

DDT in sediments from the northwest coast of Baja California (Mexico)  
and its biotransformation by *Vibrio* sp.

DDT en sedimentos de la costa noroccidental de Baja California (México)  
y su biotransformación por *Vibrio* sp.

MV Orozco-Borbón<sup>1\*</sup>, J de la Rosa-Vélez<sup>2‡</sup>, N Ramírez-Álvarez<sup>1</sup>, V Macías-Zamora<sup>1</sup>,  
EA Gutiérrez-Galindo<sup>1</sup>, A Muñoz-Barbosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, CP 22800, Baja California, México. \*E-mail: mvorozco@uabc.mx

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, CP 22800, Baja California, México.

### Abstract

During December 2003, sediment samples were collected at 20 stations along the northwest coast of Baja California (Mexico). Analyses of DDT were performed by gas chromatography, percentage of particles <63 µm in diameter, organic carbon, and sulphate-reducing bacteria. A bacterium from station 49, which showed the highest concentration of DDT and its metabolites DDE and DDD, was isolated and identified biochemically and molecularly to belong to the genus *Vibrio*. In the laboratory this bacterium was tested in minimal salts medium plus DDT and incubated at 28°C under aerobic and anaerobic conditions for 90 days. In general, the sediments showed low concentrations of DDT, ranging from undetected to 4.78 ng g<sup>-1</sup>, and the highest concentrations occurred at the deepest stations containing higher percentages of particles <63 µm and organic carbon concentrations. The isolated *Vibrio* strain showed an ability to biotransform DDT under aerobic and anaerobic conditions, presenting the *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD metabolites after 60 and 90 days of incubation in both conditions.

*Key words:* Baja California, biotransformation, DDT, marine bacteria, sediments.

### Resumen

Durante diciembre de 2003 se colectaron muestras de sedimento superficial en 20 estaciones de la costa noroccidental de Baja California (México). Se realizaron análisis de DDT por cromatografía de gases, porcentaje de partículas <63 µm de diámetro, carbono orgánico y bacterias reductoras de sulfato. De la estación 49, la cual mostró la mayor concentración de DDT y sus metabolitos DDE y DDD, se aisló una bacteria identificada bioquímica y molecularmente como del género *Vibrio*, misma que fue sometida a un bioensayo en el laboratorio, en medio de sales mínimas más DDT, e incubada a 28°C bajo condiciones aerobias y anaerobias durante 90 días. En general, los sedimentos mostraron bajas concentraciones de DDT, desde indetectables hasta 4.78 ng g<sup>-1</sup>, con tendencia a aumentar en las estaciones más profundas, las cuales contienen mayor porcentaje de partículas <63 µm y concentración de carbono orgánico. La cepa aislada mostró en el laboratorio la capacidad de biotransformar el DDT, detectándose la presencia de los metabolitos *o,p'*-DDE y *o,p'*-DDD a los 60 y 90 días de incubación en ambas condiciones.

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

### Introduction

DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl] ethane) is a highly persistent chemical compound in the environment (Iwata *et al.* 1994). Since 1948 it has been used worldwide to protect agricultural crops and control domestic pests. In the marine environment, however, it can cause alterations and have harmful effects on pelicans, sea lions, fish, and molluscs (De Long *et al.* 1973, Young *et al.* 1976, Tran and Zeng 1999).

In the Southern California Bight (SCB), the effluents of four major wastewater treatment plants are a known source of DDT: the Hyperion Treatment Plant operated by the City of Los Angeles, the Joint Water Pollution Control Plant operated by the Los Angeles County Sanitation District, Treatment Plant

### Introducción

El DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etano) es un compuesto químico altamente persistente en el ambiente (Iwata *et al.* 1994). Desde 1948 fue utilizado a nivel mundial para proteger los cultivos agrícolas, así como para controlar diversas plagas domésticas. Sin embargo, se ha demostrado que en el medio marino puede ocasionar alteraciones y efectos dañinos en pelicanos, lobos marinos, peces y moluscos (De Long *et al.* 1973, Young *et al.* 1976, Tran y Zeng 1999).

Unas de las fuentes conocidas de DDT en la Cuenca del Sur de California (CSC) son las cuatro principales plantas de tratamiento de aguas residuales en la zona: la Planta de Tratamiento de Hyperion, operada por la ciudad de Los Ángeles; la *Joint*

No. 2 operated by the Orange County Sanitation District, and the Point Loma Wastewater Treatment Plant operated by the City of San Diego. It has been estimated that between 1971 and 1996 these southern California plants discharged 41,301 kg of DDT below the thermocline (Raco-Rands 1999). On the Mexican side, there is no information regarding the input of DDT by the treatment plants operated by the cities of Tijuana and Ensenada in Baja California; however, Gutiérrez-Galindo *et al.* (1998) detected the presence of *p,p'*-DDT in marine sediments from this area.

Even though the input of DDT to the SCB has decreased three to four orders of magnitude (Zeng *et al.* 2001, Bay *et al.* 2003), a significant amount of this pollutant has accumulated in marine sediments. Approximately 71% of the SCB sediments contain DDT (Schiff *et al.* 2006), constituting a potential source of contamination and of bioaccumulation for the fauna associated with the sediment (Schiff and Allen 2000, Zeng and Tran 2002). Moreover, the DDT accumulated historically in sediments can be removed and dispersed to other areas. Models applied to the SCB have shown that DDT can be resuspended and transported by currents over long periods of time (Noble *et al.* 2001).

The reduced DDT concentrations in the SCB can be attributed to biodegradation. Bacteria are capable of biotransforming DDT, depending on the environmental conditions, into metabolites such as DDD (1,1-dichloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl] ethane), DDE (1,1-dichloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl] ethylene), and DDMU (1-chloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl] ethylene) (Quensen *et al.* 2001). It has also been found that in anaerobic media DDT is transformed to DDD by reductive dechlorination, while in aerobic media it is transformed by dehydrochlorination to DDE, which in turn can produce DDMU by reductive dechlorination under anaerobic conditions (Zeng and Venkatesan 1999).

Few surveys have been conducted on contamination by organochlorine compounds in marine sediments from the western US-Mexico border region and they have mainly focused on their spatiotemporal distribution (Gutiérrez-Galindo *et al.* 1998, Noblet *et al.* 2003). This study therefore aims to assess the role of bacteria in the biotransformation of DDT, by determining its spatial concentration in marine sediments from the northwest coast of Baja California (Mexico), as well as the capacity of *Vibrio* sp. to biotransform this pollutant under controlled laboratory conditions.

## Material and methods

### *Sediment collection*

Surface sediments were collected at 20 stations on the northwest coast of Baja California, Mexico (fig. 1), during an oceanographic cruise conducted in December 2003 aboard the Mexican naval vessel *Suchiata*. Sediments were collected with a Van-Veen grab, using sterile spatulas to remove the first 3 cm from the middle of the grab. The sediments destined for the

*Water Pollution Control Plant*, operada por el Distrito Sanitario del Condado de los Angeles; la Planta de Tratamiento No. 2, operada por el Distrito Sanitario del Condado de Orange; y la Planta de Tratamiento de Point Loma, bajo la responsabilidad de la ciudad de San Diego. Se estima que de 1971 a 1996 estas plantas del sur de California evacuaron, por debajo de la termocline, 41,301 kg de DDT (Raco-Rands 1999). Con respecto al lado mexicano se desconoce el aporte de las plantas de tratamiento de las ciudades de Tijuana y Ensenada, Baja California; sin embargo, Gutiérrez-Galindo *et al.* (1998) detectaron la presencia de *p,p'*-DDT en sedimentos marinos frente a estas localidades.

No obstante que la entrada de DDT a la CSC ha disminuido en tres a cuatro órdenes de magnitud (Zeng *et al.* 2001, Bay *et al.* 2003), se ha acumulado una cantidad significativa de este contaminante en sus sedimentos marinos. Aproximadamente 71% de los sedimentos de la CSC contienen DDT (Schiff *et al.* 2006), lo cual constituye una fuente potencial de contaminación y de bioacumulación para la fauna asociada al sedimento (Schiff y Allen 2000, Zeng y Tran 2002). Además, el DDT acumulado históricamente en los sedimentos puede llegar a ser removido y dispersado hacia otras áreas como lo demuestran los modelos aplicados a la CSC que indican que éste puede ser resuspendido y transportado por las corrientes durante largos periodos de tiempo (Noble *et al.* 2001).

La disminución de las concentraciones de DDT en la CSC se debe probablemente a su biodegradación. Se ha demostrado que las bacterias tienen la capacidad de biotransformar el DDT, dependiendo de las condiciones del medio, en metabolitos como el DDD (1,1-dicloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etano) DDE (1,1-dicloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etileno) y DDMU (1-cloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etileno) (Quensen *et al.* 2001). Por otro lado se ha encontrado que en medios anaerobios y por descloración reductiva el DDT es transformado en DDD, mientras que en medios aerobios y por deshidrocloración forma DDE, el cual a su vez, bajo condiciones anaerobias y por descloración reductiva puede producir DDMU (Zeng y Venkatesan 1999).

Existen pocos estudios de contaminación por compuestos organoclorados en los sedimentos marinos de la zona fronteriza noroccidental entre México y Estados Unidos y éstos se han enfocado mayormente a determinar su distribución espaciotemporal (Gutiérrez-Galindo *et al.* 1998, Noblet *et al.* 2003). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el papel de las bacterias en la biotransformación del DDT, para lo cual se determinó su concentración espacial en los sedimentos marinos de la costa noroccidental de Baja California (México), así como la capacidad de *Vibrio* sp. para biotransformar este contaminante bajo condiciones controladas de laboratorio.

