



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
BAJA CALIFORNIA**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
OCEANOLÓGICAS**



**DDT EN SEDIMENTOS DE LA COSTA NOROCCIDENTAL
DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO Y SU
BIOTRANSFORMACIÓN POR *VIBRIO* SP.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

MARÍA VICTORIA OROZCO BORBÓN

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA

MAYO DE 2008

Resumen de la tesis de **María Victoria Orozco Borbón**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en OCEANOGRAFÍA COSTERA, Ensenada, Baja California. Mayo de 2008.

DDT EN SEDIMENTOS DE LA COSTA NOROCCIDENTAL DE BAJA CALIFORNIA, MEXICO Y SU BIOTRANSFORMACIÓN POR *VIBRIO* SP.

Resumen aprobado por:


Dr. Ramón Cajal Medrano
Director de Tesis

Entre los contaminantes orgánicos persistentes presentes en la Cuenca del Sur de California (CSC) se destaca el DDT el cual se acumula en los sedimentos y es biotransformado por enzimas específicas de los microorganismos. Debido a su importancia se realizó una investigación: de la distribución espacial del DDT, la capacidad de las bacterias para biotransformarlo bajo condiciones controladas de laboratorio y la estructura de las bacterias en los sedimentos marinos. Durante diciembre de 2003, se colectaron muestras de sedimento superficial en 20 estaciones de la costa noroccidental de Baja California, México. Se realizaron análisis de DDT por cromatografía de gases, porcentaje de partículas $<63 \mu\text{m}$ de diámetro, carbono orgánico, bacterias reductoras de sulfato, estructura de la comunidad bacteriana (SSCP) y aislamiento del gen 4,5 DOPA. De la estación 49, la cual mostró la mayor concentración de DDT y de sus metabolitos DDE y DDD, se aisló una bacteria identificada bioquímica y molecularmente como del género *Vibrio* sp., misma que fue sometida a un bioensayo en el laboratorio, en medio sales mínimas más DDT, e incubándola a 28°C bajo condiciones aerobias y anaerobias durante noventa días, determinando además su tasa de crecimiento específico a 28°C y 8°C . Los sedimentos mostraron bajas concentraciones de DDT, desde no detectado (ND) hasta 4.78 ng g^{-1} , con tendencia a aumentar en las estaciones más profundas, las cuales contienen mayor porcentaje de partículas $<63 \mu\text{m}$ y carbono orgánico. *Vibrio* sp. presentó en el medio sales mínimas más DDT, tasas de crecimiento específico promedio de 0.6912 y 0.4296 d^{-1} a 28°C y 8°C respectivamente. Además presentó el gen 4,5 DOPA, asimismo mostró la capacidad de biotransformar el DDT ya que se detectó la presencia de los metabolitos o,p'-DDE y o,p'-DDD a los sesenta y noventa días de incubación en ambos sistemas. El mayor número de bandas obtenidas en la electroforesis (SSCP) se encontró en las estaciones ubicadas en el sur del área de estudio en donde existe mayor profundidad, concentración de carbono orgánico y mayor porcentaje de partículas $<63 \mu\text{m}$ de diámetro, detectando que el grupo más dominante en el sedimento marino fue el de las proteobacterias.

Palabras clave: DDT, sedimentos, biotransformación, bacterias marinas, Baja California.

**DDT EN SEDIMENTOS DE LA COSTA NOROCCIDENTAL
DE BAJA CALIFORNIA, MÉXICO Y SU
BIOTRANSFORMACIÓN POR *VIBRIO* SP.**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

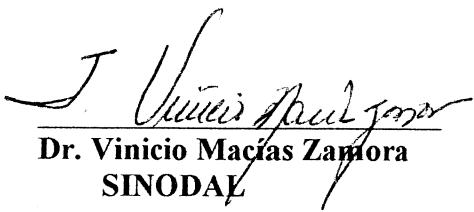
PRESENTA:

MARÍA VICTORIA OROZCO BORBÓN

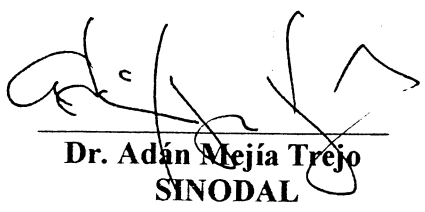
APROBADA POR:



Dr. Ramón Cajal Medrano
DIRECTOR DE TESIS



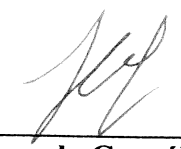
Dr. Vinicio Macías Zamora
SINODAL



Dr. Adán Mejía Trejo
SINODAL



Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
SINODAL



Dr. Fernando González Farías
SINODAL

*En cuanto a este mar, tan
grande y ancho,
así hay cosas movientes
sin número ,
criaturas vivientes,
pequeñas así como grandes.*

Salmo 104:25

En memoria de:

Dr. Jorge de la Rosa Vélez (1954-2007).

El Dr. Jorge de la Rosa Vélez mostró una gran inquietud académica desde sus inicios como estudiante, que lo llevó a destacar en el campo de la ciencia en México y en el extranjero. Como investigador fue pionero en estudios de genética poblacional en especies de importancia comercial como los camarones (*Litopenaeus stylirostris*, *Farfantepenaeus californiensis* y *F. brevirostris*) y el caracol *Astraea (Litophoma) undosa*. Sus últimos trabajos estuvieron enfocados al diseño de técnicas moleculares para la detección de los virus que afectan al camarón en cultivo, siendo uno de los primeros investigadores dentro de la Facultad de Ciencias Marinas y el Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC, en utilizar técnicas moleculares o del ADN recombinante.

Los resultados de estas investigaciones fueron relevantes en la formación de recursos humanos, de alta calidad académica, dentro del Posgrado de Oceanografía Costera. Además, la habilidad intelectual del Dr. Jorge de la Rosa le permitió contribuir en otras áreas como es la ecotoxicología química, tema de interés en esta tesis.

Con su inclinación aventurera y entusiasmo por emprender nuevos desafíos que lo llevaran a ampliar sus conocimientos científicos, sin ponerse límites y atreviéndose a incursionar en nuevas líneas de investigación, aceptó la responsabilidad de dirigir mi tesis, misma que está enfocada a dar respuesta a interrogantes en el campo de la contaminación ambiental y la bioremediación, en donde las técnicas moleculares son una herramienta básica y novedosa.

Sin su apoyo hubiera sido casi imposible comprender como se interrelacionan los procesos moleculares con los químicos y su aplicación en ciencias ambientales, lo cual permitió sentar las bases para establecer una nueva línea de Investigación en el IIO de la UABC.

Por su amplio historial, contagioso entusiasmo, capacidad y aguda visión para abordar los problemas científicos, así como su incansable ánimo para tratar y promover nuevas ideas, es el Dr. Jorge de la Rosa Vélez un ejemplo que nos motiva a ser mejores investigadores en las ciencias del mar. Por todo esto y mucho más, le brindo mi más sincero agradecimiento, por haber sido mi Director de Tesis, durante la mayor parte del desarrollo de la misma.

AGRADECIMIENTOS

A mi director:

Dr. Ramón Cajal Medrano: por sus excelentes sugerencias y por haber aceptado el desafío de concluir esta tesis.

A los miembros de mi comité de Tesis: Dr. Vinicio Macías Zamora, Dr. Adán Mejía Trejo, Dr. Fernando González Farías y Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, por sus valiosos comentarios y correcciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A la Facultad de Ciencias Marinas e Instituto de Investigaciones Oceanológicas por haberme brindado la oportunidad de crecer académicamente.

A la Secretaría de Marina por su apoyo en la colecta de sedimentos marinos abordo del buque "Zuchiate".

Y de forma muy especial a la M. en C. Nancy Ramírez Álvarez por su ayuda en la realización de los análisis cromatográficos y por compartir conmigo sus conocimientos y sus experiencias como estudiante de doctorado.

Al personal del CIBNOR de la Paz, en especial a:

Dr. Alejandro López Cortés por su amable asesoría, apoyo sincero y valiosos consejos.

M. en C. José Quinatzin García Maldonado, M. en C. Cesar Orozco Medina, Biol. Mar. Hever Latisnere y M. en C. Martha Ligia Garavito Parra por su apoyo técnico.

A mis queridas compañeras de Ecología Molecular:

M. en C. Alejandrina Jiménez Mercado, por su participación en el conteo directo de bacterias, M. en C. Josefina Ramos Paredes por sus consejos y ayuda incondicional en la depuración de secuencias de ADN y M. en C. Raquel Pedrín Caballero por su colaboración en técnicas moleculares.

Dra. Rosa Mouriño Pérez por haberme dado la confianza de usar las instalaciones y equipo de Microbiología del CICESE sin el cual no hubiera logrado realizar una parte importante de mi tesis.

A mis compañeros del IIO

Ocean. Roberto Pérez Higuera y M. en C. Luis Galindo Bect por su aportación valiosa en la elaboración del mapa de la zona de estudio.

Al Dr. Enrique Valenzuela Espinoza por su optimismo y saber ser un buen compañero.

A mis amigos

M. en C. José Antonio Segovia Zavala y Ocean. Bernardo Primitivo Flores Báez por levantarme el ánimo en los momentos más difíciles de mi tesis.

A los miembros del laboratorio de Bacteriología Marina del IIO: Biol. Celia Pérez Capetillo, Ocean. Monica Montiel Pichardo y M. en C. Lourdes Simental Ocegüera por ser compañeras y amigas.

A la M. en C. Julieta del Carmen García López y familia, por su colaboración y apoyo.

Diseñador Gráfico, Raúl Gutiérrez Espinoza por su profesionalismo en la elaboración de las figuras.

A la Dra. Rebeca Vázquez Yeomans por su asesoría en la identificación de la bacteria aislada, mediante técnicas moleculares.

Dr. Francisco Correa Sandoval por su confianza y disponibilidad para el uso de equipo del laboratorio de Genética del IIO.

M en C. Efraín Chávez Romero y M. en C. David A. Paz García por su orientación en el uso del programa estadístico UPGMA.

Dr. Walter Daesslé, M. en C. Eduardo Ortiz Campos y M. en C. Arturo Siqueiros Valencia por su apoyo en los análisis de carbono orgánico y granulometría.

M. en C. Consuelo Valle Espinoza por su amabilidad y consejos en técnicas estadísticas.

M. en C. Albino Muñoz Barbosa por su valiosa aportación para el enriquecimiento estadístico de esta tesis.

A las Secretarías del IIO, Hortensia Andrade León, L.C. Margarita Chávez Maldonado y Rosa Trujillo Brambila por el interés mostrado en el desarrollo de la tesis.

Así como a mi amiga Lic. Araceli Meléndez Crosswhite y a todas las personas que de una u otra forma intervinieron en la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia

y

amigos

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. DDT en la Cuenca del Sur de California.	1
I.2. Efecto del DDT en las bacterias.	8
I.2.1. Estrategias de supervivencia.	8
I.2.2. Acumulación de DDT por bacterias.	13
I.2.3. Papel de las enzimas en la degradación de DDT.	13
I.2.4. Rutas metabólicas para la degradación del DDT.	14
I.3. Diversidad bacteriana.	16
I.3.1. Identificación de bacterias.	17
I.3.2. Uso del 16S ARNr.	19
I.3.3. Filogenia y taxonomía de bacterias.	21
I.3.4. Métodos moleculares de identificación.	24
I.3.5. Métodos filogenéticos.	27
II. HIPÓTESIS	30
III. OBJETIVO	30
III.1. Objetivo general.	30
III.1.2. Objetivos específicos.	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	32
IV.1. Descripción de la CSC.	32
IV.2. Localización de las estaciones de muestreo.	34
IV.3. Colecta de sedimentos.	35
IV.4. DDT en sedimentos.	35
IV.5 Características del sedimento.	37
IV.6. Bacterias en sedimento.	37
IV.7. Identificación de la cepa bacteriana aislada estación 49.	38
IV.8. Bioensayo de degradación del DDT con la cepa de <i>Vibrio</i> aislada.	39
IV.9. Tasas de crecimiento <i>Vibrio</i> sp.	40
IV.9.1. Conteo directo de <i>Vibrio</i> sp.	42
IV.9.2. Tasas de crecimiento específico de <i>Vibrio</i> sp.	43
IV.10. Gen de degradación del DDT.	43
IV.10.1. Diseño de iniciadores.	43
IV.10.2. Preparación de <i>Vibrio fischeri</i> .	45
IV.10.3. Extracción del ADN genómico.	45
IV.10.4. Extracción del ADN plasmídico.	45
IV.11. Amplificación del gen por PCR.	46
IV.12. ADN en sedimento.	47
IV.12.1. Extracción de ADN en sedimento.	47
IV.12.2. Amplificación de ADN en sedimento.	48

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV.13. SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple).	48
IV.13.1. Corte y elución de las bandas SSCP.	50
IV.13.2. Purificación del producto de PCR.	50
IV.14. Secuenciación.	50
IV.15. Análisis estadísticos.	50
IV.15.1. Características del sedimento.	50
IV.15.2. Bandas de ADN.	51
IV.15.3. Árboles filogenéticos.	51
V. RESULTADOS	53
V.1. Características del sedimento.	53
V.1.1. DDT.	53
V.1.2. SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple).	60
V.1.3 Identificación de Bandas.	64
V.1.4. Árbol filogenético.	67
V.2. Identificación de la bacteria aislada estación 49.	70
V.3 Tasas de crecimiento específico.	70
V.4. Bioensayo de <i>Vibrio</i> sp.	75
V.4.1. Cromatogramas.	75
V.5. Amplificación del Gen 4,5 DOPA.	86
V.6. Extracción y amplificación del ADN en sedimento.	89
VI. DISCUSIÓN	91
VI.1. Características del sedimento.	91
VI.1.1. DDT.	91
VI.1.2. SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple).	94
VI.1.3. Árbol filogenético.	96
VI.2. Identificación de la bacteria aislada en estación 49.	103
VI.3. Tasas de crecimiento <i>Vibrio</i> sp.	104
VI.4. Bioensayo con <i>Vibrio</i> sp.	106
VI.5. Amplificación del Gen 4,5 DOPA.	111
VI.6. Extracción y amplificación del ADN bacteriano de los sedimentos.	114
VII. CONCLUSIONES	118
VIII. LITERATURA CITADA	119

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Características de los iniciadores para la amplificación del Gen 4,5 DOPA.	44
II	Concentración de DDT (ng g^{-1}) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. ND=no detectado, LD= límite de detección.	54
III	Concentración de carbono orgánico (%), partículas $<63 \mu\text{m}$ (%), bacterias reductoras de sulfato (NMP 100 g^{-1}) y profundidad (metros) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California.	56
IV	Matriz de correlación Producto-Momento de Pearson entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) Significativas ($p<0.05$), p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDD, CO % = porcentaje de carbono orgánico, BRS = bacterias reductoras de sulfato, N = número de datos.	58
V	Matriz de correlación Producto-Momento de Pearson entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) Significativas ($p<0.05$), ΣDDT , (%) partículas $<63 \mu\text{m}$, CO % = porcentaje de carbono orgánico, BRS = bacterias reductoras de sulfato, N = 19.	58
VI	Análisis de Factores entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) Significativas ($p<0.05$), p,p'-DDD, o,p'-DDD, ΣDDT , (%) partículas $<63 \mu\text{m}$, CO % = porcentaje de carbono orgánico, BRS = bacterias reductoras de sulfato, N= 19.	61

TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
VII	Coeficientes de similitud de Sorensen entre las bandas obtenidas mediante SSCP. Los números en la primera columna y en la primera fila indican las estaciones de muestreo.	65
VIII	Taxonomía de las bandas obtenidas en SSCP.	66
IX	Características de la bacteria aislada en el sedimento de la estación 49 de la costa noroccidental de Baja California.	71
X	Tasas de crecimiento específico (μ) promedio, desviación estándar, tiempo de duplicación promedio (g) y ecuación de regresión de <i>Vibrio</i> sp. en medio de sales mínimas y medio sales mínimas más DDT en condiciones aerobias.	74
XI	Porcentaje de área relativa de DDT en bioensayo aerobio con <i>Vibrio</i> sp. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano.	81

TABLAS (Continuación)

Tabla	Página
XII Porcentaje de área relativa de DDT en bioensayo anaerobio con <i>Vibrio</i> sp. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT =para, para dicloro difenil tricloroetano.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas del metabolismo microbiano para el DDT, tomado de Lal y Saxena, 1982. DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etano] DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etano] DDE [1,1,-dicloro-2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etileno] DDCN bis(<i>p</i> -clorofenil) acetonitrilo DDMU [1-cloro-2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etileno] DDMS [1-cloro-2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etano] DDNU [2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etileno] DDNS [2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etano] DDOH [2,2-bis(<i>p</i> -clorofenil) etanol] DDA [bis(<i>p</i> -clorofenil) ácido acético] BH [benzidrol] BP [Benzofenona] DDM [bis(<i>p</i> -clorofenil) metano] DBH [4,4-diclorobenzidrol] DBP [4,4-diclorobenzofenona] PCPA [(<i>p</i> -clorofenil) ácido acético].	15
2	Árbol filogenético del Dominio Bacteria tomado de Curtis y Barnes, 2000.	22
3	Árbol filogenético del Dominio Archea tomado de Curtis y Barnes, 2000.	23
4	Métodos moleculares para determinar la estructura bacteriana.	25
5	Área de estudio y estaciones de muestreo en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California y profundidad en metros, I emisor de la Planta de Tratamiento de Punta Loma, California, II emisor de la Planta Internacional de Tratamiento de Aguas Residuales, III Planta de Tratamiento de Punta Bandera.	33
6	Cromatograma de los estándares utilizados para análisis de DDT en sedimentos superficiales y bioensayo de <i>Vibrio</i> sp. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano.	41

FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
7	Distribución de DDT (ng g^{-1}) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California.	55
8	Dendograma de similitud de las variables medidas en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. CO % = porcentaje de carbono orgánico, % < 63 μm = porcentaje de partículas <63 μm , ΣDDT = dicloro difenil tricloroetano, BRS = bacterias reductoras de sulfato, o,p'-DDD = orto, para, dicloro difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para, dicloro difenil dicloroetano.	59
9	Perfil de SSCP de genes parciales de 16S ARNr en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. Los números indican las estaciones de muestreo, las letras en los carriles las bandas secuenciadas y M=estándar, de arriba hacia abajo <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Rhizobium trifolii</i> , <i>Flavobacterium johnsoniae</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	62
10	Dendograma UPGMA a partir de los índices de similitud de Sorensen entre las estaciones de muestreo de sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California.	63
11	Árbol filogenético construido por Neighbor-Joining a partir de la secuencia parcial del 16S ARNr de bacterias del sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California y de las disponibles en el GenBank. Los valores de Bootstrap superiores a 50 % obtenidos de un total de 1000 réplicas (valor de Bootstrap=1000), se muestran en las ramas del árbol. El árbol tiene como raíz a <i>Archea</i> no cultivable DQ641746.	68
12	Morfología y tinción Gram de la cepa bacteriana aislada del sedimento superficial estación 49.	72

FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
13	RFLP carriles 1 y 5 marcador de peso molecular, carril 2 <i>Vibrio harveyi</i> , carriles 3 y 4 <i>Vibrio</i> sp. aislado de sedimento superficial de la estación 49.	73
14	Control abiótico con DDT aerobio: a) inicial y b) 90 días. p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	76
15	Control abiótico con DDT anaerobio: a) inicial y b) 90 días. p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	77
16	Control biótico sin DDT, 90 días: a) aerobio y b) anaerobio. TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	78
17	Cromatograma bioensayo aerobio: a) inicial y b) 30 días. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	79

FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
18	Cromatograma bioensayo aerobio: a) 60 días y b) 90 días. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	80
19	Cromatograma bioensayo anaerobio: a) inicial y b) 30 días. p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	83
20	Cromatograma bioensayo anaerobio: a) 60 días y b) 90 días. o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, p,p'-DDE = para, para dicloro-difenil etileno, o,p'-DDD = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, p,p'-DDD = para, para dicloro-difenil dicloroetano, o,p'-DDT = orto, para dicloro difenil tricloroetano, p,p'-DDT = para, para dicloro difenil tricloroetano, TCMX = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, PCB-209 = decaclorobifenil.	84
21	Amplificación del Gen 4,5 DOPA a diferentes temperaturas de alineación (58-68 °C) por triplicado. Arriba: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo, carril 3-15 ADN <i>Vibrio fischeri</i>. Abajo: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2-9 ADN <i>Vibrio fischeri</i>.	87

FIGURAS (Continuación)

Figura		Página
22	Amplificación del Gen 4,5 DOPA en <i>Vibrio</i> sp. aislado de sedimento superficial de la estación 49. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo <i>Vibrio fischeri</i> , carril 4 ADN plasmídico <i>Vibrio</i> sp. carril 5 ADN cromosómico <i>Vibrio</i> sp.	88
23	ADN en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. M= marcador fago Lambda, 4-65 estaciones de muestreo.	90
24	Rutas propuestas para la degradación del DDT <i>Vibrio</i> sp: a) aerobia y b) anaerobia.	108

I. INTRODUCCIÓN

I.1. DDT en la Cuenca del Sur de California

La Cuenca del Sur de California (CSC) es un sistema marino que se extiende a lo largo de 357 millas desde Punta Concepción, California (Estados Unidos) hasta cabo Colonett, Baja California (México). Tiene influencia de la Corriente de California la cual fluye principalmente en dirección suroeste y de la contracorriente de California la cual durante los meses de otoño e invierno tiene una orientación en dirección norte (Davis *et al.*, 2006). La combinación de estas, propicia la coexistencia de diferentes organismos marinos entre los que se encuentran 500 especies de peces y 1500 de invertebrados, perteneciendo a una de las mayores rutas de migración de aves y mamíferos marinos a nivel mundial, clasificándose como una de las zonas templadas más diversas (Dailey *et al.*, 1993).

La CSC es una de las regiones mas densamente pobladas del noroeste del continente americano ya que cerca de 20 millones de personas la habitan (Noble *et al.*, 2001a). El incremento poblacional en esta región, ha provocado cambios importantes en el litoral y problemas de contaminación derivados de diversas actividades, entre ellas la de dragado. Se tiene conocimiento que esta última actividad se ha llevado a cabo en aproximadamente el 75 % de las bahías y estuarios del sur de California, con el objetivo de dar mantenimiento a los canales de navegación y para la construcción de marinas (Horn y Allen, 1985) y que entre 1991 y 1997 aproximadamente 2681,247 m³ de sedimentos provenientes de puertos y bahías se descargaron dentro de la CSC. Esta cantidad representa siete veces la de los sólidos aportados por el sistema de

plantas de tratamiento de aguas residuales del sur de California, contribuyendo con contaminantes al ecosistema marino entre ellos, el cromo, plomo, mercurio, PAH's, PCB's y DDT's (Steinberger *et al.*, 2002).

Con respecto a Baja California, México, la zona costera registra intensos procesos de urbanización con diversos patrones de ocupación del territorio y un incremento en la demanda de servicios básicos; por lo que esta región representa, en materia de planeación y de preservación del ambiente, un reto para autoridades responsables y sociedad en general (Dirección de Desarrollo Urbano y Ecología, 2000). Debido a este crecimiento, en los últimos años en la zona litoral entre las ciudades de Tijuana y Ensenada se han construido una cantidad significativa de marinas y desarrollos turísticos, por tanto entre un 20 a 40 % de la superficie de estuarios y zonas fangosas se han visto disminuidos, con la subsiguiente erosión y modificación de la zona costera (Periódico Oficial de Baja California, 2001; EPA, 2001).

La entrada de los contaminantes a la CSC ocurre principalmente por dos vías: acarreo por lluvias y descargas de aguas residuales de plantas de tratamiento (DiGiacomo *et al.*, 2004; Schiff *et al.*, 2006). Se tiene conocimiento que eventos de tormenta que ocurren a finales de invierno y principios de primavera contribuyen con mas del 95 % del volumen total de las descargas y de los contaminantes en la CSC (Schiff *et al.*, 2000), modificando la circulación costera, distribución de nutrientes, concentraciones de sedimento suspendido, biomasa de fitoplancton y productividad primaria (National Research Council, 1993).

En la zona de estudio se encuentran algunas cuencas que actúan como trampas de sedimento fino y de material particulado que provienen de escurrimientos por lluvia y de descargas. Algunas de éstas se encuentran cerradas o semicerradas, lo que le confiere a la zona una circulación característica (Dailey *et al.*, 1993; Schiff, 2006).

Las descargas de aguas residuales a la CSC por parte de Estados Unidos se realizan a través de las plantas de tratamiento: City of Los Angeles Hyperion Treatment Plant (HTP), County Sanitation Districts of Los Angeles County (CSDLAC), County Sanitation Districts of Orange County (CSDOC), y City of San Diego Point Loma Wastewater Treatment Plant (PLWTP). Estas evacúan a la zona costera la cantidad de $1.03 \times 10^9 \text{ g d}^{-1}$ de aguas residuales tratadas (Schiff *et al.*, 2000) a través de emisores submarinos y por debajo de la termoclina, evitando que los contaminantes alcancen la superficie (Eganhouse *et al.*, 2000), sin embargo, existen fenómenos como surgencias, vientos y tormentas de invierno que favorecen la mezcla vertical, como consecuencia, ocasionalmente las sustancias contaminantes descargadas por los emisores submarinos pueden llegar a alcanzar aguas superficiales e impactar la zona costera.

La falta de infraestructura en México para el tratamiento de sus aguas residuales ocasionó a partir de 1930 un grave conflicto internacional con Estados Unidos, debido a que las aguas residuales no tratadas de la ciudad de Tijuana contaminaban las principales playas del condado de San Diego, California (Hickey, 1986). Para resolver el problema de saneamiento fronterizo

y evitar la contaminación de la zona costera entre ambos países, se concertaron acuerdos entre los gobiernos de México y de Estados Unidos para la construcción de una planta binacional de tratamiento de aguas residuales. Esta planta de tratamiento se denomina Planta Internacional de Tratamiento de Aguas Residuales (PITAR), fue construida en San Isidro California y entró en operaciones en abril de 1997, es de tratamiento primario avanzado, con una capacidad instalada para tratar $1,100 \text{ L s}^{-1}$ de aguas residuales, mismas que son evacuadas mediante un emisor submarino, a una profundidad promedio de 29 metros.

Con respecto a la parte mexicana de la CSC, descargan sus aguas residuales cinco plantas de tratamiento: Playas de Rosarito (95 L s^{-1}), Punta Bandera (750 L s^{-1}), Sauzal (60 L s^{-1}), Gallo (250 L s^{-1}) y Naranjo (500 L s^{-1}). Las aguas residuales tratadas son vertidas directamente sobre la línea de costa.

Los estudios sobre el comportamiento y variabilidad de la carga orgánica de la planta de tratamiento de Punta Bandera indican altos niveles de materia orgánica (Sañudo-Wilhelmy, 1983; Nishikawa *et al.*, 1984). Debido a que la zona es de alta energía y expuesta al oleaje, los contaminantes son dispersados y distribuidos por factores físicos, entre ellos los procesos de difusión y advección así como las corrientes de retorno y litoral. Esta última produce un transporte de sedimentos hacia el sur (Marmolejo-Lara, 1985; Cupul-Magaña, 1987), sin embargo en verano y otoño se reportan corrientes en dirección norte (Godínez-Sandoval, 1986; Álvarez-Sánchez, 1987).

Se tiene conocimiento de que las aguas residuales evacuadas en la CSC contienen diversos contaminantes como: materia orgánica, metales pesados, microorganismos patógenos y compuestos orgánicos persistentes (COPs) los cuales impactan el ecosistema marino incluyendo la porción mexicana de la Cuenca (Ramírez-Álvarez, 2000; Noble *et al.*, 2001b; Partida-Gutiérrez *et al.*, 2003). Entre los COPs presentes en la CSC se destacan los compuestos organoclorados los cuales están integrados por el DDT y sus metabolitos así como los bifenilos policlorinados (BPC's).

El DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano] es un compuesto sintético, químicamente estable e hidrofóbico muy importante desde el punto de vista de la contaminación ambiental debido a su persistencia. Fue utilizado a nivel mundial desde 1948 para proteger los cultivos agrícolas así como para controlar diversas plagas domésticas. Los bajos costos de fabricación de algunos de sus isómeros como el p,p'-DDT (dicloro difenil tricloroetano) aunado a su amplio espectro de actividad insecticida, hicieron de este compuesto el más empleado entre 1969 a 1974, alcanzando sus máximos niveles de uso en la década de los sesenta, sin embargo debido a su efecto en los organismos, a partir de 1971 fue prohibido en Estados Unidos por la Agencia de Protección en el Ambiente (EPA).

En el medio marino se ha demostrado que puede ocasionar alteraciones y efectos dañinos en pelícanos, leones marinos, peces y moluscos (De Long *et al.*, 1973; Young *et al.*, 1976; Tran y Zeng, 1999). Su introducción en la CSC ocurrió a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales

anteriormente mencionadas. Se estima que de 1971 a 1996 las principales plantas de tratamiento de California evacuaron debajo de la termoclina 41, 301 kg de DDT (Raco-Rands, 1999).

En México, se limitó su uso a partir del año 2000, anticipándose al Convenio de Estocolmo de mayo de 2001, en donde 127 países adoptaron una resolución para prohibir o minimizar el uso de las doce sustancias tóxicas más utilizadas en el mundo, entre ellas el DDT (Martínez-Cordero y Gavilán-García, 2004). No obstante la prohibición hay reportes de su utilización ilegal debido a la existencia de reservas de este producto (CEC, 1997; Partida-Gutiérrez *et al.*, 2003). Adicionalmente se desconoce el aporte de DDT por las principales plantas de tratamiento de las ciudades de Tijuana y Ensenada, B.C., entre ellas: Planta de Punta Bandera, Planta el Gallo y Planta el Naranja, sin embargo se ha detectado la presencia de p,p'-DDT en sedimentos marinos de estas localidades (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998).

La introducción y acumulación de DDT en la parte norteamericana de la CSC está bien documentada. Estudios realizados en núcleos de sedimentos de ésta, indican que la acumulación de DDT comenzó en 1952 (Hom *et al.*, 1974), con un claro efecto de biomagnificación en organismos marinos como es el caso del pelícano café de California, el cual estuvo a punto de su extinción por ingerir anchovetas contaminadas con DDT's y PCB's (Chartrand *et al.*, 1985).

Sin embargo, se tiene conocimiento que la concentración del DDT en especies marinas ha disminuido durante las últimas tres décadas (Schiff *et al.*,

2000), por ejemplo en peces colectados en la CSC las concentraciones de este contaminante disminuyeron en dos ordenes de magnitud en comparación con las detectadas de 1985 a 1994 (Schiff y Allen, 2000). Por otra parte, en un estudio realizado en peces de la Bahía de Newport se encontraron concentraciones de DDT de $1,830 \mu\text{g kg}^{-1}$ en 1980 y de $160 \mu\text{g kg}^{-1}$ en 2002 (Allen *et al.*, 2004).

Con respecto a México son pocos los estudios realizados en la CSC entre ellos el realizado por Gutiérrez-Galindo *et al.* (1983) quienes compararon los niveles de DDT total en *Mytilus californianus* de la zona costera de Baja California con los obtenidos en la literatura para la región norte, encontrando valores sustancialmente menores a los reportados por Suárez-Vidal y Acosta-Ruíz (1976), explicando su disminución por la reducción en su uso desde 1970 en los campos agrícolas de la región de Baja California. La contaminación por compuestos orgánicos persistentes en sedimentos superficiales de la región ha sido también documentada (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998; Macías-Zamora, 2001; Noblet *et al.*, 2003).

No obstante que la entrada del DDT en la CSC a disminuido de tres a cuatro ordenes de magnitud (Zeng *et al.*, 2001; Bay *et al.*, 2003), una cantidad significativa de este contaminante ha sido acumulada en los sedimentos marinos, por tanto, aproximadamente el 71 % de los sedimentos de la CSC contienen DDT (Schiff *et al.*, 2006), llegando a constituir una fuente potencial de contaminación y de bioacumulación para la fauna asociada al sedimento (Schiff y Allen, 2000; Zeng y Tran, 2002). Además, el DDT acumulado

históricamente en los sedimentos puede llegar a ser removido y dispersado a otras áreas, como lo demuestran los modelos aplicados en la CSC que indican que puede ser resuspendido y transportado por corrientes durante largos períodos de tiempo (Noble *et al.*, 2001b).

La disminución de las concentraciones de DDT en la CSC puede deberse también al mecanismo de la biodegradación, ya que el DDT puede ser degradado dependiendo de las condiciones del medio, en metabolitos como el DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano], DDE [1,1,-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil) etileno] y DDMU [1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil) etileno]. Se ha encontrado que en medios anaerobios y por dechlorinación reductiva el DDT es transformado en DDD, mientras que en medios aerobios y por dehidroclorinación forma DDE, el cual a su vez, bajo condiciones anaeróbicas y por dechlorinación reductiva puede producir DDMU (Zeng y Venkatesan, 1999). Es de destacar que el DDMU se ha detectado en sedimentos de Palos Verdes, California (Lee, 1994) así como en microcosmos de laboratorio (Quensen *et al.*, 1998).

