Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. Tomo 59, pp. 47-56; 1988

ACCION TERATOGENICA DEL DDT EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE *CAUDIVERBERA CAUDIVERBERA* (LINNE, 1758). (ANURA, LEPTODACTYLIDAE) *

Teratogenic effect of DDT on the development of *C. caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae)

JUAN F. GAVILAN E.; IVONNE HERMOSILLA B.;
FARUK ALAY H. Y WALDO VENEGAS S.**

RESUMEN

Se estudió el efecto embriotóxico del DDT en el anfibio chileno *Caudiverbera caudiverbera*. El DDT a las concentraciones de 0,1; 1; 5 y 10 ppm, es teratogénico entre los estados de placa neural y circulación caudal, particularmente durante la neurulación. Se analizaron los tipos de malformaciones aparecidas frente a las concentraciones de DDT ensayadas: alteración de la cápsula de gelatina, despigmentación, pliegues neurales anormales, hipomorfosis, tubo neural parcial, xifosis y otras. Además se evaluó el efecto del insecticida sobre la tasa de crecimiento promedio de los embriones respecto a la de los controles. Estos resultados fueron comparados con los producidos por otros contaminantes químicos sobre embriones, larvas y adultos de otras especies de anfibios, aves y erizos. También se discuten algunos antecedentes relativos a los mecanismos moleculares que pudieran estar involucrados en la interacción entre los contaminantes químicos y los sistemas biológicos.

ABSTRACT

The embryotoxic effect of DDT on the Chilean frog *Caudiverbera caudiverbera* was studied. DDT is teratogenic at concentrations of 0,1; 1; 5 and 10 ppm from neural plate through caudal circulation stages, specifically during neurulation.

The different types of malformations produced by the tested concentrations of DDT were analyzed: disturbance of the gelatinous capsule, depigmentation, anomalies of neural folds, hypomorphosis, partial neural tube, xiphosis and others. The effect of the insecticide on the average growth rate of embryos as compared to controls was evaluated.

Our results were compared to those produced by other chemical contaminants on embryos, larvae and adults of other species of amphibians, birds, and sea-urchins. Some data about the molecular mechanisms that might be involved in the interaction of chemical contaminants with biological systems are also discussed.

KEYWORDS: Teratogenesis. DDT. Embryos. Amphibian.

---

*Proyecto 20.31.13 Dirección de Investigación, Universidad de Concepción.

**Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407 Apartado 10 Concepción Chile.

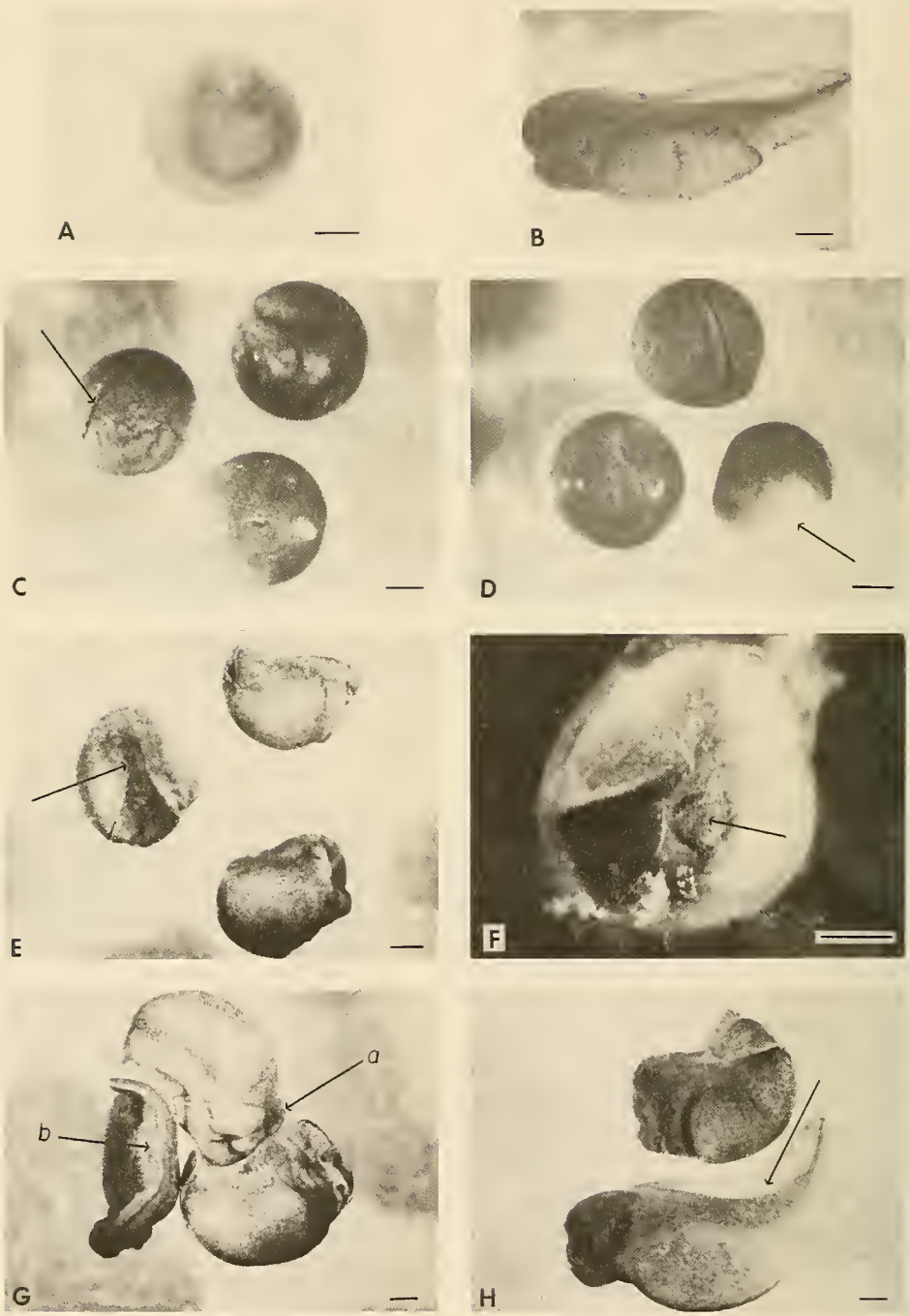

Fig. 1: Malformaciones inducidas por DDT en embriones de *C. caudiverbera* entre los estados de placa neural (A) y circulación caudal (B).
24 hrs. de tratamiento: (C) inhibición de los pliegues neurales (5 y 10 ppm); (D) distribución anormal de pigmento.
48 hrs. de tratamiento: (E) oclusión del tubo neural (1;5 y 10 ppm); (F) neurogénesis anormal.
72 hrs. de tratamiento: (G) a= ventosa anterior, placas branquiales rudimentarias y b= diferenciación somítica parcial o ausente (1; 5 y 10 ppm).
96 hrs. de tratamiento: (H) xifosis axial (1, 5 y 10 ppm).
El trazo indica 1 mm en la realidad.

INTRODUCCION

Aproximadamente el 90% de los compuestos químicos elaborados por el hombre, pueden ser peligrosos para plantas y animales silvestres (Edmisten y Bantle, 1982). Muchos de estos agentes químicos se han incorporado a los ciclos químicos, geológicos y biológicos normales de la tierra (Woodwell y col., 1967).

Después de años de controversias sobre los efectos del DDT, Chile se ha unido a varias naciones al prohibir en 1985 la utilización del pesticida. Sin embargo, a pesar de la prohibición se continúa aplicando en el país, contaminando aguas, pastos y ganado (López, 1986; Montes y col., 1986).

Es importante señalar que en investigaciones realizadas en países donde hace años se prohibió la aplicación del DDT, se informa que este pesticida y otros organoclorados se acumulan y persisten en los seres vivos causando deterioro a la flora y fauna de esos países (Woodwell y Martin, 1964; Woodwell y col., 1967; Nasle y Woolson, 1967), por lo cual el problema es potencialmente grave en Chile. En otros países, observaciones a lo largo del tiempo hacen notar que poblaciones acuáticas de especies silvestres (camarones, anfípodos, peces, anfibios) de conocida sensibilidad al DDT, se han reducido sustancialmente (Burdick y col. 1973).