## Materiales y métodos

### *Recolecta de sedimentos*

Se recolectaron sedimentos superficiales en 20 estaciones de la costa noroccidental de Baja California, México (fig. 1),

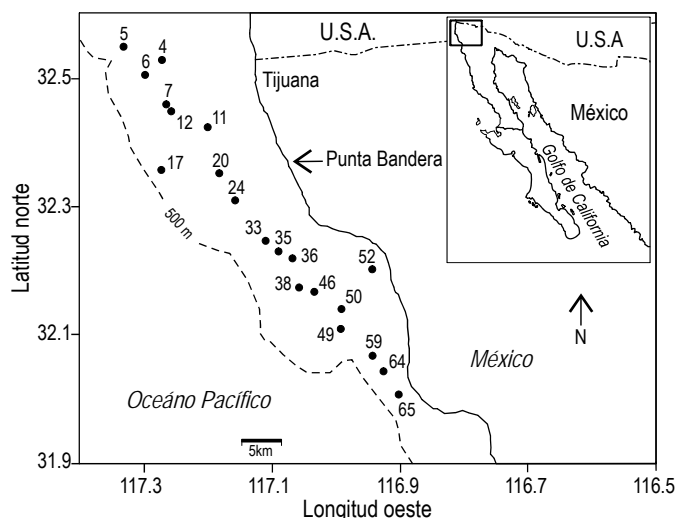


Figure 1. Distribution of the sediment sampling stations on the northwest coast of Baja California (Mexico).

Figura 1. Distribución de las estaciones de muestreo de sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California (México).

analysis of DDT, particle size, and organic carbon were stored in flasks previously decontaminated with pesticide-grade methanol and dichloromethane (heated at 400°C for 4 h) and stored at -20°C until their analysis in the laboratory. The samples used for the bacteriological analysis were placed in sterile plastic bags for their immediate analysis onboard.

#### DDT in sediments

Analysis of DDT was performed following the methodology proposed by Wade *et al.* (1992), with some modifications. For its extraction, 30 g of sediment (dry weight) were placed in a Soxhlet system with dichloromethane and the recovery standards 2,4,5,6,-tetrachloro-*m*-xylene (TCMX) and decachlorobiphenyl (PCB-209) at a concentration of 100 ng mL<sup>-1</sup>. The sample was extracted during 12 h and evaporated to 1 mL in a water bath at 55°C, rinsing the flask three times with dichloromethane. The sample was then transferred to a graduated tube for concentration to a volume of 1 mL with ultra high purity nitrogen and the solvent was replaced with hexane. The extract was separated by liquid chromatography. The fraction of the pesticides obtained was concentrated to 1 mL under a nitrogen flow. The internal standard (DBFBO) was added prior to injection into the gas chromatograph (HP-6890) equipped with an electron capture detector and autosampler. A DB-XLB fused silica capillary column was used (60 m length, 320 µm diameter, and 0.25 µm thickness). The oven temperature regime was as follows: initial temperature of 50–150°C (15°C min<sup>-1</sup>), followed by 250°C (2°C min<sup>-1</sup>), and final temperature of 300°C (5°C min<sup>-1</sup>), the latter maintained for 25 min. Total run time was 92.67 min, using helium as carrier gas at a constant pressure. The temperature of the injector was maintained at 275°C and that of the detector at 325°C. Quantification was made using the internal standard method, where:

en diciembre de 2003, en un crucero oceanográfico a bordo del buque *Suchiata* de la Secretaría de Marina. La colecta de sedimentos se efectuó con una draga Van-Veen, tomando con espátulas estériles los primeros 3 cm del centro de la draga. Los sedimentos para el análisis de DDT, tamaño de partícula y carbono orgánico fueron guardados en frascos de vidrio previamente descontaminados (con metanol y diclorometano grado pesticida, y quemados a 400°C durante 4 h) y almacenados a -20°C hasta su análisis en el laboratorio, mientras que los utilizados para el análisis bacteriológico se guardaron en bolsas de plástico estériles para ser analizados de inmediato a bordo del buque.

#### DDT en sedimentos

El DDT fue analizado mediante la metodología de Wade *et al.* (1992) con algunas modificaciones. Para su extracción se colocaron 30 g de sedimento seco en un sistema Soxhlet con diclorometano y los estándares de recuperación 2,4,5,6,-tetrachloro-*m*-xileno (TCMX) y decaclorobifenilo (PCB-209) a una concentración de 100 ng mL<sup>-1</sup>. La muestra se extrajo durante 12 h, posteriormente se evaporó hasta 1 mL en baño de agua a 55°C, enjuagando el matraz tres veces con diclorometano; la muestra resultante se transfirió a un tubo graduado para concentrar a un volumen de 1 mL con nitrógeno grado UAP y el solvente se intercambió por hexano. La separación y limpieza del extracto se hizo mediante cromatografía líquida, concentrando la fracción obtenida de los pesticidas a 1 mL bajo un flujo de nitrógeno. Se agregó el estándar interno (DBFBO) antes de inyectar la muestra al cromatógrafo de gases (GC, HP-6890) acoplado a un detector de captura de electrones (ECD), equipado con un automuestreador. Se utilizó una columna capilar de sílica fundida DB-XLB de 60 m de longitud, 320 µm de diámetro y 0.25 µm de espesor. El horno se operó con el programa de temperatura siguiente: inicio de 50°C a 150°C (15°C min<sup>-1</sup>), seguido de elevación a 250°C (2°C min<sup>-1</sup>) y llegó a una temperatura final de 300°C (5°C min<sup>-1</sup>), manteniéndose así durante 25 min. El tiempo total de la corrida fue de 92.67 min y se usó helio como gas transportador a una presión constante. La temperatura del inyector fue mantenida a 275°C y la del detector a 325°C. La cuantificación se realizó por el método del estándar interno donde:  $C = A (\text{área}_{\text{analito}} / \text{área}_{\text{est interno}})^B (C_{\text{est interno}} / \text{peso}_{\text{muestra}})$ .

El control de calidad se realizó mediante blancos de procedimiento y muestras fortificadas. En cada juego de 10 muestras se incluyó un blanco de procedimiento y una muestra fortificada, a los cuales se adicionó una mezcla de DDTs a una concentración conocida.

#### Características del sedimento

El análisis de la distribución del tamaño de partícula se realizó en alícuota de sedimento seco de acuerdo a la metodología descrita por Daesslé *et al.* (2002), utilizando un analizador láser/tungsteno de partículas (Horiba LA-900) el cual mide el

$$C = A (\text{area}_{\text{analyte}} / \text{area}_{\text{surrogate standard}})^B (C_{\text{internal standard}} / \text{weight}_{\text{sample}}).$$

Quality was controlled using procedural blanks and fortified samples. In each set of ten samples, one blank and one fortified sample were included, to which a surrogate and recovery standard were added.

### *Sediment characteristics*

Particle size distribution analysis was performed on a dry sediment aliquot according to the methodology described by Daesslé *et al.* (2002), using a Horiba LA-900 laser scattering particle size analyzer, which measures particle sizes ranging from 0.04 to 2000  $\mu\text{m}$ . Organic carbon was determined using a LECO CNHS-932 elemental analyzer. Prior to this analysis, the sediments were defrosted and oven-dried at 40°C. Aliquots from each sample were treated with HCl 6N to remove the inorganic carbon, and then dried at 80°C, weighed, and placed in containers to determine the organic carbon content.

### *Bacteria in sediments*

For the isolation of bacteria, 0.1 g of sediment was inoculated onto 10 mL of Zobell medium and incubated at 28°C for 48 h. Grown bacteria were then isolated in Luria-Bertani agar medium. As station 49 showed the highest concentration of  $\Sigma\text{DDT}$ , four bacteria from this site were isolated. They were grown in minimal salts medium with different concentrations of DDT (10–800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The bacterium that presented greatest growth was identified and tested in minimal salts medium plus DDT. Sulphate-reducing bacteria (SRB) were quantified using the most probable number (MPN) technique described by Greeson *et al.* (1977).

### *Identification of isolated bacteria*

To identify the bacterial strain showing greatest growth that was isolated from station 49 sediments, the following tests were performed: Gram staining, capsule, mobility, growth in NaCl (0%, 3%, and 6%), growth in TCBS medium, O/F glucose, catalase, oxidase, arginine dihydrolase, indol, gelatin, and urea, according to the methodology proposed by the Secretaría de Salud (1992). The results were compared with the diagnostic table in Austin (1990).

Molecular identification was performed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The methodology described by García-Ortega (1997), with modifications, was used for DNA extraction, PCR amplification, and restriction analysis. Amplification of 16S rDNA was performed using the primers 16S F, 5'-CCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', and 16S R, 5'-CGGGATCCACCTTGTACGACTTCACCC-3'. The reaction volume was 50  $\mu\text{L}$ , with the following components: 38.9  $\mu\text{L}$  sterile deionized water, 5  $\mu\text{L}$  PCR buffer (10 $\times$ ), 1  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM), 0.1  $\mu\text{L}$  *Taq* polymerase (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  DNA (200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  primer

tamaño de partícula en el intervalo de 0.04–2000  $\mu\text{m}$ . La medición de carbono orgánico se realizó con un analizador elemental LECO-CNHS 932. Antes de este análisis, los sedimentos fueron descongelados y secados en una estufa a 40°C. Se trataron alícuotas de cada muestra con HCl 6N para eliminar el carbono inorgánico; posteriormente se secaron a 80°C, se pesaron y se colocaron en contenedores para determinar el contenido de carbono orgánico.

### *Bacterias en sedimentos*

Para el aislamiento de las bacterias, se inoculó 0.1 g de sedimento en 10 mL de medio Zobell, y se incubó a 28°C durante 48 h. Posteriormente las bacterias desarrolladas se aislaron en medio Agar Luria Bertani. De la estación 49, que presentó la mayor concentración de  $\Sigma\text{DDT}$ , se aislaron cuatro bacterias, las cuales se cultivaron en medio de sales mínimas con diferentes concentraciones de DDT (10–800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Finalmente se identificó la bacteria que presentó mayor crecimiento, y se cultivó en el medio de sales mínimas y DDT. La cuantificación de bacterias reductoras de sulfato (BRS) se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP) descrita por Greeson *et al.* (1977).