I.2. Efecto del DDT en las bacterias

I.2.1. Estrategias de supervivencia

Las bacterias pueden sobrevivir y desarrollarse en ambientes contaminados mediante algunas estrategias como son: la utilización de sistemas enzimáticos comunes para los compuestos aromáticos y adopción de genes catabólicos de otras bacterias por proceso de transferencia y

recombinación de genes (Suárez-Rodríguez, 1993; Herrick *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2004; Hou y Ellis, 2004., Regeard *et al.*, 2005).

La degradación de compuestos aromáticos no es algo nuevo, ya que por millones de años la biosíntesis y rompimiento de los anillos bencénicos ha sido una parte importante en el ciclo de carbono. Estos compuestos son muy abundantes en la naturaleza, como es el caso de la lignina, polímero necesario para la construcción de tejidos vegetales. El rompimiento de su anillo bencénico se lleva a cabo por hongos y bacterias, utilizando para ello enzimas dioxigenasas las cuales desempeñan un papel importante en las rutas catabólicas de los microorganismos que degradan compuestos aromáticos e hidrocarburos saturados (Bugg y Winfield, 1998).

Actualmente en la industria existe una gran cantidad de compuestos químicos derivados de síntesis orgánicas como son los pesticidas, herbicidas o residuos industriales, cuya característica común es la de poseer en su estructura anillos bencénicos, lo que los hace altamente resistentes y difíciles de degradar en el ambiente, sin embargo los microorganismos pueden transformar estos compuestos aromáticos con las mismas enzimas que se usan para degradar compuestos orgánicos que ocurren en la naturaleza, como el caso de la lignina mencionada anteriormente.

Otra estrategia que utilizan las bacterias para sobrevivir en ambientes contaminados es la adopción de genes catabólicos de otras bacterias. La transferencia de material genético se puede realizar por medio de diversos

mecanismos como es la conjugación, aunque también pueden incorporarlo de otras especies bacterianas por medio de los virus (transducción) o directamente del medio (transformación). El material genético así incorporado puede integrarse al de la bacteria, enriqueciendo su reservorio metabólico con nuevas funciones, incluyendo aquellas que le permitan degradar compuestos xenobióticos (Suárez-Rodríguez, 1993; Tropel y Van Der Meer, 2004).

Los genes que codifican enzimas involucradas en la degradación de contaminantes se encuentran en los cromosomas aunque en muchas ocasiones pueden estar en los plásmidos (Suárez-Rodríguez, 1993). Estos son elementos genéticos circulares que se duplican en forma autónoma y tienen una existencia extracromosómica. Muchos de los genes de los plásmidos se pueden transmitir horizontalmente de célula a célula por medio de la conjugación. El intercambio genético de los plásmidos por medio de este proceso se le conoce como conjugativo y pueden transferirse inclusive a otras taxa. Estos procesos han sido estudiados en varios ambientes incluyendo el marino (Hohnstock *et al.*, 2000).

Numerosos estudios han reportado una mayor frecuencia de plásmidos bacterianos en sedimentos marinos con impacto antropogénico (Barkay y Olson, 1986; Baya *et al.*, 1986; Wickham y Atlas, 1988; Andersen y Sandaa, 1994; Hohnstock *et al.*, 2000; Johnsen y Kroer, 2007), una explicación para este incremento es la diseminación de los plásmidos que codifican genes catabólicos a través de su transmisión dentro de la comunidad microbiana, ya que los plásmidos que codifican genes representan un reservorio de ADN

(ácido desoxirribonucleico) móvil que contribuye significativamente a la adaptación y variación genética de las comunidades microbianas. Un ejemplo de ello son los plásmidos que median la adaptación de las poblaciones bacterianas al ambiente y que se han reportado durante períodos de contaminación, cuando la frecuencia de plásmidos catabólicos se incrementan de dos a diez veces (Sobecky *et al.*, 1997). Por tanto las adaptaciones genéticas de las poblaciones bacterianas a ambientes extremos o modificados por el hombre mediante los plásmidos, se pueden interpretar entonces como una estrategia de supervivencia al dotarles ciertas características ecológicas ventajosas.

Se conoce que los plásmidos pueden contener una variedad de genes, por ejemplo, los que controlan la producción de toxinas o que dan resistencia a antibióticos y metales pesados, o bien que poseen genes para la degradación de pesticidas fosforados, organoclorados y otros compuestos químicos (Dahlberg *et al.*, 1997; Bastiaens *et al.*, 2000; Laurie y Lloyd-Jones, 2000; Rhodes *et al.*, 2000, Aminov *et al.*, 2001., Johnsen y Kroer, 2007), por tanto se puede decir que los plásmidos desempeñan un papel importante en el rompimiento y detoxificación de compuestos xenobióticos. Por lo que en la actualidad se ha incrementado su uso como una herramienta para entender los procesos de contaminación en diversos ambientes.

En el ambiente marino se han realizado investigaciones utilizando a los plásmidos como herramienta. Entre los estudios más frecuentes se pueden mencionar los referidos a la resistencia a antibióticos y degradación de

hidrocarburos aromáticos (Dahlberg *et al.*, 1997; Sobecky *et al.*, 1997). Estudios referentes a la degradación de compuestos orgánicos persistentes como el DDT son escasos.

Para que suceda la transferencia de genes en una comunidad microbiana del medio marino se necesitan varias condiciones: la presencia de bacterias que sean capaces de transmitir plásmidos catabólicos, que exista una población potencialmente receptora, una entrada de compuestos xenobióticos para inducir la presión por selección y un microambiente con las condiciones físicas y químicas adecuadas para la transferencia de genes (Olson y Tsai, 1992; Boyle, 1992).

En diversos estudios se ha encontrado que no todos los lugares del medio marino son adecuados para la transferencia de genes, se ha detectado que es mayor en la interfase agua-sedimento y en los sedimentos arcillosos donde existe una mayor acumulación de nutrientes y contaminantes, en donde las bacterias adheridas al sustrato permanecen el tiempo suficiente para poder responder genéticamente a la presión selectiva favorable para la transferencia de genes (Boyle, 1992). Estos microambientes deben de poseer las condiciones adecuadas de factores fisicoquímicos como: temperatura, pH, concentración de nutrientes, potencial redox y capacidad de intercambio de cationes ya que todos estos factores no solamente determinan el tamaño y diversidad de las poblaciones microbianas marinas, sino también influyen en la tasa de transferencia del material genético (Olson y Tsai, 1992).

Se cree además que la capacidad de algunas bacterias para degradar compuestos xenobióticos de reciente creación ocurre por combinaciones de genes preexistentes o fragmentos de genes de diferentes microorganismos, que pueden constituir una nueva vía catabólica, en donde la capacidad de los plásmidos para transferir genes desempeña un papel importante en la evolución de nuevas vías metabólicas para el reclutamiento de genes ó segmentos de genes de diferentes organismos dentro de un huésped disponible (Suárez-Rodríguez, 1993; Peters *et al.*, 2004; Regeard *et al.*, 2005).

1.2. 2. Acumulación de DDT por bacterias

La acumulación de los compuestos organoclorados por los microorganismos es muy rápida, por ejemplo *Aerobacter aeorogenes* y *Bacillus subtilis* requieren solamente 30 segundos para acumular del 80 a 90 % del DDT presente en el medio (Lal y Saxena, 1982), no obstante, el tiempo requerido para acumular este compuesto químico a una concentración máxima difiere de un organismo a otro. Su introducción al interior de la célula bacteriana se lleva a cabo mediante transporte activo y pasivo, su acumulación depende de la adsorción y de la razón superficie/volumen del organismo, entre más grande habrá mayor adsorción de la bacteria a partículas de sedimento con DDT, por tanto, los organismos más pequeños acumulan mayor cantidad de insecticidas.

1.2. 3. Papel de las enzimas en la degradación de DDT

Una vez que los compuestos aromáticos han entrado en la célula bacteriana, pueden ser utilizados como sustratos por enzimas específicas y transformarlos

mediante cometabolismo. Este es un proceso mediante el cual un microorganismo transforma un compuesto químico, pero no lo utiliza como fuente de energía y carbono. La síntesis de los componentes celulares y de la actividad bacteriana se lleva a cabo mediante otro sustrato (Atlas y Bartha, 2002).

El lugar y forma de la degradación inicial del compuesto organoclorado está en función de su estructura molecular, condiciones del ambiente y de las enzimas específicas de los microorganismos que intervienen en el proceso. Existen evidencias de la intervención de enzimas bacterianas en la degradación del DDT. Pfaender y Alexander (1972) encontraron que el DDT presente en aguas residuales era metabolizado por extractos libres de células de *Pseudomonas* sp. a DDD, DDMS [1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano], DDNU [2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno] y DBP (4,4' diclorobenzofenona) bajo condiciones anaerobias, ruta metabólica descrita en Figura 1 (Lal y Saxena, 1982). Por otra parte Nadeau *et al.*, (1994) encontraron que cultivos de *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) A5 metabolizaron lentamente el *p,p'*-DDT y el *o,p'*-DDT utilizando presumiblemente las enzimas para la degradación del 4-clorobifenil.

1.2.4. Rutas metabólicas para la degradación del DDT

La diversidad de rutas bioquímicas (Figura 1) que una bacteria puede seguir para transformar DDT da una idea de su versatilidad metabólica y fisiológica y de las diferentes posibilidades que existen para su degradación. La utilización de una determinada ruta de degradación del DDT por parte de una bacteria dependerá del ambiente. Se ha reportado que bajo condiciones aerobias el DDT puede ser transformado a DDE, mientras que bajo condiciones

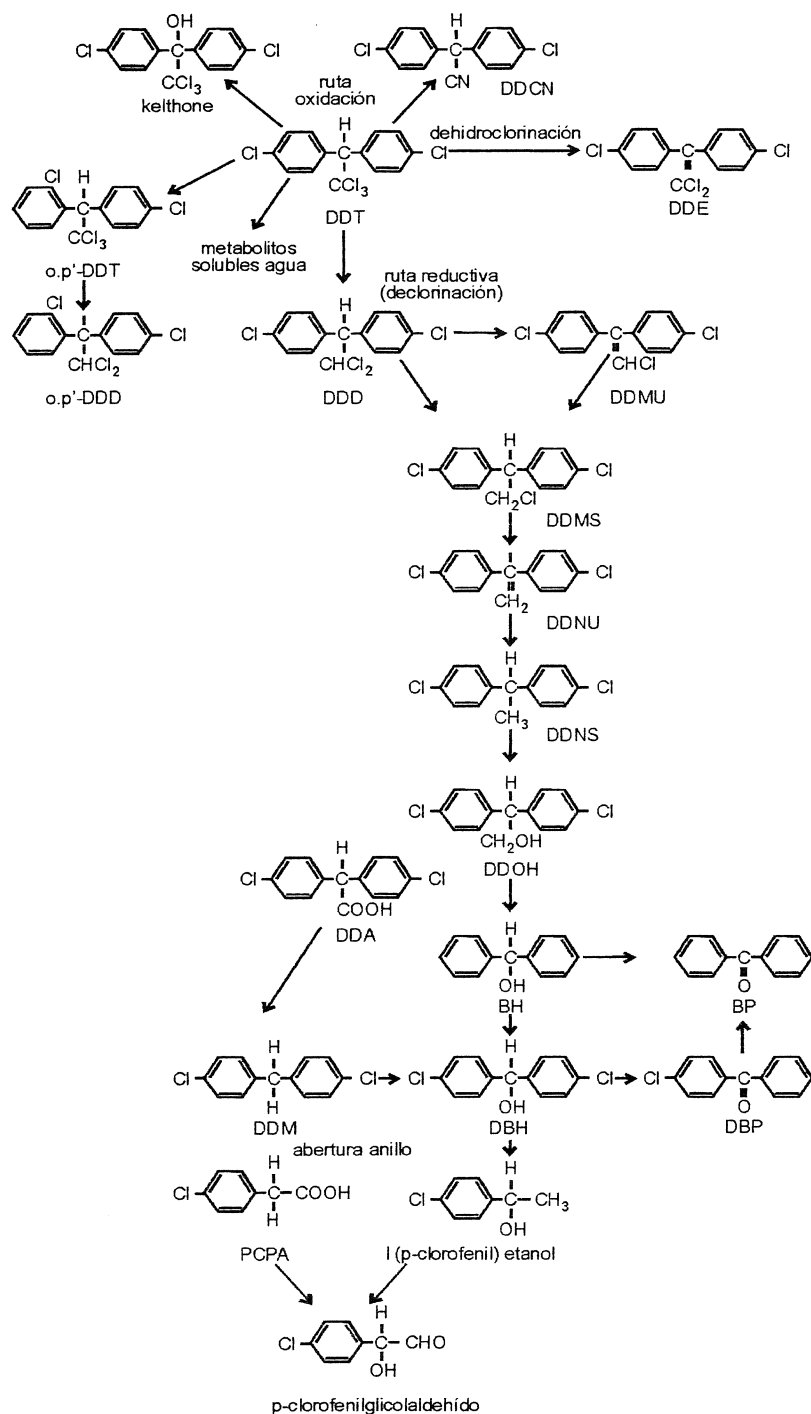


Figura 1. Rutas del metabolismo microbiano para el DDT, tomado de Lal y Saxena, 1982. **DDT** [1,1,1-tricloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] **DDD** [1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] **DDE** [1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno] **DDCN** bis(*p*-clorofenil) acetónitrilo **DDMU** [1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno] **DDMS** [1-cloro-2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] **DDNU** [2,2-bis(*p*-clorofenil) etileno] **DDNS** [2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] **DDOH** [2,2-bis(*p*-clorofenil) etano] **DDA** [bis(*p*-clorofenil) ácido acético] **BH** [benzidrol] **BP** [Benzofenona] **DDM** [bis(*p*-clorofenil) metano] **DBH** [4,4-diclorobenzidrol] **DBP** [4,4-diclorobenzofenona] **PCPA** [(*p*-clorofenil) ácido acético].

anaerobias el DDT mayormente es transformado a DDD (Aislabie *et al.*, 1997, 1999; Hay y Focht, 1998; Quensen *et al.*, 1998).

La introducción de un compuesto orgánico nuevo en el ambiente que potencialmente pueda ser utilizado como fuente de carbono y energía, motiva una presión selectiva que provoca el origen de una nueva ruta de degradación, mediante la modificación o ensamble de enzimas pertenecientes a diferentes rutas ya existentes, que permitan su conversión en un intermediario metabólico celular (Suárez-Rodríguez, 1993).

Se requiere además del desarrollo de genes reguladores que ejerzan un control adecuado sobre la expresión de genes estructurales. Esto se puede llevar a cabo mediante procesos como la mutación, recombinación o transposición los cuales provocan una elevada diversidad de ADN en bacterias del sedimento (Hou *et al.*, 2004).

1.3. Diversidad bacteriana

Hasta la década de los setenta del siglo pasado, las bacterias se clasificaban de acuerdo a sus aspectos fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, pero a partir de los años 80 se empezaron a considerar las secuencias derivadas del 16S ARNr (ácido ribonucleico ribosomal) para caracterizar comunidades bacterianas naturales, sin necesidad de obtener cultivos puros (López-García *et al.*, 2001; Hagström *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2002; Rappé y Giovannoni, 2003; Tyson *et al.*, 2004).

En la década de los 90 se aplicaron las técnicas moleculares como extracción de ADN, amplificación de ADN mediante PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés), hibridación y secuenciación para el estudio de muestras marinas (Furhman *et al.*, 1994; Giovannoni *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1997; Acinas *et al.*, 1999) y se puso de manifiesto que existía una gran diversidad microbiana que hasta entonces era totalmente desconocida, puesto que la mayor parte de las secuencias que se obtenían a partir de la biomasa microbiana recolectada en medios marinos no correspondía con las obtenidas a partir de especies cultivadas y estudiadas en laboratorio.

Los análisis basados en técnicas moleculares utilizando el 16S ARNr han mostrado que la estructura bacteriana en sedimentos marinos es diversa y compleja, que es afectada por diversos factores fisicoquímicos y biológicos entre los cuales se encuentran el carbono orgánico, oxígeno, salinidad, nutrientes, profundidad, interacción con otros organismos y el metabolismo microbiano (Edlund y Jansson, 2006; Edlund, 2007). Adicionalmente, modificaciones en el ambiente por la introducción de contaminantes pueden ocasionar cambios en la estructura poblacional de las comunidades microbianas (Cheungh y Kinkle, 2001; Duarte *et al.*, 2001; Leys *et al.*, 2004; Edlund y Jansson, 2006; Edlund, 2007).

I.3.1 Identificación de bacterias

La diferencia en algunos órdenes de magnitud entre el número de bacterias marinas detectadas con las técnicas de cuenta en placa y de microscopía de epifluorescencia, se debe a que pocas de ellas tienen la

capacidad de crecer en medios nutritivos, y si lo hacen es con baja eficiencia (Atlas y Bartha, 2002; Connon y Giovannoni, 2002; Zengler *et al.*, 2002). En la actualidad se está experimentado con medios de cultivo similares a las condiciones físico-químicas encontradas en el ambiente marino, permitiendo el aislamiento de algunas bacterias incapaces de crecer en los medios artificiales ricos en materia orgánica (Schut *et al.*, 1997; Connon y Giovannoni, 2002; Rappé *et al.*, 2002).

No obstante, la mejoría en la elaboración de medios de cultivo, todavía no es posible el aislamiento y crecimiento de la mayor parte de las bacterias del medio marino ya que se tiene conocimiento que aproximadamente el 99 % de las bacterias no han podido ser cultivadas en el laboratorio, por tanto, el porcentaje de microorganismos aislados (recuperables) con respecto al total (viable pero no recuperable) es pequeño y poco representativo de la comunidad bacteriana marina (Cottrell y Kirchman, 2000; Torsvik y Øvreås, 2002). Es por este motivo que los estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el aislamiento de microorganismos representan tan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente (Giovannoni *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995; Nichols, 2007; Ritz, 2007).

Para identificar bacterias marinas y para evitar los problemas anteriormente mencionados, en la actualidad se están aplicando técnicas de biología molecular, ya que no requieren de su aislamiento y crecimiento en medios de cultivos convencionales, basándose únicamente en el conocimiento de las secuencias del ADN (Alonso-Sáez *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007).

Es de esta manera como la aplicación de métodos moleculares para estudiar la diversidad y ecología de los microorganismos en el ambiente marino ha permitido conocer la composición de las comunidades microbianas no cultivables, de hecho grupos enteros de organismos que se cree juegan un papel significativo en algunos ambientes marinos se conocen únicamente por sus secuencias moleculares (Edlund *et al.*, 2006; Edlund, 2007). En resumen los métodos moleculares han permitido la caracterización de algunos organismos reconocidos pero pobremente entendidos, que han pasado desapercibidos en los cultivos tradicionales del laboratorio (Ravenschlag *et al.*, 2001).

I.3.2. Uso del 16S ARNr

Los ARN ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las interrelaciones evolutivas entre bacterias porque, son moléculas viejas, importantes para la síntesis de proteínas, funcionalmente constantes, distribuidas en forma universal y moderadamente bien conservadas a través de amplias distancias filogenéticas (Giovannoni y Rappé, 2000). Son también fácilmente purificadas a partir de los organismos, aún sin el procedimiento de clonación. Existen tres subunidades de la molécula de ARN ribosómico que en las bacterias tienen magnitudes de 5S, 16S y 23S.

La subunidad 5S de ARNr se ha utilizado para mediciones filogenéticas, pero tiene algunos inconvenientes como tamaño pequeño (120 nucleótidos) lo que limita la información que se puede obtener de ella, aunque es una molécula altamente conservada, cuando ocurren variaciones no se distribuyen

al azar sino que algunas posiciones derivan mas libremente que otras por tanto, la falta de variabilidad independiente de la posición de los nucleótidos limita su utilidad filogenética. En cambio los 16S ARNr y 23S ARNr de aproximadamente 1500 y 3000 nucleótidos respectivamente, contienen varias regiones de secuencias muy bien conservadas las cuales son útiles para determinar variabilidad entre las secuencias en las poblaciones bacterianas, por tanto sirven como excelentes cronómetros filogenéticos. No obstante que el 23S ARNr tiene una región conservada mayor que la 16S ARNr la mayoría de las investigaciones en filogenia bacteriana se han realizado con base al 16S ARNr porque es más manejable, siendo posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie bacteriana (Madigan *et al.*, 2000).

La ventaja de usar 16S ARNr es que se encuentra en todas las bacterias, son moléculas lo suficientemente grandes para proporcionar un número significativo de nucleótidos que permitan la comparación de secuencias, sin embargo son lo suficientemente pequeñas para utilizarlas convenientemente, por esta razón algunos investigadores que empezaron sus estudios filogenéticos con el 5S ARNr decidieron utilizar el 16S ARNr, ya que provee suficiente diversidad evolutiva para identificar diferentes grupos de microorganismos.

En la actualidad en el Ribosomal Database Project, GenBank y Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) existe una gran cantidad de datos de secuencias parciales y completas de 16S ARNr, las cuales pueden

consultarse para realizar una comparación estadística de las secuencias obtenidas de un aislamiento, contra las ya publicadas.

I.3.3. Filogenia y taxonomía de bacterias

El análisis del 16S ARNr ha permitido establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos procariotas y ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema Bergey's de clasificación actual (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001; 2005a; 2005b). Este Manual contiene una mayor información ecológica que las ediciones anteriores y divide a las bacterias en dos dominios, Bacteria y Archaea.

El Dominio Bacteria está formado por 12 linajes (Figura 2) es muy diverso y tiene representantes de varios grupos metabólicos, incluyendo organismos heterótrofos y fotótrofos.

El Dominio Archaea está constituido por dos grupos filogenéticamente diferentes (Figura 3): El Crenarchaeota que es fisiológicamente homogéneo y se encuentra en hábitats termofílicos, y Euryarchaeota el cual es fenotípicamente heterogéneo e incluye a las bacterias metanogénicas y halofílicas.

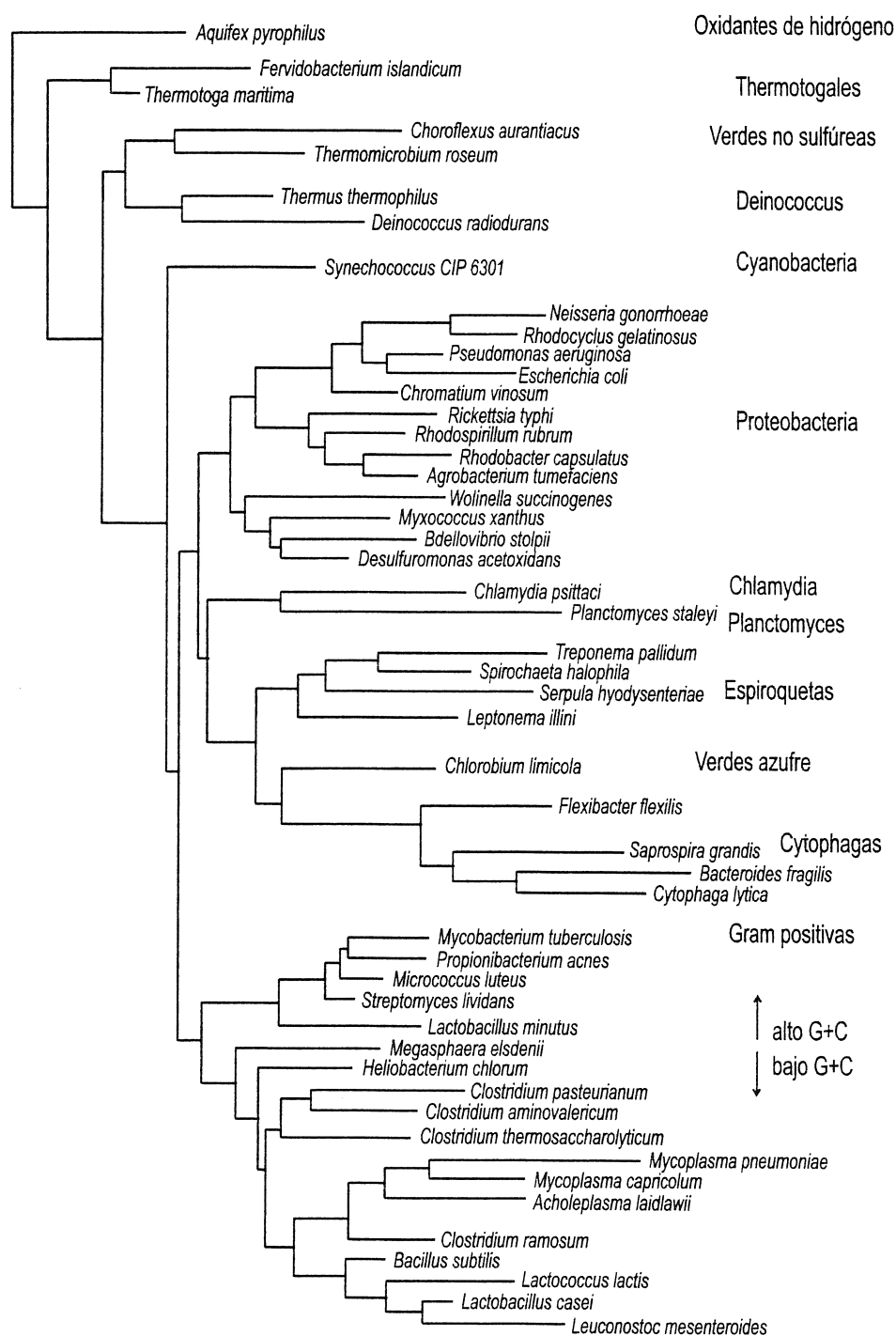


Figura 2. Árbol filogenético del Dominio Bacteria tomado de Curtis y Barnes, 2000.

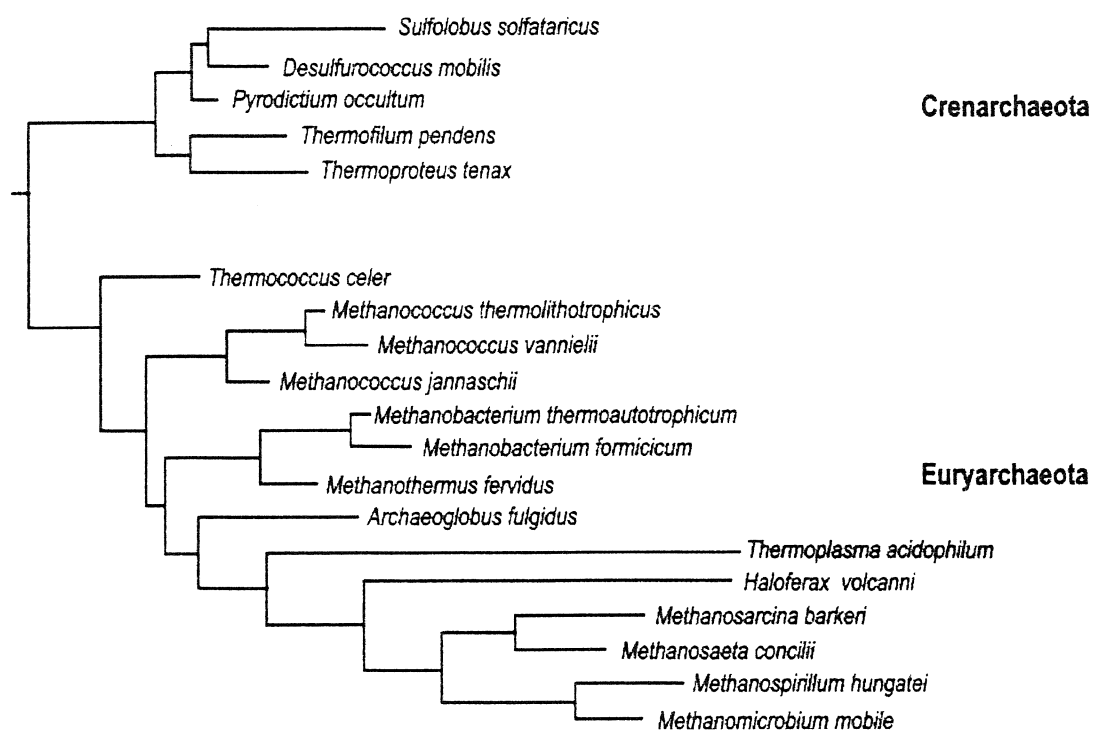


Figura 3. Árbol filogenético del Dominio Archea tomado de Curtis y Barnes, 2000.

I.3.4. Métodos moleculares de identificación

En la actualidad para determinar la diversidad microbiana en diferentes ambientes se utilizan métodos moleculares, como el RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms por sus siglas en inglés), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis por sus siglas en inglés), TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis por sus siglas en inglés) y SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism por sus siglas en inglés) (Akkermans *et al.*, 1998; Pace, 1997; Schwieger y Tebbe, 1998; Polymenakou *et al.*, 2005; Oto *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007; Blackwood *et al.* 2007). Estos son rápidos ya que no requieren de cultivos previos, el ADN es extraído de la muestra y posteriormente se amplifica mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez amplificado, el ADN total se separa físicamente mediante electroforesis, observándose un patrón de bandas único, o huellas moleculares, dando una idea general de la diversidad genética en la muestra, permitiendo realizar una comparación entre comunidades para establecer posibles diferencias espaciales y temporales (Figura 4). Es de esta manera como a través de la aplicación de estas técnicas moleculares se ha logrado tener un mejor conocimiento de la biodiversidad bacteriana en ambientes naturales y contaminados (Amann *et al.*, 1995; Head *et al.*, 1998; Nogales *et al.*, 1999; Rittmann, 2002; LaMontagne *et al.*, 2004; Ahn, *et al.*, 2007).

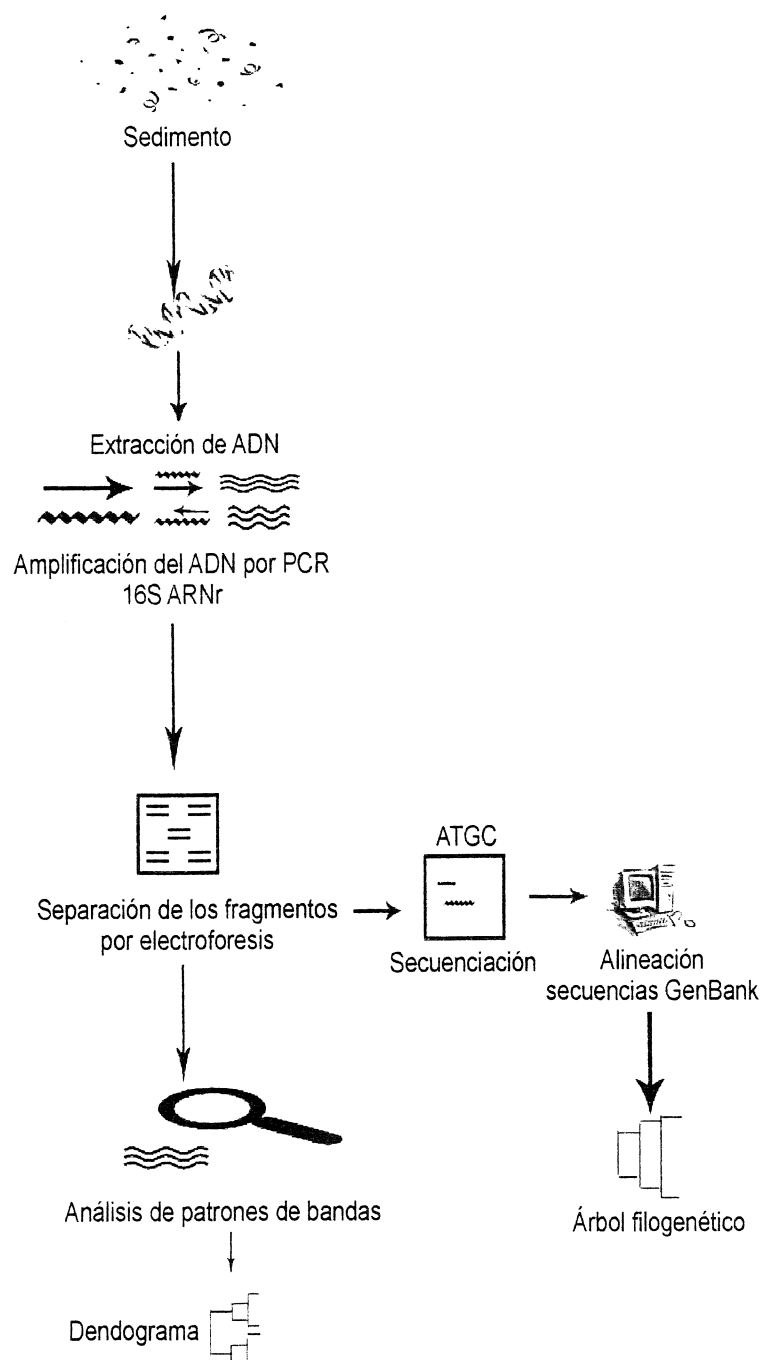


Figura 4. Métodos moleculares para determinar la estructura bacteriana.

