerobio			
Duración de la fermentación	2 semanas + 2 semanas				4 semanas			
Inóculo	HAB + nut.	<i>P.chry</i> * + nut.	Control sin inóculo sin nut.	Control sin inóculo con nut	HAB + nut	<i>P.chry</i> * + nut	Control sin inóculo sin nut	Control sin inóculo con nut

* *Phanerochaete chrysosporium*

nut = nutrimentos

b) PREPARACIÓN DEL SUELO B.

Se colectaron 10 Kg de suelo B y se enriqueció con una solución de DDT para obtener una concentración de 100 ng de DDT/g de suelo. La solución se fue adicionando distribuyéndola uniformemente. Ya húmeda se sometió a mezclado con ayuda de una batidora industrial. La mezcla se dejó secar y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

c) FERMENTACIÓN ANAEROBIA.

En la figura 7, se muestra el esquema de uno de los 6 reactores tubulares de vidrio usados en la fermentación anaerobia. Las dimensiones del reactor fueron, 5 cm de diámetro por 40 cm de largo y se agregó a cada reactor 400 g de suelo con 12% de humedad. El volumen del inóculo anaerobio fue de 100 ml de LA adaptados, por reactor y la composición de los nutrimentos fue la del medio A. La humedad final del sustrato fue de 50 ± 5 %.

Los reactores se mantuvieron en un cuarto con temperatura constante de 35°C, la fermentación tuvo una duración de dos semanas, los reactores se vaciaron y se sometieron a un posterior cultivo aerobio.

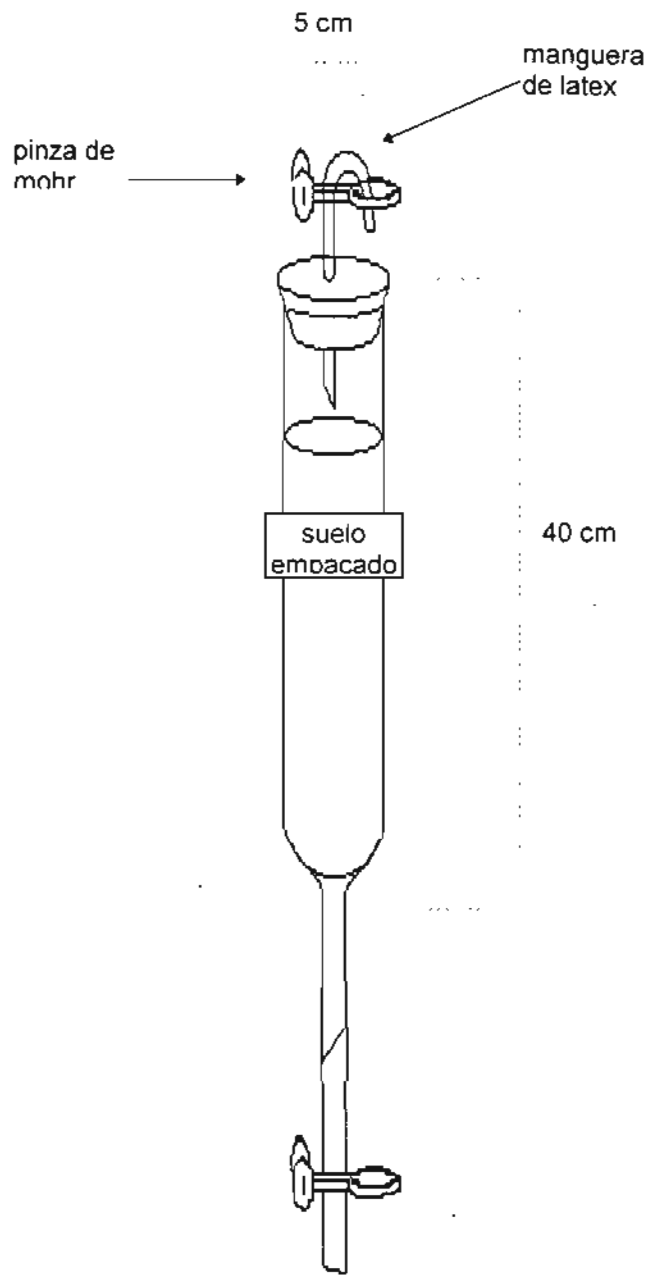


Figura 7. Fermentador anaerobio

d) FERMENTACIÓN AEROBIA.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en veinte reactores tubulares de vidrio de 50g de capacidad, de 3.5 cm de diámetro por 20 cm de largo, se agregó a cada reactor 45g de suelo, el volumen de inóculo fue de 8.9 g de cultivo HAB adaptado, por reactor. El medio se formuló de acuerdo a la mezcla de la tabla 6, con suelo contaminado (proveniente o no de una previa fermentación anaerobia). Todos los reactores fueron sumergidos en una tina de inmersión provista de un controlador de temperatura Haake para mantener la temperatura constante de 35°C. El aire comprimido (0.2 Kg/cm² manométrico) de la alimentación a los reactores 0.5 litros de aire por kilogramo de material de empaque por minuto (VKgM), se humidificó mediante burbujeo continuo en columnas de agua colocadas inmediatamente abajo de los fermentadores como se indica en la figura 8. La producción de CO₂ se monitoreó en línea por cromatografía de gases.

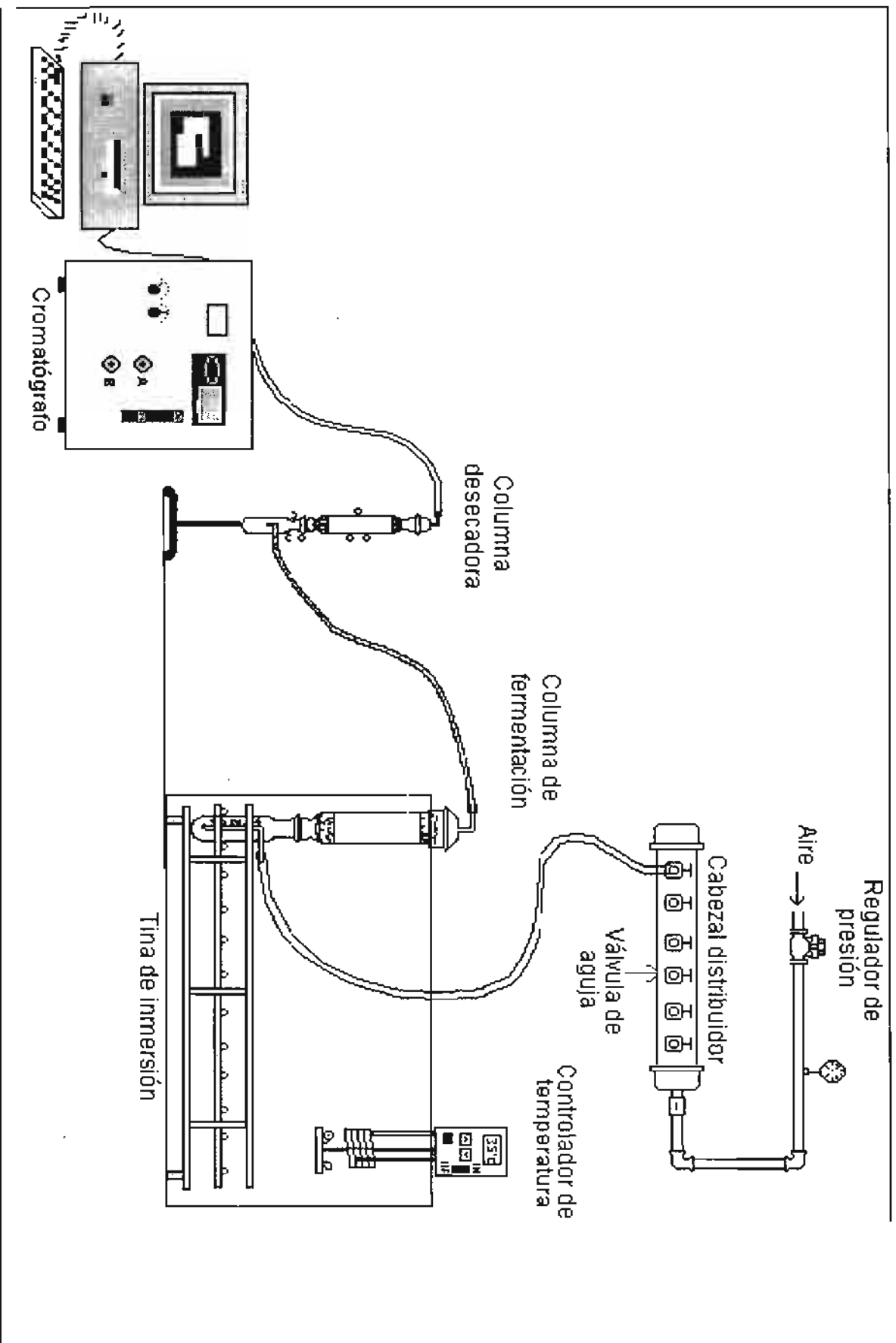


Figura 8. Fermentación aerobia.

V.7. MEDICIÓN DE LAS ACTIVIDADES MICROBIANAS.

Para evaluar indirectamente la actividad metabólica, se realizó la medición de la producción de los gases CH_4 y CO_2 en los cultivos anaerobios y CO_2 en los cultivos aerobios.

Actividad anaerobia. Se extrajo una muestra de 2 ml de gas, con una jeringa hipodérmica y se inyectó en un cromatógrafo de gases Gow-Mac equipado con un detector de conductividad térmica y una columna carbosphere malla 100-80 a una temperatura de 140°C .

Actividad aerobia. La medición del gas producido se realizó en forma continua a través de un cromatógrafo Gow-Mac 580 con detector de conductividad térmica y un sistema de adquisición e integración de cromatogramas multivía CHROMA V 3.0.

La producción de cada gas se determinó en base a una curva de calibración (mmol vs area), el gas acumulado se graficó contra el tiempo.

V.8. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS: REDUCTASAS Y PEROXIDASAS EN LA DEGRADACIÓN DEL DDT.

Los ensayos de actividad reductasa se realizaron siguiendo la metodología reportada por Fulk (1996). Toda la metodología se realizó bajo condiciones anaerobias dentro de una pequeña cámara (figura 9A y 9B) que se diseñó y construyó para este fin. Se tomó 5 g de muestra y se le adicionó 10 ml de buffer Tris-HCl 50mM de pH 7.0, se sonicó (sonicador Soniprep 150) 3 veces por 30 segundos a amplitud media y se centrifugó (centrífuga Beckman J2-HS) a 47 900 xg por 20 minutos, se tomó 4.5 ml del sobrenadante (extracto crudo enzimático) y se le adicionó 5 ml de metil viologeno 4 mM en buffer Tris-HCl, se cambió la atmósfera de la parte superior del tubo por H₂ y se leyó en un espectrofotómetro (Beckman DU650) a 578 nm por 10 minutos a intervalos de 30 segundos en caso de no lograr coloración en este tiempo, se incubaron los tubos a 37°C por 24-48 horas. Se realizó el mismo análisis sin someter a sonicación la muestra y definir si las enzimas son intra o extracelulares. La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar una unidad de absorbancia por minuto.

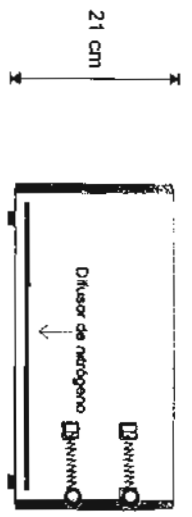
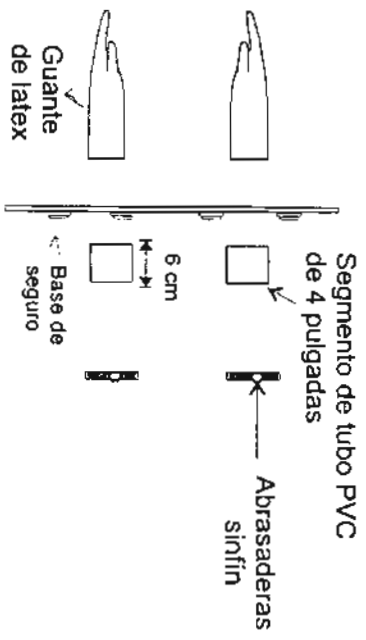
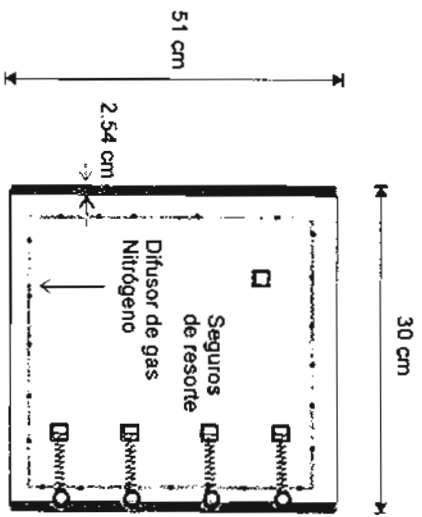
Los ensayos de actividad peroxidasa se realizaron siguiendo la metodología reportada por Ramachandra y col., (1988). Se tomó 5 g de muestra y se adicionó 10 ml de buffer de fosfatos, se mezcló y centrifugó a 47 900 xg por 20 minutos, el sobrenadante se dividió en dos partes iguales de 4.5 ml, una de ellas se calentó a

100°C por 10 minutos para desactivar la enzima y obtener un control. La mezcla de reacción se preparó de la manera siguiente: 200 µl de 4-aminoantipirina 82 mM, 200 µl de 2,4-diclorofenol 1.0 mM, 1200 µl del extracto enzimático y 200 µl de peróxido de hidrógeno 4 mM, el cual se adicionó en el momento justo de la lectura. Las muestras se leyeron espectrofotométrica a 510 nm por 10 minutos a intervalos de 30 segundos.

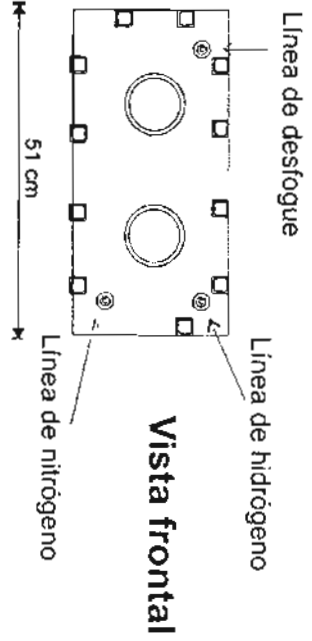
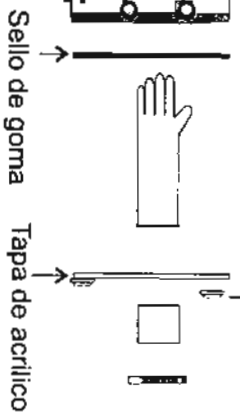
La unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para incrementar, una unidad de absorbancia por minuto.