Numerosos antecedentes indican que los anfibios pueden ser uno de los más importantes y sensibles sistemas de aviso precoz de la contaminación ambiental (Dawson y col. 1985; Pérez-Coll y col. 1985; Venegas y Hermosilla, 1986) y pueden ser utilizados como modelos para predecir los efectos de agentes teratogénicos y genotóxicos (Dawson y col. 1985; Laughlin y Lindén, 1982; Dumpert y Zeitz, 1984). En Chile son escasas las investigaciones sobre la evaluación del impacto de los pesticidas en poblaciones de animales silvestres, particularmente en lo que se refiere a posibles efectos tóxicos de plaguicidas sobre los vertebrados en general y de los anfibios en particular.

En razón a lo anterior, hemos seleccionado como modelo embriones de *Caudiverbera caudiverbera,* rana grande chilena, para estudiar los efectos teratogénicos y embriotóxicos del DDT.

La utilidad de esta especie dulceacuícola endémica como modelo de estudios teratogénicos y/o embriotóxicos reside, entre otros aspectos, en el hecho de ser una especie de amplia distribución geográfica en zonas de alto riesgo de contaminación (desde la IV Región, Lat. 29°,S a la X Región, Lat. 45°,S).

Por otro lado, los modelos biológicos que están siendo utilizados para determinar acciones tóxicas, tienen que satisfacer criterios ecológicos y económicos, representando lo mejor posible ecosistemas específicos y entregando resultados a un costo aceptable.

La presente investigación ha sido motivada por 2 situaciones: tener datos comparativos de la toxicidad de este compuesto químico y utilizar sustratos endémicos como monitoreo de contaminación en los cuerpos de aguas continentales de Chile.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron embriones de *C. caudiverbera*, obtenidos de posturas naturales recolectadas en primavera en la localidad de Cosmito a 6 km. de Concepción, VIII Región, Chile.

Las posturas fueron trasladadas al laboratorio en tiestos adecuados con agua del mismo lugar de recolección. En el laboratorio se determinó el estado de desarrollo de los embriones, segun tabla de Jorquera e Izquierdo (1964) y Gosner (1960), y se seleccionó una postura cuyos embriones presentaron normalidad y una buena consistencia de gelatina y pigmentación.

El cultivo de los embriones se realizó en unidades de cultivo y tratamiento según la técnica de Gavilán y Hermosilla (1984). Se utilizaron 10 de estas unidades, cada una con un volumen total de 1 litro

de agua de charco filtrada, las cuales fueron distribuidas de la siguiente manera: 2 unidades de cultivo controles y 8 unidades de cultivo experimentales con DDT comercial al 75% en las siguientes concentraciones 0,1; 1; 5 y 10 ppm. Cada una de estas concentraciones fue replicada.

En cada unidad se colocó 50 embriones con su gelatina normal en etapa de inicio de placa neural (Fig. 1-A) (Gosner, 1960).

Durante el tiempo que duró la experiencia (96 horas) hasta embriones en estado de circulación caudal (Fig. 1-B) no se realizó cambio de agua, pero se mantuvo aeración pasiva y constante a temperatura ambiental (15-18° C).

A partir de las 24 horas de aplicación del DDT y diariamente a intervalos regulares de tiempo, se tomó una muestra al azar en cada unidad de cultivo de 5 embriones vivos según el criterio aplicado por Dawson y col. (1985). Estos embriones se fijaron en formalina al 10% previa anestesia, para el posterior examen morfológico. Los ejemplares que presentaron alteraciones morfológicas típicas frente a las diversas concentraciones de DDT estudiada, se compararon con los controles y se fotografiaron bajo lupa estereoscópica.

RESULTADOS

Los efectos de exposición al DDT se evaluaron proporcionalmente a las concentraciones utilizadas. Sin embargo, se encontró variabilidad en el grado de sensibilidad de los embriones al insecticida.

Las alteraciones en el desarrollo normal de los embriones de *C. caudiverbera* en función del tiempo y de la concentración de DDT se resumen en la Figura 2.

Los análisis muestran que la concentración de 10 ppm bloquea drásticamente el desarrollo. Durante las primeras 24 horas, los embriones presentan un retardo en la conformación de los pliegues neurales. La inhibición de la neurulación se refleja también durante la conformación del tubo neural a las 48 y 72 horas de tratamiento. A las 96 horas de tratamiento, los embriones tratados con 10 ppm sólo alcanzaron el estado de brote caudal comparados con los embriones controles que llegaron al estado de circulación caudal (Fig. 2).