En los últimos 10 años se ha utilizado el análisis de polimorfismo de conformación de cadena simple del ADN para caracterizar comunidades microbianas así como los cambios en la composición de una comunidad frente a cambios ambientales derivados de la presencia de contaminantes antropogénicos.

El método SSCP requiere de la amplificación previa del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando iniciadores universales del gen 16S ARNr. Los amplicones obtenidos son posteriormente digeridos con enzimas de restricción y cargados en un gel de poliacrilamida. Los fragmentos de ADN obtenidos, son de igual tamaño pero diferente secuencia y se separan debido a su diferente conformación estructural durante la migración de la electroforesis (Lee *et al.*, 1996). Las bandas obtenidas son teñidas con nitrato de plata (Muyzer, 1999). A partir de la posición e intensidad de las bandas se puede realizar un estudio estadístico de la estructura de la comunidad (Fromin *et al.*, 2002) o pueden ser recortadas, purificadas, reamplificadas y secuenciadas para determinar la composición y diversidad de la comunidad microbiana.

Debido a que el método SSCP permite la separación de una mezcla heterogénea de genes 16S ARNr amplificados por PCR y que es relativamente rápido de preparar, es útil para examinar series temporales y la dinámica de las poblaciones microbianas. Una vez que se ha establecido la relación de un cierto microorganismo con una banda en particular, se puede hacer un seguimiento de las fluctuaciones existentes en la población.

Las bandas obtenidas en la electroforesis son conocidas como unidades taxonómicas operacionales, OTU (Schäfer y Muyzer, 2001), y son secuencias ambientales que puedan ser asignadas a un grupo filogenético (López-García *et al.*, 2001; Moon-van der Staay *et al.*, 2001, Bergey's, 2005a).

Una vez que se obtiene una OTU, se compara con secuencias preexistentes, si resulta ser idéntica se tiene una especie conocida, de lo contrario se puede estimar una relación de la secuencia con otros organismos mediante su incorporación dentro de un árbol filogenético, proporcionando una valiosa información sobre las asociaciones filogenéticas de las distintas poblaciones presentes en una comunidad bacteriana natural.

1.3.5 Métodos Filogenéticos

Para entender la diversidad genética de los microorganismos marinos se utilizan métodos filogenéticos los cuales permiten conocer la naturaleza, composición y diversidad de las taxa en el ambiente marino, ayudando a resolver problemas en diversidad, variabilidad e intercambio de genes siendo útil también en estudios evolutivos y ecológicos.

Existen algunos métodos que predicen la distancia acumulada entre dos secuencias, entre ellos se pueden mencionar los modelos de substitución nucleotídica, que describen como evolucionan las secuencias en el tiempo, por el reemplazo de sus nucleótidos entre ellos se encuentran: Harkov, Jukes y Cantor K80, (Kimura 80), HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano 85), TN93, Rev (Yang-94) y Tamura-Nei (Nei y Sudhir, 2000; Skelton *et al.*, 2002; Hall, 2001; Bergey's, 2005a). Todos estos se basan en los mismos conceptos pero difieren

en el grado de complejidad o números de parámetros que emplean para poder describir con mayor realismo la evolución molecular. Estos métodos son conceptualmente los más simples, parten de comparaciones pareadas de un juego de secuencias alineadas para construir una matriz. Hay que mencionar que las distancias calculadas no son simples similitudes binarias, ya que incluyen un modelo de substituciones múltiples en un solo sitio como por ejemplo el modelo de Jukes y Cantor (Head *et al.*, 1998).

Para aplicar alguno de los modelos anteriormente mencionados se requiere que las secuencias de 16S ARNr sean alineadas con las reportadas en el GenBank, ya que los análisis filogenéticos dependen del grado de homología que comparten las secuencias de nucleótidos. La alineación múltiple se puede llevar a cabo mediante el formato FASTA (Fast-All), herramienta que permite una identificación rápida mediante la comparación con secuencias conocidas y reportadas en el GenBank.

Después de la alineación de las secuencias, se aplica algún método adecuado para la construcción de árboles filogenéticos que muestran gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva con los organismos comparados. Un método comúnmente utilizado es el Neighbor Joining o del vecino más cercano, sin embargo los árboles deben ser evaluados estadísticamente mediante "likelihoods" o verosimilitudes para seleccionar el que explica mejor los cambios en las secuencias. Las pruebas jerárquicas se pueden realizar utilizando el programa MODELTEST.

Estudios realizados a nivel mundial indican que los contaminantes orgánicos persistentes pueden ocasionar cambios en la estructura poblacional de las comunidades microbianas en sedimentos contaminados (Paul *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2007) las cuales tienden a ser dominadas por organismos capaces de utilizar y/o sobrevivir a compuestos químicos sintéticos (Venosa *et al.*, 1999). Como resultado, estas comunidades son menos diversas que los sistemas no contaminados (Cheungh y Kinkle, 2001; Duarte *et al.*, 2001; Leys *et al.*, 2004), aunque se tiene conocimiento que la diversidad también puede estar influenciada por la complejidad de compuestos presentes y por el tiempo de exposición a los mismos.

Por otra parte, existen evidencias de que las bacterias del sedimento contribuyen en la biotransformación de contaminantes orgánicos persistentes entre ellos el DDT (Quensen, 1998; Van Den Hoop y Kreulle, 1999; Quensen *et al.*, 2001). No obstante que la introducción de contaminantes tienen un efecto en la ecología de las comunidades microbianas, los pocos estudios que se han realizado de contaminación por DDT en la zona fronteriza México-Estados Unidos se han enfocado mayormente a determinar su distribución espacio temporal (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998; Partida-Gutiérrez, 2003; Macías-Zamora, 2001; Noblet *et al.*, 2003), por tanto se planteó la necesidad de realizar una investigación para determinar no sólo la distribución espacial del DDT sino también la estructura de la comunidad bacteriana en los sedimentos marinos del medio natural, así como la capacidad de las bacterias en la biotransformación de DDT en condiciones controladas de laboratorio.

II HIPÓTESIS

Los plásmidos contribuyen a la variación genética y adaptación de las poblaciones bacterianas en ambientes contaminados y prístinos, porque contienen genes que se pueden transmitir horizontalmente entre especies y codificar proteínas para la degradación de contaminantes, por lo tanto en la estación con mayor concentración de DDT se espera encontrar un gen específico para su degradación. En las estaciones con mayor concentración de este contaminante se encontrará menor cantidad de grupos genéticos que en las menos contaminadas.

III. OBJETIVO

III.1. Objetivo General

Aislar bacterias de los sedimentos marinos de la zona costera fronteriza de Baja California, México-Estados Unidos, con la capacidad de degradar el DDT en condiciones controladas de laboratorio.

III.1.2 Objetivos Específicos

- a).- Determinar la distribución de DDT y sus metabolitos de degradación en los sedimentos marinos de la zona noroccidental de B.C.
- b).- Encontrar los grupos predominantes de bacterias en los sedimentos de la zona noroccidental de B.C.

- c).- Relacionar el DDT y sus isómeros con carbono orgánico, tamaño de partícula, bacterias reductoras de sulfato y profundidad.
- d).- Encontrar un plásmido en bacterias del sedimento marino, con un gen específico para la degradación de DDT.
- e).- Determinar la transformación del DDT por las bacterias aisladas de sedimentos marinos, en condiciones controladas de laboratorio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Descripción de la CSC

La batimetría del área de estudio es variable, con características someras en la franja costera desde Tijuana hasta Rosarito, seguida de variaciones en la profundidad desde Cantamar hasta la zona de Salsipuedes en la cual se observan profundidades superiores a los 400 metros (Figura 5).

El clima de la CSC está determinado por la cercanía del océano y por la posición e intensidad de la celda anticiclónica semipermanente del norte del Pacífico. En general, se puede establecer que el clima en esta zona es seco marítimo, del tipo mediterráneo, con temperaturas que fluctúan de 12 a 18 °C, los veranos son secos y calientes, mientras que los inviernos son fríos y húmedos. Durante los meses de noviembre a abril se presenta la temporada de lluvias, con una precipitación anual de 270 a 300 mm (CETS, 1990; Davis *et al.*, 2006).

El área de estudio esta influenciada principalmente por las aguas residuales de las plantas de tratamiento: Punta Loma de la ciudad de San Diego, California, binacional San Diego-Tijuana y Punta Bandera, de la ciudad de Tijuana.

La planta de tratamiento de aguas residuales de Punta Loma (PLWTP), es del tipo primario avanzado, utiliza cloruro férrico y polímeros orgánicos para una floculación y sedimentación rápida del material particulado, la capacidad es de $240 \times 10^6 \text{ g d}^{-1}$ ($908,400 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$) y trata aproximadamente $195 \times 10^6 \text{ g d}^{-1}$ de

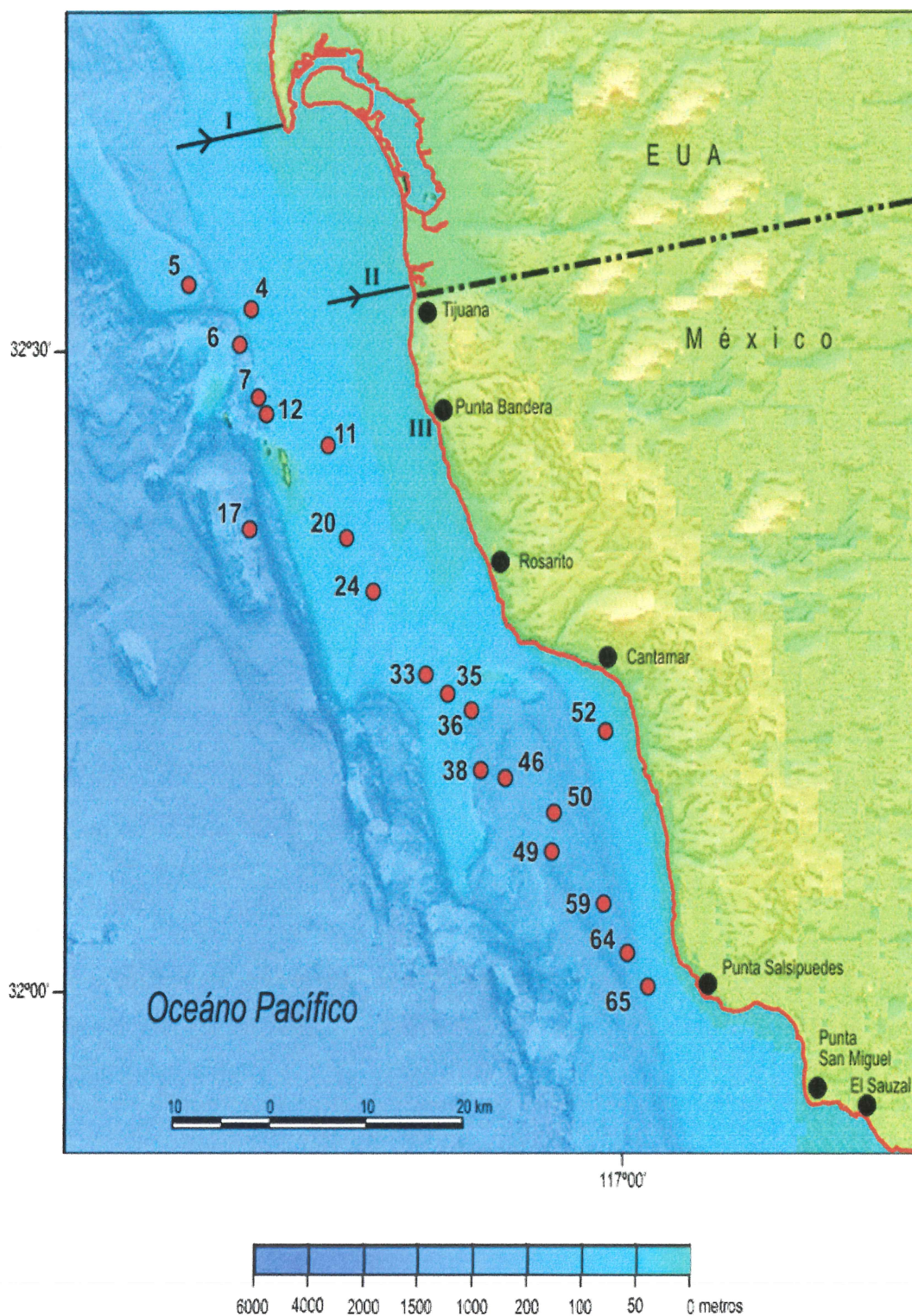


Figura 5. Área de estudio y estaciones de muestreo en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California y profundidad en metros, I emisor de la Planta de Tratamiento de Punta Loma, California, II emisor de la Planta Internacional de Tratamiento de Aguas Residuales, III Planta de Tratamiento de Punta Bandera.

aguas residuales, remueve el 80 % del total de sólidos suspendidos (TSS) y el 58 % de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). El efluente de las aguas residuales es descargado por gravedad y mediante un emisor submarino, en el océano a 4.5 millas de la costa (7.2 km) y a una profundidad de 97 metros de la superficie (Water Environment Federation, 2007).

La planta de tratamiento de Punta Bandera es de tipo secundario, descarga a cielo abierto sobre la línea de costa y a 9 km de la línea fronteriza México-Estados Unidos, $130 \times 10^6 \text{ L d}^{-1}$ de aguas residuales y una cantidad aproximada de 6000 toneladas de sólidos suspendidos anualmente (SCCWRP, 1989).

IV.2. Localización de las estaciones de muestreo

El área de estudio se encuentra en la región noroeste del estado de Baja California (Figura 5) y forma parte de la CSC. Se ubica entre los $32^\circ 32.94'$ y $32^\circ 00'$ de latitud Norte y los $117^\circ 19.85'$ y $116^\circ 54.09'$ de longitud Oeste. Se encuentra limitada al norte por la línea fronteriza México-Estados Unidos, al este por Playas de Tijuana y Rosarito, al sur con Punta Salsipuedes y al oeste con el Océano Pacífico. Las estaciones de muestreo se distribuyeron en la plataforma continental a aproximadamente 12 km de la línea de costa y con profundidades de hasta 283 metros.

IV.3. Colecta de sedimentos

La colecta de sedimentos superficiales en 20 estaciones de la costa noroccidental de Baja California (Figura 5), se realizó en diciembre de 2003, en un crucero oceanográfico abordo del buque Zuchiate de la Secretaría de Marina. La colecta de sedimentos se efectuó con una draga Van-Veen, tomando con espátulas estériles los primeros tres centímetros del centro de la draga. Los sedimentos para los análisis de DDT, tamaño de partícula y carbono orgánico fueron guardados en frascos de vidrio previamente descontaminados (con metanol y diclorometano grado pesticida y quemados a 400 °C durante 4 horas) y almacenados a -20 °C hasta su análisis en el laboratorio. Los sedimentos para la extracción de ADN se almacenaron a -80 °C y los utilizados para el análisis bacteriológico se guardaron en bolsas de plástico estériles para ser analizados de inmediato abordo del buque.

IV.4. DDT en sedimentos

El DDT fue analizado mediante la metodología de Wade *et al.* (1993) con algunas modificaciones. Para su extracción se colocaron 30 g de sedimento, peso seco, en un sistema Soxhlet con diclorometano y el estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno (TCMX) y decaclorobifenil (PCB-209) a una concentración de 100 ng mL⁻¹. La muestra se extrajo durante doce horas, posteriormente se concentró a 1 mL en baño de agua a 55 °C, el matraz se enjuagó tres veces con diclorometano, el lavado se transfirió a un tubo graduado para concentrar a un volumen de 1 mL con nitrógeno grado UAP y el solvente se intercambió por hexano. La separación y limpieza del extracto se hizo por cromatografía líquida, la fracción de los pesticidas obtenida fue

concentrada a 1 mL bajo un flujo de nitrógeno. Se le agregó el estándar interno (DBFBO) antes de ser inyectado al cromatógrafo de gases (HP-6890) acoplado a un detector de captura de electrones (GC/ECD), equipado con un automuestreador. Se utilizó una columna capilar de sílica fundida DB-XLB de 60 m de longitud, 320 μm de diámetro y 0.25 μm de espesor. La temperatura del horno consistió: inicio de 50 °C a 150 °C (15 °C min^{-1}), seguido de 250 °C (2 °C min^{-1}) y una final de 300 °C (5 °C min^{-1}), manteniéndose esta durante 25 minutos. El tiempo total de la corrida fue de 92.67 minutos y como gas acarreador se uso helio a una presión constante de 25 psi. La temperatura del inyector fue mantenida a 275 °C y la del detector a 325 °C.

La cuantificación se realizó por el método del estándar interno, con la ecuación siguiente:

$$C = A (\text{área}_{\text{analito}} / \text{área}_{\text{est surrogado}})^B (C_{\text{est interno}} / \text{peso}_{\text{muestra}}).$$

donde:

C= Concentración del analito

A= Constante

B= Constante

El control de calidad se llevó a cabo a través de blancos de procedimiento y muestras fortificadas. En cada juego de 10 muestras se incluyó un blanco de procedimiento y una muestra fortificada, a los cuales se les adicionó un estándar surrogado y de recuperación.

IV.5. Características del sedimento

El análisis de la distribución del tamaño de partícula se realizó en alícuota de sedimento seco de acuerdo a la metodología descrita en Daesslé *et al.* (2002), utilizando un analizador láser/tungsteno de partículas (Horiba LA-900) el cual mide el tamaño de partícula en el intervalo de 0.04-2000 μm . La medición de carbono orgánico se realizó con un analizador elemental LECO-CNHS 932. Previo a este análisis, los sedimentos fueron descongelados y secados en una estufa a 40 °C. Alícuotas de cada muestra fueron tratadas con HCl 6N para remover el carbono inorgánico, posteriormente se secaron a 80 °C, fueron pesadas y colocadas en contenedores para determinar el contenido de carbono orgánico.

IV.6. Bacterias en sedimento

Para efectuar el inmediato aislamiento de las bacterias, se inoculó 0.1 g de sedimento en 10 mL de medio Zobell a 28 °C durante 48 horas. Posteriormente las bacterias crecidas fueron aisladas en medio Agar Luria Bertani. De la estación 49, la cual presentó la mayor concentración de ΣDDT , se aislaron cuatro bacterias que fueron crecidas en medio sales mínimas con diferentes concentraciones de DDT (10-800 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Finalmente, la bacteria que presentó mayor crecimiento, fue identificada y ensayada en el medio sales mínimas y DDT (150 $\mu\text{g mL}^{-1}$). La cuantificación de bacterias sulfato reductoras se realizó mediante la técnica número más probable (NMP) descrita por U.S. Geological Survey (1977).

IV.7. Identificación de la cepa bacteriana aislada estación 49

Para identificar a la cepa bacteriana de mayor crecimiento aislada de los sedimentos de la estación 49, se realizaron las pruebas siguientes: Tinción Gram, cápsula, movilidad, crecimiento 0 % de NaCl, 3 % de NaCl, 6% de NaCl, crecimiento en TCB'S (Tiosulfato Citrato Bilis y Sacarosa), O/F glucosa (Oxidación o Fermentación), catalasa, oxidasa, arginina dihidrolasa, indol, gelatina y urea según metodología de la Secretaría de Salud (1992) y se compararon con la tabla de diagnóstico de Austin (1990). Adicionalmente se realizó un PCR-RFLP. La extracción del ADN, amplificación por PCR y análisis de restricción se realizaron según la metodología descrita por García-Ortega (1997) con algunas modificaciones.

La amplificación del 16S ADN_r fue realizado con los iniciadores universales 16S F: 5'-CCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 16S R: 5'-CGGGATCCACCTTGTACGACTTCACCC-3'. El volumen de la reacción fue de 50 µL con los componentes siguientes: amortiguador de PCR (10X) 5 µL, dNTP's (10 mM) 1 µL, iniciador 16S Forward (224 ng/µL) 0.5 µL, iniciador 16S Reverse (148 ng/ µL) 0.5 µL, MgCl₂ (50mM) 1.5 µL, agua desionizada estéril 38.9 µL, *Taq* polimerasa (5 U/µL) 0.1 µL, ADN (200 ng/µL) 2.5 µL. La reacción se realizó con un termociclador Apollo (Continental Lab Products) con las condiciones siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, alineamiento a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 2 minutos, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

La detección del producto de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) utilizando amortiguador TBE 1 X, se cargaron 5 µL de muestra en el gel y se aplicó una carga de 100 voltios durante 40 minutos. El producto amplificado por PCR fue digerido con la enzima *BstU* I, el volumen de la reacción fue de 40 µL con los componentes siguientes: agua desionizada estéril 25.4 µL, amortiguador para enzima (10X) 4 µL, producto PCR-16S ADN_r 10 µL, *BstU* I 0.6 µL. La mezcla fue colocada en un tubo de 0.5 mL y se incubó a 60 °C por 6 horas, fue enfriada en baño de hielo durante 5 minutos y se le agregaron 8 µL de colorante 5 X. Posteriormente, para observar los fragmentos generados se realizó una electroforesis en agarosa al 2.2 % a 100 voltios por 90 minutos, los cuales se compararon con un marcador de peso molecular de 100-2072 pares de bases (Invitrogen) y un estándar de *Vibrio harveyi*.

IV.8. Bioensayo de degradación del DDT con la cepa de *Vibrio* aislada

Se disolvieron 150 mg de DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano] (99 %) (Sigma-Aldrich) en 10 mL de acetona, se evaporó para formar cristales y se le agregó 1 L de un cultivo de *Vibrio* sp. aislado de los sedimentos de la estación 49, en su fase exponencial crecido en un medio de sales mínimas más 0.005 % de extracto de levadura. Con las sales siguientes: 4.0 g de NaNO₃, 1.5 g de KH₂PO₄, 0.005 g de FeCl₃, 0.2 g de MgSO₄, 0.01 g de CaCl₂ y 0.5 g de Na₂HPO₄ en un litro de agua destilada (pH 7.0). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 minutos. Se procedió de la misma manera para el control abiótico (medio sales mínimas más DDT sin bacterias) y control biótico (medio sales mínimas con bacterias sin DDT).

El cultivo del *Vibrio* y sus controles se incubaron en condiciones anaerobias y aerobias a 28 °C, durante noventa días, (agitación a 150 rpm) y se analizó la presencia de los metabolitos del DDT según metodología de Nadeau *et al.* (1994). A diferentes intervalos de tiempo (cada treinta días) se tomó una alícuota de 10 mL de cada sistema y se acidificaron con HCl 1 N para obtener un pH 3.0. Una vez ajustado el pH, las alícuotas se centrifugaron a 14,000 G durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un embudo de separación para su extracción con un volumen igual de diclorometano más 250 µL del estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno (TCMX) y decaclorobifenil (PCB-209) a una concentración de 400 ng mL⁻¹.

El producto de tres extracciones se colocó en un matraz bola y se evaporó aproximadamente a 0.5 mL en baño de agua, la cantidad obtenida se transfirió a un tubo graduado intercambiando el solvente por hexano grado plaguicida, el cual fue concentrado con N₂. Antes de ser inyectado al cromatógrafo de gases para determinar el DDT y sus productos de transformación se le agregó el estándar interno (DBFBO). El cromatograma que muestra los tiempos de retención de los estándares p,p'-DDE, o,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDD, p,p'-DDT y o,p'-DDT (Figura 6), sirvió de referencia para la identificación del DDT y sus metabolitos en el bioensayo.

IV.9. Tasas de crecimiento *Vibrio* sp.

Los experimentos de crecimiento fueron llevados a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad en dos condiciones de cultivo: un matraz conteniendo 200 mL de medio sales mínimas estéril más DDT y otro

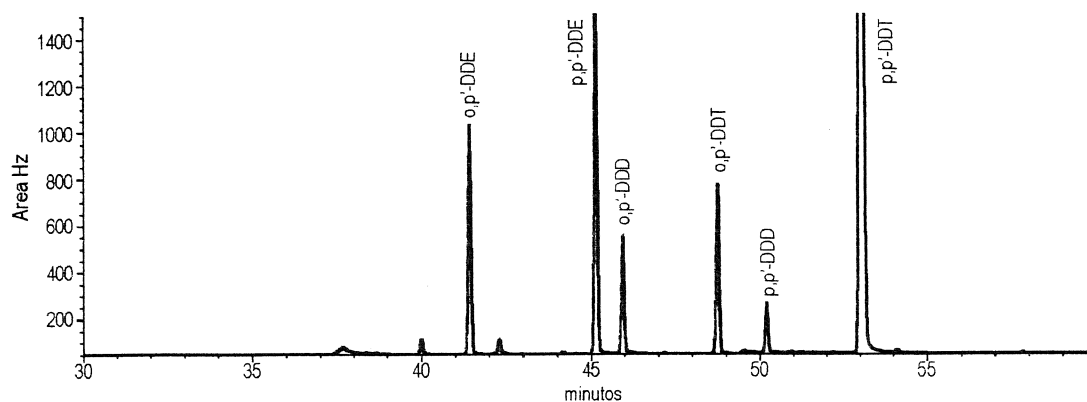


Figura 6. Cromatograma de los estándares empleados para DDT en sedimentos superficiales y bioensayo de *Vibrio* sp. **o,p'-DDE** = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano.

con sales mínimas como única fuente de carbono y energía. La incubación fue a 28 °C y 8 °C durante 96 horas con agitación a 150 rpm y en oscuridad.

IV.9.1. Conteo directo de *Vibrio* sp.

Se colocaron 10 mL del cultivo de *Vibrio* sp., en un vial estéril, la muestra se fijó con 250 µL de formaldehído al 40 % (con una concentración final del 2 %), se agitaron y almacenaron en refrigerador a 4 °C. Las muestras fueron filtradas utilizando submuestras de 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01 mL, tomando en cuenta la densidad bacteriana.

Se utilizaron filtros de polycarbonato negros y filtros de fibra de vidrio (GF/F) como soporte. Se tiñeron con colorante Dapi (4, 6,-diaminido-2-phenylindol) a una concentración final de 2 µg mL⁻¹ durante cinco minutos en oscuridad (Porter y Feig, 1980).

En un portaobjetos se colocó el filtro de polycarbonato negro con la muestra filtrada y encima una gota de aceite de inmersión de baja fluorescencia, posteriormente se colocó un cubreobjetos. Para el conteo (25-40 bacterias por campo), se utilizó un microscopio de epifluorescencia Axiovert 200, marca Carl Zeiss, utilizando una longitud de onda de excitación de UV, adaptado con una lámpara de 50 W. Las imágenes se tomaron con una cámara Olympus Dp70.

IV.9.2. Tasas de crecimiento específico de *Vibrio* sp.

La tasa de crecimiento específico (μ) se calculó a partir de un análisis de regresión lineal. Las concentraciones de bacterias obtenidas en el experimento fueron transformadas previamente con base al logaritmo natural y graficadas contra el tiempo, para obtener la ecuación siguiente:

$$y = mx + b$$

donde:

y= concentración final de bacterias

m= pendiente de la recta equivalente a la tasa de crecimiento específico

x= concentración inicial de bacterias

b= punto de intersección de la recta

IV.10. Gen de degradación del DDT

IV.10.1. Diseño de iniciadores

Se realizó una búsqueda entre las secuencias depositadas en el GenBank, encontrando en *Vibrio fischeri* ES114 el gen VFA0416 4,5 DOPA , el cual rompe el anillo aromático del DDT. La secuencia tiene un tamaño de 278 bases.

```
TTACTTTTTGTGAATATGCTTATATCAAGCTTAAGAGGTGTTCCAAGCCAAACGGCTGATTGAGTGTGG
TCAAGATATTCATCATCAGTTAATGGGTGAATAAGAATACTTAATCCATTTTGATGCAGAGTTAAATACG
TAAGTACTTCATCATAATTTCTTGTTAAATGAACTTGACGACTCCATACAGGATGCGGTCCTACTGG
TTTTTTATTAATGCGTCCTAATTCATAACCATACTCTTTATGTACGCTTTCGGTTAATGCGATGGCATAG
TCAATATTACTTTTCGTCAAAGTAAACATGGATATGATAACCATGGATATCTAATTGCGGCAT
```

A partir de esta secuencia se diseñaron los iniciadores Forward y Reverse, con ayuda del Software DNASTar, siendo adquiridos en la compañía IDT en San Diego California, y cuyas características se proporcionan en la Tabla I.

Tabla I.- Características de los iniciadores utilizados para la amplificación del Gen 4,5 DOPA.

Secuencia Iniciadores	TM	% G C	Posición
F AAGCCAAACGGCTGATTGAGTGTG	60 °C	50	46
R ATGCCATCGCATTAAACCGAAAGCG	60 °C	50	278

IV.10.2. Preparación de *Vibrio fischeri*

Se adquirió la bacteria *Vibrio fischeri* cepa ES114 de la colección ATCC (American Type Culture Collection) para utilizarla como microorganismo control. El liofilizado de la bacteria fue suspendido en medio peptona y crecida a 28 °C con agitación a 150 rpm durante 48 horas, posteriormente fue resembrada en Agar LB (Luria Bertani) para su almacenamiento a 4 °C.

IV.10.3. Extracción del ADN genómico

Se utilizaron cultivos en su fase exponencial de *Vibrio fischeri* y de *Vibrio* sp. aislado de la estación 49. La extracción se realizó mediante el Kit Wizard de Promega según instrucciones del fabricante. Para comprobar la extracción de ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparado con TBE (Tris Borato Edta) 0.5 X y 80 voltios durante 80 minutos.

El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador marca UVP a una longitud de onda de 260 nm. La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro modelo SmartSpec 3000 marca Biorad a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

IV.10.4. Extracción del ADN plasmídico

Previamente a la extracción del ADN, la bacteria *Vibrio* sp. fue crecida en caldo peptona a 28 °C con agitación a 150 rpm hasta su fase exponencial, posteriormente el ADN se extrajo mediante la utilización del Kit Wizard Plus SV Miniprep específico para la extracción del ADN plasmídico. Éste se basa en las diferencias con respecto a la forma y tiempo de desnaturalización y

renaturalización del ADN plasmídico con respecto al ADN genómico, los plásmidos al tener un tamaño menor pueden ser separados fácilmente del ADN genómico que son mayores y precipitan mas rápidamente.

El ADN producto de la extracción fue cargado en un gel de agarosa al 1 % preparado con TBE 0.5 X y sometido a electroforesis a 80 voltios durante 80 minutos. El gel fue teñido con bromuro de etidio y observado en un transiluminador marca UVP a una longitud de onda de 260 nm. Las mediciones del ADN plasmídico se realizaron con espectrofotómetro modelo SmartSpec 3000 marca Biorad a longitudes de onda de 260 y 280 nm.

IV.11. Amplificación del Gen por PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador modelo iCycler marca BIO-RAD. El volumen final de reacción fue de 50 μ L, las condiciones fueron las siguientes: amortiguador de PCR (10X) 5 μ L, dNTP's (10 mM) 0.5 μ L, iniciador Reverse (10 μ M) 0.602 μ L, iniciador Forward (10 μ M) 0.681 μ L, $MgCl_2$ (50 mM) 2 μ L, agua desionizada 39.82 μ L, *Taq* polimerasa (5 U/ μ L) 0.4 μ L y 1 μ L de ADN molde. Para el ADN plasmídico se utilizó 1.0 ng y para el genómico 50 ng, como control positivo se utilizó el ADN genómico de *Vibrio fischeri* y como control negativo agua desionizada estéril.

Para determinar las condiciones óptimas de alineamiento, se realizó un PCR de gradiente con las condiciones siguientes: ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento en un intervalo

de temperatura de 58-68 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

Los amplicones fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparado con TBE 0.5 X y 80 voltios durante 80 minutos, posteriormente fueron visualizados con bromuro de etidio en transiluminador a 260 nm. Una vez establecidas las condiciones de alineamiento, se realizó un PCR con las condiciones siguientes: ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, alineamiento a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

IV.12. ADN en sedimento

IV.12.1. Extracción de ADN en sedimento

El sedimento fue tratado con nitrógeno líquido, se molieron en un mortero hasta convertirlo en partículas finas, las cuales se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. Para la extracción del ADN total se utilizó el método Fast DNA Spin Kit for Soil del laboratorio Qbiogene. Este se basa en la acción conjunta de lisis alcalina con SDS y mecánica con partículas de cerámica y sílice, mediante un proceso de fuerte agitación. Después de la extracción del ADN y para evitar la inhibición de su amplificación en el PCR por sustancias húmicas, fue purificado mediante la utilización del paquete comercial Clean DNA Wizard de Promega.