Se realizó la cuantificación de proteína (Bradford, 1976) para el cálculo de la actividad específica. Se tomó 1 ml del extracto enzimático y se adicionó 1 ml de NaOH 1N, se hirvió la mezcla por 5 minutos para solubilizar proteínas, se tomó una alícuota de 200 µl y se adicionó 1.5 ml de reactivo de Bradford (BioRad) se agitó y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos, se leyó a 595 nm en el espectrofotómetro, la lectura se interpola en una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

Vista superior



Vista lateral



Vista frontal

Figura 9A. Cámara anaerobia

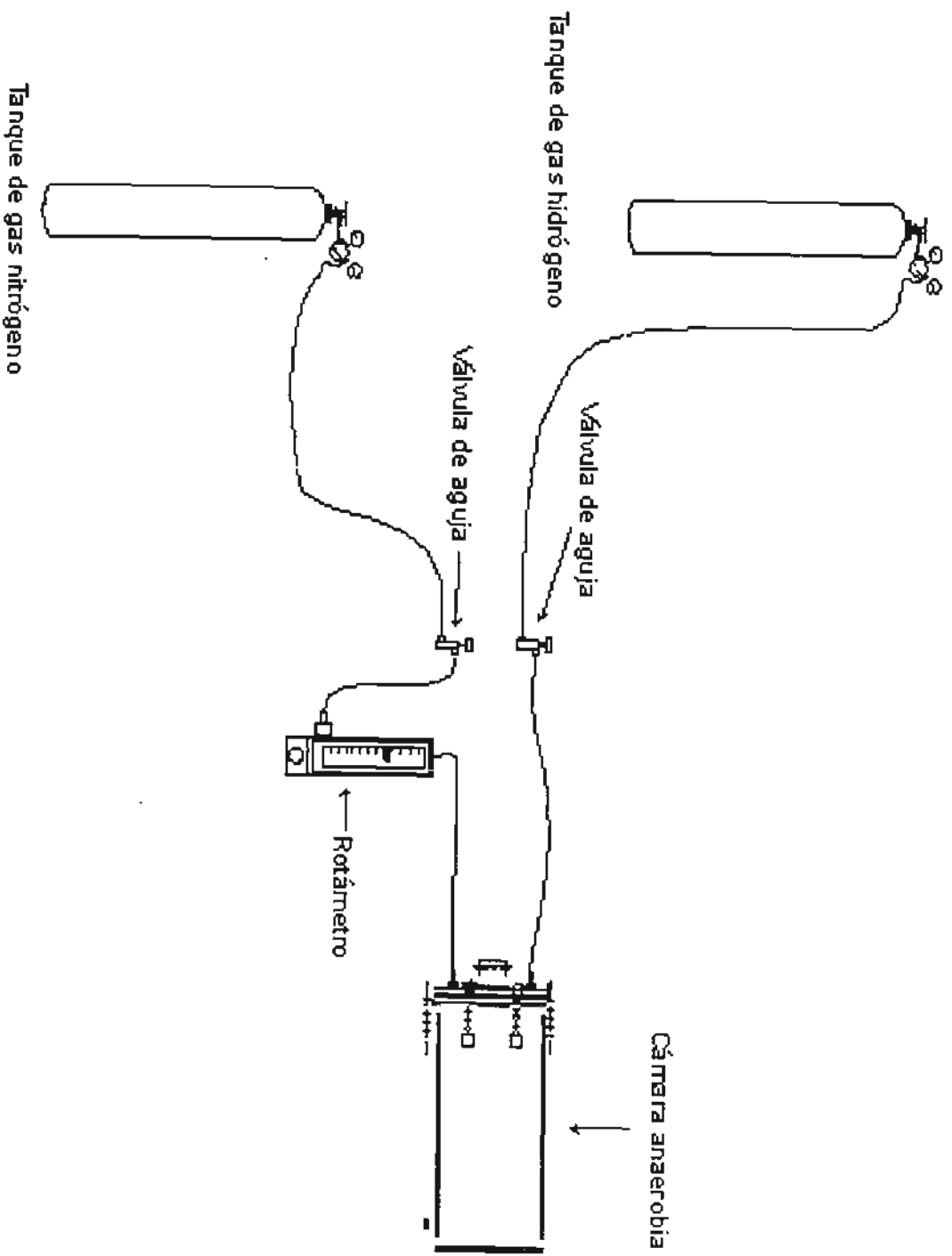


Figura 9B. Accesorios en torno a la cámara anaerobia.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 10, se presenta de manera esquemática la estrategia de trabajo. En la primera etapa se caracterizaron dos tipos de suelo y se seleccionó el que presentó las mejores características para el estudio de biodegradación de DDT, posteriormente al suelo seleccionado se le evaluó su actividad microbiana mediante la producción de CO₂ en presencia y ausencia de DDT. En la segunda etapa se evaluó la degradación de DDT bajo condiciones anaerobias y aerobias y en presencia o ausencia de inóculo. En la tercera y última etapa se evaluó la degradación de DDT en condiciones aerobia y anaerobia-aerobia secuencial, posteriormente se siguió una cinética de la transformación del DDT en condiciones anaerobias-aerobias y se evaluaron las actividades enzimáticas reductasa y peroxidasa.

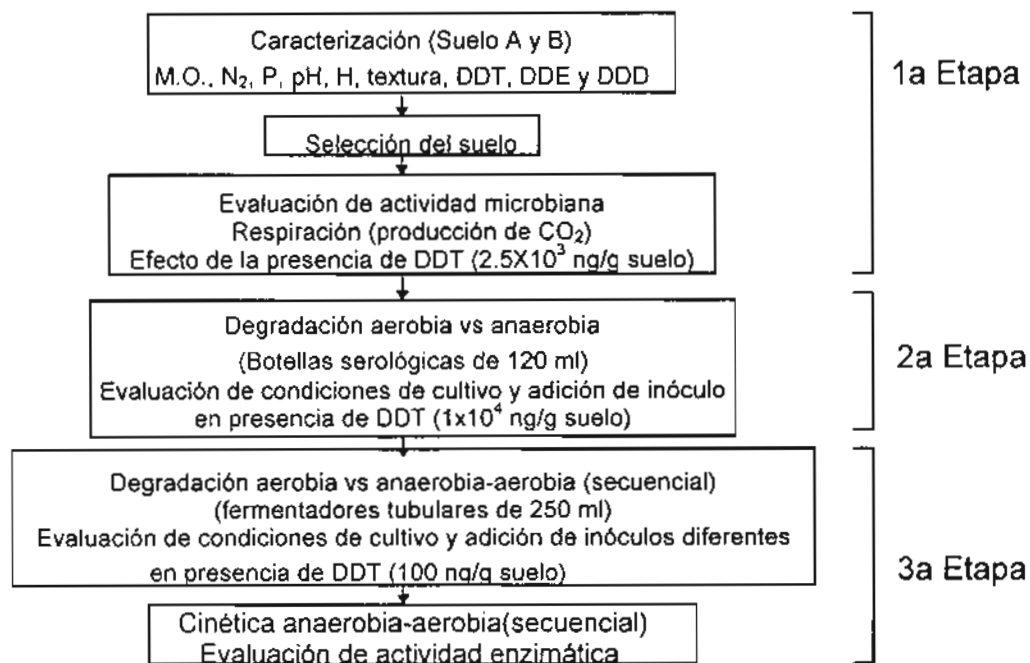


Figura 10. Esquema de la estrategia de trabajo

VI. 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS A Y B.

Las caracterizaciones de los dos tipos de suelos colectados se realizaron con el propósito de seleccionar uno de ellos como sistema de trabajo, para ello se evaluaron las principales características fisicoquímicas que pueden tener influencia sobre el proceso de degradación del DDT, así como saber si éstos estaban contaminados con éste tóxico.

a) CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS.

Los componentes químicos, físicos y biológicos del suelo determinan en gran medida sus propiedades características y dan información para definir un programa de remediación. Entre los componentes químicos, aquellos relacionados como nutrimentos son importantes, en especial el nitrógeno y el fósforo ya que son una fuente importante para el crecimiento celular, además de la fuente de carbono proveniente de la materia orgánica. Otros factores importantes son la humedad, el pH y la capacidad de intercambio catiónico (Cookson, 1995).

Los resultados de estos análisis realizados a las muestras de suelos se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de suelo A y B.

Muestra de suelo	% Humedad	% Mat. Orgánica	% Fósforo	% Nitrógeno	pH	CIC meq/100g
A	11.81 ± 1.87	9.19 ± 0.35	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.01	6.62 ± 0.09	41.54 ± 0.02
B	12.18 ± 1.56	29.06 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.36 ± 0.01	6.63 ± 0.01	68.59 ± 0.08

Como se puede observar en la tabla anterior, se presentan diferencias en los resultados de materia orgánica, fósforo, nitrógeno y la capacidad de intercambio catiónico entre ambas muestras de suelos agrícolas. Los valores obtenidos del suelo B, fueron de manera general más altos que los obtenidos en el suelo A. Por las características fibrosas del bagazo de henequén, era de esperarse un mayor contenido de humedad y de materia orgánica. Los contenidos de nitrógeno y fósforo son de al menos, el doble que lo obtenido para el suelo A.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), aumenta a medida que aumenta la materia orgánica (Soil Fertility Manual, 1988), lo que coincide con los mayores valores de materia orgánica en el suelo de bagazo de henequén. La CIC también está influenciada por la textura del suelo, así la arcilla proporciona a los suelos una alta capacidad de retención de agua y nutrientes que favorecen la CIC.

De acuerdo a los resultados de la tabla 10, el suelo A podría ser clasificado como arcilloso, así el valor de la CIC obtenida para este tipo de suelo (tabla 9) de 41.54 ± 0.02 , está dentro del rango reportado para suelos arcillosos (11 y 50 meq/100g) (Soil Fertility Manual, 1988).

Tabla 10. Textura de las muestras de suelo.

Muestra de suelo	A	B
Arena (%)	16.4	28.4
Limo (%)	20.4	39.8
Arcilla (%)	63.2	31.8

Los suelos de textura fina (arcillosos) se compactan con más facilidad, esto reduce el espacio poroso, lo que limita tanto el paso del aire como del agua a través del suelo, limitándose así el transporte de nutrimentos y proliferación de microorganismos aerobios (Manuales para educación agropecuaria, 1992).

El suelo B, se podría clasificar como del tipo franco-arcilloso (Manual para Educación Agropecuaria, 1992). Los suelos de este tipo retienen grandes cantidades de agua y nutrientes, carecen de porosidad y contienen poco aire, tienden a apelmazarse y formar grandes terrones.

Geerdink y col. (1996) sugieren que la degradación en un suelo está fuertemente influenciada por su contenido de arena, materia orgánica y arcilla, la arena no inhibe la degradación de contaminantes no polares, la materia orgánica limita la velocidad del transporte a los microorganismos y la arcilla presenta una velocidad de transporte lenta (100 veces más lento que en la materia orgánica).

Lo anterior sugiere que un suelo del tipo franco-arcilloso como el B tiene características que lo hacen más favorable que el A para alojar microbiota, pues tiene el doble de materia orgánica, la mitad de arcilla y mayor contenido de arena.

b) Determinación de DDT, DDE y DDD.

En la tabla 11, se presentan los resultados obtenidos del análisis de DDT, DDE y DDD efectuados en los dos tipos de suelo. Estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados en muestras de suelos y sedimentos en varias partes del mundo (U.S. Department of Health and Human Services, 1994).

La concentración de DDT más alta fue de 1.27 ± 0.12 ng/g y correspondió a la muestra de suelo B (enriquecida con bagazo de henequén por parte del agricultor) a diferencia de la muestra A (tzekel) que tuvo una concentración de 0.92 ± 0.15 ng/g. Es importante notar en la tabla 11, que las concentraciones de DDT en ambas muestras son mayores que las encontradas para sus productos de degradación (DDE y DDD) de lo cual se puede inferir que, la incorporación del DDT es reciente o que en ambos tipos de suelo se presenta resistencia a su degradación, la transformación así como su velocidad dependerá de las condiciones del suelo su contenido de metales y de la población microbiana presente en el suelo (Hitch y Day 1992). La incorporación reciente de DDT se explica por la cercanía del terreno a un poblado y las continuas campañas para el control de plagas de moscos transmisores de enfermedades, así como por la incorporación de la materia orgánica brindada por el bagazo de henequén, sujeto también a contaminación por DDT.

Tabla 11. Resultados del análisis de DDT y sus productos de degradación en las muestras de suelo.

Muestra de suelo	DDD (ng/g)	DDE (ng/g)	DDT (ng/g)
A	0.19 ± 0.1	0.57 ± 0.12	0.92 ± 0.15
B	0.6 ± 0.08	0.58 ± 0.2	1.27 ± 0.12

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos medidos en las muestras de suelos, el B, es el que presenta los valores más altos de nutrientes y las características de textura mejores para ser empleado como modelo en el estudio de biorremediación, así como las mayores concentraciones de DDT, DDE y DDD.

VI. 2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL SUELO D

Con el propósito de observar si el suelo seleccionado presentaba actividad microbiana, así como evaluar si el DDT resultaba tóxico a los microorganismos nativos del suelo, se midió la respiración basal e inducida del suelo en presencia y ausencia de DDT adicionado (2.5×10^3 ng/g). Mitra y Raghu (1998) reportaron la inhibición de actinomicetos y hongos a concentraciones de 5×10^3 ng de DDD/g de suelo.

Los resultados sobre la producción de CO_2 en el suelo (figura 11) indican una actividad microbiana nativa que puede ser aerobia y anaerobia. Se observa que, en las pruebas de respiración basal (en presencia y ausencia de DDT) se generó la misma cantidad de CO_2 indicando que la presencia de DDT no afectó la respiración basal ($0.7 \text{ mg CO}_2/\text{ g suelo día}$).

La producción de CO_2 en la prueba de respiración inducida fue del 55% de la esperada si toda la glucosa se hubiera consumido (anexo 1b), siendo similar a la reportada por Ramírez (1998) de 56.8% pero con 6 días más de incubación usando el mismo respirómetro e igual concentración de glucosa. Las pendientes indican una buena respuesta ($2.1 \text{ mg CO}_2/\text{ g suelo día}$) de los microorganismos nativos tanto aerobios como anaerobios y que la presencia de DDT no afecta la respiración inducida.

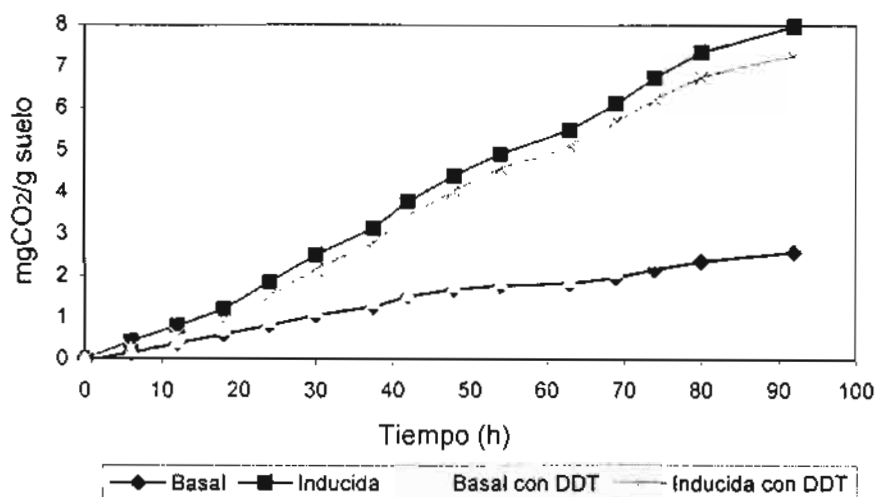


Figura 11. Producción de CO₂ como respuesta de actividad microbiana nativa en muestras de suelo B.

