



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

USO POTENCIAL DE *Colpoda cucullus* (Müller, 1773) COMO
BIOSENSOR DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS
ASOCIADOS AL SUELO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M en C. LOURDES PATRICIA CASTRO ORTÍZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

COMITÉ TUTOR: DRA. NORMA EUGENIA GARCÍA CALDERÓN

DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

México, D. F.

Agosto 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO CFCI-DE/PS/8/12

ASUNTO: Oficio de Jurato

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informarle usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS del (la) alumno (a) CASTRO CATI? QUIROGA PATRICIA con número de cuenta 91335094 con la tesis titulada: "Uso potencial de *Colpodes cucullus* (Willm., 1773) como bioensayo de plaguicidas organofosforados asociados al suelo", realizada bajo la dirección del (la) DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO:

Presidente:	DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI
Vocal	DRA. MARÍA DEL CARMEN CALDERÓN ESOJERRO
Secretario	DR. ALFONSO LUIS MORALES
Suplente	DR. RAFAEL VÁZQUEZ RODRÍGUEZ ZARAGOZA
Suplente	URA NORMA LUCENA GARCÍA GONZÁLEZ

De acuerdo con lo anterior, el(a) alumno(a) se acogió a la nueva normatividad, con base en el artículo QUINTO TRANSITORIO en apego a lo establecido en el Artículo 2º del Reglamento General de Estudios de Posgrado (2 de octubre de 2008).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad de México, D.F., a 15 de agosto de 2012.

M. del C. Arriaga
D. e. María de Coro Arriaga Arriaga
Coordinadora de Programa

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MCA/AN/JFM/ABR/12/1111

Agradecimientos

- Al Posgrado en **Ciencias Biológicas, UNAM.**
- Se agradece la beca de doctorado con clave 167313 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a lo largo de los estudios de posgrado en Ciencias Biológicas.
- Se hace patente el apoyo recibido, por parte del proyecto DGAPA UNAM PAPIIME (Clave PE205706), PAPIIT (Claves IN107209 y IT103312) y al PAIP 6190-14 (FQ-VMLP, 2009, 2010 y 2011) otorgado por la Facultad de Química de la UNAM, para la obtención de materiales y reactivos.
- Al comité tutorial integrado de la siguiente manera:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Tutor principal)

Dra. Norma Eugenia García Calderón

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza

Agradecimientos a título personal

- Al Dr. Jorge Luis Flores por su valioso apoyo durante la realización de este proyecto, así como por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos en el laboratorio de Electrofisiología del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- A la Bióloga Rosa Maria Picaso por su apoyo en la obtención de las microfotografías electrónicas de barrido de las células de *C. cucullus*. En el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.
- Al Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.
- Al cepario de la Facultad de Química de la UNAM, por facilitar la cepa de *Escherichia coli*.
- Al Dr. Salvador Rodríguez por facilitar las instalaciones de su laboratorio cuando fue requerido para poder desarrollar este trabajo y por su apoyo en las revisiones de los escritos.
- A la Dra. Norma García Calderón por su apoyo durante la elaboración de este trabajo así como en la revisión de los escritos del mismo.
- Al Dr. Francisco Bautista por su apoyo y correcciones en los escritos relacionados con las actividades académicas del doctorado.
- Al Dr. Rafael Villalobos por su gran apoyo durante la redacción del primer artículo de revisión relacionado con este trabajo que fue publicado en la Revista Internacional de Contaminación Ambiental.
- Al M en C Arturo Avila Licona por su valioso apoyo en la parte de identificación molecular de *Colpoda cucullus*.

Dedicatorias

A mi familia que siempre me ha apoyado y acompañado a lo largo de esta otra etapa de mi vida como estudiante y profesionista, gracias a todos por estar presentes siempre.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por tener siempre confianza en mí, por impulsarme a ser mejor profesionista y por su apoyo a lo largo de los años que convivimos juntos en el laboratorio de Microbiología Experimental. Al maestro Luciano por su apoyo y amistad.

A todas las personas que ayudaron con parte de su tiempo y trabajo a finalizar este proyecto.

A mis compañeros de micro experimental Rafa, Serch, Benja, Hugo, porque con su alegría y ocurrencias siempre tuvimos tiempo de compartir risas y alegrías además del trabajo. A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Micro experimental.

A la Dra. Rosalba Esquivel porque además de sus enseñanzas y apoyo me brindo su amistad, gracias Ross.

ثَقَافُ تَكْمَحِب كَيَفِيَّة ل تَعَل يَمِي وَال وُقْت صَدَاق تَكْمَع لِي شَكْرَا

Aunque pase por cañadas oscuras, no temo ningún mal, porque tú estás conmigo con tu vara y tú bastón y al verlas voy sin miedo (Salmo 23.)

ÍNDICE

Agradecimientos.....	ii
Agradecimientos a título personal	iii
Dedicatorias	iv
ÍNDICE	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tablas.....	vii
RESUMEN	1
Abstract	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivos Particulares.....	4
2.3 Hipótesis.....	4
2.4 Justificación	4
2.4 Alcances	5
4 Estrategia de trabajo,	6
3.- MARCO DE REFERENCIA.....	8
3.1 Protozoos del suelo como indicadores de contaminación	9
3.2 <i>Colpoda cucullus</i> (Müller, 1773)	10
3.3 Biosensores	12
3.4 Plaguicidas	14
3.4.1 Compuestos Orgánicos Persistentes.....	16
3.4.2 Convenio de Estocolmo	17
3.4 Plaguicidas organoclorados, usos y detección	19
3.4.1 DDT.....	22
3.4.2 Uso de DDT en México.....	23
3.5.1 Efectos del uso de DDT	25
3.5.2 DDT en suelos	26
3.5.3 Rutas de degradación del DDT	28
3.5.4 Efecto del DDT sobre los microorganismos.....	31
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1.1 Revisión bibliográfica, obtención de suelo y del organismo de interés	33
4.1.2 Identificación molecular de <i>Colpoda cucullus</i>	34
4.2 Disolución del DDT	36
4.2.1 Exposición de <i>C. cucullus</i> a DDT	36
4.3 Construcción de microdosificador.....	37
4.4. Inmovilización celular.....	37
4.5 Detección de la señal proveniente de <i>C. cucullus</i>	38
5. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL.....	40
5.1 Obtención de suelo limpio	40
5.2 Ubicación del sitio de muestreo	41
5.3 Obtención de colpódidos del suelo	43
5.4. Resultados y discusión de la primera etapa experimental.....	45
5.4.1 Caracterización del suelo de Mixquiahuala	45
5.4.2 Aislamiento e identificación morfológica del organismo de interés	46

5.4.3 Identificación molecular y obtención del árbol filogenético de <i>C. cucullus</i>	49
5.4.3 Análisis cromatográfico del suelo	50
5.5 Conclusiones de la Primera Etapa Experimental	52
6. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL	53
6.1 Disolución del DDT	54
6.2 Pruebas de toxicidad	55
6.3 Construcción de un equipo de Microdosificación	55
6.4 Resultados y discusión de la Segunda Etapa Experimental.....	57
6.5 Análisis Probit.....	61
6.6 Obtención del lixiviado de suelo contaminado con DDT.....	63
6.7 Conclusiones de la Segunda Etapa Experimental.....	65
7. TERCERA ETAPA EXPERIMENTAL.....	66
7.1 Resultados y discusión de la Tercera Etapa Experimental.....	67
7.2 Inmovilización celular.....	67
7.3 Detección y medición de la señal proveniente de <i>C. cucullus</i>	68
7.4 Conclusiones de la Tercera Etapa Experimental.....	70
8. CONCLUSIONES.....	72
9. Recomendaciones.....	73
8. REFERENCIAS.....	74
Anexo 1	85
Anexo 2	89
Anexo 3.....	90

Lista de Figuras

Figura 1.- Diagrama de El método de trabajo durante el trabajo experimental.....	7
Figura 2. Esquema general del colpódido.	12
Figura 3. Principales componentes que conforman un biosensor.....	14
Figura 4.- Estructura del DDT y de sus productos de degradación (Tomado de Dalla y Pupo, 2006). ...	22
Figura 5.- Movimiento y destino del DDT en el ambiente.....	28
Figura 6. Paso de DDT a DDD por medio de dechlorinación reductora.....	29
Figura 7. Degradación del DDT por medio de dechlorinación.....	29
Figura 8. Principales rutas de degradación del DDT en la naturaleza.	30
Figura 9. Metodología seguida en la primera etapa experimental con DDT en bioensayos.....	41
Figura 10. Ubicación del municipio de Mixquiahuala en el estado de Hidalgo.....	42
Figura 11. Vegetación predominante en la localidad de Benito Juárez	42
Figura 12. Representación esquemática de la forma de muestreo en campo	43
Figura 13. Microhábitat cerrado para promover el exquistamiento de los ciliados del suelo de Mixquiahuala, Hgo	44
Figura 14. Microfotografías del ciliado <i>Colpoda cucullus</i> “in vivo” (campo claro 40X).....	47
Figura 15. Tinción con verde de metilo. A) Macronúcleo, cilios, citostoma y B) vacuolas digestivas (40X campo claro).	47

Figura 16. Tinción con nitrato de plata (100X campo claro)	48
Figura 17. Quiste de reproducción y división de la cepa cultivada (40X campo claro)	48
Figura 18. Árbol filogenético de las secuencias de ADNr 18S de dos cepas puras amplificadas con los primers Colp-F Colp-R con referencias del genbank de NCBI. Se presentan los valores de <i>Bootstraps</i> superiores a 50%. Ambas secuencias, están relacionadas con la referencia <i>Colpoda cucullus</i> (no. Acces. EU039893.1).	50
Figura 19. Metodología seguida para realizar la segunda etapa experimental.	53
Figura 20. Diagrama de flujo de la forma es que se realizaron las pruebas de toxicidad.	55
Figura 21. Circuito eléctrico y soporte de las válvulas solenoides del microdosificador.	56
Figura 22.- Nuevo equipo de dosificación, después de los cambios realizados al primer sistema.....	57
Figura 23. <i>C. cucullus</i> expuesto a DDT A y B [4 mg/ ml] (40 X), C (100X) y D testigo (40 X)	58
Figura 24.- Diferentes cortes de las células de <i>C. cucullus</i> en donde es posible apreciar Va D = Vacuola digestiva, Ma = Macronúcleo, Mt = corte transversal de cilio, FiMt = Fibra compuesta de microtubulos transversales, Ca C = Cavidad del citostoma, MT = mitocondrias.	59
Figura 25. Micrografías de transmisión de <i>C. cucullus</i> A) 2.5 mg/mL lisis celular y daño en la membrana nuclear. B) Célula libre de DDT. Me=membrana, Ci = cilios, Mi = Mitocondrias, Ci = citoplasma, Nu = núcleo, Ct = citoplasma	60
Figura 26. Datos obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda	61
Figura 27. Concentración letal media para el DDT sobre el ciliado <i>Colpoda cucullus</i>	62
Figura 28.- Grafica de recuperación, en término de DQO total, del DDT adicionado a una muestra de suelo.	64
Figura 29. Metodología seguida para llevar a cabo la última parte experimental	66
Figura 30. Inmovilización de <i>C. cucullus</i> A) 20 minutos y B) 40 minutos dentro de carragenina.....	67
Figura 31. Muestra la punta del microelectrodo dentro del citoplasma de <i>C. cucullus</i>	68
Figura 32. Célula de <i>C. cucullus</i> previamente incubada en FURA 2 AM, para producir fluorescencia.	70

Lista de Tablas

Tabla 1. Características de los primers específicos para el género <i>Colpoda</i>	35
Tabla 2. Datos obtenidos de la caracterización de la muestra compuesta del suelo de Mixquiahuala, Hgo.	45
Tabla 3. Condiciones de mantenimiento de <i>Colpoda cucullus</i> en el laboratorio	46
Tabla 4. Límites de detección (mg/kg) del equipo empleado para los plaguicidas encontrados en el suelo de Mixquiahuala	51
Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis cromatográfico del suelo de Mixquiahuala para detectar la presencia de plaguicidas (µg/kg).....	51
Tabla 6. Resultados obtenidos de la prueba de osmolaridad a las soluciones manejadas	54
Tabla 7. Concentraciones a las cuales el DDT causa diferentes efectos sobre los organismos	63

RESUMEN

Los protozoos son microorganismos ubicuos del suelo que pueden ser una herramienta útil para conocer el nivel de contaminación de este hábitat. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto toxicológico que ocasiona el DDT sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*. Así como, conocer si es posible su uso potencial como elemento biológico de un biosensor para detectar la presencia de DDT en suelos de cultivo. Se realizaron bioensayos de toxicidad a diferentes concentraciones de DDT a un tiempo de exposición de 1 hora, empleando una cepa silvestre de *C. cucullus*, encontrándose que esta especie no presenta modificaciones morfológicas observables a 0.5 mg/mL DDT, sino a concentraciones de 1 y 2 mg/mL, respectivamente, en las que ocurre daño en mitocondrias y membrana nuclear. La concentración letal media (CL₅₀) corresponde a 2.37 mg/mL DDT, mientras que el 100% de mortalidad se observó a partir de una concentración superior a 4 mg/mL DDT. Los daños causados por el DDT en la célula de *C. cucullus* van desde deformación hasta la lisis. Adicionalmente, las micrografías de barrido mostraron claros daños en mitocondrias, debido a que el DDT bloquea los canales iónicos de la membrana celular del ciliado, provoca la fuga de iones Na⁺ y Ca²⁺. El cambio de potencial de membrana puede ser empleado como una señal susceptible de ser captada por un elemento transductor; lo que hace posible el uso de *C. cucullus* como elemento biológico en la conformación del biosensor para suelos contaminados con DDT.

Abstract

Protozoa are ubiquitous microbial eukaryotes potentially useful to determine the level of pollutants in soil. The objective of this work was to determine the toxicological effect of DDT on the ciliate *Colpoda cucullus*. As well as to evaluate their potential use as biological component of a biosensor to detect the presence of DDT in soils. Toxicity bioassays were carried out with different DDT concentrations, at an exposure time of 1 hour, using a wild strain of *C. cucullus*. This strain did not show an observable morphological effect at a concentration of 0.5 mg/mL DDT, but mitochondria and nuclear membrane damage occurs at 1 y 2 mg/mL DDT concentrations. The mean lethal concentration (LC₅₀) was found to be 2.37 mg/mL DDT, while 100% mortality was observed at concentrations greater than 4 mg/mL DDT. Damage caused by DDT in the *C. cucullus* cell lysis ranging from deformation to further scanning micrographs showed clear damage to mitochondria. DDT blocked the ionic channels of the ciliate cell membrane producing Na⁺ and Ca²⁺ leakage. This change in the membrane's electric potential can be used as a signal receivable by a transducer; thus enabling the use of *C. cucullus* as a biological element in forming a biosensor for DDT-polluted soils

1.- INTRODUCCIÓN

La explotación agrícola del suelo se encuentra frecuentemente asociada con el uso de aguas residuales, fertilizantes y plaguicidas (Ansari y Malik, 2009). Un **plaguicida** es una sustancia o mezcla de ellas, destinada a controlar cualquier plaga o vector transmisor de enfermedades. La dispersión de los plaguicidas en el ambiente depende de las características del mismo (Sánchez *et al.*, 2004) y del funcionamiento del ecosistema. Entre los factores más importantes a considerar se encuentran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo: textura, pH, contenido de materia orgánica, actividad microbiológica, entre otras. En cuanto a condiciones ambientales se consideran temperatura y humedad. De los diferentes plaguicidas los organoclorados son los más persistentes y bioacumulables en el ambiente, por tal motivo resulta de particular interés contar con mecanismos rápidos y confiables que permitan detectarlos. El DDT fue un plaguicida ampliamente usado a finales de la década de los 70's y principios de los 80's a nivel mundial (Hu *et al.*, 2009), fue prohibido por el protocolo de Estocolmo en 2004. Actualmente, su uso se restringe a países en vías de industrialización como México y China que lo usan para el control y erradicación del vector transmisor de la malaria y fiebre amarilla (Thangavadivel *et al.*, 2009). Por lo que es necesario mantener un monitoreo permanente de su dispersión y acumulación en el ambiente, para lo cual una alternativa importante de ser explorada es el uso de microorganismos que puedan servir como bioindicadores y/o biosensores de contaminación (Sánchez *et al.*, 1984; Anderson 2003; Davoren y Fogarty, 2004; Arufe *et al.*, 2004). Es difícil elegir un microorganismo que pueda ser usado como bioindicador de calidad ya que en el suelo se encuentra una gran biodiversidad de microorganismos que aún son desconocidos para los científicos (Nahmani *et al.*, 2006), por lo que es necesario evaluar la sensibilidad al DDT de los pocos organismos conocidos y su potencial uso biotecnológico.

2.- OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el uso potencial de *Colpoda cucullus* como elemento biológico de un biosensor para detectar la presencia de DDT en suelos.

2.2 Objetivos Particulares

- Obtener cultivos de *Colpoda cucullus* de un suelo considerado libre de contaminantes
- Conocer la respuesta de *Colpoda cucullus* ante diferentes concentraciones de DDT.
- Determinar las características fisiológicas y morfológicas de *C. cucullus* que permitan su uso como elemento biológico del biosensor.
- Seleccionar el equipo de trasducción que permita medir sin ambigüedades la señal emitida por el elemento biológico.
- Evaluar el uso de *C. cucullus*, como elemento biológico de un biosensor para detectar el DDT.

2.3 Hipótesis

Dada la sensibilidad de *Colpoda cucullus* al estrés provocado por la presencia de contaminantes ambientales, responderá rápidamente a la presencia de DDT en suelo, dando como resultado desde cambios graduales en su morfología hasta lisis celular, lo cual será provocado por el bloqueo de los canales iónicos de la membrana celular.

2.4 Justificación

La contaminación del suelo por plaguicidas como el DDT, se evalúa por medio de extracción del contaminante remanente, midiendo la concentración presente en las extracciones. Dicha detección queda restringida por el límite de sensibilidad de los equipos empleados. Por este motivo, se plantean alternativas para la valoración de los contaminantes tales, como el uso de biosensores por lo que proponemos evaluar el uso del ciliado edafícola *Colpoda cucullus* como elemento biológico de un biosensor que

permita valorar de manera rápida, integral y económica, el grado de toxicidad que presente el DDT remanente en el suelo. La aplicación de esta herramienta, permitirá determinar si la tecnología de remediación de suelos es adecuada o no para la completa mineralización de los contaminantes, haciéndolos inocuos tanto al ambiente como a la salud.

2.4 Alcances

Durante el desarrollo del presente trabajo, se establecieron los criterios y las bases para la construcción de un biosensor de célula completa, utilizando al ciliado edafícola *C. cucullus* como elemento biológico del mismo. Se determinaron, las condiciones de trabajo en el laboratorio que permitan la construcción del biosensor previa selección del mejor equipo transductor de la señal emitida por el elemento biológico.

4 Estrategia de trabajo,

Para lograr los objetivos planteados se procedió según lo indicado en la Figura 1, de las actividades desarrolladas durante el trabajo experimental. Posteriormente, se especificará el método seguido en cada una de las etapas de las que constó el trabajo.

En este esquema se separan las etapas experimentales por figuras de la siguiente manera:

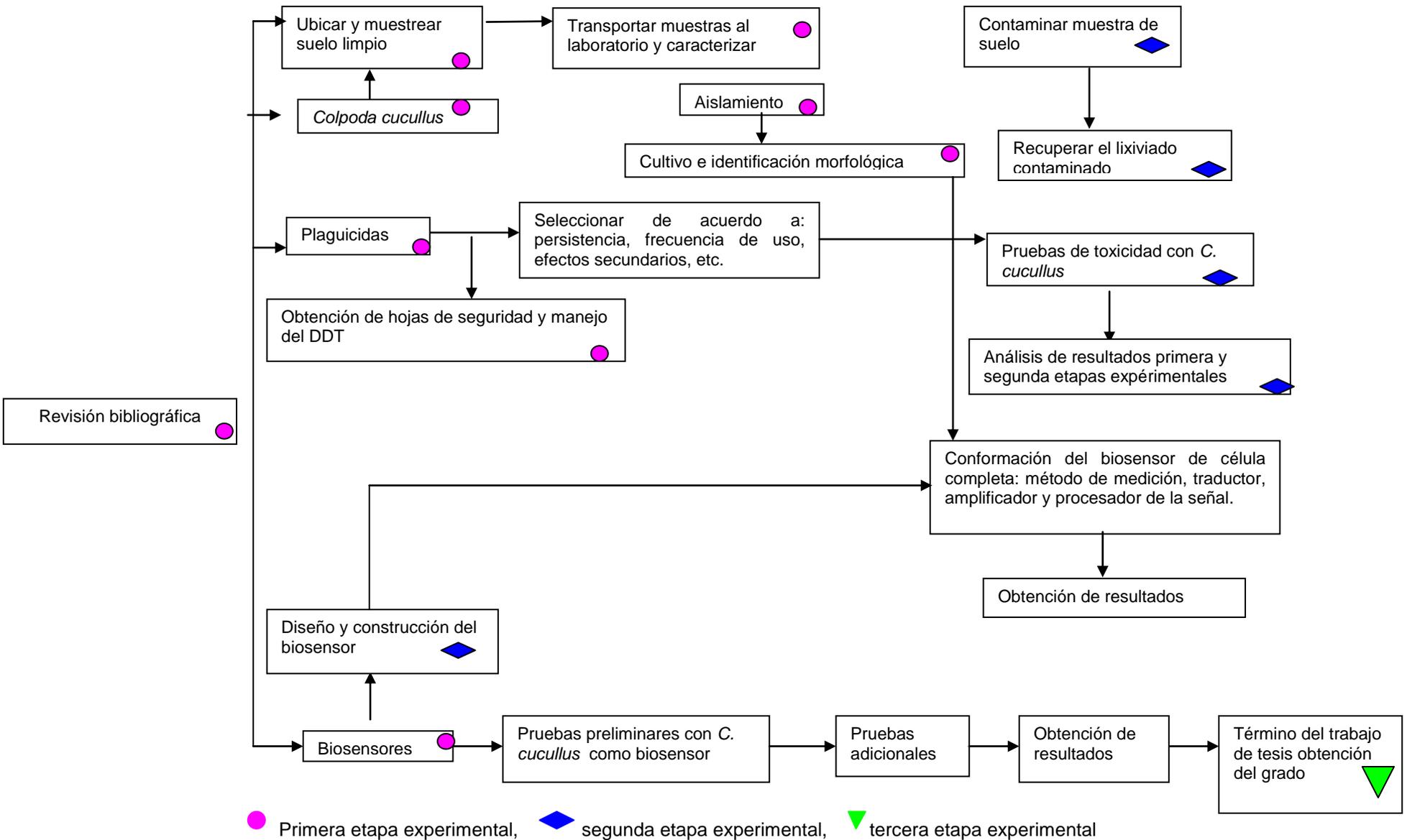


Figura 1.- Diagrama del método de trabajo durante el trabajo experimental.

3.- MARCO DE REFERENCIA

Tradicionalmente la evaluación del grado de contaminación del suelo se ha abordado mediante la aplicación de técnicas fisicoquímicas, sin embargo, dichas técnicas presentan diversos inconvenientes como la necesidad de contar con el equipo analítico adecuado, la preparación de estándares de calibración, la espera de un cierto tiempo de respuesta y la posibilidad de generación de subproductos, así como la obtención de un nivel adecuado de sensibilidad analítica. Además, estas técnicas, no indican si el contaminante presenta algún grado de toxicidad, motivo por el cual los **bioindicadores**, organismos que pueden ser usados para la detección y caracterización cuantitativa de ciertos factores o complejo de factores ambientales causados por influencia humana, juegan un papel importante en el biomonitoreo de sustancias tóxicas o persistentes en el ambiente. El biomonitoreo se refiere al uso de organismos para obtener información sobre la difusión de los contaminantes en la biosfera; para lo cual es posible utilizar microorganismos como bacterias y **ciliados**, o bien plantas o animales multicelulares (Szczepaniak y Biziuk, 2003; Franco *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Morelli *et al.*, 2005). Su uso en la evaluación de sitios contaminados provee información directa e integral de la biodisponibilidad y toxicidad de los contaminantes (Mphekgo *et al.*, 2005). Para lograr lo anterior es posible utilizar a los microorganismos endémicos del suelo, los cuales llevan a cabo procesos de **biodegradación** de compuestos químicos o mezclas de ellos, y pueden utilizarse para el biomonitoreo de los mismos. Estos microorganismos son capaces de metabolizar y mineralizar un gran número de moléculas orgánicas naturales y sintéticas, convirtiéndolas en inocuas al ambiente (Alexander 1999; Plaza *et al.*, 2005). De esta manera los microorganismos representan uno de los primeros mecanismos para la eliminación de los contaminantes (Marín *et al.*, 2005) y proporcionan información adicional sobre los efectos que contribuyen a la toxicidad o genotoxicidad de los mismos en el ambiente (Plaza *et al.*, 2005; Sarkar *et al.*, 2005). Sin embargo, el aumento de los contaminantes hace cada vez más difícil prever sus efectos sobre el ecosistema, por lo que se hace necesario contar con métodos de monitoreo ambiental complementarios a los análisis clásicos. Lo anterior es posible mediante el uso de

bioindicadores; que son herramientas biológicas utilizadas para detectar toxicidad aguda de ciertos contaminantes o condiciones ambientales extremas. Como especies de prueba se han usado mamíferos, aves y peces desarrollándose también ensayos con invertebrados, plantas, algas y bacterias (Farré *et al.*, 2005).