IV.12.2. Amplificación de ADN en sedimento

La región V6 del 16S ARNr del ADN total de los sedimentos fue amplificada mediante PCR utilizando un termociclador iCycler marca BIO-RAD. Se utilizaron los iniciadores universales Com 1 5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3' y Com 2 5' CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3' correspondientes a las posiciones 519 a 926 del gen 16S ARNr de *Escherichia coli*.

Las reacciones de PCR se realizaron en 50 µL de volumen conteniendo: amortiguador de PCR (10X) 5 µL, dNTP's (10 mM) 1 µL, 1 µL (10 µM) de cada iniciador, MgCl₂ (50 mM) 1.5 µL, agua desionizada estéril 39 µL, *Taq* polimerasa (5 U/µL) 0.5 µL, ADN (25 ng/µL) 1 µL. Los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa al 1 % preparado con TBE 0.5 X y sometidos a electroforesis a 80 voltios durante 80 minutos, siendo visualizados con bromuro de etidio en transiluminador a 260 nm.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, alineamiento a 50 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 10 minutos.

IV.13. SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple)

La técnica de SSCP se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Tebbe *et al.* (2001), Schmalenberger y Tebbe (2003). El ADN amplificado previamente por PCR fue digerido con 10 U de la enzima lambda exonucleasa (Amersham Pharmacia Biotech) a 37 °C durante 45 minutos, posteriormente

fue purificado con el Kit Clean DNA Wizard de Promega. La muestra de ADN libre de proteínas se resuspendió en 8 μ L de 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 8 μ L de amortiguador de carga desnaturizante (95 % v/v formamida, 10 mM NaOH, 0.025 % p/v, xylene cyanol), fue incubada a 95 °C por dos minutos y enfriada en hielo durante tres minutos.

El ADN de una sola hebra (10 μ L) se cargó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante preparado con amortiguador TBE estándar 0.5 X con acrilamida: bis-acrilamida al 12 %, TEMED 0,035 % (v/v), persulfato de amonio 0,07 % (p/v), y glicerol 5 %. Como control de referencia se utilizó un marcador de ADN 16S ARNr de cadena sencilla. Para la electroforesis se utilizó el sistema Dcode (BIO-RAD) con amortiguador de corrimiento TBE concentración 1 X, a una temperatura de 20 °C y un voltaje de 400 voltios durante 16 horas.

Las bandas fueron teñidas según metodología de Basaam *et al.* (1991). El gel de poliacrilamida fue fijado en una solución de ácido acético glacial al 10 % en agua desionizada durante treinta minutos con agitación lenta. Posteriormente, se colocó en una charola, protegido de la luz, con 560 mL de solución de nitrato de plata durante treinta minutos y se enjuagó con agua destilada durante veinte segundos. Una vez teñido se cambió a otra charola la cual contenía 600 mL de solución de revelado con tiosulfato de sodio al 0.2 %. El gel fue agitado durante algunos minutos para visualizar las bandas de ADN y fotografiado en escáner, siendo editado en el programa Adobe PhotoShop.

IV.13.1. Corte y elución de las bandas SSCP

Se cortaron las bandas predominantes, con un bisturí estéril y se incubaron durante 12 horas a 6 °C en 25 µL de agua desionizada estéril. Posteriormente se utilizó 1 µL del sobrenadante como ADN molde para su reamplificación por PCR con los iniciadores universales Com 1 5' CAGCAGCCGCGGTAATAC 3' y Com 2 5' CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3'.

IV.13.2. Purificación del producto de PCR

Los amplicones derivados de las bandas SSCP, fueron sometidos a electroforesis en agarosa al 1 %. Con una navaja estéril se cortó únicamente el gen 16S ARNr, eliminando los dímeros, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para ser purificados por centrifugación con el Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System según instrucciones del fabricante.

IV.14. Secuenciación

Se utilizó un secuenciador ABI 310 de la compañía Applied Biosystems, la cual se realizó en el Laboratorio IDT en San Diego, California.

IV.15. Análisis estadísticos

IV.15.1. Características del sedimento

Previo al análisis estadístico, realizado con el Programa Statistica Versión 6.0, los datos fueron transformados a la forma Log_{10} de la concentración. Se realizaron análisis de correlación Producto-Momento de Pearson para buscar las posibles asociaciones entre las diferentes variables medidas Σ DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, % de partículas <63 µm, % carbono orgánico y bacterias reductoras de sulfato (BRS). Para

identificar el grado de similitud entre estaciones de muestreo y entre distribuciones espaciales de las variables medidas, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (Hierarchical clustering). Adicionalmente, para explorar la covariancia de las variables, se realizó un análisis de factores.

V.15.2. Bandas de ADN

A partir del patrón de bandas de la electroforesis (SSCP) se calculó el coeficiente de similitud de Sorensen $C_j = 2j/(a+b)$ donde:

a= número de bandas en columna a

b= número de bandas en columna b

j = número de bandas iguales en a y b.

A partir de la matriz de coeficientes de similitud de Sorensen y para identificar las asociaciones entre las estaciones se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando el Programa Estadístico UPGMA Primer 5 (Clarke y Gorley, 2006).

IV.15.3. Árboles filogenéticos

Las secuencias fueron depuradas y ensambladas (secuencias F y R) utilizando el Programa Chromas Pro (versión 1.33). Se inspeccionó la posible presencia de secuencias quiméricas utilizando el programa Check Chimera ubicado en el portal de Ribosomal Data Project. Las secuencias obtenidas experimentalmente fueron alineadas con las secuencias homólogas reportadas en el GenBank, mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Las secuencias finales se alinearon y se compararon con secuencias obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante el programa Clustalw versión 1.8.2.

Se generó una matriz bajo el criterio de distancias nucleotídicas utilizando el modelo de Tamura Nei, que es el que mejor se ajusta a los datos de las secuencias estudiadas. Se aplicó el programa MODELTEST para determinar cual modelo de los 56 probables se ajustan mejor los datos y a partir de la matriz de distancias se construyó el árbol con el análisis de Neighbor Joining, utilizando el programa PAUP 4.0 y una de las secuencias reportadas como Outgroup. Una vez construido el árbol mediante el cálculo de las distancias genéticas (NJ), se procedió a realizar el robustecimiento estadístico mediante un análisis de bootstrap el cual calcula el porcentaje de veces que la topología observada ocurre, posterior a 1000 replicas (iteraciones). Utilizando el programa MEGA versión 2.1 debido a que el análisis de bootstrap es exhaustivo, valores por encima del 50 %, indican una alta robustez del árbol.

V. RESULTADOS

V.1. Características del sedimento

V.1.1 DDT

La concentración de DDT y sus metabolitos en los sedimentos costeros se presentan en la Tabla II y Figura 7. El promedio de la concentración Σ DDT fue de 0.425 ng g^{-1} con un valor máximo de 4.78 ng g^{-1} en la estación 49 y un valor no detectado (ND) en la estación 36. El p,p'-DDT y p,p'-DDD presentaron mayor frecuencia, ya que se encontraron en la mitad de las estaciones de muestreo. En contraste el DDE que se presentó en menor número de estaciones, mostró las concentraciones más altas, en las estaciones 49 y 17 con valores de p,p'-DDE de 3.91 ng g^{-1} y 0.79 ng g^{-1} respectivamente.

El promedio del porcentaje de carbono orgánico en los sedimentos costeros de la costa noroccidental de Baja California fue de 0.65 % (Tabla III) con un valor máximo de 1.74 % en la estación 64 y un valor mínimo de 0.03 % en la estación 4. El porcentaje de partículas $<63 \mu\text{m}$ fue del 46 % y varió entre un mínimo de 4.6 % y un máximo de 78.0 %, encontrándose en las estaciones 7 y 38 respectivamente. Con respecto a las BRS la concentración promedio fue de 49 NMP 100 gr^{-1} , con un valor máximo de 140 NMP 100 gr^{-1} en la estación 59 y valores mínimos $<18 \text{ NMP } 100 \text{ gr}^{-1}$ en las estaciones 4, 7, 11, 36 y 65.

Tabla II. Concentración de DDT (ng g^{-1}) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. ND=no detectado, LD= límite de detección.

Estación	p,p'-DDE	o,p'-DDE	p,p'-DDT	o,p'-DDT	p,p'-DDD	o,p'-DDD	Σ DDT
4	ND	ND	0.07	ND	ND	ND	0.07
5	ND	ND	ND	ND	0.03	ND	0.03
6	ND	ND	0.10	ND	0.10	ND	0.20
7	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	0.01
11	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	0.02
12	ND	ND	ND	ND	0.07	0.01	0.08
17	0.79	ND	0.30	ND	ND	ND	1.09
20	ND	ND	0.07	ND	ND	ND	0.07
24	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	0.01
33	ND	ND	0.37	ND	0.07	ND	0.44
35	ND	ND	0.22	ND	ND	0.01	0.23
36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38	ND	ND	ND	ND	0.18	0.06	0.24
46	ND	ND	0.08	ND	ND	0.01	0.09
49	3.91	0.25	0.30	0.05	0.18	0.09	4.78
50	ND	ND	ND	ND	0.02	ND	0.02
52	ND	ND	ND	ND	0.04	0.01	0.05
59	ND	ND	ND	ND	0.19	0.05	0.24
64	ND	ND	ND	ND	0.04	0.01	0.05
65	0.71	ND	0.07	ND	ND	ND	0.78
LD	0.004	0.005	0.007	0.007	0.007	0.007	_____

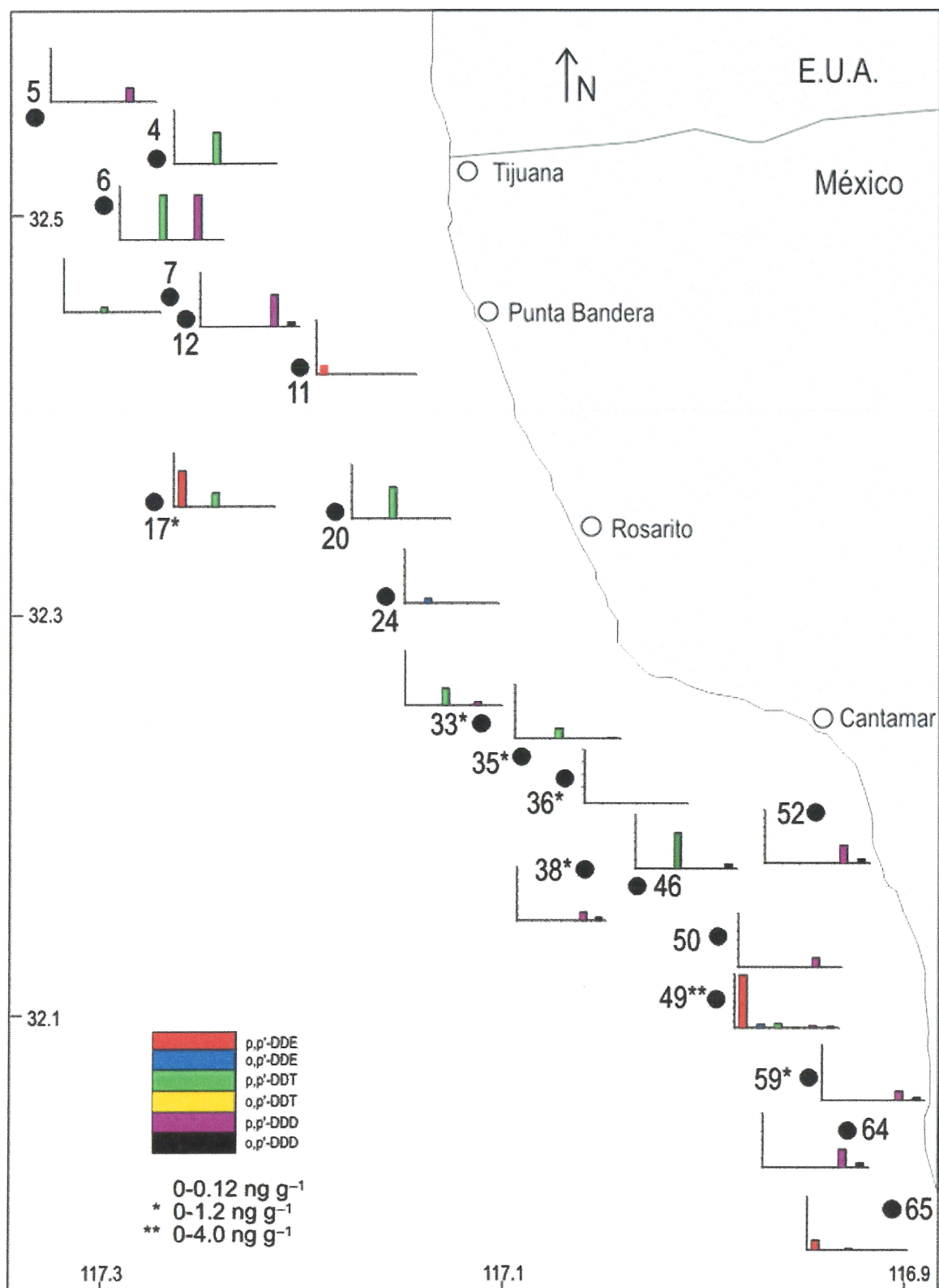


Figura 7. Distribución de DDT (ng g⁻¹) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California.

Tabla III. Concentración de carbono orgánico (%), partículas <63 μm (%), bacterias reductoras de sulfato (NMP 100 g^{-1}) y profundidad (metros) en sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California.

Estación	Carbono orgánico (%)	Partículas <63 μm (%)	Bacterias reductoras de sulfato (NMP 100 g^{-1})	Profundidad (metros)
4	0.03	27.2	<18	63
5	0.81	41.3	45	117
6	0.99	60.3	78	189
7	0.11	4.6	<18	43
11	0.05	24.2	<18	23
12	0.12	15.8	78	38
17	0.59	59.0	18	86
20	0.24	21.9	18	41
24	0.17	9.7	18	48
33	1.23	76.7	40	61
35	0.47	57.0	20	79
36	0.83	64.8	<18	128
38	0.53	78.0	130	230
46	0.50	59.7	20	283
49	1.71	72.9	110	270
50	0.55	56.8	68	270
52	0.08	20.4	68	38
59	1.51	69.9	140	230
64	1.74	63.9	45	180
65	0.74	45.5	<18	252

Los resultados muestran que el p,p'-DDE y el p,p'-DDT correlacionaron significativamente ($p < 0.05$) con el porcentaje de las partículas $< 63 \mu\text{m}$ ($r = 0.98$ y 0.90 , respectivamente) (Tabla IV). Por otra parte, el p,p'-DDE correlacionó significativamente ($p < 0.05$) con el porcentaje de carbono orgánico ($r = 0.99$) y los metabolitos p,p'-DDD y o,p'-DDD lo hicieron con las BRS ($r = 0.75$).

El análisis de correlación entre las variables ΣDDT , porcentaje de partículas $< 63 \mu\text{m}$, CO (%) y BRS en las muestras de sedimento (Tabla V), señala que ΣDDT correlacionó significativamente ($p < 0.05$) y de manera positiva con el porcentaje de partículas $< 63 \mu\text{m}$ y con el porcentaje de carbono orgánico ($r = 0.66$ y 0.56 , respectivamente). Con respecto a las BRS el análisis muestra una correlación significativa y también positiva con el porcentaje de carbono orgánico ($r = 0.52$). Por otra parte, el dendograma de similitud muestra claramente que la distribución del p,p'-DDD y o,p'-DDD en el área de estudio se encuentra fuertemente asociada con la concentración de BRS y que la ΣDDT se asocia mayormente a sus metabolitos y a las BRS (Figura 8).

Tabla IV. Matriz de correlación Producto-Momento de Pearson entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) significativas ($p < 0.05$), p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDD, partículas $< 63 \mu\text{m}$, CO % = porcentaje de carbono orgánico, BRS = bacterias reductoras de sulfato, N = número de datos

	% Partículas $< 63 \mu\text{m}$	CO (%)	BRS	N
p,p'-DDE	0.98*	0.99*	0.72	4
p,p'-DDT	0.90*	0.63	0.57	10
p,p'-DDD	0.37	0.30	0.75*	10
o,p'-DDD	0.57	0.54	0.75*	8

Tabla V. Matriz de correlación Producto-Momento de Pearson entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) significativas ($p < 0.05$), Σ DDT, % partículas $< 63 \mu\text{m}$, CO % = porcentaje de carbono orgánico. BRS = bacterias reductoras de sulfato, (N = 19).

	Σ DDT	Partículas $< 63 \mu\text{m}$	CO (%)	BRS
Σ DDT	1			
Partículas $< 63 \mu\text{m}$	0.66*	1		
CO (%)	0.56*	0.72*	1	
BRS	0.29	0.47	0.52*	1

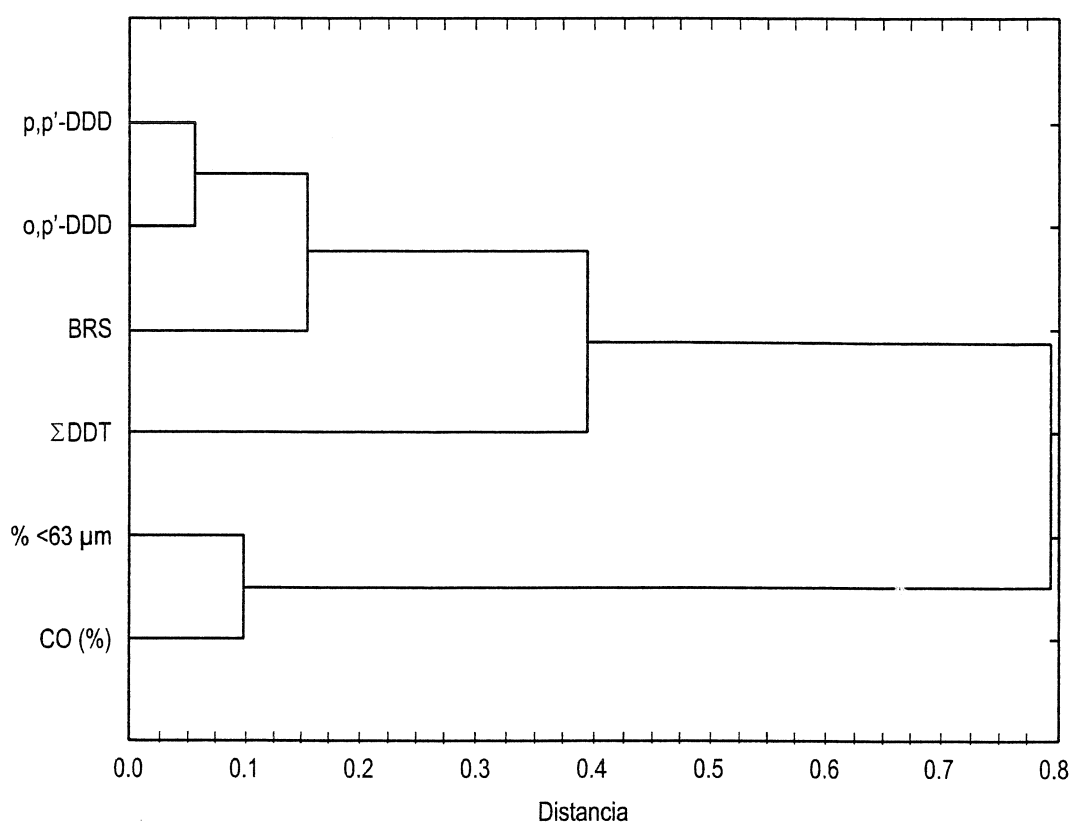


Figura 8. Dendrograma de similitud de las variables medidas en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. **CO %** = porcentaje de carbono orgánico, **% < 63 μm** = porcentaje de partículas <63 μm, **ΣDDT**= dicloro difenil tricloroetano, **BRS** = bacterias reductoras de sulfato, **o,p'-DDD** = orto, para, dicloro difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para, dicloro difenil dicloroetano.

En la Tabla VI se describen las variables estudiadas en función de dos factores, los cuales explican el 92 % de la varianza del comportamiento de las variables. El Factor 1 (F1) representa la asociación entre Σ DDT, sus metabolitos p,p'-DDD y o,p'-DDD y las BRS. Por otro lado, el Factor 2 (F2) muestra la asociación entre el porcentaje de carbono orgánico y el porcentaje de partículas <63 μ m.

V.1.2 SSCP (polimorfismo de conformación de cadena simple)

La electroforesis con el patrón de bandas derivada del análisis de SSCP se observa en la Figura 9. En general las estaciones ubicadas al sur del área de estudio (E33 a E65) presentaron mayor número de bandas que las ubicadas al norte (E4 a E24). Las bandas que tuvieron una mayor distribución fueron la 52A y 65B, encontrándose en casi todas las estaciones de muestreo, mientras que las que presentaron la menor fueron 11C (E11), 35A (E35) y 59A (E59).

Las bandas 52B y 65A se encontraron únicamente en la parte sur del área de estudio (E33 a E65), en contraste con la 4A la cual se detectó en E4, E7, E11, E17, E20, E24, E33, E35 y E59.

El dendograma UPGMA basado en distancias a partir del patrón de bandas del SSCP se observa en la Figura 10.

Tabla VI. Análisis de Factores entre las variables medidas en muestras de sedimento superficial de la costa noroccidental de Baja California. (*) Significativas ($p < 0.05$), p,p'-DDD, o,p'-DDD, Σ DDT, (%) partículas $< 63 \mu\text{m}$, CO % = porcentaje de carbono orgánico. BRS= bacterias reductoras de sulfato, (N= 19).

	Factor 1	Factor 2
p,p'-DDD	0.93*	0.32
o,p'-DDD	0.87*	0.48
Σ DDT	0.74*	0.42
% partículas $< 63 \mu\text{m}$	0.34	0.90*
CO (%)	0.16	0.97*
BRS	0.97*	0.034
Varianza explicada	3.24	2.27
Proporción de la varianza explicada	0.54	0.38

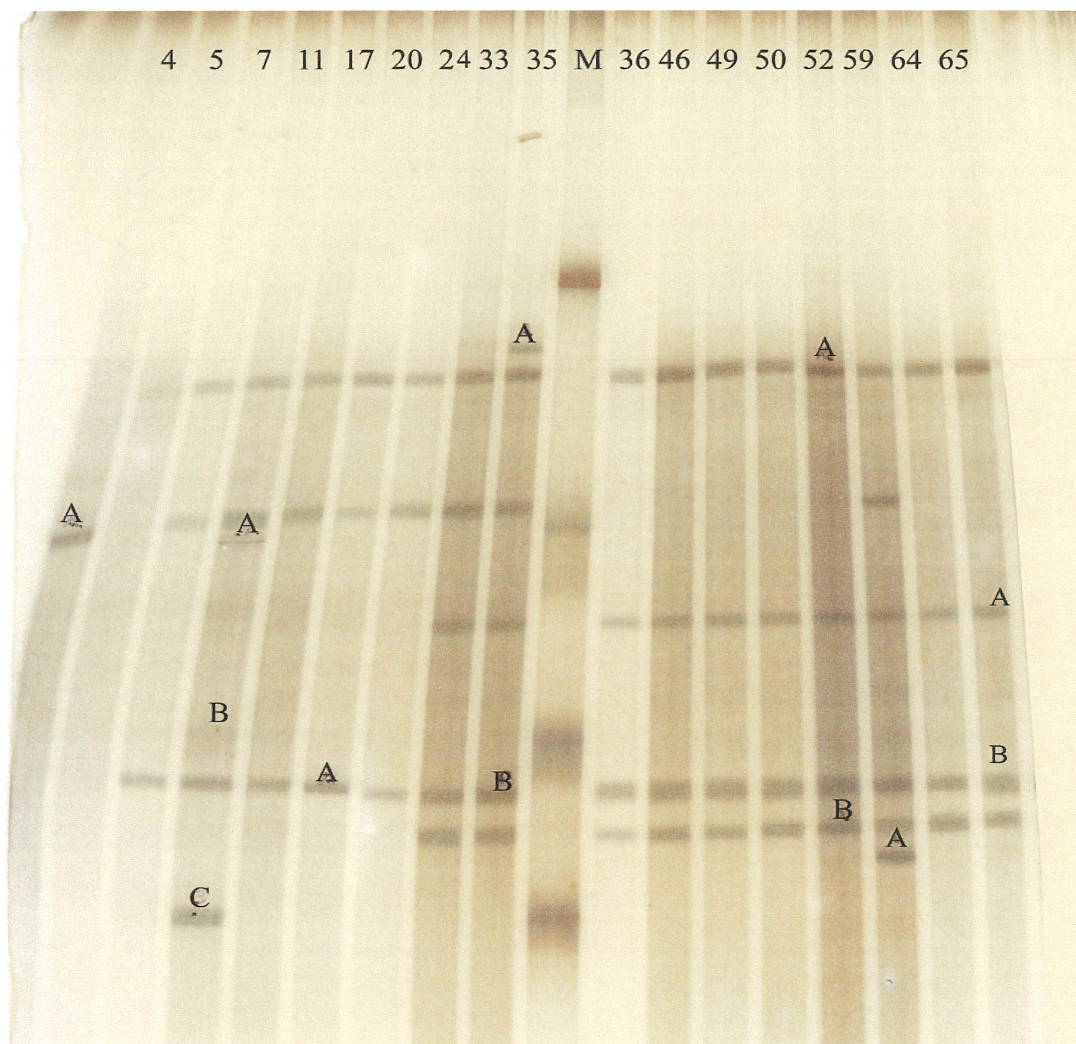


Figura 9. Perfil de SSCP de genes parciales de 16S ARNr en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. Los números indican las estaciones de muestreo, las letras en los carriles las bandas secuenciadas y M= estándar, de arriba hacia abajo *Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Agrobacterium tumefaciens*.

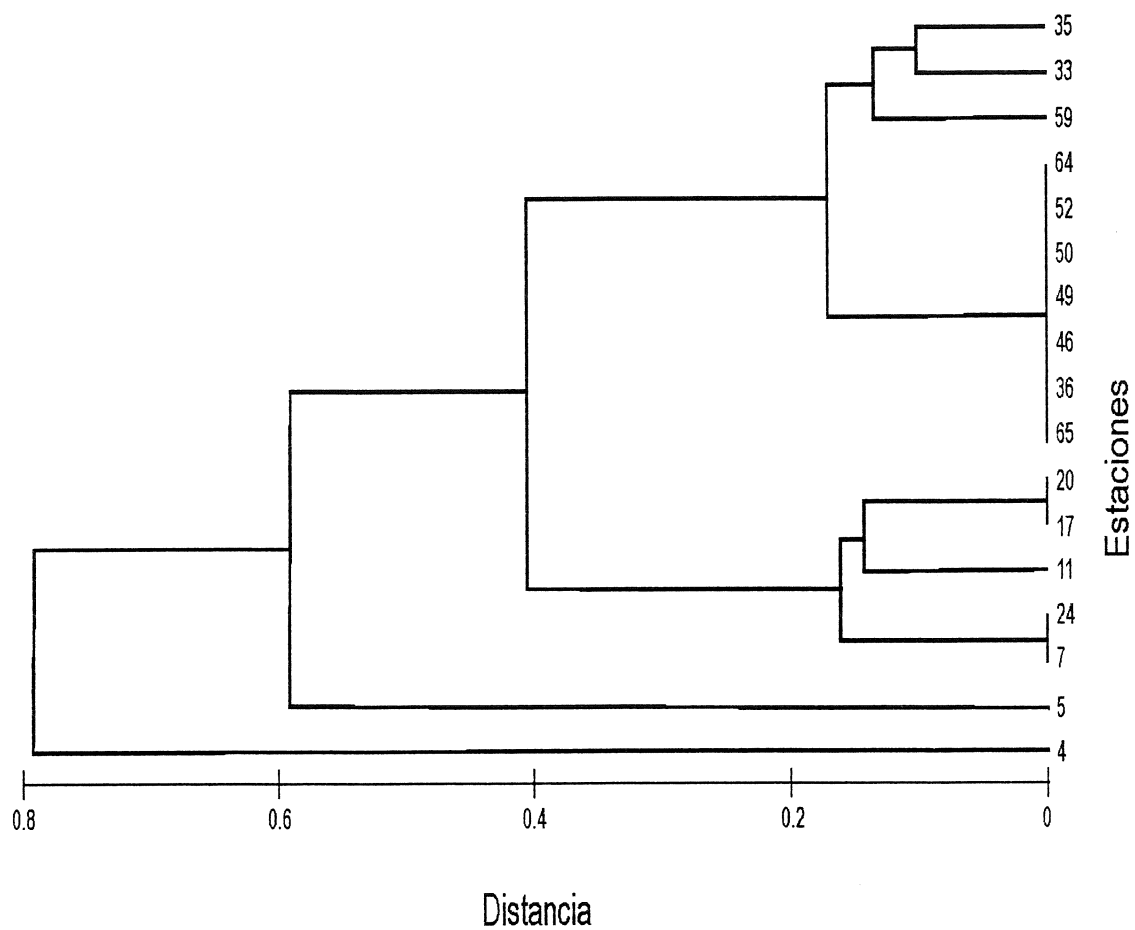


Figura 10. Dendrograma UPGMA a partir de los índices de similitud de Sorensen entre las estaciones de muestreo de sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California.

El análisis mostró tres grupos 1) E33, E35, E36, E46, E49, E50, E52, E59, E64 y E65, 2) E7, E11, E17, E20 y E24 y 3) E4 y E5. El primer grupo mostró una menor distancia, debido a que las estaciones de muestreo presentaron el mismo patrón de bandas, concordando con el análisis de Sorensen en el cual se encontró una mayor similitud entre las estaciones 33 a 65 (Tabla VII).

V.1.3 Identificación de Bandas

La identificación de las bandas detectadas en el SSCP se observan en la Tabla VIII. Se encontraron siete bandas pertenecientes al Dominio Bacteria y una al Archea. El primer dominio quedó integrado por los Phylum Proteobacteria (59.4 %), Bacteroidetes (25 %) y Cyanobacteria (15.6 %), mientras que en el Dominio Archea se incluyó únicamente un representante no clasificado.

Dentro del Phylum Proteobacteria se encontraron bacterias pertenecientes a tres clases: bandas 35A (género *Desulfobulbus*) y 52A (no clasificada) integrantes de las Delta Proteobacteria, 65A (no clasificada) de las Gamma Proteobacteria y 59A (género *Sulfurovum*) perteneciente a las Epsilon Proteobacterias.

En el Phylum Bacteroidetes se encontraron dos bandas, la 65B de la Familia Flavobacteriaceae y la 52B no clasificada. Dentro del Phylum Cyanobacteria se encontró una bacteria (11C) no clasificada, mientras que en el Dominio Archea se encontró solamente una bacteria (4A), no clasificada.

Tabla VII. Coeficientes de similitud de Sorensen entre las bandas obtenidas mediante SSCP. Los números en la primera columna y en la primera fila indican las estaciones de muestreo.

	4	5	7	11	17	20	24	33	35	36	46	49	50	52	59	64	65
5	0	1															
7	0.5	0.5	1														
11	0.4	0.4	0.86	1													
17	0.5	0.5	0.66	0.86	1												
20	0.5	0.5	0.66	0.86	1	1											
24	0.5	0.5	1	0.86	1	1	1										
33	0.3	0.3	0.75	0.67	0.75	0.75	0.75	1									
35	0.3	0.3	0.66	0.60	0.67	0.67	0.67	0.9	1								
36	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1							
46	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1						
49	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1	1					
50	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1	1	1				
52	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1	1	1	1			
59	0.3	0.5	0.66	0.6	0.67	0.67	0.67	0.9	0.83	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	1		
64	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1	1	1	1	0.8	1	
65	0	0.4	0.57	0.5	0.57	0.57	0.57	0.89	0.8	1	1	1	1	1	0.8	1	1

Tabla VIII. Taxonomía de las bandas obtenidas en SSCP

Banda	Dominio	Phylum	Clase	Orden	Familia	Género
4A	Archea	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
11C	Bacteria	Cianobacteria	Cianobacteria	N.C	N.C	N.C
35A	Bacteria	Proteobacteria	Delta Proteobacteria	Desulfobacterales	Desulfobulbaceae	<i>Desulfobulbus</i>
52A	Bacteria	Proteobacteria	Delta Proteobacteria	N.C.	N.C.	N.C.
52B	Bacteria	Bacteroidetes	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
59A	Bacteria	Proteobacteria	Epsilon Proteobacteria	Campylobacterales	Helicobacteriaceae	<i>Sulfurovum</i>
65A	Bacteria	Proteobacteria	Gama Proteobacteria	N.C.	N.C.	N.C.
65B	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	N.C.

N.C: No clasificado.

V.1.4 Árbol filogenético

El análisis de las relaciones filogenéticas de las secuencias del 16S ARNr obtenidas del SSCP se observan en la Figura 11. El árbol filogenético muestra 4 grupos definidos: grupo I integrado por representantes de los Phyla Bacteroidetes y Cyanobacteria, grupo II el cual comprende bacterias del Phylum Proteobacteria (clases Delta y Gamma Proteobacterias). Grupo III que incluye bacterias del Phylum Proteobacteria (clase Epsilon Proteobacterias) y Grupo IV de las Aquificales no cultivables.