VI. 3. EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE DDT CON ADICIÓN DE INÓCULOS EN SISTEMAS ANAEROBIO Y AEROBIO POR SEPARADO.

Con el propósito de ofrecer condiciones ambientales anaerobias y aerobias más específicas a los microorganismos se corrieron cuatro fermentaciones con y sin inóculos para determinar si el DDT era degradado en condiciones anaerobias y aerobias. Así también, ya que en la sección anterior se observó que 2.5×10^3 ng/g DDT, no impide la actividad microbiana nativa, se quiso observar al sistema a una mayor concentración de DDT (10×10^3 ng/g), pero sin rebasar los límites de contaminación reportados (ver sección de antecedentes).

Se realizaron dos controles uno anaerobio y otro aerobio a los cuales se les adicionó medio de cultivo, sin la adición de inóculo ni DDT que sirvieron para hacer la corrección de la presencia inicial de DDT en el suelo y observar su degradación sólo por la presencia de nutrientes y de los microorganismos nativos.

En la tabla 12, se presentan los resultados de la degradación de DDT en cultivos anaerobios y aerobios. Se observa que en condiciones anaerobias se alcanzó una mejor remoción de DDT que en la aerobia y que el inóculo favorece la degradación de DDT en ambos tipos de cultivo. Las muestras sometidas a condiciones anaerobias, presentaron la mayor degradación de DDT. En la fermentación anaerobia sin inóculo la degradación se lleva a cabo por los microorganismos nativos del suelo. En la fermentación anaerobia con inóculo el efecto aditivo de incorporar un inóculo incrementó la eficiencia en 25%. McIntyre y Mills (1974), reportan que las condiciones anaerobias presentan una mayor eficiencia en el proceso de decloración de la molécula de DDT porque es un proceso reductivo. En el cultivo aerobio sin inóculo no se presentó degradación de DDT; con la adición de inóculo se obtuvo un incremento en 19% de remoción de DDT, todavía por debajo de los resultados obtenidos en las pruebas anaerobias.

El aumento en la concentración de DDT en los cultivos no impidió el desarrollo de la actividad microbiana anaerobia y aerobia, en ambas condiciones de cultivo se presentó degradación de esta molécula al adicionar un inóculo.

Tabla 12. Concentraciones finales de DDT encontradas en las muestras de suelo adicionadas inicialmente con 10×10^3 ng DDT/g de suelo.

Fermentación	DDT ($\times 10^{-3}$ ng/g) remanente	% remoción
1) Anaerobia sin inóculo	6.7 ± 0.36	33
2) Anaerobia con inóculo	5.0 ± 0.05	50
3) Aerobia sin inóculo	12.6 ± 3.40	0
4) Aerobia con inóculo mixto (HAB)	8.1 ± 0.17	19

El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre las condiciones de cultivo (anaerobias o aerobias) ($F_{1,11} = 10.3894$; $p = 0.009125$) y entre los tratamientos 1,2,3 y 4 de la tabla 12 ($F_{1,11} = 10.4383$; $p = 0.0038$). En el anexo 2a se muestran las tablas de anova.

VI. 4. EVALUACIÓN DE LAS FERMENTACIONES ANAEROBIA-AEROBIA SECUENCIAL Y AEROBIA EN LA DEGRADACIÓN DEL DDT.

En el experimento anterior se observó que el cultivo anaerobio favorece la degradación del DDT, sin embargo, los productos de degradación del DDT siendo aun compuestos aromáticos es muy probable sean degradados bajo condiciones aerobias.

Uno de los pasos importantes en esta investigación fue evaluar las condiciones de fermentación junto con la bioaumentación del suelo en la reducción del DDT usando inóculos adaptados al DDT (Materiales y métodos, sección V.5).

Se realizó un diseño factorial para evaluar el efecto de un pretratamiento anaerobio seguido de cultivo aerobio comparandolo con el tratamiento aerobio. Se emplearon inóculos mixtos anaerobios y aerobios adaptados por separado y se probó también el efecto del hongo *Phanerochaete chrysosporium* que contiene un sistema enzimático capaz de degradar compuestos recalcitrantes como el DDT (Leahy y Brown, 1994). Se preparó un lote de suelo al cual se le adicionó 100 ng de DDT/g de suelo, se bajo de nuevo la concentración de DDT para estar más cerca de los límites de DDT encontrados en los suelos A y B (menores de 1.5 ng/g).

En el transcurso de 28 días de cultivo se midió la actividad de los cultivos mediante las producciones de CH₄ y CO₂ según fuera el caso y la respuesta degradativa se midió en función de la disminución en la concentración de DDT en las muestras y el aumento en la concentración de sus principales productos de degradación.

a) MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA.

Actividad anaerobia. Una forma de medir la actividad microbiana anaerobia es seguir la producción de metano y bióxido de carbono (Alef y Nannipieri, 1995).

Como se puede observar en la figura 12, en el cultivo anaerobio, la producción de metano en el reactor que se inoculó con los lodos alcanzó un máximo en el día 13 (0.25 mmoles/g de suelo) que representa la degradación del 11% de la materia orgánica total a una velocidad de degradación específica de 0.181 gDQO-

$\text{CH}_4/\text{gSSV}/\text{día}$ (cálculos en Anexo 1c) esto significa que aun bajo condiciones anaerobias la metanogénesis no es dominante en este sistema.

En los sistemas que sólo contenían agua o nutrientes, la producción de CH_4 fue nula lo que indica la no presencia significativa de una población de microorganismos metanogénicos entre la flora nativa, sin embargo la generación de CO_2 sugiere una actividad microbiana natural distinta de la metanogénica, como se observó también en el experimento con los respirómetros de Bartha (sección VI.2). Al igual que en el caso del CH_4 , la mayor producción de CO_2 se obtuvo en el reactor inoculado. La actividad microbiana natural en el suelo con y sin nutrientes, muestra que el DDT añadido no resulta tóxico para los microorganismos anaerobios presentes en el suelo.

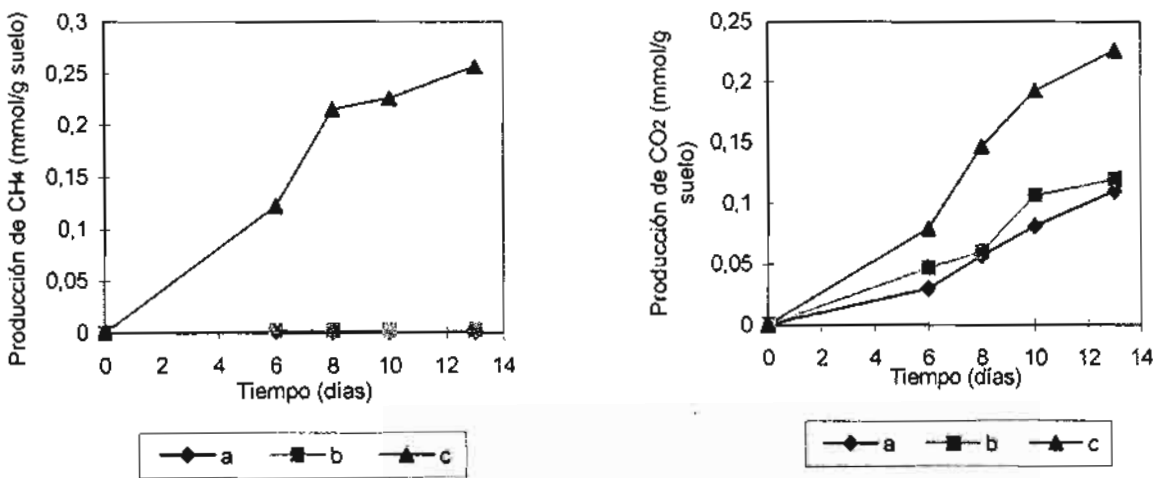


Figura 12. Producción de CH_4 y CO_2 en reactores anaerobios en presencia de DDT con: (a) suelo y agua, (b) suelo y nutrientes y (c) suelo, nutrientes y lodos.

Es muy probable que la degradación de DDT, no haya contribuido significativamente a la producción de metano ya que la cantidad adicionada (100 ng DDT/g suelo) medida como aporte de DQO (2.03 g DQO/g DDT, anexo 1d) es mínima respecto a la aportada por la DQO del suelo mismo que contiene 29% de materia orgánica.

Actividad aerobia. En la figura 13 (A), se muestra el registro continuo de la producción de CO₂, de los 4 reactores aerobios con distintos inóculos (tabla 8 del capítulo de materiales y métodos), dos de estos reactores provenientes de previo cultivo anaerobio. Las mediciones se realizaron cada hora por un período de 4.5 días y no se continuó por más tiempo debido a que todos los sistemas se estabilizaron después de 1.5 días. Se puede observar que las actividades más altas son las registradas por las fermentaciones inoculadas con el cultivo HAB probablemente debido a la característica de ser un inóculo mixto.

Por otro lado la producción máxima de CO₂ de los cultivos inoculados con *P.chrysosporium*, se alcanzó hasta después de 12h de fermentación, lo que era de esperarse ya que el crecimiento de los hongos es más lento que el de bacterias, aún cuando se realizó un precultivo de 24 h del hongo.

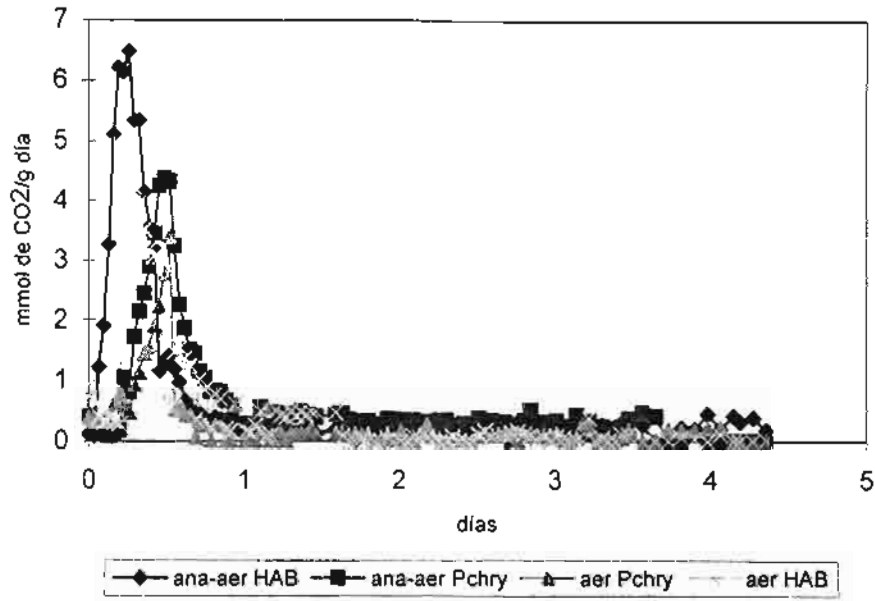
Del cálculo de la producción de CO₂, se observó que a partir del segundo día de fermentación, la producción se redujo en un 86%, registrándose valores iguales o menores a 2.5 mmol de CO₂/g día, a pesar de que únicamente alrededor del 50% de

la fuente de carbono adicionada (sacarosa) fue consumida durante las primeras 12 horas (cálculos en Anexo 1e).

En la figura 13 (B) se representa la producción acumulada de CO₂ producida durante 4.5 días. Los valores de producción van de 0.94 a 2.49 mmoles de CO₂/ g de suelo. Se observa que la mayor producción fue alcanzada por el sistema anaerobio-aerobio inoculado con lodos anaerobios (LA) y cultivo HAB. Esto es debido a que el inóculo contiene una mayor carga microbiana que los otros. Es probable que microorganismos facultativos presentes en la etapa anaerobia se desarrollaron favorablemente en la etapa aerobia alcanzando esta alta actividad.

Los sistemas anaerobio-aerobio con LA y *P. chrysosporium* y aerobio con cultivo HAB, se comportaron de manera similar, sin embargo se observa un metabolismo más retardado de *P. chrysosporium* pues después de 3 días de fermentación continua la producción de CO₂.

A)



B)

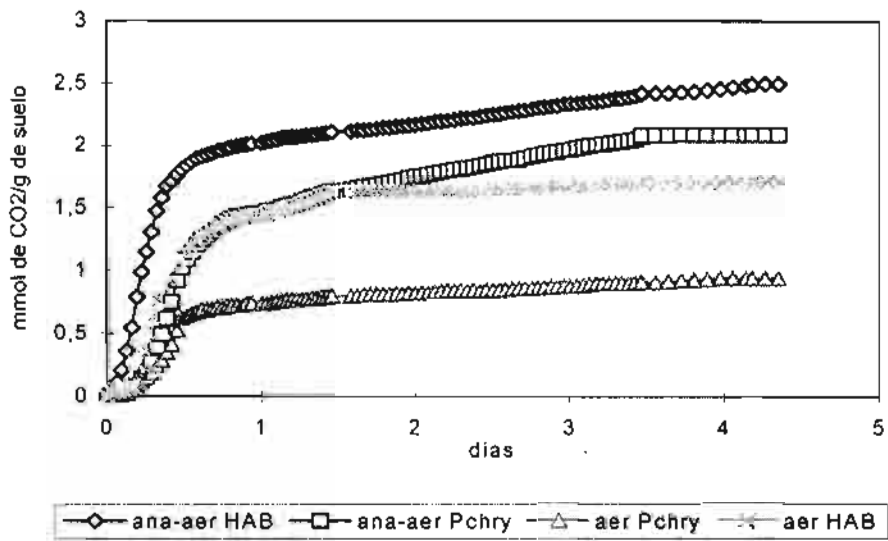


Figura 13. Producción de CO₂ en cultivos aerobios. Instantánea (A) y acumulada (B). Ana-aer HAB, precultivo anaerobio inoculado en la etapa aerobia con cultivo mixto (HAB) adaptado; ana-aer Pchry, precultivo anaerobio inoculado en la etapa aerobia con *P.chryso sporium*; aer HAB, sin precultivo anaerobio inoculado con cultivo mixto (HAB) adaptado; aer P.chry, sin precultivo anaerobio inoculado con *P.chryso sporium*.

Se observó que en los sistemas secuenciales anaerobio-aerobio, la eficiencia en la degradación del azúcar adicionado como fuente de carbono, fue mayor en comparación con los sistemas aerobios, lo que se puede explicar por la mayor carga microbiana de los primeros. Así, el que mayor y más rápida producción de CO₂ presentó en las primeras 24 horas fue el sistema anaerobio-aerobio inoculado con LA y HAB con una velocidad de producción de CO₂ de 4.07 mmol/g d. Le siguió el sistema anaerobio-aerobio inoculado con LA y *P.chryso sporium* con una velocidad de 1.72 mmol/gd, posteriormente el sistema aerobio inoculado con el cultivo HAB con una velocidad de 1.81 mmol/gd y por último el sistema aerobio inoculado con *P.chryso sporium* con una velocidad de 0.92 mmol/g d (Tabla 13). Después del primer día de fermentación las velocidades de producción de CO₂ fueron menores de 0.2 mmol/g d, sin embargo, se observó en esta etapa que sistema anaerobio-aerobio inoculado con LA y *P.chryso sporium* fue el que presentó la mayor velocidad.