### *Identificación de la bacteria aislada*

Para identificar a la cepa bacteriana de mayor crecimiento aislada de los sedimentos de la estación 49, se realizaron las pruebas siguientes: tinción de Gram, cápsula, movilidad, crecimiento en 0%, 3% y 6% de NaCl, crecimiento en TCBS, O/F glucosa, catalasa, oxidasa, arginina dihidrolasa, indol, gelatina y urea según la metodología de la Secretaría de Salud (1992) y se compararon con la tabla de diagnóstico de Austin (1990).

Para la identificación molecular se realizó una reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP). La extracción del ADN, la amplificación por PCR y el análisis de restricción se realizaron según metodología descrita por García-Ortega (1997) con modificaciones. La amplificación del 16S ADN<sub>r</sub> se efectuó con los iniciadores 16S F, 5'-CCGTCGACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', y 16S R, 5'-CGGGATCCACCTTGTACGACTTCACCC-3'. El volumen de la reacción fue de 50  $\mu\text{L}$ , con los componentes siguientes: 38.9  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de PCR (10 $\times$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 0.1  $\mu\text{L}$  de *Taq* polimerasa (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2.5  $\mu\text{L}$  de ADN (200 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de iniciador 16S Forward (224 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), y 0.5  $\mu\text{L}$  de iniciador 16S Reverse (148 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

La reacción se realizó con un termociclador Apollo (Continental Lab Products) con las condiciones siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 10 min, seguido por 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineamiento a 55°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 2 min, seguidos por un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 min.

16S Forward (224 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ), and 0.5  $\mu\text{L}$  primer 16S Reverse (148 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ).

The reaction was performed using an Apollo thermal cycler (Continental Lab Products) under the following conditions: an initial denaturalization cycle at 95°C for 10 min, followed by 25 denaturalization cycles at 95°C for 1 min, alignment at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min, followed by a final extension cycle at 72°C for 10 min.

The PCR product was detected by 1.2% agarose gel electrophoresis using 1X TBE buffer: 5  $\mu\text{L}$  of the sample were loaded onto the gel and electrophorized at 100 V for 40 min. The PCR amplified product was digested by the *BstU* I enzyme. The reaction volume was 40  $\mu\text{L}$  with the following components: 25.4  $\mu\text{L}$  sterile deionized water, 4  $\mu\text{L}$  enzyme buffer (10 $\times$ ), 10  $\mu\text{L}$  PCR-16S rDNA product, and 0.6  $\mu\text{L}$  *BstU* I. The mixture was placed in a 0.5-mL tube, incubated at 60°C for 6 h, and cooled in an ice bath for 5 min, adding 8  $\mu\text{L}$  of 5 $\times$  dye. The generated fragments were observed by 2.2% agarose electrophoresis at 100 V for 90 min, and compared using a 100–2072 pb molecular weight marker (Invitrogen) and a *Vibrio harveyi* standard.

#### *Bioassay of DDT degradation using the isolated Vibrio strain*

For this bioassay, 150 mg of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis[*p*-chlorophenyl] ethane) (99%) (Sigma-Aldrich) were dissolved in 10 mL of acetone and evaporated to form crystals, adding 1 L of a culture of *Vibrio* sp. (isolated from station 49 sediments), in exponential phase, cultivated in a minimal salts medium plus 0.005% yeast extract. The medium, containing 4.0 g  $\text{NaNO}_3$ , 1.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 g  $\text{FeCl}_3$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.01 g  $\text{CaCl}_2$ , and 0.5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 1 L distilled water (pH 7.0), was sterilized by autoclave at 121°C and 1.05 kg  $\text{cm}^{-2}$  for 15 min. The same procedure was followed for the abiotic control (minimal salts medium plus DDT without bacteria).

The *Vibrio* culture and abiotic controls were incubated under anaerobic and aerobic conditions at 28°C for 90 days (150 rpm agitation), and the presence of the DDT metabolites was determined according to Nadeau *et al.* (1994). At different time intervals (each 30 days), a 10-mL aliquote was taken from each system and acidified with HCl 1 N to pH 3. After adjusting the pH, aliquots were centrifuged at 14,000  $g$  for 15 min and the supernatant was transferred to a separation funnel for extraction with an equal volume of dichloromethane plus 250  $\mu\text{L}$  of the TCMX and PCB-209 recovery standards at a concentration of 400 ng  $\text{mL}^{-1}$ . The product of three extractions was placed in a round-bottom flask and evaporated to approximately 0.5 mL in a water bath. The amount obtained was transferred to a graduated tube, replacing the solvent by hexane (pesticide grade), which was concentrated with  $\text{N}_2$ . The internal standard (DBFBO) was added before being injected into the gas chromatograph. The chromatogram showing the retention times of the standards *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-

La detección del producto de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1.2%) utilizando amortiguador TBE 1X, se cargaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en el gel y se aplicó una carga de 100 V durante 40 min. El producto amplificado por PCR fue digerido con la enzima *BstU* I, con un volumen de reacción de 40  $\mu\text{L}$  con los componentes siguientes: 25.4  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 4  $\mu\text{L}$  de amortiguador para enzima (10 $\times$ ), 10  $\mu\text{L}$  de producto PCR-16S ADN<sub>r</sub>, y 0.6  $\mu\text{L}$  de enzima *BstU* I. La mezcla fue colocada en un tubo de 0.5 mL y se incubó a 60°C por 6 h; se enfrió en baño de hielo durante 5 min y se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de colorante 5 $\times$ . Posteriormente, para observar los fragmentos generados se realizó una electroforesis en agarosa al 2.2% a 100 V por 90 min, y se compararon con un marcador de peso molecular de 100–2072 pb (Invitrogen) y un estándar de *Vibrio harveyi*.

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

Se disolvieron 150 mg de DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis[*p*-clorofenil] etano) (99%) (Sigma-Aldrich) en 10 mL de acetona, que se evaporaron para formar cristales y se agregó 1 L de un cultivo de *Vibrio* sp. desarrollado en un medio de sales mínimas más 0.005% de extracto de levadura, aislado de los sedimentos de la estación 49, en su fase exponencial. El medio de cultivo, que contenía 4.0 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 g de  $\text{FeCl}_3$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0.01 g de  $\text{CaCl}_2$  y 0.5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 1 L de agua destilada (pH 7.0), se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.05 kg  $\text{cm}^{-2}$  durante 15 min. Se procedió de la misma manera con el control abiótico (medio de sales mínimas más DDT sin bacterias).

El cultivo del *Vibrio* y sus controles abióticos se incubaron en condiciones anaerobias y aerobias a 28°C, durante 90 días (agitación a 150 rpm) y se analizó la presencia de los metabolitos del DDT siguiendo la metodología de Nadeau *et al.* (1994). A diferentes intervalos de tiempo (cada 30 días) se tomó una alícuota de 10 mL de cada sistema y se acidificó con HCl 1 N para obtener un pH de 3. Una vez ajustado el pH, las alícuotas se centrifugaron a 14,000  $g$  durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un embudo de separación para su extracción con un volumen igual de diclorometano más 250  $\mu\text{L}$  del estándar de recuperación 2,4,5,6-tetracloro-*m*-xileno (TCMX) y decaclorobifenilo (PCB-209) a una concentración de 400 ng  $\text{mL}^{-1}$ . El producto de tres extracciones se colocó en un matraz bola y se evaporó aproximadamente a 0.5 mL en baño de agua, la cantidad obtenida se transfirió a un tubo graduado intercambiando el solvente por hexano (grado pesticida), el cual fue concentrado con  $\text{N}_2$ . Antes de ser inyectado al cromatógrafo de gases se le agregó el estándar interno (DBFBO). El cromatograma que muestra los tiempos de retención de los estándares *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDT y *o,p'*-DDT (fig. 2), sirvió de referencia para la identificación del DDT y sus metabolitos en el bioensayo.

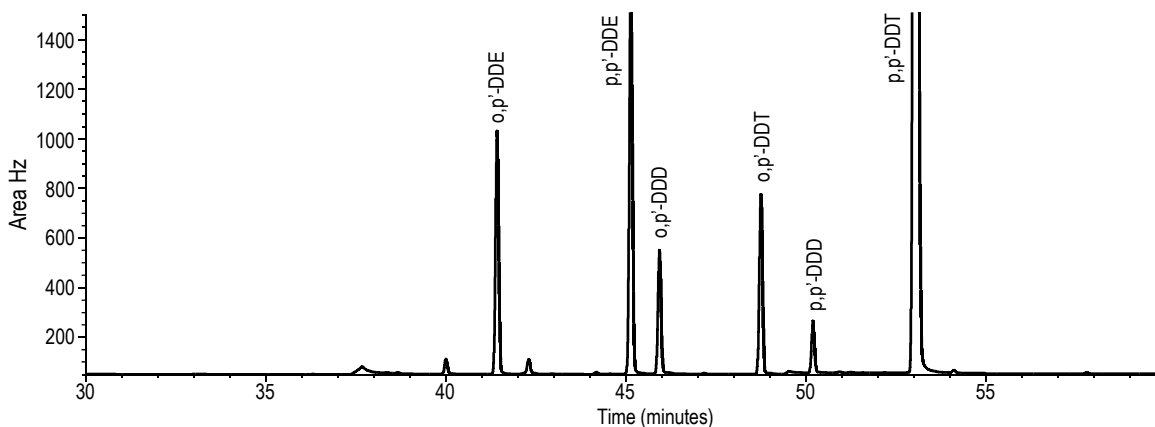


Figure 2. Chromatogram of the retention times of the standards used.

Figura 2. Cromatograma de tiempos de retención de los estándares empleados

DDD, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDT, and *o,p'*-DDT (fig. 2) served as reference for the identification of DDT and its metabolites.