El grupo I quedó integrado por las secuencias 11C, 52B y 65B las cuales muestran diferente grado de relación filogenética. La 11C se relacionó a la AY711833 reportada en el GenBank como una cianobacteria y con la AF523902 que corresponde a una bacteria no cultivable. Se relacionó también, aunque distantemente con las secuencias 52B y 65B encontradas en este trabajo y con las AY822228 y AJ704701 secuencias pertenecientes a bacterias no cultivables del Phylum Bacteroidetes, igualmente con las AM259872 y AY177723 clasificadas dentro de la familia Flavobacteriaceae, mientras que la secuencia 52B se relacionó con las reportadas en el GenBank AY822228 y AJ704701 que corresponden a bacterias del Phylum Bacteroidetes así como con la 65B de este trabajo y con las secuencias AM259872 y AY177723 de la familia Flavobacteriaceae.

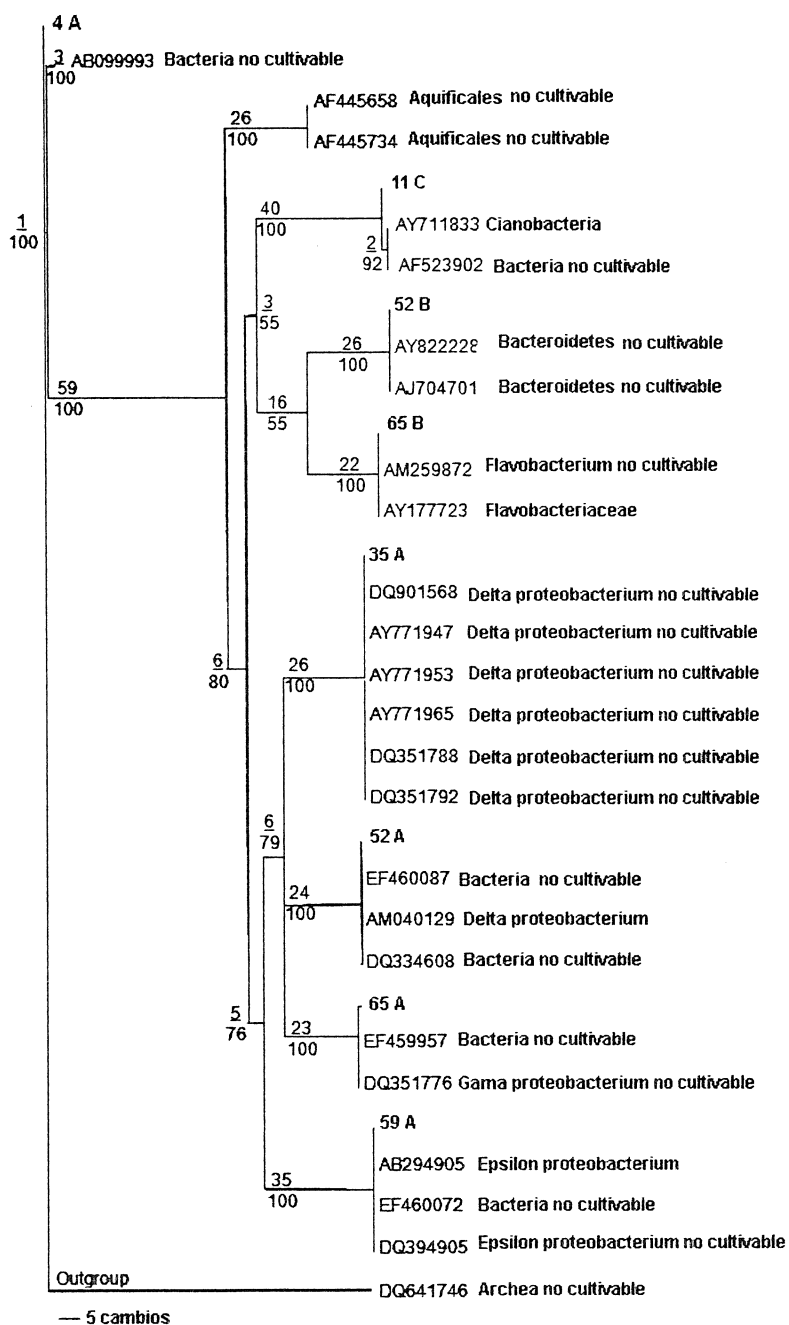


Figura 11. Árbol filogenético construido por Neighbor-Joining a partir de la secuencia parcial del 16S ARNr de bacterias del sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California y de las disponibles en el GenBank. Los valores de Bootstrap superiores a 50 % obtenidos de un total de 1000 réplicas (valor de Bootstrap=1000), se muestra en las ramas del árbol. El árbol tiene como raíz a Archea no cultivable DQ641746.

El grupo II incluyó a las secuencias 35A, 52A y 65A. La secuencia 35A se relacionó con un grupo numeroso de Delta y Gama Proteobacterias reportadas en el GenBank entre ellas DQ901568, AY771947, AY771953, AY771965, DQ351788 y DQ351792. Además, se encuentra relacionada distantemente con las secuencias 52A y 65A encontradas en este trabajo y con las Delta y Gama Proteobacterias EF460087, AM040129, DQ334608, EF459957 y DQ351776. Con respecto a las otras dos secuencias de este grupo 52A y 65A se relacionaron con EF460087, AM040129, DQ334608, EF459957 y DQ351776 respectivamente.

El grupo III quedó integrado únicamente por la secuencia 59A la cual se relacionó con las reportadas AB294905, EF460072 y DQ394905, pertenecientes al grupo de las Epsilon Proteobacterias y bacterias no cultivables. Esta secuencia además, se relacionó distantemente con el Grupo II de las Delta Proteobacterias y Gama Proteobacterias.

El grupo IV incluye a la secuencia 4A, la cual se relacionó con AB099993 la cual corresponde a una bacteria no cultivable, también se relaciona aunque distantemente con las secuencias AF445658 y AF445734 las cuales corresponden a bacterias no cultivables del grupo de las Aquificales.

V.2 Identificación de la bacteria aislada estación 49

Las características de la bacteria aislada en los sedimentos de la estación 49 se proporcionan en la Tabla IX. Es Gram negativa en forma de bacilo (Figura 12), móvil, sin cápsula, con crecimiento en el medio TCB'S y con 3 y 6 % de cloruro de sodio. Los resultados más relevantes de las pruebas bioquímicas indican que es oxidasa negativa, catalasa positiva. Además, presentó el mismo patrón de fragmentos de restricción (104, 125, 182, 228, 340 y 550 pb) que la cepa control *Vibrio harveyi* (Figura 13), por lo que se le identificó como del género *Vibrio*.

V.3 Tasas de crecimiento específico

Los promedios de las tasas de crecimiento específico ($\mu \text{ d}^{-1}$) y tiempos de duplicación g (h) para *Vibrio* sp. en los medios de cultivo utilizados a las temperaturas de 28 y 8 °C se proporcionan en la Tabla X. Las mayores tasas de crecimiento se presentaron a los 28 °C (0.6912 y 0.5640 d^{-1}) en los medios sales mínimas más DDT y sales mínimas respectivamente, las que corresponden a tiempos de generación de 34.72 y 42.55 horas. Las menores tasas de crecimiento específico se presentaron a la temperatura de 8 °C (0.4296 y 0.3216 d^{-1}) en los medios sales mínimas más DDT y sales mínimas respectivamente, las que corresponden a tiempos de generación de 55.87 y 74.63 horas.

Tabla IX. Características de la bacteria aislada en el sedimento de la estación 49 de la costa noroccidental de Baja California. *SS (Secretaría de Salud), **NR= No Reportada.

Ensayo	Resultado	<i>Vibrio harveyi</i> (Austin, 1990;*SS, 1992)
Tinción Gram	-	-
Cápsula	-	**NR
Movilidad	+	+
Crecimiento 0 % NaCl	-	-
Crecimiento 3 % NaCl	+	+
Crecimiento 6 % NaCl	+	+
Crecimiento en TCB'S	+	+
O/F glucosa	F	F
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-/+
Arginina dihidrolasa	-	-
Indol	-	-
Gelatina	+	+
Urea	-	-/+

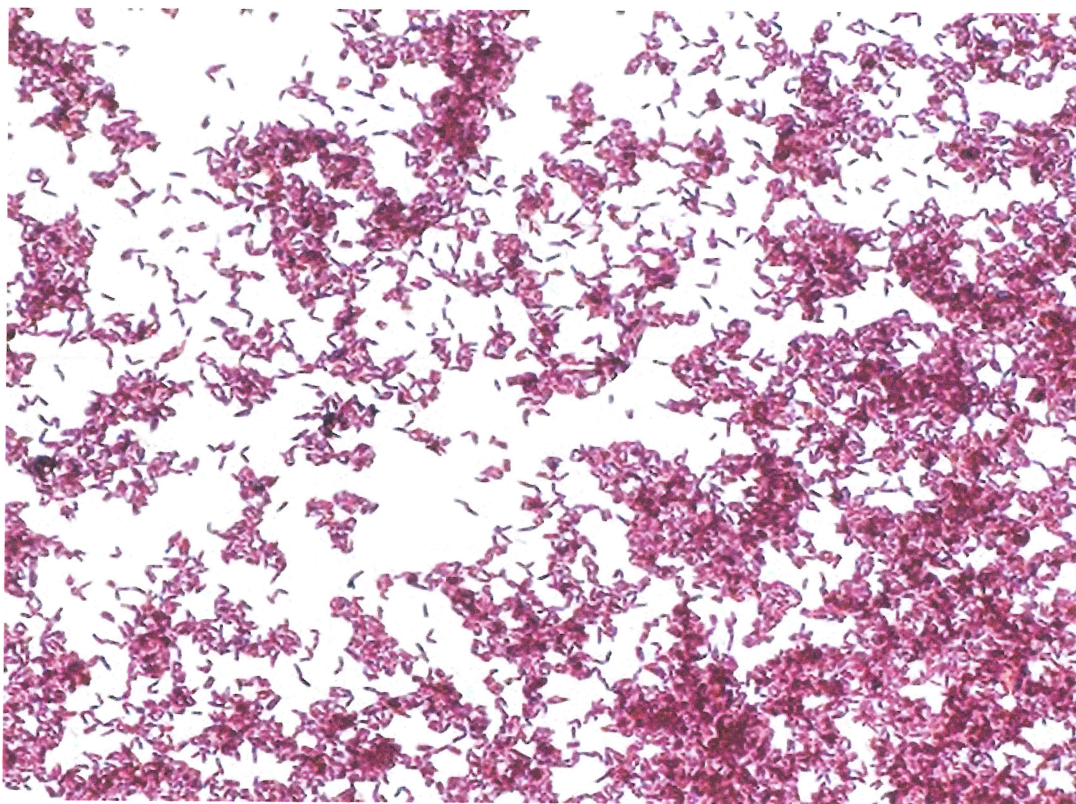


Figura 12. Morfología y Tinción Gram de la bacteria *Vibrio* sp. aislada de sedimento superficial de la estación 49.

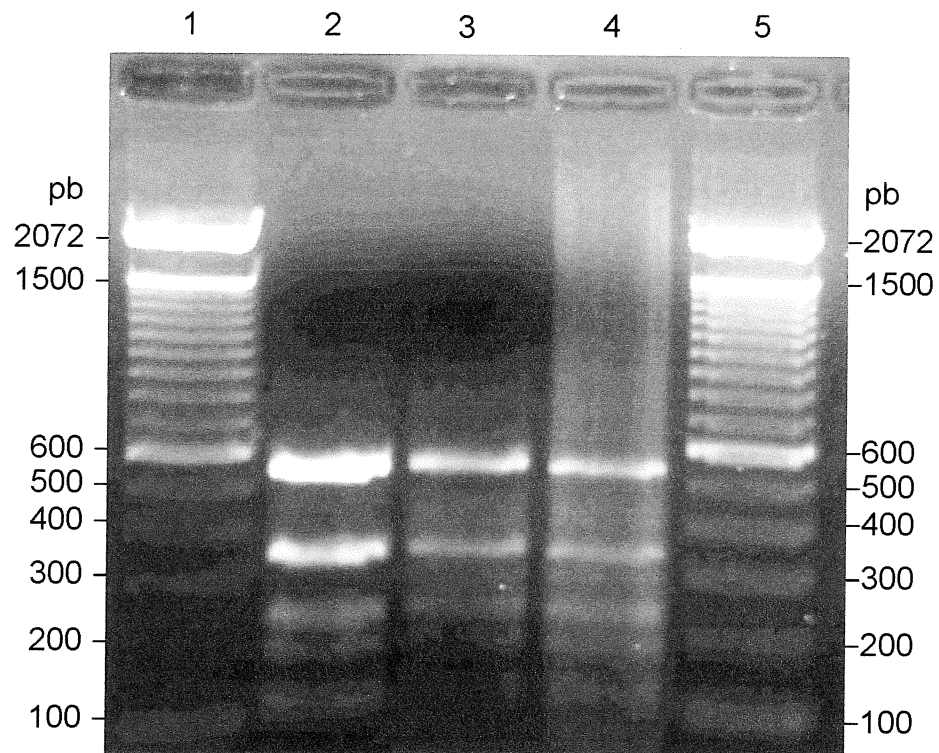


Figura 13. RFLP carriles 1 y 5 marcador de peso molecular, carril 2 *Vibrio harveyi*, carriles 3 y 4 *Vibrio* sp. aislado de sedimento superficial de la estación 49.

Tabla X. Tasas de crecimiento específico (μ) promedio, desviación estándar, tiempo de duplicación promedio (g) y ecuación de regresión de *Vibrio* sp. en medio sales mínimas y medio sales mínimas más DDT en condiciones aerobias.

Medio	Temperatura	$\mu \text{ d}^{-1}$	Desviación estándar	g (h)	$y = mx + b$
Sales mínimas	28 °C	0.5640	0.0637	42.55	$0.0235x + 14.344$
	8 °C	0.3216	0.0436	74.63	$0.0134x + 14.963$
Sales mínimas más DDT	28 °C	0.6912	0.1010	34.72	$0.0288x + 12.425$
	8 °C	0.4296	0.0291	55.87	$0.0179x + 12.118$

V.4 Bioensayo de *Vibrio* sp.

V.4.1 Cromatogramas

Los controles sin inocular conteniendo medio sales mínimas con DDT, desde el tiempo inicial hasta los noventa días de incubación en forma aerobia se observan en la Figura 14 y la anaerobia en la Figura 15.

En el tiempo inicial (Figura 14) se detectaron las señales del DDT (p,p'-DDT y o,p'-DDT) y sus metabolitos DDE (p,p'-DDE) y DDD (p,p'-DDD), pero las concentraciones se mantuvieron más o menos constantes hasta los 3 meses de incubación.

Los controles inoculados con *Vibrio* sp. y crecidos en el medio sales mínimas sin DDT en condiciones aerobias y anaerobias se observan en la Figura 16, en ninguno de ellos se detectó la señal del DDT o sus metabolitos de transformación.

Los cromatogramas del ensayo realizado con *Vibrio* sp. en el medio sales mínimas más DDT en condiciones aerobias así como los porcentajes de áreas relativas del DDT y sus metabolitos se observan en las Figuras 17 y 18 y Tabla XI. En el tiempo inicial (Figura 17a) se detectaron cuatro señales a los 53.044; 50.196; 48.752 y 45.140 minutos de tiempo de retención que corresponden a p,p'-DDT, p,p'-DDD, o,p'-DDT, y p,p'-DDE respectivamente. La señal mas grande y con un mayor porcentaje de área relativa correspondió al p,p'-DDT (88 %) mientras que la menor correspondió al p,p'-DDD (2.20 %).

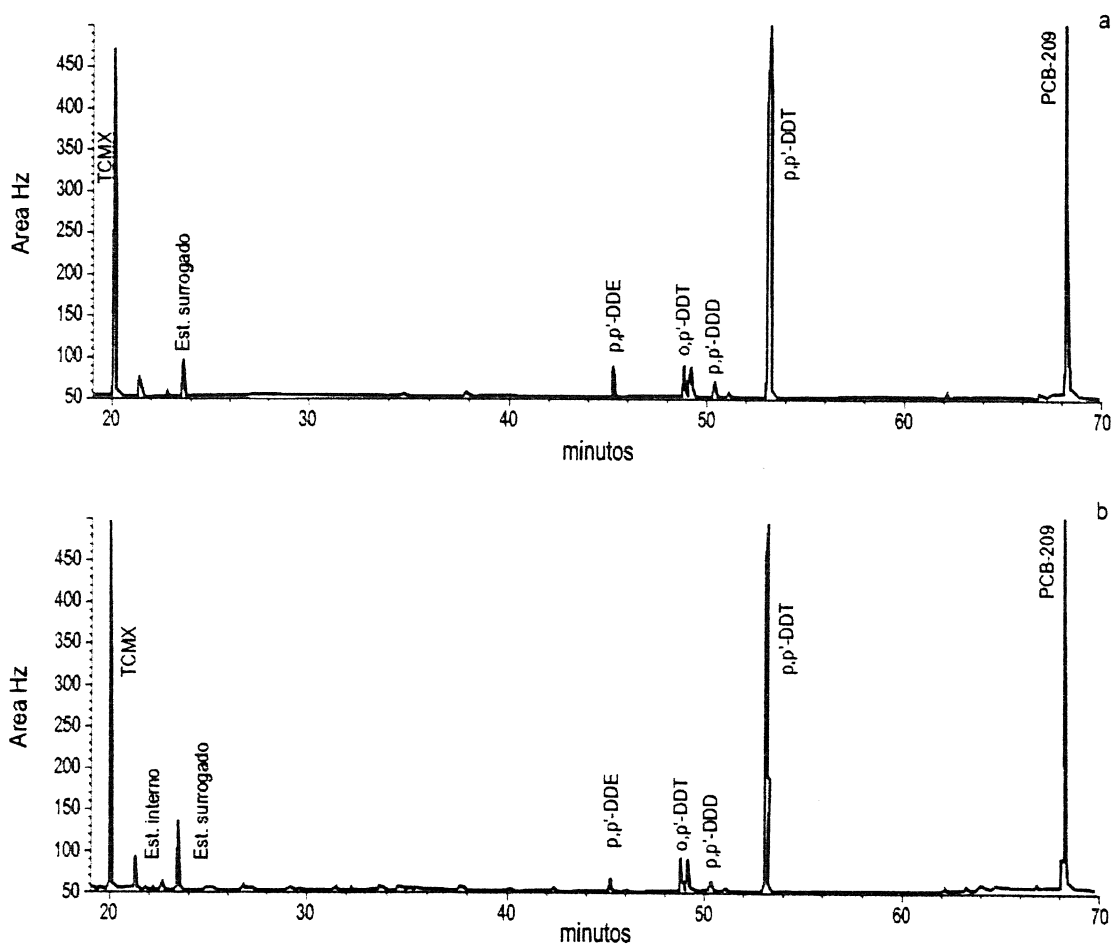


Figura 14. Control abiótico con DDT aerobio, a) Inicial, b) 90 días. **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDD**= para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

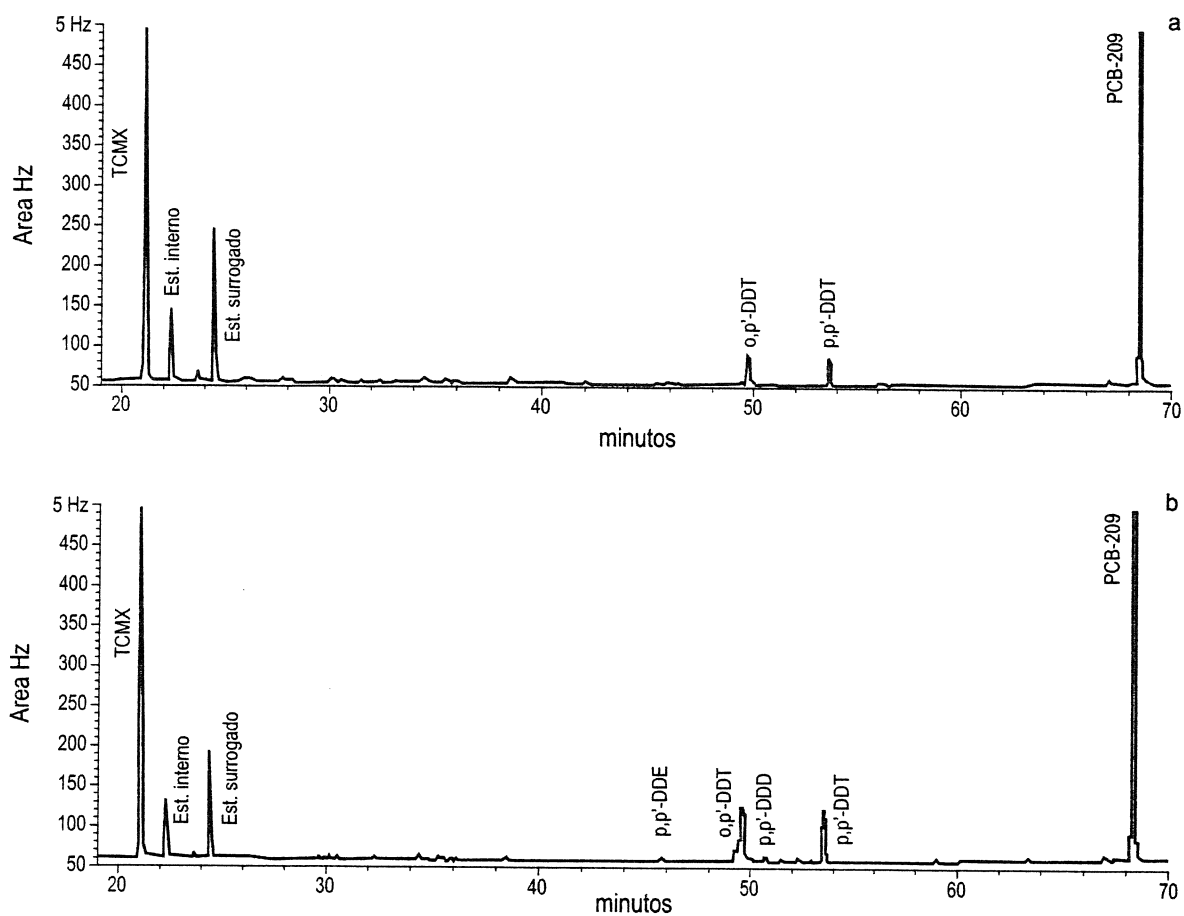


Figura 15. Control abiótico con DDT anaerobio, a) Inicial, b) 90 días. **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

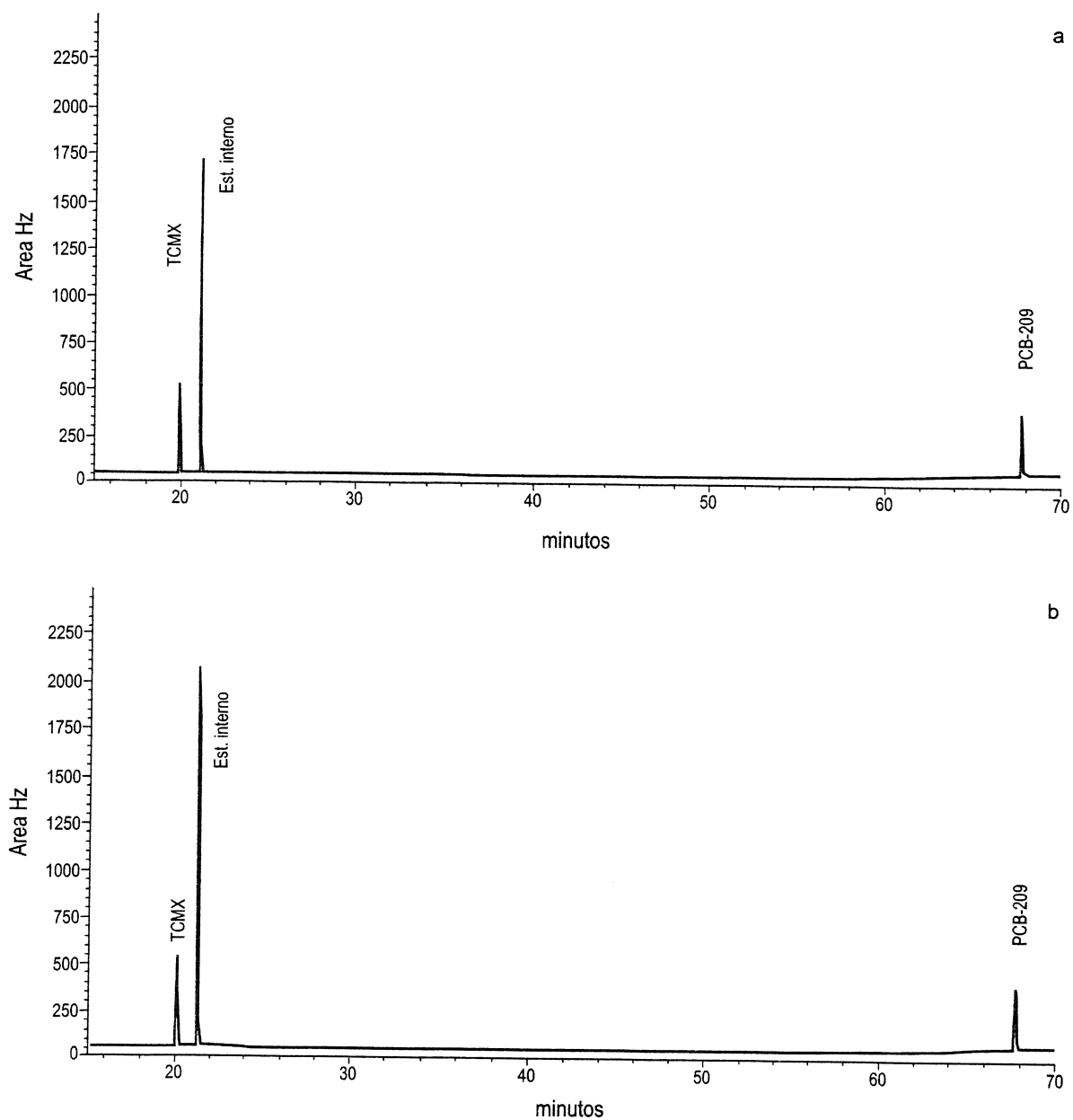


Figura 16. Control biótico sin DDT, 90 días: **a)** aerobio, **b)** anaerobio. **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

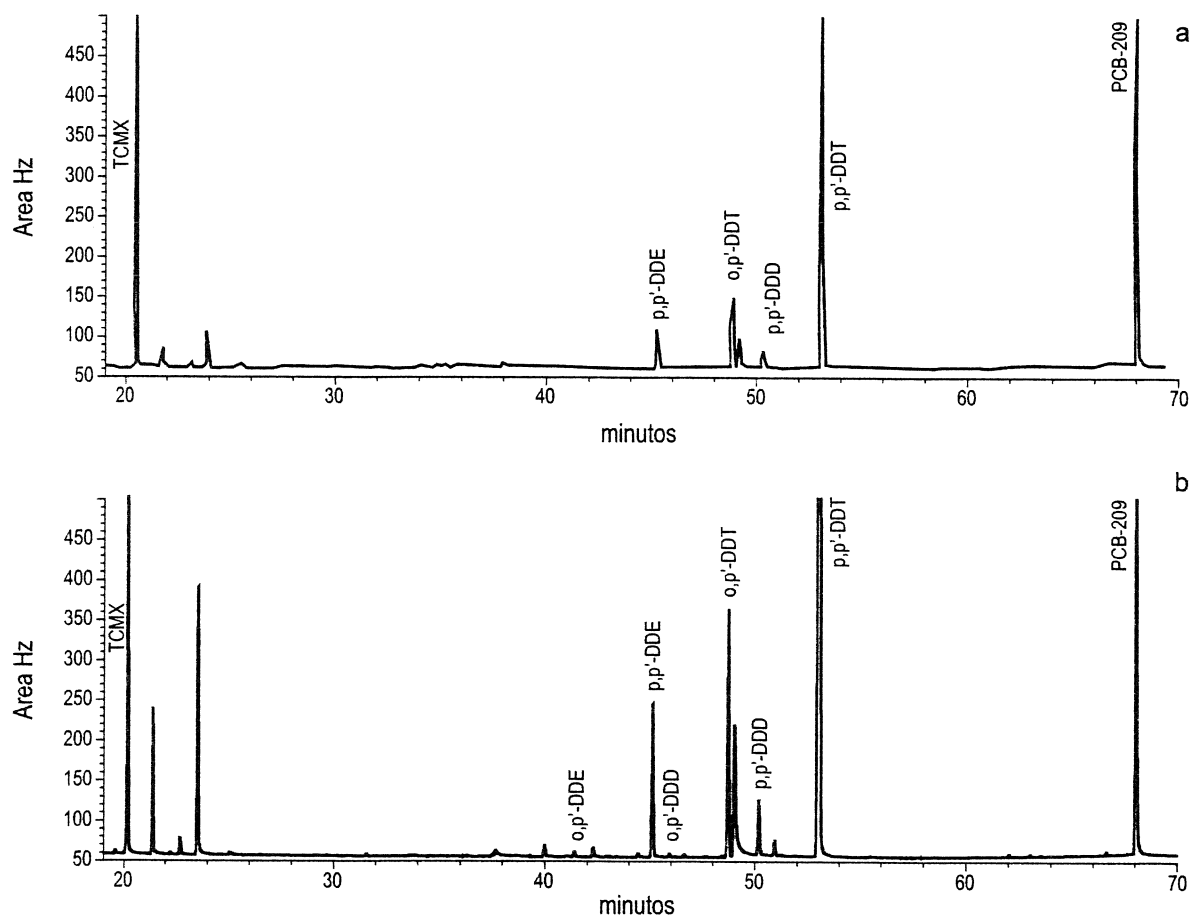


Figura 17. Cromatograma bioensayo aerobio, a) Inicial, b) 30 días. **o,p'-DDE** = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

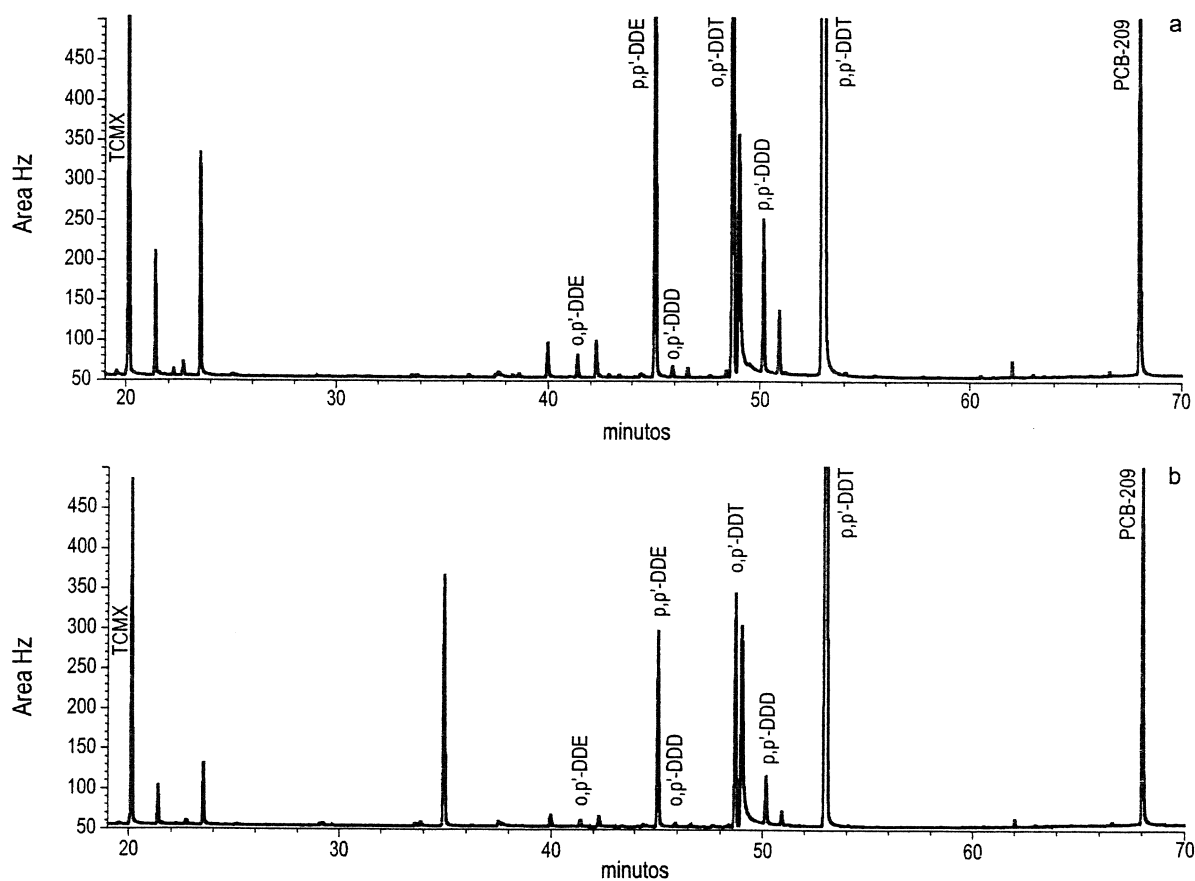


Figura 18. Cromatograma bioensayo aerobio, a) 60 días, b) 90 días. **o,p'-DDE** = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

Tabla XI. Porcentaje de área relativa de DDT en bioensayo aerobio con *Vibrio* sp.
o,p'-DDE = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano.

