

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Degradación de 1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis[4-clorobenceno] (DDT)
por una cepa nativa de *Hygrophoropsis aurantiaca*



Para optar al título de

QUÍMICO BIÓLOGO.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, junio de 2002.

DL
06
T(285)

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBÉN DARIEL VELÁSQUEZ MIRANDA
VOCAL III	DR. FEDERICO ADOLFO RICHTER MARTÍNEZ
VOCAL IV	BR. JORGE JOSÉ GARCÍA POLO
VOCAL V	BR. LIZA LEONOR CARRANZA JUI

DEDICO ESTA TESIS

- A DIOS** Por iluminarme y darme la oportunidad de alcanzar esta meta
- A MIS PADRES** Douglas y Eva por su apoyo y amor incondicional les dedico este éxito
- A MIS HERMANOS** Diana, Douglas y Cristy con cariño y amor

DEDICO ESTE ACTO

- A MIS AMIGOS** Eliud, Jorge, Amanda, Lily, Beatriz, Luis y Mario
- A MIS SOBRINOS** Gerardo y Nadia
- A MI CUÑADA** Ligia
- A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**
- A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORES Lic. Carlos Klee y Licda. María del Carmen Bran por su invaluable apoyo, paciencia y consejos para el desarrollo de esta investigación.

Muy especialmente a Licda. María del Carmen de Arreola por su continuo interés, apoyo y sugerencias para la realización de la parte experimental.

Lic. Daniel Alarcón Osorio por la lectura y revisión del manuscrito.

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

AL DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Generalidades	5
3.2 Clasificación de los pesticidas	6
3.3 Efectos de los plaguicidas en los seres vivos	6
3.4 Resistencia en los seres vivos a los insecticidas	7
3.4.1 Factores que intervienen en el desarrollo de la resistencia	8
3.4.1.1 Factores genéticos	8
3.4.1.2 Factores biológicos	8
3.4.1.3 Factores operacionales	8
3.4.2 Tipos de resistencia	9
3.4.2.1 Resistencia cruzada	9
3.4.2.2 Resistencia múltiple	9
3.4.3 Principales mecanismos de resistencia	9
3.4.3.1 Detoxificación metabólica	9
3.4.3.2 Insensibilidad del sitio de acción	10
3.4.3.3 Resistencia por comportamiento	10
3.4.3.4 Penetración reducida	11
3.4.4 Especies de insectos resistentes reportados en Guatemala	11
3.5 Biorremediación de suelos contaminados con pesticidas	11
3.5.1 Ventajas de la tecnología de biorremediación	12
3.5.2 Factores ambientales de la biorremediación	13
3.5.2.1 Disponibilidad de nutrientes y oxígeno	13
3.5.2.2 Contenido de humedad del suelo	14
3.5.2.3 pH del suelo	14
3.5.2.4 Temperatura	14
3.5.2.5 Adsorción y desorción del plaguicida en el suelo	14
3.5.2.6 Tamaño de partículas en el suelo	16
3.6. Biodegradación de insecticidas	16
3.6.1 Insecticidas organoclorados	17
3.6.1.1 Derivados clorados del etano	17
3.6.1.2 Hexaclorodiclohexanos (BCH o BHC)	18
3.6.1.3 Insecticidas ciclodienos clorados	18
3.6.1.4 Terpenos clorados	19

3.7. Degradación de compuestos xenobióticos por hongos	19
3.7.1 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	21
3.7.2 <i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	21
3.8. Métodos de laboratorio para la detección de pesticidas en el ambiente	22
3.8.1 Ensayos inmunoenzimáticos (EIA)	22
3.8.2 Métodos cromatográficos	22
3.8.2.1 Bioautografía de contacto	23
3.8.2.2 Bioautografía de inmersión	23
3.8.2.3 Cromatografía de gases-espectrometría de masas	24
4. Justificación	25
5. Objetivos	26
6. Hipótesis	27
7. Materiales y Métodos	28
7.1 Universo de trabajo	28
7.2 Recursos	28
7.2.1 Recursos Humanos	28
7.2.2 Recursos Físicos	28
7.3 Materiales	29
7.3.1 Equipo y cristalería	29
7.3.2 Reactivos	29
7.4 Procedimiento	30
7.4.1 Fase de producción de la biomasa	30
7.4.2 Fase de degradación del insecticida	30
7.4.3 Fase de extracción del insecticida y análisis	31
7.5 Diseño experimental	31
8. Resultados	32
9. Discusión de resultados	43
10. Conclusiones	46
11. Recomendaciones	47
12. Referencias	48
13. Anexos	53

1. RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue determinar la capacidad de un organismo nativo para degradar compuestos recalcitrantes como una alternativa para la biorremediación.

Para el estudio de biodegradación del DDT (Diclorodifeniltricloroetano) se empleó una cepa nativa de *Hygrophoropsis aurantiaca* aislada por Bran MC. *et al.* (1998) colectada en los bosques de pino de la región del volcán Tajumulco; la cepa del hongo fue mantenida en agar MMN (Medio Melin-Norkrans), inoculada posteriormente en placas de agar PDA (Agar Papa-Dextrosa) y el crecimiento obtenido se resebró en frascos con caldo MMN y se incubó a 27 °C en agitador mecánico a 100 rpm por 4 semanas, hasta obtener la cantidad de biomasa necesaria para la realización de la parte experimental.

La biomasa producida se lavó tres veces en medio deficiente en nitrógeno y se inoculó por duplicado 0.3 g de la misma en frascos erlenmeyer conteniendo 150 ml de medio deficiente en nitrógeno modificado, según Beaudette *et al.* y se incubaron a 27 °C por 3 días con agitación de 100 rpm. Posteriormente se agregó a cada frasco 50 µl de la solución concentrada de DDT (15,000 ppm) para obtener una concentración final de 5 ppm en el medio de cultivo y se incubaron por 14 días a 27 °C con agitación mecánica de 100 rpm, paso esencial para el contacto del insecticida con el hongo y la obtención de una buena aireación del medio de cultivo.

Se utilizó también un control estéril que contenía el medio de cultivo más el insecticida para determinar la degradación del analito por otros factores diferentes al hongo. Se analizaron las muestras y los controles en duplicado, cada uno tres veces a un intervalo de 14 días.

Previo a la realización de la parte experimental fue necesario estandarizar las técnicas de recuperación del analito estudiado, así como la concentración y dilución apropiadas para el análisis por espectrometría de masas. Con ello se determinó que para la extracción del DDT agitando las muestras en ampollas de decantación con hexano durante un minuto 7 veces, previa filtración y llevadas a un volumen final de 10 ml, se obtuvo el 100% de recuperación del analito.

Al optimizar las condiciones de separación del DDT en el cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas en modo de adquisición de barrido (SCAN) se estableció que el patrón del DDT utilizado estaba compuesto de un 2.17% de 1,1'-(2,2-dicloroetenilideno)-bis[4-clorobenceno] (*p-p'*-DDE), un 26.78% de 1-cloro-2-[2,2,2-tricloro-1-(4-clorofenil)etil]-benceno (*o-p'*-DDT), y un 64.85% de 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

(*p-p'*-DDT), y que la relación masa-carga (m/z) de los iones característicos de cada uno de ellos fueron en su orden: *p-p'*-DDE: 246.00, 317.90, 176.10, 105.00; *o-p'*-DDT: 235.00, 165.00, 199.00, 75.10; *p-p'*-DDT: 235.00, 165.00, 199.00, 75.00, lo que permitió fijar los iones representativos de cada uno de ellos y proceder a la siguiente fase del estudio en modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM) para poder detectar el nivel de concentración del analito de 5 ppm.

Se encontró que *Hygrophoropsis aurantiaca* degradó el *p-p'*-DDE en un 18.43%, el *o-p'*-DDT en un 21.72% y el *p-p'*-DDT en un 22.39% durante el período de incubación de 14 días. En la muestra control sin adición del hongo, no se observó ninguna degradación.

En la última fase del estudio se procedió a la identificación de los metabolitos formados, evaporando las muestras iniciales y finales a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyeron posteriormente con 50 μ l de metanol para inyectarlas nuevamente en modo de adquisición de barrido (SCAN).

El 1-cloro-2-[2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno (*o-p'*-DDD) fue el único subproducto identificado de la biodegradación del DDT por *Hygrophoropsis aurantiaca*; al comparar los espectros de masas de la base de datos de la librería HHPEST del CG-MS en modo de adquisición de barrido (SCAN), la concordancia de los espectros (match) fue del 96% por lo cual se evidencia que el organismo es capaz de degradar el DDT y sus isómeros hacia DDD probablemente por medio de una declorinación reductiva.

Con los resultados obtenidos se demuestra que *Hygrophoropsis aurantiaca* es capaz de degradar moléculas complejas de compuestos xenobióticos como el DDT por cometabolismo a través de un sistema lignolítico no específico, el cual puede ser de mucha utilidad para la recuperación de suelos contaminados.

2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años de la década de 1930 y principio de 1940 fue sintetizado un nuevo grupo de pesticidas químicos que por su estructura química se les denominó hidrocarburos clorados [1]. Éstos han sido detectados casi desde su síntesis hasta nuestra época en mantos acuíferos, suelos y en humanos; también, poco a poco, los científicos se dieron cuenta de que sus propiedades tóxicas y recalcitrantes influían no sólo en los insectos, sino en otras especies de seres vivos [1,2].

Uno de los problemas relacionados con los pesticidas organoclorados es que son muy persistentes, y puede tomar años su biodegradación completa. La mayoría de los pesticidas organoclorados son relativamente insolubles en agua y pueden ser transportados del campo a los arroyos por lluvias torrenciales [3].

De los doce compuestos identificados como contaminantes orgánicos persistentes, el Aldrín, Clordano, Dieldrín, DDT, Endrín, Heptaclor, Hexaclorobenceno, Mirex, Toxafeno, Bifenilos Policlorados (PCB), Dioxinas y Furanos, se han utilizado en el pasado en gran cantidad en todo el mundo, hasta su prohibición por parte de algunos gobiernos. En países como Chile y Canadá se siguen usando [4,5]. Guatemala sigue utilizando el Endosulfán a pesar de sus propiedades potencialmente tóxicas [6-9].

Estos químicos se bioacumulan a concentraciones extraordinariamente altas en los animales que están en el final de la cadena alimenticia. Por ejemplo, las concentraciones del insecticida DDT podrían ser tan bajas como 0.02 partes por millón (ppm) en el plancton, pero aumenta a 900 ppm en los peces pequeños, 2,000 ppm en peces más grandes y aún mayormente en las aves que se alimentan de ellos como gaviotas o águilas. Esto provoca efectos como el adelgazamiento del cascarón del huevo, defectos de nacimiento, etc.

La mayoría de los insecticidas matan a los insectos dañando su sistema nervioso central y pueden dañar a otros seres vivos de la misma manera. Los animales ingieren los insecticidas a través de su respiración, tragando comida o agua contaminada o absorbiendo el químico a través de la piel o mucosas [3].

En la literatura se han descrito múltiples organismos que son capaces de degradar estos químicos a compuestos menos tóxicos. Dentro de este grupo, muchos géneros de organismos heterótrofos son capaces de utilizar los pesticidas como substratos, ya sea cometabolizando las moléculas o usándolas como nutrientes [10]. Se han descrito una infinidad de bacterias, actinomicetos y hongos capaces de degradar todas las familias de estos xenobióticos, siendo

a la fecha el hongo *Phanerochaete chrysosporium* el organismo más prometedor [11-13].

Actualmente es de gran importancia encontrar y describir grupos de organismos o microorganismos que sean capaces de degradar estos compuestos en la naturaleza, así como las vías metabólicas que utilizan y que puedan ser una solución para estos compuestos recalcitrantes.

En este estudio se trabajó con una cepa guatemalteca de *Hygrophoropsis aurantiaca* el cual se encuentra asociado a materia orgánica en descomposición en bosques de pino de Guatemala, y que pertenece a la misma Clase que *P. chrysosporium*.

En este trabajo se pretendió saber si *Hygrophoropsis aurantiaca* posee habilidades degradadoras frente a compuestos xenobióticos lo cual contribuiría enormemente a la biorremediación de suelos mediante el uso de cepas nativas. La demostración de estas propiedades se realizó utilizando una cepa aislada del volcán Tajumulco en la que se evaluó su respuesta frente al insecticida DDT, utilizando la Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).

3. ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

Los plaguicidas han tenido una función muy importante en el control de enfermedades como el paludismo, el dengue y el tifo; así mismo, han influido en el desarrollo agrícola controlando insectos, hierbas y otras plagas que destruyen gran parte de los cultivos y compiten por factores como espacio, humedad y nutrientes [2].

La historia de los plaguicidas se remonta a finales del siglo XIX cuando se utilizaron aceites de petróleo, mezclas con arsénico, sales de metales pesados, y compuestos tóxicos derivados de vegetales (nicotina, piretrina, rotenona) para combatir las plagas de insectos. Posteriormente, surgieron los primeros insecticidas orgánicos sintéticos, tales como tiocianatos y compuestos dinitrados [14]. Los pesticidas orgánicos empezaron a ser ampliamente utilizados después de la segunda guerra mundial. El primer grupo sintetizado fue el de los insecticidas organoclorados [1,3]; aunque el DDT (Diclorodifeniltricloroetano) fue sintetizado por Othmar Zeidler en 1874 fue utilizado por primera vez hasta 1942. A partir de entonces la lista de plaguicidas orgánicos sintetizados ha ido aumentando [14, 15].

Los pesticidas son compuestos químicos especialmente preparados para el control de poblaciones dañinas. Debido a que las especies nocivas pertenecen a diferentes categorías taxonómicas, los pesticidas se caracterizan comúnmente sobre la base del tipo de organismos sobre el cual actúan. Así, los insecticidas, herbicidas, fungicidas y nematocidas se designan para el control de insectos, malezas, hongos patógenos de plantas, y nemátodos [10]. No obstante, los insecticidas son plaguicidas no selectivos que actúan como neurotóxicos. La característica de no-selectividad de estas sustancias, las capacita para actuar en otros *phyla*, por lo que podría dárseles el nombre de biocidas [14].

3.2. Clasificación de los pesticidas

Desde el punto de vista de su composición química, los ingredientes activos de los plaguicidas se clasifican de la siguiente manera [2]:

- Compuestos orgánicos: Contienen átomos de carbono en su estructura química. La mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos. Pertenecen a distintos grupos o familias químicas y en cada uno de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, herbicidas u otros tipos de plaguicidas.
- Plaguicidas biológicos: Se llama así a los virus, microorganismos o productos derivados de su metabolismo, formulados como insumos que pueden controlar una plaga en particular.

En el anexo No. 1 se muestran los principales grupos de plaguicidas y su composición según la Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST) de México.

3.3 Efectos de los plaguicidas en los seres vivos

Los daños a la salud, ocasionados por los plaguicidas están relacionados con su estructura química y sus propiedades fisicoquímicas, las cuales modifican su afinidad por sistemas biológicos específicos y, de manera preponderante, la dosis a la que se expone, así como su susceptibilidad. En los humanos los plaguicidas organofosforados pueden causar la enfermedad de Parkinson, la exacerbación de las enfermedades infecciosas y aumentar la frecuencia de la leucemia linfocítica crónica (LLC) [2].

La mayoría de los plaguicidas se absorben por ingestión, inhalación, por vía cutánea y ocular. [16]. Su absorción depende de su estructura química además del solvente, la sustancia tensoactiva y el emulsificador utilizados en su formulación [17].

En general los plaguicidas son cancerígenos, mutagénicos, causan lesiones degenerativas en hígado y riñón, estimulan el sistema nervioso central, producen reacciones alérgicas como vómito, cefalea, conjuntivitis, diarrea, dolores abdominales, disnea y tos entre otros [2, 16]. En las aves, el DDT reduce su metabolismo, debido a interferencia en el metabolismo del calcio, con el peso del ave al empollarlo [1,3, 18,19], además de su efecto en las mismas [10]. Se ha demostrado también

que a concentraciones tan bajas como 11.4 $\mu\text{g/l}$ la LC_{50} * puede ser letal para la ostra americana (*Crassostrea virginica*), el camarón rosado (*Penaeus duorarum*), el camarón de suelo (*Palaemonetes pugio*) y los pececillos cabeza de oveja (*Cyprinodon variegatus*) [5,8]. En las algas verdes a concentraciones de 0.1 $\mu\text{g/l}$ puede causar inhibición del crecimiento y de la fotosíntesis [19]. En el anexo No. 2 se da la clasificación de la OMS para la toxicidad aguda [20].

En los mamíferos estos insecticidas se almacenan principalmente en la médula de los huesos y en el tejido adiposo, luego en el hígado, poco menos en el bazo, pulmones, glándulas adrenales, gónadas y riñones, y en menor cantidad en el cerebro, en el cual, se presenta a una mayor concentración en la materia blanca. Los ciclodienos se diferencian del grupo de los derivados clorados del etano, en que se concentran con mayor facilidad que éstos en el bazo, riñón y gónadas, pero no así en el hígado [14].

El Aldrín y el Dieldrín reducen la resistencia de los ratones a la infección vírica por sus efectos sobre los macrófagos y afectan posiblemente la capacidad de destruir las células infectadas y de presentar el antígeno vírico para las respuestas inmunitarias humorales específicas y las mediadas por células [21]. También se ha reportado que el DDT disminuye la gamma globulina y atrofia el timo en conejos dosificados por vía oral con 18 mg/Kg/día [22].

3.4. Resistencia en los seres vivos a los insecticidas

El uso a gran escala del DDT y el HCH en el período inmediato posterior a la segunda guerra mundial, trajo como consecuencia serios problemas de resistencia en los insectos [18]. La resistencia es el desarrollo de una población capaz de sobrevivir a dosis de plaguicidas que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal [18,23]. En general el criterio para definir la presencia de resistencia ha sido la supervivencia del 20% o más de los individuos sometidos a ensayos con las concentraciones de diagnóstico actualmente conocidas de los plaguicidas comúnmente disponibles, usando los estuches para ensayos sobre el terreno de la OMS [24]. La capacidad de sobrevivir se debe a factores genéticos, que se pasan de generación en generación [23,25,26].

* LC_{50} : La concentración que es letal o que efectivamente inmoviliza el 50% de una población de prueba entre un período de tiempo especificado. Es una medida de toxicidad aguda para organismos acuáticos.

3.4.1 Factores que intervienen en el desarrollo de resistencia

Dentro de los factores que influyen en la evolución de la resistencia de las plagas tenemos:

3.4.1.1 Factores genéticos [23,26]

- La proporción inicial de genes de resistencia en una población. Mientras mayor es la proporción, mayor las posibilidades de desarrollar resistencia.
- Número de genes involucrados. Mientras menor número de genes proporcione la resistencia, ésta se desarrollará más rápido.
- Dominancia de los genes. Si domina un gen que proporciona la característica de alto nivel de oxidasas, la población será resistente a insecticidas que puedan ser desdoblados por tales mecanismos de resistencia.

3.4.1.2 Factores biológicos

- Generaciones por año: Entre más generaciones por año tiene una población adquiere más rápidamente resistencia si están expuestas a presión de selección [18,23,26].
- Fertilidad y fecundidad. Si se presenta mayor progenie por generación aumenta la probabilidad de desarrollo de individuos resistentes [23].
- Migraciones. Una población emigrante adquiere más lentamente resistencia debido a que no está expuesta continuamente al mismo insecticida [23].

3.4.1.3 Factores operacionales [23]

- Naturaleza química del plaguicida. Un plaguicida sistémico ejerce mayor presión de selección que uno de contacto, consecuentemente desarrollará más rápidamente resistencia.
- Persistencia de residuos. Un plaguicida que tiene mayor persistencia o residualidad en el campo, produce mayor presión de selección, por lo tanto desarrolla más rápidamente resistencia que uno de poca persistencia.
- Dosis de aplicación. Dosis bajas dejan organismos susceptibles, dosis altas matan casi todos los organismos susceptibles favoreciendo a los individuos resistentes.
- Umbral de selección. A mayor porcentaje de control, mayor porcentaje de organismos susceptibles eliminados y por lo tanto la probabilidad de desarrollar resistencia es mayor.

- Estadío del insecto. Se debe atacar al estadío más susceptible del insecto. Un gusano de cogollero de dos días de edad es más susceptible que otro de 15 días.

3.4.2 Tipos de resistencia

3.4.2.1 Resistencia cruzada

Es el fenómeno por el cual una población de organismos, sometida a presión de selección con un plaguicida, adquiere resistencia a éste y a otros plaguicidas del mismo grupo toxicológico, aunque no hayan sido aplicados [18,23,27].

3.4.2.2 Resistencia múltiple

Es cuando varios mecanismos confieren resistencia al mismo plaguicida [23].

3.4.3 Principales mecanismos de resistencia

3.4.3.1 Detoxificación metabólica

Este es el tipo de resistencia más importante y el más conocido; depende de los niveles de enzimas que tengan los individuos en la población. Los individuos con mayor capacidad metabólica sobreviven a los insecticidas aplicados [23].

Los casos más comunes de detoxificación metabólica son los siguientes:

- 1) Oxigenasas de función mixta (OFM): Las oxigenasas son enzimas que el organismo produce y actúan incorporando oxígeno en la molécula del plaguicida volviéndola o no menos tóxica. Ejemplo: la molécula del insecticida Dimetoato es inactivada por una oxigenasa al incorporarle un oxígeno en un extremo de la misma [23,28].
- 2) Hidrolasas o esterases. En la molécula del insecticida Malation, la enzima esterasa puede desactivarla. La cual separa los extremos en otras dos moléculas volviéndola no tóxica para el insecto [23,27,29].
- 3) Glutation transferasas. La enzima transferasa convierte al DDT en DDE, el cual tiene menor actividad insecticida [23,27,29].

3.4.3.2 Insensibilidad del sitio de acción

Este tipo de resistencia es debido a cambios en el sitio donde actúa el insecticida. Debido a esta alteración del sitio de acción, el insecticida no se acopla y pierde el efecto sobre el estado fisiológico del insecto. Ejemplos de este tipo de resistencia son:

- 1) KDR (Knock Down Resistance) o resistencia al derribo. Se presenta en los insecticidas piretroides y organoclorados. Estos insecticidas causan una parálisis rápida al insecto lo que ocasiona su muerte. La resistencia al derribo se debe a una reducción en la densidad y en el número de sitios activos en la membrana neuronal, que es el lugar donde se acoplan estos insecticidas. [23].
- 2) En África del este el gen *kdr* ha sido detectado en poblaciones de *Anopheles gambiae* y confiere resistencia cruzada al DDT y un gran número de insecticidas piretroides [27].
- 3) Insensibilidad a ciclodienos. Los insecticidas del grupo ciclodienos como el Endosulfán, bloquean la transmisión del impulso nervioso, causando la muerte del insecto. Este tipo de resistencia es el resultado de alteraciones en el sitio activo que reconoce a estos compuestos [23].
- 4) Acetil Colinesterasa (ACE) insensible. En el proceso de transmisión nerviosa, la acetilcolina (AC) es la responsable de la transmisión del impulso nervioso. La ACE cataliza este transmisor y el impulso se detiene. Los insecticidas organofosforados y carbamatos inhiben la ACE por lo tanto la AC sigue transmitiendo el impulso nervioso y el insecto muere. La resistencia se debe a que existen múltiples formas mutantes de ACE en la que el insecticida no puede acoplarse y no ejerce su acción [23].
- 5) Resistencia a *Bacillus thuringiensis*. Las δ -endotoxinas derivadas de *B. thuringiensis* penetran a las larvas por ingestión. Las toxinas son activadas en el intestino medio por acción de las enzimas y el pH alcalino. Una vez activadas, las toxinas degradan las células del epitelio ciliar del intestino medio y provocan un desbalance iónico, el insecto deja de comer y eventualmente muere por septicemia. La resistencia es causada por la ausencia de receptores de toxinas en el epitelio del intestino medio [23,30].

3.4.3.3 Resistencia por comportamiento

Algunas poblaciones desarrollan cambios en su comportamiento en respuesta a la presión de selección ejercida por un insecticida, las cuales evitan la exposición del insecto a las dosis letales del insecticida [18,23,27].

3.4.3.4 Penetración reducida

En este caso se retarda la llegada del insecticida al sitio de acción, lo cual incrementa la posibilidad de eliminarlo. La facilidad de penetración del plaguicida dentro del insecto varía según la estructura y espesor de la cutícula, cubierta nerviosa, antenas, intestino, etc. [23].

3.4.4 Especies de insectos resistentes reportadas en Guatemala [24]

Anopheles albimanus. Resistente al DDT y organofosforados.

Anopheles pseudopunctipennis. Resistente al DDT y organofosforados.

Anopheles vestitipennis. Resistente al DDT.

Aedes aegypti. Resistente al DDT y organofosforados.

Culex quinquefasciatus. Resistente al DDT.

3.5 Biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas [2]

El problema de la contaminación ambiental que resulta de la toxicidad y persistencia en el ambiente de los compuestos xenobióticos, ha establecido la necesidad de desarrollar una gran variedad de procesos innovativos de tipo químico, físico y biológico, para eliminar compuestos orgánicos peligrosos del ambiente sin causar posteriores daños ecológicos.