3.1 Protozoos del suelo como indicadores de contaminación

Los protozoos son los organismos fagotróficos más abundantes en el suelo, son importantes depredadores de bacterias y otros microorganismos, su habilidad para formar quistes cuando se encuentran en condiciones adversas y de exquistarse en condiciones favorables, su delicada membrana externa los hace responder de manera rápida al estrés ambiental y al provocado por las diferentes actividades antrópicas (Díaz *et al.*, 2006; Esteban *et al.*, 2006; Pratt *et al.*, 1997). Se consideran colonizadores en serie de muchos nichos ecológicos en la biosfera. Es posible hacer una asociación de ciertas especies y comunidades de protozoos con algunas de las características edáficas como tipo de suelo, régimen de humedad y distribución de poros. Estas características determinan la naturaleza de los componentes de la microbiota del suelo, que proveen de presas a la comunidad de protozoos heterotróficos. Al estar en contacto directo con el suelo es posible usarlos como bioindicadores de este ecosistema.

Algunas de las características que se han tomado en cuenta para los ensayos de toxicidad con ciliados es que son un componente esencial y abundante del suelo por lo que probablemente los cambios en la dinámica y en la estructura de la comunidad están influenciados por la fertilidad y formación del mismo, su rápida reproducción y delicada membrana externa los hace reaccionar rápidamente a los cambios ambientales, por lo que sirven como sistema de advertencia y excelente herramienta de bioensayo. Los resultados son obtenidos en menos de 24 horas, más rápido que cualquier otro sistema eucariótico de prueba, el genoma de los protozoos es similar al de los metazoos por lo que sus reacciones a los cambios ambientales pueden ser relacionadas con organismos superiores más fácilmente que los procariontes, y adicionalmente soportan condiciones ambientales extremas (Darbyshire, 1994;

Foissner, 1999). Los ciliados estimulan las velocidades de los ciclos de carbono y nitrógeno en los suelos, y en los sistemas de tratamiento de aguas residuales como los lodos activados mejoran la calidad del efluente (Lee *et al.*, 2004; González *et al.*, 2006).

Los ciliados más abundantes del suelo son los pertenecientes a la familia Colpodidae la cual es cosmopolita y se ha diversificado en un gran número de hábitats terrestres. Su ciclo de vida incluye quistes resistentes y estrategias adaptativas que le permiten sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, por modificación de estructuras celulares y funcionales (Trielli *et al.*, 2006).

Ciliados como *Colpoda steinni* y *Colpoda inflata* han sido usados en bioensayos, empleándose en pruebas de toxicidad para suelo (Campbell *et al.*, 1997; Pratt *et al.*, 1997; Gutiérrez *et al.*, 2003; Madoni y Romeo, 2006).

3.2 *Colpoda cucullus* (Müller, 1773)

Colpoda cucullus es un ciliado común, que se encuentra en casi todos los compartimentos del suelo (Arévalo-Trejar, 1967), lo cual hace a esta especie interesante para estudios asociados con la afectación en su calidad por la introducción de contaminantes.

Los colpódidos son formas de vida libre, típicamente encontrados en suelos presentan una ciliatura oral organizada, pudiendo ser formas exclusivamente edafícolas las cuales forman quistes. *Colpoda* es un género común, se alimenta primordialmente de bacterias sin embargo, algunas especies se alimentan también de levaduras, otros protozoos, así como de pequeños metazoarios y rotíferos. Presentan además, una amplia tolerancia a las condiciones abióticas extremas, rápido enquistamiento/exquistamiento y cuando el ambiente les es favorable una rápida multiplicación. Los ciliados colpódidos son los primeros colonizadores de los suelos; considerándose especies de selección r, seguido por las especies intermedias de selección K, manteniendo grandes poblaciones en comparación con otras especies (Bamforth, 2001).

Muchas de las especies de colpódidos pueden ser encontradas en suelos y musgos, muy pocos en hábitat semiterrestres como los charcos. Especies como *C. steinii*, *C. maupasi*, *C. inflata* y *C. cucullus* se encuentran frecuentemente en extractos de plantas. Los colpódidos son importantes en varios procesos físicos y biológicos del suelo ya que pueden incrementar el espacio poroso en un 8%, secretan sustancias que son fungicidas e incrementan la capacidad de fijación de nitrógeno de *Azotobacter*. Las especies de *Colpoda* se alimentan primordialmente de bacterias, ocasionalmente de cianobacterias, hongos y algas verdes. Especies como *C. steinii* y *C. cucullus* pueden ingerir partículas que van de 0.3 a 1.1 μm de tamaño (Foissner, 1993).

Colpoda steinii ha sido usado en pruebas de toxicidad para medir contaminación en suelo (Campbell *et al.*, 1997; Dive *et al.*, 1989), los resultados obtenidos muestran que los ciliados edafícolas pueden ser usados para comparar la toxicidad generada por contaminación con metales pesados en suelo y para examinar los factores que afectan la biodisponibilidad de las soluciones que contienen dichos metales.

Los microorganismos del suelo pueden ser expuestos a un extenso intervalo de tratamientos, incluyendo desecación, erosión, cultivo intenso, desforestación y depósito de algunos ácidos como el nítrico o contaminación con metales pesados, cabe señalar que la diversidad de los ciliados juega un papel determinante en la recuperación de este tipo de perturbaciones (Coûteaux y Darbyshire, 1998).

Debido a lo anterior este trabajo plantea el uso de *Colpoda cucullus* primero como microorganismo **bioindicador** (Castro-Ortíz, 2004) y posteriormente como posible elemento biológico para un biosensor. La figura 2 muestra el esquema de *Colpoda cucullus* con algunas estructuras representativas.

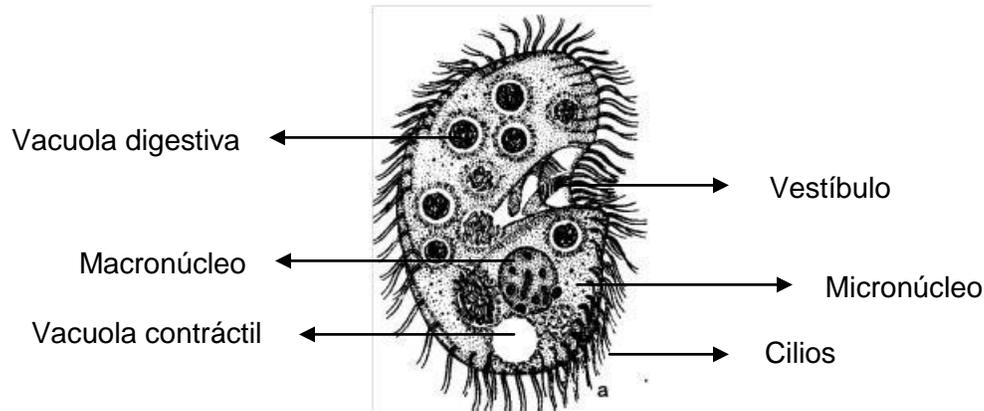


Figura 2. Esquema general del colpódido (Foissner, 1993).

Morfología y biología de *Colpoda cucullus*: Tamaño en vivo de 40 a 120 μm , generalmente 60 a 80 x 40 a 60 μm , reniforme, la apertura oral se encuentra ubicada en la parte anterior del cuerpo, macronúcleo globular de localización variable, el micronúcleo es lenticular junto al macronúcleo. Presenta una vacuola contráctil y poro excretor en la parte final posterior, un cortex flexible surcado de cinetias. El citoplasma en ocasiones es amarillo y con inclusiones cristalinas, el número de cinetias somáticas es muy variable pero la mayoría de las poblaciones presentan de 26 a 38 en promedio. Su reproducción generalmente es asexual y se lleva a cabo dentro de un quiste reproductor con la formación de cuatro colpódidos más pequeños en 7 horas.

3.3 Biosensores

Un biosensor se define como **un dispositivo compacto de análisis que incorpora un elemento de reconocimiento biológico el cual puede ser desde un ácido nucleico, una enzima, un anticuerpo hasta un tejido o una célula completa; asociado a un sistema de transducción que permite procesar la señal producida por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito** (Hall, 1991; Canh, 1993; González *et al.*, 2006). Consta de 3 elementos: a) el biológico que se encuentra en contacto con el dispositivo b) que es un transductor que convierte la señal biológica en una señal cuantificable ya sea de forma eléctrica, óptica o mediante

sensores térmicos y c) un amplificador de la señal que la envía a un sistema de toma y procesamiento de datos (Paitan *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005).

Los biosensores son clasificados de acuerdo con el método de transducción de la señal pudiendo ser electroquímica, óptica, piezoeléctrica o térmica. Estos son rápidos y de costo efectivo, pueden ser arreglados en equipos portátiles obteniendo mediciones en tiempo real o también ser usados como dispositivos remotos (Farré *et al.*, 2005). Pueden ser subdivididos en dos clases de acuerdo con el tipo de molécula de biorreconocimiento de la siguiente manera:

- Biosensores catalíticos; los cuales emplean enzimas y microorganismos como moléculas de biorreconocimiento, en éstos las reacciones de catálisis envuelven al analito para dar un producto. Comúnmente los analitos para biosensores catalíticos son pequeñas moléculas orgánicas como la glucosa.

- Biosensores de afinidad; en estos las moléculas de biorreconocimiento usadas incluyen a los anticuerpos, DNA, péptidos y lectinas; estos son caracterizados por un evento forzoso entre la molécula de biorreconocimiento y el analito (reacción de afinidad) esta clase de biosensor es compatible con la detección de agentes biológicos como toxinas, microbios y virus (Castillo *et al.*, 2004; Gooding, 2006). La figura 3 muestra los componentes típicos de un biosensor.

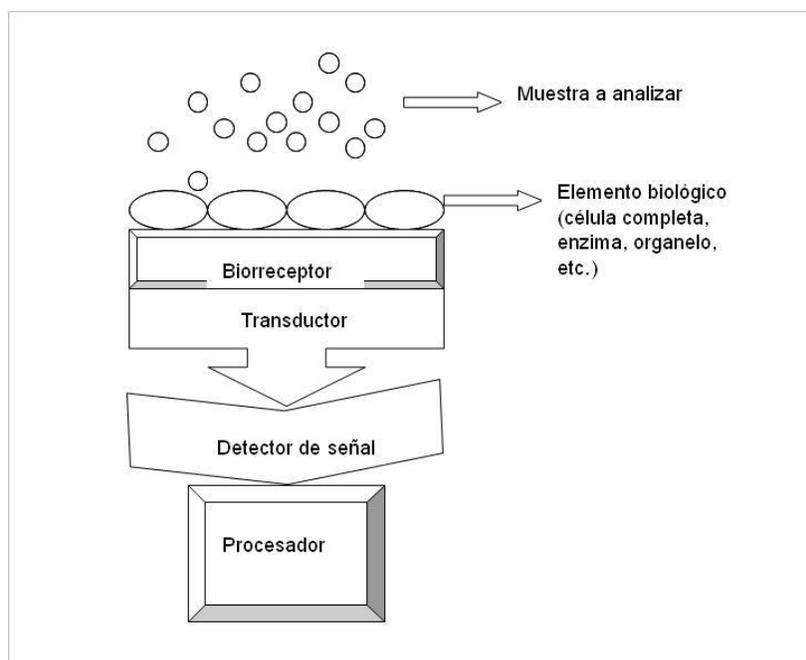


Figura 3. Principales componentes que conforman un biosensor.

Para el desarrollo de un biosensor se requiere de la identificación del sistema biológico, que proporcione la especificidad deseada, adicionalmente se necesita la construcción de un detector adaptado al sistema biológico lo que conlleva largo tiempo. Por otra parte también es necesario superar la posible destrucción del elemento biológico por el analito para obtener una señal detectable y cuantificable (Alcalá, 2002).

3.4 Plaguicidas

El hombre ha combatido las plagas desde épocas antiguas utilizando plaguicidas naturales. Fue a partir de la revolución industrial, con el crecimiento de las zonas urbanas y el requerimiento de mayor producción de alimentos, lo que ocasionó el aumento del uso de plaguicidas los cuales fueron derivados del petróleo. Con el aumento de las necesidades alimenticias también se incrementaron las necesidades de preservar los cultivos de las plagas para asegurar la alimentación de la población de las grandes ciudades, lo cual llevó al uso de los plaguicidas sintéticos. A partir de este momento con la síntesis y el uso de los dinitroderivados se desarrollaron la mayoría de los plaguicidas sintéticos. Lo anterior deriva en intoxicaciones y problemas ambientales

resultado del uso de estos compuestos xenobióticos. Uno de los plaguicidas sintéticos más usados desde mediados del siglo XIX, fue el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT) tanto en la agricultura como para el control de vectores causantes de enfermedades como la malaria. Los plaguicidas presentan estructuras químicas extremadamente variadas, lo que influye en sus propiedades toxicológicas y ambientales dificultando su estudio, ya que para cada grupo es necesario recurrir a métodos analíticos distintos.

Actualmente, se trata de evitar el uso de plaguicidas persistentes y/o de elevada toxicidad sustituyéndolos por compuestos de menor estabilidad química y mínima toxicidad que imiten las estructuras químicas de los plaguicidas naturales. Un plaguicida se define como cualquier sustancia o mezcla de sustancias, destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades y especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicio o interfieran con la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de los alimentos, productos agrícolas, madera y forrajes; además de combatir a algunos ectoparásitos como insectos, ácaros u otras plagas que invaden animales domésticos (Albert, 2004).

Los plaguicidas pueden clasificarse según su concentración en:

- a) Ingrediente activo: compuesto químico que ejerce la acción plaguicida.
- b) Plaguicida técnico: la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado.
- c) Plaguicida formulado: mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con uno o más ingredientes conocidos como "inertes", cuyo objetivo es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas.

También se clasifican de acuerdo con los organismos que controlan en: insecticidas, bactericidas, acaricidas, molusquicidas, rodenticidas, avicidas, herbicidas, fungicidas y nematocidas.

3.4.1 Compuestos Orgánicos Persistentes

Los compuestos orgánicos persistentes (COP's) son principalmente compuestos sintéticos altamente tóxicos y sumamente estables al resistir la degradación fotolítica, química y biológica. Se caracterizan por su elevada liposolubilidad, lo que da lugar a su acumulación en el tejido graso de los organismos vivos. Los COP's contaminan aire, alimentos, agua y suelo, siendo transportados fácilmente por agua y aire. Al ser liberados en una parte del mundo pueden ser transportados en la atmósfera a regiones alejadas de la fuente original. De los contaminantes que son liberados al ambiente cada año por actividades humanas, los COP's perduran muchos años a niveles basales lo que causa exposición prolongada. Existe también la inquietud de que los países en desarrollo, hayan hecho acopio de plaguicidas indeseables, en especial de **DDT**. En muchos casos los envases se están deteriorando y el contenido está pasando por lixiviación al suelo y corrientes de agua, lo que afecta tanto a la vida acuática como a la terrestre. Debido a todas estas características los COP's se consideran sustancias peligrosas que exigen acción prioritaria (Greenpeace Argentina, 1999; OPS, 1999).

Las sustancias que se encuentran clasificadas como COP's son dañinas a la salud tanto del hombre como de plantas, animales y al ambiente en general. Estos daños van desde alergias, hipersensibilidad, cáncer, desórdenes de sistema nervioso central y periférico, anomalías en la reproducción, alteraciones en el sistema inmunitario, trastornos del crecimiento, defectos congénitos y muerte.

Los COP's son de muchos tipos tanto naturales como antrópicos, destacan por ser muy persistentes y bioacumulables incluyen muchos insecticidas organoclorados de primera generación, como el dieldrin, **DDT**, toxafeno y clordano así como varios químicos o productos secundarios industriales, entre ellos los bifenilos policlorados (PCB), las dibenzo-p-dioxinas (dioxinas) y los dibenzo-p-furanos (furanos). Muchos de estos compuestos se han utilizado y se siguen empleando en grandes cantidades. Presentan capacidad de bioacumulación debido a su persistencia en el ambiente,

también se distinguen por ser compuestos semivolátiles característica que les permite evaporarse y transportarse por el ambiente de manera más rápida (Ritter *et al.*, 1995).

Los plaguicidas considerados como COP's se encuentran constituyendo un grupo de sustancias emparentadas químicamente debido a su estructura cíclica, a su número de átomos de cloro así como a su baja volatilidad, características que permiten clasificarlos en los siguientes grupos:

- Diclorodifeniletanos entre los que se encuentra el **DDT** y sus análogos, como el DDE.
- Ciclodienos y compuestos relacionados como: clordano, heptaclor, aldrin y dieldrin.
- Bencenos clorados como el hexaclorobenceno y los ciclohexanos.
- Derivados de la terbenina como el toxafeno y el endosulfan.

Al ser compuestos que presentan una elevada estabilidad química y alta liposolubilidad se han convertido en una amenaza para la salud del hombre y de los animales teniendo consecuencias ambientales que aún no ha sido evaluadas en su totalidad (Piola, 2005).

3.4.2 Convenio de Estocolmo

En febrero de 1997 el Programa de las Naciones Unidas para el Medio ambiente (PNUMA) convocó a un comité internacional de negociación con la finalidad de elaborar un instrumento jurídico internacional vinculado con la aplicación de medidas internacionales respecto a ciertos COP's. En esta reunión se llegó a la conclusión de que los primeros COP's que debían eliminarse eran los conocidos como la “**docena sucia**” entre los cuales se encuentran los siguientes compuestos: aldrin, bifenilos policlorados (PCB), clordano, **DDT**, dieldrina, dioxinas, endrina, furanos, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex y toxafeno.

Con la finalidad de llegar a un documento que manejará este instrumento jurídico se han realizado cinco reuniones cuyo resultado fue un Convenio firmado oficialmente el 23 de mayo de 2001 en Estocolmo (Blount, 2002).

El Convenio de Estocolmo resume todos los lineamientos para la producción, exportación y uso de COP's; siendo su objetivo principal proteger la salud del hombre y del ambiente frente a los contaminantes orgánicos persistentes. Esto se debe a que los compuestos orgánicos persistentes presentan propiedades tóxicas, son resistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por aire, agua y especies migratorias a través de las fronteras internacionales siendo depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos.

Adicionalmente, se reconoció que los COP's representan un grave problema de salud en los países en desarrollo, como resultado de la exposición local a dichos contaminantes. Los ecosistemas y comunidades indígenas de las zonas árticas se encuentran especialmente amenazados debido a que los alimentos tradicionales de estos lugares están contaminados, convirtiéndose en un problema de salud pública. Motivo por el cual surge la necesidad de iniciar actividades internacionales para reducir y/o eliminar las emisiones y descargas de contaminantes orgánicos persistentes.

Al estar incluido dentro de la lista de la "docena sucia" ha quedado establecido la reducción en uso y producción del **DDT**, como resultado del convenio de Estocolmo se estableció que los países productores tienen que comunicarlo al programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), proporcionando de manera clara el procedimiento para su uso y disposición.

En el anexo B del convenio, se encuentran las especificaciones para la producción y usos de este plaguicida. Se estableció que el DDT solo podrá ser utilizado para el control de vectores de enfermedades, reportando su uso de manera inmediata a la Organización Mundial de la Salud (OMS). Así mismo, establece que el uso del DDT deberá ser informado cada tres años tanto a la secretaría como a la OMS en cuanto a

cantidades y condiciones en que éste ha sido utilizado. Además, por su importancia en el control de vectores y la enfermedad en cuestión, también se proporcionará la información que corrobore que el uso del DDT sigue siendo la mejor alternativa para la eliminación de vectores, proporcionando información científica, técnica, ambiental y económica que se tenga disponible (Convenio de Estocolmo, 2001).

3.4 Plaguicidas organoclorados, usos y detección

Los compuestos organoclorados (OC's) forman un grupo muy diverso de sustancias con características físico-químicas y estructurales muy diversas, tienen aplicaciones tanto en la industria como en la agricultura. Al igual que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son compuestos persistentes muy hidrofóbicos, lo que los pone a un mismo nivel de interés debido a su tendencia a bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica. Son químicos sintéticos, introducidos al ambiente después de la segunda guerra mundial; por sus características pronto llegaron a convertirse en contaminantes ubicuos, particularmente en ambientes marinos; actualmente se ha encontrado que estos compuestos han contaminado grandes cantidades de suelo y sedimentos (Chang y Doong, 2005). Entre los organoclorados más extendidos en altas concentraciones en la biota se encuentra el **DDT** y los bifenilos policlorados (PCB) (Aguilar y Borrell, 2005). Otro plaguicida organoclorado que se encuentra considerado como COP es el haclorociclohexano (HCH), el cual se ha acumulando en suelo y en organismos vivos (Zhu *et al.*, 2005). Desde el punto de vista estructural, constituyen un grupo de sustancias muy heterogéneo, teniendo en común la presencia de estructuras monocíclicas o policíclicas con distinto número de sustituyentes cloro, incluye varios grupos que son:

- a) Grupo de los Ciclodienos: Aldrín y su epóxido, Dieldrín, Mirex
- b) Grupo del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano): p-p'-DDT, o-p'-DDT, p-p'-Metoxiclor.
- c) Grupo del Hexaclorociclohexano (HCH) y Hexaclorobenceno (HCB): HCH, -HCH, HCB.
- d) Grupo de los indenos clorados: heptacloro, a-Clordano.
- e) Grupo de los terpenos clorados: Toxafeno (En Toxicología y química legal)

Estos plaguicidas se caracterizan por su toxicidad, estabilidad y recalcitrancia a la degradación en ambientes naturales, adicionalmente muchos organoclorados son semivolátiles y lipofílicos. Plaguicidas como el clordano, aldrin y dieldrin fueron extensamente usados hasta 1982, siendo el suelo el mayor receptor de estos compuestos (Zhang *et al.*, 2005). La principal acción tóxica de los plaguicidas organoclorados se dirige al sistema nervioso, en donde inducen a un estado de sobreexcitación en el cerebro, lo cual se manifiesta con convulsiones y ataques violentos. Son disruptores hormonales capaces de afectar el funcionamiento normal del sistema endocrino y reproductor en el hombre. Adicionalmente, los plaguicidas organoclorados tienden a acumularse en la cadena trófica por lo cual muchos de ellos han sido prohibidos en numerosos países (Waliszewski *et al.*, 1997; Waliszewski *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2006).

Los organoclorados han sido ampliamente usados en los trópicos para el control del vector transmisor de malaria, ectoparásitos y pestes agrícolas. Por sus propiedades lipofílicas, los organoclorados son liposolubles absorbiéndose fácilmente por vía oral distribuyéndose en el organismo y acumulándose en tejido adiposo para posteriormente ser traslocados o eliminados en la leche materna. El uso de este tipo de plaguicidas ha tenido repercusiones tanto en salud como en calidad ambiental. En México los principales plaguicidas organoclorados usados fueron el DDT y el lindano, para la erradicación de los vectores que provocan la propagación de enfermedades infecciosas. Los plaguicidas organoclorados se consideran compuestos orgánicos persistentes (COP's). Debido a que resisten en diversos grados la degradación ya sea fotoquímica, química o bioquímica, causando que su vida media en el ambiente sea muy larga (Albert, 2004). En agricultura los plaguicidas se utilizan para la protección de los cultivos y plantaciones contra diferentes pestes, las cuales pueden ocasionar disminución en la productividad o pérdida total de los mismos, por lo que han llegado a convertirse en un elemento indispensable, no obstante ser considerados contaminantes peligrosos. Los plaguicidas contaminan suelos y agua debido a su mal uso; investigaciones recientes han demostrado que a la larga las bajas concentraciones de

muchos plaguicidas son causantes de daños en la salud pública (Yazgan y Tanik, 2005).