TABLA 13. Producción de CO₂ en cultivos aerobios.

Cultivo	Eficiencia de producción de CO ₂ por fuente de C exógena (%)	Vel. de producción de CO ₂ (mmol/g d)	
		1er día	después 1er día
Ana-aer (HAB)	100.0	4.07	0.15
Ana-aer (<i>P.chrys</i>)	85.0	1.72	0.20
Aerobia (HAB)	69.42	1.81	0.06
Aerobia (<i>P.chrys</i>)	47.18	0.92	0.05

b) DEGRADACIÓN DE DDT Y DDE.

Para asegurar un control de calidad en los análisis se calculó la recuperación de los estándares internos (HCH y 2, 4, 5 TCB) la cual fue del 94% en promedio, lo cual da confiabilidad en la extracción y en el análisis cromatográfico de las muestras realizadas.

En la tabla 14 se presentan los resultados de los análisis de DDT en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos, las concentraciones finales promedio van de 12.88 a 80.69 ng/g, que se encuentran por debajo de la concentración encontrada en el suelo al tiempo cero de 82.69 ng DDT /g de suelo seco.

Es importante hacer la aclaración que aunque el suelo se enriqueció originalmente con DDT para lograr una concentración final de 100 ng de DDT/g de suelo sólo se encontró una concentración al inicio del experimento del 82.69 ng/g. Esto pudo deberse a que parte se haya transformado a DDE o DDD u otro producto de degradación no detectado.

La concentración inicial de DDE en este experimento fue de 16.3 ng/g. No se hizo adición de este compuesto en el suelo, pero es probable la presencia de DDE y DDD como impurezas en el DDT o como resultado también de un proceso de degradación. Si se suman las concentraciones de DDT+DDE en el tiempo cero se

obtiene 98.33 ng, lo que se acerca bastante a la concentración inicial de 100 ng de DDT/g de suelo.

Los resultados del análisis de DDE en las muestras reportaron concentraciones de 5.12 a 23.70 ng/g. El encontrar concentraciones mayores a la reportada al T=0, es el resultado de la acumulación de este compuesto por la degradación del DDT hacia DDE como paso intermedio en la ruta de degradación, como se puede observar en los tratamientos 1,4,5,6 y 8, estos aumentos van del 9 al 45.4%. El favorecimiento al ataque del DDT sobre el DDE en los cultivos está influenciado por las condiciones de fermentación como ya se mencionó en la sección VI. 3.

En la tabla 14, se puede observar, que la reducción de la concentración inicial de DDT en todos los tratamientos, van desde 2.5 al 84.4%, este último obtenido con el experimento que siguió una fermentación secuencial anaerobia-aerobia y se inoculó con *Phanerochaete chrysosporium*. Este resultado muestra la eficiencia en la degradación de DDT de un pretratamiento anaerobio empleando microorganismos procedentes de lodos. Así también, el uso de *Phanerochaete chrysosporium* en un sustrato sólido en condiciones aerobias, dando en conjunto una eficiencia de degradación, medida como desaparición de DDT mayor que en los demás tratamientos probados. Este resultado mejora la degradación de DDT reportada por Bumpus & Aust (1987) del 50% de una concentración inicial de 1.25 nmol/ ml en 30 días de incubación con *Phanerochaete chrysosporium*.

TABLA 14. Resultados del análisis de las concentraciones de DDT y DDE y sus reducciones en suelo sometido a diferentes tratamientos de fermentación sólida.

TRATAMIENTO	DDT (ng/g)	Reducción de DDT (%)	DDE (ng/g)	Reducción de DDE (%)
suelo sin tratamiento T = 0	82.69		16.3	
1) Ana-aer + H ₂ O	56.84	31.3	17.78	+ 9.0
2) Ana-aer + Nutrimientos	27.07	67.3	15.0	8.0
3) Ana-aer (<i>P. chrys</i>)	12.88	84.4	5.12	68.6
4) Ana-aer (HAB)	38.50	52.2	23.7	+ 45.4
5) Aerobia + H ₂ O	80.69	2.5	18.09	+ 10.9
6) Aerobia + Nutrimientos	79.98	3.3	18.73	+ 14.9
7) Aerobia (<i>P. chrys</i>)	45.51	45.0	16.18	0.7
8) Aerobia (HAB)	60.53	26.8	18.35	+ 12.5

+ se presentó un aumento de la concentración inicial.

Es interesante notar que la presencia de microorganismos endógenos (en los controles) es favorable en el proceso de degradación en especial en aquellos tratamientos en los cuales se les adicionaron nutrimentos (tratamientos 2 y 6 de la tabla 14) en comparación con aquellos que sólo se adicionó agua (1 y 5 tabla 14).

En la tabla 14, se puede observar, que la reducción de la concentración inicial de DDE en los tratamientos 2 y 3, son de 8.0 y 68.6% respectivamente, el último obtenido con el experimento en el cual se siguió una fermentación secuencial anaerobia-aerobia y se inoculó con *Phanerochaete chrysosporium*, este tratamiento coincide con el reportado como el de mayor reducción de DDT.

En el análisis de DDD en este experimento se observaron concentraciones muy elevadas, (hasta 50 veces mayores a las esperadas por la degradación del DDT) debido probablemente a la coelución del DDD con otro compuesto presente en el suelo. Por esta razón no se realizó el análisis de datos de este compuesto.

a) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de varianza de dos vías (programa *Statistica*, 6.0), de los resultados obtenidos para los tratamientos contenidos en el diseño factorial, mostraron diferencias significativas:

a) entre las condiciones de fermentación ($F_{1,7} = 1215.7$; $p = 0.00001$) y

b) entre los dos inóculos ($F_{1,7} = 86.016$; $p = 0.000035$),

lo cual deja claro el efecto benéfico en este proceso de degradación de la secuencia de fermentación anaerobia-aerobia y del uso de *Phanerochaete chrysosporium* sobre el cultivo mixto. Las tablas de anova, se incluye en el Anexo 2c.

El análisis de varianza efectuado para el DDE, mostró diferencias significativas:

a) entre las condiciones de fermentación ($F_{1,7} = 8.7469$; $p = 0.0211$) y

b) entre los inóculos ($F_{1,7} = 6.5150$; $p = 0.0379$).

La tabla del anova correspondiente se encuentra en el Anexo 2c.

A fin de observar si hubo diferencia entre los tratamientos estimulados con la adición de un inóculo y los que no se les adicionó inóculo, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, ya que las variables que se incluyeron (los 4 tratamientos en los cuales no se adicionó inóculo y que se consideraron como

controles) no cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas requeridos para un análisis paramétrico.

Se encontró en este análisis estadístico, que existen diferencias significativas para el caso de DDT, lo que permite afirmar que el tratamiento reportado como el mejor (*P.chryso sporun* en un sistema anaerobio-aerobio), es significativamente diferente de los tratamientos en los cuales no se les adicionó inóculo alguno (controles). El resultado del análisis se presentan en forma gráfica (figura 14) a fin de observar los tratamientos que tienen diferencias significativas.

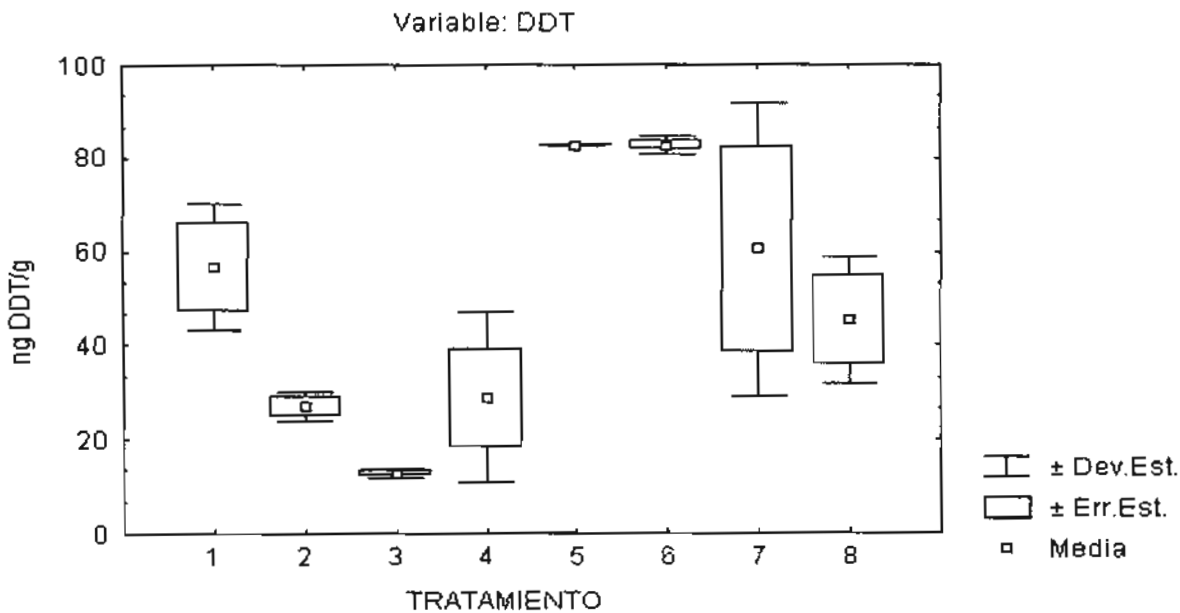


Figura 14. Gráfico de cajas, de los ocho tratamientos: 1) ana-aer + H₂O, 2) ana-aer + N, 3) ana-aer *P.chry*, 4) ana-aer HAB, 5) aer + H₂O, 6) aer + N, 7) aer HAB, 8) aer *P.chry*

Se puede observar del gráfico de cajas (fig. 14), que en el tratamiento 3 se obtuvo una reducción del DDT menor a 20 ng/g este tratamiento (3), es diferente de los tratamientos 1 y 2 en los cuales no se adicionó inóculo, en el sistema anaerobio-aerobio.

Observaciones de varios estudios muestran que compuestos aromáticos hidrofóbicos, como es el caso del DDT, pueden ser degradados por microorganismos hasta una concentración residual, la cual no decrece o lo hace muy lentamente a través de los años y con tratamientos continuos, esto debido a que las subsiguientes reducciones están limitadas por la disponibilidad del contaminante para los microorganismos (Luthy y col., 1998). Otra explicación (Greerdink y col, 1996) se refiere al efecto de la fracción arcillosa del suelo, como es este caso, que exhibe una baja velocidad de transporte de contaminantes no polares de hasta 1000 veces menor que para el caso de la materia orgánica. De esta manera se explicaría la concentración remanente de DDT que no fue degradada.

Hasta ahora se tiene que el tratamiento anaerobio-aerobio con *P.chryso sporun* fue el que presentó la mayor degradación de DDT y DDE en 28 días, a pesar de tener una lenta respiración (tabla 13). Esto nos indica que no se debe tomar la producción de CO₂ como un parámetro de degradación de DDT.

VI. 5. CINÉTICA DE LA TRANSFORMACIÓN DE DDT EN LA FERMENTACIÓN ANAEROBIA-AEROBIA

Con objeto de estudiar el efecto de las condiciones de fermentación sobre la degradación del DDT se corrió un experimento con el proceso secuencial anaerobio-aerobio + *P.chrysosporun* (tratamiento 3 de la tabla 14), con el que se obtuvieron los mejores resultados de degradación de DDT y DDE.

Se tomaron muestras a diferentes tiempos (6,10,14,16,20 y 28 días) para analizar DDT y sus productos de degradación. Se optimizó el procedimiento cromatográfico a fin de cuantificar el DDD en este experimento. La recuperación de los estándares internos fue del 80%.

Las concentraciones iniciales de DDT, DDE y DDD en el suelo tipo B fueron, respectivamente, 15.34, 40.54 y 129.28 ng/g de suelo. Es importante hacer notar que el suelo es un sustrato muy heterogéneo y que aunque al hacer la adición del DDT al suelo se hizo un mezclado exhaustivo, es posible encontrar diferentes estratos de concentración de este compuesto, además, el DDT es un compuesto que puede ser degradado bajo condiciones diversas, por lo que se tuvo especial cuidado en todo el proceso de cuantificación de DDT y sus productos de degradación.

En la Tabla 15, se presentan los valores de DDT, DDE y DDD así como las reducciones e incrementos relativos (%) encontrados a lo largo del experimento. Para el DDT se obtuvo una disminución en la concentración inicial del 92.3% en 14 días, llevada a cabo en la etapa de cultivo anaerobia, este valor es similar al reportado (97%) por Beunink y Rehm (1988) para un caldo de cultivo rico con una

concentración inicial de 50 mg DDT/l, para el DDE en la misma etapa, la concentración se redujo en un 12.3% mientras que el DDD presentó un comportamiento diferente al incrementarse su concentración, debido a que es producto de la degradación del DDT y DDE. Al iniciarse el cultivo aerobio; la concentración del DDD bajó hasta en un 32% de la inicial y el DDE se redujo hasta un 36%.

TABLA 15. Resultados de las transformaciones de DDT, DDE y DDD de la cinética del tratamiento 3 en el suelo B.

Fermentación	Tiempo (día)	DDT (ng/g)	Reducción DDT (%) acumulado	DDE (ng/g)	Reducción DDE (%) acumulado	DDD (ng/g)	Reducción DDD (%) acumulado
	0	15.34		40.54		129.28	
anaerobia	6	3.42	77.7	35.56	12.3	159.09	+ 23.0
anaerobia	10	4.10	77.7	38.51	12.3	177.43	+ 37.2
anaerobia	14	1.18	92.3	38.16	12.3	174.40	+ 34.9
aerobia	16	4.81	92.3	26.84	33.8	108.05	16.4
aerobia	20	4.73	92.3	29.63	33.8	99.40	29.9
aerobia	28	4.39	92.3	25.86	36.21	88.02	31.9

+ se presentó un aumento en la concentración

Para observar la presencia del hongo *P. chrysosporium* en los días 14, 15, 16, 18, 24 y 28 (fermentación aerobia), se realizaron siembras en placa con agar de papa, observándose un predominio del hongo hasta el día 16. A partir de entonces se presentó una franca competencia entre el hongo y diversos microorganismos. Lo cual también es congruente con lo encontrado en la gráfica de la figura 13, en donde se observa una mayor y más rápida respuesta de los sistemas en donde se inoculó con cultivos de bacterias.

En la figura 15, se presentan los resultados normalizados con respecto a la concentración inicial (fracción de la concentración inicial, $C = c/c_0$) de las concentraciones en los diferentes tiempos. Se observa que el DDT decrece durante la etapa anaerobia pero aumenta al entrar en la etapa aerobia (a los 14 días), esto debido a la adición de bagazo de caña de azúcar en la formulación del sustrato aerobio ya que existen reportes de la aplicación de DDT en el cultivo de la caña de azúcar (Gold, 1999).