En naciones con problemas de contaminación existe una gran demanda por tecnologías innovadoras de tratamiento, limpieza y rehabilitación ambiental. Dentro de éstas, está el uso de una gran diversidad de microorganismos y sus productos extracelulares para procesos de biorremediación en suelos contaminados por hidrocarburos y por plaguicidas químicos incluyendo herbicidas e insecticidas.

La biorremediación es un proceso por el cual se recuperan suelos o aguas contaminadas con compuestos tóxicos por medio del uso de organismos que degradan los mismos a compuestos menos dañinos; se ha llevado a cabo de manera natural desde que se inició la vida en el planeta Tierra, pero es un proceso relativamente lento. Se define como la destrucción de compuestos orgánicos por los microorganismos, con la consecuente producción de dióxido de carbono y agua o metano. Otra definición apropiada es la desaparición de las propiedades ambientales indeseables de una sustancia.

La biorremediación ofrece la posibilidad de degradar y transformar sustancias contaminantes en sustancias menos complejas y más fácilmente asimilables para otros organismos. Se lleva a cabo en cuatro pasos:

- a) Determinación del tipo y grado de contaminación, cantidad de suelo contaminado, propiedades del suelo y la identificación de bacterias nativas degradadoras del contaminante. Estas bacterias se identifican para utilizarlas en el proceso de biorremediación.
- b) Incremento en el número de bacterias por un proceso conocido como fermentación de la biomasa (masa total de microorganismos por un volumen dado).
- c) Aplicación de la biomasa al suelo contaminado por diferentes técnicas (inyección o aspersión).
- d) Monitoreo y mantenimiento de las condiciones ideales para el desarrollo de bacterias degradadoras al adicionar nutrientes, oxígeno, humedad y un balance óptimo ácido-base.

3.5.1 Ventajas de las tecnologías de biorremediación [2]

1. Son tecnologías seguras, económicas y más rápidas que algunos tratamientos fisicoquímicos.
2. Se utilizan sistemas biológicos cuyo costo es mínimo, más aún si se utiliza la población autóctona.
3. El ecosistema del sitio contaminado prácticamente no se altera.
4. No se generan desechos como producto del tratamiento, ya que los contaminantes son realmente degradados.
5. Pueden ser acoplados a otro tipo de tecnología cuando la remoción de los contaminantes no es la máxima deseada.
6. Los contaminantes adsorbidos o atrapados en los poros del suelo también son biodegradados.
7. Si la actividad microbiana no es la deseada, puede estimularse por la adición controlada de algunos compuestos requeridos por los microorganismos.
8. Cuando los contaminantes orgánicos son empleados como la principal fuente de carbono y energía, el proceso se realiza con mayor rapidez.

3.5.2 Factores ambientales para la biorremediación

Las poblaciones microbianas que destruyen compuestos orgánicos sintéticos son sujetas a una variedad de factores físicos, químicos y biológicos, que tienen influencia sobre su crecimiento y su actividad. Las características ambientales donde crecen, varían enormemente y estas diferencias tienen impacto sobre las poblaciones residentes, la proporción de transformaciones bioquímicas y la identidad y persistencia de los productos de degradación [2].

Los principales factores ambientales para la biorremediación son:

3.5.2.1 Disponibilidad de nutrientes y oxígeno

Las bacterias heterotróficas para crecer necesitan una fuente de carbono, otros nutrientes y un aceptor final de electrones, el cual es el oxígeno para el caso de las aerobias. Adicionalmente, las bacterias llegan a necesitar micronutrientes en concentraciones traza y algunos factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas u otras moléculas orgánicas [2].

Los suelos contienen bajas concentraciones de materia orgánica oxidable. Aunque el carbono puede presentarse en concentraciones de 1% o más, éste se presenta en formas complejas, por lo que las bacterias pueden utilizarlo solo con lentitud. Típicamente, el suministro del resto de los nutrientes excede los requerimientos de las bacterias, comparativamente con la disponibilidad de carbono; por lo que éste se convierte en el elemento limitante para su crecimiento [2,14].

No obstante, esta situación cambia cuando se introduce un contaminante en el suelo ya que puede aumentar la demanda de otro nutriente, como el nitrógeno y/o fósforo, así como la del aceptor de electrones, que se convierten en el factor limitante. La ausencia de éstos disminuye la proporción de degradación del contaminante[2].

Por lo tanto, para que un proceso de biorremediación tenga éxito, es importante vigilar la concentración de cada uno de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias, así como la proporción de cada uno de ellos para asegurar la mineralización del contaminante [2,14].

3.5.2.2 Contenido de humedad del suelo

Los microorganismos, al igual que todos los organismos vivos, necesitan de humedad para crecer, ya que se componen por más de un 80% de agua. Los nutrientes que se encuentran en el medio extracelular, se encuentran disueltos en agua lo cual facilita el paso a través de la membrana al interior de la misma. Las reacciones bioquímicas se realizan en medio acuoso [2,14,31].

Durante el proceso de biorremediación, si el contenido de agua es muy alto, será difícil que el oxígeno atmosférico penetre en el suelo. Por lo tanto, es importante mantener el contenido de humedad a un nivel adecuado, que de acuerdo a varios autores, es de 50 a 80 por ciento [2].

3.5.2.3 pH del suelo

La acidez o alcalinidad de una solución afecta el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de las bacterias crecen de manera óptima, en un rango de 6.5 a 7.5, aunque hay excepciones. En el curso de la biorremediación es necesario mantener el pH del suelo a un valor de 7, ya que las bacterias crecen rápidamente y son más resistentes a choques térmicos y condiciones de secado [2,14,31].

3.5.2.4 Temperatura

Se ha determinado que la temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias aisladas del suelo es entre 20 y 25 °C. Sin embargo, puede darse un proceso de biorremediación en zonas críticas a muy bajas o bien a altas temperaturas (por microorganismos termófilos) [2,14,31].

3.5.2.5 Adsorción y desorción del plaguicida en el suelo [2]

La solubilidad del plaguicida es importante tomarla en cuenta, ya que dependiendo de ella estará más o menos disponible para los microorganismos. Para que pueda ser degradado por bacterias puede ser necesario adicionar o no surfactantes que hagan más soluble el compuesto.

Algunas sustancias que se han reportado como degradables, no pueden ser degradadas bajo circunstancias particulares. Se han sugerido varias razones para explicar la falta de biodegradación de dichas moléculas, entre las que se incluyen:

- La concentración de sustancias tóxicas puede ser tan alta, que el crecimiento microbiano y su metabolismo no se llevan a cabo.
- La baja concentración de los nutrientes, previene el crecimiento bacteriano.
- El sustrato puede estar a concentraciones tan bajas, que no permite la reproducción de los microorganismos que contienen las enzimas catabólicas.
- El sustrato puede estar en forma que no sea disponible para los microorganismos.

Una variable importante para la biorremediación de un suelo contaminado con plaguicidas, es la disponibilidad de estos en el suelo para los microorganismos. Ésta está en función de la afinidad de la adsorción del compuesto orgánico al suelo. El plaguicida disponible para la biodegradación es equivalente a la cantidad disuelta en la fase acuosa. Si se aumenta la proporción de agua / sólidos del suelo, la cantidad total de plaguicida disponible para la degradación también se incrementará.

La no-disponibilidad de una molécula orgánica puede resultar de su sorción a los sólidos del suelo (inclusión dentro de la matriz física del suelo). La superficie de los constituyentes sólidos del suelo puede alterar la disponibilidad de compuestos orgánicos, provocar cambios en los niveles de varios nutrientes, modificar el pH, retener microorganismos o bajar la actividad de enzimas extracelulares. Las superficies activas del suelo pueden ser sustancias sencillas, sustancias húmicas o hidróxidos y óxidos amorfos de hierro y aluminio.

Las superficies de los sólidos a menudo actúan por adsorción, la cual se refiere a la retención de solutos, presentes originalmente en una solución, por la superficie de un material sólido.

La absorción es la retención del soluto dentro de la masa del sólido, más que en su superficie. En el término sorción se incluyen a ambos.

Existen muchos compuestos orgánicos que son adsorbidos y absorbidos dentro de los sólidos del suelo. Éstos incluyen: aminoácidos, fosfatos orgánicos, fosfatos, compuestos heterocíclicos de nitrógeno, alquilbencensulfonatos, surfactantes catiónicos y otros de alto peso molecular, por mencionar unos cuantos. Existen muchos factores que tienen influencia sobre la sorción de compuestos orgánicos, e incluyen el tipo y concentración de solutos en la solución que rodea al sólido.

3.5.2.6 Tamaño de partícula en el suelo

Los suelos pueden presentar diversas texturas, que equivalen al tamaño de partículas de los minerales que prevalecen en ellos. De acuerdo a la clasificación de estas partículas, las arenas son aquellas con un tamaño entre 0.05 y 2 mm de diámetro, los limos entre 0.05 y 0.002 mm y las arcillas debajo de 0.002. Las arenas proporcionan al suelo características de un drenaje más eficiente pero, por su mayor tamaño, tienen muy poca área superficial expuesta, comparativamente con aquellas de menor tamaño como las arcillas. Éstas últimas son más reactivas, tienen una carga negativa en su superficie y causan en el suelo condiciones pobres de drenaje. Por lo tanto, influyen en otras características del suelo tales como: textura, estructura, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, nitrógeno total, fósforo total, capacidad de campo y pH [2,14].

3.6. Biodegradación de insecticidas

Muchos géneros de organismos heterótrofos usan pesticidas como sustratos, ya sea cometabolizando las moléculas o usándolas como nutrientes. Las especies de *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Aerobacter*, *Hidrogenomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* entre las bacterias; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Phanerochaete*, *Mortierella*, *Saprolegnia*, *Pleurotus*, *Phellinus*, *Polyporus* y *Trichoderma* entre los hongos y *Micromonospora*, *Nocardia* y *Streptomyces* entre los actinomicetos, modifican una o más de las sustancias químicas sintéticas. La diversidad de sustratos se iguala a la diversidad de especies. Sin embargo, es muy raro poder predecir qué especies o aun qué géneros son los responsables de una transformación particular en la naturaleza [2,10-13].

En general existen dos vías por las cuales pueden ser degradados los pesticidas:

- a) la sustancia química sustenta el crecimiento, sirviendo como fuente de carbono, energía y, ocasionalmente, de nitrógeno y azufre.
- b) Los compuestos no sirven, aunque se metabolicen, como fuente de nutrientes. En estos casos la transformación es por cometabolismo, es decir el metabolismo realizado por un microorganismo de un compuesto que la célula es incapaz de emplear como fuente de energía o nutriente esencial. Por lo tanto, los heterótrofos de este tipo no pueden ser aislados por

cultivos de enriquecimiento en los cuales el medio contiene el pesticida como nutriente [5,6].

Las reacciones realizadas por los organismos heterótrofos para la transformación de estas sustancias son: a) Detoxicación, transformación de una molécula inhibitoria en un producto no tóxico; b) Degradación, transformación de un sustrato complejo en productos simples; c) Conjugación, formación de complejo o reacciones de adición, en la cual un organismo hace el sustrato más complejo o combina al pesticida con los metabolitos celulares; d) Activación, conversión de un sustrato no tóxico o pesticida putativo en una molécula tóxica, que es el pesticida real; e) Defusión, conversión de una molécula no tóxica, la cual puede ser pesticida en lugares donde este sujeta a activación enzimática, en un producto no tóxico que ya no está sujeto a activación; f) Cambio del espectro de toxicidad, en la cual el pesticida es tóxico para un grupo de organismos pero son metabolizados para formar productos que inhiben organismos totalmente diferentes [5].

3.6.1 Insecticidas organoclorados

Los insecticidas organoclorados son hidrocarburos cíclicos, clorados, apolares, lipofílicos, y estables bajo las condiciones ambientales. Estas características hacen que sean muy persistentes y se acumulen en la biosfera. [32]. Los insecticidas organoclorados se han clasificado en cuatro grandes clases:

- Derivados clorados del etano.
- Hexaclorociclohexanos (HCH o BHC).
- Ciclodienos clorados.
- Terpenos clorados.

3.6.1.1 Derivados clorados del etano

La base estructural de estos compuestos es una molécula de etano, a la cual están unidos dos grupos fenólicos, formando la estructura química básica de estos compuestos. Otros átomos (dentro de los que siempre se incluye el cloro) o grupo sencillo substituyen a algunos hidrógenos de la estructura básica, constituyendo diferentes tipos de insecticidas. Estos son los menos tóxicos, pero los más persistentes de los insecticidas organoclorados [32]. Ejemplos del grupo son el DDT (Diclorodifeniltricloroetano), el Metoxicloro y el Dicofol.

El DDT se disuelve en la grasa de la quitina del esqueleto externo de los insectos y al ponerse en contacto con los centros nerviosos produce parálisis [33]. En presencia de la luz ultravioleta, el DDT pierde HCl y se transforma en DDE (diclorodifenildicloroetileno), compuesto que carece de menor acción insecticida [17].

El anexo No. 3 da una idea general de algunas vías que el DDT puede tomar en el ambiente. Algunos de los análogos del DDT son subproductos del mismo. La ruta principal de reacción en los microorganismos es hacia TDE (tetraclorodifeniletano; o DDD: diclorodifenildicloroetano) y DDE (diclorodifenildicloroetileno). Este es un proceso de declorinación reductivo directo y se lleva a cabo por bacterias en el suelo y el agua. Los estudios en el destino metabólico de los otros productos del metabolismo del DDT son limitados [34].

3.6.1. 2 Hexaclorociclohexanos (HCH o BHC)

Estos compuestos también se conocen incorrectamente con el nombre de hexacloruros de benceno, de donde proviene la abreviatura de BHC. La propiedad insecticida de estas sustancias la descubrieron Dupire y Raucourt en Francia, y Slade en Inglaterra en 1942. Existen siete isómeros, siendo el isómero gamma el que posee mayor efectividad como insecticida, razón por la cual suele identificarse como Lindano (en honor del inglés Van der Linden) [34]. El Lindano es estable a la acción de la luz solar, del oxígeno del aire, del calor y de los ácidos concentrados, sin embargo, en medio alcalino se descompone y libera con facilidad ácido clorhídrico [18,33]. El isómero gamma de HCH fue usado extensivamente como un insecticida. Los estudios de su biodegradación son limitados. Este no se acumula como el DDT en los tejidos animales [32,34].

3.6.1.3 Insecticidas ciclodienos clorados

Son hidrocarburos cíclicos, cuyo grupo funcional básico (derivados del hexaclorociclopentadieno) se caracteriza por presentar un puente endo/exometilénico clorinado. Su molécula contiene seis o siete átomos de cloro en total. La mayor parte de estos compuestos se sintetizan por la reacción de Diels-Alder, de donde proviene el nombre de uno de ellos, el Dieldrín. Casi todas estas sustancias son isómeros o epóxidos de la misma estructura, pero a pesar de ello, varían en propiedades y grado de toxicidad [32]. Estos compuestos representan uno de los grupos más persistentes de pesticidas. Ejemplos son Aldrín, Dieldrín, Heptaclor, Isodrín, Endrín y

Endosulfán. Aldrín y Dieldrín han sido prohibidos en algunas partes y son solamente usados para propósitos especiales en otros [34,35].

En el suelo y en el agua la degradación es probablemente microbiana, pero algunas veces se dirige hacia la formación de una estructura de un epóxido en anillo en las moléculas. Esto es formado del grupo $\text{CH}=\text{CH}$ del último anillo clorinado. Este proceso de epoxidación convierte Aldrín a Dieldrín, Isodrín a Endrín, y Heptaclor a Heptaclor epóxido. Todos los epóxidos son más estables que la forma primaria [34].

Los procesos de oxidación de compuestos ciclodienos produce intermediarios tóxicos más estables. Este sistema es el más abundante en los microorganismos. La actividad microbiana resulta en la formación de "intermediarios tóxicos estables".

Estos compuestos no son completamente inertes (y puede ser visto por su eventual utilización por los microorganismos). Algunas de las vías de degradación del Dieldrín se dan en el anexo No. 4 y del Endosulfán en el anexo No. 5.

3.6.1.4 Terpenos clorados

El Canfeclor, también conocido como Toxafeno, tiene un contenido de cloro del orden del 67 al 69%. El número de productos químicos individuales que forman parte del Canfeclor y sus estructuras es desconocido. No tiene un punto de fusión definido y su presión de vapor es la más elevada de estos compuestos. Se descompone por la acción de la luz solar liberando ácido clorhídrico [18,33].

3.7. Degradación de compuestos xenobióticos por hongos [36]

Algunos hongos como los basidiomicetos pudridores de madera son capaces de degradar los polímeros de lignina los cuales son generalmente resistentes a la degradación microbiana. La lignina provee un soporte a los árboles actuando como un adhesivo uniendo las células y las microfibrillas de celulosa en el xilema produciendo un material de estructura laminada. Éste es un polímero aromático tridimensional heterogéneo que contiene varias uniones bioquímicas carbono-carbono y uniones éter entre las unidades monoméricas de fenilpropano.

Debido a que es una estructura insoluble no repetitiva y no estereoselectiva, requiere un proceso de degradación no específico.

Si un hongo pudridor blanco como *Phanerochaete chrysosporium* se le somete a condiciones limitadas de nitrógeno, sulfuro o carbohidratos (metabolismo idiofásico), degradará la lignina.

La lignina es degradada por varios agentes como peróxido de hidrógeno y ciertas peroxidases llamadas ligninasas. Ambas son secretadas hacia el medio y su acción combinada oxida un rango amplio de subestructuras de lignina tan bien como compuestos modelo de dímeros y trímeros. Los productos solubles despolimerizados son absorbidos por las células fúngicas y metabolizadas por intermediarios del ciclo de Krebs y convertidas en dióxido de carbono. La oxidasa glioxal extracelular idiofásica puede ser importante en oxidar uno, dos y tres fragmentos de carbono generados por la ligninasa.

El sistema lignolítico de los hongos pudridores blancos parece ayudar a la decontaminación de compuestos xenobióticos por diferentes vías. Este sistema actúa sobre material extracelular insoluble. Los compuestos xenobióticos la mayoría de veces tienen una solubilidad muy limitada en agua y no están disponibles para una degradación intracelular en el suelo. La segmentación ocurre en las uniones carbono-carbono y carbono-oxígeno independientemente de la configuración de los centros quirales. En este mecanismo de radicales libres, las relaciones estereoquímicas estrictas, una característica sobresaliente de las interacciones substrato-enzima dictadas por sitios activos de conformación, no funcionan por mucho tiempo. La degradación de un xenobiótico debería ser iniciada como la de la lignina por limitación de nutrientes, y se esperaría que la degradación del mismo ocurriera sin ningún requerimiento especial hasta llevarlo a bajas concentraciones. En los sistemas bacterianos, generalmente permanece un residuo debido a que la concentración del metabolito, cae muy debajo de la K_m^\dagger de la enzima y a una pérdida de inducción de la síntesis de la enzima. El sistema lignolítico de los hongos pudridores blancos debería actuar hasta que la concentración del metabolito sea tan baja como la de la enzima activada, esto es esencialmente indetectable.

La lignina es al menos mineralizada parcialmente por los hongos. Pocos microorganismos son competentes en el metabolismo total de compuestos

[†] K_m : Constante de Michaelis, expresada en unidades de concentración (moles/litro); proporciona una guía valiosa acerca del tipo de una reacción enzimática. De esta manera si la concentración de sustrato es grande la K_m será insignificante y la velocidad de reacción es independiente de la cantidad de sustrato (cinética de orden cero), mientras que si la concentración de sustrato es baja en comparación a la K_m , la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato por lo que debe considerarse la reacción de primer orden (cinética de primer orden).

persistentes en el ambiente. La conversión de materiales inorgánicos hacia dióxido de carbono es la solución ideal.

3.7.1 *Phanerochaete chrysosporium*

El hongo pudridor de madera *P. chrysosporium* (también conocido como *Sporotrichum pulverulentum*), fue descrito primeramente por Burdsall y Eslyn en 1974; ha sido objeto de numerosas investigaciones en la década de 1980 con el objetivo de aprovechar el sistema lignolítico en la degradación de xenobióticos [36]. El sistema de degradación de este organismo comprende dos peroxidasas extracelulares con un grupo heme, la lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), las cuales aparecen como familias de isoenzimas, y también como un sistema generador de H₂O₂ y constituyen los componentes principales del sistema degradador extracelular de lignina [11].

Bumpus y Aust [36,42,43] demostraron que *P. chrysosporium* es capaz de mineralizar el DDT en cultivo en medios deficientes en nitrógeno. El primer metabolito en aparecer fue el 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDD) y posteriormente el mismo fue metabolizado para formar 2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol (Dicofol), el cual es entonces desclorinado para formar 2,2-dicloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol (FW-152) [36,42]. Por último, resulta una segmentación en la unión carbono-carbono para formar 4,4'-diclorobenzofenona (DBP), la cual es segmentado nuevamente en el anillo aromático para formar en última instancia CO₂ [42].

3.7.2 *Hygrophoropsis aurantiaca*

Hygrophoropsis aurantiaca según la clasificación de Alexopoulos & Mims (1985) [44], pertenece a la División *Amastigomycota*, Subdivisión *Basidiomycotina*, Clase *Basidiomycetes*, Familia *Paxillaceae*. Es llamado comúnmente Falsa Cantarela. Habita generalmente en madera podrida y/o humus. Fructifica solo o en grupos pequeños en basura o madera, en verano o invierno, usualmente bajo las coníferas. En América del Norte se le encuentra generalmente bajo los árboles de pino o secoya [45,46].

Autores como Jordan P, Phillips R. le atribuyen propiedades venenosas y alucinógenas, que pueden causar desordenes gastrointestinales [46,47]. Otros autores como Albert Pilát, Pappeti C. *et al* refieren que la carne del hongo es comestible con poco sabor, dulce y agradable [45,48]. En Guatemala el hongo es consumido por comunidades indígenas de los departamentos de San Marcos (regiones cercanas al volcán Tajumulco), Totonicapán, Tecpán [49], Chimaltenango y Guatemala [50]. Debido a que *H. aurantiaca* posee

laminillas que le dan un aspecto venoso, se le confunde fácilmente con *Cantharellus cibarius* y se venden juntos en los mercados locales de estas regiones con el nombre común de "anacate" [50].

El píleo del hongo mide aproximadamente 2-8 cm (ancho); es convexo o algo deprimido, el margen es al principio enrollado. La superficie es seca, algunas veces aterciopelada, típicamente algo pálida o naranja oscuro, café naranja, café amarillento, café olivo, o café oscuro (algunas veces oscuro o café al centro y naranja a naranja amarillento hacia el margen), pero unas veces blanquecino y en otras negruzco. La carne es delgada, pálida o teñida de anaranjado o color del píleo; olor agradable. El pie mide de 2-10 cm de largo, (0.2) 0.5-1 (2) cm de espesor, centrado o no, igual o alargado hacia a la base, algunas veces curvo; seco, de amarillo a anaranjado o café naranja o más o menos coloreado como el píleo. Las laminillas son cerradas y estrechas hacia la madurez (embotadas cuando son jóvenes); típicamente naranja oscuro a un naranja claro, pero la mayoría de las veces naranja pálido o en cualquier tono de amarillo[51,52].

3.8 Métodos de laboratorio para la detección de pesticidas en el ambiente

3.8.1 Ensayos inmunoenzimáticos

Desde su introducción, los inmunoensayos han servido para detectar y cuantificar cientos de moléculas de diferentes tipos, propias o extrañas a organismos, tales como hormonas, y moléculas extrañas como los compuestos farmacéuticos.

Para la producción de los inmunoensayos para pesticidas, fungicidas y herbicidas, éstos deben unirse a una molécula inmunogénica específica (hapteno) para producir los anticuerpos utilizados para el inmunoensayo. Los inmunoensayos comerciales para detectar pesticidas en el ambiente se basan en la técnica de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima).

Como ventajas están la rapidez, sensibilidad y costo. Puede detectar ppb (partes por billón) de pesticidas en el agua y el ambiente. Como desventajas tenemos la inespecificidad, reacciones cruzadas, un número alto de falsos positivos, por lo que no han sustituido a los métodos de referencia [53].

3.8.2 Métodos cromatográficos

Este grupo abarca los métodos de referencia para el análisis de pesticidas. Dentro de ellos se encuentran la cromatografía de capa fina (TLC), la

cromatografía de gases (CG), la cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Un método sencillo, la bioautografía, identifica la presencia o ausencia de los pesticidas por medio de una cromatografía en capa fina (TLC). Fue ideada al principio para detectar antibióticos en cromatogramas en papel o en capa fina [54,55].

La bioautografía puede ser de dos tipos: de contacto y de inmersión.