El riesgo que se corre al exponerse a plaguicidas organoclorados se encuentra asociado con la exposición a largo plazo, debido a su persistencia en el ambiente y a que provocan carcinogenicidad. Los procesos de biotransformación que pueden sufrir dichos plaguicidas en el organismo generan, en muchos casos, metabolitos aún más tóxicos y con una capacidad de acumulación igual al compuesto del cual se originaron (Cortinas, 2004).

El destino de los plaguicidas en el suelo está determinado por las características del mismo, así como por las condiciones ambientales de temperatura y humedad además, se debe tener en cuenta las características del mismo plaguicida. Su degradación se lleva a cabo por procesos tanto químicos como microbiológicos; la degradación química ocurre por medio de reacciones como fotólisis, hidrólisis y procesos de oxidación-reducción, mientras que la biológica involucra a los microorganismos del suelo capaces de metabolizar las cadenas de carbono de los plaguicidas (Andreu y Picó, 2004; Sánchez *et al.*, 2004).

Por otro lado, los biosensores se han utilizado desde 1956 cuando el profesor Leland C. Clark inventó el primer dispositivo biosensor, el cual fue modificado hasta llegar a convertirse en el primer biosensor utilizado en medicina para la medición de glucosa en sangre (Tauber *et al.*, 2001; López y Ortiz, 2002). Se tienen antecedentes sobre el uso de células completas como elemento biológico de biosensores para medir los cambios que presenta la célula ya sea de pH, productos de excreción, consumo de oxígeno disuelto, producción de CO₂, entre otros (Cambiaso *et al.*, 1996). El usar células eucarióticas, tiene como ventaja que los resultados se aproximen más a los posibles daños toxicológicos causados en el hombre que los obtenidos con bacterias; la segunda razón es que con los componentes vivos es posible obtener información analítica junto con resultados cuantitativos o cualitativos (Bousse, 1996).

3.4.1 DDT

El 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (**DDT**) es producido por la condensación del cloral y el clorobenceno en presencia de un exceso de ácido sulfúrico concentrado, el resultado es 80% de **p,p'-DDT**; 20% del isómero **o,p'-DDT** y trazas del isómero **o,o'-DDT**; de todos estos productos el isómero **p,p'** es el que tiene actividad plaguicida (figura 4) (Navarro, 2006). Sintetizado en 1874 su acción como plaguicida fue descubierta en 1939, siendo usado durante la segunda guerra mundial, para proteger al personal militar del mosquito transmisor de la malaria del tifus y del dengue en regiones tropicales, pero fue a partir de 1945 que se comercializó para control de plagas en agricultura y forestación (Beard, 2006). A pesar de que el **DDT** como plaguicida se ha usado desde 1940, en suelos fue aplicado por primera vez en Estados Unidos de América y en algunas partes de Europa a finales de 1970 para el cuidado de los cultivos (Gfrerer y Lankmayr, 2005; Pirnie *et al.*, 2006).

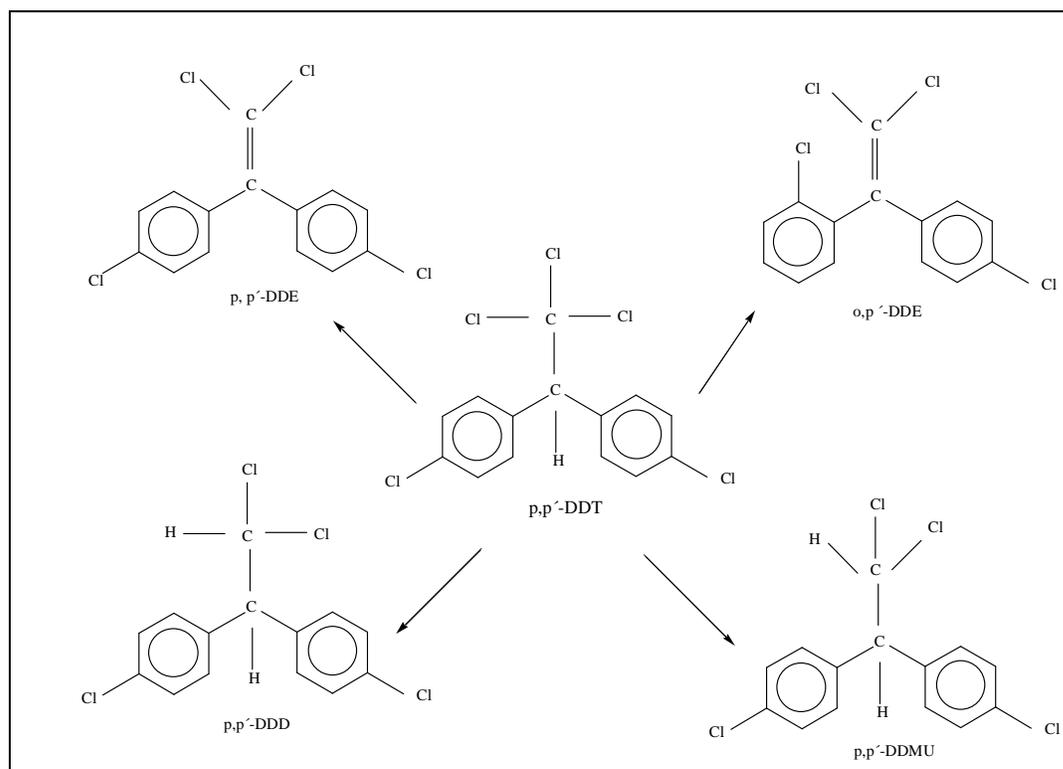


Figura 4.- Estructura del DDT y de sus productos de degradación (Tomado de Dalla y Pupo, 2006).

Es un compuesto lipofílico muy poco soluble en agua 3.4 ppb, pero muy soluble en disolventes no polares. Tiene un alto coeficiente de partición octanol/agua, con un logaritmo de 6.36. Los metabolitos del DDT también son muy hidrofóbicos, el logaritmo del coeficiente de partición es 7.0 para el DDE y 6.2 para el DDD. Debido a esta propiedad, el DDT se bioacumula en los organismos, alcanzando concentraciones mucho más altas que las existentes en el ambiente. Es tóxico a muy bajas concentraciones afectando un amplio espectro de organismos además de la fauna silvestre. El DDT es absorbido por las partículas del suelo, haciéndolo muy estable, y con el tiempo es lixiviado llegando a contaminar los cuerpos de agua (Toxicología Ambiental, 2004).

Es muy estable y poco reactivo; por lo que permanece en el ambiente y en los organismos inalterado durante largos períodos, al igual que sus productos de degradación.

Sus características físicas y químicas son las siguientes:

Fórmula empírica: $C_{14}H_9Cl_5$

Peso molecular: 354.5

Estado físico: cristales incoloros o polvo blanco

Punto de ebullición: 260 °C

Punto de fusión: 109 °C

Densidad relativa (agua = 1): 1.5

Solubilidad en agua: Ninguna

Punto de inflamabilidad: 72-75 °C

(Hoja técnica DDT, 2007)

3.4.2 Uso de DDT en México

En México el uso de los plaguicidas sintéticos se inició en 1948 con la introducción de los plaguicidas organoclorados, siendo el principal el **DDT**.

Las regiones con mayor uso de este plaguicida fueron Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán,

Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca. Se calcula que en ellas se aplicó el 80% del total de plaguicidas usados en el país, lo que comprueba que el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones y cultivos (Albert, 2005).

En agricultura, fueron usadas más de 1000 toneladas de DDT por año, llegando a ser de las más altas a nivel mundial (Díaz-Barriga *et al.*, 2003).

El uso indiscriminado de los plaguicidas en el país, ha ocasionado contaminación de agua, suelo y aire. En zonas como Chiapas los organoclorados se encuentran en grandes extensiones de humedales naturales (Hernández-Romero *et al.*, 2004). El DDT en particular presenta elevadas concentraciones en el aire (Alegría *et al.*, 2006).

Durante la primera mitad de 1980 se redujo el uso de los organoclorados en el país, lo cual fue ocasionado por las presiones internacionales, esto trajo como resultado la restricción del DDT, para uso solo en campañas sanitarias de erradicación de la malaria; lo cual se reflejó en una disminución en la demanda y una producción menor a 600 toneladas anuales (López-Carrillo *et al.*, 1996).

Las medidas anteriores llevaron a México a participar en el Convenio de Estocolmo tendiente a la reducción en el uso, producción y liberación de COP's. Los principales COPs incluyen nueve plaguicidas organoclorados, entre ellos el **DDT**; aceites industriales especialmente los usados en la industria eléctrica, conocidos como bifenilos policlorados (PCB) y contaminantes que se producen de manera no intencionada como dioxinas y furanos, generados durante la combustión de compuestos químicos con cloro (Greenpeace, 2004).

La reducción del DDT en México ha sido importante debido a que el país cuenta con importantes zonas de conservación ecológica por ejemplo, en el estado de Oaxaca se tienen áreas de selvas y bosques conservados que albergan una biodiversidad reconocida con especies amenazadas y en peligro de extinción, en las costas de Baja California se tienen importantes zonas de conservación de tortuga marina las que son afectadas por la acumulación del DDT (Gardner *et al.*, 2003).

3.5.1 Efectos del uso de DDT

El DDT y sus metabolitos, especialmente el 1,1-dicloro 2,2-bis (4-clorofenil) etileno (p,p'-DDE), se transportan por el ciclo del agua mediante la precipitación o escorrentía superficial, también puede transportarse a zonas remotas de la atmósfera, contribuyendo a la contaminación mundial. Lo anterior ocasiona preocupación por la persistencia de dichos compuestos en el agua, sedimentos, suelos y cadena alimenticia (Galvão y Henao, 2002).

Los principales medios de exposición son la inhalación de vapores y la ingestión por medio de alimentos contaminados de origen animal como: lácteos y cárnicos.

Los primeros estudios que se realizaron sobre el DDT mostraron que sus efectos tóxicos se pueden agrupar de la siguiente manera:

- a) Inducción enzimática de las oxidasas microsómicas mediadas por el citocromo P450 (CYP)
- b) Aumento de las lipasas, de la transaminasa glutámica y bloqueo de la ATPasa
- c) Modificación del metabolismo lipídico, transporte de vitamina A y de glucosa
- d) Efecto sobre el potencial de acción de los canales de sodio y cloro en neuronas
- e) Alteración en la síntesis de hormonas esteroidales.

También tiene efecto sobre el metabolismo hepático, daña el patrón renal y las gónadas. En los sistemas muy oxigenados pueden generar radicales libres de alta reactividad que son disparadores de peroxidación de membrana. Las moléculas electrofílicas producidas en su metabolismo se unen fácilmente con proteínas y ácidos nucleicos y forman aductos (Pachón, 2003). Adicionalmente se ha visto que los organoclorados afectan también, los procesos reproductores y alteran la respuesta inmunológica.

Además, eleva el riesgo de cáncer y mutaciones en personas que trabajan directamente con este tipo de plaguicida, también es tóxico cuando se maneja a largo plazo, llegándose a reportar más de 2089 casos de toxicidad en la República Mexicana (Gómez-Arroyo *et al.*, 2000; Rojas-García *et al.*, 2005). Se ha visto que en mujeres embarazadas el DDT y sus metabolitos atraviesan la barrera placentaria exponiendo al

producto en gestación además, después del nacimiento el bebé consume leche materna contaminada (Prado *et al.*, 2004; Waliszewski *et al.*, 2002).

3.5.2 DDT en suelos

El suelo es el recurso básico de todos los ecosistemas terrestres, por lo que su pérdida influye en la composición de las especies forestales. Suministra nutrientes a las plantas, de ahí que su degradación sea considerada como uno de los problemas ambientales que amenaza la producción mundial de alimentos. Cumple funciones trascendentales para los ecosistemas forestales, como permitir la recarga de acuíferos además, es el medio donde se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos necesarios para el reciclaje de compuestos orgánicos (SEMARNAT, 2002).

En él se encuentra la mayor actividad de microorganismos capaces de degradar compuestos orgánicos dentro de los cuales se puede incluir a los xenobióticos. El deterioro del suelo puede reflejarse en el detrimento de la calidad del aire y agua tanto subterránea como superficial (Avidano *et al.*, 2005).

En México se cuenta con una gran diversidad de suelos, aunque la mayor parte del territorio nacional presenta los siguientes grupos: Leptosoles (24%), Regosoles (18.5%), Calcisoles (18.2 %), Feozems (9.7 %) y Vertisoles (8.3 %) (Luege, 2005).

La degradación del suelo es consecuencia directa de las actividades antrópicas y se refiere a la reducción o pérdida de su capacidad para sostener a los ecosistemas naturales así como para mantener o mejorar la calidad del aire, agua y salud humana. Entre las sustancias que se hallan involucradas en la degradación del suelo se encuentran los xenobióticos, sustancias que no existen de manera natural en el ambiente, como los plaguicidas antes mencionados.

La contaminación del suelo por plaguicidas ha ocurrido por aplicación directa sobre los cultivos, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones de los depósitos de almacenamiento o por descarga de residuos y depósito sobre el suelo. De tal manera que, los restos de plaguicida se

dispersan en el ambiente y se convierten en contaminantes para los sistemas bióticos y abióticos (Ortiz-Hernández *et al.*, 1997). El movimiento de los contaminantes a través del suelo se lleva a cabo por lixiviación, lo cual depende de la solubilidad del contaminante en el agua, su naturaleza química así como del pH del suelo. Adicionalmente, es favorecida por la capacidad de adsorción (adherencia del compuesto a las partículas del suelo), lo que va a depender del porcentaje de arcillas, limos y arenas que presente el suelo (Lara, 1999).

En el suelo el DDT puede sufrir diferentes tipos de descomposición ya sea química llevada a cabo por procesos como oxidación, reducción, hidroxilación entre otros. Fotoquímica producida por la luz ultravioleta, por volatilización o por acción microbiana y de las plantas, que pueden degradarlo (Lou *et al.*, 2006) (figura 5).

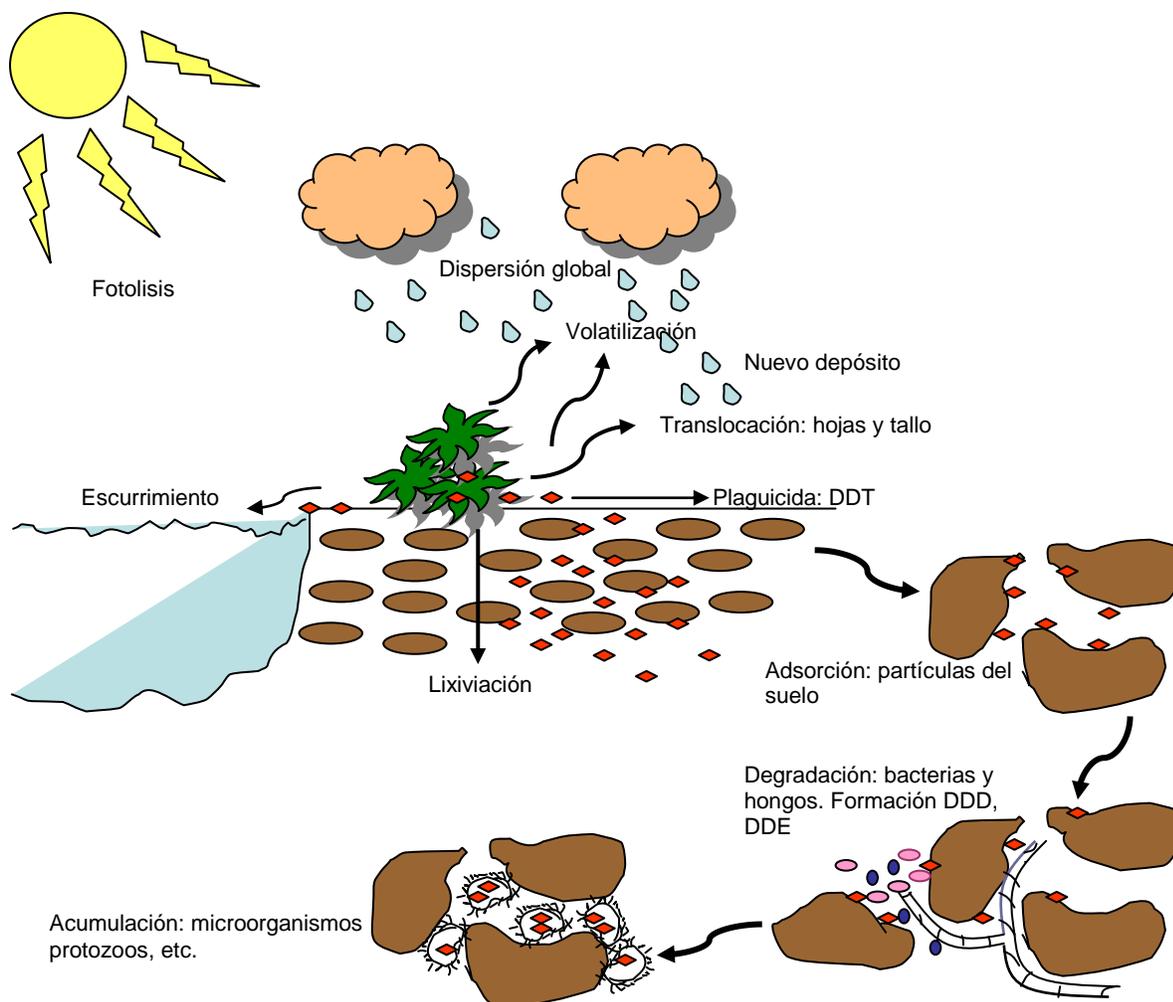


Figura 5.- Movimiento y destino del DDT en el ambiente.

3.5.3 Rutas de degradación del DDT

En los suelos y el ambiente la disipación y descomposición del DDT se lleva a cabo de manera parcial por algunos microorganismos, en la naturaleza es posible encontrar las siguientes rutas de degradación:

- Desclorinación reductora: Esta es una importante reacción microbiana, que se lleva a cabo por sustitución de un átomo de cloro por un carbono nanoaromático con un átomo de hidrógeno. La conversión de DDT a DDD es un ejemplo clásico de desclorinación reductora que se lleva a cabo por *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, actinomicetos del suelo, cinco especies de *Streptomyces*,

Aerobacter aerogenes y ocurre en el suelo en condiciones anaerobias (Rup y Saxena, 1982).

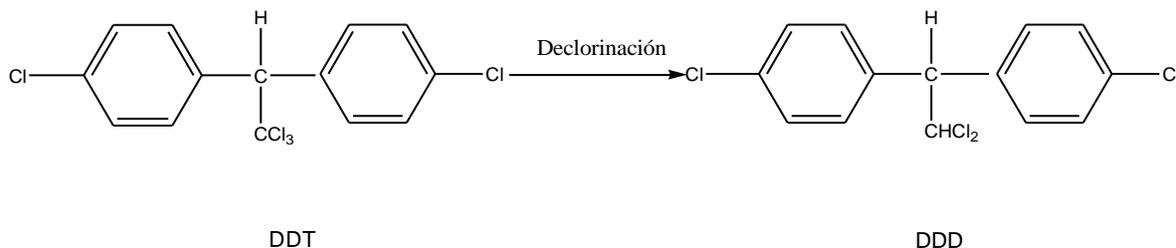


Figura 6. Paso de DDT a DDD por medio de desclorinación reductora.

- Deshidroclorinación: Involucra la remoción simultánea de un hidrógeno y un cloro, la reacción se lleva a cabo entre el carbono de cloro saturado y el hidrógeno adyacente del carbono vecino. La formación de DDE a partir de DDT es una de las reacciones más conocidas de deshidroclorinación (Rup y Saxena, 1982).

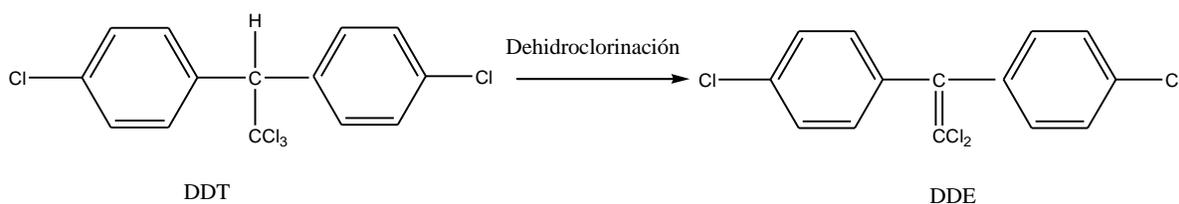


Figura 7. Degradación del DDT por medio de desclorinación.

Otra ruta de degradación de plaguicidas organoclorados es la oxidación que ocurre en organismos superiores. Estas rutas no son conocidas en su totalidad, el paso principal para que un microorganismo degrade DDT es la desclorinación reductiva de DDT a DDD. El DDD puede ser degradado por desclorinación, deshidroclorinación y descarboxilación a DBP o a una forma más reducida. La segunda ruta principal, para la degradación del DDT, involucra la deshidroclorinación del DDT a DDE (Aislabe *et al.*, 1997).

La degradación dependerá fundamentalmente de los microorganismos presentes en el medio, así como de las condiciones ambientales prevalecientes. Cuando el DDT es degradado por desclorinación los productos son el DDD y el DDE, los que pueden

ser finalmente degradados hasta DDMU (1-cloro-2-2,bis(*p*-clorofenil)etileno) (Rup y Saxena, 1982; Aislabie *et al.*, 1997).

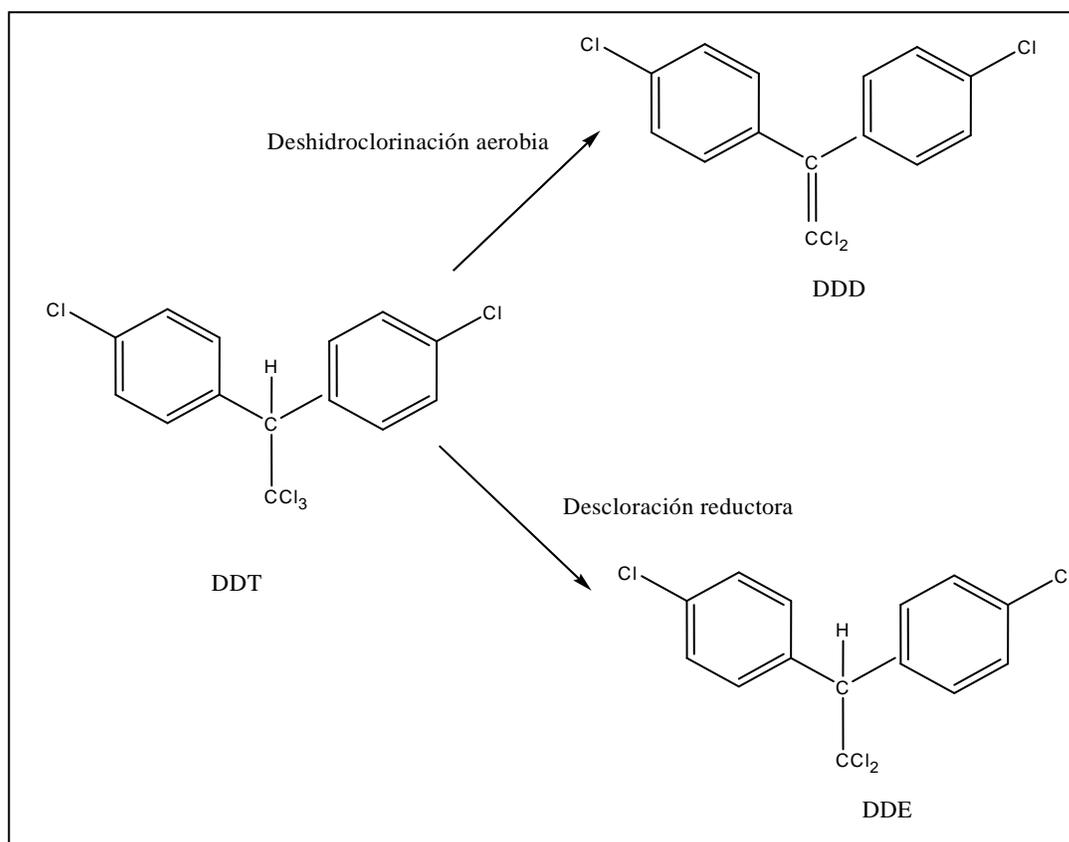


Figura 8. Principales rutas de degradación del DDT en la naturaleza.