### Statistical analysis

Prior to the statistical analysis using Statistica software (version 6.0), data were  $\log_{10}$ -transformed. Correlation analyses were conducted using Pearson's product momentum to determine the possible associations among the different variables measured ( $\Sigma$ DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, percentage of particles <63  $\mu\text{m}$ , percentage of organic carbon, and SRB). To identify the degree of similarity among the spatial distributions of the variables measured, hierarchical clustering was applied. Furthermore, to examine the covariance of the variables, a factor analysis was performed.

### Results

Mean concentration of  $\Sigma$ DDT was  $0.425 \text{ ng g}^{-1}$ , with a maximum value of  $4.78 \text{ ng g}^{-1}$  at station 49. The metabolites *p,p'*-DDT and *p,p'*-DDD showed the highest frequency, occurring at half of the sampling stations. In contrast, *p,p'*-DDE occurred at the least number of stations but showed the highest concentrations,  $3.91$  and  $0.79 \text{ ng g}^{-1}$ , at stations 49 and 17, respectively (table 1); *o,p'*-DDE was detected at stations 24 ( $0.01 \text{ ng g}^{-1}$ ) and 49 ( $0.25 \text{ ng g}^{-1}$ ), while *o,p'*-DDT was found only at station 49 ( $0.05 \text{ ng g}^{-1}$ ). None of the compounds analyzed was detected at station 36.

Mean percentage of organic carbon in marine sediments from the northwest coast of Baja California was  $0.65\%$ , with a maximum value of  $1.74\%$  at station 64 and minimum value of  $0.03\%$  at station 4 (table 2). Mean percentage of particles <63  $\mu\text{m}$  in diameter was  $46\%$ , ranging from a minimum of  $4.6\%$  at station 7 to a maximum of  $78.0\%$  at station 38. Mean concentration of SRB was  $49 \text{ MPN } 100 \text{ g}^{-1}$ , with a maximum value of  $140 \text{ MPN } 100 \text{ g}^{-1}$  at station 59 and minimum values of  $<18 \text{ MPN } 100 \text{ g}^{-1}$  at stations 4, 7, 11, 36, and 65.

### Análisis estadísticos

Antes de realizar el análisis estadístico con el programa Statistica versión 6.0, se transformaron los datos al  $\log_{10}$  de la concentración. Se realizaron análisis de correlación producto-momento de Pearson para buscar las posibles asociaciones entre las diferentes variables medidas ( $\Sigma$ DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, % de partículas <63  $\mu\text{m}$ , % de carbono orgánico y BRS). Para identificar el grado de similitud entre distribuciones espaciales de las variables medidas se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (*Hierarchical clustering*). Adicionalmente, para explorar la covariancia de las variables se realizó un análisis de factores.

### Resultados

El promedio de la concentración de  $\Sigma$ DDT fue  $0.425 \text{ ng g}^{-1}$  con un valor máximo de  $4.78 \text{ ng g}^{-1}$  en la estación 49. El *p,p'*-DDT y el *p,p'*-DDD mostraron la mayor frecuencia, ya que se encontraron en la mitad de las estaciones de muestreo. En contraste el *p,p'*-DDE, que se presentó en menor número de estaciones, mostró sus mayores concentraciones en las estaciones 49 y 17, con valores de  $3.91$  y  $0.79 \text{ ng g}^{-1}$  respectivamente (tabla 1). El *o,p'*-DDE se encontró en las estaciones 24 ( $0.01 \text{ ng g}^{-1}$ ) y 49 ( $0.25 \text{ ng g}^{-1}$ ), mientras que el *o,p'*-DDT sólo se encontró en la 49 ( $0.05 \text{ ng g}^{-1}$ ). Cabe destacar que en la estación 36 no se detectó ninguno de los compuestos analizados.

El promedio del porcentaje de carbono orgánico en los sedimentos costeros de la costa noroccidental de Baja California fue de  $0.65\%$ , con un valor máximo de  $1.74\%$  en la estación 64 y un valor mínimo de  $0.03\%$  en la estación 4 (tabla 2). El porcentaje medio de partículas <63  $\mu\text{m}$  de diámetro fue de  $46\%$ , y varió entre un mínimo de  $4.6\%$  y un máximo de  $78.0\%$ , en las estaciones 7 y 38 respectivamente. Con respecto a las BRS su concentración media fue de  $49 \text{ NMP } 100 \text{ g}^{-1}$ , con un valor máximo de  $140 \text{ NMP } 100 \text{ g}^{-1}$  en la estación 59 y valores mínimos  $<18 \text{ NMP } 100 \text{ g}^{-1}$  en las estaciones 4, 7, 11, 36 y 65.

Table 1. Concentration of DDT (ng g<sup>-1</sup>) in surface sediments from the northwest coast of Baja California. ND = not detected.

Tabla 1. Concentración de DDT (ng g<sup>-1</sup>) en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California. ND = no detectado.

Station	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDD	ΣDDT
4	ND	0.07	ND	ND	0.07
5	ND	ND	0.03	ND	0.03
6	ND	0.10	0.10	ND	0.20
7	ND	0.01	ND	ND	0.01
11	0.02	ND	ND	ND	0.02
12	ND	ND	0.07	0.01	0.08
17	0.79	0.30	ND	ND	1.09
20	ND	0.07	ND	ND	0.07
24	ND	ND	ND	ND	0.01
33	ND	0.37	0.07	ND	0.44
35	ND	0.22	ND	0.01	0.23
38	ND	ND	0.18	0.06	0.24
46	ND	0.08	ND	0.01	0.09
49	3.91	0.30	0.18	0.09	4.78
50	ND	ND	0.02	ND	0.02
52	ND	ND	0.04	0.01	0.05
59	ND	ND	0.19	0.05	0.24
64	ND	ND	0.04	0.01	0.05
65	0.71	0.07	ND	ND	0.78
Detection limit	0.004	0.007	0.007	0.007	–

The results showed that *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT correlated significantly ( $P < 0.05$ ) with the percentage of particles <63 μm ( $r = 0.98$  and  $0.90$ , respectively; table 3). A significant ( $P < 0.05$ ) correlation was also observed between *p,p'*-DDE and the percentage of organic carbon ( $r = 0.99$ ), and between *p,p'*-DDD and *o,p'*-DDD with SRB ( $r = 0.75$ ).

The correlation analysis of ΣDDT, percentage of particles <63 μm, percentage of organic carbon, and SRB in the sediment samples (table 4) indicated that ΣDDT correlated

Table 2. Concentration of organic carbon, particles <63 μm in diameter, and sulphate-reducing bacteria (SRB) in surface sediments from the northwest coast of Baja California.

Tabla 2. Concentración de carbono orgánico, partículas <63 μm y bacterias reductoras de sulfato (SRB) en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California.

Station	Organic carbon (%)	Particles <63μm (%)	SRB (MPN 100 g <sup>-1</sup> )
4	0.03	27.2	<18
5	0.81	41.3	45
6	0.99	60.3	78
7	0.11	4.6	<18
11	0.05	24.2	<18
12	0.12	15.8	78
17	0.59	59.0	18
20	0.24	21.9	18
24	0.17	9.7	18
33	1.23	76.7	40
35	0.47	57.0	20
36	0.83	64.8	<18
38	0.53	78.0	130
46	0.50	59.7	20
49	1.71	72.9	110
50	0.55	56.8	68
52	0.08	20.4	68
59	1.51	69.9	140
64	1.74	63.9	45
65	0.74	45.5	<18

Los resultados muestran que el *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDT se correlacionaron significativamente ( $P < 0.05$ ) con el porcentaje de las partículas <63 μm ( $r = 0.98$  y  $0.90$ , respectivamente; tabla 3). Por otra parte, el *p,p'*-DDE se correlacionó significativamente ( $P < 0.05$ ) con el porcentaje de carbono orgánico ( $r = 0.99$ ), y los metabolitos *p,p'*-DDD y *o,p'*-DDD lo hicieron con las BRS ( $r = 0.75$ ).

Table 3. Pearson product-moment correlation matrix of variables measured in surface sediments from the northwest coast of Baja California. SRB = sulphate-reducing bacteria.

Tabla 3. Matriz de correlación producto-momento de Pearson entre las variables medidas en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California. SRB = bacterias reductoras de sulfato.

	Particles <63 μm (%)	Organic carbon (%)	SRB	Number of data
<i>p,p'</i> -DDE	0.98*	0.99*	0.72	4
<i>p,p'</i> -DDT	0.90*	0.63	0.57	10
<i>p,p'</i> -DDD	0.37	0.30	0.75*	10
<i>o,p'</i> -DDD	0.57	0.54	0.75*	8

\* Significant ( $P < 0.05$ )

Table 4. Pearson product-moment correlation matrix of variables measured in surface sediments from the northwest coast of Baja California. SRB = sulphate-reducing bacteria ( $n = 19$ ).

Tabla 4. Matriz de correlación producto-momento de Pearson entre las variables medidas en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California. SRB = bacterias reductoras de sulfato ( $n = 19$ ).

	$\Sigma$ DDT	Particles <63 $\mu\text{m}$ (%)	Organic carbon (%)	SRB
$\Sigma$ DDT	1			
Particles <63 $\mu\text{m}$ (%)	0.66*	1		
Organic carbon (%)	0.56*	0.72*	1	
SRB	0.29	0.47	0.52*	1

\* Significant ( $P < 0.05$ )

significantly ( $P < 0.05$ ) and positively with the percentage of particles <63  $\mu\text{m}$  and organic carbon ( $r = 0.66, 0.56$ ). A significant positive correlation was also observed between SRB and percentage of organic carbon ( $r = 0.52$ ). On the other hand, the similarity dendrogram (fig. 3) clearly shows that the distribution of  $p,p'$ -DDD and  $o,p'$ -DDD in the study area is strongly related to the concentration of SRB and that  $\Sigma$ DDT is primarily associated with its metabolites and SRB.