3.8.2.1. Bioautografía de contacto

Se basa en la difusión de los compuestos separados por cromatografía en capa fina. Es útil para el ensayo de antibióticos. Estos son colocados sobre la superficie de una caja de agar nutriente inoculada con microorganismos que son susceptibles a los antibióticos que están siendo analizados. Después de 15-30 minutos, las cromatoplasmas son removidas. El antibiótico se difunde dentro del agar e inhibe el crecimiento de los microorganismos de ensayo. Las placas son entonces incubadas a una temperatura apropiada hasta que una capa delgada de crecimiento de microorganismos es visible sobre la superficie. Las zonas de inhibición pueden hacerse más conspicuas y visibles tempranamente por el uso de indicadores con actividad deshidrogenasa [55].

3.8.2.2 Bioautografía de inmersión

En este método las cromatoplasmas pueden ser incluidas en el medio. Para el ensayo de pesticidas, estos se colocan directamente sobre la placa de sílica, luego se le añade una película de agar donde se estría sobre los puntos de aplicación de los pesticidas y se incuba un tiempo para que ocurra la degradación. Posteriormente a esto, se retira la capa de agar y se desarrolla una cromatografía en capa fina con hexano, revelando la presencia o ausencia de los analitos con luz UV de 254 nm [54-56]. La presencia de manchas moradas de igual tamaño al blanco indica que no hay una degradación del pesticida, mientras que la disminución o ausencia de dos o más manchas de igual o diferente color indica que el hongo degrada el pesticida. Si absorbe el pesticida lo utilizará como fuente de energía, mientras que si no lo absorbe pero lo degrada, significa que lo cometaboliza.

3.8.2.3 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

El siguiente paso para determinar qué tan capaz es un organismo de degradar un compuesto xenobiótico, es midiendo el porcentaje de degradación frente a la cantidad de sustrato inicial del mismo. El organismo será tanto más efectivo mientras no produzca compuestos intermediarios y finales también tóxicos, por lo que la GC-MS es útil (siempre y cuando reconozca los compuestos en su banco de datos) para identificar los mismos [56].

4. JUSTIFICACIÓN

Ya que los pesticidas organoclorados no son selectivos pueden tener severas consecuencias sobre toda clase de organismos, incluyendo al hombre debido a su particular característica de biomagnificación [2,36].

Los pesticidas organoclorados son venenos universales que se degradan muy lentamente (realcitrantes), ya que carecen de sitios intramoleculares activos, lo que les confiere estabilidad; además, son liposolubles por lo que se acumulan en los tejidos de mamíferos; adicionalmente son mutagénicos y carcinogénicos, por lo que crean un verdadero problema de salud pública [1,36].

Si bien es cierto que en Guatemala el uso de estos pesticidas empezó a disminuir en la década de 1980, aún se sigue utilizando el Endosulfán, a pesar de su potencial tóxico (64,927 Kilos importados en 1997 y 173,570 Kilos en 1998) [6,7]. Otros países como Estados Unidos han disminuido el uso de Toxafeno, DDT y Aldrín del 63 a menos del 5% entre 1966 y 1988 [57]. En Canadá se ha prohibido el uso de los pesticidas organoclorados, aunque se sigue usando el Dieldrín como controlador de termitas [5]. En Chile ya se ha prohibido el uso del DDT desde 1984, el Aldrín desde 1988 y el Clordano, Dieldrín, Endrín y Heptaclor desde 1987 [4].

La degradación natural de estos compuestos puede llevar desde uno hasta veinticinco años por lo que los niveles de toxicidad pueden ser muy elevados en el suelo; además hay estudios que demuestran la acumulación de estos pesticidas en la leche materna humana [22,32,34].

Es importante encontrar y describir grupos de organismos o microorganismos que sean capaces de degradar estos compuestos en la naturaleza, así como las vías metabólicas que utilizan y que puedan ser una solución para la biodegradación de estos compuestos realcitrantes.

Este estudio es el primero que se realiza en Guatemala, el cual pretende detectar el grado de biodegradación de pesticidas organoclorados por una cepa nativa de un hongo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

5.1.1 Demostrar la capacidad de organismos nativos para degradar compuestos recalcitrantes como una alternativa para la biorremediación.

5.2 Objetivos Específicos

5.2.1 Evaluar la capacidad de *Hygrophoropsis aurantiaca* para degradar pesticidas organoclorados.

5.2.2 Determinar el tipo de vía utilizada por *Hygrophoropsis aurantiaca* para la degradación del insecticida DDT (utilización del insecticida como fuente de energía, degradación por cometabolismo).

5.2.3 Identificar los posibles productos del metabolismo de *Hygrophoropsis aurantiaca* sobre el pesticida utilizado.

6. HIPÓTESIS

Hygrophoropsis aurantiaca es capaz de degradar el insecticida DDT a una concentración de 5 ppm en el medio de cultivo por cometabolismo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Universo de trabajo

- Cepa en cultivo puro de *Hygrophoropsis aurantiaca* aislada por Bran MC. *et al.* (1998), la cual fue colectada en los bosques de pino de la región del volcán Tajumulco del Departamento de San Marcos, Guatemala.
- Insecticida Organoclorado:
1,1'(2,2,2-Tricloroetilideno)bis[4-clorobenceno] (DDT) de grado técnico.

7.2 Recursos

7.2.1 Recursos Humanos

- Bachiller Milton Rolando Baldizón Pernillo (tesista).
- Licda. María del Carmen Bran (Asesora).
- Lic. Carlos Klee (Asesor).

7.2.2 Recursos Físicos

- Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR), Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Físicoquímica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio de Toxicología, Escuela de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Centro de Documentación y Biblioteca, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Biblioteca del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP).
- Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Centro de Documentación de la OPS/OMS.

7.3 Materiales

7.3.1 Equipo y cristalería

- Cromatógrafo de gases HP 5971 A con Detector Selectivo de Masas.
- Computadora HP.
- Impresora HP 520.
- Bomba de vacío marca Edwards.
- Micropipeta de volumen variable de 10-50 μ l.
- Campana bacteriológica de flujo laminar.
- Frascos erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Balanza analítica.
- Autoclave.
- Balones aforados de 0.5 y 1 L.
- Frascos oscuros de vidrio con tapón de rosca de 0.5 y 1 L.
- Tubos de vidrio de 20 mm X 10 mm con tapadera de rosca.
- Microjeringas de cromatografía.
- Frascos de cintilación con tapadera de rosca.
- Columna capilar HP-5 Siloxane (5% Ph Me Silicone) 25 m de longitud X 0.2 mm de diámetro interno.

7.3.2 Reactivos

- DDT.
- Hexano HPLC.
- Metanol HPLC.
- Glucosa.
- Ácido Cítrico.
- Fosfato de Amonio $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$.
- Fosfato ácido de Potasio KH_2PO_4 .
- Sulfato de Hierro heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Sulfato de Cinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de Cobalto hexahidratado $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- Sulfato de Manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.
- Sulfato de Magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Cloruro de Calcio CaCl_2 .
- Cloruro de Hierro (III) FeCl_3 .
- Cloruro de Sodio NaCl .
- Tiamina (HCl).
- Peptona.

- Extracto de Malta.
- Extracto de Levadura.
- Agar PDA.
- Nitrógeno.
- Helio.

7.4 Procedimiento

Fase cualitativa y cuantitativa: Determinación del porcentaje de degradación del insecticida y comparación de los productos de degradación contra la librería de pesticidas del GC-MS realizada por el hongo.

7.4.1 Fase de producción de la biomasa

7.4.1.1 La cepa del hongo aislada, mantenida en tubos con agar MMN, se inoculó en placas de agar PDA y se incubó durante 2 semanas a 27 °C.

7.4.1.2 A partir de las placas de PDA se inoculó el hongo en frascos erlenmeyer de 500 ml, conteniendo 250 ml de caldo MMN y se incubaron a 27 °C en un agitador mecánico a 100 rpm durante 4 semanas hasta obtener una cantidad de biomasa suficiente para los ensayos.

7.4.2 Fase de degradación del insecticida

7.4.2.1 La biomasa producida se lavó 3 veces con el medio deficiente en nitrógeno modificado (ver anexo 6) a 1,000 rpm durante 10 minutos.

7.4.2.2 Se inoculó aproximadamente 0.3 g de biomasa en frascos erlenmeyer de 250 ml conteniendo 150 ml de medio deficiente en Nitrógeno y se incubaron durante 3 días a 27 °C en un agitador mecánico a 100 rpm. Cada uno se hizo por duplicado.

7.4.2.3 Para el control estéril se realizó el paso anterior a excepción de la inoculación del hongo.

7.4.2.4 Se agregó 50 µl de la solución concentrada de DDT/hexano (15,000 ppm.) a cada frasco para dar una concentración final de 5 ppm en el medio de cultivo.

7.4.2.5 Se incubaron los frascos erlenmeyer durante 14 días a 27 °C en un agitador mecánico a 100 rpm.

7.4.3 Fase de extracción del insecticida y análisis

7.4.3.1 Se filtró el medio de cultivo de los frascos erlenmeyer en el día inicial "0" y final "14" en papel Whatmann No. 5 y se trasvasó a ampollas de decantación de 250 ml.

7.4.3.2 Las ampollas se agitaron durante 1 minuto 7 veces para lograr la extracción completa del insecticida.

7.4.3.3 Se decantó el medio de cultivo y el extracto obtenido se trasvasó a balones aforándolos a 10 ml con hexano, guardándolos en tubos con tapón de rosca a -10°C hasta su análisis.

7.4.3.4 Se inyectó $1\ \mu\text{l}$ de los extractos obtenidos por duplicado, 3 veces cada uno, en el GC-MS en modo SIM para cuantificar el insecticida en las condiciones establecidas (ver anexo 7).

7.4.3.5 Las muestras iniciales y finales se evaporaron luego a sequedad en frascos de cintilación bajo una corriente continua de Nitrógeno.

7.4.3.6 Estas muestras se reconstituyeron con $50\ \mu\text{l}$ de metanol y se inyectaron en modo SCAN para identificar los productos de degradación.

7.5. Diseño Experimental

Tipo de Estudio: descriptivo, pre-experimental de tipo pre-post prueba (X_1 O X_2) donde:

X_1 = insecticida.

O= Agente modificador (hongo).

X_2 = Productos de degradación.

Muestreo:

Se analizó 1 concentración del insecticida (5 ppm.), por duplicado.

Variabes:

Independiente: Concentración del insecticida.

Dependiente: Degradación del insecticida.

Análisis: Evaluación de resultados pre-post prueba

[X_1] - [Productos Finales]

8. RESULTADOS

La muestra patrón del DDT utilizado estaba constituida por varios isómeros y compuestos relacionados por lo que se analizó la misma a varias concentraciones (de 1 a 5 ppm) en modo de adquisición de barrido (SCAN), obteniendo la siguiente composición porcentual: *p-p'*-DDE (2.17%), *o-p'*-DDT (26.78%) y *p-p'*-DDT (64.85%). Ver anexo No. 8.

En la tabla No. 1 mostrada en la página No. 35 se detallan los resultados de la identificación de los compuestos presentes en la muestra patrón de DDT contra la base de datos de la librería HHPEST del GC-MS estableciéndose una concordancia (match) del 99% para el *p-p'*-DDE (TR = 15.17 min), 98% para el *o-p'*-DDT (TR = 18.42 min) y 99% para el *p-p'*-DDT (TR = 16.73 min).

Al analizar los espectros de masas de los compuestos identificados en la tabla No. 1, se estableció que para cuantificar el porcentaje de degradación del DDT en modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM), se debería escoger *m/z* características, siendo las escogidas para *p-p'*-DDE: 246.00, 317.90, 176.10, 105.00; *o-p'*-DDT: 235.00, 165.00, 199.00, 75.10; *p-p'*-DDT: 235.00, 165.00, 199.00, 75.00. En los anexos 9, 10 y 11 se observa en primer plano el espectro de masas de los isómeros y compuestos relacionados de la muestra patrón de DDT empleada, en segundo plano el espectro de masas de la librería HHPEST del GC-MS y en tercer plano la fórmula correspondiente de cada uno, lo que permitió seleccionar los iones representativos de cada uno de ellos para poder detectar el nivel de concentración del analito en 5 ppm.

En el anexo No. 12 se observa una muestra de DDT a una concentración de 1 ppm inyectada en modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM), lo que aseguró una sensibilidad alta en la identificación de los iones estudiados. También se observa que los tiempos de retención en modo SIM para el *p-p'*-DDE, *o-p'*-DDT y el *p-p'*-DDT fueron 15.15, 15.46, y 16.46 min respectivamente.

En la siguiente fase del estudio el DDT fue degradado en un medio de cultivo deficiente en nitrógeno por *Hygrophoropsis aurantiaca* en un tiempo de 14 días con agitación (100 rpm) a 27 °C a una concentración de 5 ppm. En los anexos 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos del análisis por duplicado de la muestra inicial de DDT en 5 ppm cada una inyectada tres veces. Aquí se puede observar la reproducibilidad del método utilizado, así como una alta sensibilidad y especificidad al detectar los iones seleccionados.

En los anexos 15 y 16 se muestran los análisis correspondientes para el control inicial y su duplicado cada uno inyectado tres veces.

Los resultados de la muestra final inyectada también por duplicado y cada una tres veces se encuentran en los anexos 17 y 18. Los controles finales corridos fueron analizados de la misma forma, encontrándose los resultados en los anexos 19 y 20.

El porcentaje de biodegradación del DDT por *H. aurantiaca* fue determinado midiendo el área de los picos de los isómeros y compuestos relacionados del DDT en modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM) haciendo mediciones en el día inicial (día 0) y el día final (día 14), en duplicado y cada muestra tres veces, por medio de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (ver anexos No. 13-20).

El porcentaje de degradación de los compuestos seleccionados (*p-p'*-DDE, *o-p'*-DDT y *p-p'*-DDT) que se muestra en las tablas 2 y 3 de las páginas 36 y 37 está dado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de degradación} = \frac{[(\text{muestra inicial} - \text{muestra final})]}{\text{muestra inicial}} * 100$$

En la tabla No 2 se muestran las áreas corregidas correspondientes a los isómeros y compuestos relacionados del DDT, obteniéndose para todos un valor medio. Previo a la determinación de los porcentajes de degradación de los compuestos en estudio fue necesario restar los valores obtenidos en las muestras control (Control estéril de medio de cultivo más insecticida). Ver tabla No. 3; de acuerdo a esto, el *p-p'*-DDE se degradó un 18.43% (ya que el control prácticamente fue el mismo al inicio que al final), el *o-p'*-DDT se degradó un 21.72% (30.43%-8.71%), y el *p-p'*-DDT un 22.39% (ya que también el control prácticamente fue el mismo al inicio que al final). En los gráficos No. 1, 2, y 3 de la página 38 se observan en rojo los niveles de los isómeros y compuestos relacionados del DDT en los controles y en azul los niveles de los mismos en la muestra estudiada en los puntos inicial (día 0) y final (día 14), y que muestran la degradación de ellos por *H. aurantiaca*.

En los cromatogramas de las muestras iniciales y finales analizadas en modo SIM se observa a veces la aparición de un cuarto pico con un Tiempo de Retención (TR) aproximado de 15.91 min (ver anexos 13-20); este pico estuvo presente en la muestra patrón inicial de DDT inyectada en modo SCAN el cual fue identificado por la librería HHPEST del CG-MS como *o-p'*-DDT con un TR de 16.45 min en la muestra inicial y final y con un espectro de masas idéntico al *o-p'*-DDT con un TR de 16.28 min. Este pico no fue tomado en cuenta durante la cuantificación de los porcentajes de

degradación debido a que su baja concentración no permitió obtener el área correspondiente.

Las muestras iniciales y finales fueron evaporadas luego bajo corriente de Nitrógeno y fueron reconstituidas posteriormente con 50 μ l de metanol e inyectadas en modo de adquisición de barrido (SCAN) con el propósito de identificar los productos de degradación formados.

En el anexo No. 21 se observa el cromatograma total de iones de la muestra inicial evaporada y concentrada a 50 μ l en metanol, en el cual podemos observar la presencia de los 3 iones seleccionados bajo estudio junto con algunos otros compuestos a muy baja concentración, los cuales no fue posible identificarlos por la base de datos de la librería HHPEST del GC-MS. En los anexos 22, 23 y 24 se observan en primer plano las áreas ampliadas de cada uno de ellos, en segundo y tercer plano los espectros de masas de la muestra y la librería, y en cuarto plano la fórmula estructural de cada uno de ellos. En la tabla No. 4 de las páginas 39-41 se detallan los resultados de la identificación de los iones presentes en la muestra.

En el anexo No. 25 se observa el cromatograma obtenido de la inyección de la muestra final evaporada y reconstituida con 50 μ l de metanol; puede observarse la presencia de los iones *p-p'*-DDE, *o-p'*-DDD *o-p'*-DDT, *p-p'*-DDT y la presencia de varios picos en una concentración baja con diferentes tiempos de retención (TR). En los anexos 26-29 se observan en primer plano los picos ampliados de cada uno de ellos, en segundo y tercer plano los espectros de masas correspondientes a la muestra y la librería, y hacia el final la fórmula estructural del compuesto identificado. El compuesto mostrado en los anexos No. 25 y 27 de la muestra final con un TR de 15.55 min fue identificado por la base de datos de la librería HHPEST el GC-MS como *o-p'*-DDD (match del 96%), y el cual es un producto del metabolismo. En el análisis del espectro de masas del *o-p'*-DDT y el *o-p'*-DDD se observa claramente la ausencia de un cloro en la producción de un pico formado en $m/z = 318$ (ver anexos No. 27 y 28) [42].

En la tabla número 5 mostrada en la página No. 42 se encuentra el reporte de la identificación de los compuestos identificados por la librería HHPEST del GC-MS de la muestra final.

Tabla No. 1. Identificación de los iones de DDT en modo SCAN

Pico	TR	%Área	Identificación de la librería	No. de Ref	No. de CAS	Calidad
1	4.93	2.20	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
2	5.25	0.69	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
3	6.91	1.07	C:\DATABASE\HPPEST.L PERTHANE	169	000072-56-0	7
4	9.27	0.22	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
5	11.47	1.15	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
6	11.65	0.27	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
7	12.60	0.96	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
8	13.46	0.93	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
9	14.29	1.95	C:\DATABASE\HPPEST.L ETHOFUMESATE	214	026225-79-6	38
10	14.77	4.51	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	96
			<i>p,p'</i> -DDE	30	000072-55-9	45
			ETHOFUMESATE	214	026225-79-6	2
11	15.01	1.65	C:\DATABASE\HPPEST.L ETHOFUMESATE	214	026225-79-6	9
12	15.17	31.96	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDE	30	000072-55-9	99
			<i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	99
13	15.62	4.98	C:\DATABASE\HPPEST.L ETHOFUMESATE	214	026225-79-6	8
14	15.88	18.42	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	98
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000500-29-3	94
			<i>p,p'</i> -DDD	56	000072-54-8	93
15	16.18	3.21	C:\DATABASE\HPPEST.L ETHOFUMESATE	214	026225-79-6	1
16	16.73	23.82	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	99
			<i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	99
			<i>p,p'</i> -DDD	56	000072-54-8	94
17	18.98	2.00	C:\DATABASE\HPPEST.L PROPAMOCARB	270	025606-41-1	2

Tabla No. 2.
Tiempos de retención y áreas corregidas de la muestra de DDT 5 ppm.

	DDT 5 ppm inicial		DDT 5 ppm inicial, duplicado		DDT 5 ppm final		DDT 5 ppm final, duplicado	
	TR*	Área corregida	TR	Área corregida	TR	Área corregida	TR	Área corregida
<i>p-p'</i>-DDE								
1era.	15.14	2568624	15.16	2843611	15.18	1916347	15.19	1558043
2da.	15.85	995621	15.15	2799685	15.17	1972514	15.20	1344093
3ra.	15.14	759871	15.16	2383397	15.19	1753602	15.15	1529525
Promedio	15.38	1441372	15.16	2675564	15.18	1880821	15.18	1477220
Media	2058468.17				1679020.67			
% de degradación	18.43**							
<i>o-p'</i>-DDT								
1era.	15.84	435554	15.84	858093	15.85	452641	15.85	439861
2da.	15.85	199862	15.83	1219122	15.84	580328	15.86	346675
3ra.	15.83	227903	15.83	877732	15.86	390284	15.84	446573
Promedio	15.84	287773	15.84	984982	15.85	474418	15.85	411036
Media	636377.67				442727.00			
% de degradación	30.43**							
<i>p-p'</i>-DDT								
1era.	16.42	9773498	16.41	12558421	16.42	8648101	16.42	8374424
2da.	16.40	5242080	16.40	18285176	16.41	10729608	16.43	7090790
3ra.	16.41	4922611	16.40	13330368	16.43	8268344	16.41	6646950
Promedio	16.41	6646063	16.41	14724655	16.42	9215351	16.42	7370721
Media	10685359.00				8293036.17			
% de degradación	22.39**							

*TR: Tiempo de retención en minutos.

**Porcentaje de degradación: [(muestra inicial- muestra final)/muestra inicial]*100

Tabla No. 3.
Tiempos de retención y áreas corregidas del control de DDT 5 ppm.

	Control inicial DDT 5 ppm		Control inicial DDT 5 ppm, duplicado		Control final DDT 5 ppm		Control final DDT 5 ppm, duplicado	
	TR*	Área corregida	TR	Área corregida	TR	Área corregida	TR	Área corregida
p-p'-DDE								
1era.	15.13	3090544	15.15	2850799	15.11	3438996	15.14	2859539
2da.	15.12	3325881	15.12	3403551	15.13	3472020	15.13	3295776
3ra.	15.14	2897577	15.15	2939773	15.14	2933263	15.13	3422607
Promedio	15.13	3104667.33	15.14	3064707.67	15.13	3281426.33 3	15.13	3192640.67
Media	3084687.5				3237033.5			
% de degradación	-4.99**							
o-p'-DDT								
1era.	15.82	1028712	15.83	960429	15.83	850633	15.85	805232
2da.	15.82	898793	15.82	1056101	15.82	825612	15.82	866603
3ra.	15.82	1046845	15.82	1039418	15.82	963547	15.81	1193590
Promedio	15.82	991450	15.82	1018649.33	15.82	879930.67	15.83	955141.67
Media	1005049.67				917536.17			
% de degradación	8.71**							
p-p'-DDT								
1era.	16.39	12566546	16.39	12134911	16.39	14552772	16.39	12888730
2da.	16.39	15166278	16.38	15034310	16.40	14333374	16.41	14357146
3ra.	16.39	12400094	16.39	13480341	16.39	12438257	16.39	14744904
Promedio	16.39	13377639.33	16.39	13549854	16.39	13774801	16.40	13996926.7
Media	13463746.7				13885863.83			
% de degradación	-3.14**							

*TR: Tiempo de retención en minutos.

**Porcentaje de degradación: [(control inicial- control final)/control inicial]*100

Gráfico No. 1. Degradación de o-p-DDE

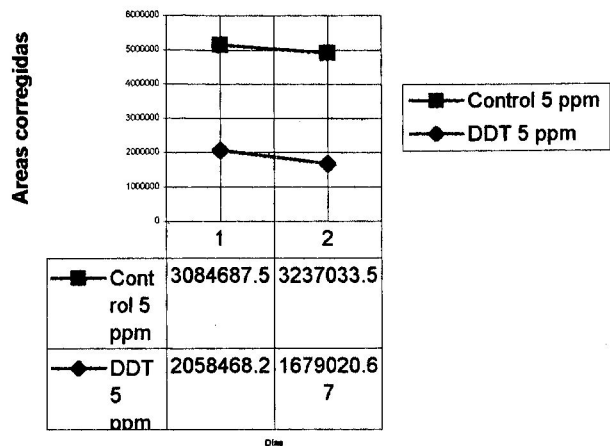


Gráfico No. 2. Degradación de o-p DDT

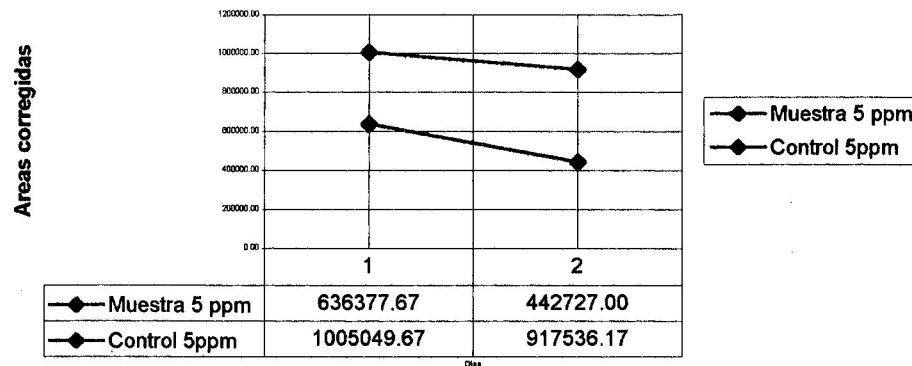


Gráfico No. 3. Degradación de p-p DDT

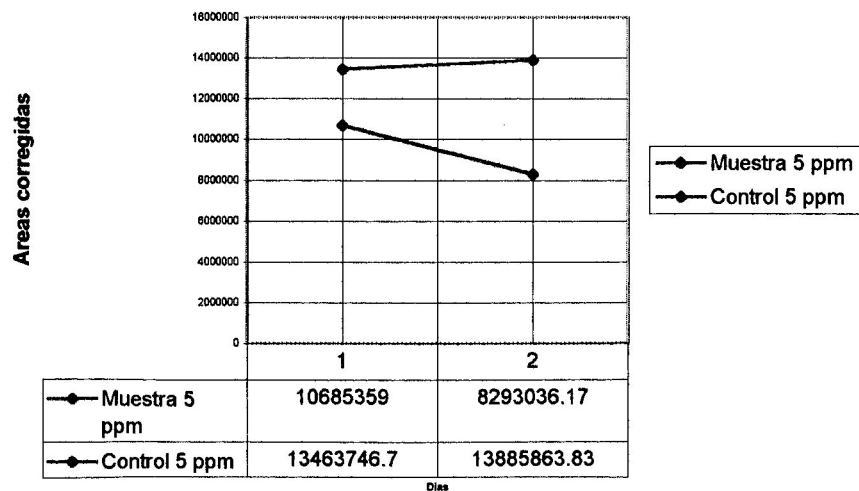


Tabla No. 4. Resultados de la inyección de la muestra inicial en modo SCAN.