Concentraciones de 5 y 1 ppm tienen un efecto inhibidor drástico en el estado de placa neural similar al tratamiento de 10 ppm (Fig. 2) afectándose notoriamente el desarrollo embrionario hacia pliegues neurales (Fig. 1-C). Sin embargo, el tratamiento con 1 ppm determinó un atraso menos drástico a nivel de tubo neural y de respuestas musculares en el desarrollo (Fig. 2).

Los tratamientos de 0,1; 1 y 5 ppm a las 96 horas y final de la experiencia, determinaron que los embriones alcanzaran solamente la conformación de esbozos de brotes branquiales, respecto a los controles que llegaron al estado de circulación caudal.

Concomitante a las inhibiciones en el desarrollo normal se encontraron alteraciones morfológicas evidentes en los embriones tratados con DDT, las cuales fueron apareciendo en el transcurso del tiempo. La presencia de las anomalías en embriones de *C. caudiverbera* aparecen en la Tabla I.

Para efecto de un mejor ordenamiento, hemos clasificado estos resultados de acuerdo a su aparición en el tiempo y a su localización en la región del embrión afectada.

A las 24 horas a nivel extraembrionario se detectó alteraciones en la gelatina cambiando de un aspecto normal transparente a un aspecto lechoso opaco. En este período se hace evidente en los embriones en pliegue neural, una despigmentación y/o distribución anormal del pigmento (Fig. 1-D).

A las 48 horas son notorias las alteraciones dorsales y ventrales tales como oclusión en la conformación del tubo neural y edemas (Figs. 1-E,F).

TABLA I. MODALIDADES Y PRESENCIA DE MALFORMACIONES EN EMBRIONES DE *C. CAUDIVERBERA* A TRAVES DEL TIEMPO Y A DIFERENTES DOSIS DE DDT.

TIEMPO DE APARICION (hrs)	REGION DEL EMBRION AFECTADA	ALTERACION	CONCENTRACION DE DDT PPM			
			0,1	1	5	10
24	Extra Embrionaria	Descomposición de la gelatina.	+	+	+	+
	Embriónica Superficial	Despigmentación y/o distribución anormal del pigmento.	+	+	+	+
48	Dorsal	Tubo neural abierto (Oclusión)	—	+	+	+
	Ventral	Edema; hiperplasia. Escasa Vitelolisis	+	+	+	+
72	Anterior	Microcefalia, ventosa y placas branquiales rudimentarias.	—	+	+	+
	Latero-dorsal	Escasa diferenciación de somitos	—	+	+	+
96	Eje-axial	Xifosis	—	+	+	+

(+) Presente
(—) Ausente

A las 72 horas la región cefálica presenta una evidente hipomorfosis. Esta microcefalia es fácilmente observable a este tiempo y persiste hasta el final de la experiencia. Organos anteriores, como la ventosa, placas branquiales, de conformación normal en los controles, son rudimentarias en los embriones tratados con DDT (Fig. 1-G).

En la región latero-dorsal del embrión la diferenciación somítica es parcial o ausente (Fig.. 1-G).

Hacia las 96 horas de la experiencia en los tratamientos de 1; 5 y 10 ppm se constata una fuerte alteración en la morfogénesis axial, manifestándose claramente xifosis (Fig. 1-G y H).

Por otra parte, en un intento por com-

parar el crecimiento de los embriones expuestos al DDT respecto a los controles, se midió la longitud anteroposterior. El promedio de los resultados se grafica en la Fig. 3 para cada una de las concentraciones respecto al control.

Entre placa neural y tubo neural (hasta las 48 horas) el crecimiento de los embriones tratados con 0,1 y 1 ppm mostraron variaciones mínimas. Las concentraciones de 5 y 10 ppm del insecticida actuaron inhibiendo el crecimiento en esta etapa del desarrollo. (Fig. 3).

Desde los estados de tubo neural (48 horas) hasta circulación caudal (96 horas) los embriones tratados con dosis menores a 10 ppm presentaron un crecimiento menor que los controles. Un retardo drástico del crecimiento se observó en estos estados bajo la acción de 10 ppm.