Etapas	o,p'- DDE	p,p'- DDE	o,p'- DDD	p,p'- DDD	o,p'- DDT	p,p'- DDT
Inicial	-----	4.20	-----	2.20	5.65	88.00
30 días	0.14	4.41	0.10	1.60	7.79	85.97
60 días	0.15	4.42	0.08	1.09	7.63	86.00
90 días	0.19	5.92	0.11	1.47	7.34	84.96

A partir de los treinta días de incubación (Figura 17b) se detectaron además de los anteriormente mencionados una señal a los 41.40 minutos de tiempo de retención, el cual corresponde al o,p'-DDE y otra a los 45.93 minutos de tiempo de retención correspondiente al o,p'-DDD. El porcentaje de las áreas relativas del p,p'-DDT (85.97 %) y p,p'-DDD (1.60 %) fueron menores que en el tiempo inicial, mientras que el del o,p'-DDT (7.79 %) y p,p'-DDE (4.41 %) fueron mayores.

Los cromatogramas del bioensayo con *Vibrio* sp. en el medio sales mínimas más DDT en condiciones anaerobias así como los porcentajes de áreas relativas se observan en las Figuras 19 y 20, Tabla XII. En el tiempo inicial se detectaron las señales de los metabolitos p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE y p,p'-DDD (Figura 19a). El mayor pico de absorción y mayor porcentaje de área relativa se detectó para el p,p'-DDT (85.66 %), y el menor para el p,p'-DDD (2.52 %). A partir de los sesenta días de incubación se detectaron dos señales: una a los 41.40 minutos de tiempo de retención, que correspondió al o,p'-DDE y otra a los 45.93 minutos de tiempo de retención correspondiente al o,p'-DDD (Figura 20a). Estos presentaron un porcentaje de área relativa de 0.43 y 0.36 respectivamente, los cuales se incrementaron a 1.97 % y 1.12 % respectivamente a los noventa días de incubación (Figura 20b).

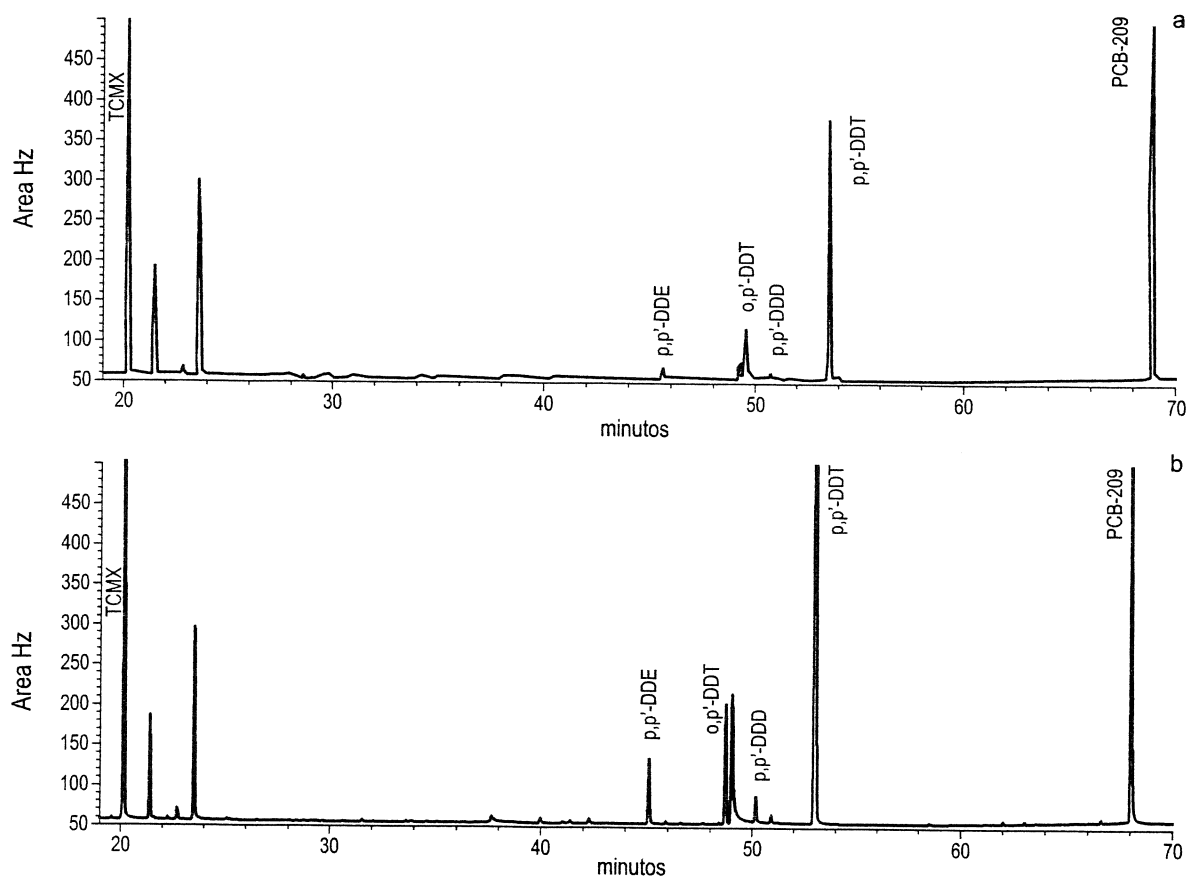


Figura 19. Cromatograma bioensayo anaerobio, **a)** Inicial, **b)** 30 días, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

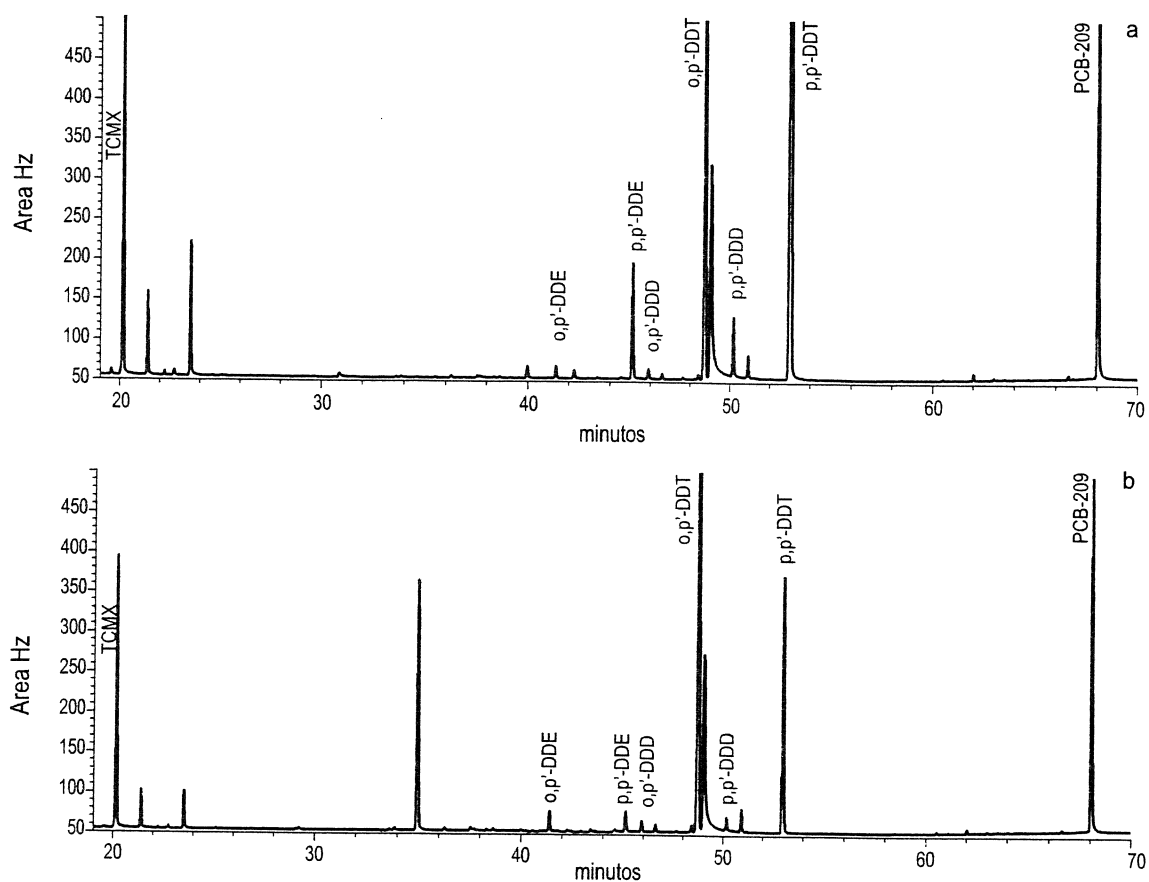


Figura 20. Cromatograma bioensayo anaerobio, a) 60 días, b) 90 días. **o,p'-DDE** = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano, **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano, **TCMX** = estándar de recuperación 2,4,5,6,-tetracloro-m-xileno, **PCB-209** = decaclorobifenil.

Tabla XII. Porcentaje de área relativa de DDT en bioensayo anaerobio con *Vibrio* sp. **o,p'-DDE** = orto, para dicloro-difenil etileno, **p,p'-DDE** = para, para dicloro-difenil etileno, **o,p'-DDD** = orto, para dicloro-difenil dicloroetano **p,p'-DDD** = para, para dicloro-difenil dicloroetano, **o,p'-DDT** = orto, para dicloro difenil tricloroetano, **p,p'-DDT** = para, para dicloro difenil tricloroetano.

Etapas	o,p'-DDE	p,p'-DDE	o,p'-DDD	p,p'-DDD	o,p'-DDT	p,p'-DDT
Inicial	-----	4.20	-----	2.52	7.61	85.66
30 días	-----	4.09	-----	1.73	7.79	83.39
60 días	0.43	3.85	0.36	2.07	18.24	75.04
90 días	1.97	1.98	1.12	1.29	68.62	25.02

El porcentaje de área relativa del p,p'-DDT disminuyó de 85.66 % en el tiempo inicial a 25.02 % a los noventa días de incubación, mientras que el o,p'-DDT se incrementó de 7.61 a 68.62 % durante el mismo periodo. Con respecto a las áreas relativas del p,p'-DDD y p,p'-DDE presentaron variaciones con incrementos y disminuciones. El porcentaje de recuperación del estándar interno fue de 101 % $\pm$ 5.

V.5 Amplificación del Gen 4,5 DOPA

Los iniciadores empleados F AAGCCAAACGGCTGATTGAGTGTG y R ATGCCATCGCATTAACCGAAAGCG amplificaron un fragmento de 233 pb correspondiente al Gen VFA0416 4,5, DOPA a partir de ADN molde de la bacteria control *Vibrio fischeri* (Figura 21).

Las temperaturas de alineamiento (58-68 °C) ensayadas en el PCR de gradiente mostraron ser adecuadas para su amplificación, aunque se obtuvo una mejor resolución de la banda a 60.5 °C en los carriles 9-11.

Los resultados de la electroforesis del PCR realizado con el ADN plasmídico y genómico de *Vibrio* sp. aislado de la estación 49 se observan en la Figura 22. Esta bacteria mostró tener el Gen VFA0416 4,5 DOPA a nivel plasmídico, ya que su ADN fue amplificado con los iniciadores específicos anteriormente mencionados observándose la misma banda de 233 pb que la bacteria control *Vibrio fischeri*.

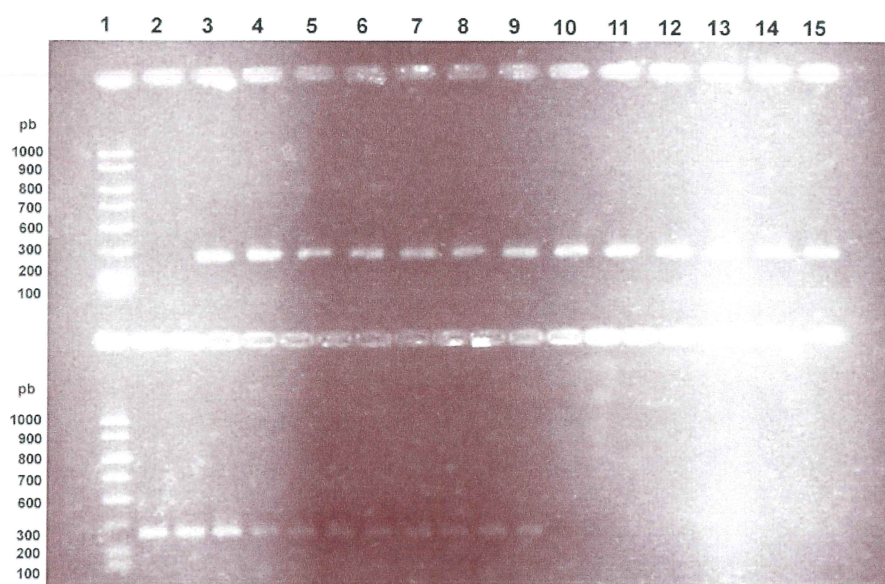


Figura 21. Amplificación del Gen 4,5 DOPA a diferentes temperaturas de alineación (58-68 °C) por triplicado. Arriba: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo, carril 3-15 ADN *Vibrio fischeri*. Abajo: carril 1 marcador de peso molecular, carril 2-9 ADN *Vibrio fischeri*.

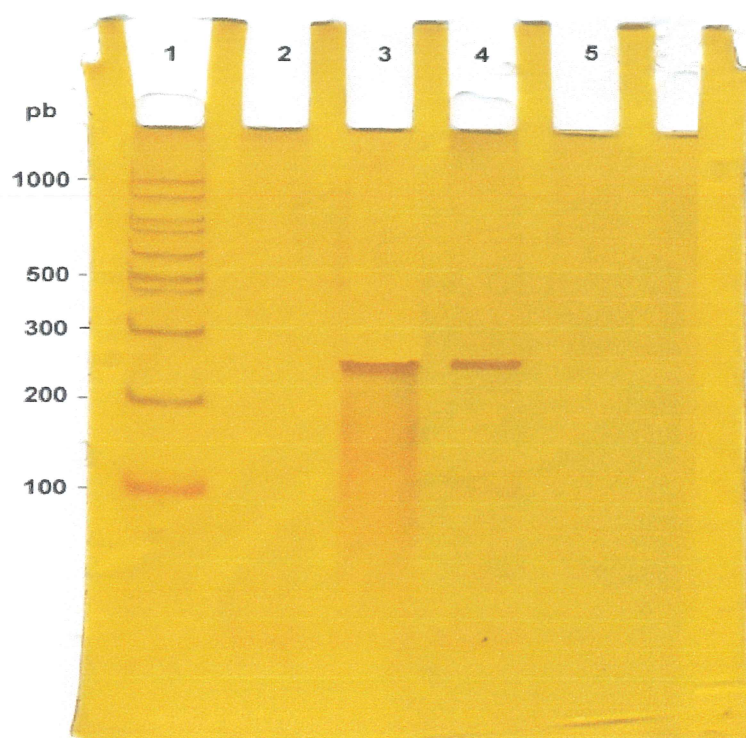


Figura 22. Amplificación del Gen 4,5 DOPA en *Vibrio* sp. aislado de sedimento superficial de la estación 49. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo *Vibrio fischeri*, carril 4 ADN plasmídico *Vibrio* sp., carril 5 ADN cromosómico *Vibrio* sp.

En la investigación realizada con *Vibrio* sp. no se detectó el Gen VFA0416 4,5 DOPA en el genoma, posiblemente porque existen variaciones interespecíficas entre *Vibrio fischeri* y la bacteria ensayada sin embargo, las condiciones de temperatura (60 °C) de alineación en el PCR, así como las concentraciones de los constituyentes químicos en la reacción (dNTP's, cloruro de magnesio, amortiguador, *taq* polimerasa) mostraron ser adecuadas para la amplificación de éste gen en *Vibrio fischeri*.

V.6. Extracción y amplificación del ADN en sedimento

La electroforesis del ADN total bacteriano del sedimento marino extraído con el Fast ADN Spin for Soil de Qbiogene se observa en la Figura 23. Las mayores intensidades de banda (mayor concentración de ADN) ocurrieron en las estaciones 20 a 65, mientras que las menores correspondieron a las estaciones 4 a 17.

La electroforesis del ADN amplificado por PCR utilizando el gen 16S ARNr del sedimento fue amplificado en casi todas las estaciones de muestreo, con excepción de E6 y E38.

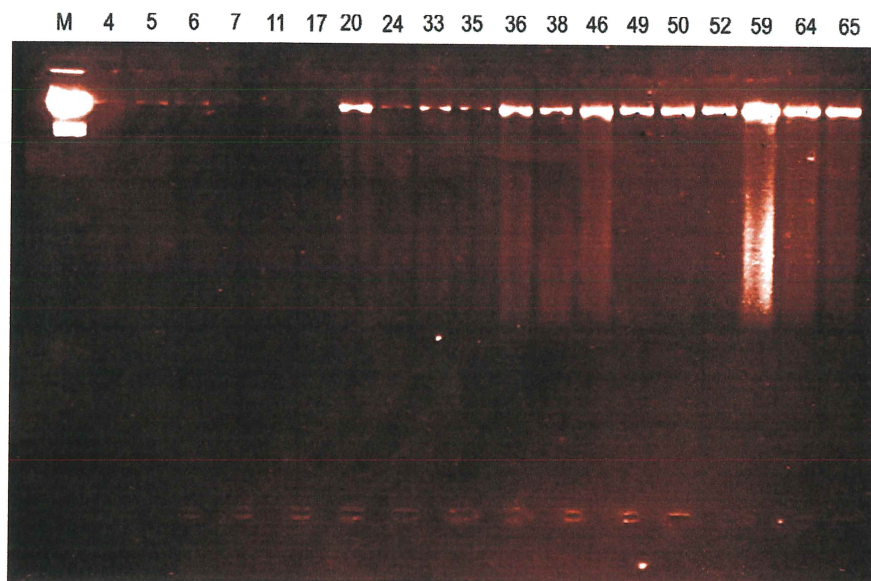


Figura 23. ADN en sedimento superficial de la zona costera noroccidental de Baja California. M= marcador fago Lambda, 4-65 estaciones de muestreo.

VI. DISCUSIÓN

VI.1. Características del sedimento

VI.1.1. DDT

Las concentraciones de DDT encontradas en los sedimentos de la zona costera fronteriza México-Estados Unidos, son bajas (no detectado a 4.78 ng g^{-1}) en comparación con otras de la misma región, como las de Palos Verdes y bahías de Santa Mónica y San Diego en donde se han detectado hasta 2500 ng g^{-1} (Shiff *et al.*, 2000; Bay *et al.*, 2003) y con las detectadas en otras partes del mundo como Guadalete, Bahía de Cádiz en España en donde se han reportado 63 ng g^{-1} de DDT (Lara-Martín *et al.*, 2005) pero son similares a las reportadas por Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998 (0.07 a 4.7 ng g^{-1}) y Noblet *et al.*, 2003 (0.73 ng g^{-1}) para la misma zona de estudio.

Las bajas concentraciones de ΣDDT detectadas podrían ser tanto de aportes recientes así como de años anteriores. En Estados Unidos, en los años setentas entró la política de prohibición de su uso para fines agrícolas, pero fue hasta 1989 cuando los usos permitidos (sanitario y militar) fueron eliminados. Mientras que en México su uso empezó a decrecer en respuesta a inquietudes ambientales. Como consecuencia para el año 1997 solo era utilizado para el control del paludismo y fue hasta el 2000 que México no utiliza ni produce DDT. Sin embargo, hay reportes de uso ilegal debido a las reservas de ese producto en varios países incluyendo el nuestro (CEC, 1997; Venkatesan *et al.*, 1999; Partida-Gutiérrez *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005). En estudios realizados en la CSC se ha encontrado que las concentraciones de DDT en sedimentos, columna de agua y organismos han decrecido desde entonces (Shiff *et al.*,

2000). Sin embargo el DDT detectado en los sedimentos de la zona de estudio pudiera representar una fuente de bioacumulación potencial para la fauna asociada al sedimento, ya que el estudio realizado por Macías-Zamora *et al.* (2001) indica que aproximadamente el 60 % del total del área muestreada en la parte mexicana de la CSC contiene DDT.

Las concentraciones mayores de DDT no se encontraron en las estaciones más cercanas a la frontera México-Estados Unidos y a la planta de tratamiento de Punta Loma California, en general se detectaron en las estaciones más profundas (Figura 5) que son las que contienen, mayores porcentajes de partículas $<63\ \mu\text{m}$ de diámetro y carbono orgánico, lo que concuerda con el estudio realizado por Peris *et al.* (2005). Los análisis de correlación realizados mostraron correlaciones significativas de ($p < 0.05$) entre ΣDDT y p,p'-DDE con estas dos variables, mientras que el dendograma de agrupamiento asoció a ΣDDT con sus metabolitos o,p'-DDD, p,p'-DDD y con las BRS. El análisis de factores (Tabla VI) también señala esta relación ya que el primer factor explica la asociación de las BRS con p,p'-DDD, o,p'-DDD y ΣDDT . Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Schiff *et al.* (2006) en la CSC, en donde se encontró mayor concentración de DDT en los estratos ubicados entre los 120 y 500 m de profundidad, los cuales se caracterizaron por un mayor porcentaje de grano fino y de carbono orgánico.

El patrón de distribución de Σ DDT encontrado en la zona de estudio (Figura 7) parece estar influenciado por la circulación la cual tiene una fuerte componente hacia mar abierto y el sur (Figuroa-González, 2006). La alta energía del oleaje del sistema distribuye ampliamente el material orgánico particulado, el cual se acumula más allá de la costa en respuesta a los procesos de mezcla local y corrientes (National Research Council, 1990; Oey, 1999; Macías-Zamora y Ramírez-Álvarez, 2004). Esto es evidente a partir de la acumulación de partículas de sedimento pequeñas ($<63 \mu\text{m}$), ricas en carbono orgánico hacia las isobatas de mayor profundidad y hacia la parte sur del área de estudio (Ramírez-Álvarez *et al.*, 2007). Este patrón es debido al repentino cambio en el ancho de la plataforma continental, el ángulo de incidencia del oleaje en la playa y a la contracorriente de California, cuyo patrón de circulación es invertido a lo largo de la costa resultando en un flujo neto hacia el sureste (Oey, 1999).

Zeng y Venkatesan (1999), mencionan que las principales plantas de tratamiento de California, Estados Unidos, descargan a una profundidad de 60 a 100 metros, cerca de cañones submarinos, por lo que los contaminantes pudieron ser transportados hacia la pendiente continental. Así, el DDT introducido antes de 1971 pudo haber sido transportado con material particulado, preferentemente de tamaño fino.

Las concentraciones mayores de DDD se detectaron en las estaciones 38, 49 y 59 (Figura 7), las cuales presentaron mayor presencia de BRS. Debido a ésto los análisis de correlación y agrupamiento mostraron una relación y

asociación entre ese grupo de bacterias y los metabolitos p,p'-DDD y o,p'-DDD. De la misma manera, el primer factor del análisis mutivariado (Tabla VI) mostró asociación entre el p,p'-DDD, o,p'-DDD y las BRS. La explicación de esta relación es que éstas se encuentran en ambientes reducidos, que son propicios para la decoloración reductiva del DDT a DDD, además no se descarta que las BRS detectadas en la zona de estudio lleven a cabo este proceso de degradación, ya que Huang *et al.* (2001) y Wang *et al.* (2004) en sus estudios de biodegradación anaeróbica con DDT en suelos y sedimentos estuarinos, encontraron que las BRS estuvieron significativamente involucradas en la decoloración del p,p'-DDT.

La presencia de DDE y DDD en la estación 49 indica la posibilidad de que en el sedimento exista un consorcio de bacterias anaerobias facultativas capaces de reducir u oxidar el DDT, ya que se conoce que la formación del DDE ocurre en medios aerobios, a través de dehidroclorinación del DDT mientras que la formación de DDD ocurre en medios anaerobios y a través de la decoloración reductiva del DDT (Lal y Saxena, 1982; Aislabie *et al.*, 1997; Foght *et al.*, 2001). Es posible que en esta estación existan microambientes óxicos-anóxicos propicios para el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas.

VI.1.2 SSCP (Polimorfismo de conformación de cadena simple)

El número de bandas en los sedimentos, al igual que el DDT, parecen estar relacionadas con las características de sedimento y profundidad de las estaciones de muestreo.

Las estaciones más profundas (33 a 65) ubicadas en la parte sur de la zona de estudio, presentaron mayor número de bandas y porcentajes promedio de carbono orgánico (0.90 %) y de partículas <63 μm de diámetro (60.5 %) que las estaciones 4 a 24 ubicadas en la parte norte. Estos resultados concuerdan con el análisis estadístico UPGMA el cual asoció a las estaciones, dependiendo del número de bandas, en tres grupos, entre ellos el integrado por las estaciones más profundas (33 a 65) localizadas en la parte sur de la zona de estudio, el de las estaciones de la parte norte (7, 11, 17, 20 y 24) caracterizadas por ser someras y el de las estaciones 4 y 5 ubicadas cerca del límite internacional México-Estados Unidos.

La diferencia en la estructura bacteriana de los sedimentos marinos de la zona de estudio se relaciona con el contenido de carbono orgánico, tamaño de partículas y profundidad. Estudios realizados en sedimentos de otras partes del mundo, han reportado que la profundidad del agua de mar y el contenido de carbono orgánico ejercen una fuerte influencia sobre la estructura y diversidad de la población bacteriana (Giovanonni y Rappé, 2000; Dominik y Höfle, 2002; Edlund *et al.*, 2006), por tanto la tendencia general es encontrar una mayor diversidad bacteriana en sedimento fino, principalmente arcillas las cuales son ricas en materia orgánica, propicias para el desarrollo microbiano.

La batimetría y profundidad de las estaciones de muestreo en este estudio, pueden relacionarse también con el número de bandas, ya que a partir de la estación 33 y hasta la 65, con excepción de la 52, se incrementa

gradualmente la profundidad (61-283 metros). Estas estaciones aparentemente forman parte de una cuenca con una pendiente la cual se prolonga hasta Punta Salsipuedes (Figura 5). Esta cuenca funciona como una vía natural de acceso de partículas de sedimento fino con contaminantes, que provienen del emisor submarino de Punta Loma California, es por esta razón que estudios de contaminación en la zona de estudio consistentemente reportan mayores concentraciones de metales pesados, bifenilos policlorinados y DDT, así como sus metabolitos, en las estaciones ubicadas alrededor de la isobata de los 60 metros (profundidad donde evacuaba el emisor submarino) en comparación con las ubicadas cerca de la costa (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1994; Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998).

VI.1.3. Árbol filogenético

La acumulación de partículas de sedimento fino con mayor contenido de materia orgánica en las estaciones ubicadas en la parte sur de la zona de estudio posiblemente generaron zonas anóxicas, con un potencial redox adecuado para el desarrollo de bacterias del ciclo del azufre como es el caso de *Desulfobulbus* (Banda 35A) y *Sulforovum* (Banda 59A).

Desulfobulbus es una bacteria reductora de sulfato (BRS), Gram negativa, anaerobia e integrante del grupo de las Delta Proteobacterias, las cuales desempeñan un importante papel en los ciclo de carbono y de azufre en los sedimentos marinos ya que se conoce que son responsables del 50 % del total de carbono orgánico (Jørgensen, 1982; Canfield *et al.*, 1993; Llobet-

Brossa *et al.*, 2002) así como de la reducción de los sulfatos a sulfuro de hidrógeno (Stainer *et al.*, 1996).

Además se tiene conocimiento que *Desulfobulbus* tiene la capacidad de reducir otros aceptores electrónicos como nitrato, óxidos de hierro y de manganeso. Diversos estudios realizados a nivel mundial han detectado esta bacteria en sedimentos marinos reducidos (Wieringa *et al.*, 2000; Purdy *et al.*, 2003) así como en sitios contaminados con hidrocarburos y PCB's (Lösekann *et al.*, 2007).

Debido a que la banda 35A aislada en la estación 35 y que corresponde a *Desulfobulbus* tuvo similitud con la secuencias DQ351788 y DQ351792 encontradas en sedimentos contaminados con metales pesados en la parte sur del Mar del Norte (Gillan y Pernet, 2007), así como con las secuencias AY771947, AY771953 y AY771965 en sedimentos del mar de Wadden (Mußmann *et al.*, 2005), es probable que desempeñe un importante papel en la biotransformación de los contaminantes en la zona de estudio, en particular en la estación 35, ya que se conoce que las BRS pueden llevar a cabo la decloración reductiva del DDT a DDD (Huang *et al.*, 2001), además estas bacterias al reducir los sulfatos a sulfuro de hidrógeno disminuyen las concentraciones de sulfatos, los cuales se ha encontrado inhiben la degradación de algunos compuestos organoclorados como el DDE (Quensen *et al.*, 1998).

Sulfurovum aislada de la estación 59, es una bacteria Gram negativa litotrófica que oxida el azufre y los tiosulfatos en presencia de oxígeno, pertenece al grupo de las Epsilon Proteobacterias, las cuales desempeñan una función importante en los procesos biogeoquímicos de los nutrientes, principalmente en sedimentos marinos. Algunos estudios han mostrado que este grupo de bacterias se encuentran en abundancia en las interfases óxicas-anóxicas de los sedimentos marinos, entre ellos el realizado por Edlund (2007) en sedimentos del Mar Báltico, en donde detectó la presencia de *Sulfurovum* secuencia EF460072 la cual mostró similitud con la secuencia 59A del presente trabajo.

La presencia de *Sulfurovum* en la estación 59, que presentó uno de los mayores porcentajes de carbono orgánico (1.51 %) y mayor número de BRS (140 NMP gr⁻¹), se debe a su capacidad de metabolizar compuestos inorgánicos del azufre en ambientes reducidos. Se conoce que las Epsilon Proteobacterias se encuentran en abundancia en las interfases óxicas-anóxicas de los sedimentos marinos en donde coexisten el sulfuro de hidrógeno y oxígeno (Fenchel y Finlay, 1995), lo cual se ha detectado en el Mar Negro y Cuenca de Cariaco, dos de las cuencas anóxicas más grandes a nivel mundial, caracterizadas por contener concentraciones elevadas de hidrocarburos y metano, así como en la Cuenca de Guaymas, Golfo de California, México (Madrid *et al.*, 2001; Vetriani *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2003).

La banda 65A aislada de las estaciones 33 a 65 es integrante del grupo de las Gamma Proteobacterias, el cual incluye a bacterias anaerobias

facultativas, entre los géneros más importantes se encuentran los productores de metano *Methylomonas*, *Methylomicrobium*, *Methylobacter* y *Methylococcus*, así como *Vibrio* spp. y *Pseudomonas* spp., los cuales son muy abundantes en el ambiente marino.

La Banda 65A mostró similitud con las secuencia EF459957 encontrada en sedimentos anóxicos del Mar Báltico (Edlund, 2007) y con la DQ351776 detectada en sedimentos marinos del Mar del Norte contaminados con metales pesados (Gillan *et al.*, 2005). Por tanto su presencia en la parte sur de la zona de estudio (E33-65) es indicativa de ambientes reducidos.

No obstante que la clasificación de la banda 65A en el GenBank, se realizó únicamente a nivel grupo (Gama Proteobacterias), su presencia en todas las estaciones de muestreo de la parte sur de la zona de estudio es indicativo de que pertenece a una bacteria muy abundante en el ambiente marino, posiblemente a los géneros *Vibrio* ó *Pseudomonas*.

Por otra parte, es relevante el hecho de que la bacteria aislada de la estación 49, que mostró la capacidad de transformar el DDT en el bioensayo de laboratorio, pertenezca al género *Vibrio* del grupo de las Gama Proteobacterias, las cuales son muy abundantes en el ambiente marino, por tanto no se descarta la posibilidad de su presencia en el sedimento de otras estaciones de muestreo de la parte sur de la zona de estudio.

Otro Phylum de bacterias que indica la posibilidad de que la parte sur de la zona de estudio contenga sedimentos reducidos es el Bacteroidetes, el cual está integrado por Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides (CFB). Este grupo de bacterias fue detectado mediante las bandas 52B y 65B en las estaciones 33 a 65. La primera banda mostró similitud con secuencias de lugares contaminados como la AJ704701 encontrada en sedimentos productores de metano del Mar de Barentz (Losekann *et al.*, 2007) y con la AY822228 detectada en sedimentos enriquecidos con materia orgánica proveniente de una granja de peces (Bissett *et al.*, 2006). La segunda banda mostró similitud con la secuencia AM259872 la cual corresponde a una *Flavobacterium* no cultivable y asociada con la esponja *Tethya aurantium* del Mar Adriático (Thiel *et al.*, 2007).