Pico	TR	%Área	Identificación de la librería	No. de Ref.	No. de CAS	Calidad
1	4.46	0.32	C:\DATABASE\HPPEST.L PROPAMOCARB	270	025606-41-1	2
2	4.68	0.06	C:\DATABASE\HPPEST.L PROPAMOCARB	270	025606-41-1	2
3	6.17	0.07	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
4	6.28	0.06	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
5	6.44	0.06	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
6	8.51	0.02	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
7	10.08	0.12	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
8	10.15	0.02	C:\DATABASE\HPPEST.L 2,5-DICHLORANILIN	334	000095-82-9	16
			CARBETAMIDE	152	016118-49-3	16
			2,3-DICHLORANILIN	335	000608-27-5	7
9	10.79	0.03	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
10	10.84	0.03	C:\DATABASE\HPPEST.L CARBETAMIDE	152	016118-49-3	10
11	11.03	0.03	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
12	11.46	0.14	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
13	11.57	0.14	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
14	12.10	0.08	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
15	12.33	0.09	C:\DATABASE\HPPEST.L 2,5-DICHLORANILIN	334	000095-82-9	7
			2,3-DICHLORANILIN	335	000608-27-5	7
16	12.69	0.13	C:\DATABASE\HPPEST.L TRIADIMEFON	57	043121-43-3	4
17	12.75	0.05	C:\DATABASE\HPPEST.L TRIADIMEFON	57	043121-43-3	10
18	13.26	0.12	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
19	13.43	0.06	C:\DATABASE\HPPEST.L DEMEPHION	113	008065-62-1	9

20	13.80	0.90	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
21	13.95	0.12	C:\DATABASE\HPPEST.L METHOPROTRYNE	166	000841-06-5	1
22	14.37	0.10	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
23	14.57	0.13	C:\DATABASE\HPPEST.L DIMETHAMETRYN	323	022936-75-0	10
24	14.90	0.10	C:\DATABASE\HPPEST.L FLUAZIFOP-P-BUTYL	195	007924-46-6	9
			HEXACHLOROBENZENE	73	000118-74-1	2
			DIMETHAMETRYN	323	022936-75-0	2
25	14.97	0.25	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
26	15.18	0.18	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDE	30	000072-55-9	64
			<i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	43
27	15.40	2.17	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i>-DDE	30	000072-55-9	96
			<i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	93
28	15.56	0.42	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	87
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	83
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	64
29	15.68	0.22	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
30	15.87	0.36	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	76
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	62
			<i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	59
31	16.06	0.22	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDE	30	000072-55-9	64
			<i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	60
32	16.28	26.78	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i>-DDT	65	000789-02-6	94
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	83
			<i>p,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	53
33	16.45	0.96	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	96
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	93
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	86
34	17.06	64.85	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	95
			<i>p,p'</i>-DDT	153	000050-29-3	90
			<i>p,p'</i> -DDD	56	000072-54-8	37
35	17.29	0.09	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
36	18.07	0.13	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
37	19.04	0.09	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			

38	19.71	0.21	C:\DATABASE\HPPEST.L					
			CHLORFENSON	82	000080-33-1	42		
			OXYCARBOXIN	255	005259-88-1	1		
39	22.02	0.09	C:\DATABASE\HPPEST.L					
			No coincide con ningún espectro					

Tabla No. 5. Resultados de la inyección de la muestra final en modo SCAN.

Archivo		C:\HPCHEM\1\DATA\FSCANICD.D				
Librería de búsqueda:		C:\DATABASE\HPPEST.L				
Pico	TR	%Área	Identificación de la librería	No. de Ref	No. de CAS	Calidad
1	11.35	0.29	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
2	11.46	0.14	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
3	11.57	0.83	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
4	13.80	4.64	C:\DATABASE\HPPEST.L No coincide con ningún espectro			
5	15.17	0.35	C:\DATABASE\HPPEST.L DICHLORVOS	159	000062-73-7	2
6	15.38	3.05	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDE	30	000072-55-9	99
			<i>o,p'</i> -DDE	168	003424-82-6	94
7	15.55	0.34	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	96
			<i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	87
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	83
8	16.22	23.30	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	81
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	74
			<i>p,p'</i> -DDD	56	000072-54-8	72
9	16.42	0.71	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>o,p'</i> -DDT	65	000789-02-6	95
			<i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	93
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	50
10	16.89	66.34	C:\DATABASE\HPPEST.L <i>p,p'</i> -DDT	153	000050-29-3	97
			<i>o,p'</i> -DDD	167	000053-19-0	86
			<i>p,p'</i> -DDD	56	000072-54-8	64

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Diversos estudios demuestran que las bacterias oxidan los metabolitos del DDT y sus análogos con grupos hidroxilo o hidrógeno en posiciones *para*. En general, la oxidación decrece dependiendo de los sustituyentes en *para* (H,-H; H,-OH; OH-, -OH; H-, -Cl; Cl-, -Cl; y NO₂-, -NO₂) (los dos grupos mostrados juntos son en posiciones *p-p'*) [42,58].

El DDT es altamente estable y es debido a la molécula de -CCl₃ insertada en el centro de los anillos aromáticos. Las enzimas envueltas en la degradación del DDT están presentes en diversos organismos a pesar de que nunca han estado expuestos al DDT, lo que sugiere una habilidad natural para degradarlo [58].

La principal vía de degradación bacteriana envuelve una declorinación reductiva del grupo triclorometilo para generar DDD (1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano). Estudios de Subba-Rao y Alexander demuestran que en cultivos con *Pseudomonas* y *Alcaligenes spp.* los dos cloros alifáticos son perdidos y el grupo metilo es convertido a un grupo carboxilo vía alcohol; esta descarboxilación produce entonces DDM (bis(4-clorofenil)-metano). El carbono central es hidroxilado para formar DBH (4,4'-diclorobenzidrol) el cual es oxidado a DBP (4,4'-diclorobenzofenona). En contraste, el grupo HCl puede ser perdido del DDT en sistemas bacterianos para generar DDE (1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano), el cual es un producto final del metabolismo [36]. Las bacterias degradan el DDT en medio de cultivo en un intervalo que va desde 1.6 a 16.4% en 7 días [58].

Los primeros estudios de degradación del DDT por hongos muestran que *Trichoderma viride* y *Mucor alterans* pueden degradarlo a metabolitos solubles en agua y en hexano. Andersen *et al.* muestran que los metabolitos del DDT, Dicofol y DDD, fueron identificados en cultivos de *T. viride*, mientras que otros no identificados fueron observados en cultivos de *M. alterans* [42].

Engst *et al.* proponen que *Fusarium oxysporum* degrada el DDT en una vía similar a las propuestas por las bacterias [42,36]. Se ha reportado que *Aspergillus flavus* es capaz de convertir el DDT a DBH, DDD y DDE mientras que *Thanotephorus cucumeris* convierte el DDT a DBP, DDD y DDE [42,58].

En contraste otros estudios demuestran que algunos hongos cometabolizan el DDT y poseen la habilidad de hidroxilar algunas moléculas de pesticidas [42], sugiriendo que el metabolismo del DDT por hongos puede ocurrir en dos rutas principales: dehidrodeclorinación para formar DDE y una declorinación reductiva para formar DDD, el cual es subsecuentemente convertido a DDA

(ácido-bis(4-clorofenil) acético), DDM (bis(4-clorofenil)metano), DBH y DBP [58].

De todos los hongos estudiados a la fecha que son capaces y eficientes al degradar compuestos xenobióticos, *P. chrysosporium* ha sido el más prometedor [2,11-13,35-43,58]. Las investigaciones de Bumpus y Aust demostraron que en cultivos deficientes en nitrógeno *P. chrysosporium* metaboliza el DDT extensivamente. El DDD fue el primer metabolito observado, y aparece alrededor de los primeros 3 días de degradación; éste desaparece luego de que los cultivos se vuelven lignolíticos (3 a 4 días después) y se convierten en metabolitos del DDD; el DDD es posteriormente metabolizado para formar Dicofol, 2,2-dicloro-1,1-bis(4-clorofenil) etanol (FW-152) y DBP. *P. chrysosporium* hidroxila el DDT en el carbono bencílico y remueve uno de los cloros alifáticos para producir FW-152 [36].

La degradación de compuestos xenobióticos por hongos pudridores de madera como *Phanerochaete chrysosporium* es dependiente del sistema degradador de lignina presente durante el metabolismo idiofásico (condiciones metabólicas secundarias) [41] en cultivos deficientes en nitrógeno y está probablemente aumentada en aquellos hongos relacionados filogenéticamente con él, como el hongo en estudio *Hygrophoropsis aurantiaca* [42].

P. chrysosporium es capaz de degradar del 50 al 60% del DDT en un período de incubación de 30 días. Si al medio de cultivo se le añade más glucosa por un tiempo adicional de 18 días más del 90% del DDT es metabolizado [43]. Otros hongos como *Pleurotus ostreatus*, *Phellinus weirii* y *Popyporus (Coriolus) versicolor* mineralizan el DDT aproximadamente a la mitad de la actividad de *P. chrysosporium* [36].

Durante la fase experimental de degradación del DDT por *H. aurantiaca* el porcentaje degradado de *p-p'*-DDE (18.43%), *o-p'*-DDT (21.72%) y *p-p'*-DDT (22.39%) se convirtió a productos metabolizados. El único producto identificado fue el *o-p'*-DDD. La cantidad de *o-p'*-DDD encontrado en una pequeña proporción pudo ser debido a que el *o-p'*-DDT no estuvo disponible por falta de solubilidad en el medio de cultivo y no fue lo suficientemente adecuada para que *H. aurantiaca* lo degradara y lo convirtiese hacia *o-p'*-DDD. Otra razón por la cual el porcentaje de degradación del DDT no alcanzó al citado por otros investigadores usando hongos diferentes pudo deberse a que el tiempo de estudio fue de 14 días. Por otro lado, es probable que *H. aurantiaca* haya estado saliendo de la fase lignolítica por lo que el *o-p'*-DDD se estuviera convirtiendo a los otros metabolitos mencionados.

Es posible que otros metabolitos hayan sido generados, pero al no tenerlos en su base de datos la librería HHPEST, DDM, DBH, DBP y FW-152 no

fueron identificados. El Dicofol si se encontraba en la base de datos pero tampoco fue identificado.

De producirse metabolitos solubles en agua y al solo examinar la fase hexánica no pudieron ser detectados; debido a esto, no es posible proponer totalmente una vía de degradación para el DDT por *Hygrophoropsis aurantiaca*, aunque presumiblemente sería por medio de una declorinación reductiva.

Un dato interesante es que no se encontró *p-p'*-DDD formado a pesar de que el *p-p'*-DDT era el principal sustrato disponible para el cometabolismo. Esto sugiere que como hubo una clara reducción del *p-p'*-DDT (22.39%) o no fue detectable, o existe otra vía metabólica por la cual fue degradado el *p-p'*-DDT a otros subproductos no detectados.

La utilización secundaria de sustrato, o cometabolismo, ocurrió a la par del consumo de la fuente primaria de energía, en un medio deficiente en nitrógeno. Esto es necesario para mantener el estado activo de las enzimas para cometabolizar la molécula de DDT. Como se mencionó antes, el sistema lignolítico de los hongos pudridores de madera no es específico y tiene la habilidad de descomponer o degradar compuestos xenobióticos que son diferentes al sustrato original. Existe seguramente una competencia entre sustratos primarios y secundarios por un sistema enzimático necesario para ambos. Debido a esto no se puede definir una reacción cinética sencilla, sino más bien compleja. Estas ligninasas o peroxidasas pueden degradar los compuestos xenobióticos e incorporar los mismos como intermediarios del ciclo de Krebs para convertirlos en última instancia a CO₂.

10. CONCLUSIONES

10.1 A una concentración de 5 ppm *Hygrophoropsis aurantiaca* es capaz de degradar el DDT en el medio de cultivo por utilización secundaria de sustrato o cometabolismo.

10.2 *Hygrophoropsis aurantiaca* es capaz de degradar el *p-p'*-DDE un 18.43%, el *o-p'*-DDT 21.72% y el *p-p'*-DDT un 22.39% en un intervalo de 15 días en un medio deficiente en nitrógeno a 27 °C en agitación a 100 rpm.

10.3 La biodegradación del *o-p'*-DDT por *Hygrophoropsis aurantiaca* es por una declorinación reductiva para formar principalmente *o-p'*-DDD.

11. RECOMENDACIONES

11.1 Evaluar la degradación del DDE por *Hygrophoropsis aurantiaca* porque siendo este un metabolito final del DDT puede estar incluso en concentraciones más altas que el DDT en el suelo, agua, leche materna y es además altamente tóxico para las aves.

11.2 Dilucidar la vía completa de degradación del DDT por *Hygrophoropsis aurantiaca*, por medio de otras técnicas para la elucidación de estructuras como la espectroscopía ultravioleta, infrarrojo y espectroscopía de masas con insecticidas y metabolitos marcados con ^{14}C para determinar los compuestos no identificados, prolongando el período de la biodegradación del mismo a 30 días.

11.3 Diseñar un sistema sólido de fermentación para evaluar la capacidad de *Hygrophoropsis aurantiaca* de degradar compuestos xenobióticos, ya sea como cultivo puro, o preparaciones enzimáticas libres de células, en suelos contaminados con el insecticida.

11.4 Evaluar la capacidad de *Hygrophoropsis aurantiaca* para degradar otros insecticidas como el Endosulfán que actualmente se utiliza en nuestro país a pesar de que es potencialmente tóxico.

12. REFERENCIAS

1. Turk A, Turk J, Wittes JT. Ecology Pollution Environment. U.S.A.: W. B. Saunders Company, 1978. ix + 217 p.
2. Ortiz-Hernández ML, *et al.* Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. Biotecnología. 1998;1:129-151.
3. Rollins D, Fuchs TW, Hanselka CW, Winn J. Reducing Pesticide Risks To Wildlife. Disponible en: <http://ipm.ucla.edu>. 1997.
4. Paratori C. Persistent Organic Pollulants. Chile: Current Situation. Chile. 1999. Disponible en: <http://paratoric.lecture/organicpollulants.edu>.
5. Professor Krulls Lectures. ENV100Y ENVIRONMENT. Canadá. 1999. Disponible en: <http://krulls.lectures/environment/html>.
6. Ingeniero Tony Rocael Camo. Oficina de Normas y Regulaciones. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Comunicación personal.
7. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The Pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin have Estrogenic Effects on Human Estrogen-Sensitive Cells. Department of Anatomy and Cellular Biology, Tufts University School of Medicine, Boston, MA 02111. USA. 1998. Disponible en: <http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/1994/102-4/soto/html>
8. Parrish PR, *et al.* Dieldrin: Effects on Several Estuarine Organisms. Disponible en: <http://www.epa.gov/ged/publica/c0230.htm>. 1999.
9. Kimbal AC, *et al.* Listado de plaguicidas restringidos y prohibidos en países de la región de las Américas (Documento de trabajo). Metapec, México: OPS, 1989. 345 pp.
10. Hurst CJ, *et al.* Manual of Environmental Microbiology. U.S.A.; ASM Press, 1997, xvii + 894.
11. Valli K, Wariishi H, Gold MH. Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-*p*-Dioxin by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 1992;174(7):2131-2137.
12. Bumpus JA, Kakar SN, Coleman RD. Fungal Degradation of Organophosphorous Insecticides. Appl. Biochem. Biotech. 1993;39/40:715-726.
13. Valli K, Gold MH. Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 1991; 173(1): 345-352.
14. Millar, Turk Foth. Fundamentos de la Ciencia del Suelo. Quinta Edición. México. Compañía Editorial Continental. 1987, 187 pp.
15. Farm Chemicals Handbook'93. U.S.A. Meister Publishing Company. 1993. 200 pp.

16. Munguía MR, *et al.* Plaguicidas en Costa Rica. Costa Rica. 1998. Disponible en: www.geocities.com/HotSprings/Resort/4124/docencia/legal/plaguicidas.html
17. Vega S. Evaluación epidemiológica de Riesgos causados por agentes químicos ambientales. Toxicología III. Aspectos específicos de la toxicología de algunos contaminantes. OPS/OMS. Tomo VI. 1985. 198 pp.
18. Arias JA, *et al.* Plaguicidas Organoclorados. Serie Vigilancia 9. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental OPS/OMS. Metepec, Estado de México: OPS/OMS, 1990. vi+97 pp.
19. International Programme on Chemical Safety. OMS Environmental Health Criteria: DDT and its derivatives; environmental aspects. Ginebra: OMS, 1989. 98 pp.
20. Henao S, Carey G. Plaguicidas Inhibidores de las Colinesterasas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental OPS/OMS. Metepec, estado de México: OPS/OMS, 1991. x+ 169 pp.
21. Repetto R, Baliga SS. Los plaguicidas y el sistema inmunitario. Riesgos para la salud pública. World Resources Institute. 1996. xi+112 pp.
22. Finkelman J, Corey G, Calderon R. Epidemiología ambiental: Un proyecto para América Latina y el Caribe. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Programa de Salud Ambiental OPS/OMS/EPA, 1994. xvi+258 pp.
23. Escuela Agrícola Panamericana. Resistencia de Plagas Agrícolas a Insecticidas en Nicaragua. Causas, Situación Actual y Manejo. Proyecto cuantificación de resistencia a insecticidas en plagas de importancia agrícola en Nicaragua. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, 1997. 21pp.
24. OMS. Resistencia de los vectores de enfermedades a los plaguicidas. Serie de Informes Técnicos 818. Informe del comité de expertos de la OMS en biología de los vectores y lucha antivectorial. Ginebra: OMS, 1992. 63 pp.
25. Krebs CJ. Ecología. Estudio de la distribución y la abundancia. Segunda edición. Trad. Correa JB. México: Editorial Harla. 1985. xxxii+754 pp.
26. Bellinger R. Pest Resistance to Pesticides. Clemson University. 1996. Disponible en: http://ipmwww.ncsu.edu/sefety/Southern_region/pestrest.pdf
27. WHO Expert Committee on Malaria WHO Technical Report Series 892. Ginebra: WHO, 2000. 71 pp.
28. Vega S. Toxicología II. Toxicocinética. OPS/OMS, 1985. 41 pp.
29. Rodríguez M, *et al.* Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba: Instituto Pedro Kourí, 1999. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol51_2_99/mtr04299.html.

30. Shiva M, Shiva V. Ecología Política del resurgimiento de la malaria. Disponible en: <http://www.revistadelsur.org.uy/revista.062/tapa4.html>
31. Del Alamo, LR. Hdrocarbon-Contaminated Soil Bioremediation. Estados Unidos: Saint Louis University, (tesis de graduación) 1999. Disponible en: [http://www.geocities.yahoo.com/toto?s=76000013&1=NE&b=1&t=953421168';yfEA\(0\)](http://www.geocities.yahoo.com/toto?s=76000013&1=NE&b=1&t=953421168';yfEA(0))
32. Dary O. Determinación del grado de contaminación de la leche humana en Guatemala con insecticidas organoclorados persistentes. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1980. 105 p.
33. Salmeón J, Salmeón J. Intoxicaciones producidas por pesticidas. Segunda edición. Madrid: Publicaciones de extensión agraria, Ministerio de Agricultura, 1980. 195 pp.
34. Environmental Microbiology Home Page. Pesticide Biodegradation and Microbiology. U.S.A. Disponible en: <http://www.emhp.edu>, 1999.
35. Kullman S, Matsumura F. Metabolic Pathways Utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for Degradation of the Cyclodiene Pesticide Endosulfan. Appl. Environ. Microbiol. 1996;62(2):593-600.
36. Springer-Verlag New York Inc. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, U. S. A.: Springer-Verlag New York Inc. Vol. 122, 1991.
37. Gold MH, *et al.* Purification and Characterization of an Extracellular H₂O₂-Requiring Diarylpropane Oxygenase from the White Rot Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. Biophys. 1984;234(2):353-362.
38. Hammel KE, Kalyanaraman B, Kirk TK. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dibenzo [*p*]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* Ligninase. J. Biol. Chem. 1986;261:16948-16952.
39. Beaudette LA, *et al.* Comparison of Gas Chromatography and Mineralization Experiments for Measuring Loos of Selected Polychlorinated Biphenyl Congeners in Cultures of White Rot Fungi. Appl. Environ. Microbiol. 1998;64(6):2020-2025.
40. Hawari J, *et al.* Biotransformation of 2,4,6-Trinitotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in Agitated Cultures at pH 4.5. Appl. Environ. Microbiol. 1999;65(7):2977-2986.
41. Bhasker GV, *et al.* Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. J. Bacteriol. 1998;180(19):5159-5164.
42. Bumpus JA, Aust SD. Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethane] by the White Rot *Fungus Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 1987;53:2001-2008.

43. Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD. Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus. *Science*. 1985;228:1434-1436.
44. Tormo Molina R. Lectura hipertextuales de botánica. Proyecto de Innovación Docente, Instituto de Ciencias de la Educación. Universidad de Extremadura. España. Disponible en: <http://www.unex.es/botanica/presenta> 2000.
45. Pappeti C, Consiglio G, Simonini G. Atlante fotografico del Funghi d'Italia. Italia: Associaziane Micologica Bresadola, 1999.cxviii + 512 p.
46. Phillips R. Mushrooms of North America. Primera edición. Hong Kong. Little Brown and Company. 1991. 250 p.
47. Jordan P. Illustrated Encyclopedia. Mushroom Identifier. Hong Kong: Lorenz Books, 1999. 128 p.
48. Pilát A, Usák O. I Funghi. Atlante Illustrato. Segunda edición. Italia: Nicola Teti Editore, 1980. 125 + 94 p.
49. Licda. María del Carmen Bran. Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Comunicación personal.
50. Sommerkamp I. Hongos comestibles en los mercados de Guatemala. Guatemala: Dirección General de Investigación (DIGI). Universidad de San Carlos de Guatemala, Doc. Tec. No. 3-90, 1991. 50p.
51. Laessøe T, Lincoff G, Del Conte A. The Mushroom Book. How to Identify, Gather, and Cook Wild Mushrooms and Other Fungi. U.S.A.: DK publishing book, 1996. 256 p.
52. Arora D. Mushrooms Demystified. A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi. 2da. Edición. U.S.A.: Ten Speed Press, Berkeley, 1986. 959 p.
53. Aiyagari N, La Breche T. Immunoassays. EPA Documents. SW 846. Disponible en: <http://www.EPA.gov>
54. Touchstone JC, Dobbins MF. Practice of Thin Layer Chromatography. 2nd edition. U.S.A.: John Wiley & Sons Inc., 1983, xxiii + 405.
55. Lara García FM. Implementación del Método bioautográfico por Cromatografía en capa fina con aplicación a extractos de Macuy (*Solanum nigrescens* Mart & Gal.) Frente a *Candida albicans*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1993. 53 p.
56. American Chemical Society. Organochlorine Pesticides. USA: ACS, 1998. Disponible en: <http://www.acs.gov/>
57. Gilliom RJ, Shelton T. Pesticides in the Atmosphere. USA: 1999. Disponible en: http://ca.water.usgs.gov/pnsp/atmos/atmos_4.html.

58. Subba-Rao RV, Alexander M. Bacterial and Fungal Cometabolism of 1,1-Trichloro-2,2-bis(4-Chlorophenyl)Ethane (DDT) and its Breakdown Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985;49:509-516.

PROPIEDAD DE LA INSTITUCIÓN TECNOLÓGICA DE GUATEMALA
Biblioteca Central

13. ANEXOS

Anexo No. 1 Principales grupos de plaguicidas y su composición (CICOPLAFEST)
[2].