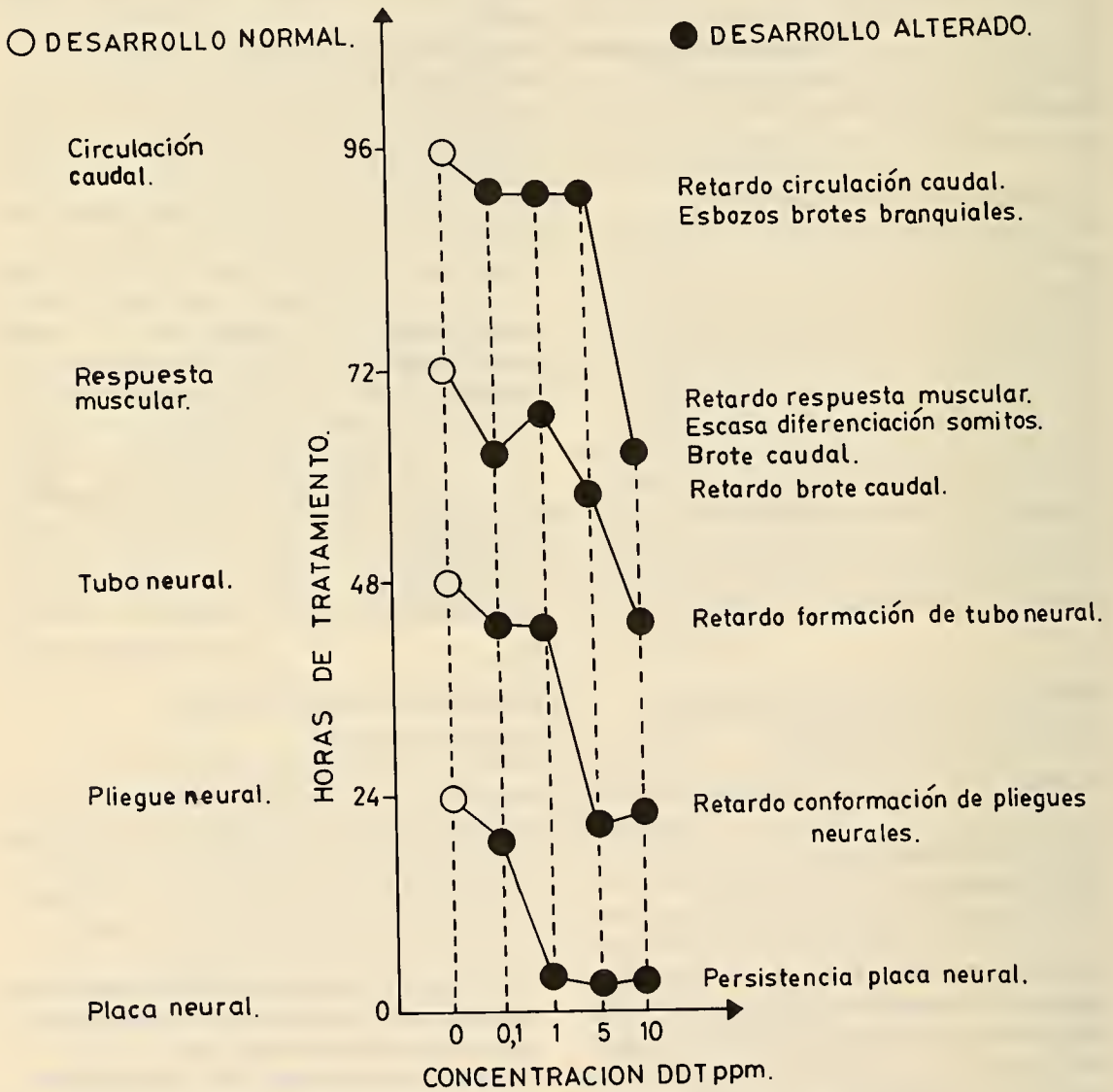

Fig. 2: Variación del desarrollo desde placa neural hasta circulación caudal en embriones de *C. caudiverbera* en función de la concentración de DDT y del tiempo.