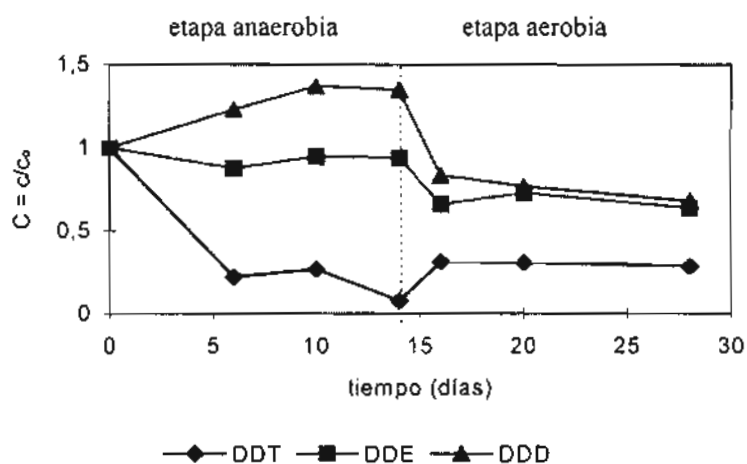
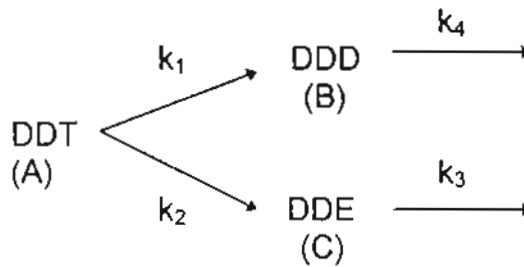


Figura 15. Gráfico de la normalización de las concentraciones de DDT, DDE y DDD reportados a los diferentes tiempos.

El DDE, se degrada un 12.3% en la etapa anaerobia y se observa un incremento en la concentración de DDD (37.2%), esto debido a que bajo condiciones anaerobias la conversión hasta DDD resulta mucho más rápida por reacciones de dechloración reductiva (Atlas y Bartha, 1993). Es en la etapa aerobia donde se presenta una disminución de las concentraciones de DDD y DDE, las cuales son mayores al 30%. Asumiendo que el DDT se degrada lineal e irreversiblemente a DDE y DDD y calculando las velocidades de formación de estos productos de degradación (k_1 y k_2),

se observa la ruta preferente hacia la formación de DDD (65%) sobre la de DDE (35%) como se observa en el desarrollo siguiente:

Cinética de reacción simultánea:

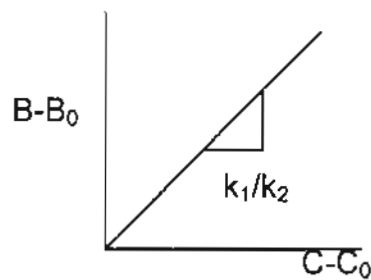
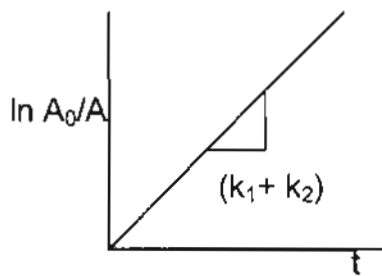


Para la etapa anaerobia:

$$dA / dt = -(k_1 + k_2) A \quad , \quad dB / dt = k_1 A \quad \text{y} \quad dC / dt = k_2 A$$

también $k_T = (k_1 + k_2)$

donde A, B y C son los valores normalizados de DDT, DDD y DDE respectivamente.

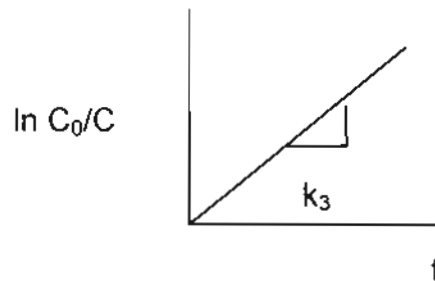
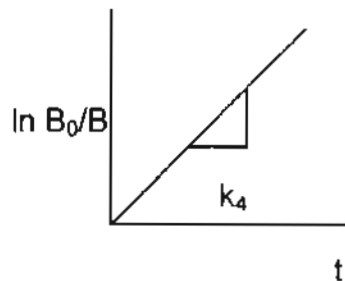


$$k_T = 0.16 /d, \quad k_1 = 0.056 /d \quad \text{y} \quad k_2 = 0.108 /d$$

$k_1 / k_T = 35\%$ se va hacia DDE y $k_2 / k_T = 65\%$ se va hacia DDD.

Para la etapa aerobia se tiene:

$$dC / dt = -k_3 C \quad , \quad dB / dt = -k_4 B$$



$$k_3 = 0.038 /d \quad \text{y} \quad k_4 = 0.024 /d$$

Bajo condiciones aerobias ocurre la formación de DDE, mientras que en condiciones anaerobias se forma DDD y es mucho más rápida que la transformación a DDE. En condiciones aerobias, la deshidrocloración es la reacción dominante, mientras que en condiciones anaerobias ocurre una desclorinación reductiva.

El DDE es un compuesto más persistente y tóxico que el mismo DDT (Carey y col.,1998), por lo tanto no es deseable se acumule en el suelo, lo que justifica el pretratamiento anaerobio en la el proceso de biodegradación del DDT.

En la tabla 16 se muestra el resumen de los resultados de concentraciones finales de DDT obtenidas en los diversos tratamientos de biodegradación a diferentes concentraciones iniciales. A partir de ellos se calculó las velocidades de degradación y se construyeron las gráficas de la figura 16, en donde se pueden observar tres cosas: 1) que la velocidad de degradación es dependiente de la concentración, así como directamente proporcional a ella, 2) que bajo condiciones anaerobias es más rápida la degradación que bajo condiciones anaerobias y 3) que es necesaria la adición de inóculo, en especial para el tratamiento aerobio.

Tabla 16. Velocidades de degradación del DDT a diferentes concentraciones iniciales y bajo diferentes tratamientos.

Tratamiento	DDT -To (ng/g)	DDT -Tf (ng/g)		tiempo (días)	velocidad (ng/g d)	
		s/inóculo	c/inóculo		s/inóculo	c/inóculo
anaerobio	10000	6700	5000	13	253.85	384.62
anaerobio	15.34		1.18	14		1.01
aerobio (HAB)	10000	10000	8100	13	0	146.15
aerobio (HAB)	82.69		60.5	28		0.79
aerobio (Pchry)	82.69	80	45.5	28	0.10	1.33
aerobio (Pchry)	4.81		4.39	13		0.03

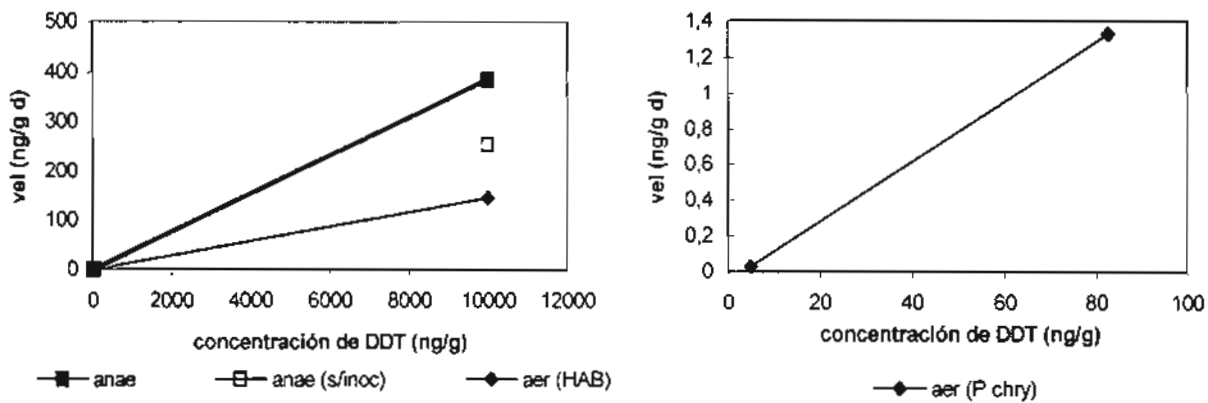


Figura 16. Gráficos de las velocidades de biodegradación contra la concentración inicial de DDT.

a) ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para los diferentes tiempos de fermentación mostraron diferencias significativas, para el caso de DDT entre el tiempo 0 y 14 días, $H(6, N = 21) = 13.51527$; $p = 0.0356$, lo que deja claro la eficiencia del tratamiento anaerobio en la biotransformación del DDT principalmente hacia la formación de DDD ya que se obtuvo aumentos en la concentración de este compuesto en esta etapa de fermentación. Para el caso de DDE, no se encontró diferencia significativa entre los tiempos, esto era de esperarse ya que la degradación de DDT conlleva a la formación de DDE, sin embargo en la tabla 15, se observa una disminución en la concentración inicial de hasta el 36.21% al final del cultivo aerobio, en la etapa anaerobia la reducción alcanzada fue sólo del 12.3%. Para el DDD el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el tiempo

14 y 16 días, $H(6, N = 21) = 13.02164$; $p = 0.0427$, primero se observó un aumento en la concentración de DDD en la etapa anaerobia hasta el día 14 y posteriormente una tendencia de reducción en la concentración de este compuesto en la etapa aerobia, lo cual muestra la eficiencia del sistema acoplado anaerobio-aerobio en el proceso de degradación de DDT. El análisis estadístico correspondiente se encuentra en el Anexo 2d.

Una forma de corroborar que la degradación del DDT que ya se ha discutido con anterioridad fue efectuada por microorganismos es mediante la medición de las actividades de las enzimas esperadas durante este proceso de degradación.

VI. 6. EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS REDUCTASAS Y PEROXIDASAS EN EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DEL DDT.

Con el propósito de observar la actividad enzimática adjudicable a los microorganismos se evaluó, la actividad presente en:

A) un sistema con adición de inóculo y nutrimentos.

B) un sistema sin inóculo y adicionado de nutrimentos.

C) un sistema sólo adicionado de nutrimentos y sometido a proceso de esterilización.

Los ensayos de actividad reductasa se realizaron a los tiempos 0, 5, 10 y 14 días de fermentación (anaerobia), ya que de acuerdo a la ruta propuesta por Zook y Feng, (1999) para la degradación del DDT bajo condiciones anaerobias se efectúa una decoloración reductiva.

La actividad reductasa en la fermentación anaerobia fue sólo cualitativamente observada (presencia de una coloración azul) los días 10 y 14, en las muestras adicionadas con lodos, ya que se carecía de condiciones adecuadas para mantener anaerobiosis estricta, sin embargo, la coloración es prueba contundente de que la enzima estaba presente, aunque no se haya podido cuantificar.

Se realizó el análisis de las muestras sin sonicar y sonicando a fin de observar si las enzimas son extracelulares o intracelulares. En las muestras sin sonicar no se observó actividad reductasa. Sugiriendo que son enzimas intracelulares o asociadas a la membrana como es el caso de la mayoría de las enzimas reductasas (Crawford, 1999).

Con el fin de encontrar actividad oxidativa de las enzimas involucradas de acuerdo a la ruta propuesta por Zook y Feng (1999) se hicieron ensayos de actividad peroxidasa a los tiempos 0, 5, 10 y 14 días del cultivo aerobio (figura 17).

Se observa la presencia de actividad en el sistema adicionado con inóculo, esta va en aumento hasta el día 10, para luego decrecer probablemente por el agotamiento de nutrientes debido al aumento de biomasa (incremento de proteína).

En el tratamiento adicionado sólo con nutrientes (B) el comportamiento se ve retrasado y en el tratamiento que fue sometido a esterilización (C) la respuesta fue nula.

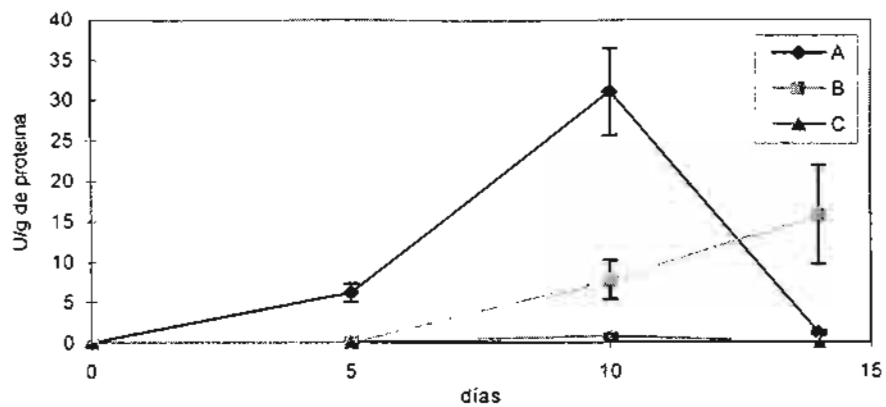


Figura 17. Actividad peroxidasa encontrada en la fermentación aerobia bajo los tratamientos: (A) con adición de inóculo, (B) sin adición de inóculo y (C) sometido a esterilización.

Se puede concluir que existe actividad peroxidasa y que de acuerdo a los resultados reportados esta se incrementa por la presencia de un inóculo. La mayor actividad se presenta en la etapa de cultivo aerobia, lo cual coincide con la mayor reducción en la concentración de DDE y DDD (tabla 15).

VII. CONCLUSIONES

1. Por sus características de textura, el suelo enriquecido con bagazo de henequén (B), se eligió como soporte para el trabajo de biodegradación al contener una mayor cantidad de materia orgánica y nutrientes.
2. La biodegradación de DDT fue más rápida en condiciones anaerobias, lo que condujo a proponer el pretratamiento anaerobio para la biodegradación de este xenobiótico.
3. Es necesaria la adición de un inóculo para la biodegradación del DDT en especial bajo condiciones aerobias.
4. El inóculo de *Phanerochaete chrysosporium*, fue mejor promotor de la biodegradación del DDE y DDD en la etapa aerobia en comparación con el cultivo mixto comercial (HAB), que fue sometido a adaptación con DDT.
5. La biodegradación de DDT, DDE y DDD total alcanzada con el sistema anaerobio-aerobio, con lodos anaerobios y *Phanerochaete chrysosporium* fue del 92%, 36% y 30% respectivamente en un tiempo de 28 días.

6. El DDD incrementó su concentración inicial durante la etapa anaerobia debido a la degradación del DDT, se observó la ruta preferente para la degradación del DDT hacia la formación de DDD (65%) sobre la de DDE (35%). Es en la etapa aerobia donde se presenta una mayor disminución de las concentraciones de DDD y DDE, las cuales son mayores del 30%.

7. Los experimentos de evaluación de la actividad enzimática en el proceso de degradación del DDT del suelo, sugieren que existe actividad principalmente por la acción de un inóculo. Las reductasas (evaluadas cualitativamente) son intracelulares y las peroxidasas son tanto intra como extracelulares.

VIII. RECOMENDACIONES

Los puntos relevantes para futuras investigaciones que ayudarían a comprender el proceso de biodegradación del DDT podrían enfocarse en los siguientes aspectos:

Dada la fuerte adsorción a partículas sólidas (suelo) de algunas sustancias poco solubles en agua como el DDT, se recomienda realizar experimentos con suelo adicionado con DDT a diferentes tiempos y estudiar el efecto de adsorción y de la textura del suelo sobre el proceso de biodegradación.