Grupo	Compuestos	Composición
1	Organoclorados	Átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones, oxígeno. Carecen de sitios intramoleculares activos, por lo que son muy estables.
2	Organofosforados	Derivados del ácido fosfórico. Poseen un átomo central de fósforo en la molécula. Son más tóxicos y menos estables en el ambiente, en relación con los organoclorados.
3	Carbamatos	Estructura química basada en un alcaloide de <i>Physostigma venenosum</i>
4	Piretroides	Compuestos sintéticos similares a las piretrinas (alcaloides obtenidos de los pétalos de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>)
5	De origen botánico	Productos derivados directamente de vegetales, que no se sintetizan químicamente
6	Biológicos	Virus, microorganismos o productos derivados de su metabolismo
7	De cobre	Compuestos inorgánicos de cobre
8	Tiocarbamatos	Difieren de los carbamatos en su estructura molecular en que contienen un grupo -S- en su composición
9	Organoestánicos	Presencia de un estaño como átomo central de la molécula
10	Organoazufrados	Poseen un azufre como átomo central en su molécula, muy tóxicos a ácaros y de baja toxicidad a insectos.
11	Dinitrofenoles	Se reconocen por la presencia de dos grupos nitro (-NO ₂ -) unidos a un anillo fenólico.
12	Derivados de la urea	Compuestos que incluyen a la urea unida a compuestos aromáticos
13	Composición diversa	Triazinas, ftalimidas, carboxiamidas, derivados de los ácidos tricloroactéticos y tricloropicolínico, guanidina y naftoquinonas, biperidílicos.

Anexo No. 2. Dosis tóxicas (DL_{50}) para la rata según la clasificación de la OMS [20].

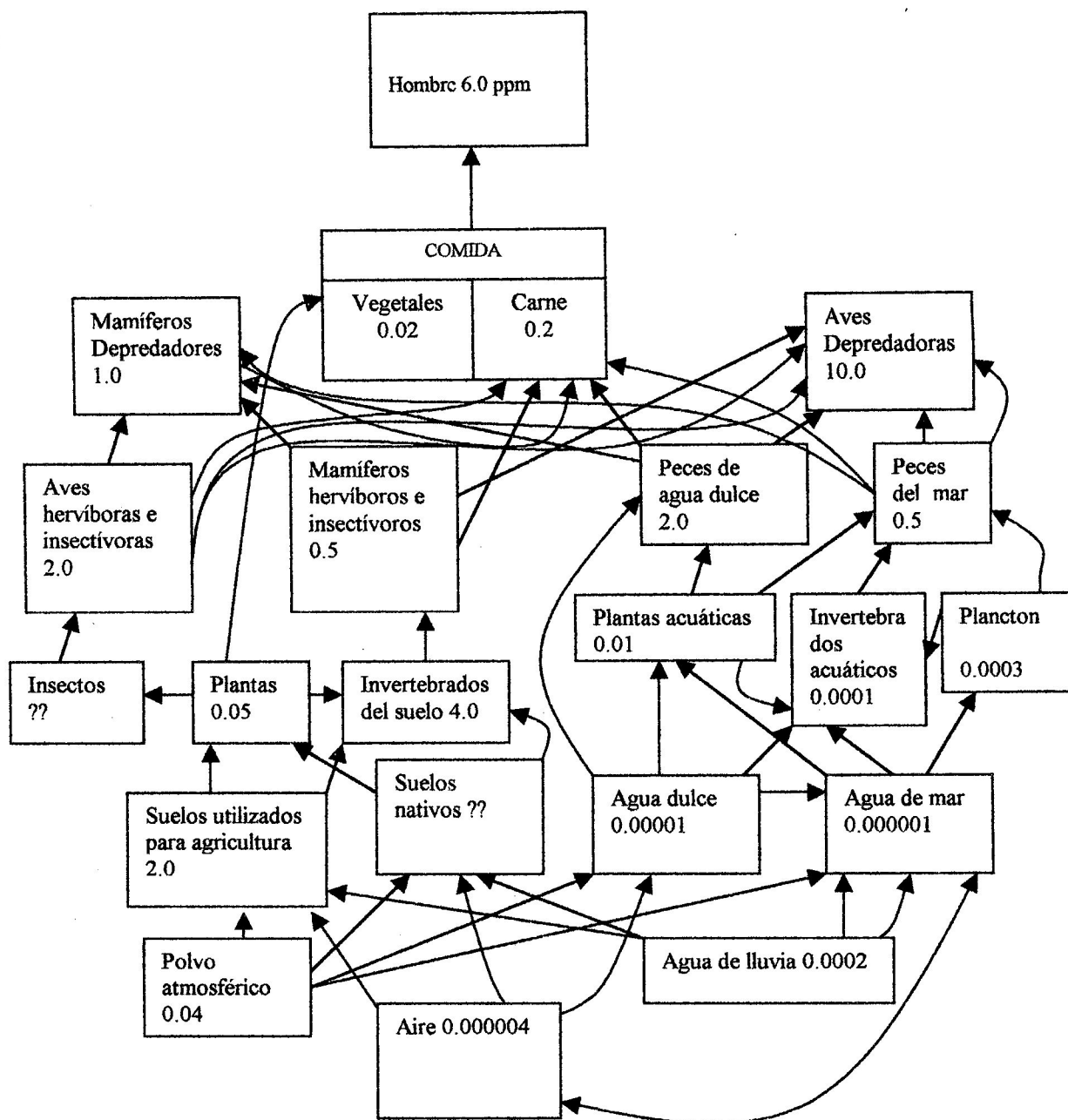
CLASE	DL_{50} PARA RATA (mg/Kg peso corporal)			
	ORAL		DÉRMICA	
	Sólidos*	Líquidos*	Sólidos*	Líquidos*
Ia Extremadamente peligroso	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
Ib Altamente peligroso	5-50	20-200	10-100	40-400
II Moderadamente peligroso	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III Ligeramente peligroso	Más de 500	Más de 2000	Más de 1000	Más de 4000

*El término sólido o líquido se refiere al estado físico del ingrediente o formulación que se clasifica

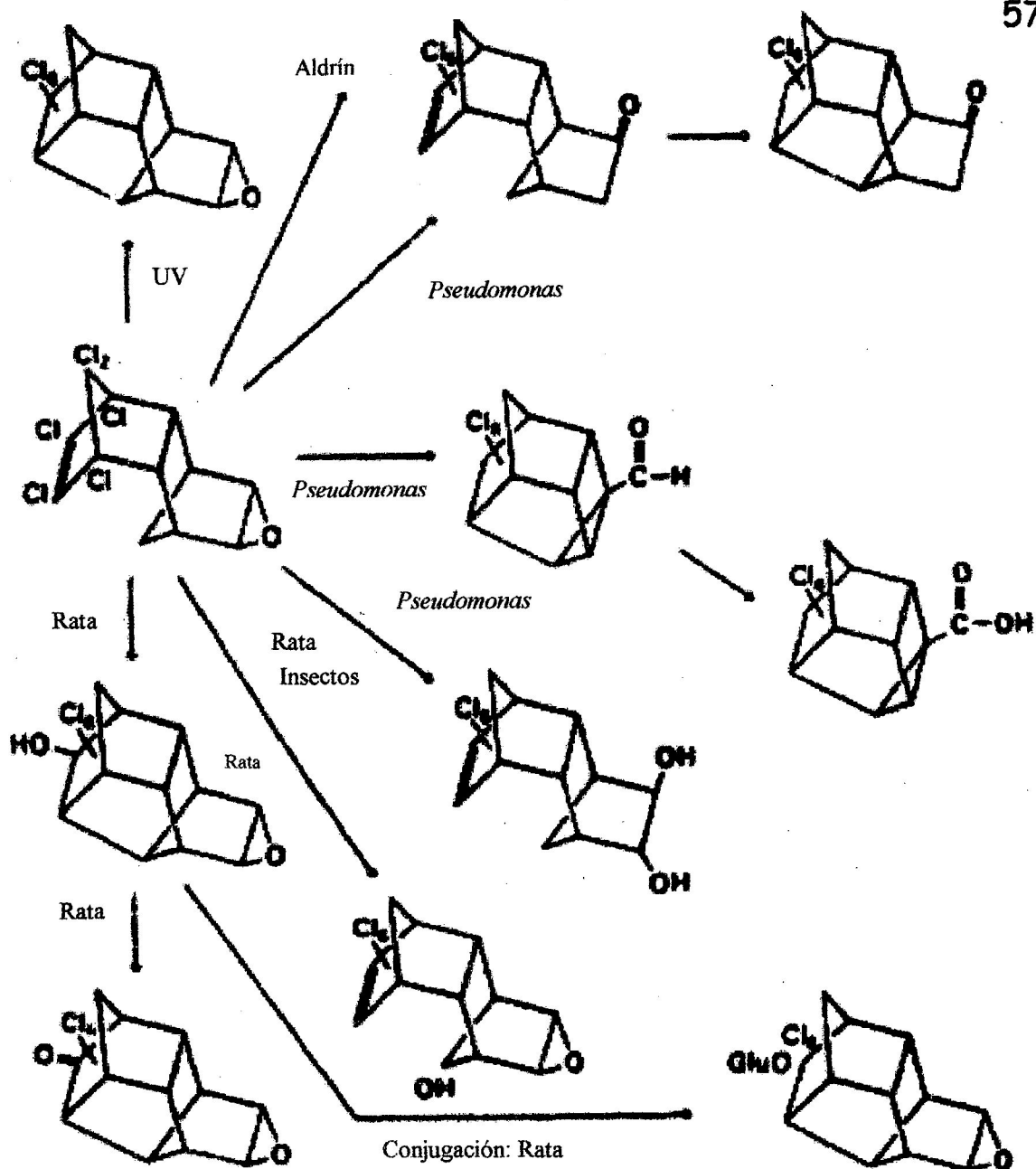
CL_{50}^{**} para la rata después de 4 horas de exposición

Toxicidad	Concentración (mg/l de aire)
Muy tóxico	≤ 0.5
Tóxico	> 0.5 a 2.0
Poco tóxico	> 2.0 a 20

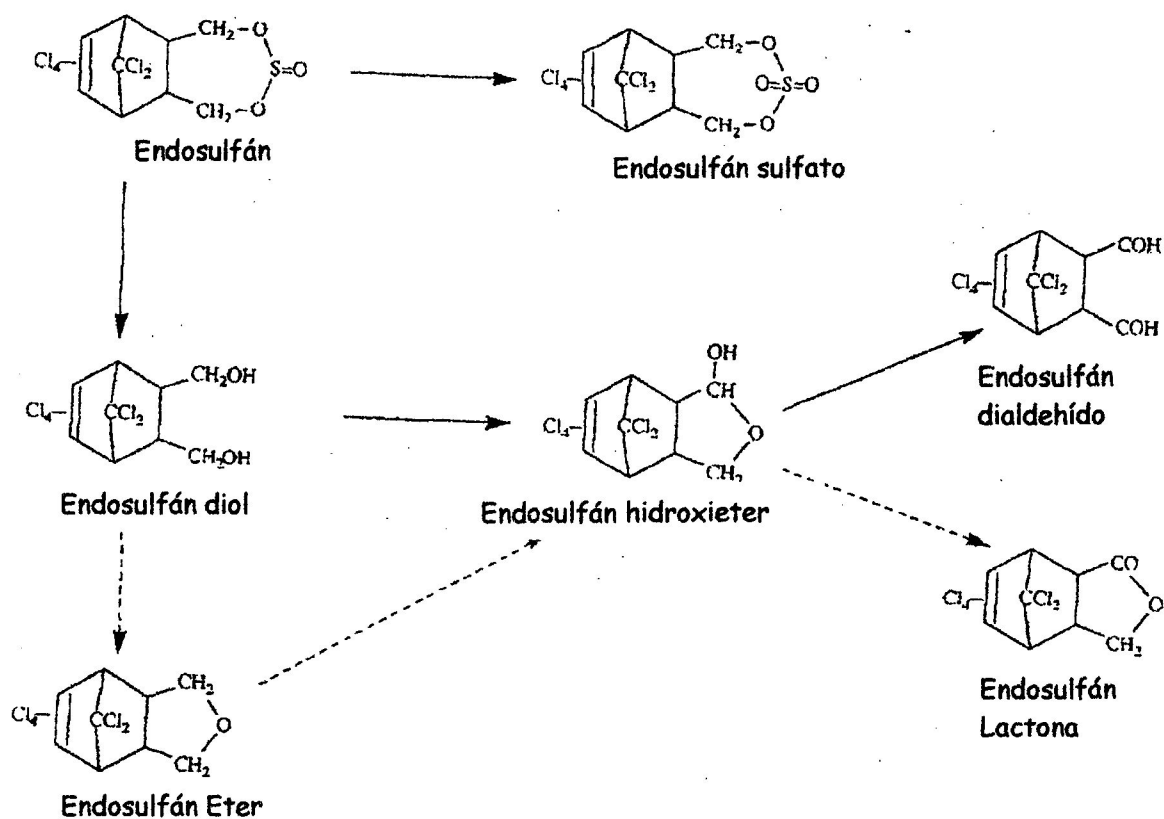
Cantidades típicas del DDT (ppm) en el ambiente



Anexo No. 3. Vías del DDT en el ambiente [14].



Anexo No. 4. Vías de degradación del Dieldrin [14].



Anexo No. 5. Vías metabólicas propuestas para la degradación de Endosulfán por *P. chrysosporium*. Las flechas continuas indican las vías de degradación principales; las flechas discontinuas las vías de degradación menores [17].

Anexo No. 6 Contenido del medio deficiente en nitrógeno por litro de agua destilada.

Glucosa	10.00	g
KH_2PO_4	2.00	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50	mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.16	mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.14	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.29	mg
Extracto de levadura	0.20	g*
Peptona	0.10	g*

* Éstos son añadidos al medio porque la cantidad exacta de nitrógeno y vitaminas requeridas por la cepa era desconocida. Se añadió también ácido cítrico suficiente para amortiguar el medio a pH 4.5.

Anexo No. 7 Condiciones de Operación GC/MS para el análisis del DDT.

Flujo en ml/min: 2.57

SPLIT: 12 Kpa

Rampa:

Tiempo inicial: 2 minutos.

Temperatura inicial horno: 50 °C

Tasa de incremento : 20 °C/min

Tiempo final: 10 minutos.

Temperatura final: 280 °C.

Inyector: 280 °C

Detector B: 280 °C.

Modo de Adquisición:

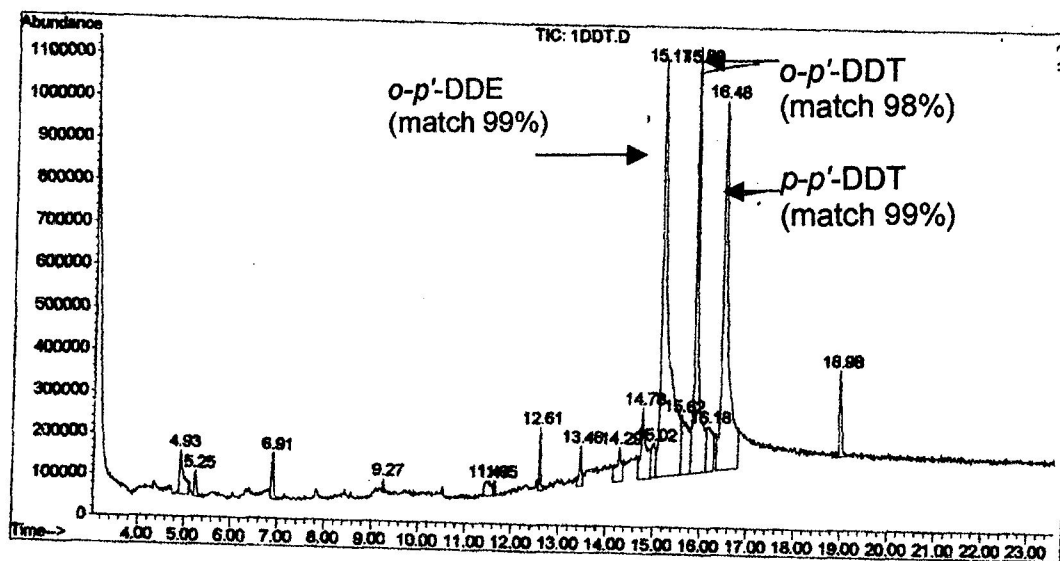
SIM (Monitoreo de iones seleccionados).

SCAN (Barrido).

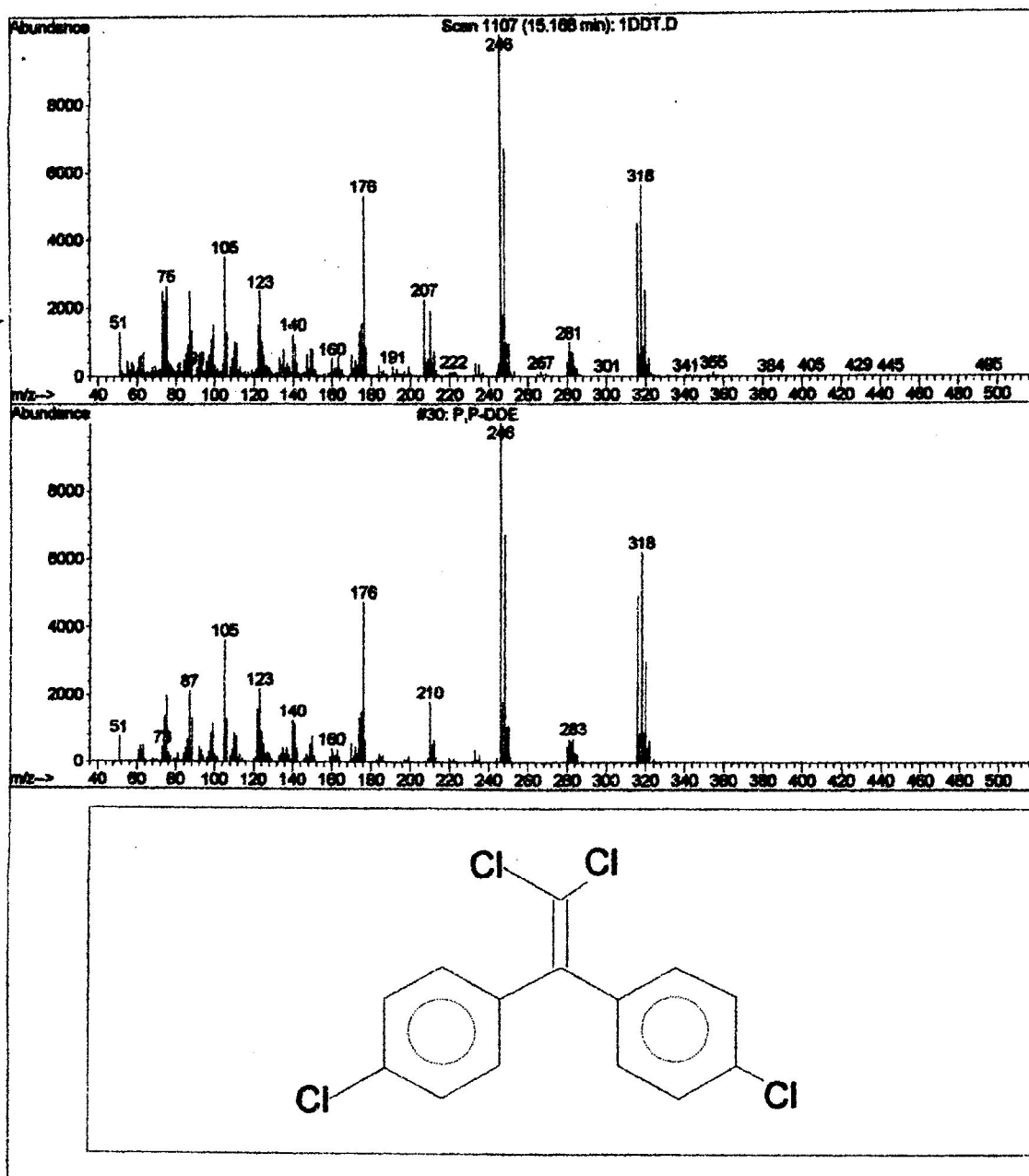
Tiempo de solvente : 14.90 minutos.

Columna capilar HP-5 Siloxane (5% Ph Me Silicone) 25 m de longitud X 0.2 mm de diámetro interno.

Anexo No. 8. Identificación del patrón de DDT en modo SCAN. Cromatograma total de iones donde se muestra la concordancia (match) del mismo contra la librería HHPEST del GC-MS.

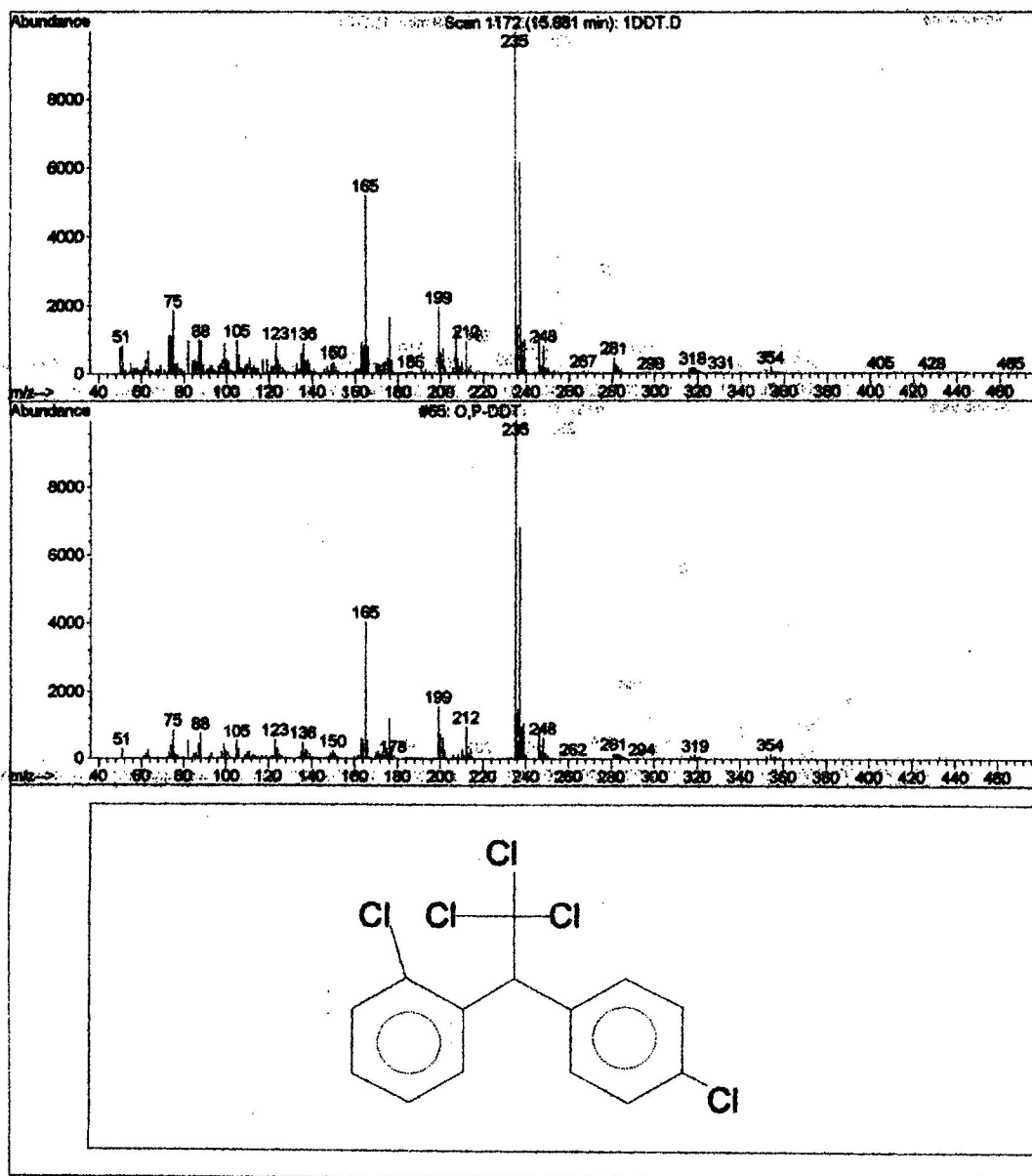


Anexo No. 9. Espectros de masas del ion identificado *p-p'*-DDE de la muestra patrón y la librería HHPEST respectivamente. En tercer plano se observa la estructura del *p-p'*-DDE.