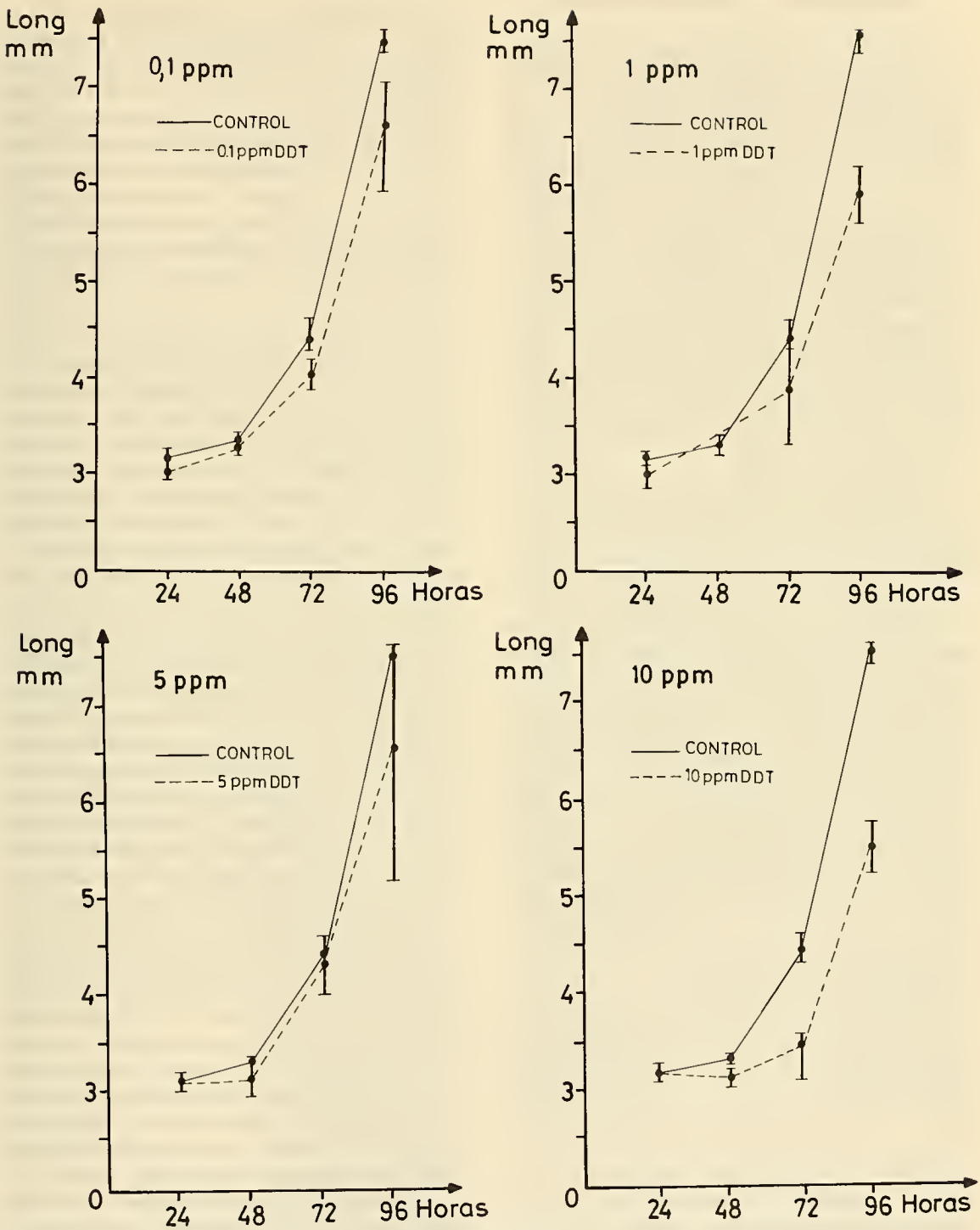

Fig. 3: Curvas de crecimiento promedio de los embriones de *C. caudiverbera* desde placa neural a circulación caudal, tratados con concentraciones crecientes de DDT.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante la década de 1960 muchos herpetólogos europeos y americanos sugieren que los pesticidas contribuyen a la disminución de sapos y ranas de áreas silvestres (Cooke, 1972; Gibbs y col. 1971). La incorporación de compuestos químicos en los animales de ambientes acuáticos como los anfibios, se ha propuesto que puede ser a través de 3 vías: la alimentación, la respiración y la absorción epidérmica (Cooke, 1972). En efecto, los hábitos alimentarios de algunas especies de animales son importantes para elevar los niveles residuales de sustancias químicas persistentes como el DDT (Bjerk y Brevik, 1980).