La información sobre la degradación del DDT en protozoos no se encuentra documentada de manera suficiente por lo que es incierto el papel que jueguen estos microorganismos en la degradación de este plaguicida. Algunos protozoos que se encuentran en el rumen son capaces de convertir el DDT a DDD y DDE, mientras que los ciliados dulceacuícolas han mostrado diferencias en su habilidad para metabolizar el DDT; la amiba del suelo *Acanthamoeba castellanii* es capaz de metabolizar el DDT a DDE, DDD y DPB. Se ha visto que la acumulación de este plaguicida en ciliados tarda entre 1 y 4 horas dependiendo de la especie (Rup y Saxena, 1982).

3.5.4 Efecto del DDT sobre los microorganismos

La acción del DDT sobre los microorganismos dependerá de su naturaleza, concentración, tipo de microorganismo y condiciones ambientales. Sin embargo, grandes cantidades de DDT en el suelo pueden ocasionar la disminución, desaparición o proliferación de poblaciones de microorganismos presentes en los ecosistemas, alterando la sucesión microbiana, las comunidades, biomasa y actividad enzimática del mismo (Johnsen *et al.*, 2001; Edvantoro *et al.*, 2003).

La estabilidad del DDT favorece su acción residual en el suelo y contra los insectos, lo que aumenta su peligrosidad por su larga persistencia en el ambiente favoreciendo su bioacumulación en los organismos, con lo cual pasa a la cadena trófica de los animales superiores incluyendo el humano.

Provoca fuga de iones, en los canales de sodio de los axones en las células nerviosas lo cual impide la transmisión normal de los impulsos nerviosos para posteriormente causar impulsos espontáneos provocando que los músculos se contraigan a lo que le siguen convulsiones y finalmente la muerte.

Otras funciones ligadas a la membrana, que afecta el DDT, son la fosforilación oxidante en las mitocondrias y la reacción de Hill en los cloroplastos (Ponce *et al.*, 2006). En el hombre puede causar efectos crónicos en hígado, riñones y sistema inmune (Lal y Saxena, 1982; Pesticide Action Network UK, 2006). Adicionalmente, se han registrado efectos como aumento de lipasas, transaminasa glutámica y bloqueo de la ATPasa; modificación del metabolismo lipídico, transporte de la vitamina A y glucosa; provoca además, la alteración en la síntesis de hormonas esteroidales (Prado *et al.*, 2002).

En lo que a bioacumulación se refiere, el DDT se almacena en los cuerpos de microorganismos acuáticos pasando a los que se alimentan por filtración, los que a su vez lo almacenan en sus cuerpos cientos de veces más que los microorganismos de niveles inferiores, de esta manera se mueve en la cadena trófica (Jonson y Kennedy, 1973). Lo anterior ocasiona la acumulación de DDT en organismos no blancos tales como plantas, aves y mamíferos (Kiflom *et al.*, 2001) incluso llegando a aquellos que

nunca han estado en sitios fumigados con DDT (focas). Afecta directa o indirectamente la función natural del suelo influenciando además, la fertilidad y el crecimiento de las plantas (Gundi *et al.*, 2007). Asimismo, el DDT y sus metabolitos principalmente el DDE, tienen la capacidad de interferir en diversos procesos biológicos como el adelgazamiento del cascarón de las tortugas y otros animales ovíparos (Cuevas *et al.*, 2003).

Otro efecto del uso del DDT es la disrupción endócrina que se presenta en mamíferos y aves debido a que, los metabolitos del DDT tienen varios grados de efectos androgénicos, anti androgénicos, estrogénicos y anti estrogénicos aparte de inhibir la secreción de gonadotropina; dichos efectos se han observado más habitualmente en las aves (Iwaniuk *et al.*, 2006).

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Revisión bibliográfica, obtención de suelo y del organismo de interés

En este rubro se abarcaron los diferentes temas que este trabajo incluyó como:

- 1) uso de biosensores en México y a nivel internacional. 2) Empleo de ciliados en particular edafícolas, como elemento biológico de un biosensor.
- 3) Plaguicidas considerados compuestos orgánicos persistentes (COP's), más usados en el país, dentro de los cuales se encuentra el DDT. 4) Contaminación de suelos por DDT, así como daños causados al ambiente terrestre y acuático además, de a la salud.
- 5) Transporte de los plaguicidas en el ambiente, su bioacumulación, persistencia en el suelo y en la cadena trófica.
- 6) Obtención de *Colpoda cucullus* de un suelo limpio y su cultivo en el laboratorio para realizar los experimentos

Posteriormente se eligió el lugar de muestreo teniendo en consideración los siguientes aspectos:

- Suelo considerado limpio: libre del uso de plaguicidas
- Que no estuviera expuesto a riego con aguas negras
- No se utilizaran fertilizantes
- Que fuera de uso agrícola

Lo anterior con la finalidad de encontrar al organismo de interés que fue el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*, como elemento biológico para el posible biosensor, y que éste no hubiera estado en contacto con elevadas concentraciones de DDT.

Una vez establecido el sitio de muestreo se procedió a coleccionar las muestras del mismo para llevarlas al laboratorio para su proceso y la obtención del microorganismo de interés.

El suelo se secó al aire, se molió a mano con un martillo forrado de papel, para evitar la introducción de fierro en la muestra, se mezcló por cuarteo para obtener una muestra compuesta; se le realizaron análisis de pH, carbono orgánico, porcentaje de humedad, textura, densidad real y aparente, porcentaje de espacio poroso y finalmente capacidad de campo; adicionalmente se mandó una muestra de suelo a análisis cromatográfico para verificar en cuales y en qué cantidad se encontraban plaguicidas.

La obtención del organismo de interés se realizó según lo indicado por Bamfort (citado en Aleff *et al.*, 1998).

Las células aisladas se mantuvieron en agua destilada con una alimentación que consistió en una infusión de cebada inoculada con *Escherichia coli*, los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 28°C.

La identificación morfológica se realizó por medio de observaciones en vivo así como por medio de tinciones vitales con verde de metilo al 1%, con este colorante se logró resaltar macronúcleo, citostoma, vacuolas digestivas y cilios. También se realizó impregnación con nitrato de plata al 1% (Klein) para resaltar el sistema de líneas de plata y poder realizar el conteo de cinetias.

Para esto se colocó sobre un portaobjetos una gota del cultivo de *C. cucullus*, a la cual se le añadió una gota del nitrato de plata y se mantuvo al sol por 3 minutos se revisó la preparación bajo el microscopio óptico, para evitar sobretinción de las células. Una vez teñidas se enjuagó con agua corriente, se montó con bálsamo de Canadá y se procedió a obtener evidencia fotográfica.

Todo lo anterior se realizó utilizando un microscopio estereoscópico Motic SMZ-168 y un microscopio óptico marca Iroscope equipado con cámara y videograbadora.

Adicionalmente, al suelo se le realizó un análisis cromatográfico para determinar la presencia y concentración de plaguicidas.

4.1.2 Identificación molecular de *Colpoda cucullus*

A efecto de corroborar que la especie del ciliado empleado en la experimentación, se trataba efectivamente de *C. cucullus*, se aplicaron técnicas de biología molecular a los ejemplares cultivados en el laboratorio.

Por medio de PCR se amplificó el ADN ribosomal 18S de 1190 pares de bases de la cepa cultivada y se comparó con una cepa tipificada obtenida de American Type Culture Collection 30916 (ATCC). Los primers específicos que fueron usados para este género se presentan en la tabla 1. Se extrajo el ADN genómico de ambos cultivos, puros, se concentraron a 50 mL de medio de cultivo que contenía a los microorganismos a 5000 rpm. El botón formado se resuspendió agregando 200 µL de TE 10X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM). Posteriormente se congeló a -80° C

por 15 minutos y a continuación, fue llevado a temperatura de ebullición (85° C) por 10 minutos. Después, se le adicionaron 50 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1) y 50 µL de fenol saturado. Se centrifugó a 5,000 rpm a 4° C por 5 minutos. Después fue lavado dos veces con 200 µL de cloroformo-álcohol isoamílico y fue centrifugado por 1 minuto a 5,000 rpm a 4° C. La fase acuosa fue recuperada en un tubo nuevo al cual se le adicionaron 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M, pH 7.0) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcló y almacenó durante 12 horas a -20° C. A continuación, fue centrifugado por 30 minutos a 14,000 rpm a 4° C, el botón o paquete de ADN se lavó 2 veces, con 300 µL de etanol frío a 80 % centrifugándolo 3 minutos a 14,000 rpm (4° C). Se dejó secar completamente. Finalmente, fue resuspendido en 100 µL de agua desionizada.

La electroforesis fue realizada en gel de agarosa al 0.8 y 1 % a 75 volts. Se reveló en un baño con bromuro de etidio y se tomó la imagen resultante con un fotodocumentador Benchtop UVP.

Tabla 1. Características de los primers específicos para el género *Colpoda*

Primers	Tamaño	Tm °C	Secuencia	Cola de bases	Sitios de restricción	Sitio de vector	Enzima
Colp-For 5'-3'	32	62-59	ACCATACATATGCATGCT GT (C/A)AAACCT(G/A)ACTT	ACCATACATAT G	CATATG	2297	Nde I
Colp-Rev 5'-3'	29	61-59	ATCATAGAYGCTTGCACA (T/C) AAAGTCCCTC	ATCATAGATG	ACCTGC(N) ⁴	1063	BspM I

4.2 Disolución del DDT

Para lograr la disolución del DDT se emplearon diferentes disolventes orgánicos como alcohol, dimetil sulfoxido, hexano, cloroformo, acetato de etilo y acetona. Cada disolvente orgánico fue probado primero en agua para verificar que no ocasionaban daño sobre *C. cucullus*. Esto se realizó a partir de disolver una alícuota de 2 mL del disolvente orgánico en 8 mL de agua, todos los disolventes ocasionaban daño sobre la célula pero la acetona resultó ser fácil de evaporar, motivo por el cual fue el disolvente con el que se trabajó para disolver el DDT en una solución acuosa libre de disolvente que no dañara a las células de *C. cucullus*.

El DDT se disolvió de la siguiente manera: Se colocó DDT en 2 mL de acetona y posteriormente se agregó agua hasta completar 10 mL, una vez disuelto se colocó debajo de la campana de extracción para favorecer la evaporación de la acetona.

El DDT no es soluble en agua por lo que precipitaba rápidamente; de manera que los experimentos de exposición fueron realizados inmediatamente, ya que a las 3 horas de disuelto empezaba a formar cristales lo cual lo hacía no biodisponible para las células. Para verificar la eliminación de la acetona de la solución se realizaron pruebas de osmolaridad comparando los valores con las diferentes soluciones: DDT con acetona, DDT sin acetona, DDT con evaporación de la acetona y la solución de alimentación.

4.2.1 Exposición de *C. cucullus* a DDT

Para exponer a *C. cucullus* al DDT se tomaron por micropipeteo 10 células que fueron puestas en pequeñas cajas de Petri de 1 cm de diámetro a las cuales se les adicionaron 100 µL de DDT. Se observó bajo el microscopio estereoscópico por un lapso de una hora. Cada concentración fue probada por triplicado con un total de 30 células expuestas a DDT y su respectivo testigo utilizándose 60 células en total por cada concentración manejada.

Con los datos obtenidos se realizó el análisis probit para calcular la concentración letal media (CL₅₀). También se expusieron células a dos concentraciones

por debajo de la CL_{50} para obtener micrografías electrónicas de transmisión y observar si las células de *C. cucullus* presentaban daños a nivel fisiológico, ya que a nivel morfológico no eran visibles.

4.3 Construcción de microdosificador

En esta etapa del proyecto se efectuó la construcción de un microdosificador para lo cual fue necesario construir una caja de circuitos eléctricos con: cables planos de cuatro y diez vías, eliminador de corriente, leds, entre otros, las conexiones fueron realizadas en el laboratorio de electrofisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se colocaron válvulas solenoides que facilitarían la dosificación del compuesto problema. Estas fueron montadas en una lámina de acrílico para evitar que éstas se movieran y fueron conectadas al circuito eléctrico y probadas para verificar su correcto funcionamiento. Una vez terminado el microdosificador se realizaron algunas modificaciones con las cuales se logró su automatización sin necesidad de un programa aparte.

4.4. Inmovilización celular

Otro de los problemas que se encontró a lo largo de este trabajo fue lograr la inmovilización del elemento biológico para seguir con su evaluación como posible elemento de un biosensor. Para esto, se probaron diferentes matrices orgánicas como la grenetina, metilcelulosa, agarosa y carragenina. La matriz debería mantener a la célula en perfecto estado fisiológico, no provocar estrés en ella para que los resultados obtenidos fueran por efecto del DDT y reducir al mínimo el movimiento de la célula.

Para esto se disolvieron diferentes cantidades desde 0.1 g hasta 0.5 g de cada una de las matrices en agua para tomar uno o dos ejemplares de *C. cucullus* e introducirlos en la matriz solidificada y así observar si se presentaba algún tipo de daño y en cuanto tiempo.

De las matrices probadas solo la carragenina mostró inmovilizar, casi en su totalidad a *C. cucullus* por lapsos hasta de una hora o más sin causar daño en las células. Siempre y cuando no se secase por completo. Motivo por el cual se eligió esta matriz para

continuar el trabajo. Se disolvieron 0.2 gramos de carragenina en 10 mL de agua lo que permitió mantener a la célula en buenas condiciones por periodos de hasta 1 hora.

Para inmovilizar se tomó una gota de carragenina, la cual se calentó para disolverla, se colocó en un portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente; una vez hecho esto por micropipeteo se inyectó una célula de *C. cucullus* dentro de la matriz y se empezó a observar bajo el microscopio estereoscópico.

4.5 Detección de la señal proveniente de *C. cucullus*

Para proceder a detectar la posible señal producida por *C. cucullus* como elemento biológico de un biosensor se tomaron en cuenta dos opciones. La primera fue introducir un microelectrodo a la célula para que la respuesta obtenida fuera por medio de un cambio de voltaje al bloquearse los canales iónicos con el DDT.

Lo anterior se trabajó en el laboratorio de electrofisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, con el apoyo del Dr. Jorge Flores, las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Inmovilizar a la célula dentro de la carragenina
- Una vez inmóvil en un portaobjetos se procedió a localizar a la célula debajo del microscopio invertido dicróico (marca Leica), con objetivo de 40 X, equipado con una cámara (penta-lmax) y un programa de adquisición de imágenes (Win View/32).
- El microelectrodo se fabricó con un tubo capilar y fue rellenado con una solución de cloruro de potasio 50 mM.
- El microelectrodo se introdujo dentro de la carragenina hasta llegar a la célula que se encontraba inmóvil.
- Después de varios intentos se logró insertar el electrodo dentro de la célula inmóvil, pero no fue posible detectar ninguna señal.

La segunda opción que se contempló fue la de introducir un fluorocromo a la célula de *C. cucullus* para que la señal medible fuera de disminución de la bioluminiscencia provocada por la fuga de iones.

En este caso en particular se utilizó el fluorocromo FURA 2 AM (acetometil ester AM) el cual se eligió debido a que puede atravesar las membranas biológicas penetrando la célula sin causar daño alguno. Además, de que es selectivo al calcio y responde a mínimas fluctuaciones de pH. Para lograr cargar a la célula con el FURA 2 AM se realizó lo siguiente:

- Se preparó una solución de acetometil ester ó FURA 2 AM a una concentración 10 μ M
- Las células de *C. cucullus* se incubaron en esta solución por un lapso de una hora
- Se procedió a observar en el microscopio si las células se cargaron con el fluorocromo
- Se tomaron fotografías de lo observado.

5. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

La primera parte experimental consistió en realizar una revisión bibliográfica; muestrear y caracterizar el suelo, obtener las formas tróficas de los ciliados; identificar a la especie *Colpoda cucullus*; determinar su tiempo de generación; así como establecer cuál ha sido el uso del DDT en México y si está presente en el suelo del sitio de muestreo seleccionado

En una primera valoración se siguieron los procedimientos establecidos para evaluar el efecto tóxico de una sustancia (Castillo, 2004), lo cual implicó hacer ensayos de exposición a diferentes concentraciones de DDT, así como a un lixiviado de suelo contaminado. Para lo anterior, se utilizaron 10 ciliados por cada prueba con sus respectivas réplicas y testigos, manejándose 60 organismos por prueba a cada concentración.

5.1 Obtención de suelo limpio

Se muestreó suelo del municipio de Mixquiahuala de Juárez, Hidalgo; se utilizó este suelo porque aún basan sus prácticas agrícolas en el cultivo de temporal y no utilizan fertilizantes, plaguicidas ni aguas residuales. Característica que hizo muy propicio este suelo para la obtención del ciliado de interés, por ser un suelo poco contaminado.

El método seguida en esta primera etapa experimental se presenta en el siguiente diagrama de flujo (figura 9).

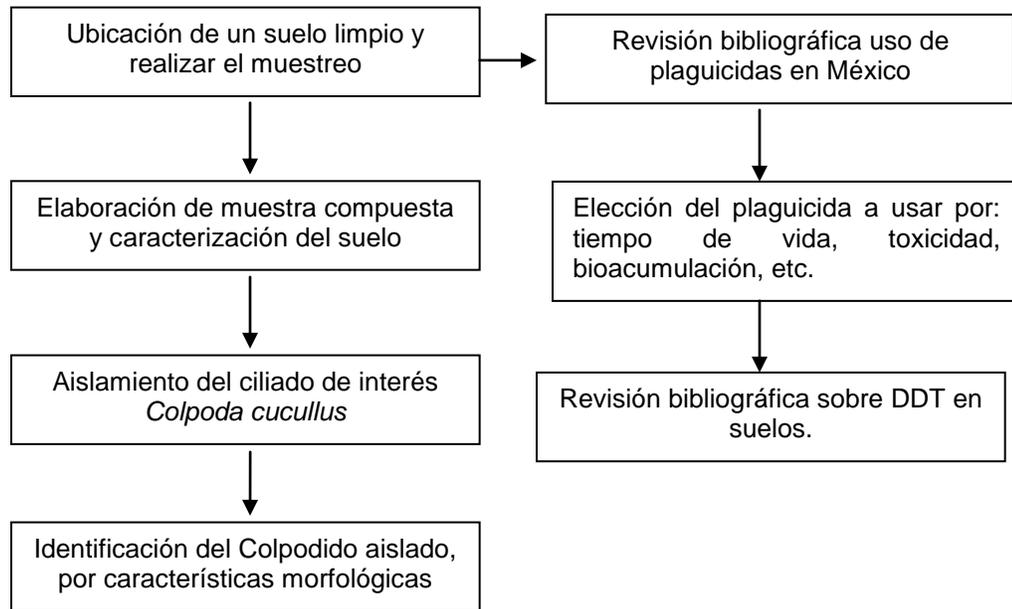


Figura 9. Método seguido en la primera etapa experimental con DDT en bioensayos

5.2 Ubicación del sitio de muestreo

El estado de Hidalgo se encuentra ubicado a 19°36' de latitud norte; 97°58' al este y a 99°53' de longitud oeste. Colinda al norte con Querétaro de Arteaga, San Luis Potosí y Veracruz; al este con Veracruz y Puebla; al sur con Puebla, Tlaxcala y la Ciudad de México; al oeste con la Ciudad de México y Querétaro de Arteaga (INEGI, 2000).

El municipio de Mixquiahuala de Juárez se ubica 20°13'52" de latitud norte y 99°12'47" de longitud oeste, a una altura de 2100 metros sobre el nivel del mar a 31 km de Actopan y a una distancia de 67 km de la capital del estado. Este municipio se caracteriza por contar con algunos suelos agrícolas de temporal, siendo la agricultura la principal actividad económica (figura 10).

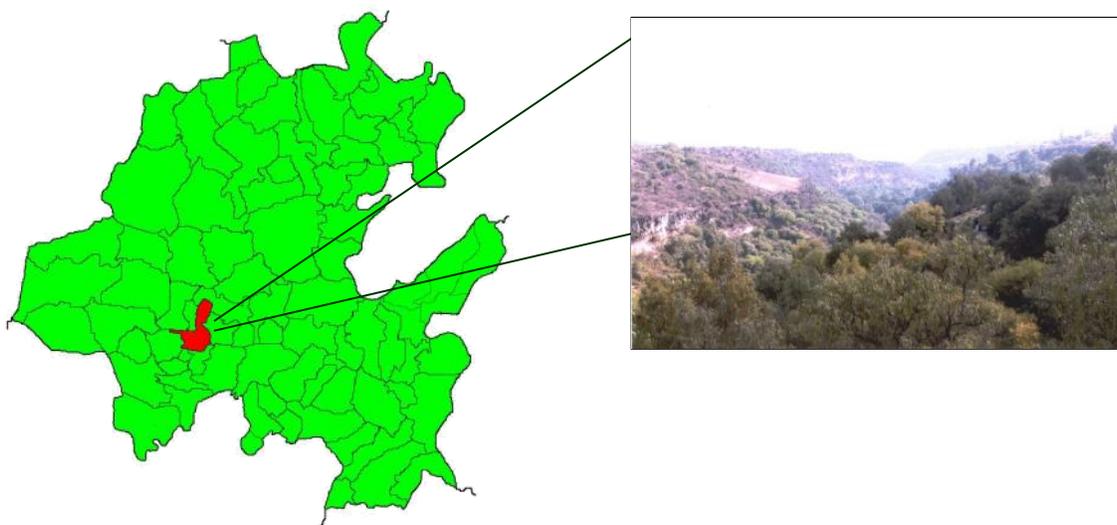


Figura 10. Ubicación del municipio de Mixquiahuala en el estado de Hidalgo

Las muestras de suelo libres de contaminantes fueron colectadas en la localidad de Benito Juárez (Reyes, 2004).



Figura 11. Vegetación predominante en la localidad de Benito Juárez

El clima de este municipio es semiseco templado, con una temperatura promedio anual de 17° C, alcanzando 14° en los meses más fríos de diciembre y enero a 20° C en mayo cuando se registran las temperaturas más altas. La precipitación media anual es de 509 mm, siendo junio y julio los de mayor precipitación mientras que febrero y diciembre los de mayor sequía (INEGI, 2000).

Para realizar el muestreo se tomaron en cuenta varios métodos, incluyendo el proyecto de norma “proy–nmx-aa–132–scfi–2006”; M-MMP-1-01-03 y la información publicada por el Instituto Nacional de Ecología (INE) en lo referente al muestreo y caracterización de suelos. El muestreo se realizó en un terreno cultivado con maíz, el cual se encontraba semi-seco con las primeras plántulas de maíz, por lo que para evitar daños al cultivo, se muestreó en un área de aproximadamente 6 m de largo por 2 m de ancho en zig-zag (figura 12).

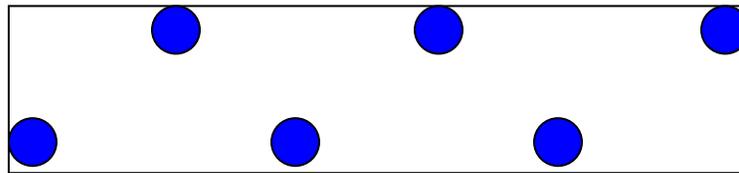


Figura 12. Representación esquemática de la forma de muestreo en campo

Las muestras de suelo fueron puestas en bolsas de plástico negras para su transporte. Una vez en el laboratorio se dejaron abiertas para eliminar la humedad a temperatura ambiente; hecho lo anterior se procedió a moler cada una de las muestras manualmente, para deshacer algunos agregados, tenerlas homogéneas y elaborar una muestra compuesta por cuarteo; el suelo se pasó por un tamiz de 2 mm de apertura.

A la muestra compuesta se le realizaron los siguientes análisis: pH, contenido de materia orgánica, porcentaje de humedad, capacidad de campo, densidad real, densidad aparente y textura por considerarse los más importantes para la presencia de ciliados; estas técnicas se realizaron de acuerdo con la NOM–021–SEMARNAT–2000.