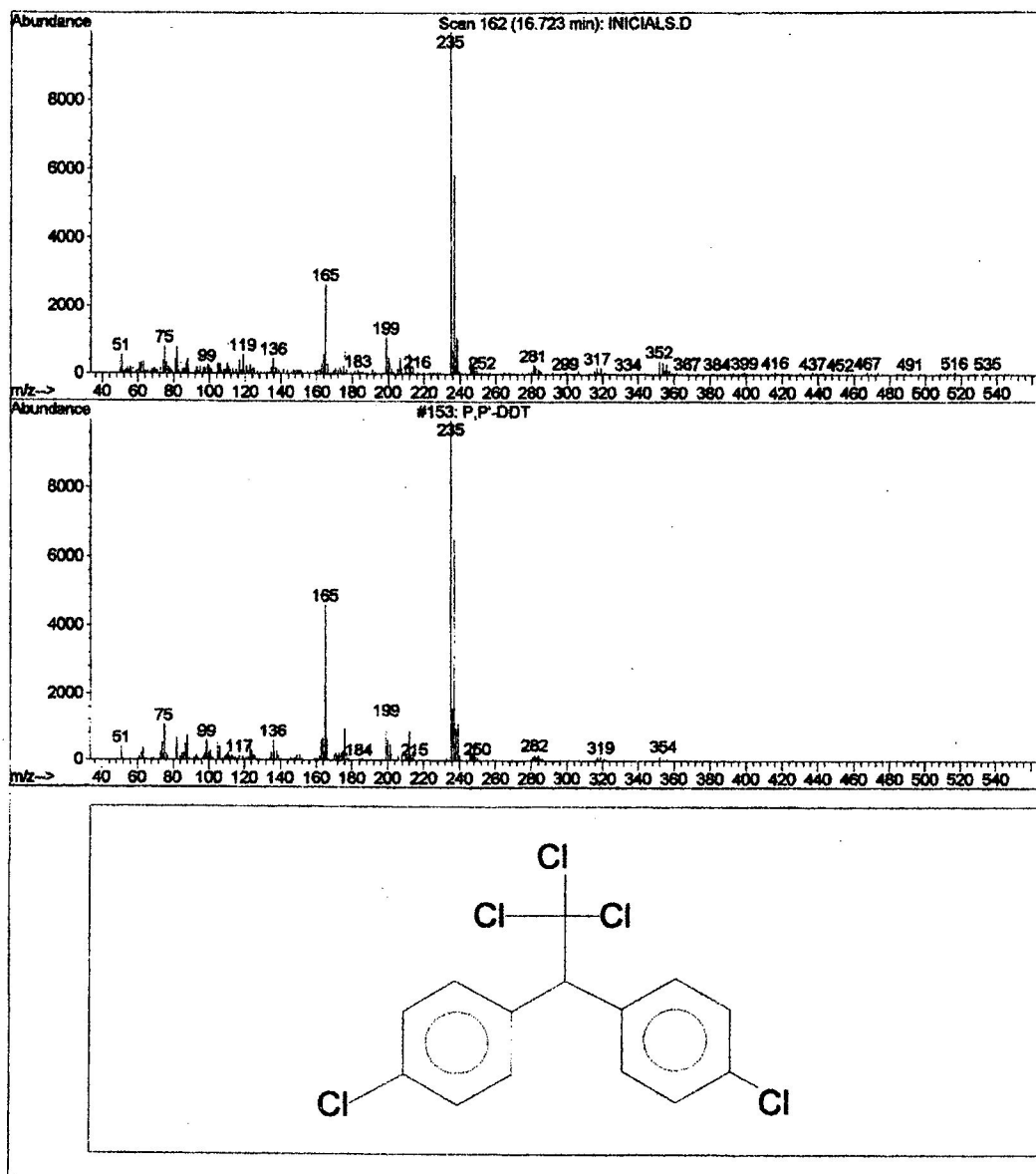


PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

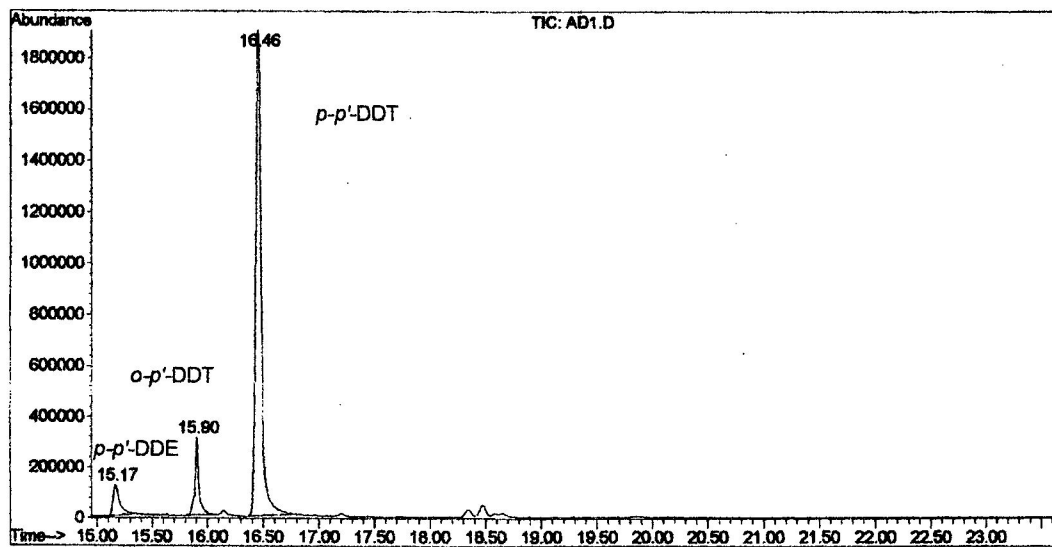
Anexo No. 10. Espectros de masas del ion identificado *o-p'*-DDT de la muestra patrón y la librería HHPEST respectivamente. En tercer plano se observa la estructura del *o-p'*-DDT.



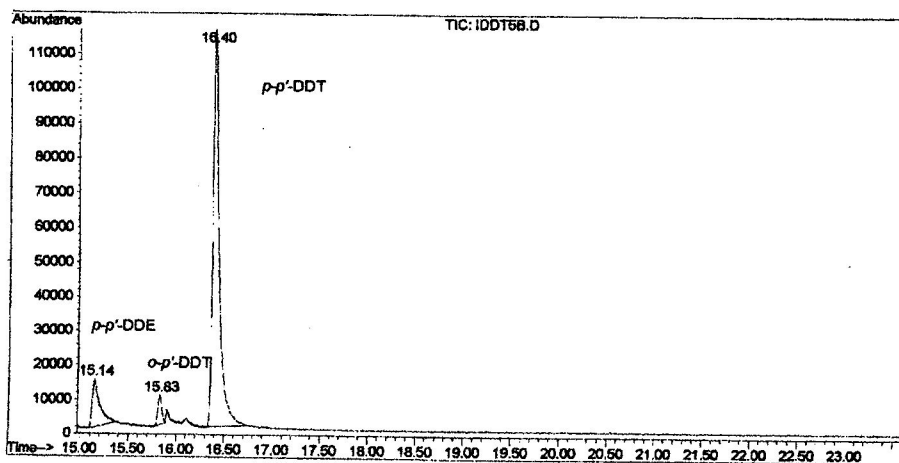
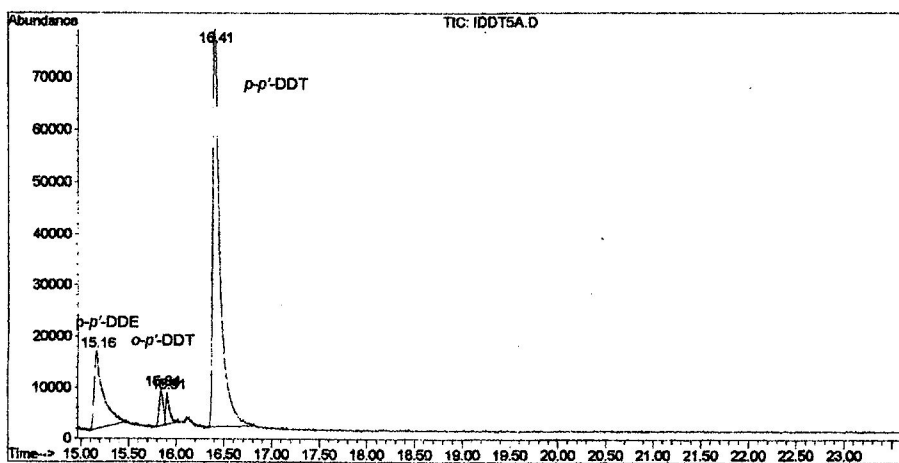
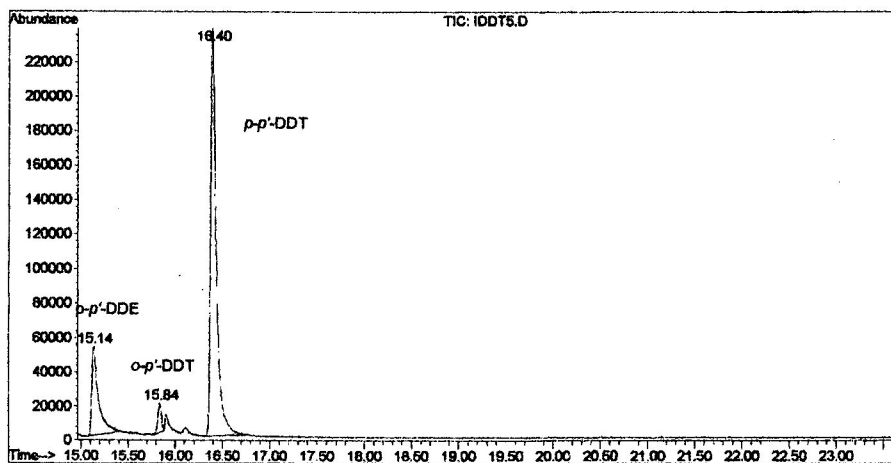
Anexo No. 11. Espectros de masas del ion identificado *p-p'*-DDT de la muestra patrón y la librería HHPEST respectivamente. En tercer plano se observa la estructura del *p-p'*-DDT.



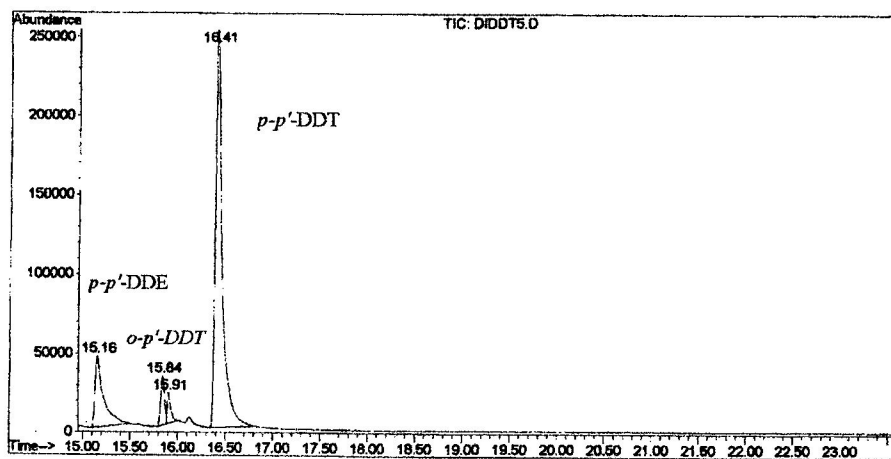
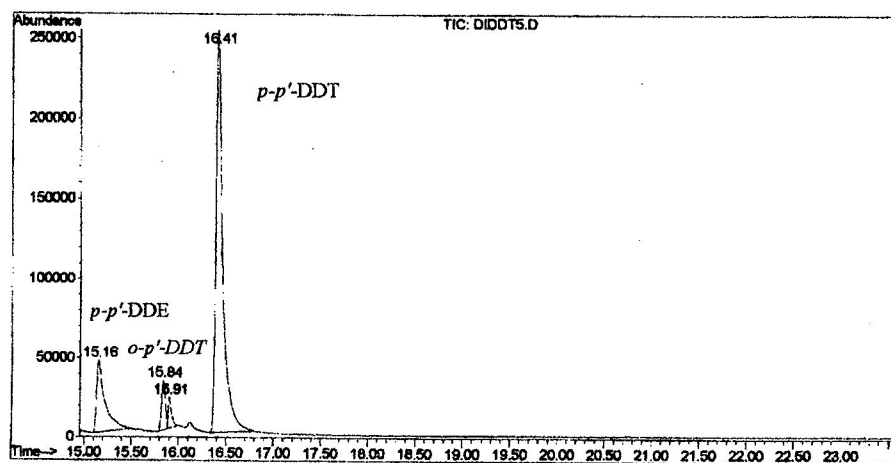
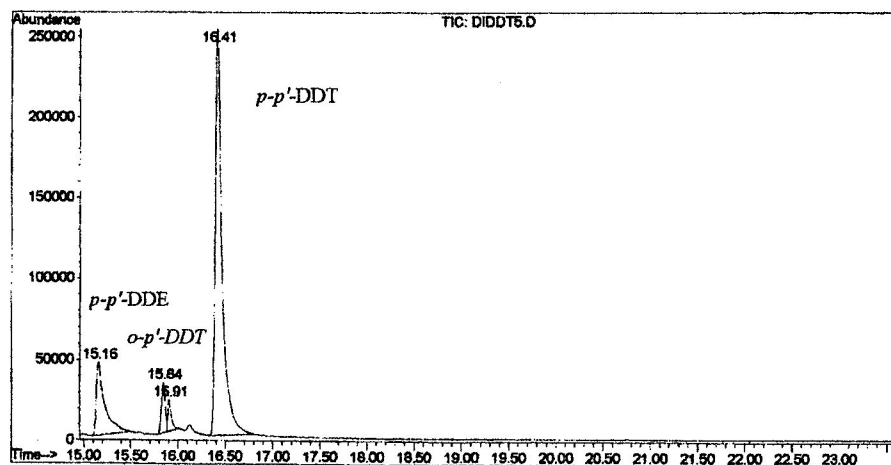
Anexo No. 12 Muestra patrón de DDT a 1 ppm analizada en modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM). Los iones seleccionados fueron en su orden: *p-p'*-DDE, *o-p'*-DDT, *p-p'*-DDT.



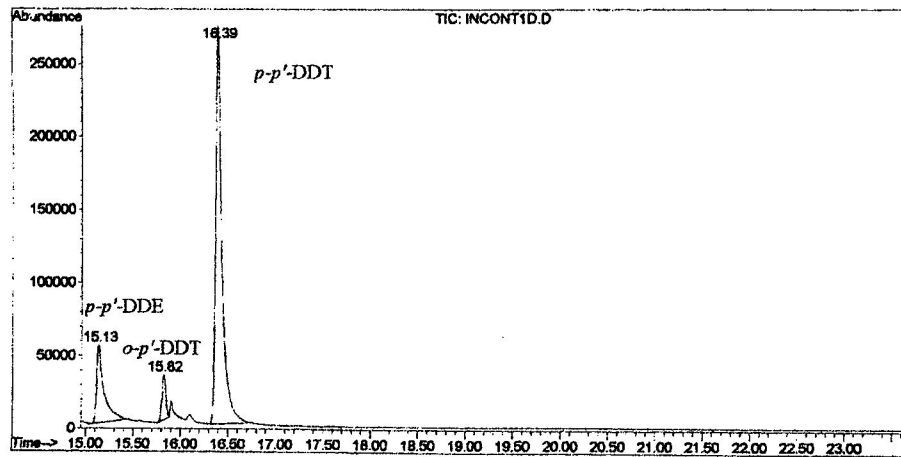
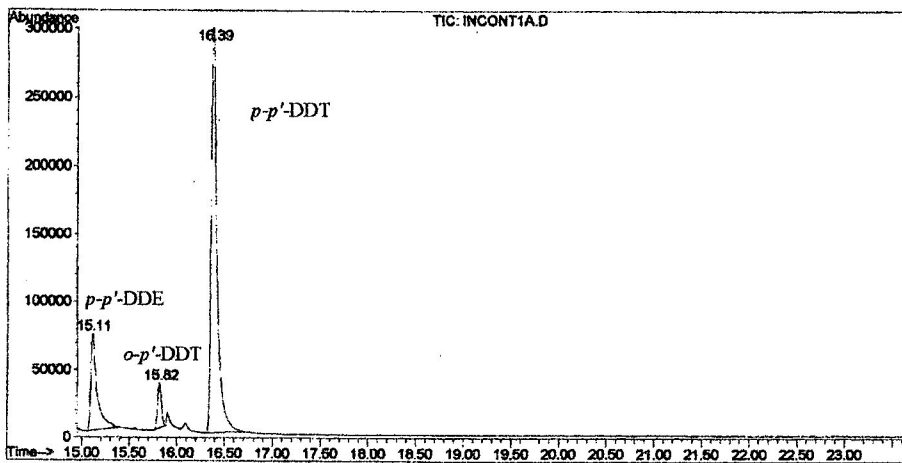
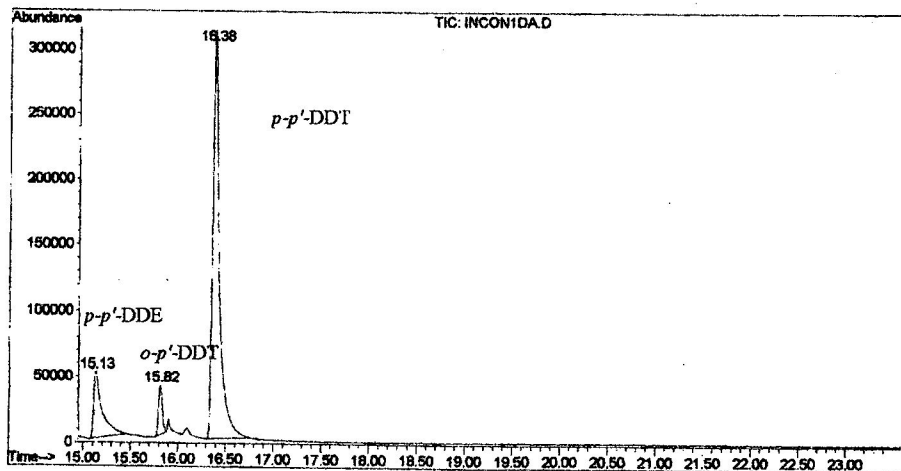
Anexo No. 13. Muestra Inicial de DDT 5 ppm. Primera, segunda y tercera inyección.



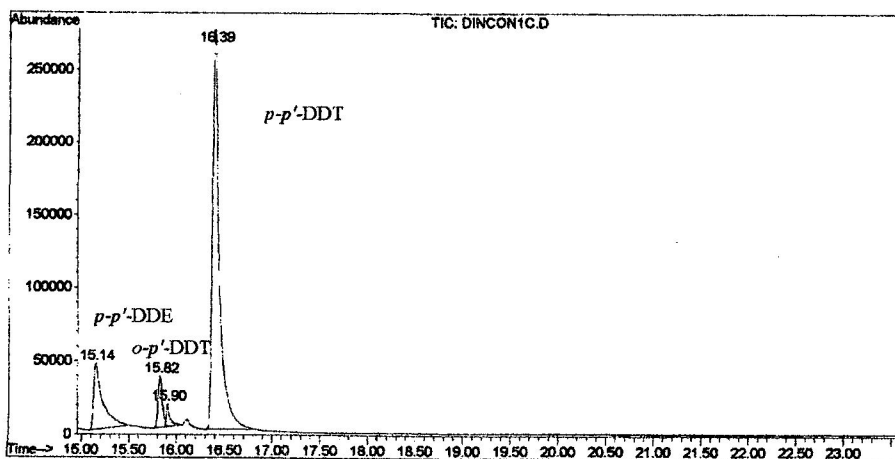
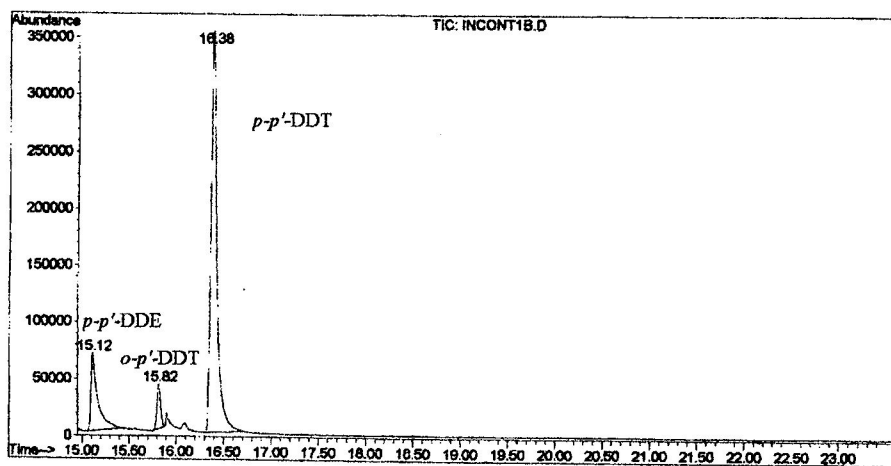
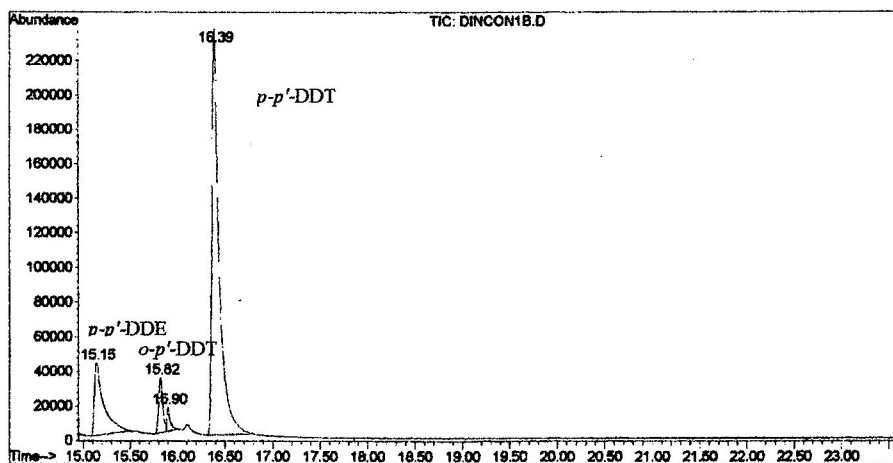
Anexo No. 14. Duplicado Muestra inicial DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a la primera, segunda y tercera inyección.



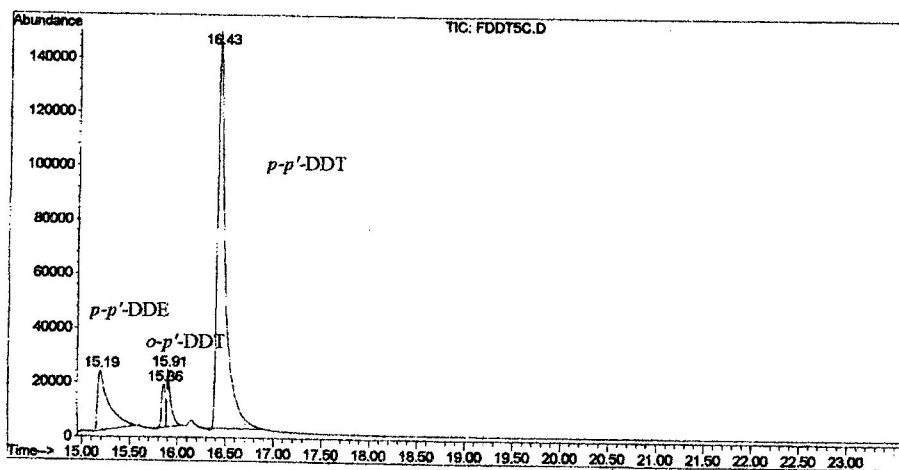
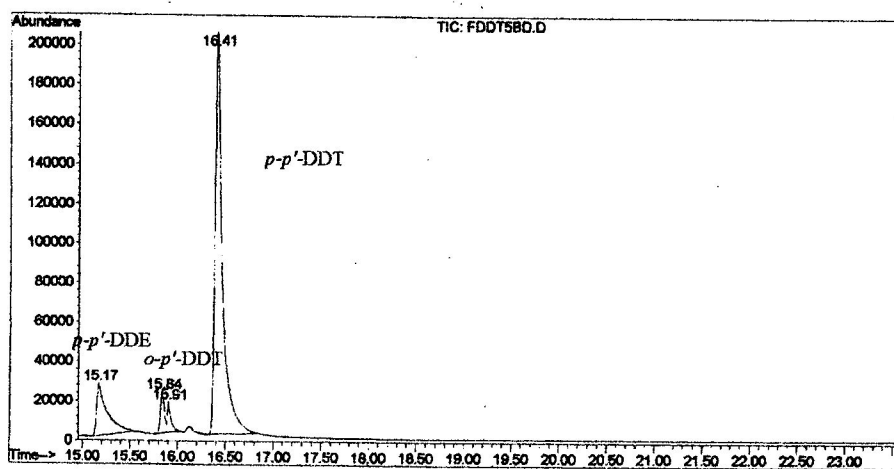
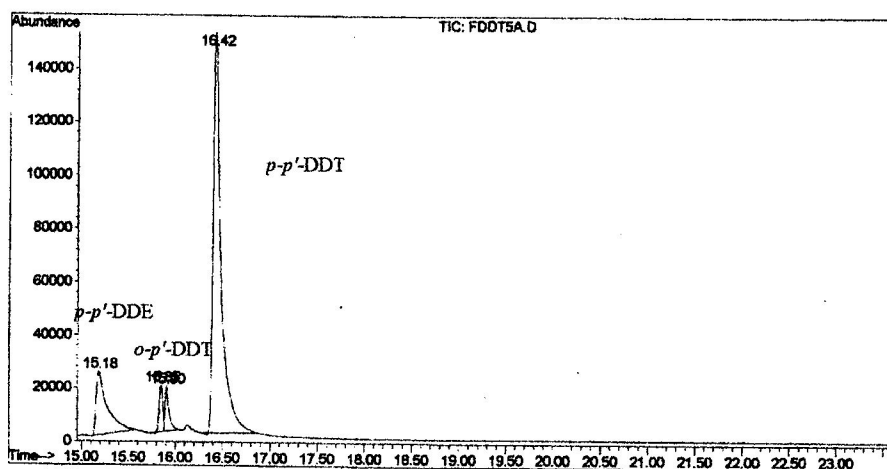
Anexo No. 15. Control Inicial DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a primera, segunda y tercera inyección.