La banda 52A aislada en casi todas las estaciones de muestreo, con excepción de la E4 es integrante del grupo de las Delta Proteobacterias, el cual incluye a bacterias aerobias y anaerobias como el caso de las BRS y de sulfuro como *Desulfovibrio*. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en los sedimentos marinos (Gillan *et al.*, 2005; Mußmann *et al.*, 2005; Edlund *et al.*, 2006; Gillan y Pernet, 2007). Su amplia distribución en la zona de estudio indica que las características granulométricas, así como el contenido de carbono orgánico de los sedimentos, no son factores limitantes para su crecimiento, aunque es importante mencionar que la secuencia de la Banda 52A mostró similitud con las secuencias AM040129 correspondiente a una Delta Proteobacteria no cultivable de sedimentos del Mar del Norte (Musat *et al.*, 2006) y con la EF460087 detectada en sedimentos del Mar Báltico (Edlund,

2007). Estos dos sitios están caracterizados por contener altos porcentajes de materia orgánica.

La secuencia de la Banda 11C corresponde a una bacteria clasificada dentro del Phylum Cyanobacteria, mostró similitud con las secuencias AF523902 detectada en sedimentos superficiales del Río Savannah en Estados Unidos, los cuales están impactados con desechos de una planta de carbón (Brofft *et al.*, 2002) y con la AY711833 correspondiente a una cianobacteria no cultivable encontrada en una muestra de sedimento de una zona de marisma en Sapelo Island, Georgia, Estados Unidos (Moran *et al.*, 2004). El lugar donde se encontraron estas dos secuencias hacen suponer que la cianobacteria detectada en la presente investigación debería encontrarse en una estación de muestreo con mayor contenido de materia orgánica, sin embargo se encontró en la estación 11 la cual se caracteriza por contener arena gruesa, con un tamaño de partícula de 164 μm , esto se debe a que las partículas gruesas permiten la colonización de cianobacterias (Díez *et al.*, 2007); además presentó uno de los menores porcentajes de carbono orgánico (0.05 %) y una menor profundidad que el resto de las estaciones (23 metros). Lo somero de la estación posiblemente favorece el crecimiento de las cianobacterias, ya que son organismos fotosintéticos que requieren de energía luminosa para llevar a cabo sus actividades metabólicas (Atlas y Bartha, 2002; Edlund *et al.*, 2006).

Por tanto, los factores que probablemente influyeron en su detección fueron la profundidad y el fosfato, éste es un nutriente clave para el crecimiento de las cianobacterias. Además la estación 11 se localiza aproximadamente a

12 km al oeste de la planta de tratamiento de Punta Bandera, ésta descarga aguas residuales con alto contenido de fosfato en la zona costera, ya que a 2 km de la costa y frente a la descarga se han detectado hasta $90 \mu\text{g at L}^{-1}$ de fosfato lo cual indica introducción antropogénica (Segovia-Zavala *et al.*, 1995). Estudios realizados en otros sitios indican que el aporte antropogénico de fosfatos incrementan la población de cianobacterias (Eiler *et al.*, 2007).

La secuencia de la Banda 4A, corresponde a una bacteria clasificada dentro del Dominio Archea y mostró similitud con la secuencia AB099993 la cual corresponde a una bacteria termofílica de una chimenea hidrotermal del Océano Índico (Suzuki *et al.*, 2003). Se relaciona también aunque distantemente con las secuencias AF445734 y AF445658 que corresponden a bacterias termofílicas Aquificales no cultivables (Khachane *et al.*, 2005).

Es posible que la secuencia 4A detectada en los sedimentos de las estaciones 4, 7, 11, 17, 20, 24, 33, 35 y 59 contenga algunos de los genes de las bacterias termofílicas anteriormente mencionadas, sin embargo no han podido ser expresados debido a las bajas temperaturas prevalecientes en la zona de estudio. La ausencia de esta secuencia en el resto de estaciones se debe posiblemente a que la materia orgánica y sustancias húmicas inhiban su amplificación por PCR. Además, es importante destacar que para su detección se requieren iniciadores como: PRA46F, PREA1100R, PARCH340F y PARCH340R específicos para la amplificación de Archeas (Nakatsu *et al.*, 2000).

VI.2 Identificación de la bacteria aislada en estación 49

La bacteria aislada en la estación 49 y ensayada en el medio sales mínimas más DDT fue identificada como *Vibrio* sp., ya que presentó las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias de este género como el ser bacilos curvos, Gram negativas, anaerobias facultativas, móviles por flagelos polares y no esporuladas (Austin, 1990). El estudio con RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción) comprobó su identidad ya que la bacteria aislada presentó los mismos patrones de restricción que la bacteria control *Vibrio harveyi*. Es importante mencionar que en la actualidad la gran mayoría de las identificaciones bacterianas se realizan mediante métodos moleculares, los cuales se basan en el uso de enzimas de restricción para generar patrones de bandas (RFLP) y secuenciación de ADN. Estos métodos moleculares presentan una mayor reproducibilidad y exactitud que los tradicionales de identificación (Savelkoul *et al.*, 1999), sin embargo requieren de una infraestructura aún no disponible en todos los laboratorios.

El género *Vibrio* sp. identificado en la presente investigación se clasifica de acuerdo a los análisis de secuencias del 16S ARNr dentro del grupo de las Gama Proteobacterias, uno de los más abundantes en el medio marino en donde ocupan una gran diversidad de ambientes. Por ejemplo, se han encontrado en la columna de agua y sedimentos contaminados por metales pesados y PCB's (Gillan *et al.*, 2005; Edlund y Jansson, 2006; Edlund *et al.*, 2006; Gillan y Pernet, 2007).

No obstante, en los sedimentos de la zona de estudio no se han detectado concentraciones significativas de contaminantes orgánicos

persistentes como PCB's, DDT, PAHS y metales pesados (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998; Macías-Zamora, 2001; Partida-Gutiérrez *et al.*, 2003).

VI.3 Tasas de crecimiento *Vibrio* sp.

Las mayores tasas de crecimiento específico de *Vibrio* sp. a 28 °C indican que es un organismo psicrotrófico de acuerdo con la clasificación de Morita (1975), que subdivide a las bacterias en dos grupos: las que crecen a 0 °C con una máxima de 20 °C (psicrófilos) y las que se desarrollan a 0 °C y a una temperatura mayor de 20 °C (psicrotróficos). Existen evidencias de que este tipo de bacterias son más abundantes en ambientes fríos que las psicrófilas. En un estudio realizado por McMeekin (1988) en el Mar Antártico encontró que de 250 aislamientos bacterianos 249 correspondían a organismos psicrotróficos, adicionalmente, Murayama *et al.* (1997) encontraron que las cepas cultivables a 4 °C de aguas profundas y sedimentos del Mar de Japón eran psicrotróficas. Éstas además de ser abundantes en el ambiente marino son organismos importantes como degradadores de la materia orgánica (Radjasa, *et al.*, 2001).

Las mayores tasas de crecimiento y menores tiempos de duplicación de *Vibrio* sp. a los 28 °C se explican porque los incrementos en la temperatura aceleran las reacciones metabólicas de los microorganismos (Atlas y Bartha, 2002; Takemoto *et al.*, 2007). Pomeroy y Wiebe (2001) mencionan que el sustrato y la temperatura son factores limitantes para el crecimiento de las bacterias de tal manera que su eficiencia depende en gran medida de estas variables. En este trabajo aparentemente la temperatura no fue limitante para el

crecimiento de *Vibrio* sp., sin embargo hay que considerar que cuando existen variaciones de la misma por debajo o arriba del óptimo de crecimiento microbiano, la tasa de crecimiento específico disminuye. Ésto se observó en el trabajo realizado por Herbert y Bell (1977) en *Vibrio* sp. (psicrófilo obligado) en donde las mayores tasas de crecimiento se presentaron a los 15 °C (0.0922 d^{-1}), mientras que a la temperatura máxima de 23 °C no se registró ningún crecimiento bacteriano. Estos resultados difieren de los obtenidos en el presente trabajo ya que la mayor tasa de crecimiento específico (0.6912 d^{-1}) en *Vibrio* sp. se obtuvo a 28 °C.

Las mayores tasas de crecimiento específico de *Vibrio* sp. en el medio sales mínimas más DDT en las dos temperaturas (28 y 8 °C), se deben probablemente al efecto combinado del carbono lábil (levadura) y refractario (DDT) que aparentemente actúan sinérgicamente para el crecimiento de la bacteria y la transformación del contaminante (cometabolismo). Debido a que este compuesto organoclorado es muy complejo y difícil de degradar la bacteria ensayada no lo utiliza como fuente de carbono y de energía para su crecimiento. La fuente de carbono y energía para *Vibrio* sp. proviene del extracto de levadura ($8 \mu\text{M}$) presente en el medio sales mínimas, porque es una mezcla compleja de acetato, aminoácidos, péptidos, bases de nitrógeno, metales traza, fosfato y vitaminas principalmente del complejo B12 (Difco, 1984; Tanner, 1997). Se ha encontrado que concentraciones de levadura tan bajas como 50 mg L^{-1} (cantidad empleada en el presente estudio) soporta el crecimiento de la mayoría de las especies bacterianas y puede recuperar la mayoría de los microorganismos del ambiente (Tanner, 1997).

Por otra parte Foght *et al.* (2001) mencionan que el extracto de levadura puede utilizarse en suelos que contienen una baja población microbiana y en aquellos en donde existen pequeñas cantidades de carbono. En estas condiciones la levadura funciona como una fuente alternativa de carbono para que los microorganismos lleven a cabo el proceso de cometabolismo, facilitando la degradación del DDT.

VI. 4 Bioensayo con *Vibrio* sp.

La disminución en la señal del DDT y el incremento en las señales del p,p'-DDE y p,p'-DDD en los ensayos aerobio y anaerobio del presente trabajo, se deben posiblemente a la transformación del DDT por *Vibrio* sp. Sin embargo, es importante destacar que los compuestos organoclorados pueden ser acumulados intracelularmente y de manera selectiva por los microorganismos, por ejemplo *Aerobacter aeorogenes* y *Bacillus subtilis* requieren solamente 30 segundos para acumular del 80 a 90 % del DDT presente en el medio (Lal y Saxena, 1982), cambiando el reservorio y proporciones del DDT residual. Debido a que los análisis en este estudio se realizaron únicamente con el sobrenadante, se requiere de un estudio de balance de masas con ^{14}C -DDT tomando en consideración ambos compartimientos.

Por lo anteriormente mencionado, la evidencia de la transformación de DDT por *Vibrio* sp. en el presente estudio, la constituyen las señales de o,p'-DDE y o,p'-DDD detectadas en los ensayos aerobio y anaerobio, ya que estos

metabolitos no se encontraron en el tiempo inicial del experimento ni en los controles abióticos. Su ausencia en estos descarta la posibilidad de que se hayan formado por procesos de degradación térmica o fotoquímica del DDT.

Los resultados obtenidos en los sistemas aerobio y anaerobio con *Vibrio* sp. permiten proponer las posibles rutas metabólicas (Figura 24). El incremento en la señal y área relativa del p,p'-DDE en el sistema aerobio se debe a que en el medio de cultivo existían las condiciones adecuadas para que se llevara a cabo la dehidroclorinación del DDT (Figura 24a), mediante la remoción simultánea de hidrógeno y cloro. Este resultado concuerda con los obtenidos por diversos investigadores los cuales indican que en condiciones aerobias la reacción dominante es la dehidroclorinación (Aislabie *et al.*, 1997, 1999; Foght *et al.*, 2001).

En contraste al p,p'-DDE que se formó por dehidroclorinación, los metabolitos o,p'-DDE y o,p'-DDD lo hicieron probablemente por isomerización a partir de los metabolitos p,p'-DDE y p,p'-DDD ya que Lal y Saxena (1982) destacan que este proceso es una de las reacciones importantes del metabolismo del DDT.

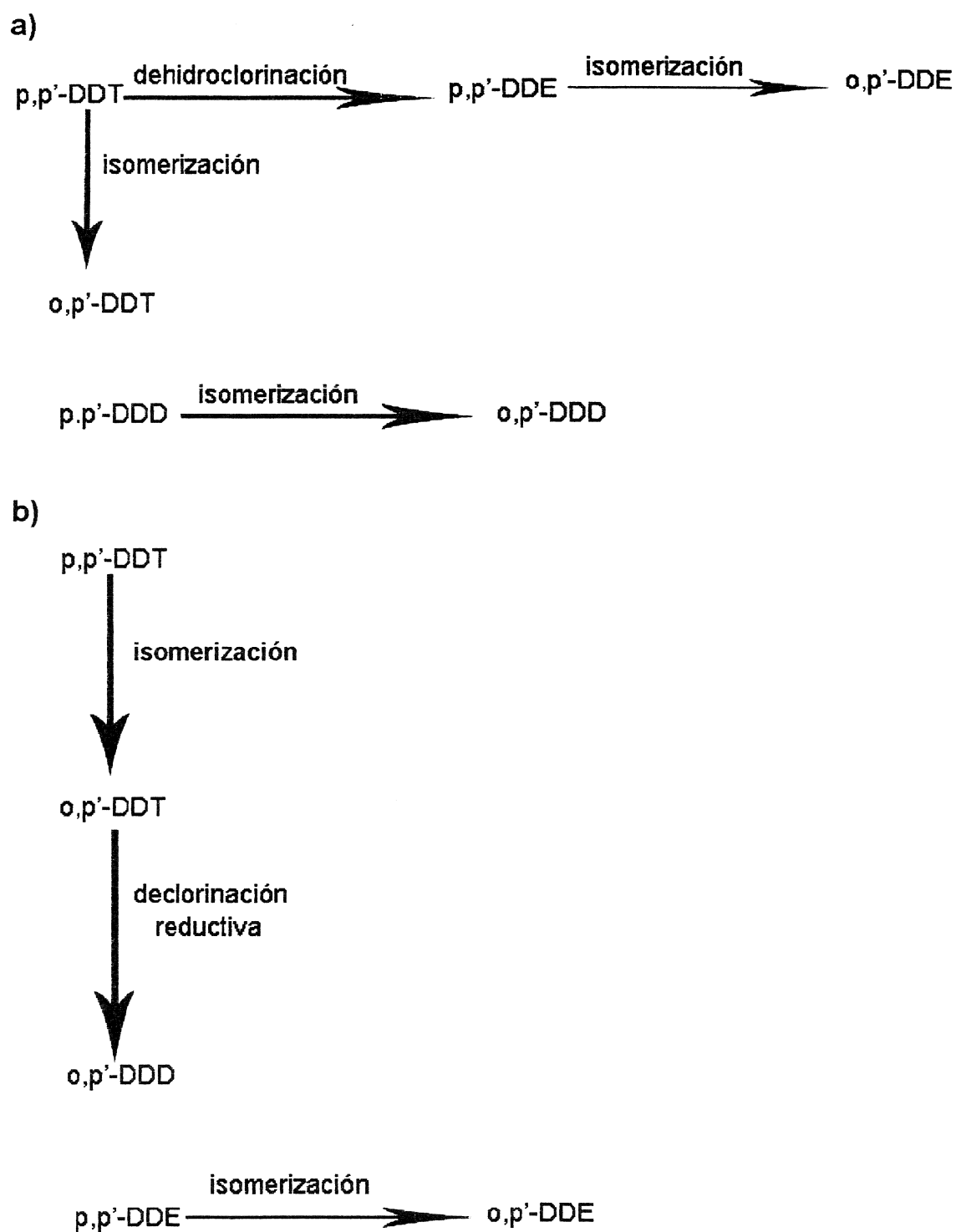


Figura 24. Rutas propuestas para la degradación del DDT *Vibrio* sp. a) aerobia y b) anaerobia

En este trabajo se descarta que el o,p'-DDD se haya formado por dehidroclorinación reductiva del DDT ya que este proceso se lleva a cabo preferentemente en condiciones anaerobias (Aislabie *et al.*, 1997; Foght *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001).

Por otra parte, es probable que el o,p'-DDE en el bioensayo con *Vibrio* sp. se haya formado a partir del p,p'-DDE, aunque los porcentajes de áreas relativas (Tabla XI) no reflejan una disminución de éste, ya que es posible que se haya dado una transformación simultánea de p,p'-DDT a p,p'-DDE y por tanto un equilibrio de masas, lo cual sugiere que en este sistema se están llevando a cabo diversas reacciones metabólicas, algunas de ellas interrelacionadas.

En el sistema anaerobio (Figura 24b) probablemente ocurrieron dos procesos metabólicos de manera secuencial, la isomerización del p,p'-DDT a o,p'-DDT y la declorinación reductiva de este para formar o,p'-DDD. Lal y Saxena (1982) señalan que la transformación del p,p'-DDT a o,p'-DDT se realiza mediante una de las rutas del metabolismo anaerobio microbiano (Figura 1). Por tanto, es probable que *Vibrio* sp., posea una enzima con la capacidad de cambiar la posición del átomo del cloro del carbono 4 a la posición 2 del anillo bencénico, y de esta manera preparar la ruta para la transformación enzimática del DDT, obteniendo además energía libre estándar, útil para llevar a cabo actividades metabólicas, aunque desde el punto de vista termodinámico no sea tan eficiente como la dehidroclorinación y la declorinación reductiva.

El o,p'-DDD detectado en el bioensayo anaerobio pudo haberse formado a través del proceso de declorinación reductiva, por la separación de un átomo de cloro de la cadena alifática del o,p'-DDT. Diversos estudios han determinado que el DDD es el producto principal del catabolismo anaerobio del DDT (Holliger y Schraa, 1994; Aislabie *et al.*, 1997; Quensen *et al.*, 1998; Corona-Cruz, *et al.*, 1999; Foght *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001).

Las señales de o,p'-DDE y o,p'-DDD detectadas en los ensayos aerobio y anaerobio fueron pequeñas, probablemente porque el experimento se realizó durante noventa días, en el medio sales mínimas con DDT como fuente única de carbono y con la intervención única de *Vibrio* sp. Es probable entonces, que si se hubiera empleado un consorcio bacteriano, utilizando el medio sales mínimas en presencia de otro compuesto químico como el bifenilo (cometabolismo), la transformación del DDT hubiera sido más evidente, con la probable formación de algunos de su metabolitos como el DDMU y DDM.

La importancia del cometabolismo para inducir la degradación del DDT y sus metabolitos se ha puesto de manifiesto en algunas investigaciones (Aislabie *et al.*, 1997, 1999; Hay y Focht, 1998; Foght *et al.*, 2001; Chandrappa *et al.*, 2004). En estas investigaciones los autores propusieron una ruta para la degradación anaerobia del DDT por el metabolismo bacteriano y mencionan que su transformación se lleva a cabo por reacciones sucesivas de declorinación reductiva para producir DDMU (dicloro difenil etileno), el cual es posteriormente oxidado a DDOH (dicloro difenil etanol). Oxidaciones posteriores del DDOH producen DDA (dicloro difenil ácido acético), el cual es

descarboxilado a DDM (dicloro difenil metano). Finalmente, el DDM es metabolizado a DBP (dicloro benzofenona) o puede ser escindido uno de sus anillos aromáticos para formar PCPA (cloro fenil ácido acético). Es en esta parte de la ruta metabólica que se requiere de oxígeno y la intervención de las dioxigenasas, para el rompimiento del anillo aromático.

VI.5 Amplificación del Gen 4,5 DOPA

El gen 4,5 DOPA específico para la degradación del DDT fue encontrado únicamente en el ADN plasmídico de *Vibrio* sp. aislado de la estación 49. Existe la posibilidad de que esta cepa bacteriana haya adquirido la enzima durante el tiempo de exposición a este compuesto organoclorado, ya que hasta 1970 la zona de estudio estuvo fuertemente impactada por la introducción de DDT derivado de las principales plantas de tratamiento de aguas residuales de las ciudades de California, Estados Unidos (Gutiérrez-Galindo *et al.*, 1998; Noble *et al.*, 2001a; Partida-Gutiérrez, 2003).

Se conoce que las bacterias sometidas a estrés por la introducción de contaminantes antropogénicos, incrementan la presión por selección y la presencia y número de plásmidos con capacidad para degradar hidrocarburos, PCB's y DDT's (Capone y Bauer, 1992; Suárez-Rodríguez, 1993; Hohnstock *et al.*, 2000; Aminov *et al.*, 2001). Este hallazgo es de gran importancia para la ecología microbiana de los sedimentos de la zona de estudio, porque los plásmidos en ciertas circunstancias pueden transmitir ADN de una célula donadora a una receptora, la cual a su vez puede llegar a convertirse en donadora (Tropel, 2004; Regeard, 2005). La naturaleza de este proceso de

transferencia de genes es relevante, ya que si se introducen en una población plásmidos que contienen genes como el 4,5 DOPA para la degradación de un compuesto químico como el DDT puede la población receptora llegar a convertirse en portadora de plásmidos en poco tiempo.

Con base a lo anteriormente expuesto, existe la posibilidad de encontrar el gen 4,5 DOPA en otras bacterias de diferentes estaciones de muestreo de la zona de estudio. Para comprobar esta posibilidad se requieren realizar estudios de hibridación utilizando ADN plasmídico de las diferentes bacterias aisladas en las estaciones de muestreo y una sonda elaborada con el gen 4,5 DOPA de la bacteria *Vibrio fischeri* ES114. Para ello se requiere desnaturalizar el ADN plasmídico de los microorganismos y del gen a estudiar para formar una cadena sencilla de ADN, la hibridación de ambas cadenas indicaría una homología entre las bases y una similitud entre ambos ADN. La técnica de hibridación con sondas específicas ha sido utilizada a nivel mundial para detectar genes para la degradación de diversos contaminantes persistentes (Capone y Bauer, 1992; Atlas y Bartha, 2002).

La detección en el presente trabajo de los metabolitos o,p'-DDE y o,p'-DDD, los cuales se forman en las primeras etapas de la degradación del DDT así como la del gen 4,5 DOPA el cual rompe su anillo bencénico (últimas etapas de su catabolismo), son indicio de que *Vibrio* sp., debe poseer varias enzimas para su catabolismo. Sin embargo, es poco probable que esta cepa bacteriana contenga todas las enzimas involucradas en las rutas metabólicas para la degradación total de este compuesto organoclorado, por tanto no se

descarta la posibilidad de que *Vibrio* sp. y otros géneros de bacterias presentes en los sedimentos de la zona de estudio integren un consorcio microbiano con mayor capacidad para degradar el DDT, ya que se tiene conocimiento que en la mayoría de los procesos de degradación de compuestos orgánicos intervienen este tipo de asociaciones bacterianas (Atlas y Bartha, 2002).

Por otra parte, es importante destacar que el gen 4,5 DOPA detectado en el presente trabajo, es del grupo de las dioxigenasas, las cuales introducen dos átomos de oxígeno en el anillo bencénico, desplazando el átomo de cloro por un hidroxilo. Algunos Investigadores indican que la ruptura del anillo bencénico puede ocurrir también de manera anaeróbica por hidrogenación reductiva (Bugg y Winfield, 1998). Sin embargo, existen evidencias de que su ruptura ocurre únicamente en presencia de oxígeno molecular (Aislabie *et al.*, 1997; Foght *et al.*, 2001), por tanto se requieren de condiciones alternadas anaeróbicas y aeróbicas para promover la declorinación reductiva y el rompimiento del anillo aromático por las dioxigenasas (4,5 DOPA).

Finalmente, la amplificación del gen 4,5 DOPA en este trabajo (Figura 22) muestra que las condiciones establecidas para el PCR son adecuadas, entre ellas los iniciadores y temperatura de anillado. Los iniciadores forward y reverse poseen las características recomendadas como el contener el 50 % de GC y una temperatura de fusión (TM) similar (Sambrook *et al.*, 1989; Cha y Thilly, 1995; Steffen *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2004).

Los iniciadores mostraron también una gran especificidad con las temperaturas de alineamiento empleadas (58-68 °C) ya que el gen 4,5, DOPA pudo ser amplificado en ese intervalo de temperatura.

VI. 6. Extracción y amplificación del ADN bacteriano de los sedimentos

Los resultados de la electroforesis (Figura 23) mostraron que el método de extracción empleado (Fast DNA Spin for Soil) fue adecuado para la extracción del ADN bacteriano total de los sedimentos marinos de la zona de estudio. Sin embargo, existen antecedentes que indican que la obtención de ADN en este tipo de muestras es difícil, ya que por su naturaleza presentan una alta concentración de sustancias húmicas derivadas de la materia orgánica y que algunos de sus componentes como los ácidos húmicos y fúlvicos son fuertes inhibidores de las actividades enzimáticas, principalmente de la *Taq* polimerasa durante las reacciones de amplificación por PCR (Ikeda *et al.*, 2006). Otro problema para la extracción del ADN del sedimento es la adsorción de los microorganismos a las partículas de sedimento, por tanto los métodos comerciales actualmente empleados a nivel mundial como el Ultra Clean Soil DNA Isolation (MoBio Inc., Solana CA, USA) y el Fast DNA Spin Kit for Soil (Qbiogene, Carlsbad, Ca. USA) se basan en una combinación de lisis alcalina y agitación fuerte para el desprendimiento de las bacterias.

No obstante lo anteriormente mencionado, el ADN del sedimento marino fue amplificado con excepción de las estaciones 6 y 38. Como se observa en Figura 23, la cantidad de ADN de la estación 6 no fue suficiente para ser amplificada por PCR, el problema no fue metodológico y se explica porque esta

estación contiene partículas de sedimento grueso y con poco contenido de materia orgánica y por tanto con una menor población microbiana, mientras que la estación 38 fue una de las que presentó mayor cantidad de ADN. Es probable por tanto, que contenga mayor cantidad de ácidos húmicos, los que inhibieron su amplificación por PCR, no obstante que el ADN fue previamente diluido (1:100). Es importante mencionar que esta estación se caracteriza por contener partículas de sedimento fino y mayor contenido de materia orgánica.

Las bajas concentraciones de DDT encontradas en el área de estudio no permitieron comprobar la hipótesis planteada de que las estaciones con mayor concentración de este contaminante presentarían mayores cambios en la estructura de la comunidad bacteriana, y por tanto, menor diversidad que las menos contaminadas. La estructura de la población bacteriana de los sedimentos, parece estar relacionada con el tamaño de partícula y carbono orgánico ya que el mayor número de bandas se encontraron en las estaciones mas profundas en donde existe una acumulación de sedimentos ricos en materia orgánica, lo que genera condiciones para el desarrollo de bacterias dominantes (proteobacterias), así como de bacterias indicadoras de medios anóxicos como lo muestra la presencia de los géneros *Desulfobulbus* y *Sulfurovum* (estaciones 35 y 59).

No obstante que en la zona de estudio se encuentran bajas concentraciones de DDT, la presencia de bacterias del azufre en los sedimentos, indican la posibilidad de que estos actualmente están siendo impactados por las aguas residuales de la plantas de tratamiento de Punta

Loma, California, Estados Unidos y Punta Bandera, México. Es importante mencionar que los resultados en la presente investigación son los primeros datos obtenidos de la zona fronteriza México-Estados Unidos y muestran que los métodos moleculares basados en huellas genéticas de ADN (SSCP) se pueden utilizar para determinar la estructura bacteriana de sedimentos impactados por la introducción de contaminantes antropogénicos. Sin embargo, se requieren de mayores estudios utilizando un grupo de iniciadores como los reportados en los trabajos de Nakatsu *et al.* (2000) y Sánchez *et al.* (2007) para la detección de un mayor número de bacterias pertenecientes a los Dominios Bacteria y Archea.

A pesar de que en la zona de estudio se encontraron bajas concentraciones de DDT se pudo comprobar la hipótesis planteada, que en la estación con mayor concentración de este contaminante se detectaría un gen específico para la degradación de DDT, mismo que se encontró en el ADN plasmídico de *Vibrio* sp. aislado de la E49. Es posible que esta bacteria haya adquirido por presión por selección el gen (4,5 DOPA) durante el tiempo que estuvo expuesta al contaminante o lo haya adquirido por transferencia horizontal de otras bacterias, por tanto es probable que otras especies bacterianas de la zona de estudio también lo posean. Sin embargo, para llegar a esta conclusión se requieren realizar estudios mediante técnicas de hibridación utilizando una sonda fabricada a partir del gen anteriormente mencionado.

En la presente investigación se demostró que *Vibrio* sp. tiene la capacidad de transformar el DDT a o,p'-DDD y o,p'-DDE de manera aerobia y anaerobia. Debido a que estos metabolitos se forman en las primeras etapas de degradación de este compuesto químico, se requieren de estudios adicionales para determinar los metabolitos intermedios y finales de la degradación de DDT. Se requiere realizar un estudio de balance de masas utilizando ^{14}C -DDT para determinar con exactitud los metabolitos que intervienen en su transformación y las relaciones entre estos para deducir las principales vías catabólicas. Por otra parte y debido al importante papel que desempeñan las enzimas incluyendo las dioxigenasas en la degradación del DDT, se recomienda realizar investigaciones para determinar sus mecanismos de acción, especificidad y regulación. Actualmente estos estudios son de importancia en algunas áreas como la biotecnología ambiental.

VII. CONCLUSIONES

En general las mayores concentraciones de DDT en el sedimento marino se presentaron en la parte sur del área de estudio. La Σ DDT en el sedimento se relacionó con mayor contenido de carbono orgánico y de porcentaje de partículas <63 μ m, mientras que el o,p'-DDD y el p,p'-DDD se relacionaron con las BRS.

La bacteria *Vibrio* aislada en este trabajo contiene el gen 4,5 DOPA específico para la degradación del DDT, mismo que se encuentra en *Vibrio fischeri* ES114 utilizada como control positivo

Los resultados de cromatografía de gases corroboran los obtenidos mediante técnicas moleculares, ya que la presencia de los metabolitos o,p'-DDD y o,p'-DDE en los cultivos aerobio y anaerobio sugieren la transformación del DDT por *Vibrio* aislado en este trabajo, la cual ocurrió en las primeras etapas del metabolismo aerobio y anaerobio de esta bacteria.

El número de bandas obtenidas en la electroforesis (SSCP) fue mayor en las estaciones con mayor profundidad, concentración de carbono orgánico y porcentaje de partícula <63 μ m. Las secuencias de las bacterias del sedimento marino se relacionaron con algunas reportadas en el GenBank de ambientes contaminados, siendo el grupo de las proteobacterias el más dominante.

VIII. LITERATURA CITADA

- Acinas, S.G., Antón, J. and Rodríguez-Varela, F. 1999. Diversity of free-living attached bacteria in offshore western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:514-522.
- Ahn, Y.B., Häggblom, M.M. and Kerkhof, L.J. 2007. Comparison of anaerobic microbial communities from estuarine sediments amended with halogenated compounds to enhance dechlorination of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *FEMS Microbiol Ecol*. 61:362-371.
- Aislabie, J., Davison, A.D., Boul, H.L., Franzmann, P.D., Jardine, D.R. and Karuso, P. 1999. Isolation of *Terrabacter* sp. Strain DDE-1, which metabolizes 1,1-Dichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl) Ethylene when induced with biphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 5607-5611.
- Aislabie, J.M., Richards, N.K. and Boul, H.L. 1997. Microbial degradation of DDT and its residues-a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 40:269-282.
- Akkermans, A.D.L., van Elsas, I.D., and Bruijn, F.J. eds. 1998. *Molecular Microbial Ecology Manual. Supplement 4*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. ISBN 0-7923-3411-6.
- Allen, M.J., Diehl, D.W. and Zeng, E.Y. 2004. Bioaccumulation of contaminants in recreational and forage fish in Newport Bay, California in 2000-2002. Technical Report 436. *Southern California Coastal Water Research Project*. Westminster Ca. EUA. 68 pp.

- Alonso-Sáez, L., Balagué, V., Sá, E.L., Sánchez, O., González, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedrós-Alió, C. and Gasol, J.M. 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol Ecol.* 60:98-112.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology.* 215:403-410.
- Álvarez-Sánchez, L.G., Godínez, M. y Lavín, M.F. 1987. *Dispersión frente a la costa de Tijuana, Baja California*. En: Resúmenes del VII Congreso Nacional de Oceanografía. 27-31 de Julio. Ensenada, B. C. Instituto Nacional de Pesca.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
- Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N. and Mackie, R.I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(2):22-32.
- Andersen, S.R. and Sandaa, R.A. 1994. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolates from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* 60(3):908-912.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. 2002. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Cuarta edición, Editorial Pearson, Madrid. 677 pp.