Se recomienda investigar las rutas de degradación por vía anaerobia y aerobia. Este trabajo podrían hacerse con marcaje de carbono radioactivo, a fin de evaluar si los productos finales de degradación proviene o no de la molécula del DDT.

Identificar los microorganismos contenidos en el cultivo mixto anaerobio y comprobar si se trata de cepas diferentes a las ya reportadas en la literatura como involucradas en procesos de biorremediación. En cultivos *in vitro* evaluar la tasa de degradación del DDT.

Estudios cinéticos de actividades enzimáticas, específicamente reductasas y peroxidasas, para evaluar el papel que juegan estos catalizadores en el sistema anaerobio-aerobio dentro del proceso de biodegradación.

Hacer un muestreo de suelos en la península de Yucatán e identificar las zonas más contaminadas y su distribución. Previa caracterización, realizar pruebas piloto en

zonas de alta contaminación, adicionando nutrientes y/o bioaumentando bajo condiciones controladas y establecer un patrón de monitoreo por un tiempo de 60 días.

IX. REFERENCIAS

- Aguilera-Vazquez L., (1998). Escalamiento de biorreactores para co-composteo de suelos contaminados con petróleo. Tesis de maestría. UAM-I.
- Alef K. and Nannipieri P., (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemical*. Academic Press.
- Alexander M., (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press.NY.
- APHA, *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (1975). 14th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- ASTM, *Standards Methods* (1992). D2973-71. vol. 04.08, sec 4.
- Atlas RM. and Bartha R., (1993). *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Balch W.E., Fox G.E., Magrum L.J., Woese C.R. and Wolfe R.S., (1979). Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. *Microbiol.Rev.*, 43:260-269.
- Bartha R. and Shen J., (1996). The Priming effect of glucose polymers in biodegradability tests conducted in soil. Abstracts of 96 th General Meeting of The American Society for Microbiology. May 19-23.
- Beretta M. and Dick T., (1994). Organochlorine compounds in human Milk, Porto Alegre, Brazil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53:357-360.
- Beunink J. and Rehm H.J., (1988). Synchronous anaerobic and aerobic degradation of DDT by an immobilized mixed culture system. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:72-80.
- Bidleman T., Christensen E. and Billings W., (1981). Atmospheric transport of organochlorines in the North Atlantic gyre. *J Marine Res* 39:443-464.
- Boul L.H., Garnham M.L., Hucker D., Baird D. and Aislable J., (1994). Influence of Agricultural Practices on the Levels of DDT and Its Residues in Soil. *Environ. Sci. Technol.* 28(8):1397-1402.
- Bradford M.M., (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

- Bumpus J. A. and Aust S., (1988). Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Etano] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 53(9):2001-2008.
- Carey J., Cook P., Giesy J., Hodson P., Muir D., Owens W., Solomon K., (1998) Ecotoxicological Risk Assessment of the Chlorinated Organic Chemicals. Publication of SETAC.
- Clark R.B., (1988). Halogenated hydrocarbons. En *Marine Pollution*. 3rd. Edition. Oxford University Press. pp.83-100.
- Crawford D., (1999). Comunicación personal.
- Cebrian M.E., (1998). Efecto de los plaguicidas sobre la función reproductiva humana: una asignatura pendiente. *Avance y Perspectiva* 17:205-213
- Cookson J.T., (1995). *Bioremediation Engineering. Design and application*. McGraw-Hill, Inc.
- Cremlyn R.J., (1995). *Plaguicidas Modernos y su Acción Bioquímica.*, UTEHA Noriega Editores. México.
- Doelle H.W., Mitchell D.A. and Rolz C.E., (1992). *Soils Substrate Cultivation*. Elsevier Applied Science. London and New York.
- Dominguez X., (1980). *Química Orgánica.*, Ed.. CECSA., México.
- Duch G.J., (1988). *La Conformación Territorial del Estado de Yucatán.*, Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional de la Península de Yucatán.
- EPA, Environmental Protection Agency Superfund Public Health Evaluation Manual. Office of Emergency and Remedial Response. EPA 540/1-86-060. October 1986.
- Evans M.S., Noguchi G.E. and Rice C.P., (1991). The biomagnification of polychlorinated biphenyls, toxaphene and DDT compounds in a Lake Michigan offshore food web. *Arch. Environ Contam. Toxicol* 20(1):87-93.
- Focht D.D. and Alexander M., (1971). Aerobic cometabolism of DDT analogues by *Hydrogenomonas* sp. *J. Agr. Food Chem.*, 10(1):20-22.
- Ford W. M. and Hill E. P., (1991). Organochlorine pesticides in soil sediments and aquatic animals in the upper Steele Bayou watershed of Mississippi. *Arch Environ Contam.* 20:161-167.

- Fukuto T. R. and Sims J. J. (1971). Metabolism of insecticides and fungicides. In: White-Stevens R (ed) Pesticides in the Environmental. vol 1, Partel, Dekker, Nueva York.
- Funk S. B., (1996). Anaerobic TNT degradation by *Clostridium* spp. PhD Thesis, University of Idaho.
- Gambrell R.P., Reddy C.N., Collard V., Green G. and Patrich H.W., (1984). The recovery of DDT, Kepone and permethrin added to soil and sediment suspensions incubated under controlled redox potencial and pH conditions. *Journal WPCF* 56(2):174-182.
- García R.M., (1996). Decoloración de colorantes azo y trifenilmetano por *Phanerochaete chrysosporium* en fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría UAM-I p-29.
- Geerdink M.J., VanLoosdrecht M.C.M. and Luyben K.Ch.A.M., (1996). Model for microbial degradation of nonpolar organic contaminants in a soil slurry reactor. *Environ. Sci. Technol.* 30(3):779-786.
- Gold-Bouchot G., (1999). Comunicación personal.
- Gómez-Catalán J., Lezaun M., To-Figueras J. and Corbella J., (1995). Organochlorine residues in the adipose tissue of the population of navarra (Spain). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54:534-540.
- Goodhue C.T., Rosazza J.P. and Peruzzoti G.P., (1986). Methods for transformation of organic compounds. In: Compost production, quality and use. Ed by M de Bertoldi M Ferranti PL'Hermite, F Zucconi, Elsevier Applied Science Publisher Ltd.
- Gutiérrez Rojas M., (1995). Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de doctorado UAM-I.
- Gutiérrez-Rojas M., (2000). Increasing bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. Capítulo 13, en *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses* (E. Olguín, G. Sánchez and E. Hernandez, Eds) Taylor and Francis, London pags:167-177
- Higson F.K., (1991). Degradation of xenobiotics by white rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 122:111-152.
- Hitch R.K. and Day H. R., (1992). Unusual persistence of DDT en some western USA soils. *Bull Environ Contam. Toxicol* 48:259-264.

- InterBio Ltd. (1990). Biolyte HA-BI International Biochemicals Group. Irland.
- Jégou B., (1996). ¿Disminuye la fertilidad masculina? *Epidemiología. Mundo Científico* 171:760-765.
- Johnson A., Norton D. and Yake B., (1988). Persistence of DDT in the Yakima River Drainage, Washington. *Arch Environ Contam. Toxicol.* 17:289-297.
- Kannan K., Tanabe S., Ramesh A., Subramanian A. and Tatsukawa R., (1992). Persistent organochlorine residues in foodstuffs from India and their implications on human dietary exposure. *J. Agric. Food Chem.* 40:518-524.
- Kieft T.L. and Rosacker L.L., (1991). Application of respiration and adenylate-based soil microbiological assay to deep subsurface terrestrial sediments. *Soil Biol Biochem* 23:563-568.
- Kan A.T., Fu G., Hunter M., Chen W., Ward C.H. and Tomson, M.B., (1998). Irreversible sorption to sediments: Experimental observations and model predictions. *Environ.Sci.Technol.* 32:892-902.
- Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A. and Wilson E.M., (1995). Persistent DDT metabolite p,p-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375:581-585.
- Leahy M. C. and Brown R. A., (1994). BIOREMEDIATION, *Chemical Engineering*, May:108-116.
- Lichtenstein E. and Schulz K., (1959). Persistence of some chlorinated hydrocarbon insecticides as influenced by soil types, rate of application and temperature. *J. Econ. Entomol.* 52:124-131.
- López-Carrillo L., Torres-Arreola L., Torres-Sanchez L., Espinosa-Torres F., Jiménez C., Cebrián M., Waliszewski S. and Saldate O., (1996). Is DDT a public health problem in Mexico? *Environmental Health Perspectives.* 104(6):584-588.
- Ludwicki J.K. and Goralczyk K., (1994). Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* 52:400-403.
- Luthy R.G., Aiken G.R., Brusseau M., Cunningham S.D., Gschwend P.M., Pignatello J.J., Reinhard M., Traina S.J., Weber W.J. and Westall J.C., (1998). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environ. Sci. Technol.* 31:3341-3347.

- Manual para Educación Agropecuaria (1992). Suelos y Fertilización 34. SEP/Trillas.
- McIntyre A.D. and Mills C.F., (1974). Ecological Toxicology Research Effects of Heavy Metal and Organohalogen Compounds. Plenum Press, N.Y. London.
- Monroy O. y Olguín P. (compiladores) (1992). Manual de Técnicas de Análisis para Aguas residuales. UAM-ORSTOM.
- Moriarty F., (1975). Organochlorine Insecticides., Academic Press, New York.
- Nadeau L.J., Menn F.M., Breen A. and Saylor G.S., (1994). Aerobic Degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-Chlorophenyl)etano (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5, Appl. Environ. Microbiol. 60(1):51-55.
- Nair A., Samuel T. and Pillai M.K.K., (1992). Behaviour of DDT in three soils exposed to solar radiations under different conditions. Pestic. Sci. 34:333-340.
- Norma Oficial Mexicana NOM-AA-21-1985.
- Norma Oficial Mexicana NOM-AA-94-1985.
- Pfaender F.K. and Alexander M., (1972). Extensive microbial degradation of DDT and DDT metabolism by natural communities. J. Agric. Food Chem. 20(4):842-846.
- Quensen J.F., Mueller S.A., Jain M.K. and Tiedje J.M., (1998). Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms. Science 280:722:724.
- Ramachandra M., Crawford D., Hertel G., (1988). Description of an extracellular lignin peroxidase of lignocellulolytic actinomycete, *Streptomyces viridosporus*. Appl. Environ. Microbiol. 54:3057-3063.
- Rapaport R., Urban N. and Capel P., (1985). "New" DDT inputs to North America: Atmospheric deposition. Chemosphere 14:1167-1174.
- Renner R., (1998). "Natural" Remediation of DDT, PCBs Debated. Environ.Sci.Technol/News. Aug.1 p 360A-363A.
- Restrepo I., (1988). Naturaleza Muerta, Plaguicidas, Leyes y Legislación. Centro de Ecodesarrollo-Ediciones Océano.

- Samuel T. and Pillai M.K.K., (1990). Effect of temperature and solar radiation on volatilization, mineralization and degradation of [¹⁴C]-DDT in soil. Environ. Pollut. 57:63-77
- Sharpe R.M., (1995). Another DDT connection. Nature 375:538-539.
- Soil Fertility Manual (1988). Foundation for Agronomic Research, Potash & Phosphate Institute and the Potash & Phosphate Institute of Canada.
- Speece R.E., (1996). Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters. Archae Press. p1115.
- Stanley C., Barney J. and Helton M., (1971). Measurement of atmospheric levels of pesticides. Environ Sci Technol 5:430-435.
- Staples C., Werner F. and Hoogheem T., (1985). Assessment of priority pollutant concentration in the United States using STORET database. Environ Toxicol Chem 4:131-142.
- Subba-Rao R.V. and Alexander M., (1977a). Products formed from analogues of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) metabolites by *Pseudomonas putida*. Appl. Environ Microbiol 33(1):101-108.
- Subba-Rao R.V. and Alexander M., (1977b). Cometabolism of products of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Pseudomonas putida*. J. Agric. Food Chem. 25(4):856-858.
- Subba-Rao R.V. and Alexander M., (1985). Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) and its breakdown products. Appl. Environ Microbiol 49(3):509-516.
- Tan G.H. and Vijayaletchumy K., (1994). Organochlorine pesticide residue levels in peninsular malaysian rivers., Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53:351-356.
- United National Environment Programme (UNEP) prepared jointly by the Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC) and the International Atomic Energy Agency (IAEA) (1992). Determination of DDTs, PCBs by capillary gas chromatography and electron capture detection.
- U.S. Department of Health and Human Services (1994). Toxicological Profile for 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry TP-93/05.
- Verma A. and Pillai M.K.K., (1991). Bioavailability of soil-bound residues of DDT and HCH to earthworms. Curr Sci. 61(12):848-843.

- Verschueren K., (1983). Handbook of environmental data on organic chemicals. 2nd ed. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company, 433-445.
- Vu Duc T., Masahide K. and Ryo T. (1993). Persistent organochlorine residues in soil from tropical and sub-tropical asian countries. Environ. Pollut. 81:61-71.
- Wayland J., Hayes Jr., Edward R. and Laws Jr., Editors (1992). DDT and Its Analogs. Handbook of Pesticide Toxicology, Vol 2. Classes of Pesticides. pp 743-780.
- Webber E.C., Bayne D.R. and Seesock W.C., (1989). DDT contamination of benthic macroinvertebrates and sediments from tributaries of Wheeler Reservoir, Alabama. Arch Environ Contam Toxicol 18:728-733.
- Wedemeyer G., (1966). Dechlorination of DDT by *Aerobacter aerogenes*. Science 152:647.
- Wolf M.S., Toniolo P.G., Lee E.W., Rivera M. and Dubin N., (1993). Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. J. Nat.Canc.Inst. 85:648-652.
- Zook and Fend, (1999). <http://www.labmed.umn.edu/umbbd/index.html>

ANEXO 1.

a) Porcentaje de recuperación de estándares internos.

La solución de estándares internos contenía
Hexaclorohexano (HCH) 20 ng/ml
Toxiclorobifenil (2,4,5 TCB) 25 ng/ml

A cada muestra y blanco se adicionó 1 ml de la solución de estándares internos.

En el cromatograma se identificaron los tiempos y áreas de los dos compuestos adicionados como estándares internos.

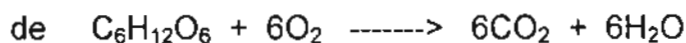
Se realizaron inyecciones en el cromatógrafo de la solución de estándares internos para obtener las áreas correspondientes y se calculó el porcentaje de recuperación de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Conc. de est. interno en la muestra}}{\text{Conc. de est. interno}} = \frac{\text{Area de la muestra + est. interno}}{\text{El area del est. interno}}$$

b) Balance de CO₂ en el experimento de evaluación de la actividad microbiana en el suelo B.