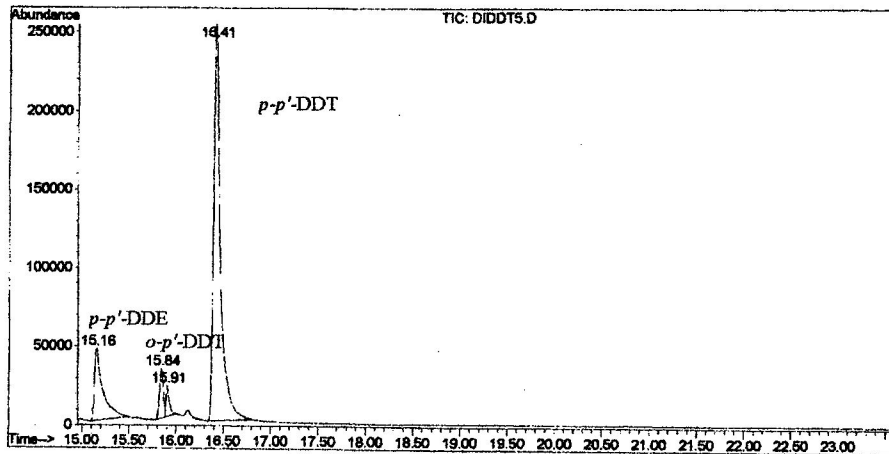
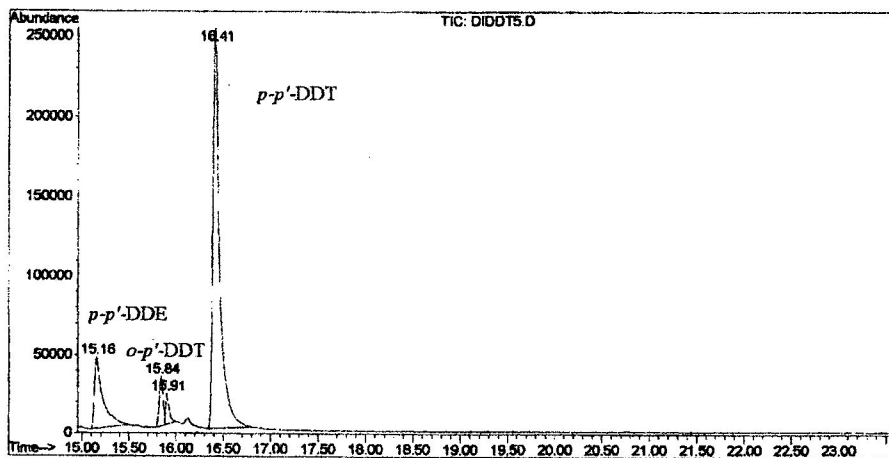
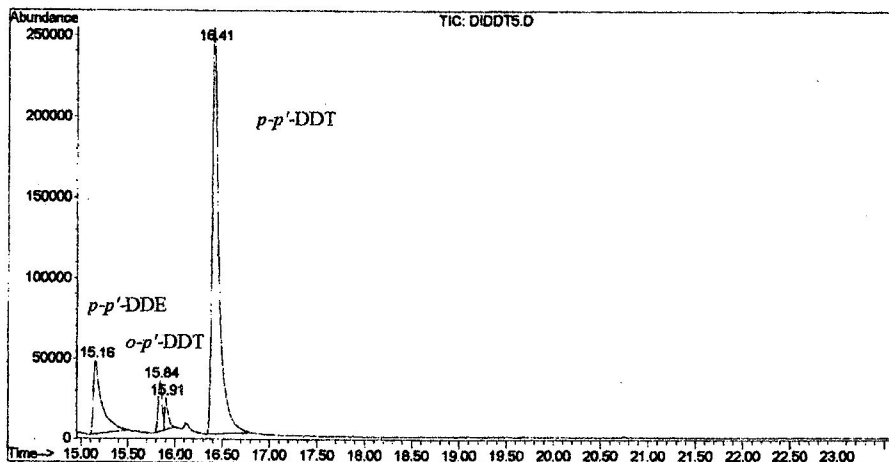
Anexo No. 16. Duplicado Control Inicial DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a primera, segunda y tercera inyección.



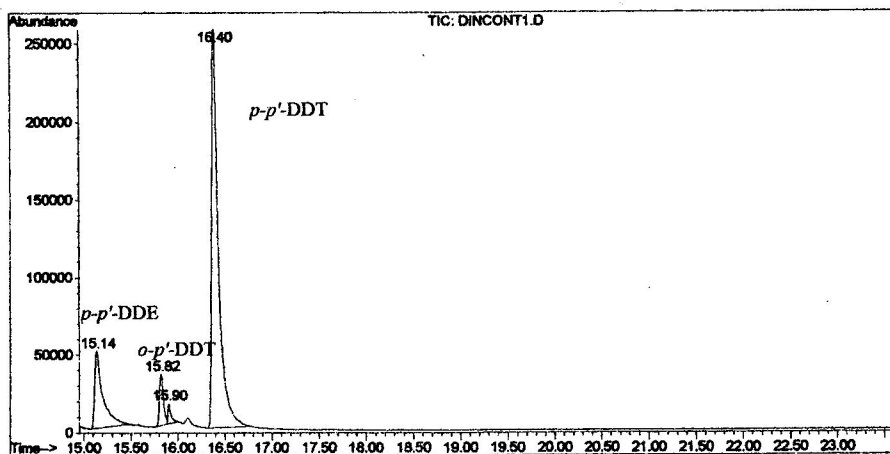
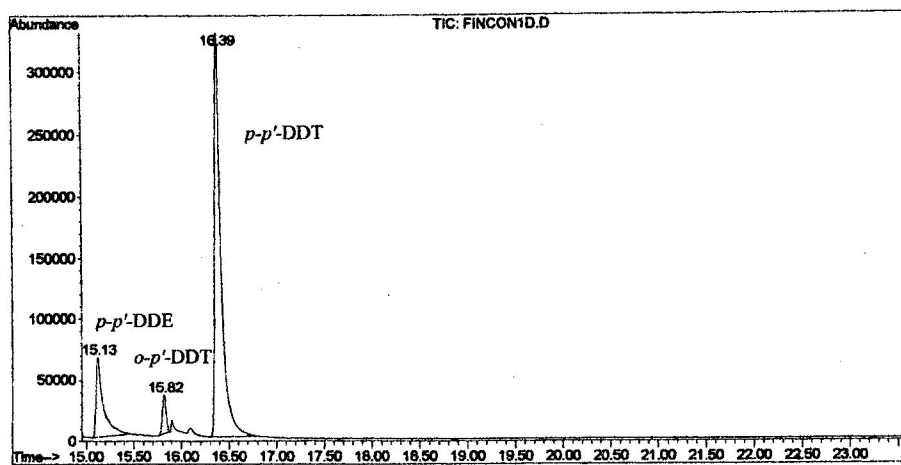
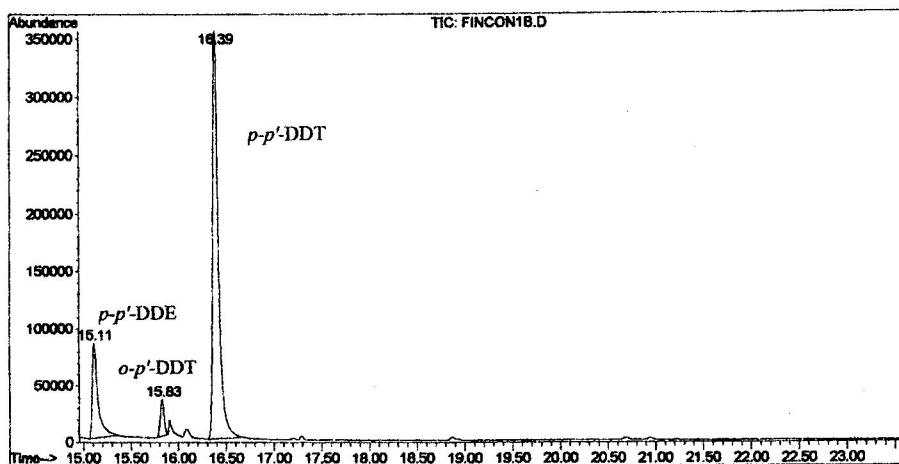
Anexo No. 17. Muestra Final DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a la primera, segunda y tercera inyección.



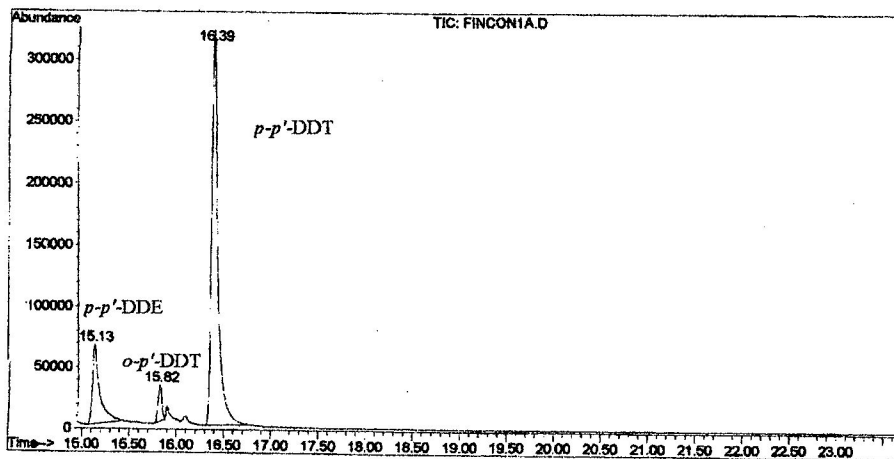
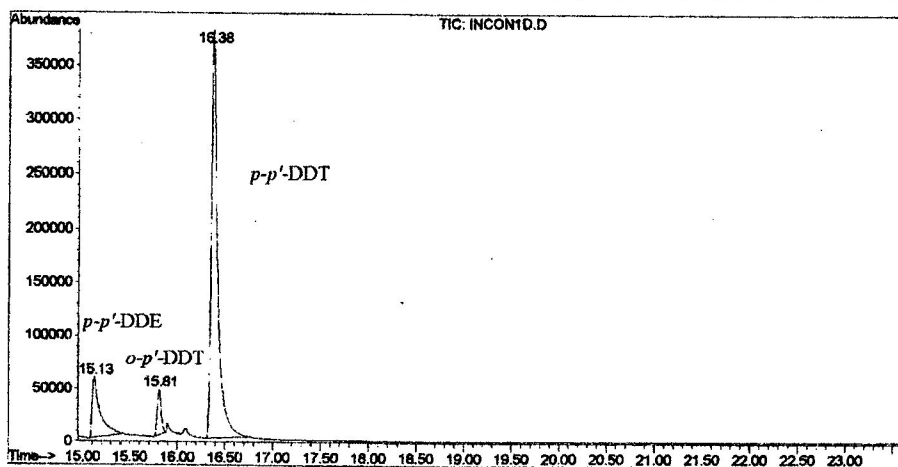
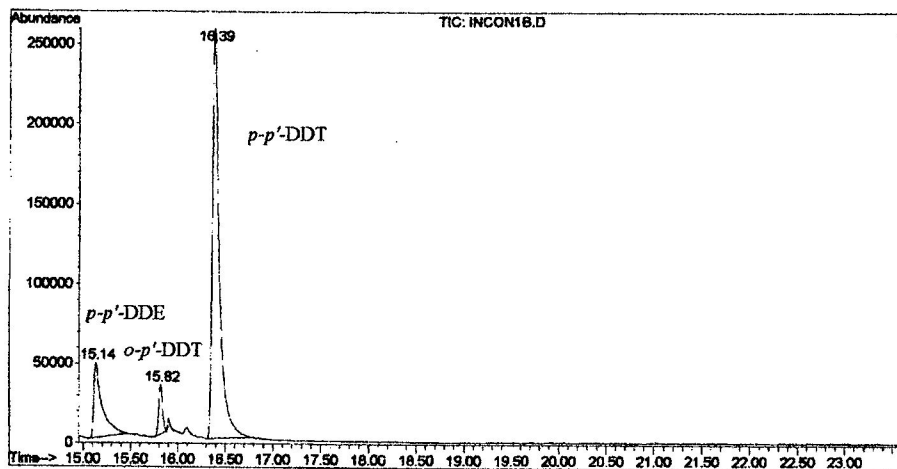
Anexo No. 18. Duplicado Muestra Final DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a la primera, segunda y tercera inyección.



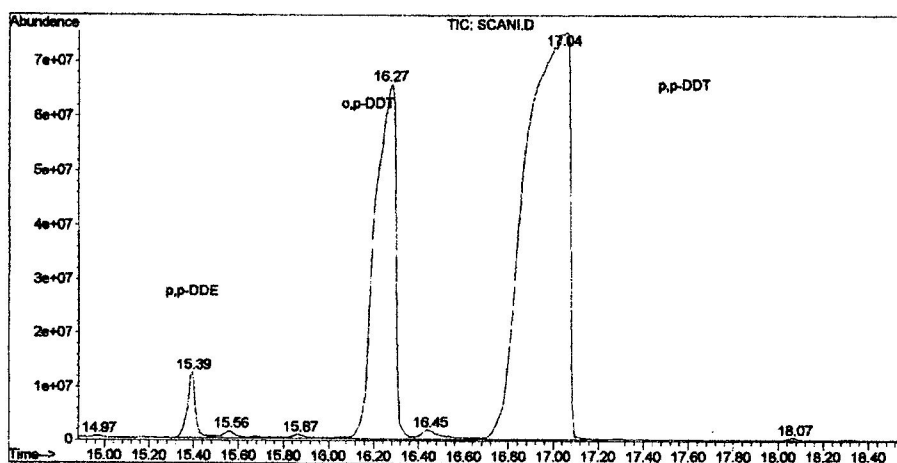
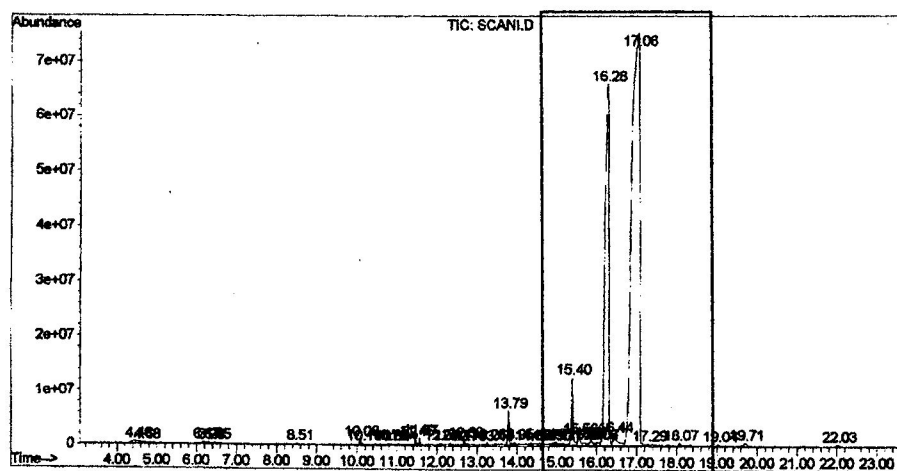
Anexo No. 19. Control Final DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a la primera, segunda y tercera inyección.



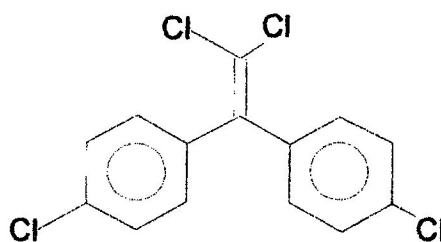
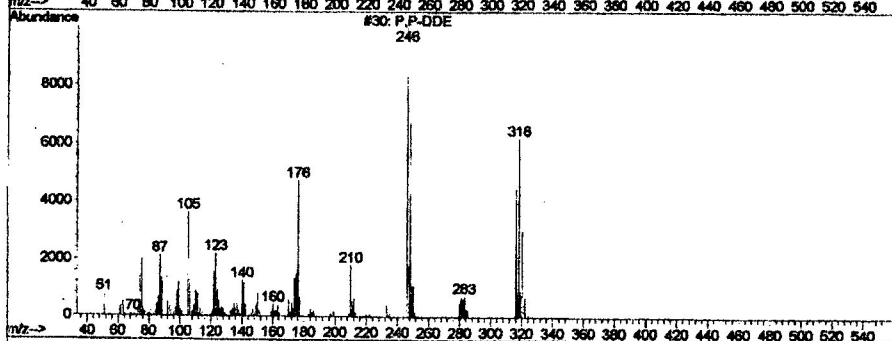
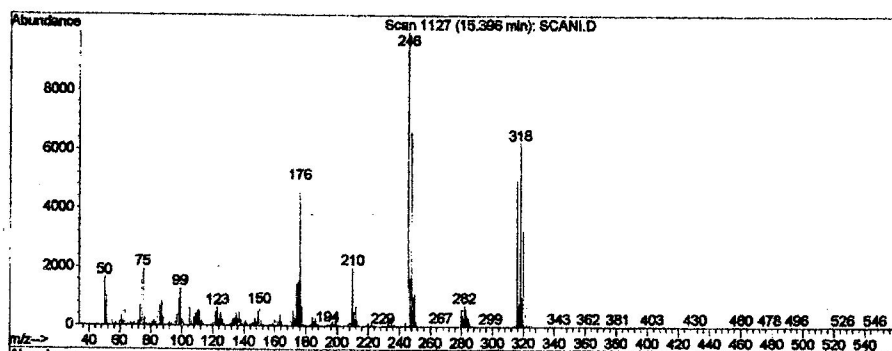
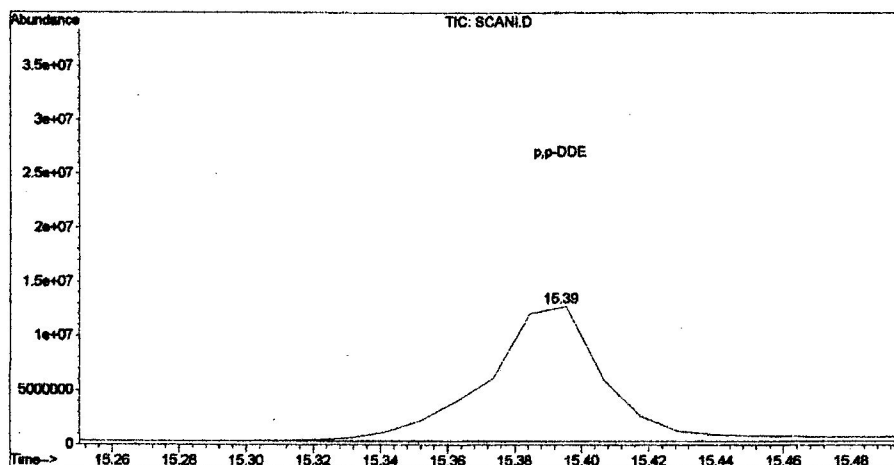
Anexo 20. Duplicado Control Final DDT 5 ppm. Cromatogramas correspondientes a la primera, segunda y tercera inyección.



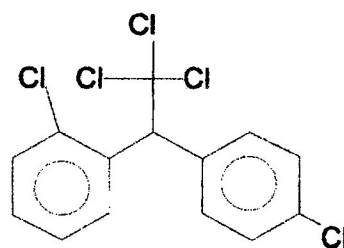
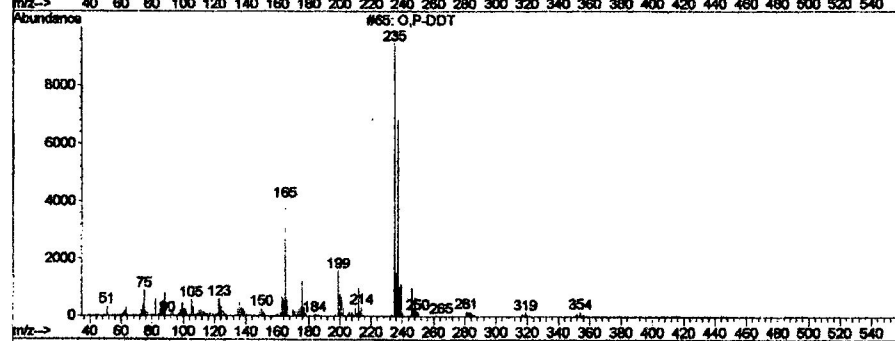
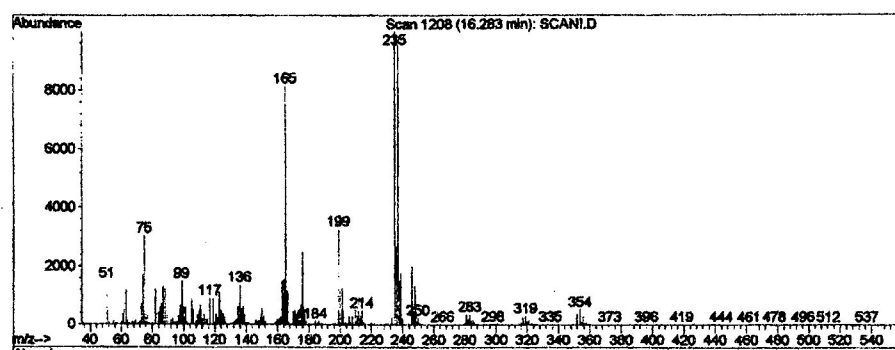
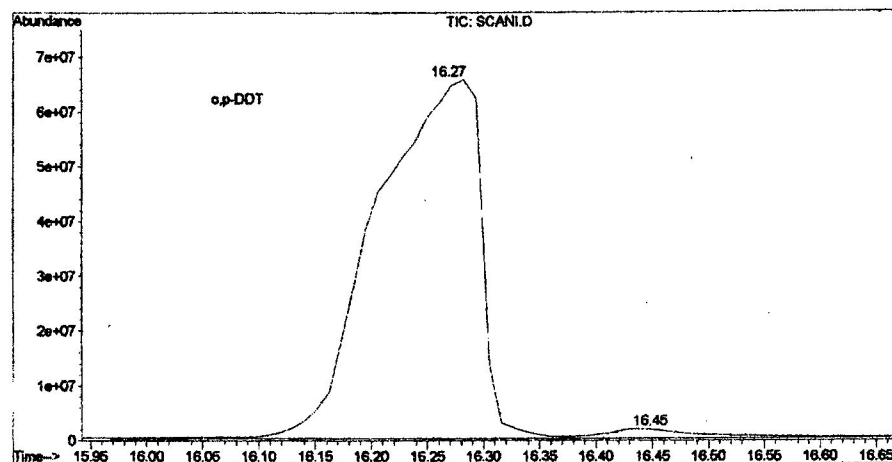
Anexo No. 21. Cromatograma total de iones de la muestra inicial de DDT concentrada a 50 μl e inyectada en modo SCAN. En segundo plano se observa la ampliación del cuadro seleccionado con los picos del *p-p'*-DDE, *o-p'*-DDT y *p-p'*-DDT.