The variables studied in terms of two factors explained 92% of the variance of their behaviour (table 5). Factor 1 represents the association between  $\Sigma$ DDT, its metabolites  $p,p'$ -DDD and  $o,p'$ -DDD, and SRB. Factor 2 shows the association between the percentage of organic carbon and of particles <63  $\mu\text{m}$ .

The bacterium isolated from station 49 sediments was Gram negative, mobile, capsuleless, and showed growth in

El análisis de correlación entre las variables  $\Sigma$ DDT, porcentaje de partículas <63  $\mu\text{m}$ , carbono orgánico (%) y BRS en las muestras de sedimento (tabla 4), señala que  $\Sigma$ DDT se correlacionó significativamente ( $P < 0.05$ ) y de manera positiva con el porcentaje de partículas <63  $\mu\text{m}$  y con el porcentaje de carbono orgánico ( $r = 0.66, 0.56$ ). Con respecto a las BRS el análisis muestra una correlación significativa y también positiva con el porcentaje de carbono orgánico ( $r = 0.52$ ). Por otra parte, el dendrograma de similitud (fig. 3) muestra claramente que las distribuciones del  $p,p'$ -DDD y  $o,p'$ -DDD en el área de estudio se encuentran fuertemente asociadas con la concentración de BRS y que  $\Sigma$ DDT se asocia mayormente a sus metabolitos y a las BRS.

Las variables estudiadas en función de dos factores explican 92% de la varianza del comportamiento de las variables (tabla 5). El factor 1 representa la asociación entre  $\Sigma$ DDT, sus

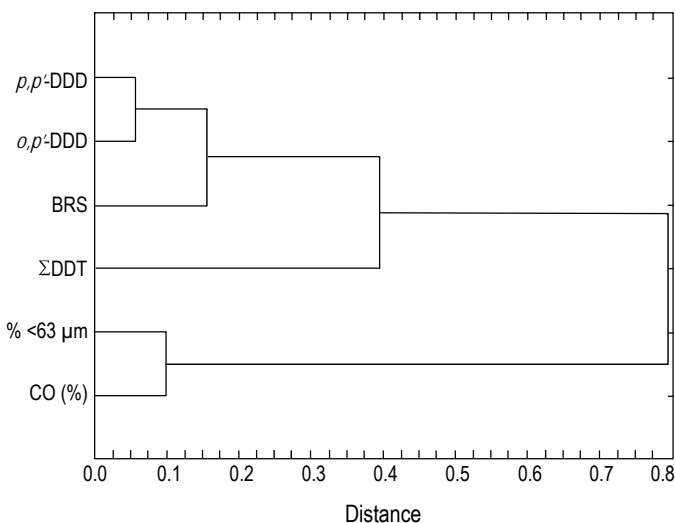


Figure 3. Cluster analysis:  $p,p'$ -DDD,  $o,p'$ -DDD,  $\Sigma$ DDT, sulphate-reducing bacteria (SRB), percentage of particles <63  $\mu\text{m}$  in diameter, and percentage of organic carbon in surface sediments from the northwest coast of Baja California.

Figura 3. Análisis de agrupamiento del  $p,p'$ -DDD,  $o,p'$ -DDD,  $\Sigma$ DDT, las bacterias reductoras de sulfato, el porcentaje de partículas <63  $\mu\text{m}$  y el porcentaje de carbono orgánico en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California.

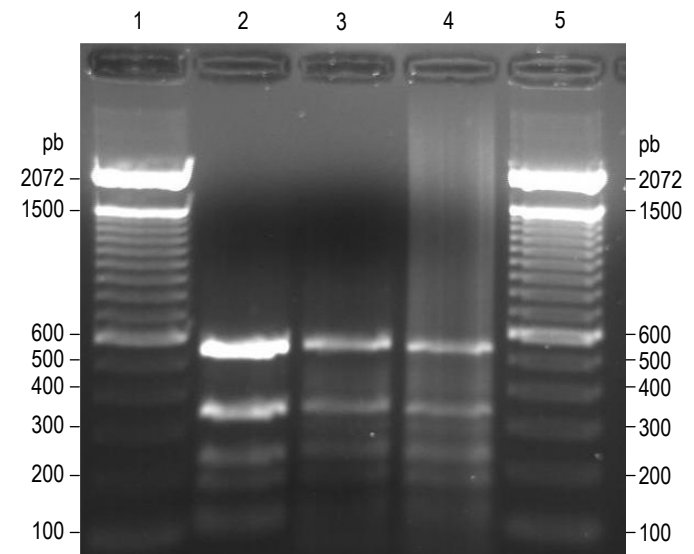


Figure 4. Molecular identification (PCR-RFLP) of the bacterium isolated from station 49 sediments. Lanes: (1 and 5) 100–2072 pb molecular weight marker (Invitrogen), (2) *Vibrio harveyi*, and (3 and 4) station 49 *Vibrio* sp.

Figura 4. Identificación molecular por PCR-RFLP de la bacteria aislada del sedimento superficial de la estación 49. Carriles: (1 y 5) marcador de peso molecular 100–2072 pb (Invitrogen), (2) *Vibrio harveyi*, y (3 y 4) *Vibrio* sp. de la estación 49.



Table 5. Factor analysis of variables measured in surface sediments from the northwest coast of Baja California. SRB = sulphate-reducing bacteria ( $n = 19$ ).

Tabla 5. Análisis de factores de las variables medidas en sedimentos superficiales de la costa noroccidental de Baja California. SRB = bacterias reductoras de sulfato ( $n = 19$ ).

	Factor 1	Factor 2
<i>p,p'</i> -DDD	0.93*	0.32
<i>o,p'</i> -DDD	0.87*	0.48
ΣDDT	0.74*	0.42
Particles <63 μm (%)	0.34	0.90*
Organic carbon (%)	0.16	0.97*
SRB	0.97*	0.03
Explained variance	3.24	2.27
Proportion of explained variance	0.54	0.38

\* Significant ( $P < 0.05$ )

TCB medium and in 3% and 6% NaCl. The most relevant results from the biochemical tests indicate that it is oxidase negative and catalase positive. It showed the same restriction fragment pattern (104, 125, 182, 228, 340, and 550 pb) as the control strain *Vibrio harveyi*, and was thus classified as belonging to the genus *Vibrio* (fig. 4).

During the initial time of the bioassay using *Vibrio* sp., four peaks were detected at retention times of 53.04, 50.19, 48.75, and 45.14 min, corresponding to the metabolites *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, and *p,p'*-DDE, respectively (fig. 5a). The highest peak corresponded to *p,p'*-DDT and the lowest to *p,p'*-DDD. After 60 and 90 days of incubation (fig. 5b, c), two other peaks, in addition to those mentioned, were detected at retention times of 41.40 and 45.93 min, corresponding to *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD, respectively; an increase in the peak corresponding to *p,p'*-DDE was also detected. The percent recovery of the internal standard was  $101\% \pm 5$ .

The experiment using *Vibrio* sp. in minimal salts medium plus DDT under anaerobic conditions (fig. 6) presented a similar behaviour to that observed in the aerobic assay. During the initial time four peaks were observed at retention times of 53.04, 50.19, 48.75, and 45.14 min, corresponding to *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, and *p,p'*-DDE, respectively (fig. 6a). The highest peak also corresponded to *p,p'*-DDT, while the smallest corresponded to *p,p'*-DDD. After 60 and 90 days of incubation (fig. 6b, c) two important peaks were observed at retention times of 41.40 and 45.93 min, corresponding to *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD, respectively. The percent recovery of the internal standard was also  $101\% \pm 5$ .

## Discussion

The DDT concentrations found in the marine sediments analyzed from the northwest coast of Baja California are low ( $0.01\text{--}4.78 \text{ ng g}^{-1}$ ) in comparison with those reported for other

metabolites *p,p'*-DDD and *o,p'*-DDD, y las BRS. Por otro lado, el factor 2 muestra la asociación entre el porcentaje de carbono orgánico y el porcentaje de partículas <63 μm.

La bacteria aislada en los sedimentos de la estación 49 es Gram negativa, móvil, sin cápsula, con crecimiento en el medio TCBS, y con 3% y 6% de NaCl. Los resultados más relevantes de las pruebas bioquímicas indican que es oxidasa negativa y catalasa positiva; además, presentó el mismo patrón de fragmentos de restricción (104, 125, 182, 228, 340 y 550 pb) que la cepa control *Vibrio harveyi* (fig. 4), por lo que se clasificó como del género *Vibrio*.

Cerca del inicio del bioensayo con *Vibrio* sp. se detectaron cuatro señales a los 53.04, 50.19, 48.75 y 45.14 min de retención, que corresponden a los metabolitos *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT y *p,p'*-DDE, respectivamente (fig. 5a). La mayor señal correspondió al *p,p'*-DDT mientras que la menor correspondió al *p,p'*-DDD. A los 60 y 90 días de incubación (fig. 5b, c) se detectaron, además de las anteriormente mencionadas, una señal a los 41.40 min de retención, que corresponde al *o,p'*-DDE y otra a los 45.93 min de retención correspondiente al *o,p'*-DDD, detectándose además un incremento en la señal del *p,p'*-DDE. El porcentaje de recuperación del estándar interno fue de  $101\% \pm 5$ .

El experimento realizado con *Vibrio* sp. en el medio de sales mínimas más DDT bajo condiciones anaerobias (fig. 6) presentó un comportamiento similar al aerobio. Al inicio del experimento se encontraron cuatro señales a los 53.04, 50.19, 48.75 y 45.14 min de retención, correspondientes a los metabolitos *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT, y *p,p'*-DDE, respectivamente (fig. 6a). La mayor señal también correspondió al *p,p'*-DDT, mientras que la menor correspondió al *p,p'*-DDD. A los 60 y 90 días de incubación (fig. 6b, c) se encontraron dos señales importantes, una a los 41.40 min de retención, que corresponde al *o,p'*-DDE, y otra a los 45.93 min de retención correspondiente al *o,p'*-DDD. El porcentaje de recuperación del estándar interno fue igualmente de  $101\% \pm 5$ .