5.3 Obtención de colpódidos del suelo

Para obtener los colpódidos se siguió el método indicado por Bamfort (Aleff *et al.*, 1998); que consiste en:

- Colocar en una o varias cajas de Petri (de 10 a 15 cm de diámetro) una cama de suelo.
- Humedecer las cajas con agua destilada sin sobresaturar el suelo.

- A partir del segundo día se realizaron observaciones bajo el microscopio estereoscópico, marca Motic SMZ-168. Este procedimiento favorece el exquistamiento y la proliferación de los ciliados presentes, debido a que la caja funciona como un microhábitat cerrado en donde se lleva a cabo una sucesión de comunidades.
- A partir del cuarto día aparecieron los colpodidos, se tomaron uno a uno con una micropipeta y se trasladaron a frascos que contenían infusión de alimentación, se incubaron a 28°C. Para lograr condiciones favorables para su reproducción asexual, obteniéndose clones para realizar los experimentos.



Figura 13. Microhábitat cerrado para promover el exquistamiento de los ciliados del suelo de Mixquiahuala, Hgo

5.4. Resultados y discusión de la primera etapa experimental

5.4.1 Caracterización del suelo de Mixquiahuala

La caracterización del suelo mostró un pH cercano a la neutralidad, con un valor de 7.54 unidades. La cantidad de carbono orgánico que contiene se clasifica como muy alta para uso agrícola (Rodríguez y Rodríguez, 2002) con un valor de 45 g/Kg, el porcentaje de humedad fue de 8 %, mientras que el análisis granulométrico mostró que presenta una textura franco-arenosa (Tabla 2).

Tabla 2. Datos obtenidos de la caracterización de la muestra compuesta del suelo de Mixquiahuala, Hgo.

Parámetro	Valor
pH (unidades)	7.54
Carbono orgánico (g/Kg)	45
Porcentaje de humedad (%)	8
Textura	Franco-Arenosa (% de arenas 66.2) (% de limos 22) (% de arcillas 11.8)
Densidad real (g/cm ³)	2.14
Densidad aparente (g/cm ³)	1.81
% de espacio poroso	39.77
Capacidad de campo (mL/kg de suelo)	200

Del análisis ciliatológico, además del ciliado *Colpoda cucullus* se observó la presencia de microorganismos como Oxytricos y algunos otros pertenecientes a la clase Litostomatea y nemátodos.

5.4.2 Aislamiento e identificación morfológica del organismo de interés

Para lograr el aislamiento de los colpódidos se tomaron, por micropipeteo, uno a uno los organismos para transferirlos a cajas de vidrio de aproximadamente 1 centímetro de diámetro. La alimentación consistió en una infusión de cebada a la cual se le inoculó una cepa bacteriana, ya que *Colpoda* se alimenta predominantemente de bacterias, dicha cepa fue *Escherichia coli*. Una vez que se logró mantener a los ciliados en estas cajas y establecidas las condiciones adecuadas para su cultivo en el laboratorio, se procedió a realizar las transferencias necesarias para contar con el número de microorganismos que permitieran realizar tanto los experimentos programados como las pruebas de identificación del ciliado y corroborar que el colpódido cultivado correspondiera a *Colpoda cucullus*; para esto se le comparó con una cepa de referencia obtenida del American Type Culture Collection (ATTC).

Las condiciones de mantenimiento de los colpódidos en el laboratorio se muestran en la tabla 2.

Tabla 3. Condiciones de mantenimiento de *Colpoda cucullus* en el laboratorio

Parámetro	Intervalo
Temperatura	28°C
Agua	Destilada (sin esterilizar)
Alimentación	Infusión de cebada inoculada con <i>E. coli</i>
Fotoperiodo	9 h luz por 15 oscuridad
Aireación	Manual diaria

Para la identificación del colpódido cultivado se realizaron observaciones en vivo, tinciones con colorantes vitales, así como impregnaciones argénticas de Klein, medición de las células y observación del quiste de reproducción.

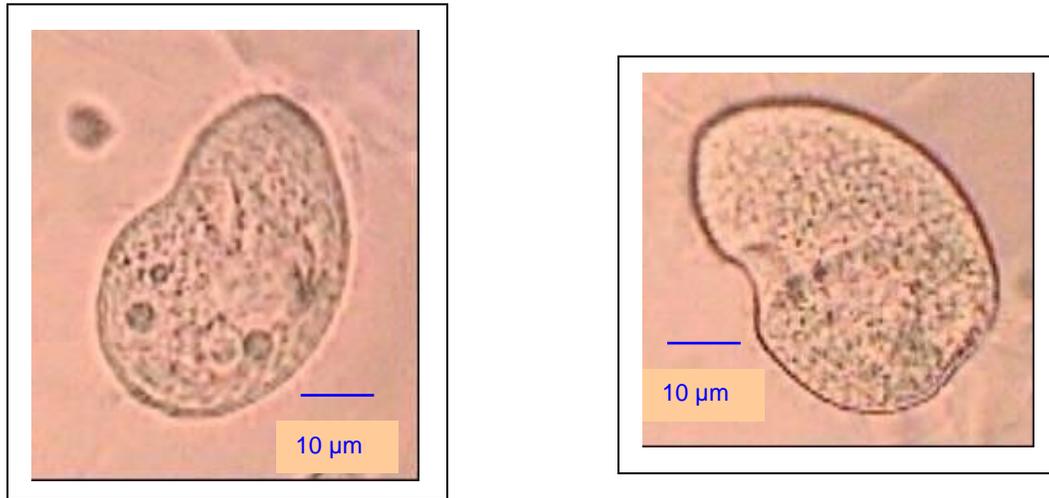


Figura 14. Microfotografías del ciliado *Colpoda cucullus* "in vivo" (campo claro 40X)

Mediante el colorante verde de metilo fue posible observar el macronúcleo, los cilios, la apertura del citostoma o boca, así como las vacuolas digestivas que son características de este género (**Figura 15**).

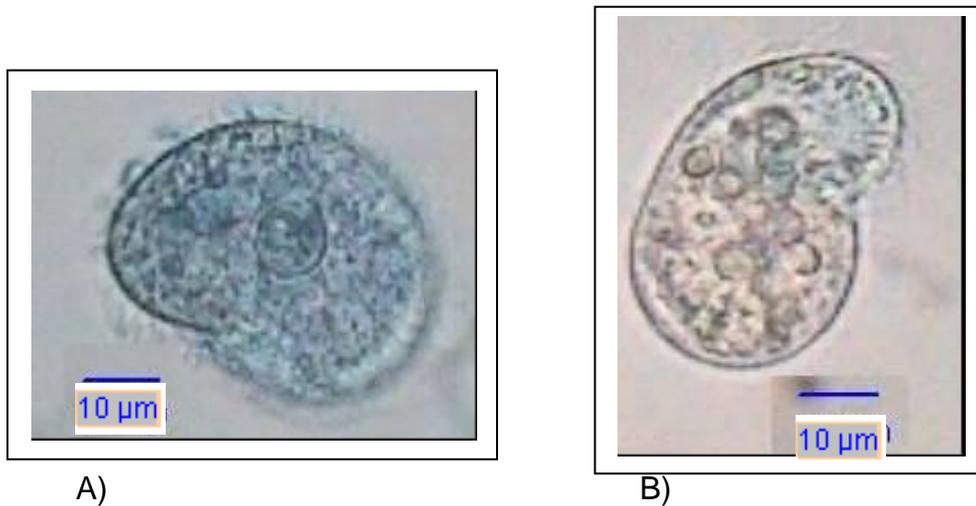


Figura 15. Tinción con verde de metilo. A) Macronúcleo, cilios, citostoma y B) Vacuolas digestivas (40X campo claro).

La impregnación argéntica de Klein permitió observar el sistema de líneas de plata y la infraciliatura de la célula (figura 16).

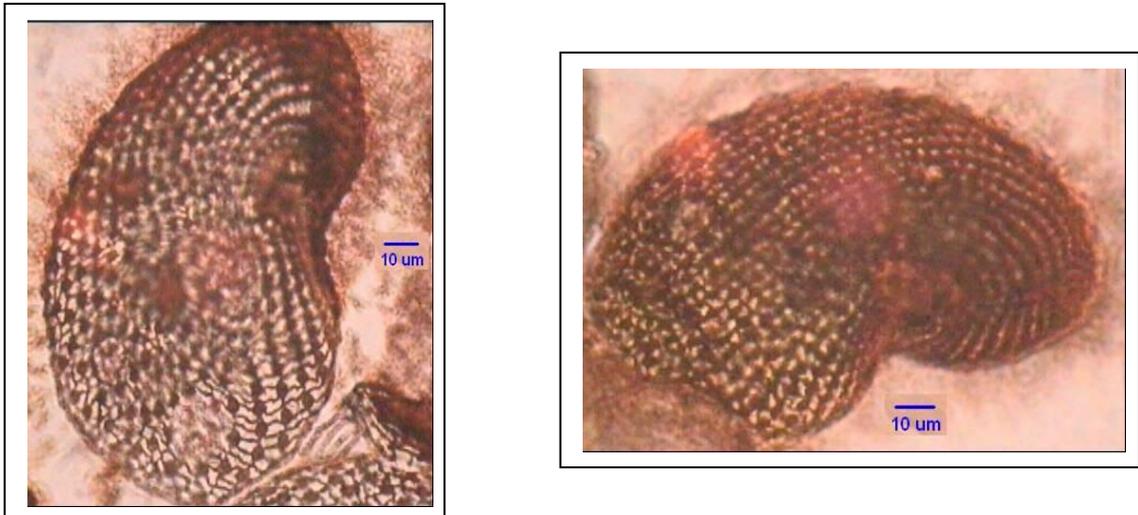


Figura 16. Tinción con nitrato de plata (100X campo claro)

Se observó la reproducción asexual de la célula, la cual se divide en cuatro tomitos, resultado en cuatro colpódidos de menor tamaño (figura 17). Para establecer el tiempo de duplicación se separaron cuatro células y se realizó un primer conteo a las 24 horas, posteriormente se hicieron varias cuentas más hasta completar 72 horas. El tiempo de duplicación de la cepa cultivada en el laboratorio y que según las características morfológicas corresponde a *Colpoda cucullus* fue de **6.5** horas.

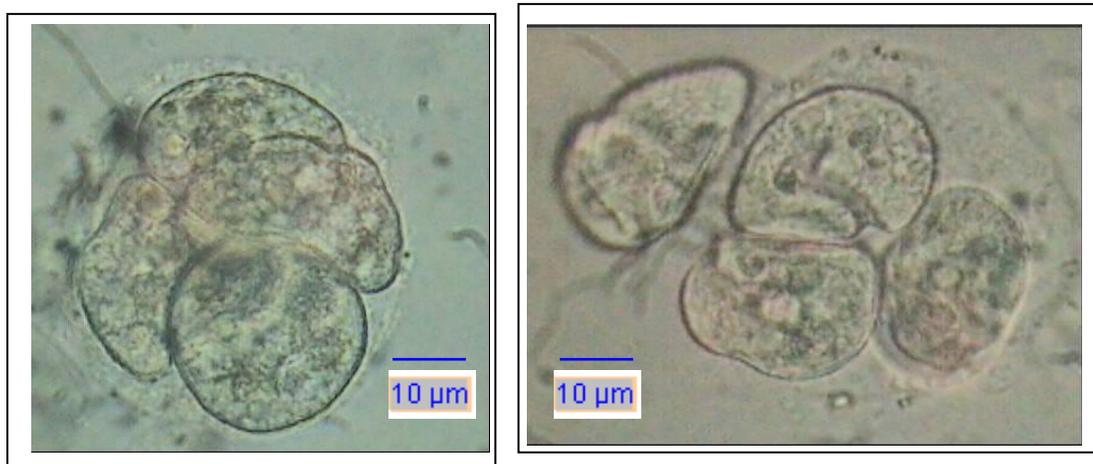


Figura 17. Quiste de reproducción y división de la cepa cultivada (40X campo claro)

5.4.3 Identificación molecular y obtención del árbol filogenético de *C. cucullus*

Para la identificación molecular, se procedió a comparar las secuencias resultantes (1130 pb) de ambas cepas de colpodidos, con las disponibles en Genbank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information) empleando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a efecto de encontrar las secuencias con mayor identidad para los ejemplares utilizados. Las secuencias de la cepa silvestre y la procedente de ATCC se alinearon con el programa CLUSTAL W del paquete BIOEDIT versión 7.0.9 (Hall, 1999). Para construir el árbol filogenético se usó el software MEGA versión 4.0 (Tamura *et al.* 2007). El cálculo de las matrices de distancia y la construcción de los árboles filogenéticos se realizó con el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987) y máxima verisimilitud (Maximum likelihood), los valores de Bootstrap fueron generados con 1000 réplicas.

El árbol filogenético resultante de estos datos se presenta en la figura 18, en el cual se aprecia que el análisis de biología molecular realizado a la cepa silvestre corresponde a la especie *C. cucullus*

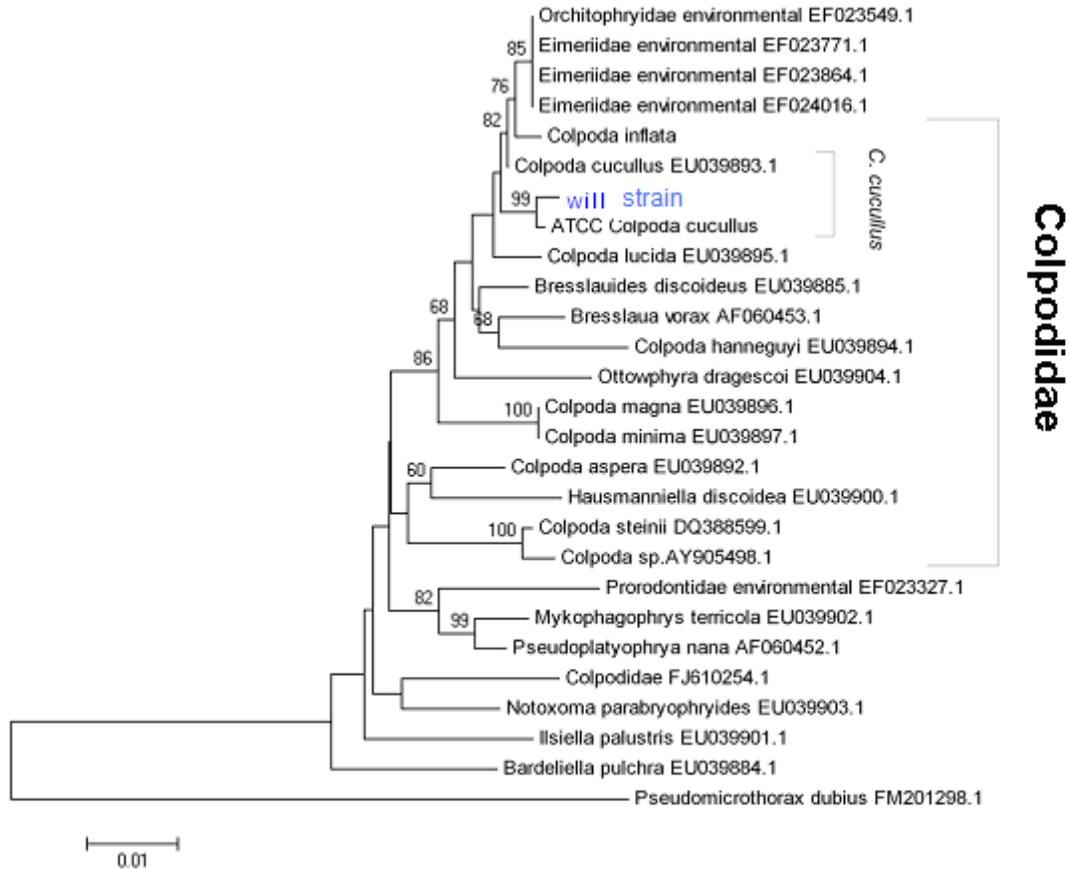


Figura 18.- Árbol filogenético de las secuencias de ADNr 18S de dos cepas puras amplificadas con los primers Colp-F Colp-R con referencias del genbank de NCBI. Se presentan los valores de *Bootstraps* superiores a 50 %. Ambas secuencias, están relacionadas con la referencia *Colpoda cucullus* (no. Acces. EU039893.1).

5.4.3 Análisis cromatográfico del suelo

El análisis cromatográfico del suelo para determinar el contenido de plaguicidas, tales como el DDT, heptacloro, aldrín y endrin aldehído mostró que estos se encuentran apenas en el límite de detección que fue de 0.029 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el heptacloro, 0.027 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el aldrín y de 0.019 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el endrín aldehído, respectivamente (Tabla 4).

Para el DDT la concentración máxima detectada fue de 0.015 mientras que para el 4,4 DDE y 4,4 DDD fue de 0.025 y 0.030 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. En el suelo se

encontró una concentración promedio de DDT de 0.084 $\mu\text{g}/\text{kg}$, superior al límite de detección del equipo. El DDE y DDD se encontraron en 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.055 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, de estos el DDD se encontró por arriba del límite de detección del equipo (Tabla 5).

Este análisis mostró que aunque el suelo de Mixquiahuala se encuentra libre del uso de plaguicidas, por parte de los agricultores, es posible encontrarlos debido a la volatilidad y la facilidad de movimiento que estos presentan.

De tal manera, que aunque se encontraron tanto DDT como sus derivados las concentraciones en la que fueron detectados estuvieron cerca de los límites detectables, del equipo utilizado, e incluso para algunos por debajo de los límites mínimos. Así las concentraciones a las cuales se encontró el DDT fueron de 0.066 mg/kg de suelo. Por lo que se consideró que en este suelo las células se encontraban mínimamente expuestas a este tipo de contaminantes ambientales.

Tabla 4. Límites de detección (mg/kg) del equipo empleado para los plaguicidas encontrados en el suelo de Mixquiahuala

COMPUESTO	LDM mg/kg
Hexa Clorobenceno	0.024
Heptacloro	0.029
Aldrín	0.027
4,4 DDE	0.025
Dieldrín	0.028
Endrín	0.026
4,4 DDD	0.030
Endrín aldehído	0.019
4,4 DDT	0.015
Mirex	0.013

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis cromatográfico del suelo de Mixquiahuala para detectar la presencia de plaguicidas ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

ESTACIÓN	Hexa Clorobenceno	Dieldrín	Endrín	4,4 DDD	4,4 DDT	4,4 DDE	Mirex	Endrín Aldehído
Mixch Superficial (1-15cm)	<0.024	0.214	<0.026	0.060	0.066	<0.025	<0.013	<0.019
Mixch Réplica Superficial (1-15cm)	<0.024	0.289	<0.026	0.050	0.102	<0.025	<0.013	<0.019

5.5 Conclusiones de la Primera Etapa Experimental

Los resultados obtenidos de esta primera etapa experimental mostraron que:

- El método seguido para la obtención de las células de *Colpoda* fue el más adecuado, logrando obtener formas tróficas en la caja con suelo.
- La identificación morfológica mostró que el ciliado aislado de este suelo corresponde a la especie *Colpoda cucullus*.
- El tiempo de generación, para este microorganismo, fue de 6.5 horas con las condiciones establecidas en el laboratorio, se observó la formación de cuatro células hermanas de menor tamaño, lo que corresponde a lo establecido en la literatura para *C. cucullus*.
- La revisión bibliográfica mostró que uno de los plaguicidas más usados en México y en el mundo fue el DDT. Se utilizó primero para erradicar al vector transmisor de la malaria y posteriormente para la protección de los cultivos, por lo que aumento su acumulación en suelos.
- Su persistencia en suelos es mayor de 15 años. Lo anterior, junto con su tendencia de bioacumulación, fueron los criterios que se tomaron en cuenta para elegirlo como contaminante problema. Por lo que se buscó la presencia de este plaguicida en el suelo del cual se obtuvo a *C. cucullus*.
- El análisis de plaguicidas realizado al suelo mostró que aunque no se utilizan plaguicidas en el suelo de Mixquiahuala, se encuentran presentes en una cantidad mínima incluido el DDT en una concentración promedio de 0.084 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Los resultados obtenidos por medio del análisis de PCR corroboraron que la cepa aislada del suelo de Mixquiahuala pertenecía a la especie ***Colpoda cucullus***.

En la segunda etapa experimental se procedió a realizar el trabajo con el DDT y los bioensayos con la célula cultivada en el laboratorio.

6. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

Durante esta parte del experimento el objetivo fue lograr la disolución del DDT en un medio acuoso, ya que si se utilizaba un solvente orgánico las pruebas de toxicidad no reflejarían los efectos del plaguicida si no los provocados por dicho solvente. Se plantearon y desarrollaron las pruebas de toxicidad programadas con las células de *C. cucullus*, para determinar la concentración letal media del DDT sobre este ciliado. También se realizó la toma de microfotografías ópticas y electrónicas de transmisión para observar el daño causado por el DDT a las células. En esta etapa, también se contaminó un poco de suelo y se obtuvo el lixiviado para exponer a *C. cucullus* al lixiviado observando si este presentaba algún efecto sobre las células así como el posible tiempo en que esta pequeña cantidad de DDT se quedaba en el suelo. Adicionalmente, se inició la construcción de un sistema de microdosificación para comenzar con la posible construcción del biosensor.

El método seguido en esta etapa experimental se muestra en la figura 19.

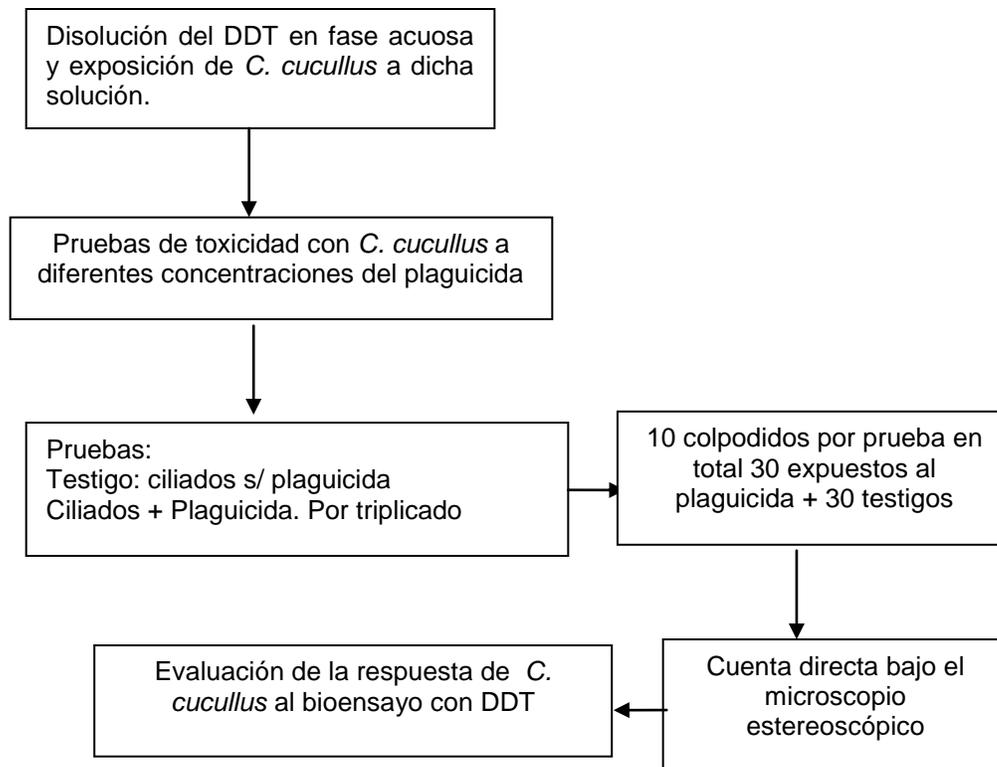


Figura 19. Método seguido para realizar la segunda etapa experimental.

6.1 Disolución del DDT

La disolución del DDT se realizó de la siguiente manera: Se peso desde 0.5 mg hasta 5 mg de DDT la cual fue disuelta en acetona, hecho esto se tomó una alícuota para ponerla en agua; para lograr que el DDT no precipitara al contacto con el agua se tuvo la precaución de que la punta de la pipeta estuviera dentro del agua al poner el DDT, se aforó el volumen a 10 mL con agua destilada. El volumen aforado se dejó en la campana de extracción, por un periodo aproximado de hora y media, esto se hizo con la finalidad de evaporar la acetona. Una vez evaporada la acetona se aforó con agua destilada, hasta recuperar el volumen inicial.