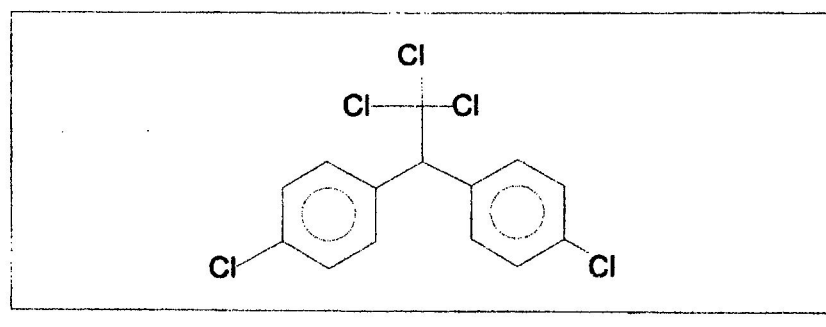
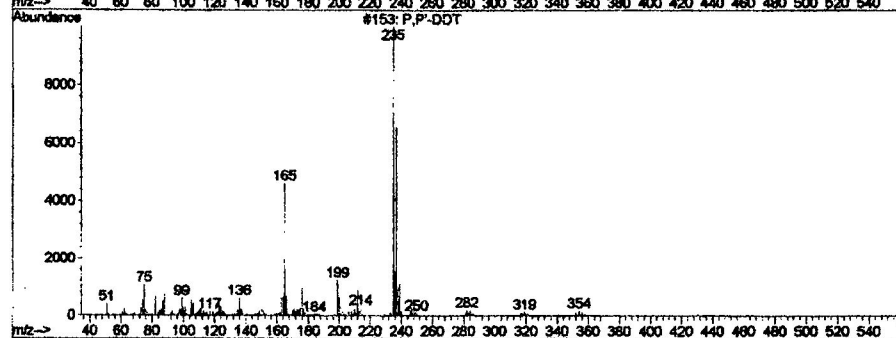
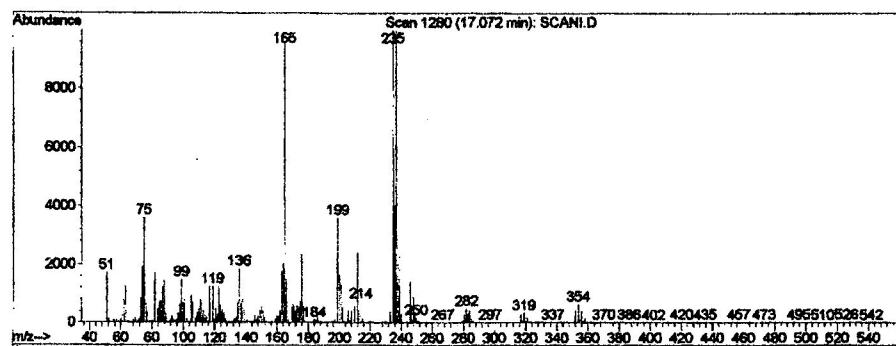
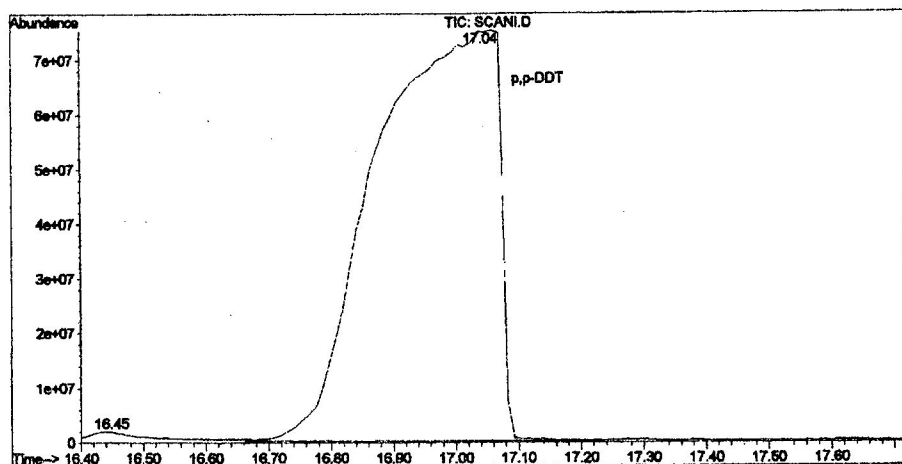
Anexo No. 22. Área ampliada del pico del *p-p'*-DDE de la muestra inicial concentrada a 50 μ l analizada en modo SCAN. En segundo y tercer plano se observan los espectros de masas del *p-p'*-DDE de la muestra y de la librería respectivamente. En cuarto plano se observa la estructura del *p-p'*-DDE.



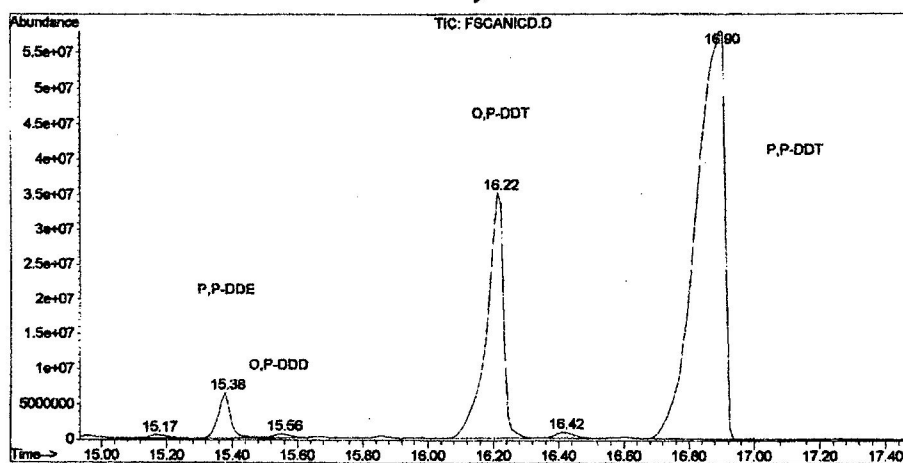
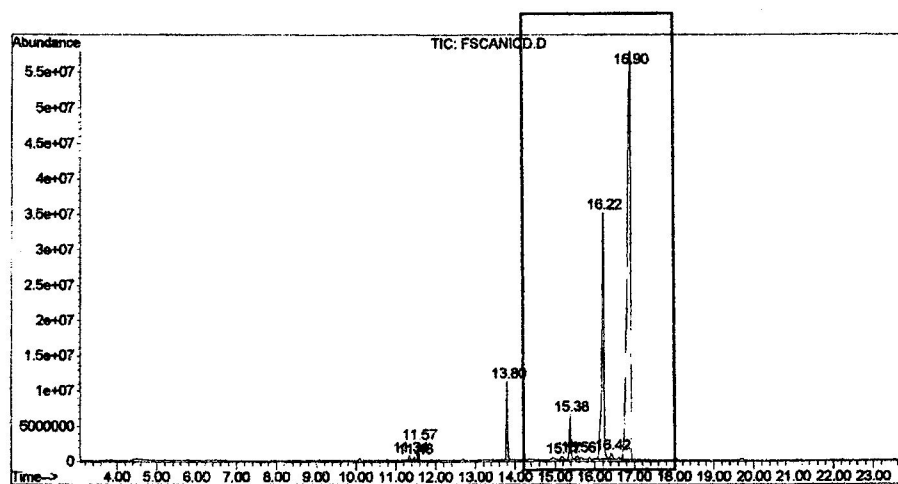
Anexo No. 23. Área ampliada del pico del *o-p'*-DDT de la muestra inicial concentrada a 50 μ l y analizada en modo SCAN. En segundo y tercer plano se observan los espectros de masas del *o-p'*-DDT de la muestra y la librería respectivamente. Hacia el final se observa la estructura del *o-p'*-DDT.



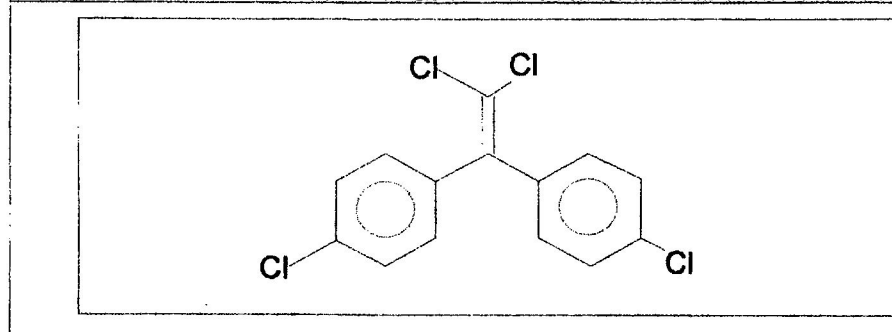
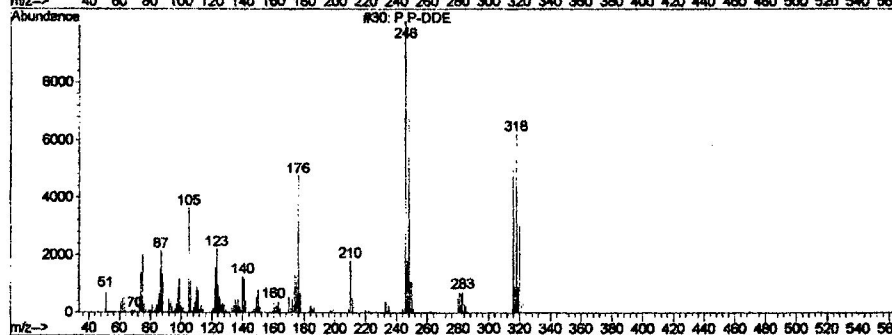
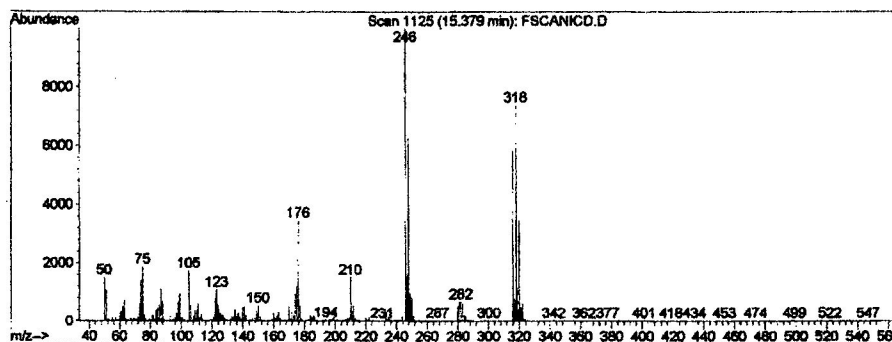
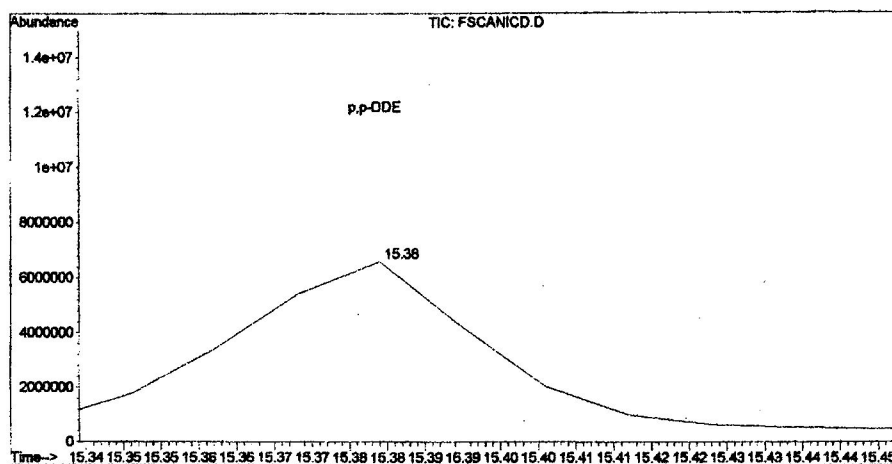
Anexo No. 24. Área ampliada del pico del *p-p'*-DDT de la muestra inicial concentrada a 50 μ l analizada en modo SCAN. En segundo y tercer plano se observan los espectros de masas del *p-p'*-DDT de la muestra y la librería respectivamente. Hacia el final se observa la estructura del *p-p'*-DDT.



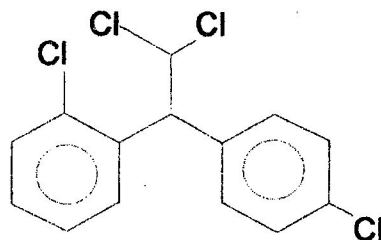
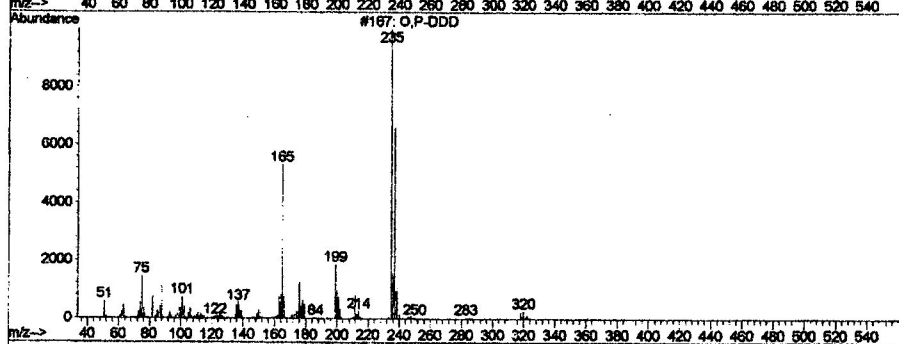
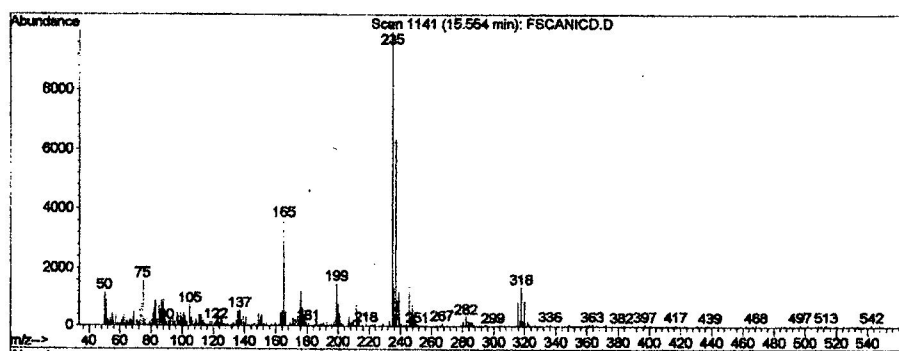
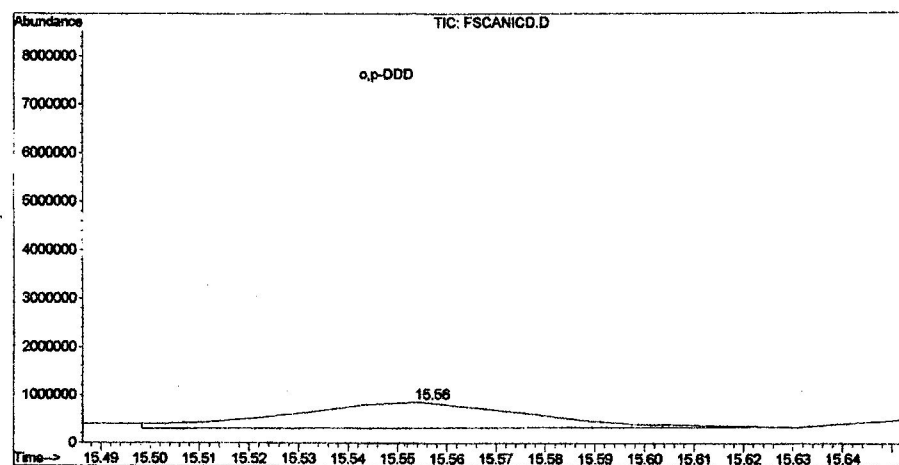
Anexo No. 25. Cromatograma total de iones de la muestra final de DDT concentrada a 50 μ l e inyectada en modo SCAN. En segundo plano se observa el área ampliada de la selección, donde se observan los picos del *p-p'*-DDE, *o-p'*-DDD, *o-p'*-DDT, *p-p'*-DDT.



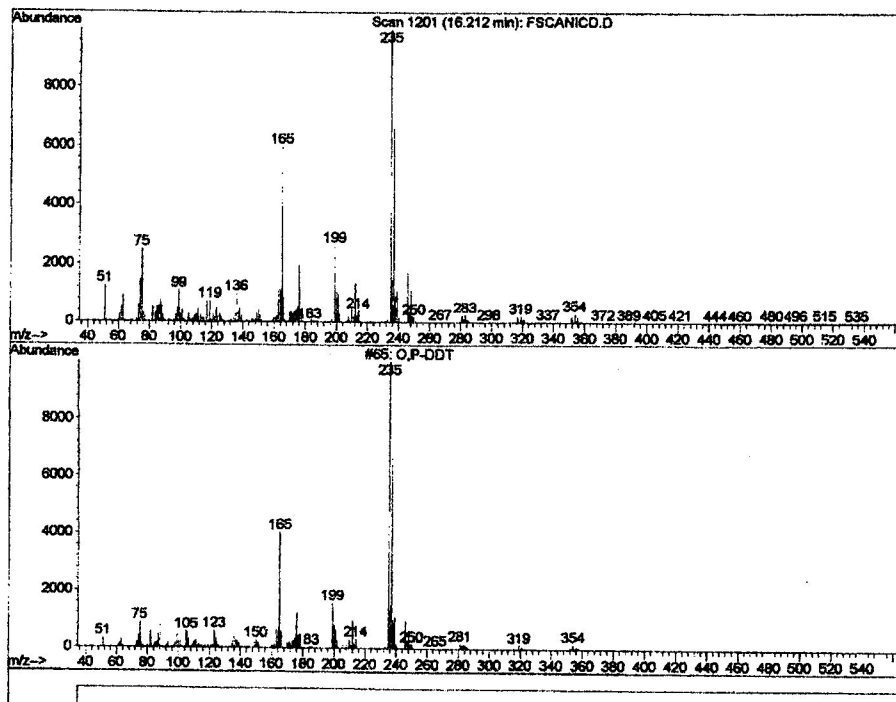
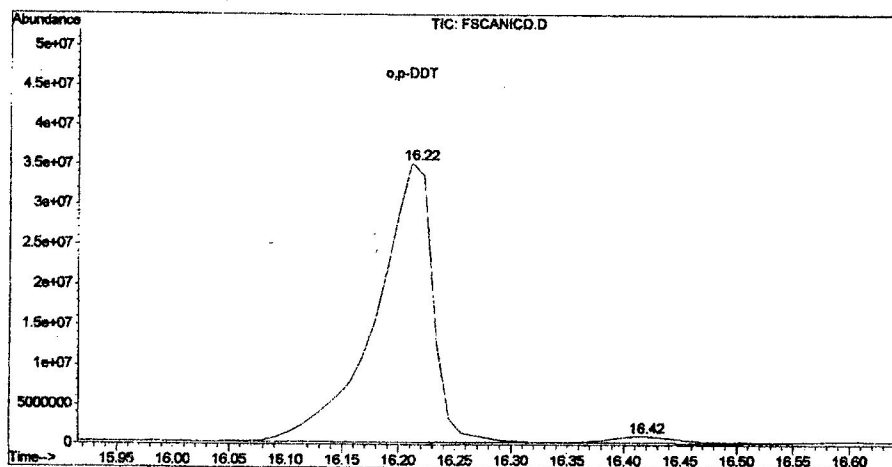
Anexo No. 26. Ampliación del pico del *p-p'*-DDE de la muestra de DDT final concentrada a 50 μ l. En segundo y tercer plano se observan los espectros de masas del compuesto identificado y la libería respectivamente. Hacia el final se muestra la estructura del *p-p'*-DDE.



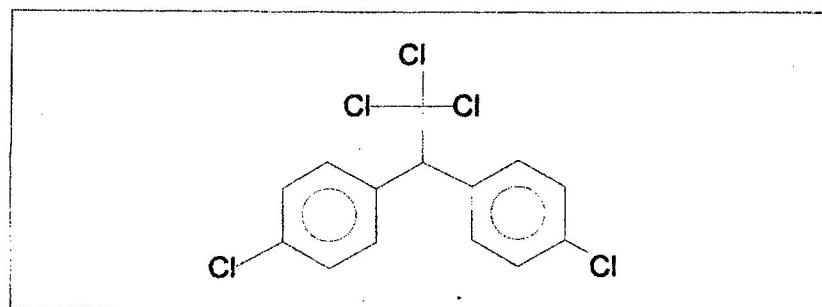
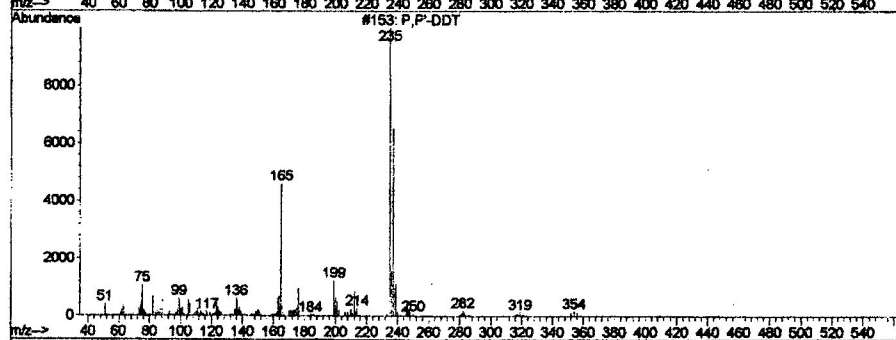
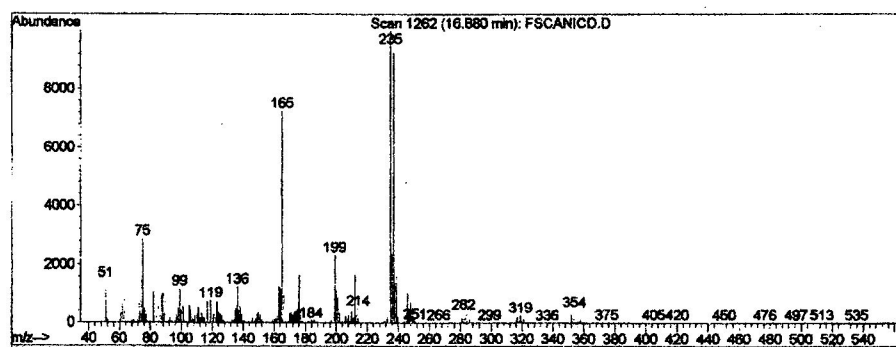
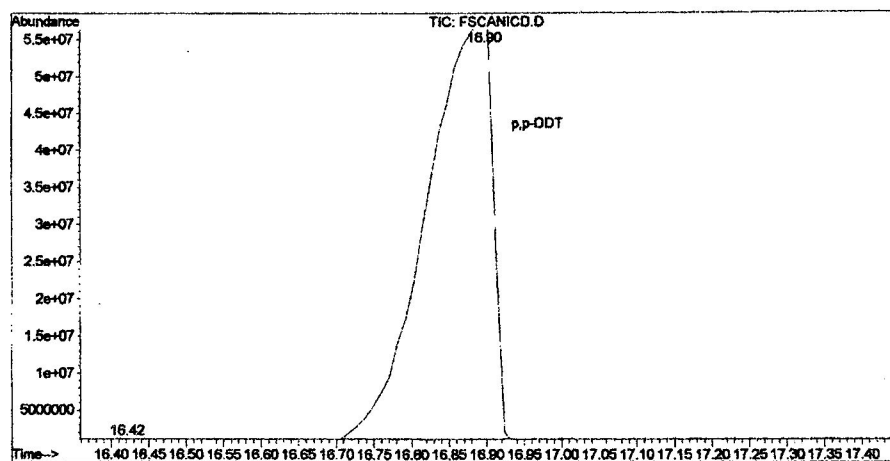
Anexo No. 27. Ampliación del pico del *o-p'*-DDD de la muestra final de DDT concentrada a 50 μ l y analizada en modo SCAN. En segundo y tercer plano se observan los espectros de masas del compuesto identificado y la librería respectivamente. Hacia el final la estructura del *o-p'*-DDD.




Anexo No. 28. Ampliación del pico del *o-p'*-DDT de la muestra final de DDT concentrada a 50 μ l y analizada en modo SCAN. En segundo y tercer plano los espectros de masas del compuesto identificado y la librería respectivamente. Hacia el final la estructura del *o-p'*-DDT.



Anexo No. 29. Ampliación del pico del *p-p'*-DDT de la muestra final de DDT concentrada a 50 μ l y analizada en modo SCAN. En el segundo y tercer plano los espectros de masas del compuesto identificado y la librería respectivamente. Hacia el final se observa la estructura del *p-p'*-DDT.

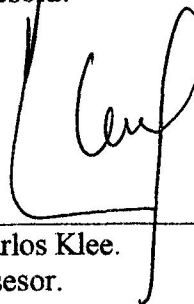




Milton Rolando Baldizón Pernillo.
Tesista.



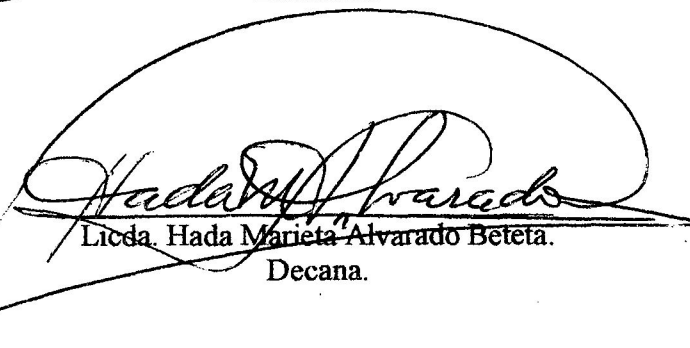
Licda. María del Carmen Bran.
Asesora.



Lic. Carlos Klee.
Asesor.



Licda. Heidi Elke Legemann Lima.
Directora.



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta.
Decana.