## Discusión

Las concentraciones de DDT encontradas en los sedimentos marinos analizados de la zona costera noroccidental de Baja California, frontera entre México y Estados Unidos, son bajas ( $0.01\text{--}4.78 \text{ ng g}^{-1}$ ) en comparación con otras reportadas para la misma región del sur de California, como las de Palos Verdes y las bahías de Santa Mónica y San Diego, donde se han detectado hasta  $2500 \text{ ng g}^{-1}$  (Schiff *et al.* 2000, Bay *et al.* 2003), y con las detectadas en otras partes del mundo como la Bahía de Cádiz, en España, en donde se han reportado  $63 \text{ ng g}^{-1}$  de DDT (Lara-Martín *et al.* 2005); sin embargo, son similares a las reportadas por Gutiérrez-Galindo *et al.* (1998;  $0.07\text{--}4.7 \text{ ng g}^{-1}$ ) y Noblet *et al.* (2003;  $0.73 \text{ ng g}^{-1}$ ) para la misma zona de estudio.

Las bajas concentraciones de ΣDDT detectadas en este trabajo podrían ser atribuidas tanto a aportes recientes como de años anteriores. En Estados Unidos, en los años setenta se

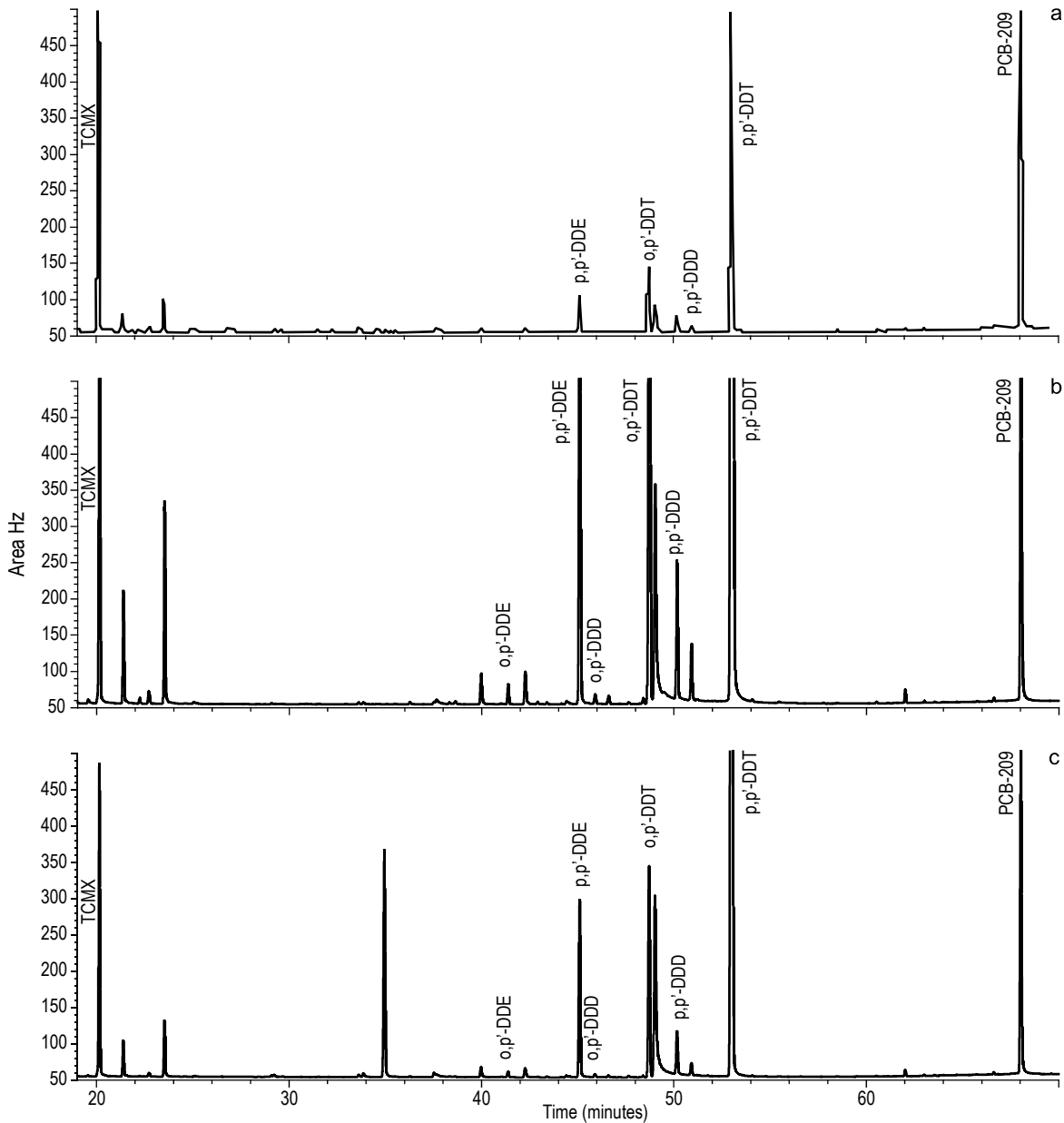


Figure 5. Chromatograms of DDT in the bioassay using *Vibrio* sp. in an aerobic medium: (a) initial incubation time, (b) 60 days of incubation, and (c) 90 days of incubation.

Figura 5. Cromatogramas del DDT en el bioensayo con *Vibrio* sp. en medio aerobio (a) Tiempo inicial de incubación (b) 60 días de incubación y (c) 90 días de incubación.

sites in southern California, such as Palos Verdes and the Santa Monica and San Diego bays, where concentrations of up to 2500 ng g<sup>-1</sup> have been recorded (Schiff *et al.* 2000, Bay *et al.* 2003); however, they are similar to those reported by Gutiérrez-Galindo *et al.* (1998; 0.07–4.7 ng g<sup>-1</sup>) and Noblet *et al.* (2003; 0.73 ng g<sup>-1</sup>) for the same study area. They are also low in comparison with those detected in other parts of the world, such as Cádiz Bay (Spain), where DDT concentrations of 63 ng g<sup>-1</sup> have been recorded (Lara-Martín *et al.* 2005).

The concentrations of ΣDDT detected in this study can be attributed to inputs from recent and previous years. In the

prohibió el uso de DDT para fines agrícolas, pero no fue sino hasta 1989 que se prohibieron sus usos permitidos sanitario y militares. En México su uso empezó a disminuir en respuesta a inquietudes ambientales, y para 1997 sólo era utilizado para el control del paludismo. A partir del año 2000 México dejó de utilizar y producir DDT; sin embargo hay reportes de su uso ilegal debido a las reservas de este producto en México y otros países (CEC 1997, Venkatesan *et al.* 1999, Partida-Gutiérrez *et al.* 2003, Hong *et al.* 2005). En estudios realizados en la CSC se ha encontrado que las concentraciones de DDT en sedimentos, columna de agua y organismos han disminuido (Schiff *et*

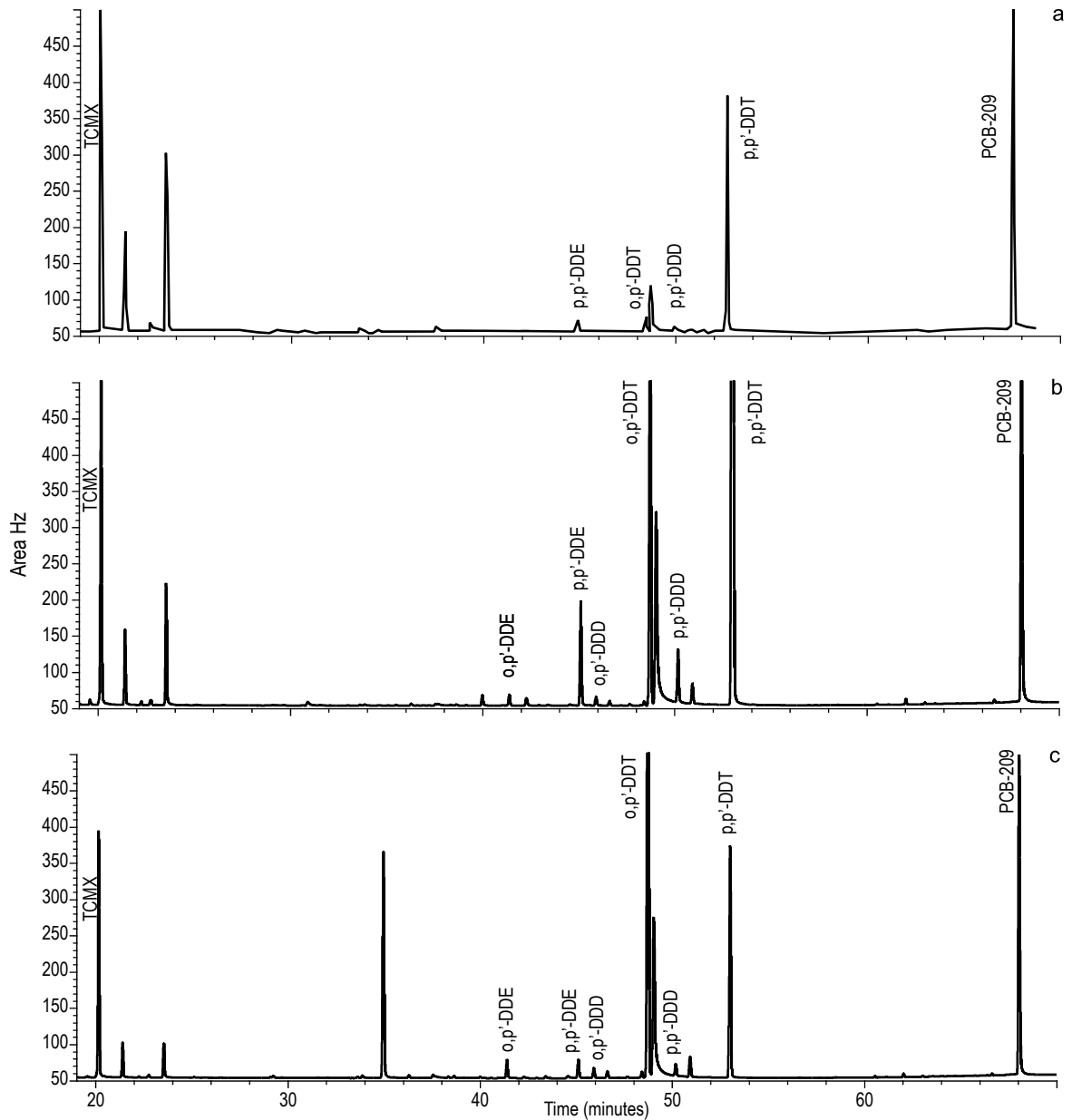


Figure 6. Chromatograms of DDT in the bioassay using *Vibrio* sp. in an anaerobic medium: (a) initial incubation time, (b) 60 days of incubation, and (c) 90 days of incubation.