A 20g de suelo se añadió, 10 ml de glucosa al 2% (200 mg de glucosa)

$$\frac{200 \text{ mg glucosa}}{20 \text{ g suelo}} = \frac{10 \text{ mg glucosa}}{\text{g suelo}}$$



se tiene que:

$$\frac{10 \text{ mg de glucosa}}{\text{g de suelo}} \frac{(264 \text{ mg CO}_2/\text{mol})}{(180 \text{ mg glucosa/mol})} = 14.66 \text{ mg de CO}_2 \text{ producido/g de suelo}$$

En el experimento con adición de glucosa (respiración inducida) la producción de CO₂ fue de 8.0 mg de CO₂/ g de suelo. Dividiendo entre el valor teórico calculado:

$$\frac{8.0 \text{ mg CO}_2/\text{g de suelo}}{14.66 \text{ mg de CO}_2/\text{g de suelo}} = 0.55 \text{ ó } 55\% \text{ del CO}_2 \text{ que debió producirse por el consumo de la glucosa adicionada.}$$

c) Balance de CH₄ en el experimento de medición de actividad microbiana durante el cultivo anaerobio.

Volumen total del reactor = 785 cm³

Cantidad de suelo a fermentar = 400 g

Cantidad de materia orgánica en el suelo, 29% (tabla 10)

Producción teórica de metano = 0.35 L CH₄/ g DQO ó 2.85 g DQO/ L CH₄

La degradación total de la materia orgánica en el suelo se calcula de la siguiente manera:

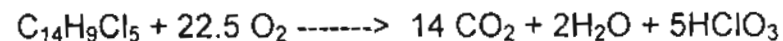
$$400\text{g suelo} \times \frac{0.29\text{g M.O.}}{\text{g suelo}} \times \frac{0.35\text{ LCH}_4}{\text{g DQO}} \times \frac{1.3\text{ g DQO}}{\text{g M.O.}} \times \frac{\text{mol CH}_4}{22.4\text{ L}} = 2.35\text{ mmol CH}_4$$

De la figura 12, el 0.25 mmol de CH₄ obtenido representa entonces el 11% (0.25/2.35 = 0.11) de la máxima producción de metano producida por la materia orgánica del suelo.

La velocidad específica de degradación de los lodos anaerobios es entonces:

$$\frac{0.25\text{ mmol CH}_4}{13\text{ días g suelo}} \times \frac{400\text{ g suelo}}{0.1\text{ L lodo}} \times \frac{\text{L lodo}}{27\text{ gssv}} \times \frac{22.4\text{ mL}}{\text{mmol CH}_4} \times \frac{2.85\text{ g DQO}}{\text{mL CH}_4} = 181.8\text{ mgDQO/gssv'd}$$

d) Cálculo teórico de de la DQO del DDT.



P.M. DDT = 354.5

$$\frac{720}{354.5} = 2.03\text{ g DQO / g de DDT}$$

a) Balance de CO₂ en el experimento de medición de actividad microbiana durante cultivo aerobio.

Los datos experimentales se ajustaron a un polinomio con un coeficiente de correlación (r^2) mayor de 0.90.

Se integró y calculó el area bajo la curva de este polinomio para obtener la producción en mmol CO₂/ g de suelo.

Se determinó la cantidad teórica de CO₂/ g de suelo, producido por la degradación completa de la sacarosa adicionada.

Se calculó el porcentaje de CO₂ obtenido.

ANEXO 2.

TABLAS DE ANOVA.

a)

ANCOVA Table for Degrad by condic

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,00589633	1	0,00589633	10,39	0,0091
Within groups	0,00567533	10	0,000567533		
Total (Corr.)					
	0,0115717	11			

ANOVA Table for Degrad by Trat

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,009217	3	0,00307233	10,44	0,0039
Within groups	0,00235467	8	0,000294333		
Total (Corr.)					
	0,0115717	11			

Data file: %FRASC.STA [3 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: A - (-9999)
No text values

Var 2: B - (-9999)
No text values

Var 3: C - (-9999)
No text values

Var 4: D - (-9999)
No text values

Data file: ADAPTA.STA [6 cases with 2 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: ADAPTA_ - (-9999)
No text values

Var 2: %DEGRAD - (-9999)
No text values

Data file: ADAPTA.STA [6 cases with 2 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: ADAPTA_ - (-9999)
No text values

Var 2: %DEGRAD - (-9999)
No text values

STAT. NONPAR STATS			
Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (adapta.sta)			
Independent (grouping) variable: ADAPTA_			
Kruskal-Wallis test: H (1, N= 6) = 3.857143 p = .0495			
Depend.:	Code	Valid N	Sum of Ranks
%DEGRAD			
Group 1	0	3	6.00000
Group 2	1	3	15.00000

STATISTICA: GENERAL ANOVA/MANOVA

data file: DDE.STA [12 cases with 3 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 3: DDE — (-9999)
 No text values

Var 1: TRAT - (-9999)
 No text values

Var 2: MICRO - (-9999)

Text	Numeric	Long label
A	100	
B	101	

INDEPENDENT VARIABLES (between groups factors):

```

TRAT      Number of Levels: 2   Codes: level  1:  1
               level  2:  2
MICRO     Number of Levels: 2   Codes: level  1: 100-A
               level  2: 101-B
```

```

DESIGN: 2 - way ANOVA, fixed effects
DEPENDENT: 1 variable: DDE
BETWEEN: 1-TRAT ( 2): 1 2
          2-MICRO ( 2): A B
WITHIN: none
```

STAT. GENERAL MANOVA	Summary of all Effects; design: (dde.sta) 1-TRAT, 2-MICRO					
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	1*	770.7422*	7*	88.11685*	8.746819*	.021180*
2	1*	574.0860*	7*	88.11685*	6.515053*	.037967*
12	1	40.6814	7	88.11685	.461676	.518671

data file: FERDDT.STA [21 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: TIEMPO - (-9999)
No text values

Var 2: DDT - (-9999)
No text values

data file: FERDDT.STA [21 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: TIEMPO - (-9999)
No text values

Var 2: DDT - (-9999)
No text values

STAT. NONPAR STATS	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (ferddt.sta) Independent (grouping) variable: TIEMPO Kruskal-Wallis test: H (6, N= 21) = 13.51527 p =.0356		
Depend.: DDT	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group 1	0	3	60.00000
Group 2	6	3	27.00000
Group 3	10	3	29.00000
Group 4	14	3	6.00000
Group 5	16	3	38.00000
Group 6	20	3	38.00000
Group 7	28	3	33.00000

Data file: FERDDT.STA [21 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Variable 1: TIEMPO - (-9999)
 0 text values

Variable 3: DDE - (-9999)

Text	Numeric	Long label
A	100	
B	101	

Data file: FERDDT.STA [21 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Variable 1: TIEMPO - (-9999)
 0 text values

Variable 3: DDE - (-9999)

Text	Numeric	Long label
A	100	
B	101	

STAT. NONPAR STATS	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (ferddt.sta) Independent (grouping) variable: TIEMPO Kruskal-Wallis test: H (6, N= 19) = 11.54211 p =.0730		
Depend.: DDE	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group 1	0	3	45.00000
Group 2	6	2	25.00000
Group 3	10	2	28.00000
Group 4	14	3	42.00000
Group 5	16	3	14.00000
Group 6	20	3	23.00000
Group 7	28	3	13.00000

data file: FERDDT.STA [21 cases with 4 variables]

VARIABLES AND THEIR TEXT VALUES:

Var 1: TIEMPO - (-9999)
No text values

Var 4: DDD - (-9999)
No text values

STAT. NONPAR STATS	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks (ferddt.sta)		
	Independent (grouping) variable: TIEMPO		
	Kruskal-Wallis test: $H(6, N=21) = 13.02164$ $p = .0427$		
Depend.: DDD	Code	Valid N	Sum of Ranks
Group 1	0	3	36.00000
Group 2	6	3	48.00000
Group 3	10	3	38.00000
Group 4	14	3	55.00000
Group 5	16	3	25.00000
Group 6	20	3	17.00000
Group 7	28	3	12.00000

Anaerobic–Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils

A. Corona-Cruz,¹ G. Gold-Bouchot,² M. Gutierrez-Rojas,³ O. Monroy-Hermosillo,³
E. Favela³

¹ Facultad de Ingenieria Quimica, Universidad Autonoma de Yucatan Apdo.
Postal 1226-A, Merida, Yucatan 97288, Mexico

² CINESTAV-IPN Unidad Merida, Yucatan, Mexico

³ UAM-I, Mexico, D.F.

Received: 15 March 1999/Accepted: 17 June 1999

DDT (C₁₄H₉Cl₅) is a pesticide that belongs to the group of organochlorines. It has been extensively used since the Second World War all over the world and, even though its use is banned or restricted in many countries because of its deleterious effects, it is still commonly found in the environment, especially in the soil, due to its strong adsorption to solid particles, which results in a great persistency (EPA, 1986). Some investigations have reported that the DDT present in the soil can be degraded in two years, while others have found that the process can take from fifteen to twenty years or more (Alexander, 1994).

The degradation products of DDT are mainly the dechlorination products DDE and DDD. The pathway can be DDT → DDE → DDD, or from DDT to DDD directly. These routes have not been completely established, even after 40 years of studies (Wayland *et al.*, 1991). In anaerobic marine sediments DDE is readily dechlorinated to DDMU (Quensen *et al.*, 1998).

In less developed countries, the use of DDT still continues in order to control diseases such as malaria and dengue (Wayland *et al.*, 1991; Cebrián, 1998). So far, no chemical compound has been found that brings together DDT's properties and effectiveness. In Mexico, the use of DDT is higher than in any other Latin American country (PAHO, 1994). Mexico used about 1000 tons of DDT in 1992 (Sharpe, 1995). The production of DDT in Mexico is mostly for its own use. Though production has diminished since 1970, it has remained stable since 1985 (López-Carrillo *et al.*, 1996). In a study carried out in the state of Veracruz in Mexico, DDT and DDE were determined in the adipose tissue of people. These compounds were present in all the cases analyzed and the highest levels were found in a suburban zone. Average Σ DDT concentration was 24.82 mg/kg, very high compared to the results in other countries (Waliszewski *et al.*, 1995).

In recent years, there has been renewed research interest in DDT, since it has been associated with several health problems, including the increased risk of breast cancer in women and alterations in reproductive functions in men (Cebrián, 1998).

DDT is a chlorinated organic compound that is highly resistant to degradation by biological, photolitical and chemical means, given that its molecular structure contains chlorinated aliphatic and aromatic structures that impart great chemical stability. Because of this, DDT is a recalcitrant, toxic, persistent pollutant (Kannan *et al.*, 1992). This explains the current interest in developing bioremediation processes for this compound.

Current bioremediation processes typically use aerobic bacteria to degrade petroleum and other chemical wastes by oxidation of the compounds. However, it has been observed that anaerobic systems are often more capable of degrading chlorinated pollutants by reductive dechlorination (Leahy and Brown, 1994). Some compounds, such as polychlorinated biphenyls (PCBs) can be initially dechlorinated and partially degraded by

anaerobic bacteria and the resulting products can then be more rapidly degraded by aerobic processes. DDT, too, may be amenable to this type of bioremediation approach.

Several bioremediation studies had been carried out in submerged-liquid cultures, using various microorganisms and systems to degrade DDT: *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus and Aust, 1987) and *Alcaligenes eutrophus* (Nadeau *et al.*, 1994) isolated from sewage have been used in aerobic conditions (Pfaender and Alexander, 1972). In the same way, immobilized mixed cultures in anaerobic-aerobic systems have also been employed (Beunink and Rehm, 1988). However, a microorganism that uses the DDT as primary source of carbon and energy for growth has not yet been found.

The objective of this work was to evaluate the degradation of DDT in solid state cultures, by different cultures in anaerobic and/or aerobic systems. The system that yielded the best results was a coupled anaerobic (with a mixed culture)-aerobic (with *P. chrysosporium*) fermentation.

MATERIALS AND METHODS

In order to evaluate the effect of the fermentation system and the use of a pure or mixed culture, a preliminary experiment with four different fermentations was carried out in triplicate, following a 2 X 2 factorial design. The factors were two fermentation systems (anaerobic-aerobic or aerobic) and two biological systems (mixed culture or *P. chrysosporium*). The response variables measured were the concentrations of DDT, DDE and DDD. Four controls were also established, two for each fermentation system. In one no microorganisms were added (only water), and in the other, only nutrients. The fermentations were incubated 28 days in aseptic conditions. Once the fermentation system with the best results of reduction of DDT concentration was determined, the experiment was redone under those conditions but with samples taken by triplicate at different times (0, 6, 10, 14, 16, 20 and 28 days). This was done in order to find out the time in which the process of removal of DDT and its dechlorinated intermediates was more efficient. Data analysis utilized the program *Statistica 6.0* (Statsoft, 1996).

A microbial consortium isolated from sewage from an anaerobic wastewater plant from a soft drink company was employed as the inoculum in the anaerobic fermentation (inoculum, 10% v/v). In the aerobic fermentation, a mixed culture that included five species of *Pseudomonas*, one of *Klebsiella*, four of *Rhodocci* and two strains of fungi was added (inoculum, 5% dry base). This culture has been reported to be capable of degrading aromatic compounds (HAB InterBio LTD., 1990). For the aerobic pure culture system, *Phanerochaete chrysosporium*, strain H-298 (CDBB) from the Collection of Microbial Cultures of CINVESTAV-IPN was employed. The inoculum was a suspension of spores from a fresh culture maintained on potato dextrose agar (PDA) slants, which had been grown for 5 days at 35°C. The spores were collected in 30 ml of Tween solution [0.1 % (v/v)] and were counted by use of a Neubauer chamber at the proper dilution to count from 25 to 50 spores per 0.1 mL (García, 1996). To adapt the mixed culture to DDT, 3 ml of a solution containing DDT (0.5 mg/mL), glucose (1 g/L) and the following minerals (in mg/L): Na₂HPO₄ (500), MgSO₄ 7H₂O (480), (NH₄)₂SO₄ (350), KH₂PO₄ (300), Ca(NO₃)₂ (40), FeSO₄ 7H₂O (3), CoCl₂ 6H₂O (0.1), ZnSO₄ (0.07), NaMoO₄ 2H₂O (0.03), MnCl₂ 6H₂O (0.02), NiCl₂ 6H₂O (0.02), H₃BO₃ (0.02) and CuCl₂ (0.01) were added weekly, five times. The adaptation of the anaerobic mixed culture was carried out in a UASB reactor with a capacity of 1.5 litres. For the aerobic mixed culture a glass jar of 2 litres capacity equipped with an air diffusor was used. The incubation temperature in both cases was 35°C.

Ten kg of soil from a plot of land used to produce vegetables in the State of Yucatan in Mexico were collected. The granulometric analysis of the soil reported 40 % silt, 32 % clay and 28 % sand. The organic matter content was 29 %. The DDT and DDE concentrations in the soil prior to treatment are shown in table 1.

Glass tubular reactors (diameter 3.5 cm and length 22 cm) for anaerobic fermentation

were used, and 400 g of soil were introduced in such a way that 75 % of the volumetric capacity of each reactor was occupied. The concentration of nutrients was determined based on the requirements reported by Speece (1996) for anaerobic microorganisms and using Balch medium as a base (Balch *et al.*, 1979). There was 50 % humidity and the incubation temperature was 35°C. The production of CH₄ and CO₂ was monitored in a Gow-Mac chromatograph equipped with a thermal conductivity detector and a carbosphere column. The analyses were done at a temperature of 140°C. The fermentations had a duration of 14 days and after this time, the reactors were emptied, and the soil was subject to the aerobic fermentation. These fermentations were carried out in tubular glass fermentators similar to those employed in the anaerobic phase. However, air was supplied to the reactors. It was first humidified by bubbling through water columns placed just below the fermentators. The incubation temperature of 35°C was held using a water bath in which the reactors were submerged. The production of CO₂ during the process of aerobic fermentation was monitored using the Gow-Mac chromatograph.