El blanco experimental fue preparado de igual manera, adicionándole al agua destilada dos mL de acetona, los cuales se dejaron evaporar, para posteriormente aforar a un volumen final de 10 mL. Una vez lista la solución de prueba y la testigo se procedió a realizar las pruebas de toxicidad, de manera inmediata. Para corroborar que la acetona se eliminó totalmente y que el efecto observado sobre *C. cucullus* fue por el DDT, se realizó una prueba de osmolaridad a las soluciones (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados obtenidos de la prueba de osmolaridad a las soluciones manejadas

Solución	Osmolaridad (mol/kg)	
Infusión + <i>C. cucullus</i>	38	
Infusión de cebada	44	
Infusión de cebada + <i>E. coli</i>	44	
	C/acetona	S/acetona
Agua testigo	50	41
DDT + acetona	69	39
Control	314	310

Como se puede observar en la tabla cinco, tanto el agua testigo como el DDT disuelto en acetona presentaron una osmolaridad más elevada, pero al evaporar la acetona la osmolaridad disminuyó hasta casi el valor obtenido en la infusión más *E. coli*, con lo cual se comprobó que la acetona se eliminó en su totalidad y que los efectos observados sobre las células de *C. cucullus* fueron ocasionados por el DDT.

6.2 Pruebas de toxicidad

Para llevar a cabo las pruebas de toxicidad sobre el ciliado *C. cucullus* se planteó el siguiente método.

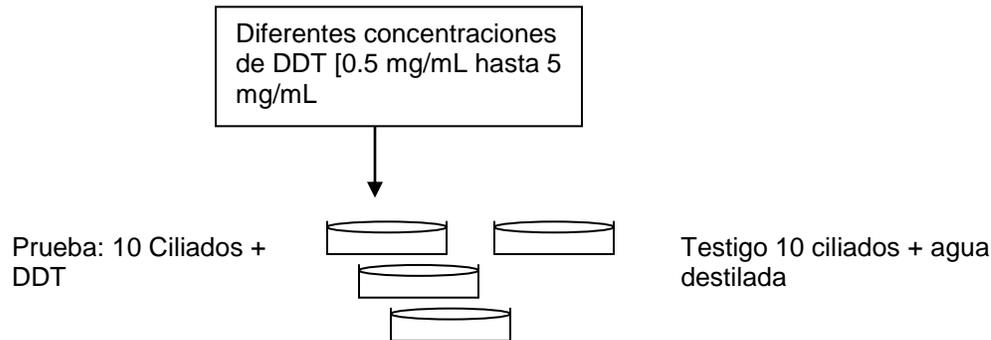


Figura 20. Diagrama de flujo de la forma en que se realizaron las pruebas de toxicidad.

Con una pipeta Pasteur, se tomaron 10 células de *C. cucullus* para colocarlos a una pequeña caja en donde se agregaron 100 μ L de DDT, los efectos causados por este plaguicida sobre los ciliados fueron observados por un tiempo de exposición de 1 hora 30 minutos, con ayuda del microscopio estereoscópico, registrándose los resultados y tomando microfotografías.

Al realizar los bioensayos fue posible establecer la concentración letal media (CL_{50}) del DDT sobre la célula de *C. cucullus*, este dato se obtuvo por medio del estadístico probit.

Para reforzar los resultados obtenidos en las pruebas de toxicidad se tomaron microfotografías electrónicas de transmisión, con un microscopio JEM 1200 Ex -11 electron microscope (marca JEOL). Lo anterior con la finalidad de observar los daños morfológicos que no fueron posibles determinar con el microscopio estereoscópico.

6.3 Construcción de un equipo de Microdosificación

Con la finalidad de realizar una dosificación controlada (concentración y frecuencia de adición) de la sustancia de prueba sobre el elemento biológico, se

construyó un microdosificador, que permitiría la reducción de errores humanos durante los ensayos de exposición del elemento biológico al DDT (Fig. 21). Para ello, se elaboró un programa de cómputo que permitiera el manejo automático del tiempo de apertura y cierre de las válvulas solenoides. Durante esta parte del trabajo se contruyó tanto los circuitos eléctricos, que controlan el microdosificador, como la parte mecánica de los soportes para colocar válvulas solenoides. Adicionalmente, se montaron sobre cada una de ellas las conexiones necesarias y se probó su correcto funcionamiento. Una vez terminada esta fase, se montó el soporte para las jeringas dosificadoras. Este soporte fue de material acrílico de 60 cm de largo por 27.5 de ancho, sobre el que se distribuyeron de manera uniforme las 8 jeringas a emplear.



Figura 21. Circuito eléctrico y soporte de las válvulas solenoides del microdosificador.

Posteriormente, este sistema fue modificado para su mejor funcionamiento, siendo posible compactar la caja del circuito electrónico y que fuera operable de manera automática o manual, sin necesidad de contar con un equipo de cómputo, programando segundos hasta horas la apertura de la válvula (figura 22).



Figura 22.- Nuevo equipo de dosificación, después de los cambios realizados al primer sistema

6.4 Resultados y discusión de la Segunda Etapa Experimental

De las pruebas con DDT se encontró que a concentraciones de 5 mg/mL las células de *C. cucullus* sufrieron muerte inmediata, mientras que a la concentración de 4 mg/mL se obtuvo daño en citoplasma, observando que la célula va perdiendo su forma hasta sufrir lisis (figura 23). Con estas dos concentraciones y en un tiempo menor a los 30 minutos se observó 100 % de mortalidad.

Las células mantenidas en la solución testigo no sufrieron daño morfológico alguno ni en su movimiento.

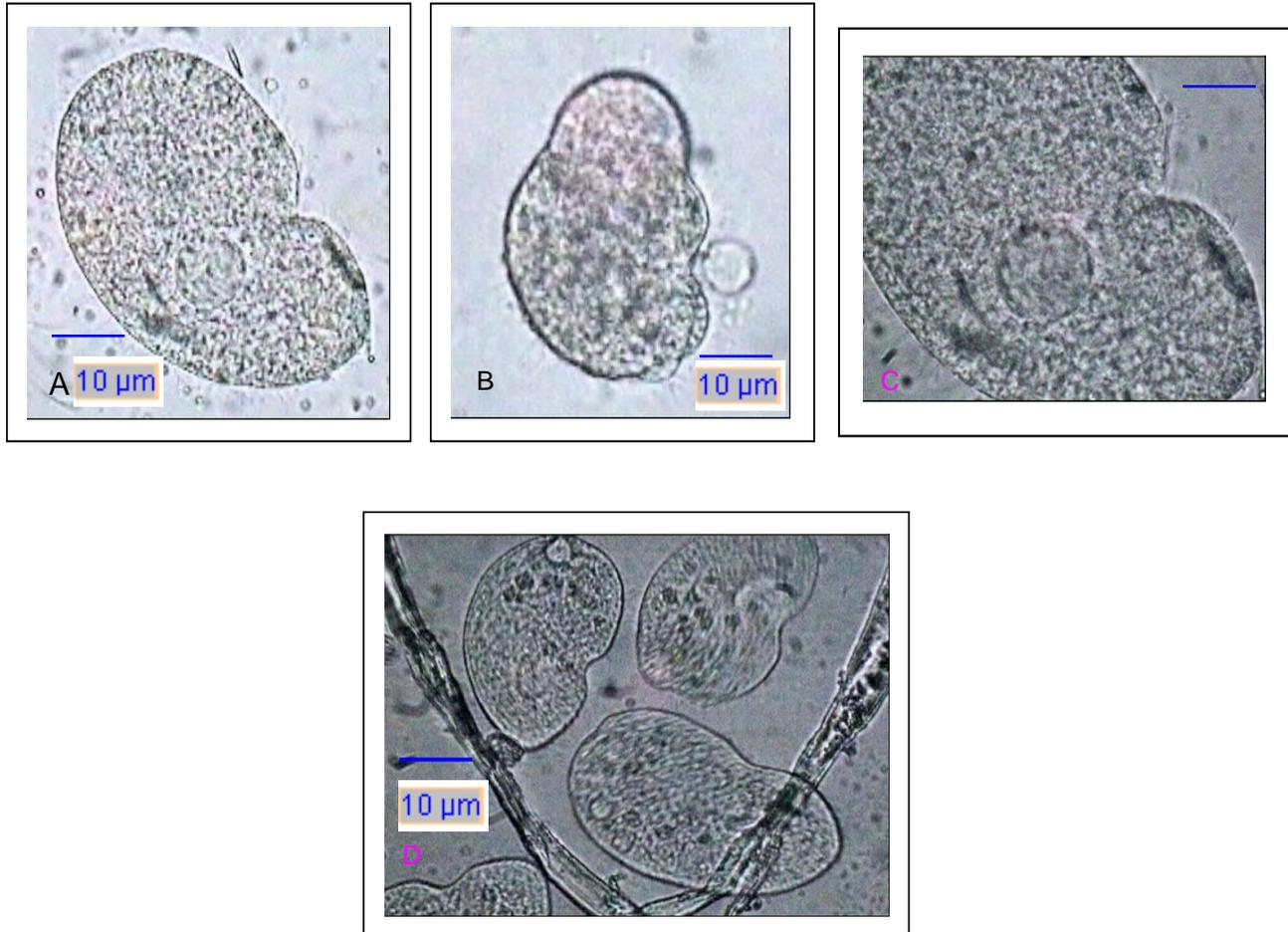


Figura 23. *C. cucullus* expuesto a DDT A y B [4 mg/ ml] (40 X), C (100X) y D testigo (40 X)

A la concentración de 3 mg/mL, se encontró un 86.66 % de mortalidad, así como pérdida en la velocidad de nado y lisis celular a los 45 minutos de exposición. A la concentración de 2 mg/mL, no se observó deformación en la célula, presentándose un 20% de mortalidad. La concentración más baja fue de 0.5 mg/mL y se obtuvo 100 % de sobrevivencia, no fue posible observar daño morfológico sobre las células de *C. cucullus*, pero fisiológicamente no se sabe qué tipo de daño sufran. Por lo cual, se optó por tomar microfotografías electrónicas de transmisión.

Las microfotografías proporcionaron información relacionada con el daño fisiológico de *C. cucullus* haciendo posible una comparación entre células sanas y expuestas a DDT. Con las microfotografías fue posible observar diferentes estructuras de

la célula de *C. cucullus* como: macronúcleo, mitocondrias, estructura de los cilios, cavidad del citostoma, en una célula sana (figura 24).

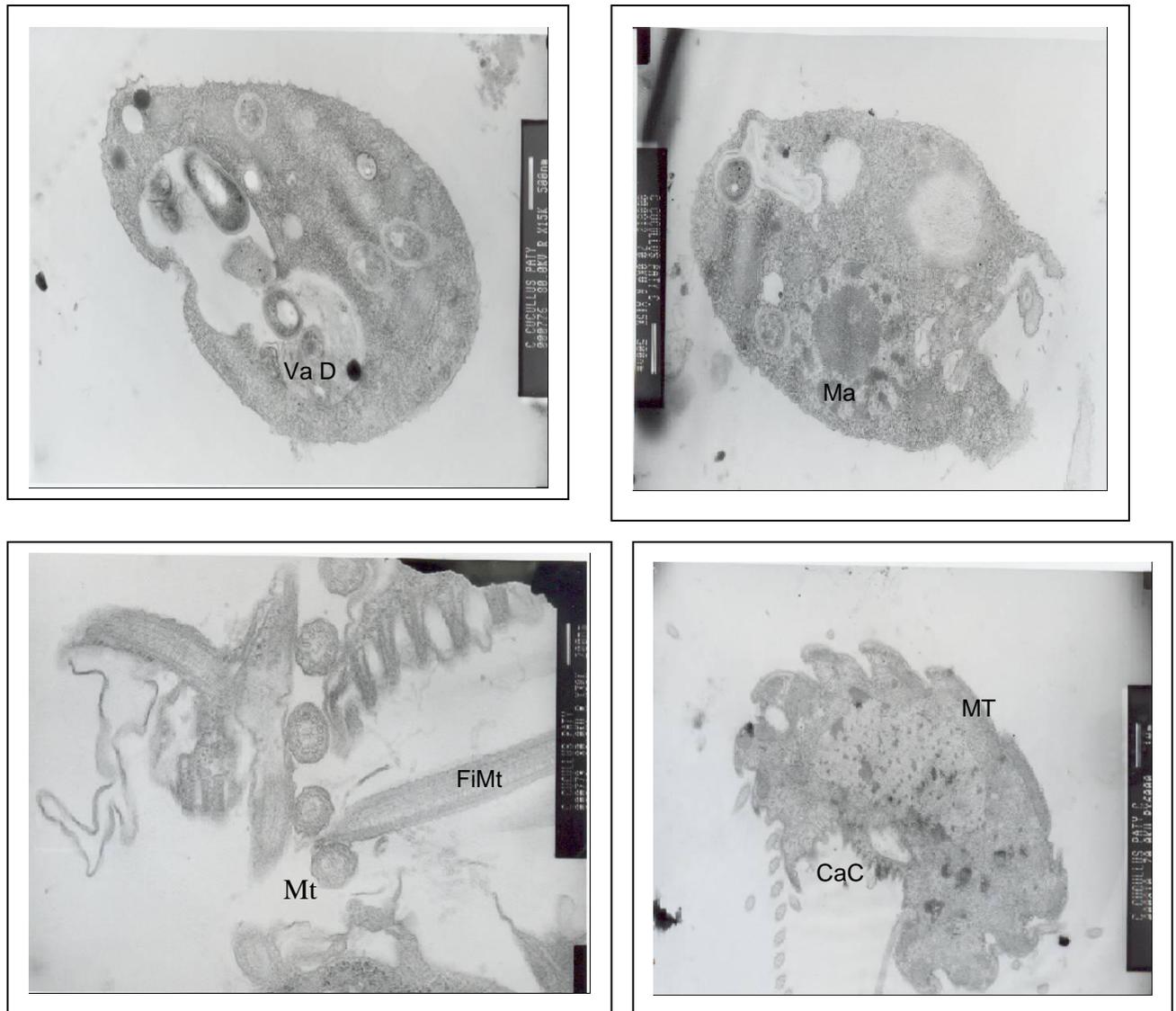


Figura 24.- Diferentes cortes de las células de *C. cucullus* en donde es posible apreciar Va D = Vacuola digestiva, Ma = Macronúcleo, Mt = corte transversal de cilio, FiMt = Fibra compuesta de microtubulos transversales, Ca C = Cavidad del citostoma, MT = mitocondrias.

A la concentración de 2.5 y 1 mg/mL, las microfotografías electrónicas de transmisión evidenciaron que aunque no se aprecie daño morfológico sobre la célula, fisiológicamente se presentan daños que provocan lisis celular. Se observó que las alteraciones producidas por el DDT a la concentración de 2.5 mg/mL fueron desde daño en las mitocondrias hasta daño en el núcleo, dependiendo del tiempo de exposición. En mitocondrias se observó la desaparición de las crestas mitocondricas, sobreviniendo lisis celular. De tal manera, que aunque este daño no fue observado en la forma trófica de la célula, el DDT a estas concentraciones causa un importante deterioro fisiológico (figura 25).

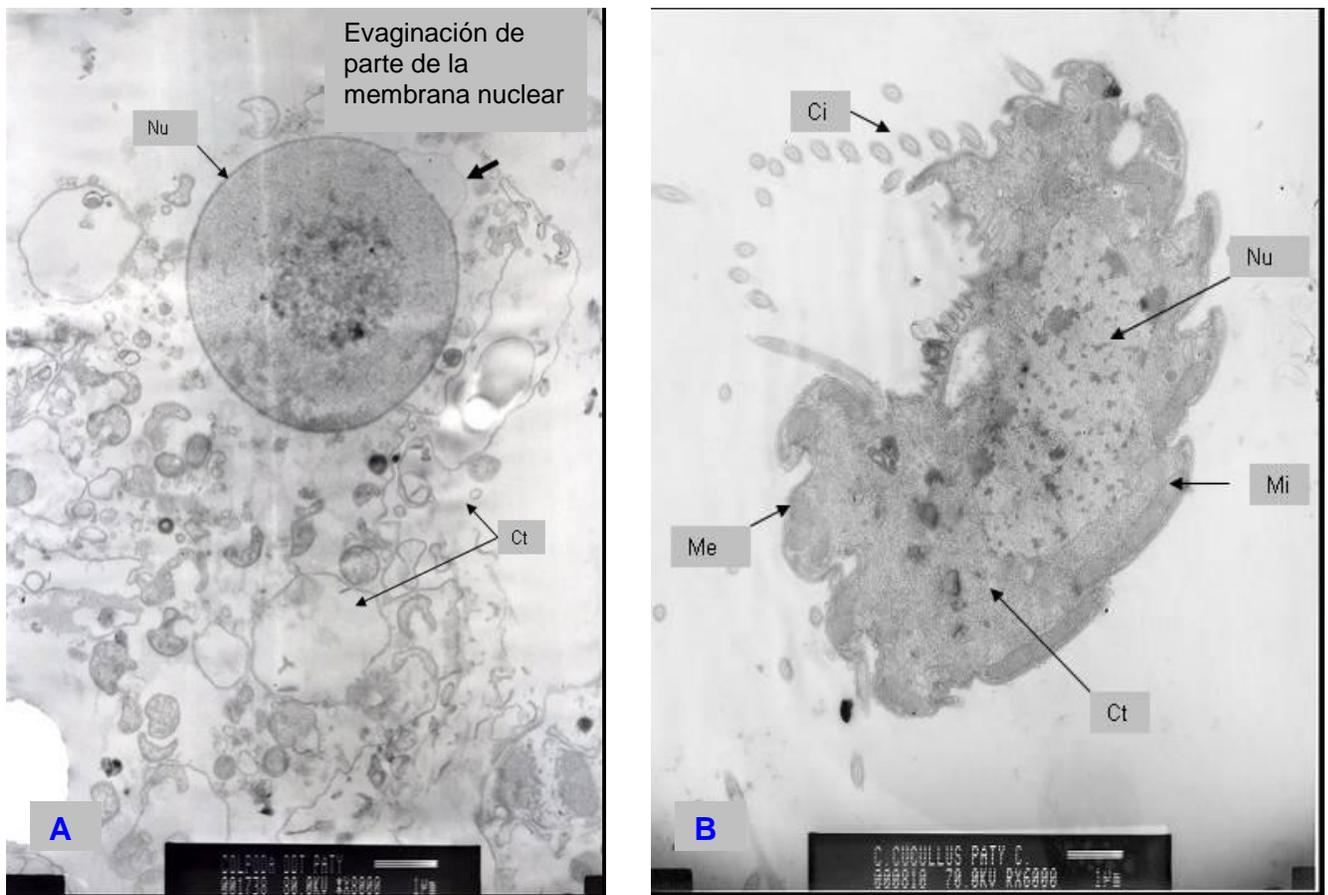


Figura 25. Micrografías de transmisión de *C. cucullus* A) 2.5 mg/mL lisis celular y daño en la membrana nuclear. B) Célula libre de DDT. Me=membrana, Ci = cilios, Mi = Mitocondrias, Ci = citoplasma, Nu = núcleo, Ct = citoplasma

6.5 Análisis Probit

Con los resultados obtenidos de las pruebas de toxicidad (Figura 26) y para obtener la concentración letal media (CL_{50}) del DDT sobre *C. cucullus* se realizó el análisis estadístico Probit. Al realizar el análisis se encontró que el valor de la CL_{50} fue de 2.37 mg/mL de DDT. Las tablas uno a cinco del anexo uno presentan los resultados totales obtenidos.

En la figura 26 se presentan los datos obtenidos de cada una de las concentraciones manejadas para obtener el valor de la CL_{50} . Como se observa a las concentraciones superiores a 1 mg/mL las células empiezan a morir a partir de los cinco minutos de exposición. Asimismo, durante este tiempo fue posible observar los cambios morfológicos que sufre la célula al estar expuesta al DDT.

La concentración a la cual no se observan efectos fue de 0.5 mg/mL de DDT y es en la que no se observa alteración en la célula.

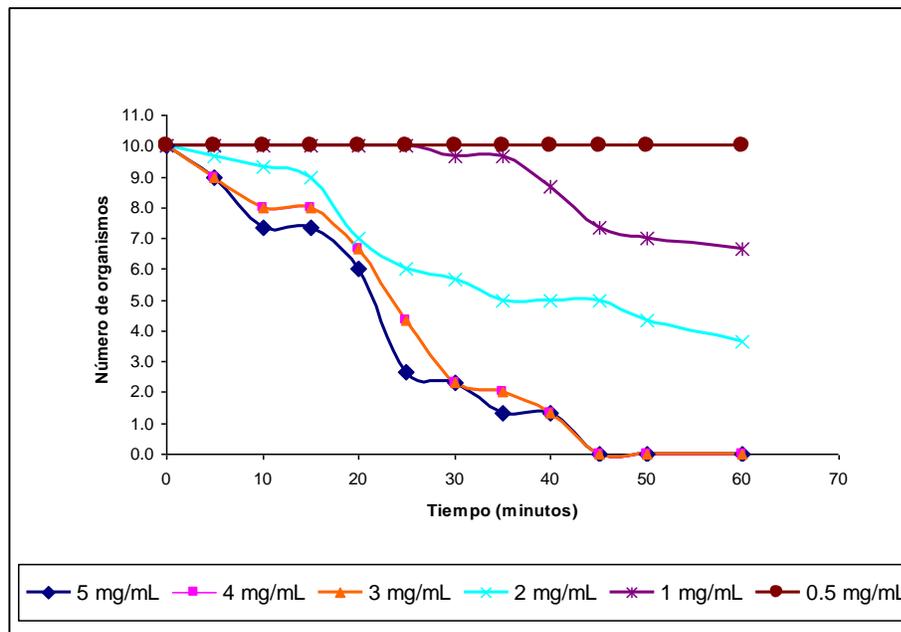


Figura 26. Datos obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda

En la figura 27, se muestra gráficamente el logaritmo de la CL₅₀ del DDT sobre *C. cucullus*. Para obtener el valor de la concentración letal media, que fue de 2.37 mg/mL se sacó valor del antilog del log₁₀ de la concentración. El valor de R² obtenido fue de 0.99, lo cual indica que los daños observados sobre las células de *C. cucullus* fueron debidos a la presencia de DDT.

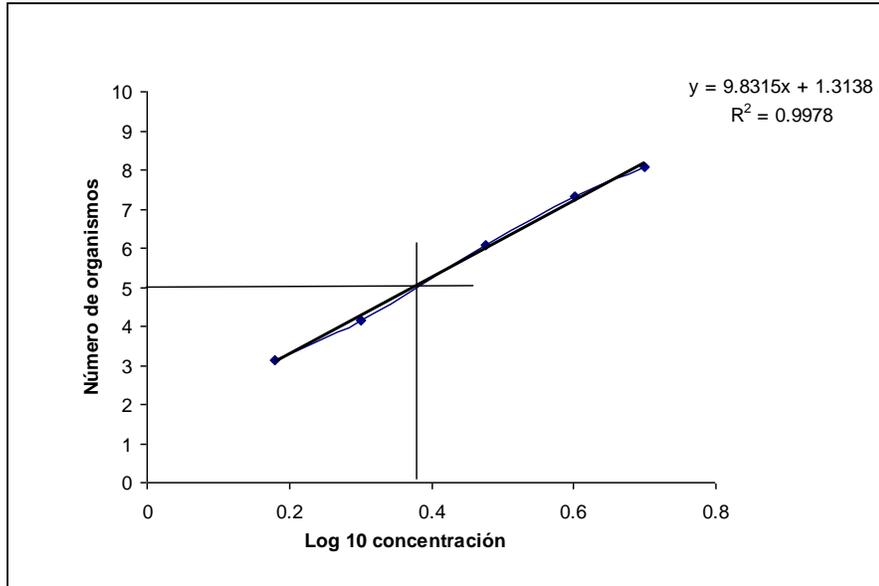


Figura 27. Concentración letal media para el DDT sobre el ciliado *Colpoda cucullus*.

Los daños causados por el DDT varían en organismos diferentes como se observa en la tabla 7. *C. cucullus* responde de manera inmediata al contacto con DDT, con efectos visibles que ya no son posibles de observar a las mínimas concentraciones.