Figura 6. Cromatogramas del DDT en el bioensayo con *Vibrio* sp. en medio anaerobio: (a) tiempo inicial de incubación, (b) 60 días de incubación y (c) 90 días de incubación.

United States, the use of DDT for agricultural purposes was banned in the 1970s, but it was not until 1989 that its use for sanitation and military purposes was also prohibited. In Mexico its use began to decrease in response to environmental concerns and by 1997 it was only employed for malaria control. Since 2000 it has not been used or produced in Mexico, though there have been reports of the illegal use of the unused stocks of DDT still available in this and other countries (CEC 1997, Venkatesan *et al.* 1999, Partida-Gutiérrez *et al.* 2003, Hong *et al.* 2005). Surveys conducted in the SCB have shown that the concentrations of DDT in sediments, water column,

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

Las mayores concentraciones de DDT no se encontraron en las estaciones más cercanas a la frontera México-Estados Unidos y a la planta de tratamiento de Point Loma, en California, sino que en general se detectaron en las estaciones cercanas a la isobata de 200 m, que son las que muestran

and organisms have decreased (Schiff *et al.* 2000); however, the sediments in the study area may represent a potential source of bioaccumulation for the fauna associated with the sediment, since according to Macías-Zamora (2001), approximately 60% of the total area sampled in the SCB contains DDT.

The highest DDT concentrations were not recorded at the stations closest to the US-Mexico border or the Point Loma Wastewater Treatment Plant, but rather at the stations close to the 200-m isobath, which are the ones that show the highest percentages of particles <63  $\mu\text{m}$  in diameter and organic carbon (Peris *et al.* 2005). The correlation analyses showed significant correlations ( $P < 0.05$ ) between  $\Sigma\text{DDT}$  and  $p,p'$ -DDE with these two variables, whereas the cluster dendrogram associated  $\Sigma\text{DDT}$  with its metabolites  $o,p'$ -DDD and  $p,p'$ -DDD and with SRB. The factor analysis also revealed this relationship since the first factor explained the association of SRB with  $p,p'$ -DDD,  $o,p'$ -DDD, and  $\Sigma\text{DDT}$ . Our findings concur with those obtained by Schiff *et al.* (2006), who recorded higher DDT concentrations in layers between 120 and 500 m depth in the SCB, characterized by higher percentages of fine grains and organic carbon.

The  $\Sigma\text{DDT}$  distribution pattern observed in the study area seems to be influenced by the circulation. The system's high wave energy distributes the particulate organic matter, which accumulates offshore as a result of the local currents and mixing processes (National Research Council 1990, Oey 1999, Macías-Zamora and Ramírez-Álvarez 2004). This is evidenced by the accumulation of small sediment particles (<63  $\mu\text{m}$ ), rich in organic carbon, along the deeper isobaths and in the southern part of the study area (Ramírez-Álvarez *et al.* 2007). This pattern can be attributed to the abrupt change in the width of the continental shelf, the wave incidence angle, and the California Countercurrent, whose circulation pattern is inverted along the coast resulting in a net southeastward flow (Oey 1999).

According to Zeng and Venkatesan (1999), the main California wastewater treatment plants discharge at depths between 60 and 100 m, near submarine canyons, so it is possible for pollutants to be transported towards the continental slope. Thus, the DDT introduced before 1971 may have been transported with the particulate matter, particularly the fine-sized grains.

The highest DDD concentrations were recorded at stations 38, 49, and 59, stations that had the highest presence of SRB. The correlation and cluster analyses showed a relation and association between this group of bacteria and the metabolites  $p,p'$ -DDD and  $o,p'$ -DDD. Likewise, the first factor of the multivariate analysis (table 5) showed an association between  $p,p'$ -DDD and  $o,p'$ -DDD with SRB. An explanation for this relation is that SRB occur in reduced environments, which are propitious for the reductive dechlorination of DDT and DDD; moreover, the possibility that SRB are involved in this degradation process should not be discarded. In a study on anaerobic biodegradation of DDT residues in estuarine sediments, Huang

mayores porcentajes de partículas <63  $\mu\text{m}$  de diámetro, y mayor porcentaje de carbono orgánico (Peris *et al.* 2005). Los análisis de correlación realizados mostraron correlaciones significativas ( $P < 0.05$ ) entre  $\Sigma\text{DDT}$  y  $p,p'$ -DDE con estas dos variables, mientras que el dendrograma de agrupamiento asoció a  $\Sigma\text{DDT}$  con sus metabolitos  $o,p'$ -DDD y  $p,p'$ -DDD, y con las BRS. El análisis de factores también muestra esta relación ya que el primer factor explica la asociación de las BRS con  $p,p'$ -DDD,  $o,p'$ -DDD y  $\Sigma\text{DDT}$ . Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Schiff *et al.* (2006) en la CSC, en donde se encontró mayor concentración de DDT en los estratos ubicados entre los 120 y 500 m de profundidad, mismos que se caracterizaron por un mayor porcentaje de grano fino y carbono orgánico.

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

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

Las mayores concentraciones de DDD se detectaron en las estaciones 38, 49 y 59, las cuales presentaron mayor presencia de BRS. Por ello los análisis de correlación y agrupamiento mostraron una relación y asociación entre ese grupo de bacterias y los metabolitos  $p,p'$ -DDD y  $o,p'$ -DDD. De la misma manera, el primer factor del análisis multivariado (tabla 5) mostró asociación entre  $p,p'$ -DDD,  $o,p'$ -DDD y las BRS. La explicación de esta relación es que tales bacterias se encuentran en ambientes reducidos que son propicios para la descloración reductiva del DDT a DDD; además, no se descarta que las BRS detectadas en la zona de estudio lleven a cabo este proceso de degradación. Huang *et al.* (2001), en un ensayo de biodegradación anaeróbica con DDT en sedimentos estuarinos, encontró que las BRS estuvieron significativamente involucradas en la descloración del  $p,p'$ -DDT.

La presencia de DDE y DDD en la estación 49 indica la posibilidad de que en el sedimento exista un conjunto de bacterias anaerobias facultativas capaces de reducir u oxidar el DDT, ya que se sabe que la formación del DDE ocurre en

*et al.* (2001) found that SRB were significantly involved in the dechlorination of *p,p'*-DDT.

The presence of DDE and DDD at station 49 indicates the possibility that the sediment contains a consortium of facultative anaerobic bacteria capable of reducing or oxidizing DDT, since the formation of DDE is known to occur in aerobic environments via the dehydrochlorination of DDT, while that of DDD occurs in anaerobic environments via the reductive dechlorination of DDT (Lal and Saxena 1982, Aislabie *et al.* 1997, Foght *et al.* 2001). It is possible that station 49 comprises oxic-anoxic microenvironments that favour the growth of facultative anaerobic bacteria like *Vibrio* sp. This bacterium was isolated at this station and was capable of growing under both aerobic and anaerobic laboratory conditions in a minimal salts medium plus DDT.

The reduction in the DDT peak and increase in the *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDD peaks in the aerobic and anaerobic assays may be due to the transformation of DDT by *Vibrio* sp. It is important to note, however, that organochlorine compounds can be intracellularly and selectively accumulated by microorganisms. For example, *Aerobacter aerogenes* and *Bacillus subtilis* require only 30 sec to accumulate 80–90% of the DDT present in the environment (Lal and Saxena 1982), changing the location and proportion of the residual DDT. As only the supernatant was analyzed in this paper, a mass balance study using <sup>14</sup>C-DDT is required, considering both the residual and intracellular DDT.

In this study, the biotransformation of DDT by *Vibrio* sp. was evidenced by the detection of *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD in the aerobic and anaerobic assays, metabolites that were not present at the beginning of the experiment nor in the abiotic controls. Because of their absence it is possible to discard the possibility that they were formed by the thermal and photochemical degradation of DDT.

The *o,p'*-DDE and *o,p'*-DDD peaks detected in the aerobic and anaerobic assays were small, probably because the experiment was conducted over 90 days, in a culture medium with DDT as the only source of carbon and with the sole intervention of *Vibrio* sp. If we would have used a bacterial consortium, as well as a minimal salts medium with another chemical compound like biphenyl (cometabolism), the biotransformation of DDT might have been more evident, with the probable formation of less chlorinated metabolites such as DDMU and DDM. Several studies have shown the importance of cometabolism in the induction of DDT degradation (Aislabie *et al.* 1997, 1999; Hay and Focht 1998; Foght *et al.* 2001).

English translation by Christine Harris.