The substrate for the aerobic reactors was composed of soil, sugar cane bagass (to improve air distribution through the columns), sacarose, urea and potassium phosphate, mixed according to the method of Mendoza (1994), simulating the characteristic composition of compost. A solution of mineral salts (Goodhue 1986) was also added to the formula. The mixture was maintained at 50 % humidity. The fermentation lasted two to four weeks, depending on the system (anaerobic-aerobic or aerobic, respectively).

The quantification of DDT and of its main degradation products (DDE and DDD) were made using gas chromatography according to the technique reported by the United Nations Environmental Program (UNEP, 1992). Two internal standards were added to procedural blanks to assure the quality of the analyses and to calculate the recovery percentage for the samples analyzed. The internal standards employed were PCB 103 and PCB 198.

A Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph equipped with an electron capture detector (ECD) and a capillary column HP SE-54 (200 mm i.d. x 30 m) was used to identify and quantify the compounds. The peaks of the chromatograms were integrated by means of a HP Chemstation 3365 Series II software. The conditions of the chromatograph were the following: initial temperature of 70°C held for 2 min, and a temperature program with an increment of 3°C/min until 265°C, held for 25 min.

RESULTS AND DISCUSSION

Methane was produced in those systems containing, beside the contaminated soil (S), the inoculum of microorganisms from the sludge (Fig. 1). In the controls containing only water (H₂O) and/or nutrients (N), methane production was practically nil. In the sludge inoculated systems, methane production reached its maximum between days 6 and 8. There was metabolic activity in all the reactors, as shown by anaerobic carbon dioxide production (Fig. 2); however, production was higher in those that were inoculated with sludge.

Aerobic metabolic activity, as shown by carbon dioxide production, was observed in all the systems (Fig. 3). The highest levels were detected in the first day, and the highest values were observed in the fermentations inoculated with the mixed culture. From the second day, CO₂ production remained stable in all systems, and values equal or less to 1 % of CO₂ were registered. In the reactors where no inoculum was added, the production of CO₂ was only detected during the first day. This was also true for the anaerobic fermentation, and for the control to which only a solution of nutrients had been added.

DDT analyses of the samples that underwent fermentation, showed concentrations from 12.88 to 80.69 ng/g (Table 1). Such concentrations are below the concentration found in the DDT-contaminated soil used as substrate in the solid fermentations (82.69 ng/g). The reduction percentages for DDT in all of the treatments are also shown in Table 1; these

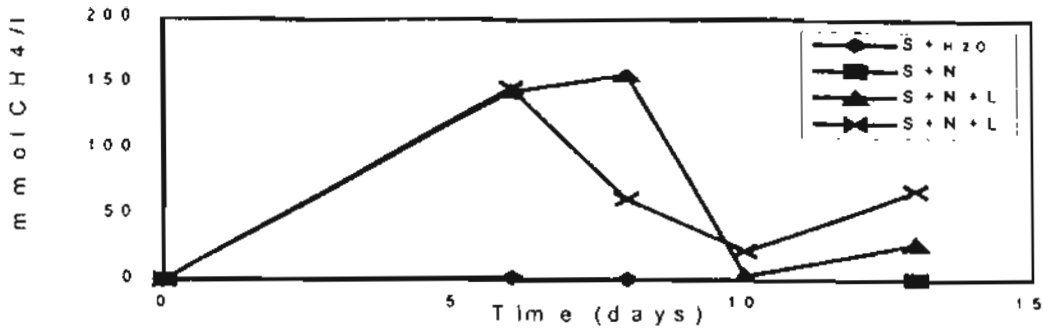


Figure 1. Production of CH₄ under anaerobic conditions. S+H₂O, contaminated soil and water; S+N, contaminated soil and nutrients; S+N+L, contaminated soil, nutrients and sludge.

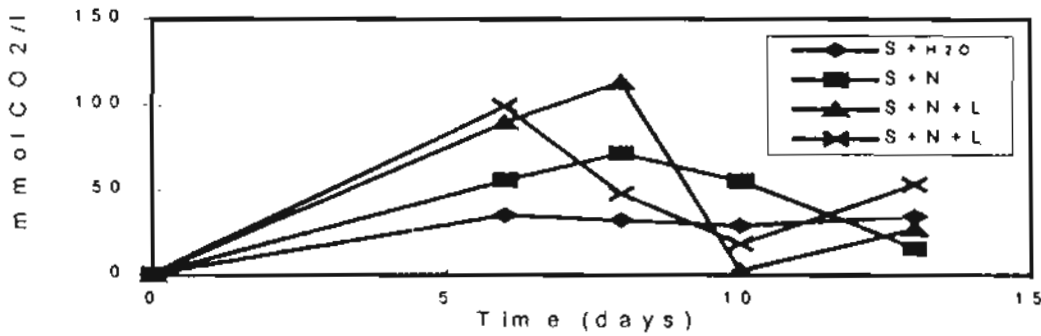


Figure 2. Production of CO₂ under anaerobic conditions. S+H₂O, contaminated soil and water; S+N, contaminated soil and nutrients; S+N+L, contaminated soil, nutrients and sludge.

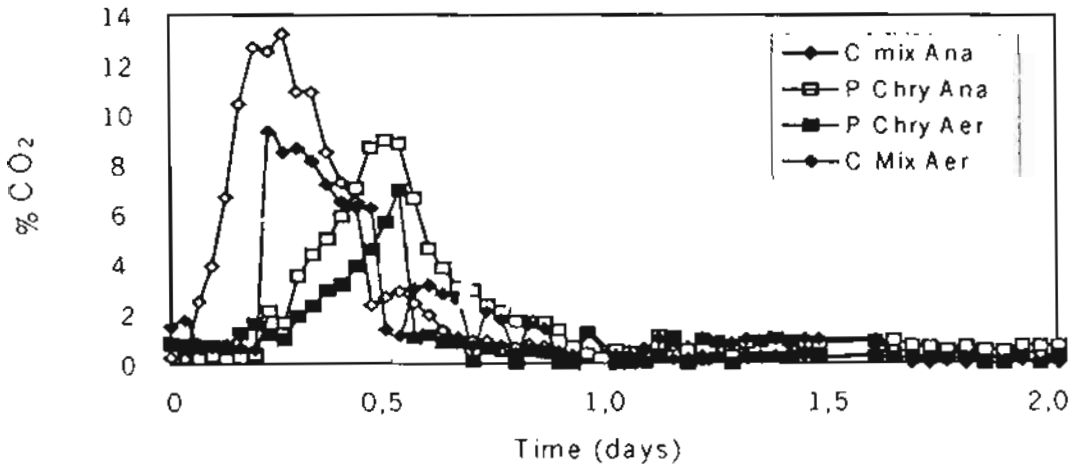


Figure 3. Production of CO₂ under aerobic conditions. C mix Ana, fermentation anaerobic-aerobic with mixed culture; P Chry Ana, fermentation anaerobic-aerobic with *P.chrysosporium*, P Chry Aer, fermentation aerobic with *P.chrysosporium*; C Mix Aer, fermentation aerobic with mixed culture.

percentages ranged from 2.5 to 84.4 %. The latter was obtained in the experiment that consisted of a sequential anaerobic-aerobic fermentation that had the *P. chrysosporium* inoculum. This indicates there was effective DDT reduction (dechlorination) in anaerobic phase by the microorganisms from sewage. This has also been reported by Pfaender and Alexander (1972). Moreover, the use of a fungus in the aerobic second phase of the solid substrate fermentation yielded a higher reduction efficiency (50 % within 30 days of incubation) than that reported by Bumpus and Aust (1987). A two-way analysis of variance of the data obtained from the treatments included in the factorial design showed significant differences between the conditions of fermentation ($F_{1,7} = 1215.7$; $p = 0.00001$) and between the inocula ($F_{1,7} = 86.016$; $p = 0.000035$). The results clearly established the favorable effect on the degradation process of the sequence of anaerobic-aerobic fermentation and the use of *Phanerochaete chrysosporium* over the aerobic mixed culture.

Table 1. Results of the analysis of concentrations of DDT and DDE in soil subjected to different treatments of solid fermentation.

Treatment	DDT (ng/g) average	DDT Red. (%)	DDE (ng/g) average	DDE Red. (%)
*ana-aer S+H ₂ O	56.84	31.3	17.78	-
*ana-aer S+N	27.07	57.3	15.0	8.0
ana-aer <i>P. chry.</i>	12.88	84.4	5.12	68.6
ana-aer mixed cult.	39.50	52.2	23.70	-
aer <i>P. chry.</i>	79.98	3.3	18.73	-
aer mixed cult.	80.69	2.5	18.09	-
*aer S+ H ₂ O	60.53	26.8	18.35	-
*aer S + N	45.51	45.0	16.18	-
soil without treatment	82.69	0.0	16.30	-

*treatments without the addition of an inocule.

Average recovery 94 %.

In relation to DDE concentrations, these ranged from 5.12 to 23.70 ng/g (Table 1). A decrease in concentration compared to that found in the initial substrate (16.3 ng/g) was observed only in two treatments; however, it is possible to find an accumulation of this compound as a result of the dechlorination of DDT. The analysis of variance considering DDE levels also showed significant differences between the fermentation conditions ($F_{1,7} = 8.7469$; $p = 0.0211$) and between the inocula ($F_{1,7} = 6.5150$; $p = 0.0379$). The treatment that resulted in a higher reduction of DDE (68.6 %) was the same that showed a higher reduction of DDT.

For DDD, the concentrations found were unacceptably high (50 times over the amount of original DDT concentration). This could be due to a co-elution of this compound with another present in the soil, in such a way that the levels of DDD were overestimated. Therefore, a statistical analysis of these data was not performed.

The eight treatments (including those without an inoculum) were evaluated in order to determine if there were significant differences between the treatments with and without inoculum. A Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance was made. The variables included in the statistical analysis did not fulfill the assumptions of normality and equality of variances required for a parametric analysis. When considering the DDT concentrations, significant differences were found ($H_{7,20} = 15.0553$; $p = 0.0353$) between treatments, and the significantly most effective treatment was that with *P. chrysosporium* in an anaerobic-aerobic system.

Table 2 shows the results obtained in the experiment carried out under the optimal conditions obtained in the preliminary experiment, and where samples were taken at different times to analyze the levels of DDT and its dechlorination products. Optimization of the chromatographic procedure resulted in a better quantification of DDT and its metabolites. This experiment was done to determine in which of the two stages

(anaerobic or aerobic) the highest reduction of DDT, DDE and DDD took place.

Table 2. Average values of the concentration of DDT, DDE and DDD at different fermentation times.

FERMENTATION	TIME (day)	DDT (ng/g)	DDE (ng/g)	DDD (ng/g)
	0	15.34	40.54	129.28
anaerobic	6	3.42	35.56	159.09
anaerobic	10	4.10	38.51	177.43
anaerobic	14	1.18	38.16	174.40
aerobic	16	4.81	26.84	108.05
aerobic	20	4.73	29.63	99.40
aerobic	28	4.39	25.86	88.02

Average recovery 80 %.

The statistical analysis of the results obtained for the different fermentation times showed significant differences for DDT concentrations between times 0 and 14 days ($H_{6,21} = 13.51527$; $p = 0.0356$). These results prove the efficiency of the anaerobic treatment in the dechlorination of DDT, specially towards the formation of DDD, given that the concentration of this compound increased during this stage of fermentation. In relation to DDE and DDD, no significant differences between times were found. This was already expected, considering that the degradation of DDT involves the formation of DDE and DDD as degradation products. However, there was a trend in reduction of DDE and DDD levels in the following aerobic phase. This supports the efficiency of the coupled anaerobic-aerobic system in the degradation process of DDT.

REFERENCES

- Alexander M (1994) Recalcitrant Molecules. In: Biodegradation and Bioremediation. Academic Press. New York, p274
- Balch WE, Fox, GE, Malgrum L J, Woese CR, Wolfe RS (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews* 43:260-296
- Beunink J, Rehm H (1988) Synchronous anaerobic and aerobic degradation of DDT by an immobilized mixed culture system. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:72-80
- Bumpus JA, Aust SD (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(9):2001-2008
- Cebrián M E (1988) Efectos de los plaguicidas sobre la función reproductiva humana: una asignatura pendiente. *Avance y Perspectiva* 17:205-213
- EPA (1986) Environmental Protection Agency Superfund Public Health Evaluation. Manual Office of Emergency and Remedial Response EPA 540/1-86-060
- García R M (1996) Decoloración de colorantes azo y trifenilmetano por *Phanerochaete chrysosporium* en fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría UAM-I p-29
- Goodhue CT, Rosazza JP, Peruzzoti GP (1986) Methods for transformation of organic Compounds. In: Compost production, quality and use. Ed by M de Bertoldi M Ferranti PL=Hermite, F Zucconi, Elsevier Applied Science Publisher Ltd
- Kannan KS, Tanabe A, Ramesh A, Subramanian R, Tatsukawa R (1992) Persistent organochlorine residues in foodstuffs from India and their implications on human dietary exposure. *J Agric Food Chem* 40:518-524
- Leahy MC, Brown RA (1994) Bioremediation: Modelling and mapping are critical, while air sparging and soil vapor extraction have become strong allies. *Chem Eng* pp108-116
- López-Carrillo L, Torres-Arreola L, Torres-Sánchez L, Espinosa-Torres F, Jiménez C, Cebrián M, Waliszewski S, Saizate O (1996) Is DDT Use a Public Health Problem in Mexico? *Environmental Health Perspectives* 6:584-588
- Mendoza JM (1994) Balances de Calor en un Proceso de Biodegradación de lodos Activados por Fermentación Sólida. Tesis de Maestría en Biotecnología UAM-I
- Nadeau LIJ, Menn F, Breen A, Sayler GS (1994) Aerobic Degradation of 1,1,1-

- Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl Environ Microbiol* 60(1):51-55
- PAHO (1994) Status of malaria programs in the Americas XLII report. PAHO document CSP24/inf/2. Washington, DC:Pan American Health Organization
- Quensen JF, Mueller SA, Jain MK, Tiedje JM (1998) Reductive Dechlorination of DDE to DDMU in Marine Sediment Microcosms. *Science* 280:722-724
- Sharpe RM (1995) Another DDT connection. *Nature* 375:538-539
- Speece RE (1996) Treatability Protocol. In: *Anaerobic Biotechnology for industrial wastewaters*. Archae Press, p-115
- Walszewski SM, Pardo-Serdas VT, Infanzon RM, Rivera J (1995) Determination of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue: 1992 study in Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 55:43-49
- Wayland J, Hayes Jr, Edward R, Laws Jr, Editors (1991) DDT and Its Analogs. *Handbook of Pesticide Toxicology, Vol 2. Classes of Pesticides*. pp 743-780