Tabla 7. Concentraciones a las cuales el DDT causa diferentes efectos sobre los organismos

Organismo	Concentración	Tiempo de exposición (min)	Efectos	Referencia
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.1 - 5 mg/kg	ND	Degradación en un 3.1 %	Aislaire et al., 1997
<i>Blepharisma intermedium</i>	1 mg/ml	240	Bioacumulación en un 90 %	Amanchi y Hussain, 2010
<i>Stylonychia notophora</i>	100 mg/mL	60	Inhibición de división y crecimiento	Lal and Saxena, 1980
<i>Chelonia mydas</i> , <i>Eretmochelys imbricata</i>	0.494 mg/mL	ND	Adelgazamiento del cascaron	Cuevas et al., 2003
<i>C. cucullus</i>	4.0 mg/mL	Inmediato	Muerte	Castro-Ortíz et al., 2012
<i>C. cucullus</i>	2.3 mg/mL	60	Daño morfológico	Castro-Ortíz et al., 2012
<i>C. cucullus</i>	1.0 mg/mL	30	Daño morfológico	Castro-Ortíz et al., 2012
<i>C. cucullus</i>	0.5 mg/mL	60	Nivel de efectos no observable	Castro-Ortíz et al., 2012

6.6 Obtención del lixiviado de suelo contaminado con DDT

Para realizar la prueba de retención de DDT en suelo se efectuó lo siguiente: Se tomaron 40 g de suelo agregando 3 mg de DDT, el cual se mezcló perfectamente y se colocó en embudos. Estos últimos tenían un pequeño tapón de fibra de vidrio, para evitar que el suelo se perdiera. Una vez en el embudo se le adicionaron a cada muestra de suelo 20 mL de agua destilada para humedecerlo. A partir del segundo día se adicionaron otros 20 mL de agua destilada para obtener el lixiviado, en el cual se esperaba encontrar el DDT. Lo anterior se realizó con la finalidad de observar el tiempo que el DDT permanece en el suelo adherido a las partículas de arcilla y materia orgánica. En esta prueba se encontró que esta pequeña cantidad de DDT permanece

en el suelo por más de 20 días. El DDT aumentó la materia orgánica lavada del suelo, lo que muestra que el DDT fue arrastrado conforme pasaron los días (figura 28).

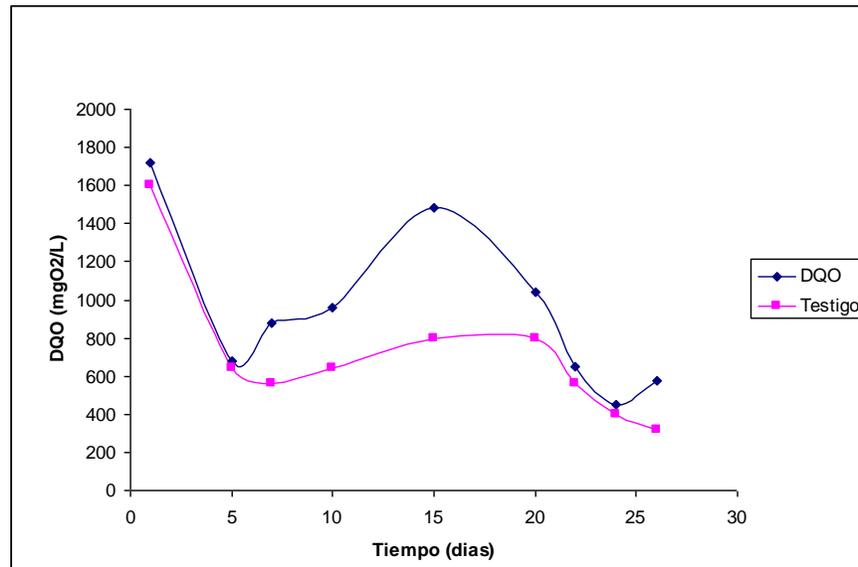


Figura 28.- Gráfica de recuperación, en término de DQO total, del DDT adicionado a una muestra de suelo.

El lixiviado obtenido de los primeros tres días de lavado fue utilizado para exponer a *C. cucullus*, dicho lixiviado mostró ser tóxico para las células ya que los microorganismos presentaron deformación celular y muerte a la hora de exposición. Como se observa en la figura 28, hasta después del quinto día y con más de 120 mL de agua se empezó a arrastrar el DDT contenido en el suelo. La mayor cantidad de DDT fue obtenida el día 15 con más de 300 mL de agua. La concentración de materia orgánica, medida como DQO total, empezó a disminuir a partir del decimos sexto día llegando a ser muy similar a la del suelo testigo, por lo que se asume que las concentraciones de DDT eran mínimas para el día 24.

6.7 Conclusiones de la Segunda Etapa Experimental

- Se logró una adecuada disolución del DDT, libre de solventes orgánicos, por lo que se asume los daños observados fueron debidos al plaguicida.
- Concentraciones de 3, 4 y 5 mg/mL causan entre el 86.66 y el 100% de muerte celular por lisis.
- Los daños causados por el DDT sobre las células van desde deformación celular hasta lisis a partir de las concentraciones de 2 mg/mL.
- A concentraciones de 1 mg/mL las células de *C. cucullus* sufrieron daño considerable evidenciado por las micrografías electrónicas de transmisión las cuales muestran que las mitocondrias sufren lisis.
- La concentración letal media del DDT sobre *C. cucullus* se encontró a 2.37 mg/mL.
- La concentración a la cual no se observaron efectos fue de 0.5 mg/mL.
- La construcción del micodosificador fue mejorada para ser más compacta y portátil.

7. TERCERA ETAPA EXPERIMENTAL

Durante esta última etapa experimental, el primero de los obstáculos que se debió resolver fue la inmovilización de la célula en una matriz que permitiera mantenerla viva, pero con un movimiento reducido. Para la inmovilización de *C. cucullus*, se probaron diferentes matrices, eligiéndose finalmente la que se consideró más adecuada para el experimento. Posteriormente, se iniciaron las pruebas para detectar la lectura de una posible señal de la célula como el elemento biológico del biosensor. En esta parte, se consideraron dos opciones la primera fue por medio de un microelectrodo y la segunda, utilizar fluorocromos.

Una vez realizado lo anterior, durante la tercera parte del trabajo, se procedió a reunir todos los elementos obtenidos con objeto de proceder a la construcción del biosensor. El método seguida durante esta última parte experimental se presenta en la figura 29.

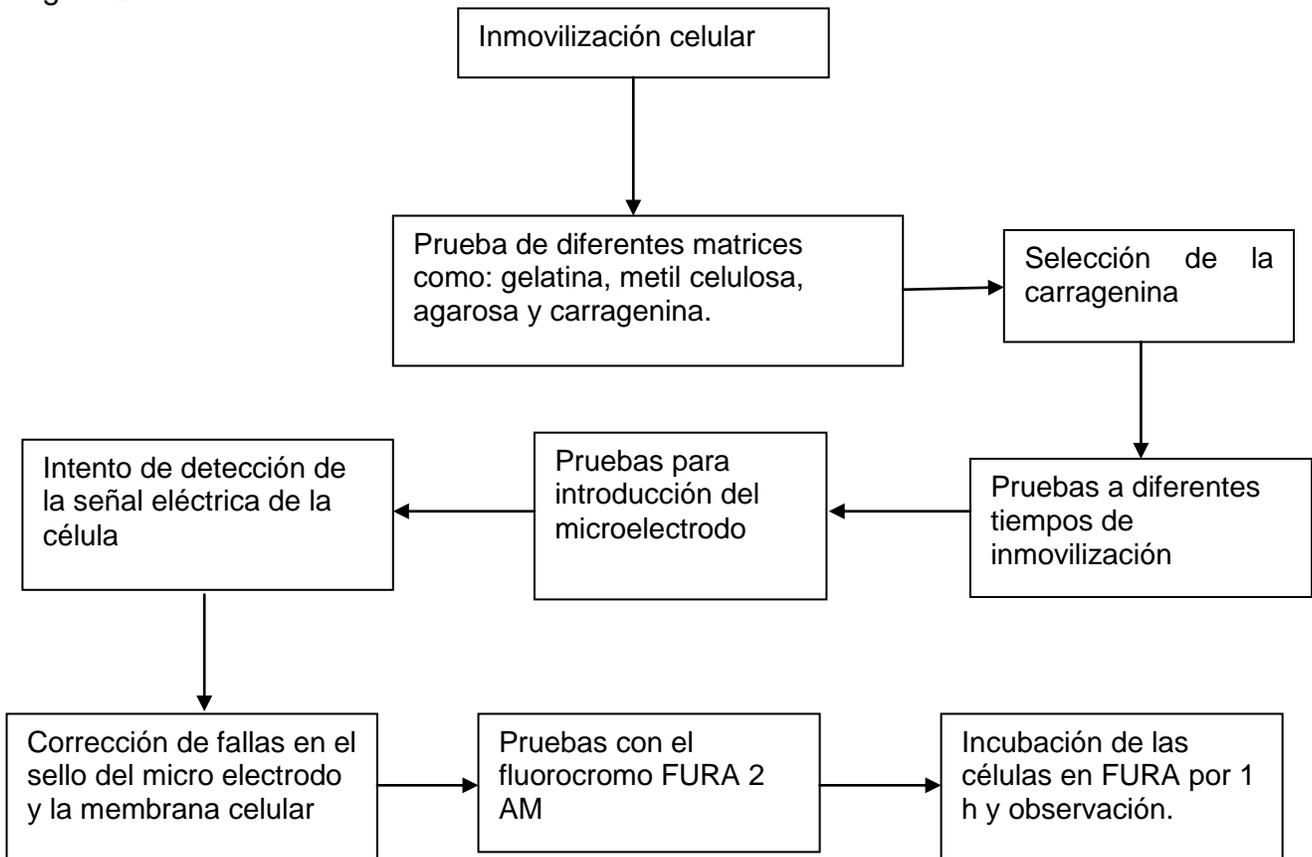


Figura 29. Método seguida para llevar a cabo la última parte experimental

7.1 Resultados y discusión de la Tercera Etapa Experimental

7.2 Inmovilización celular

Para lograr la inmovilización del elemento biológico se probaron diferentes matrices como: agarosa, gelatina, metil celulosa y carragenina. Los resultados obtenidos de estas pruebas mostraron que las primeras tres matrices no resultaron adecuadas para mantener inmóvil al elemento biológico, ya que solo se logro inmovilizar a *C. cucullus* por un periodo no mayor a 5 minutos. Adicionalmente, presentaron problemas de estabilidad al poner exceso de agua, ya que se perdía la consistencia de la matriz y como consecuencia ocurría también la pérdida de la célula.

La carragenina fue la que mostró los mejores resultados para inmovilizar a *C. cucullus*, logrando mantener a los ejemplares inmovilizados por periodos de hasta una hora, sin que estos sufrieran daño (figura 30). Además de posibilitar la hidratación de la carragenina sin que se perdiera de la consistencia de la matriz y con ello se retuviera la célula sin que se desplazara.

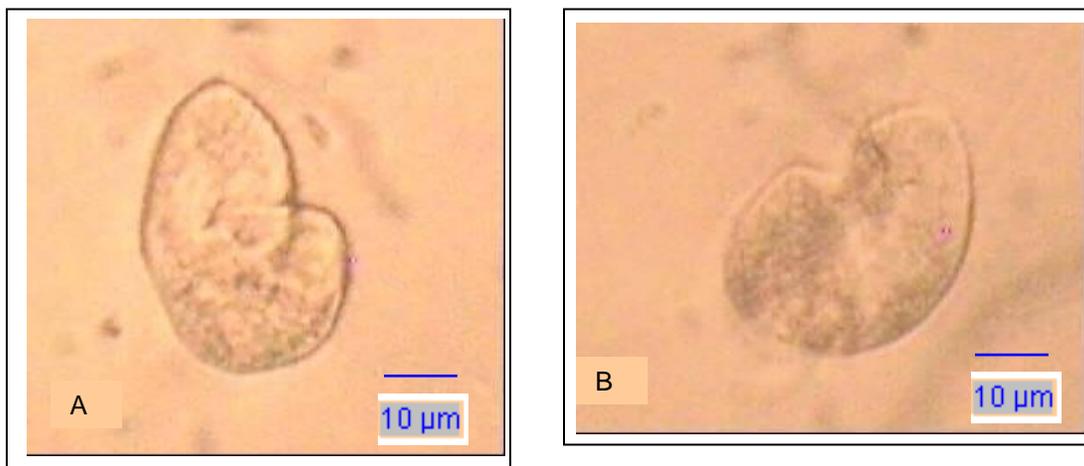


Figura 30. Inmovilización de *C. cucullus* A) 20 minutos y B) 40 minutos dentro de carragenina.

Una vez lograda la inmovilización de la célula dentro de la carragenina por periodos relativamente largos, fue posible ensayar la introducción de un microelectrodo que permitiera registrar una posible señal eléctrica producida por la apertura de los

canales de sodio (Na^+) potasio (K^+) de la célula en estado de reposo y libre de agentes estresantes.

7.3 Detección y medición de la señal proveniente de *C. cucullus*

La inserción del microelectrodo dentro del citoplasma de *C. cucullus* se trató de hacer con ayuda del microscopio óptico. Sin embargo, después de diversos intentos y tras lograr insertar el microelectrodo, el cual se encontraba lleno de una solución de cloruro de potasio 50 Mm; no fue posible captar dentro de la célula ninguna señal (figura 31). Lo anterior, posiblemente debido a que no se obtuvo un sellado perfecto entre el microelectrodo y la membrana celular de *C. cucullus*, a causa de la presencia de los cilios en toda la célula. Sin embargo, para no afectar las condiciones morfológicas de la célula no se intentó la desciliación con alcohol, como se indica en algunas referencias bibliográficas. Al no obtener la respuesta esperada mediante el empleo del microelectrodo, se procedió a ensayar con la segunda opción, que fue el uso de fluorocromos. Considerando que *C. cucullus* no cuenta con este tipo de elementos de manera natural, se procedió a efectuar una revisión bibliográfica para determinar el tipo de fluorocromo que pudiera penetrar la membrana de la célula, sin dañarla, y de esta manera poder obtener una señal óptica en lugar de eléctrica.



Figura 31. Muestra la punta del microelectrodo dentro del citoplasma de *C. cucullus*

El fluorocromo que se probó fue el acetoximetil ester (AM), FURA 2 AM, el cual es permeable a la membrana celular, por lo que penetra al interior de la célula sin

dañarla. Lo cual lo hace un excelente colorante para observación y digitalización de imágenes. El espectro de excitación del FURA 2 AM se encuentra entre los 280 y 300 nm, mientras que el pico de emisión se encuentra cerca de los 510 nm. Es un quelante altamente selectivo al calcio y presenta mínimas fluctuaciones a las variaciones de pH, este fluorocromo ha sido usado con una gran variedad de tipos celulares en los cuales se quiere conocer la concentración de calcio libre en el citoplasma.

Con el uso del FURA-2 AM, fue posible observar la bioluminiscencia que adquirió la célula de *C. cucullus* al ser incubada con este fluorocromo (figura 31). El FURA-2 AM mide las concentraciones libres de calcio (Ca^{2+}), por lo cual al exponer a la célula a DDT y quedar bloqueados los canales iónicos e imposibilitados para cerrarse, se observaría como resultado un cambio en la luminiscencia interna de la célula, ya que se tendría más calcio libre fuera de ésta que en el citoplasma, el fluorocromo saldría por los canales iónicos junto con los iones de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Con el programa correcto para analizar las imágenes hubiera sido posible cuantificar, en forma de bioluminiscencia, el fluorocromo fuera de la célula. Este fluorocromo tiene la ventaja de poder ser utilizado ya sea en una suspensión de células o con una sola célula para ser analizada de manera individual con un microscopio de fluorescencia (Malgaroli *et al.*, 1987). El FURA 2 AM permite hacer mediciones precisas de las concentraciones de calcio intracelular por periodos de hasta una hora sin que se presente pérdida significativa de la fluorescencia.

Para cargar la célula de *C. cucullus* con el fluorocromo solo fue necesario incubar por 1 hora a las células en una solución de acetoximetil ester (FURA 2 AM) para este caso particular se utilizó en una concentración 10 μM . Pasado este tiempo, se realizó una observación al microscopio para comprobar que las células se cargaron con el fluorocromo. Como resultado de la incubación en la figura 32 se observa la célula de *C. cucullus* con fluorescencia, provocada por el FURA 2 AM, al atravesar la membrana de la célula.

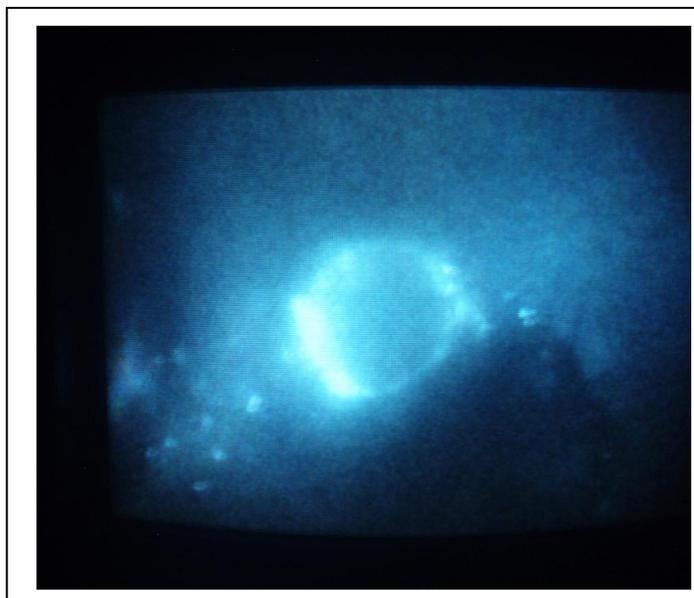


Figura 32. Célula de *C. cucullus* previamente incubada en FURA 2 AM, para producir fluorescencia.

Los resultados obtenidos han evidenciado la factibilidad de usar a *C. cucullus* como elemento biológico para la conformación de un biosensor óptico útil en la determinación de DDT presente en suelo.

Futuras experimentaciones deberán enfocarse en la exposición al DDT de las células de *C. cucullus* cargadas con FURA 2 AM y observar los cambios que ocurren en el tiempo. Para ello, será necesario emplear equipo de microscopía que cuente con los aditamentos adecuados que permitan visualizar, mediante el uso de longitudes de onda apropiadas, el cambio de intensidad de la bioluminiscencia dentro y fuera de las células cuando estas entren en contacto con el DDT.

7.4 Conclusiones de la Tercera Etapa Experimental

- La matriz que mostró ser más adecuada para lograr la inmovilización de *Colpoda cucullus* fue la **carragenina**. Manteniendo a la célula para su estudio hasta por una hora.
- La detección de una posible señal eléctrica no fue posible.

- El fluorocromo FURA 2 AM fue una buena opción para lograr una bioluminiscencia en la célula debido a que puede pasar a través de la membrana sin causar daños.
- Se logró observar la bioluminiscencia adquirida por las células de *C. cucullus* al ser incubadas en FURA 2 AM.
- No se logró obtener evidencia contundente de la respuesta de *C. cucullus*, debido a que no se logró un sello perfecto entre el microelectrodo y la membrana celular debido a la presencia de los cilios.

8. CONCLUSIONES

- Las células de *Colpoda cucullus* han resultado una excelente herramienta para realizar pruebas de toxicidad. Su delicada membrana en contacto con el ambiente las hace responder en menos de una hora al estrés provocado por la presencia de los contaminantes.
- La forma de obtención de las células del suelo fue adecuada, ya que se logró conseguir una gran cantidad para llevar a cabo los experimentos que fueron programados.
- Los ensayos de toxicidad con el DDT mostraron que *C. cucullus* responde de manera rápida, a partir de los primeros cinco minutos de exposición, dependiendo de la concentración, al estrés provocado por la presencia del DDT con pérdida de la morfología y la disminución en la velocidad del nado.
- El suelo de Mixquiahuala, aunque es de temporal, presenta concentraciones de DDT de 0.066 mg/kg de suelo. Posiblemente el cual ha sido depositado debido a la volatilidad de ese plaguicida.
- El análisis de biología molecular mostró que el organismo aislado del suelo de Mixquiahuala pertenece a la especie *C. cucullus*.
- La concentración letal media (CL₅₀) obtenida al poner en contacto a la célula con el DDT fue de 2.37 mg/mL de DDT.
- Las microfotografías electrónicas de transmisión mostraron que a concentraciones por debajo de los 2 mg/mL de DDT las células sufren daños como lisis, pérdida de las crestas mitocondricas y daño en la membrana nuclear.
- El equipo construido para la microdosificación es muy útil ya que permite la disminución de errores al dosificar el DDT, adicionalmente ayuda a que el analista este el menor tiempo en contacto con la solución de DDT.
- Se logró la inmovilización de la célula, para proceder a la medición de una posible señal, ya sea eléctrica o visual, tanto en reposo como al ser expuesta al DDT.
- No fue posible la medición de una señal con el microelectrodo debido a que no se logró un sellado perfecto entre este y la membrana de la célula.

- El FURA 2 AM mostró ser una excelente herramienta para que las células de *C. cucullus* adquirieran bioluminiscencia sin ocasionarles daños, lo cual puede permitir la exposición al DDT y la observación de los posibles daños sobre las células al bloquearse los canales iónicos.
- El ciliado edafícola *C. cucullus* puede ser un buen elemento biológico para un biosensor, si se logra, por un lado un sellado perfecto entre el microelectrodo y la membrana celular, o si se detecta por medio del fluorocromo que el DDT causa la despolarización de la membrana y la pérdida de iones.

9. Recomendaciones

- Seguir con las pruebas de inmovilización para mejorar la técnica e intentar mantener por mayor tiempo a las células sin daño en una matriz más estable.
- Intentar nuevamente la inserción del microelectrodo con el objetivo de detectar una señal de la célula en reposo, para que pueda ser comparada con una señal provocada por la presencia de un factor externo que cause estrés en la célula como el DDT.
- Continuar, con las pruebas con el fluorocromo para lograr obtener evidencias de que efectivamente el calcio intracelular cambia su concentración, al poner a la célula en contacto con el DDT y bloquearse los canales iónicos.

8. REFERENCIAS

- Aislabie JM, Richards NK, Boul HL. (1997). Microbial degradation of DDT and its residues—a review. **New Zeal J Agr. Res.** (40): 269-282
- Aguilar A y Borrell A. (2005). DDT and PCB reduction in the western Mediterranean from 1987 to 2002, as shown by levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). **Mar. Environ. Res.** 59: 391–404
- Albert AL. (2004). Toxicología Ambiental. Universidad Autónoma Ciudad Juárez. 445 p.
- Albert AL. (2005). Panorama de los plaguicidas en México 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Tepic, Nayarit, 1 y 2 de septiembre de 2005. 16 p.
- Alcalá MPL. (2002). Ingeniería de anticuerpos aplicada al desarrollo y aplicación de biosensores enzimáticos. Tesis doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Barcelona, 100 p.
- Aleff K y Nanniper P. (1998). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. Toronto, 556 p.
- Alegria H, Bidleman FT, Figueroa SM. (2006). Organochlorine pesticides in the ambient air of Chiapas, Mexico. **Environ. Pollut.** 140: 483-491
- Alexander M. (1999). Biodegradation and bioremediation. Academic Press. San Diego, California. 443 p.
- Amanchi NR, Hussain MM (2010). Cytotoxicity assessment of monocrotophos in *Paramecium caudatum* and *Oxytricha fallax*. *J. Environ. Biol.* 31: 603-607.
- Anderson TH. (2003). Microbial eco–physiological indicators to asses soil quality. **Agr. Ecosyst. Environ**, 98. 285 – 293.
- Andréu V y Picó Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. **Trenes. Anal. Chem.** 23 (10–11): 772-788.
- Ansari IK y Malik A. (2009). Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. **Mutat. Res.** 673:124-132.
- Arévalo-Trear ME. (1967). Sistemática y morfología de algunas especies de protozoarios edafícolas aislados de un tipo de suelo de ando, del estado de Morelos, México. Tesis Biología. Facultad de Ciencias UNAM. 70 p.