- Austin, B. 1990. *Methods in aquatic bacteriology*. John Wiley and Sons. New York. 415 pp.
- Barkay, T. and Olson, B. 1986. Phenotypic and genotypic of aerobic heterotrophic sediment bacterial communities to mercury stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(2):401-406.
- Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196:80-83.
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., Dewatcher R., Verachtert H and Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5):1834-1843.
- Bay, S.M., Zeng, E.Y., Lorenson, T.D., Tran, K. and Alexander, C. 2003. Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of Santa Monica Bay, California. *Marine Environmental Research*. 56:255-276.
- Baya, A.M., Brayton, P.R., Brown B.L., Grimes, D.J., Russek-Cohen and Colwell, R.R. 1986. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine bacteria isolated from polluted and unpolluted Atlantic Ocean samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 51(6):1285-1292.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2001. *The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria*. Second edition. Volume one. Garrity, G.M. (Eds.). Michigan, USA. 721 pp.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2005a. *The proteobacteria. Part A introductory essays*. Second edition. Volume two. Garrity, G.M. (Eds.). Michigan, USA. 304 pp.

- Bergey's manual of systematic bacteriology. 2005b. *The proteobacteria. Part C the alpha-, beta-, delta-, and epsilon proteobacteria*. Second edition. Volume two. Garrrity, G.M. (Eds.). Michigan, USA. 1388 pp.
- Bissett, A., Bowman, J. and Burke, C. 2006. Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiology Ecology*. 55(1):48-56.
- Blackwood, C.B., Waldrop, M.P., Zak, D.R. and Sinsabaugh, R.L. 2007. Molecular analysis of fungal communities and laccase genes in decomposing litter reveals differences among forest types but no impact of nitrogen deposition. *Environmental Microbiology*. 9(5):1306-1316.
- Boyle, M. 1992. The importance of genetic exchange in degradation of xenobiotic chemicals In: *Environmental microbiology*, Ralph Mitchell (Eds.), New York, John Wiley-Liss, pp. 319-333.
- Brofft, J.E., McArthur, J.V. and Shimkets, L.J. 2002. Recovery of novel bacterial diversity from a forested wetland impacted by reject coal. *Environmental Microbiology*. 4(11): 764-769.
- Bugg, T. D.H. and Winfield, Ch.J. 1998. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*. 15:513-530.
- Canfield, D.E., Jørgensen, B.B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N.B., Thamdrup, B., Hansen, J.W., Nielsen, L.P. and Hall, P.O.J. 1993. Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Mar. Geol.* 113:27-40.

- Capone, D.G. and Bauer, J.E. 1992. Microbial processes in coastal pollution. In: Mitchell, R., (Ed.). *New concepts in environmental microbiology*. Wiley-Liss, Inc. New York, pp. 191-237.
- CEC. 1997. Plan de acción regional de América del Norte para el manejo del DDT, grupo de trabajo de América del Norte para el manejo racional de sustancias químicas, subgrupo de trabajo para el manejo de DDT y clordano. Montreal: Comisión para la Cooperación Ambiental.
- CETS, (Commission on engineering and technical systems). 1990. Monitoring Southern California Coastal Waters. *The Southern California Bight*, Chapter 1:7 pp.
- Cha, R.S. and Thylly, W.G. 1995. *Specificity, efficiency and fidelity of PCR* In: PCR Primer A Laboratory Manual. Edited by Dieffenbach C.W and Dveksler G.S. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 37-51.
- Chandrappa, M., Kamanavalli, H. and Ninnekar, Z. 2004. Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* species. *Current Microbiology*. 48:10-13.
- Chartrand, A. B., Moy, S., Safford, A.N., Yoshimura, T. and Schinazi, L.A. 1985. Ocean Dumping under Los Angeles Regional water quality control board permit. A Review of Past Practices, Potential Adverse Impacts, and Recommendations for Future Action. Report of the Los Angeles Regional Water Quality Control Board. 44 pp.
- Cheung, Pui-Yi and Kinkle, B. 2001. *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5):2222-2229.
- Clarke, K.R. and Gorley, R.N. 2006. Primer 5(PV6): User manual/tutorial, Primer-E, Plymouth UK, 91 pp.

- Connon, S.A. and Giovannoni, S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3878-3885.
- Corona-Cruz, A., Gold-Bouchot, G., Gutiérrez-Rojas, M., Monroy-Hermosillo, O. and Favela, E. 1999. Anaerobic-aerobic biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 63(2):219-225.
- Costa, R., Gomes, N., Milling, A. and Smalla, K. 2004. An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:230-234.
- Cottrell, M.T. and Kirchman, D.L. 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:5116-5122.
- Cupul-Magaña, A.L., Pérez-Higuera, R. y Chee-Barragán, A. 1987. Utilización de los minerales pesados como indicadores de los sedimentos entre Punta los Buenos y Playas de Rosarito, B. C., México. *Ciencias Marinas*. 13(4):97-109.
- Curtis, H. y Barnes, N.S. 2000. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. 6^a edición. 1496 pp.
- Daesslé, L.W., Ramos S.E., Carriquiry, J.D., and Camacho, V.F. 2002. Clay dispersal and the geochemistry of manganese in the northern Gulf of California. *Cont. Shelf Res*. 22:1311-1323.
- Dahlberg, C., Linberg, C., Torsvik, V.L. and Hermansson, M. 1997. Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various

degrees of homology to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12):4692-4697.

- Dailey, M.D., Anderson, J.W., Reish, D.J. and Gorseline, D.S. 1993. *The California Bight: Background and setting*. In: Dailey, M.D. Reish D. J. and Anderson, J.W. (eds.), *Ecology of the Southern California Bight: A Synthesis and Interpretation*. University of California Press. Berkeley, CA, pp. 1-18.
- Davis, G., Franco, E., Gilardis, K., Macías, V., Rodriguez, V. and Yochem, P. 2006. *A vital signs monitoring program for the Baja California Pacific near shore marine ecosystem Tijuana to San Quintín*. Conceptual Ecosystem Model-version 3/13/06. 25 pp.
- De Long, R.L., Gilmartin, W.G. and Simpson, J.G. 1973. Premature births in California sea lions: Associations with high organochlorine pollutants residue levels. *Science* (181):1168-1169.
- Díez, B., Bauer, K. and Bergman, B. 2007. Epilithic cyanobacterial communities of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): diversity and diazotrophy. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:3656-3668.
- Difco, Manual. 1984. *Dehydrated culture media and reagents for microbiology*. 10th ed. DIFCO laboratories. Detroit, Michigan. 1115 pp.
- DiGiacomo, P.M., Washburn, L., Holt, B. and Jones, B.H. 2004. Coastal pollution hazards in southern California observed by SAR imagery: storm water plumes, wastewater plumes, and natural hydrocarbon seeps. *Marine Pollution Bulletin* 49: 1013-1024.

- Dirección de Desarrollo Urbano y Ecología. 2000. Programa Parcial de Desarrollo Urbano. Gobierno del Estado, Gobierno Municipal de Ensenada y SEDESOL.
- Dominik, K., and Höfle, M.G. 2002. Changes in bacterioplankton community structure and activity in a eutrophied lake as revealed by 5S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3606-3613.
- Duarte, G., Soares, A., Seldin, L., Araujo, W. and Van Elsas, J. 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3):1052-1062.
- Edlund, A. 2007. *Microbial diversity in Baltic Sea sediments*. Thesis doctoral, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 36 pp.
- Edlund, A. and Jansson, J.K. 2006. Changes in active bacterial communities before and after dredging of highly polluted Baltic Sea sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:6800-6807.
- Edlund, A., Soule, T., Sjöling, S. and Jansson, K. 2006. Microbial community structure in polluted Baltic Sea sediments. *Environmental Microbiology* 8(2):223-232.
- Eganhouse, R.P., Pontolillo, J. and Leiker, T.J. 2000. Diagenetic fate of organic contaminants on the Palos Verdes Shelf, California. *Mar. Chem.* 70:317-338.
- Eiler, A., González-Rey, C., Allen, S. and Bertilsson, S. 2007. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperatura in brackish water. *FEMS Microbiol Ecol.* 60:411-418.

- EPA, Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. 2001. Informe de avance del Programa de Infraestructura de Agua Potable y Aguas Residuales para la Frontera entre Estados Unidos y México. EPA-832-R-00-001.
- Fenchel, T. and Finlay, B.J. 1995. *Ecology and evolution in anoxic worlds*. Oxford Univeristy Press. 294 pp.
- Figueroa-González, J.C. 2006. *Circulación superficial en la región costera de Rosarito a San Diego, utilizando radares de alta frecuencia*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada Baja California, México. 96 pp.
- Foght, J., April, T., Biggar, K. and Aislabie, J. 2001. Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A Review. *Bioremediation Journal*. 5(3):225-246.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M., and Rossi, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*. 4(11):634-643.
- Furhman, J.A., Lee, S.H., Masuchi, Y. and Davis, A.A. 1994. Characterization of marine prokaryotic communities via DNA and RNA. *Microb. Ecol.* 28:133-145.
- García-Ortega, A.M. 1997. *Caracterización molecular de especies marinas del género Vibrio*. Facultad de Ciencias Químicas, UABC-Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, B.C. Tesis de Licenciatura. 45 pp.
- Gillan, D.C. and Pernet, F. 2007. Adherent bacteria in heavy metal contaminated marine sediments. *Biofouling*. 23:1-13.

- Gillan, D.C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G. and Dubois, P. 2005. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(2):679-690.
- Giovannoni, S.J, Britschgi T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 345:60-63.
- Giovannoni, S.J. and Rappé, M.S. 2000. *Evolution diversity and molecular ecology of marine ecology of marine prokaryotes*. In: Chapter 3 Microbial Ecology of the Oceans. Kirchman, Eds. Wiley-Liss Inc, pp. 47-131.
- Giovannoni, S.J., Rappé, M.S., Vergin, K.L. and Adair, N.L. 1996. 16S rRNA genes reveal stratified open ocean bacterioplankton populations related to the Green Non-Sulfur bacteria. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93:7979-7984.
- Godínez-Sandoval, V. M. 1986. *Dispersión frente a la costa de Rosarito, B. C.* Tesis de Licenciatura en Oceanología. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B. C. 69 pp.
- Gutiérrez-Galindo, E. A., Sañudo-Wilhelmy, S.A. y Flores-Báez, B.P. 1983. Variación espacial y temporal de pesticidas organoclorados en el mejillón *Mytilus californianus* (Conrad) de Baja California. *Ciencias Marinas*. 9(1): 7-18.
- Gutiérrez-Galindo, E.A., Flores-Muñoz, G., Ortega-Lara, V. y Villaescusa-Celaya, J.A. 1994. Metales pesados en sedimentos de la costa fronteriza Baja California (México), California (EUA). *Ciencias Marinas*. 20 (1):105-124.

- Gutiérrez-Galindo, E.A., Ríos-Mendoza, L.M., Flores-Muñoz, G. and Villaescusa-Celaya, J.A. 1998. Chlorinated hydrocarbons in marine sediments of the Baja California (México) California (USA) border zone. *Marine Pollution Bulletin*. 36(1):27-31.
- Hagström, Å., Pommier, T., Rohwer, F., Simu, K., Stolte, W., Svensson, D. and Zweifel, U.L. 2002. Use of 16S Ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7):3628-3633.
- Hall, B.G. 2001. Phylogenetic trees made easy. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA. 3 Edition. 233 pp.
- Hay, A.G. and Focht, D.D. 1998. Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethylene (DDE) by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:2141-2146.
- Head, I.M., Saunders, J.R. and Pickup, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*. 35:1-21.
- Herbert, R.A. and Bell, C.R. 1977. Growth characteristics of an obligately psychrophilic *Vibrio* sp. *Arch. Microbiol.* 113:215-220.
- Herrick, J.B., Stuart-Keil, K.G., Ghiorse, W.C. and Madsen, E.L. 1997. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(6):2330-2337.
- Hickey, N.W. 1986. Border sewage update, continuing plan of action. Chief Administrative Office of Special Projects. Sacramento, California. 16 pp.

- Hohnstock, A.M., Stuart-Keil, K.C., Kull, E.E. and Madsen, E.L. 2000. Naphthalene and donor cell density influence field conjugation of naphthalene catabolism plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(7):3088-3092.
- Holliger, C. and Schraa, G. 1994. Physiological meaning and potential for application of the reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 15:297-305.
- Hom, W.R., Risebrough, R.W., Souter, A. and Young, D.R. 1974. Deposition of DDE and polychlorinated biphenyls in dated sediments of the Santa Barbara Basin. *Science* 184 (142):1197-1199.
- Hong, Z., Yonglong, L., Dawson, R. W., Yahuan, S. and Tieu, W. 2005. Classification and ordination of DDT and HCH in soil samples from the Guanting Reservoir, China. *Chemosphere*. 60:762-769.
- Horn, M.H. and Allen, L.G. 1985. Fish community ecology in the Southern California bays and estuaries. Chapter 8. In: *community ecology in estuaries and coastal lagoons: Towards and ecosystem integration*. (A. Yañez-Arancibia, Ed.). UNAM Press, México, pp. 169-190.
- Hou, B.K., Ellis, L.B.M. and Wackett, L.P. 2004. Encoding microbial metabolic logic: predicting biodegradation. *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 31:261-272.
- Huang, H.J., Liu, S-M. and Kuo Ch-E. 2001. Anaerobic biodegradation of DDT residues (DDT, DDD, and DDE) in estuarine sediment. *J. Environ. Sci. Health*. 36(3): 273-288.
- Ikeda, S., Ytow, N., Ezura, H., Minamisawa, K. and Fujimura, T. 2006 Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants. *Plant Biotechnology*. 23:137-151.

- Johnsen, A.R. and Kroer, N. 2007. Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events. *FEMS Microbiol Ecol.* 59:718-728.
- Jørgensen, B.B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed the role of sulphate reduction. *Nature.* 296:643-645.
- Kachane, A.N., Thimis K.N. and Martin dos Santos, V.P.A. 2005. Uracil content of 16S rRNA of thermophilic and psychrophilic prokaryotes correlates inversely with their optimal growth temperatures. *Nucleic Acids Research.* 33(13):4016-4022.
- Lal, R. and Saxena, D.M. 1982. Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiological Review.* 46(1):95-127.
- LaMontagne, M.G., Leifer, I., Bergmann, S. and van De Werfhorst, L.C. 2004. Bacterial diversity in marine hydrocarbon deep sediments. *Environmental Microbiology.* 6(8):799-808.
- Lara-Martín, P.A., Gómez-Parra, A., Petrovic, M., Barceló, D., y González-Mazo, E. 2005. Distribución de contaminantes orgánicos en sedimentos costeros de la Bahía de Cádiz (S de España). *Ciencias Marinas.* 31(1B):203-212.
- Laurie, A.D. and Lloyd-Jones, G. 2000. Quantification of phnAc and nahAc in contaminated New Zealand soils by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 66(5):1814-1817.
- Lee, D.H., Zo, Y.G. and Kim, S.J. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-Single strand

- conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3112-3120.
- Lee, H.J. 1994. The distribution and character of contaminated effluent-affected sediment, Palos Verdes Margin, Southern California. Expert Report 2, *Southern California Damage Assessment Witness Reports*. 261 pp.
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. and Springael, D. 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:1944-1955.
- Llobet-Brossa, E., Rabus, R., Böttcher, M.E., Könneke, M., Finke, N., Schramm, A. 2002. Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment a multi-method approach. *Aquatic Microbiology Ecology*. 29:211-226.
- López-García, P., López, A., Moreira, D. and Rodríguez, F. 2001. Diversity of free living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiology Ecol*. 36:193-202.
- Lösekann, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A. and Amann, R. 2007. Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:3348-3362.
- Macías-Zamora, J. V. and Ramírez-Álvarez, N. 2004. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. *Environ Pollut*. 130:229-238.
- Macías-Zamora, J.V. 2001. Monitoring coastal waters from Tijuana to Ensenada. *Bight Bulletin* No.2.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2000. *Brock's biology of microorganisms*. 9th edition. Prentice Hall. 992 pp.
- Madrid, V.M., Taylor, G.T., Scranton, M.I. and Christoserdov, A.Y. 2001. Phylogenetic diversity of bacterial and archeal communities in the anoxic zone of the Cariaco Basin. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1663-1674.
- Marmolejo-Lara, M. 1985. *Control de asolvamiento en una obra de toma de agua marina*. Tesis de Licenciatura en Oceanología. Escuela Superior de Ciencias Marinas, U. A. B. C. Ensenada, B. C. 66 pp.
- Martínez-Cordero, M.A. y Gavilán-García, A. 2004. La investigación en México en materia de compuestos orgánicos persistentes. *Gaceta Ecológica*. 072:5-20.
- McMeekin, T.A. 1988. Preliminary observations on psychrotrophic and psychrophilic, heterotrophic bacteria from antarctic water samples. *Hydrobiologia*. 165:35-40.
- Mills, H.J., Hodges, C., Wilson, K., McDonald, I.R., and Sobecky, P.A. 2003. Microbial diversity in sediments associated with surface breaching gas hydrate mounds in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiology Ecology*. 46:39-52.
- Moon-van der Staay, S. Y., De Watcher, R. and Vaulot, D. 2001. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*. 409:607-610.
- Moran, M.A., Buchan, A., González, J.M., Heidelberg, J.F., Whitman, W.B., Kiene, R.P., Henriksen, J.R., King, G.M., Belas, R., Fuqua, C., Brinkac, L., Lewis, M., Johri, S., Weaver, B., Pai, G., Eisen, J.A., Rahe, E.,

- Sheldon, W.M., Ye, W., Miller, T.R., Carlton, J., Rasko, D.A., Paulsen, I.T., Ren, Q., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Madupu, R., Nelson, W.C., Sullivan, S.A., Rosovitz, M.J., Haft, D.H., Selengut, J., and Ward, N. 2004. Genome sequence of *Silicibacter pomeroyi* reveals adaptation to the marine environment. *Nature*. 432(7019):910-913.
- Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* 39(2):144-167.
- Morris, R.M., Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Slebold, W.A., Carlson, C.A. and Giovannoni, S.J. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 420:806-809.
- Murayama, A., Taniguchi, R., Tanaka, H., Ishiwa, H., and Higashihara, T. 1997. Low-temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench. *Mar. Biol.* 128:705-711.
- Musat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., van Beusekom, J.E., de Beer, D., Dubilier, N. and Amann, R. 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst. Applied and Environmental Microbiology*. 4:333-348.
- Mußmann, M., Ishii, K., Rabus, R. and Amann, R. 2005. Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environmental Microbiology*. 7(3):405-418.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion Microbiology*. 2:317-322.
- Nadeau, L.J., Menn, F.M., Breen, A. and Sayler, G.S. 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by

- Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:51-55.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V. and Øvreås, L. 2000. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*. 64:1382-1388.
- National Research Council. 1990. *Monitoring Southern California's Coastal Waters*. Ed. National Academy Press. 154 pp.
- National Research Council. 1993. *Managing Wastewater in Coastal Urban Areas*. National Academy Press, Washington D.C. 478 pp.
- Nei, M. and Sudhir, K. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. 333 pp.
- Nichols, D. 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology*. 60:351-357.
- Nishikawa, K., Sañudo-Wilhelmy, S. A. y Rivera-Duarte, I. 1984. Estado de la contaminación actual en la zona fronteriza México-E. U. A. Perspectivas para su control y reducción. Reunión de ecología del mar de Cortés. SEDUE, 4-6 de abril. La Paz, BCS, pp. 87-91.
- Noble, M.A., Sherwood, C.R., Lee, H., Jingping, Xu., Dartnell, P., Robertson, G., and Martini, M. 2001b. Conference an Exhibition in: *Oceans, MTS/IEEE* Volume: 3, pp. 1996-2000.
- Noble, R.T., Dorsey, J.H., Leecaster, M.L., Orozco-Borbón, M.V., Reid, D., Shiff, K.C. and Weisberg, S.B. 2001a. A regional survey of the microbiological water quality along the shoreline of the Southern California Bight. *Southern California Coastal Water Research Project, Annual Report 1999-2000*. Long Beach, CA, pp. 218-225.

- Noblet, J.A., Zeng E.Y., Baird, R., Gossett, R.W., Ozretich, R.J. and Phillips, Ch.R. 2003. Southern California Bight 1998 Regional Monitoring Program:VI. Sediment Chemistry. *Southern California Coastal Water Research Project*, Westminster CA. 277 pp.
- Nogales, B., Moore, E.R.B., Abraham, W.R. and Timmis, K.N. 1999. Identification of the metabolically active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil. *Environmental Microbiology*. 1(3):199-212.
- Oey, L.Y. 1999. A forcing mechanism for the poleward flow off the southern California coast. *J Geophys. Res.* 104:13529-13539.
- Olson, B.H. and Tsai, Y.L. 1992. *Molecular approaches to environmental management*. In: Environmental microbiology. Ralph Mitchell (Eds.). New York, John Wiley-Liss, pp. 239-263.
- Oto, M., Suda, W. and Shinoyama, H. 2006. 16S rRNA gene-based analysis of microbial community by whole-genome amplification and minigel-single-strand conformation polymorphism technique. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102 (5): 482-484.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 734-740.
- Partida-Gutiérrez, D.I., Villaescusa, J.A., Macías-Zamora, J.V. y Castillón, F.F. 2003. Contaminantes orgánicos persistentes en núcleos de sedimentos de la región sur de la Cuenca de las Californias. *Ciencias Marinas*. 29(4):521-534.
- Paul, D., Pandey, G., Meier, C., van der Meer, J.R. and Jain, R.K. 2006. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and

- assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57:116-127.
- Periódico Oficial de Baja California. 2001. Programa regional de desarrollo urbano, turístico ecológico del corredor costero Tijuana-Ensenada (COCOTREN).
- Peris, E., Requena, S., de la Guardia, M., Pastor, A., and Carrasco, J. M. 2005. Organochlorinates pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere*. 60:1542-1549.
- Peters, M., Tomitas, A., and Nurk, A. 2004. Organization of the horizontally transferred pheBA operon and its adjacent genes in the genomes of eight indigenous *Pseudomonas* strains. *Plasmid*. 52(3)230-236.
- Pfaender, F.K. and Alexander, M. 1972. Extensive microbial degradation of DDT *in vitro* and DDT metabolism by natural communities. *J. Agric. Food Chem.* 20:842-846.
- Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A. and Stephanou, E.G. 2005. Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the eastern Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*. 49:367-378.
- Pomeroy, L.R and Wiebe, W. 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. 23:187-204.
- Porter, K. G. and Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology Oceanography*. 25(5):943-948.
- Purdy, K.J., Nedwell, D.B. and Embley, T.M. 2003. Analysis of the sulfate reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting

- Antarctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:3181-3191.
- Quensen, J.F. III., Tiedje, J.M., Jain, M.K. and Mueller, S.A. 2001. Factors controlling the rate of DDE dechlorination to DDMU in Palos Verdes margin sediments under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology*. 35(2):286-291.
- Quensen, J.F. III., 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.
- Raco-Rands, V. 1999. Characteristics of effluents from large municipal wastewater treatment facilities in 1996. *Southern California Coastal Water Research Project, Annual Report 1997-1998*. Long Beach, CA, pp. 2-17.
- Radjasa, O.K., Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K. and Ohwada, K. 2001. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from the northwestern Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA analysis. *Marine Biotechnology*. 3:454-462.
- Ramírez-Álvarez, N. 2000. *Distribución de los alquil benceno lineales (ABL), trazadores de aguas residuales en sedimentos recientes de la frontera México-E.U.A. a Punta Banda, Ensenada, Baja California, México*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B. C. México, 76 pp.
- Ramírez-Álvarez, N., Macías-Zamora, V., Burke, R.A. and Rodríguez-Villanueva, V.L. 2007. Use of $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and carbon to nitrogen ratios to evaluate the impact of sewage-derived particulate organic matter on the

- benthic communities of the southern California Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26 (11). In press.
- Rappé, M.S., and Giovannoni, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microb.* 57: 369-394.
- Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., and Giovannoni, S.J. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton. *Nature*. 418:630-633.
- Ravenschlag, K., Sahm, K. and Amann, R. 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology*. 67:387-395.
- Regeard, Ch., Maillard, J., Dufraigne, Ch., Deschavanne, P. and Holliger, Ch. 2005. Indications for acquisition of reductive dehalogenase genes through horizontal gene transfer by *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6):2955-2961.
- Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P. and Pickup R.W. 2000. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9):3883-3890.
- Rittmann, B.E. 2002. The role of molecular methods in evaluating biological treatment processes. *Water Environment Research*. 74(5):421-427.
- Ritz, K. 2007. The plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60:358-362.

- Sambrook, J., Fritsch E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Book 2. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, O., Gasol, J.M., Massana, R., Mas, J. and Pedrós-Alió, C. 2007. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:5962-5967.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A. 1983. *Estimación de la carga orgánica de la ciudad de Tijuana*, B. C. Tesis de Licenciatura en Oceanología. Escuela de Ciencias marinas. U. A. B. C. Ensenada, B. C. 81 pp.
- Savelkoul, P.H.M., Aarts, H.J.M., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J.I.W., Schouls, L. and Lenstra, J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: The state of an Art. *Journal of clinical microbiology*. 37(10):3083-3091.
- SCCWRP. 1989. Marine outfalls: 1987 inputs from wastewater treatment plants, power plants, and industrial facilities. *Southern California Coastal Water Research Project*, Annual Report 1989. Long Beach, CA, pp. 30-37.
- Schäfer, H. and Muyzer, G. 2001. *Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology*. In: *Methods in Microbiology, Marine*, Vol. 30, JH Paul (ed.), Academic Press, pp. 425-468.
- Schiff, K. C. and Allen, M.A. 2000. Chlorinated hydrocarbons in flat fishes from the Southern California, USA, Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(6):1559-1565.

- Schiff, K. C., Maruya, K. and Christenson, K. 2006. Southern California Bight 2003 Regional Monitoring Program: II. Sediment Chemistry. *Southern California Coastal Water Research Project*, Westminster, CA. 67 pp.
- Schiff, K.C., Allen M.J., Zeng, E.Y. and Bay, S.M. 2000. Southern California. *Marine Pollution Bulletin*. 41(1-6):76-93.
- Schmalenberger, A. and Tebbe, Ch.C. 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR. Amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*. 12:251-262.
- Schut, F., Prins, R.A., and Gottschal, J.C. 1997. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat Microbial Ecol.* 12:177-202.
- Schwieger, F. and Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation-polimorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:4870-4876.
- Secretaría de Salud. 1992. Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos. 30 pp.
- Segovia-Zavala, J.A., Delgadillo-Hinojosa, F., Orozco-Borbón, M. V., Muñoz-Barbosa, A. y Canino-Herrera, S.R. 1995. Distribución de DBO y bacterias en la costa fronteriza México-EUA. *Ciencias Marinas*. 21:415-426.
- Skelton, P., Smith, A. and Monks, N. 2002. *Cladistics a Practical Primer on CD-ROM*. Cambridge University Press. 80 pp.
- Sobecky, P.A., Mincer, T.J., Chang, M.C. and Helinski, D.R. 1997. Plasmids isolated from marine sediment microbial communities contain replication

- and incompatibility regions unrelated to those of known plasmid groups. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:888-895.
- Stainer, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P. P. 1996. *Microbiología*. 2^{da} edición, Editorial Reverté. 750 pp.
- Steffen, C., Ankenbauer, W., Poauer-Hofmann, R., Bye, S., Eiseisen, D., Frey, B. 1999. *PCR Applications*. Manual 2nd ed. Mannheim: Roche, pp. 10-48.
- Steinberger, A., Stein, E. and Schiff, K. 2002. Characteristics of dredge material disposal to the Southern California Bight between 1991 and 1997. California and the world ocean 02: *Revisiting and California's Ocean Agenda*, pp. 1361-1376.
- Suárez- Rodríguez, M. 1993. *Degradación de los ácidos 3- y 4- hidroxibenzoico en Klebsiella pneumoniae: purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas*. Memoria Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. 153 pp.
- Suárez-Vidal, C.E. y Acosta-Ruiz M.J. 1976. Distribución de las concentraciones de DDT en mejillón *Mytilus californianus* en la parte noroccidental de la Baja California. *Ciencias Marinas*. 3(2):1-7.
- Susuki, Y., Inagaki, F. and Takai, K. 2003. Microbial diversity in dead chimney structures found in deep-sea hydrothermal systems, Mid-Okinawa trough and Indian Ocean Ridge. Published only in Database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=2820823>
- Suzuki, M.T., Rappe, M.S., Haimberger, Z.W., Winfield, H., Adair, N., Strobel, J. and Giovannoni, S.J. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 983-989.

- Takemoto, K., Nacher, J.C. and Akutsu, T. 2007. Correlation between structure and temperature in prokaryotic metabolic networks. *BMC Bioinformatics*. 8:303. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/8/303>
- Tanner, R.S. 1997. *Cultivation of bacteria and fungi*. In: Chapter 6 Manual of Environmental Microbial. Hurst, Ch. J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walterm, M.V. editors. ASM Press, Washington, D.C. pp. 52-60.
- Tebbe, Ch.C., Schmalenberger, A., Peters, S. and Schwieger, F. 2001. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. Scientific Press. Wymondham, UK, pp. 161-175.
- Thiel, V., Neulinger, S.C., Staufenberger, T., Schmaljohann, R. and Inhoff, J.F. 2007. Spatial distribution of sponge-associated bacteria in the Mediterranean sponge *Tethya aurantium*. *FEMS Microbiology Ecology*. 59:47-63.
- Torsvik, V., and Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion Microbiology*. 5:240-245.
- Tran, K. and Zeng, E.Y. 1999. Use of equilibrium partitioning theory to determine routes of chlorinated hydrocarbon uptake in hornyhead turbot. In: Weisberg S.B. (Ed.), *Southern California Coastal Water Research Project*. Annual Report 1997-1998. Westminster CA, pp. 32-42.
- Tropel, D. and van der Meer, J.R. 2004. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(3):1092-2172.

- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E., Ram, R.J. and Richardson, P.M. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43.
- U.S. Geological Survey. 1977. *Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples*. In: Greeson, P.A., Chairman, T.A., Ehlke, G.A., Irwin B.W. Lium y Slack, K.V (eds.). Techniques of Water-Resources Investigations of the United States Geological Survey. U.S. Government printing office, Washington D.C. 332 pp.
- Van Den Hoop, M.A.G.T. and Kreule, P. 1999. Sorption kinetics and transformation of DDT in sediment. *Water, Air, and Soil. Pollution*. 110:57-66.
- Venkatesan, M.I., de Leon, R.P., van Geen, A. and Luoma, S.N. 1999. Chlorinated hydrocarbon pesticides and polychlorinated biphenyls in sediment cores from San Francisco Bay. *Marine Chemistry*. 64:85-87.
- Venosa, A.D., Stephen, J.R., Macnaughton, S.J., Chang, Y. and White, D.C. 1999. *Microbial population changes during bioremediation o fan experimental oil spill*. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C.R., Brylinsky, M. and Jonson-Green, P. (eds.). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Vetriani, C., Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. 2003. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6481-6488.

- Wade, T.L., Brooks, J.M., Kennicut II, M.C., McDonald, T.J., Sericano, J.L and Jackson, T.J. 1993. GERG trace organics contaminant analytical techniques. In: *Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program. National Benthic Surveillance and Mussel Watch Projects 1984-1992*, Eds. G. G. Lauenstein and A. Y. Cantillo. NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 71. Silver Spring, MD, pp. 121-139.
- Wang, Y.S., Chiu, T.Ch. and Yen, J.H. 2004. Effects of microbial inhibitors on anaerobic degradation of DDT. *Biological and Photolytic Transformations*. 66:2257-2261.
- Water Environment Federation. 2007. Recycle, Reclaim, Reuse. City of San Diego Point Loma Wastewater Treatment Plant. *Water environmental and technology*. 19:8.
- Wickham, G.S. and Atlas, R.M. 1988. Plasmid frequency fluctuations in bacterial populations from chemically stressed soil communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(9):2192-2196.
- Wieringa, E.B.A., Overmann, J. and Cypionka, H. 2000. Detection of abundant sulphate-reducing bacteria in marine oxic sediment layers by a combined cultivation and molecular approach. *Environmental Microbiology*. 2:417-427.
- Young, D.R., Hessen, T.C. and McDermott D.J. 1976. An offshore biomonitoring system for chlorinated hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*. 7(8): 156-159.
- Zeng, E.Y. and Tran, K. 2002. Distribution of chlorinated hydrocarbons in overlying water, sediment, polychaete, and hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) in the coastal ocean, Southern California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(8):1600-1608.

- Zeng, E.Y. and Venkatesan, M.I. 1999. Dispersion of sediments DDTs in the coastal ocean off southern California. *Science of the Total Environment*. 229: 195-208.
- Zeng, E.Y., Bay, S.M., Tran, K. and Alexander, A. 2001. Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of Santa Monica Bay, California. In: Weisberg, S.B. and Elmore, D. (Eds.). *Southern California Coastal Water Research Project. Annual Report 1999-2000*. Westminster, CA, pp. 96-113.
- Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E.J., Short, J.M. and Keller, M. 2002. Cultivating the uncultured. *PNAS*. 99(24):15681-15686.