## References

- Aislabie JM, Richards NK, Boul HL. 1997. Microbial degradation of DDT and its residues: A review. *New Zealand J. Agric. Res.* 40: 269–282.
- Aislabie J, Davison AD, Boul HL, Franzmann PD, Jardine DR, Karuso P. 1999. Isolation of *Terrabacter* sp. strain DDE-1, which

medios aerobios mediante la deshidrocloración del DDT, mientras que la formación de DDD ocurre en medios anaerobios y mediante la descloración reductiva del DDT (Lal y Saxena 1982, Aislabie *et al.* 1997, Foght *et al.* 2001). Es posible que en las inmediaciones de la estación 49 existan microambientes óxicos-anóxicos propicios para el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas como *Vibrio* sp., la cual fue aislada de esta estación y mostró la capacidad de crecer en condiciones de laboratorio tanto aeróbicamente como anaeróbicamente en presencia del medio de sales mínimas más DDT.

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

La evidencia de la biotransformación del DDT por *Vibrio* sp. en el presente estudio se basa en la detección de *o,p'*-DDE y *o,p'*-DDD en los ensayos aerobio y anaerobio, ya que estos metabolitos no se encontraron ni al inicio del experimento ni en los controles abióticos. Debido a su ausencia se descarta la posibilidad de que se hayan formado por procesos de degradación térmica o fotoquímica del DDT.

Las señales detectadas de *o,p'*-DDE y *o,p'*-DDD en los ensayos aerobio y anaerobio fueron pequeñas, probablemente porque el experimento se realizó durante 90 días en un medio de cultivo con DDT como fuente única de carbono y con la sola intervención de *Vibrio* sp. Posiblemente, si se hubiera empleado un conjunto de bacterias utilizando además el medio de sales mínimas en presencia de otro compuesto químico como el bifenilo (cometabolismo), la biotransformación del DDT hubiera sido más evidente, con la probable formación de metabolitos menos clorados como el DDMU y DDM. La importancia del cometabolismo para inducir la degradación del DDT y sus metabolitos ha sido puesta de manifiesto en las investigaciones realizadas por diversos autores (Aislabie *et al.* 1997, Hay y Focht 1998, Aislabie *et al.* 1999, Foght *et al.* 2001).

- metabolizes 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene when induced with biphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5607–5611.
- Austin B. 1990. *Methods in Aquatic Bacteriology*. John Wiley and Sons, New York, 415 pp.
- Bay SM, Zeng EY, Lorenson TD, Tran K, Alexander C. 2003. Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of Santa Monica Bay, California. *Mar. Environ. Res.* 56: 255–276.
- CEC. 1997. North American Regional Action Plan on DDT. North American Working Group for the Sound Management of Chemicals Task force on DDT and Chlordane. Commission for Environmental Cooperation, Montreal.

- Daesslé LW, Ramos SE, Carriquiry JD, Camacho VF. 2002. Clay dispersal and the geochemistry of manganese in the northern Gulf of California. *Cont. Shelf Res.* 22: 1311–1323.
- De Long RL, Gilmartin WG, Simpson JG. 1973. Premature births in California sea lions: Associations with high organochlorine pollutant residue levels. *Science* 181: 1168–1169.
- Foght J, April T, Biggar K, Aislabie J. 2001. Bioremediation of DDT contaminated soils: A review. *Bioremediation J.* 5: 225–246.
- García-Ortega AM. 1997. Caracterización molecular de especies marinas del género *Vibrio*. Tesis de licenciatura, UABC/Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Mexico, 45 pp.
- Greeson PA, Ehlke TA, Irwin GA, Lium BW, Slack KV. 1977. Methods for collection and analysis of aquatic biological and microbiological samples. US Geological Survey, Techniques of Water Resource Investigations of the United States Geological Survey. Book 5, Chapter 4. US Government Printing Office, Washington DC, 332 pp.
- Gutiérrez-Galindo EA, Ríos-Mendoza LM, Flores-Muñoz G, Villaescusa-Celaya J. 1998. Chlorinated hydrocarbons in marine sediments of the Baja California (Mexico)-California (USA) border zone. *Mar. Pollut. Bull.* 36: 27–31.
- Hay AG, Focht DD. 1998. Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene (DDE) by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2141–2146.
- Hong Z, Yonglong L, Dawson RW, Yahuan S, Tieu W. 2005. Classification and ordination of DDT and HCH in soil samples from the Guanting Reservoir, China. *Chemosphere* 60: 762–769.
- Huang HJ, Liu SM, Kuo CHE. 2001. Anaerobic biodegradation of DDT residues (DDT, DDD, and DDE) in estuarine sediment. *J. Environ. Sci. Health* 36: 273–288.
- Iwata H, Tanabe S, Sakai N, Nishimura A, Tatsukawa R. 1994. Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. *Environ. Pollut.* 85: 15–33.
- Lal R, Saxena DM. 1982. Accumulation, metabolism, and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiol. Rev.* 46: 95–127.
- Lara-Martín PA, Gómez-Parra A, Petrovic M, Barceló D, González-Mazo E. 2005. Distribution of organic pollutants in coastal sediment of Cádiz Bay (SW Spain). *Cienc. Mar.* 31: 203–212.
- Macías-Zamora JV. 2001. Monitoring coastal waters from Tijuana to Ensenada. *Bight Bull.* No. 2.
- Macías-Zamora JV, Ramírez-Álvarez N. 2004. Tracing sewage pollution using linear alkylbenzenes (LABs) in surface sediments at the south end of the Southern California Bight. *Environ. Pollut.* 130: 229–238.
- Nadeau LJ, Menn FM, Breen A, Sayler GS. 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 51–55.
- National Research Council. 1990. Monitoring Southern California's Coastal Waters. National Academy Press, 154 pp.
- Noble MA, Sherwood CR, Lee HL, Jingping X, Dartnell P, Robertson G, Martini M. 2001. Transport processes near coastal ocean outfalls. Conference and Exhibition in: Oceans, MTS/IEEE 3: 1996–2000.
- Noblet JA, Zeng EY, Baird R, Gossett RW, Ozretich RJ, Phillips CR. 2003. Southern California Bight 1998 Regional Monitoring Program. VI. Sediment Chemistry. Southern California Coastal Water Research Project, Westminster, California, 277 pp.
- Oey LY. 1999. A forcing mechanism for the poleward flow off the southern California coast. *J. Geophys. Res.* 104: 13529–13539.
- Partida-Gutiérrez DI, Villaescusa JA, Macías-Zamora JV, Castellón FF. 2003. Persistent organic pollutants in sediment corers from the southern region of the Bight of the Californias. *Cienc. Mar.* 29: 521–534.
- Peris E, Requena S, de la Guardia M, Pastor A, Carrasco JM. 2005. Organochlorinated pesticides in sediments from Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere* 60: 1542–1549.
- Quensen JF III, Tiedje JM, Jain MK, Mueller SA. 2001. Factors controlling the rate of DDE dechlorination to DDMU in Palos Verdes margin sediments under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 35: 286–291.
- Raco-Rands V. 1999. Characteristics of effluents from large municipal wastewater treatment facilities in 1996. Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1997–1998. Long Beach, CA, pp. 2–17.
- Ramírez-Álvarez N, Macías-Zamora V, Burke RA, Rodríguez-Villanueva VL. 2007. Use of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  and carbon to nitrogen ratios to evaluate the impact of sewage-derived particulate organic matter on the benthic communities of the southern California Bight. *Environ. Toxicol. Chem.* 26: 2332–2338.
- Secretaría de Salud. 1992. Manual de técnicas y procedimientos para la investigación de *Vibrio cholerae* en agua y alimentos. 30 pp.
- Schiff K, Allen MA. 2000. Chlorinated hydrocarbons in flat fishes from the Southern California Bight, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 1559–1565.
- Schiff KC, Allen MJ, Zeng EY, Bay SM. 2000. Southern California. *Mar. Pollut. Bull.* 41: 76–93.
- Schiff KC, Maruya K, Christenson K. 2006. Southern California Bight 2003 Regional Monitoring Program. II. Sediment Chemistry. Southern California Coastal Water Research Project, Westminster, CA, 67 pp.
- Tran K, Zeng EY. 1999. Use of equilibrium partitioning theory to determine routes of chlorinated hydrocarbon uptake in hornyhead turbot. In: Weisberg SB (ed.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1997–1998. Westminster, CA, pp. 32–42.
- Venkatesan MI, de Leon RP, van Geen A, Luoma SN. 1999. Chlorinated hydrocarbon pesticides and polychlorinated biphenyls in sediment cores from San Francisco Bay. *Mar. Chem.* 64: 85–87.
- Wade TL, Brooks JM, Kennicutt MC II, McDonald TJ, Sericano JL, Jackson TJ. 1992. GERG trace organic contaminant analytical techniques. In: Lauenstein GG, Cantillo AY (eds.), Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program. National Benthic Surveillance and Mussel Watch Projects 1984–1999. Technical Memorandum, NOS ORCA 71. NOAA, Silver Spring, MD, pp. 121–139.
- Young DR, Hessen TC, McDermott DJ. 1976. An offshore biomonitoring system for chlorinated hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 7: 156–159.
- Zeng EY, Venkatesan MI. 1999. Dispersion of sediment DDTs in the coastal ocean off southern California. *Sci. Total Environ.* 229: 195–208.
- Zeng EY, Tran K. 2002. Distribution of chlorinated hydrocarbons in overlying water, sediment, polychaete, and hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) in the coastal ocean, southern California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 21: 1600–1608.
- Zeng EY, Bay SM, Tran K, Alexander A. 2001. Temporal and spatial distributions of contaminants in sediments of Santa Monica Bay, California. In: Weisberg SB, Elmore D (eds.), Southern California Coastal Water Research Project Annual Report 1999–2000. Westminster, CA, pp. 96–113.

Recibido en mayo de 2007;  
aceptado en agosto de 2008.