-
- Arufe IM, Arellano J, Moreno JM y Sarasquete C. (2004). Toxicity of a commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L) larvae: a comparison with the microtox test. **Ecotox. Environ. Safe.** 59: 209-216.
 - Avidano L, Gamalero E, Cossa GP, Carraro E. (2005). Characterization of soil health in an Italian polluted site by using microorganisms as bioindicators. **Appl. Soil Ecol.** 30:21–33.
 - Bamforth SS. (2001). Proportions of active ciliates in soil. **Biol. Fert. Soils.** 33: 197 – 203.
 - Beard J. (2006). DDT and human health. **Sci. Total Environ.** 355: 78– 89.
 - Bento FM, Camargo AO, Okeke BC, Frankenberger WT. (2005). Comparative bioremediation of soil contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technol.** 96: 1049 – 1055.
 - Blount E. (2002). Convenio de Estocolmo sobre los contaminantes orgánicos persistentes Un instrumento internacional para un problema global. En línea: <http://www.istas.net/ma/areas/residuos/informe2.pdf.v>. (Consultado 10-03-08).
 - Bousse L. (1996). Whole cell biosensors. **Sensors Actuat B-Chem.** 34: 270 – 275.
 - Cambiaso A, Chiarugi S, Grattarola M, Lorenzelli L, Lui A, Margesin B, Martinoina S, Zanini V y Zen M. (1996). An H⁺ - FET – based systems for on –line detection of microorganisms in waters. **Sensors Actuat B-Chem,** 34: 245 – 251.
 - Campbell DC, Warren A, Cameron MC, Hope JS. (1997). Direct toxicity assessment of two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay. **Chemosphere** 34(3):501-514.
 - Canh MT. (1993). Biosensors. Chapman & Hall Editors. New York. 187 p.
 - Castillo J, Gáspar S, Let S, Niculescu M, Mortari A, Bontidean I, Soukharev V, Dorneanu SA, Ryabov AD, Csöregi E. (2004). Biosensors for life quality design development and applications. **Sensors Actuat B-Chem.** 102: 179-194.
 - Castillo MG. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 188 p.

- Castro–Ortíz LP. (2004). Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recorte de perforación sobre el ciliado edafícola “*Colpoda cucullus*”. Tesis maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. 90 p.
- Castro-Ortíz L. P., Luna Pabello V. M., García Calderón N. E., Rodríguez Zaragoza S. Flores Hernández J. L and Avila L. A. (2012). Toxicological effect of DDT in *Colpoda cucullus* and its potential application in forming environmental biosensor. **IRJM**. 3: 117-126.
- Chang S y Doong R. (2006). Concentration and fate of persistent organochlorine pesticides in estuarine sediments using headspace solid-phase microextraction. **Chemosphere** 62: 1869–1878.
- Cortinas de NC. (2004). Plaguicidas y sustancias químicas peligrosas. En línea: http://www.sre.gob.mx/eventos/dgtg/prog_susquimicas/infomesa1.doc (Consultado 5-06-08)
- Coûteaux MM y Darbyshire FB. (1998). Functional diversity amongst oil protozoa. **Applied. Soil Ecology**. 10: 229-237.
- Cuevas E, Maldonado A y Cobos B. (2003). Determinación de DDT y DDE en huevos de tortuga blanca (*Chelonia mydas*) y de tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), en la costa de Yucatán, México. **Oceánides** 18(2): 87-92.
- Dalla VF y Pupo NFR. (2006). Oxidation of p,p'-DDT and p,p'-DDE in highly and long-term contaminated soil using Fenton reaction in a slurry system. **Sci. Total Environ**. 371:11–18
- Darbyshire JF. (1994). Soil Protozoa. CAB international. 203 p.
- Davoren M y Fogarty A M. (2004). A test for the ecotoxicological evaluation of the agro-chemical environ. **Ecotox. Environ. Safe**. 59: 116-122.
- Díaz-Barriga F, Borja-Aburto V, Waliszewski S, Yañez L. (2003). The handbook Environmental Chemistry: Chapter 14. **DDT in Mexico**. Vol. 3: 371-388
- Díaz S, Martín-González A, Gutiérrez JC. (2006). Evaluation of heavy metal acute toxicity and bioaccumulation in soil ciliated protozoa. **Environ. Int**. 32 (6): 711-717.
- Dive D, Robert S, Angrand E, Bel C, Bonnemain H, Brun L, Demarque Y, Le Du A, El Bouhoti R, Fourmaux MN y Guery L. (1989). A bioassay using the measurement of the

- growth inhibition of a ciliate protozoan: *Colpidium campylum* Stokes. **Hydrobiologia**, 188/189: 181 – 188.
- Echegaray AA y Ramírez GRM. (1986). Prácticas de Microbiología Agrícola. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. 66 p.
 - Edvartoro BB, Naidu R, Megharaj M y Singleton I. (2003). Changes in microbial properties associated with long-term arsenic and DDT contaminated soils at disused cattle dip sites. **Ecotox. Environ. Safe.** 55: 344–351.
 - Enriquez AP. (1997). Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. En: www.monografias.com (Consultado 28- 04-2008).
 - Esteban FG, Clarke JK, Olmo LJ, Finlay BJ. (2006). Soil protozoa—an intensive study of population dynamics and community structure in an upland grassland. **Appl. Soil Ecol.** 33(2): 137-151.
 - Fang W, Yong-Rong B, Xin J, Hong-Jian G, Gui-Fen Y, Jian-Cai D. (2006). Residual characteristics of organochlorine pesticides in Lou soils with different fertilization modes. **Pedosphere** 16(2): 161-168.
 - Farré M, Brix R, Barceló D. (2005). Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. **Trends Anal. Chem.** 24(6): 532 -544.
 - Franco I, Contin M, Bragato G, De Nobili M. (2004). Microbiological resilience of soil contaminated with crude oil. **Geoderma** 12:17 – 30.
 - Foissner W. (1993). Colpodea (Ciliophora) Protozoenbiota. Vol. 4/4. Gustav Fischer Verlag. New York. 784 p.
 - Foissner W. (1999). Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. **Agr. Ecosyst. Environ.** 74:95–112.
 - Galvão AL, Henao S. (2002). Programa regional de acción y demostración de opciones sostenibles para el control de la malaria sin el uso de DDT en México y América Central. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología.** 64:106 - 109.
 - Gardner CS, Pier MD, Wesselman R, Juárez JA. (2003). Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. **Mar. Pollut. Bull.** 46: 1082–1089.
 - Gfrerer M, Lankmayr E. (2005). DDT degradation during enhanced solid–liquid extractions a consideration. **J. Chromatogr. A.** 1072: 117–125.

- Gómez-Arroyo S, Díaz-Sánchez Y, Meneses-Pérez MA, Villalobos-Pietrini R, León-Rodríguez J. (2000). Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. **Mutat. Res.** 466: 117–124.
- González MA, Díaz S, Borniquel S, Gallego A, Gutiérrez JC. (2006). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. **Res. Microb.** 157(2): 108-118.
- Gooding JJ. (2006). Biosensors technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. **Anal. Chim. Acta.** 559: 137 – 151.
- Greenpeace Argentina. (1999). Contaminantes orgánicos persistentes en los humanos: Resumen de los datos existentes a nivel global sobre los 12 contaminantes orgánicos persistentes y otros organoclorados en tejido humano. En línea <http://www.greenpeace.org/argentina/contaminacion/contaminantes-persistentes/resumen-del-informe-contaminan-2>. (Consultado 7-01-2009).
- Gundi A.K.B.V, Viswanath B, Chandra SM, Kumar NV y Reddy RB. (2007). Activities of cellulase and amylase in soils as influenced by insecticide interactions. **Ecotox. Environ. Safe.** 68:278–285.
- Gutiérrez JC, González MA, Díaz S, Ortega R. (2003). Ciliates as a potential source of cellular and molecular biomarkers/ biosensors for heavy metal pollution. **Eur. J Protisto.** 39 (4): 461- 467.
- Hall HAE. (1991). Biosensors. Prentice Hall – Hispanoamericana S.A., México. 345 p.
- Hall TA. (1999). Bioedit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Hernández-Romero HA, Tovilla-Hernández C, Malo AE, Bello-Mendoza R. (2004). Water quality and presence of pesticides in a tropical coastal wetland in southern México. **Mar. Pollut. Bull.** 48: 1130–1141.
- Hu W, Lu Y, Wang G, Wang T, Luo W, Shi Y, Zhang X y Jiao W. (2009). Organochlorine pesticides in soils around watersheds of Beijing reservoirs: A case study in guanting and miyun reservoirs. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 82:694–700
- INE. Instituto Nacional de Ecología. Suelos. (2002) En línea www.ine.gob.mx. (Consultado 10-03- 08).

- INEGI. Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2000). Marco Geoestadístico. En Línea: <http://mapserver.inegi.gob.mx/>. (Consultado 16-02-08)
- Johnsen K, Jacobsen SC, Torsvik V y Sørensen J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biol. Fertil. Soils** 33:443–453.
- Jonson TB y Kennedy JO. (1973). Biomagnification of p,p'-DDT and methoxychlor by bacteria. **Appl. Microbiol.** 26(1): 66-71.
- Kiflom GW, Wandiga OS y Kamau NG. (2001). Status of organochlorine (DDT) pollutants and steps toward electrocatalytic reductions. **Pure Appl. Chem.** 73(12): 1907-1916.
- Lal R, Saxena DM (1980). Effect of DDT on Cell Population Growth, Cell Division, and DNA Synthesis in *Stylonychia notophora* (Stokes). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 9:163-170.
- Lal R y Saxena MD. (1982). Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. **Microbiol. Reviews.** 46(1): 95-127.
- Lara G. (1999). Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. En línea: <http://www.monografias.com./trabajos10/>. (Consultado 22-05-07).
- Lee S, Basu S, Tyler WC, Wei WI. (2004). Ciliate populations as bio-indicators at Deer island treatment plant. **Adv. Environ. Res.** 8: 371–378.
- López –Carrillo L, Torres-Areola L, Torres SL, Espinoza TF, Mariano CCJ, Waliszewski S y Saldate O. (1996). Commentary: Is DDT Use a public health problem in México? **Environ. Health Perspectives** 104(6): 584-588
- López GMA y Ortiz de Apodaca FO. (2002). Inmunosensores: Herramientas analíticas con un gran potencial de futuro. **Schironia**, 1:51 – 59 En línea: www.schironia.com (Consultado 9-06-07).
- Luege TLJ. (2005). Suelos Capitulo 3. En línea: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_04/03_suelos/index_suelos.html. (Consultado 28-10-07).
- Luo L, Zhang S, Shan X, Zhu Y. (2006). Oxalate and root exudates enhance the desorption of p,p'-DDT from soils. **Chemosphere** 63: 1273–1279.

-
- Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J y Pozzan T. (1987). Fura-2 Measurement of Cytosolic Free Ca²⁺ in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol.* 105:2145- 2155.
 - Marín JA, Hernández T, García C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by land farming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98: 185 – 195.
 - Madoni P y Romeo GM. (2006). Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environ. Pollut.* 14: 1-7.
 - Método de muestreo y prueba de materiales, M-MMP- 1-01-03. (2003). Suelos y materiales para terracerías. 11 p.
 - Morelli IS, Del Panno MT, De Antoni GL, Paineira AT. (2005). Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge –contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 55: 271 – 278.
 - Mphokgo PM, Cloete ET. (2005). The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 55:1 – 8.
 - Nahmani J, Lavelle P, Rossi JP. (2006). Does changing the taxonomical resolution alter the value of soil macroinvertebrates as bioindicators of metal pollution? *Soil Biol. Biochem.* 38: 385–396
 - Navarro SRJ. (2006). Estudio de oxidación de plaguicidas organoclorados con ferrato de potasio. Tesis en Ingeniería Química, Facultad de Química, UNAM. 78 p.
 - Norma PROYNMX-AA-132-SCFI-2006. Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra.
 - NOM-021-SEMARNAT-2000. Diario Oficial de la Federación. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos, estudio, muestreo y análisis.
 - Ortiz-Hernández M, Sánchez-Salinas E, Vázquez-Duhalt R y Quintero-Ramírez R. (1997). Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. *Biotecnología.* 3:129-151.
 - Ortíz SR. (1997). Los plaguicidas en México.
En línea: <http://www.monografias.com/Biologia/index.shtml>. (Consultado 16-03-2007).

- OPS. Organización Panamericana de la Salud. (1999). Contaminantes orgánicos persistentes. 14 pp. En línea http://www.paho.org/spanish/gov/ce/ce124_15.pdf. (Consultado 14-11-07).
- Paitan Y, Birian D, Birian I, Shechter N, Babai R, Rishpon J, Ron EZ. (2003). On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. **Biotechnol. Adv.** 22: 27-33.
- Piola JC. (2005). Compuestos orgánicos persistentes: Plaguicidas I. En línea. <http://www.sertox.com.ar>. (Consultado 30-12-07).
- Plaza G, Nalcez – Jawecki G, Ulfig K, Brigmon RL. (2005a). Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon – bioremediated soil. **Ecotox. Environ. Safe.** 62:415–420.
- Plaza G, Nalcez – Jawecki G, Ulfig K, Brigmon RL. (2005b). The application of bioassays as indicators of petroleum –contaminated soil remediation. **Chemosphere**, 59:289 – 296.
- Pirnie FE, Talley WJ, Hundal SL. (2006). Abiotic transformation of DDT in aqueous solutions. **Chemosphere**, 65:1576–1582.
- Ponce G, Cantú PC, Flores A, Badii M, Zapata R, López B y Fernández I. (2006). Modo de acción de los plaguicidas. **RESPYN** 7(4) En: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/4/index>. (Consultado 17-12-07).
- Prado FG, Carabias MR, Rodríguez GE y Herrero HE. (2002). Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. **Rev. Esp. Salud Pública.** 76: 133-147.
- Prado G, Díaz G, Noa M, Méndez I, Cisneros I. (2004). Niveles de pesticidas organoclorados en leche humana de la ciudad de México. **Agro. Sur.** 32(2) 60-69.
- Pratt JR, Mochan D, Xu A. (1997). Rapid toxicity estimation using soil ciliates: Sensitivity and bioavailability. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 58: 387 – 393.
- Rendón SG. (2005). El campo mexicano, una bomba de tiempo tóxica. En línea: <http://www.cronica.com.mx/nota> (Consultado 20-08-2007).
- Residuos de Plaguicidas. En línea: www.osanet.euskadi.net/r85-7554/eu/contenidos. (Consultado 10-04-2007).

- Reyes SEI. (2004). Compartimentalización de carbono en suelos con agua residual en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental). Facultad de Ciencias, UNAM. 64 p.
- Ritter L, Solomon KR, Forget J. (1995). Contaminantes orgánicos persistentes. Informe de evaluación sobre: DDT, aldrina, dieldrina, endrina, clordano, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex toxafeno, bifenilos policlorados, dioxinas y furanos. Canadian Network of Toxicology Centres. 51 p.
- Rodríguez FH y Rodríguez AJ. (2002). Métodos de análisis de suelos y plantas: criterios de interpretación. Ed. Trillas. 193 p.
- Rodríguez MS, López de Alda MJ, Marco MP, Barceló D. (2005). Biosensors for environmental monitoring a global perspective. *Talanta* 65: 291-297.
- Rojas-García AE, Solís-Heredia MJ, Piña-Guzmán V, Vega L, López-Carrillo L, Quintanilla-Vega B. (2005). Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol. Appl. Pharm.* 205:282– 289.
- Rup L y Saxena DM. (1982). Accumulation, metabolism, and effects of Organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiol. Rev.* 46: 95-127.
- Saitou N y Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sánchez MJM. (1984). Los plaguicidas: adsorción y evolución en el suelo. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Temas de divulgación. 51 p.
- Sánchez ME, Estrada IB, Martínez O, Martín-Villacorta J, Aller A, Morán A. (2004). Influence of the application of sewage sludge on the degradation of pesticides in the soil. *Chemosphere*, 57: 673 – 679.
- SEMARNAT. (2002). Criterio cuarto: Conservación y mantenimiento de recursos suelo y agua. 115-124.
- Sarkar D, Ferguson M, Datta R y Birnbaum S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environ. Pollu.* 136:187 – 195.
- Szczepaniak K y Biziuk M. (2003). Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environ. Res.* 93:221 – 230.

- Tauber M, Rosen R, Belkin S. (2001). Whole-cell biodetection of halogenated organic acids. **Talanta** 55:959–964.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24:1596-1599.
- Thangavadivel K, Megharaj M, Smart R, Lesniewski JP y Naidu R. (2009). Application of high frequency ultrasound in the destruction of DDT in contaminated sand and water. **J Hazard. Mater.** 168 (2): 1380-1386.
- Trielli F, Chessa MG, Amaroli A, Ognibene M, Delmonte Corrado MU. (2006). Effects of organophosphate compounds on a soil protist, *Colpoda inflata* (Ciliophora, Colpodidae). **Chemosphere**, 65(10):1731-1737.
- Waliszewski MS, Pardo VT, Waliszewski, Chantiri JN Aguirre AA, Infanzhn RM, Rivera J. (1997). Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. **Sci. Total Environ.** 208:127-132.
- Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, Rivera J, Infanzon R. (1998). Time trend of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Veracruz, Mexico: 1988-1997 survey. **Sci. Total Environ.** 221: 201-204.
- Waliszewski SM, Bermúdez MT, Infanzón RM. (2002). Niveles de DDT en tejido adiposo materno, suero sanguíneo y leche de madres residentes en Veracruz, México. Estudio 1997-1999. **Rev. Int. Contam. Ambient.** 18:17-25.
- Yazgan MS y Tanik A. (2005). A new approach for calculating the relative risk level of pesticides. **Environ. Int.** 31:687– 692
- Zhang HB, Luo YM, Zhao QG, Wong HM, Zhang GI. (2005). Residues of organochlorine pesticides in Hong Kong soils. **Chemosphere**, 63(4): 633-641.
- Zhu Y, Liu H, Xi Z, Cheng H, Xu X. (2005). Organochlorine pesticides (DDTs and HCHs) in soils from the outskirts of Beijing, China. **Chemosphere**, 60:770–778.

Paginas de internet:

- Contaminantes orgánicos persistentes. (1999). Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. En línea: <http://www.paho.org/spanish/gov/ce/ce12415.pdf> . (Consultado 22-02-07).

- DDT. Hoja técnica. En línea: <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn0034.htm>. (Consultado 11-05-2007).
- Historia del DDT en América del Norte. (1997). En Línea: www.cec.org/files/PDF. (Consultado 31-06-2007).
- Hoja técnica DDT. (2007). En línea: <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspn0034.htma>. (Consultado 08-01-07).
- Greenpeace. (2004). México, obligado a eliminar los compuestos más tóxicos (2004). En línea <http://www.greenpeace.org/mexico/>. (Consultado 07-02-07).
- Pesticide Action Network UK. (2006). En línea: <http://www.pan-uk.org/About/index.htm>. (Consultado 18-10-07).
- TOXICOLOGIA AMBIENTAL. (2004). Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. University of Arizona. En línea: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c6-3-2-2.html>. (Consultado 20-11-07).

Anexo 1

Conteos totales de la exposición de *C. cucullus* a diferentes concentraciones de DDT y calculo probit. Se observa que conforme aumenta la concentración del DDT también aumenta la mortalidad de *C. cucullus*.

Tabla 1.- Muestra los resultados obtenidos a la concentración de 0.5 mg/mL de DDT

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	10	10	10
10	10	10	10	10
15	10	10	10	10
20	10	10	10	10
25	10	10	10	10
30	10	10	10	10
35	10	10	10	10
40	10	10	10	10
45	10	10	10	10
50	10	10	10	10
60	10	10	10	10
Mortandad		0	0	0
Mortan.				
Total			0	
Promedio			0	
Porcentaje			0	

Tabla 2. Resultados obtenidos a la concentración de 1.5 mg/mL de DDT

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	10	10	9
10	10	10	10	9
15	10	10	10	9
20	10	10	10	9
25	10	10	10	9
30	10	10	10	9
35	10	10	10	9
40	10	10	10	9
45	10	10	10	9
50	10	10	10	9
60	10	10	10	9
Mortandad		0	0	1
Mortan. Total			1	
Promedio			0.33	
Porcentaje			3.33	

Tabla 3.- Resultados obtenidos a la concentración de 2 mg/mL de DDT

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	9	10	10
10	10	9	9	10
15	10	9	8	10
20	10	8	8	5
25	10	7	6	5
30	10	7	5	5
35	10	7	5	3
40	10	7	5	3
45	10	7	5	3
50	10	5	5	3
60	10	4	4	3
Mortandad		6	6	7
Mortan. Total			19	
Promedio			6.33	
Porcentaje			63.33	

Tabla 3.- Resultados obtenidos a la concentración de 3 mg/mL de DDT

3 mg/mL

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	10	10	10
10	10	10	10	10
15	10	10	10	10
20	10	8	10	8
25	10	7	8	8
30	10	7	8	7
35	10	5	5	7
40	10	5	3	5
45	10	5	2	5
50	10	5	1	4
60	10	2	0	2
Mortandad		8	10	8
Mortan. Total			26	
Promedio			8.67	
Porcentaje			86.67	

Tabla 4.- Resultados obtenidos a la concentración de 4 mg/mL de DDT

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	10	8	9
10	10	10	8	6
15	10	10	8	6
20	10	8	7	5
25	10	5	5	3
30	10	2	2	3
35	10	2	2	2
40	10	2	0	2
45	10	0	0	0
50	10	0	0	0
60	10	0	0	0
Mortandad		10	10	10
Mortan. Total			30	
Promedio			10	
Porcentaje			100	

Tabla 5.- Resultados obtenidos a la concentración de 5 mg/mL de DDT

Tiempo	testigo	prueba 1	prueba 2	prueba 3
0	10	10	10	10
5	10	9	9	9
10	10	8	8	6
15	10	8	8	6
20	10	8	5	5
25	10	5	0	3
30	10	4	0	3
35	10	2	0	2
40	10	2	0	2
45	10	0	0	2
50	10	0	0	0
60	10	0	0	0
Mortandad		10	10	10
Mortan. Total			30	
Promedio			10	
Porcentaje			100	

Tabla 6.- Resultados con los análisis del cálculo del Probit

Concentración mg/L	Log 10 de la concentración	# organismos expuestos	Mortandad observada	% mortandad	Probit Empírico	Probit Calculado
	X	N	r	P	PE	Y
0.5	-0.30	10	0	0	0	
1	0.00	10	3	30	4.56	3.076
1.5	0.18	10	1	3.33	3.12	4
2	0.30	10	6.33	63.33	5.33	4.615
3	0.48	10	8.66	86.66	6.08	5.487
4	0.60	10	10	100	8.09	6.153
5	0.70	10	10	100	8.09	6.61

Para calcular la CL_{50} se utilizó la ecuación de la recta obtenida gráficamente de la siguiente manera:

CL_{50}

$$y = 9.8315 + 1.3138x$$

$$y = 5$$

$$y - 1.3138 = 9.8315x$$

$$x = (y - 1.3138) / 9.8315$$

$$x = (5 - 1.3138) / 9.8315$$

$$x = 0.3749$$

$$x = 2.370$$

Anexo 2

Tinción argéntica de Klein

- Primero colocar una gota del cultivo sobre un portaobjetos limpio, tratar de que la gota quede en el centro del mismo.
- Extender un poco la gota en el centro del portaobjetos, para propiciar la separación de los ciliados, y dejar secar a temperatura ambiente.
- Una vez seca la gota del cultivo, colocar sobre esta un par de gotas del colorante de nitrato de plata.
- Exponer al sol por 3 minutos y revisar bajo el microscopio óptico si las células se han teñido. Si se cuenta con una lámpara de luz ultravioleta se puede utilizar con las medidas de precaución adecuadas.
- Si las células se observan teñidas proceder a lavar el exceso de colorante al con agua corriente, usando una pipeta o agua de la llave. Este paso se debe de realizar con cuidado para no perder a los especímenes teñidos.
- Dejar secar la preparación y montar con bálsamo de Canadá, dejar secar y proceder a observar y tomar fotografías.
-

Anexo 3

Los productos derivados de este trabajo de investigación fueron:

- Castro-Ortíz L. P., Luna Pabello V. M. y Villalobos Pietrini R. 2007. **Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México (Revisión)**. Rev. Inter. Contam. Amb. 23 (1) 35-45.-
- Castro-Ortíz L. P., Luna Pabello V. M., García Calderón N. E., Rodríguez Zaragoza S. Flores Hernández J. L and Avila L. A. (2012). Toxicological effect of DDT in *Colpoda cucullus* and its potential application in forming environmental biosensor. **IRJM**. 3(4): 117-126.