Estudios de Cooke (1972) señalan que el DDT puede afectar el comportamiento de larvas de anfibios especialmente sensibles como la rana común *Rana temporaria* y el sapo común europeo *Bufo bufo*.

Nuestros resultados indican que el DDT causa inhibición y retardo en el desarrollo normal embrionario de *C. caudiverbera*. Tales efectos están directamente relacionados con la dosis utilizada del insecticida. La concentración de 10 ppm inhibe completamente el desarrollo embrionario post-gastrula. Similares efectos han informado Laughlin y Lindén (1982) al avaluar la acción de tributiltinfluorado (TBTF) un fungicida que afecta la sobrevida y el crecimiento de embriones de *R. temporaria*, durante el desarrollo post-gastrula.

A nivel extraembrionario y durante las primeras horas de la experiencia, la gelatina que rodea a los embriones cambia su aspecto normal y transparente. Esta envoltura es una barrera considerada como protección natural de los embriones y, entre otras funciones, limitaría la cantidad de compuestos potencialmente tóxicos que pudieran ser absorbidos por los embriones (Laughlin y Lindén, 1972).

Durante el estado de pliegue neural las concentraciones de DDT ensayadas provocaron cambios en la pigmentación de los embriones de *C. caudiverbera*. Estudios con embriones del sapo africano, *Xenopus laevis*, indican que el compuesto denominado di-2-etil-hexilftalato (DEHP) a concentraciones de 2 ppm provoca alteraciones semejantes al DDT en la distribución del pigmento (Dumpert y Zeitz, 1984). Además, sustancias químicas como la acridina, amilina y quinolina también pueden producir este efecto, a concentraciones menores a 2 ppm (Davis y col. 1981).

Por otra parte, nuestros resultados indican que el DDT provoca retraso en el crecimiento con la consiguiente disminución del tamaño, además de notorias malformaciones en el tubo neural, microcefalia, xifosis en el eje axial del cuerpo y edemas. También durante el desarrollo de la experiencia se observaron alteraciones conductuales en embriones al estado de respuesta muscular y circulación caudal, repercutiendo lo anterior en una eclosión temprana de los embriones debido a movimientos rápidos y repetitivos. Esta hiperactivación ha sido informada por Cooke (1972) para embriones y larvas de la rana americana, *R. catesbiana*, sometida a 2 y 4 ppm de DDT. Cabe señalar que cationes bivalentes como plomo, cadmio y zinc (Dawson y col. 1985) y compuestos como la acridina y similares (Davis y col. 1981) pueden provocar efectos semejantes en embriones de *X. laevis*.

En consideración a lo expuesto, se podría concluir que la acción teratogénica de varios contaminantes químicos apunta a las mismas malformaciones. Esto ha sido señalado en anfibios y otros animales acuáticos, como consecuencia de los posibles efectos múltiples e inespecíficos que los contaminantes químicos pudieran producir sobre los sistemas biológicos (Dawson y col. 1985). Es así como el cadmio y el DDT producen una disminución de la disponibilidad de moléculas energéticas porque interfieren inhibiendo procesos como la fosforilación oxidativa en anfibios (Pérez-Coll y col. 1985). Tal efecto también se ha demostrado en preparados mitocondriales de mús-

culo rojo coxal de machos adultos de cucarachas *(Periplaneta americana)*, sometidos a la acción del DDT. Esta sensibilidad de la fosforilación oxidativa al DDT puede ser de utilidad para explicar ciertas respuestas fisiológicas de un organismo expuesto al insecticida (Khan y Cutkomp, 1982).

La conocida persistencia del DDT en el ambiente, además de su acción teratogénica demostrada en varias especies incluyendo aquellos organismos no objetivos, como los anfibios, han motivado en países como Canadá, el uso de pesticidas alternativos como organofosfatos y carbamatos para el control de plagas. En efecto, Elliott-Feeley y Armstrong en 1982 estudiaron la acción del fenitrotion y carbaril a concentraciones entre 1-10 ppm sobre embriones de *X. leavis*. Los resultados establecieron que ambos organofosforados producen efectos similares al DDT. Particularmente en exámenes histológicos se evidenció con cierta frecuencia anormalidades en el desarrollo de órganos como el corazón, cuerda nerviosa y notocorda. Esta acción teratogénica, según los autores, puede ser el resultado de la inhibición de colinesterasas importantes para el desarrollo de los embriones. En este sentido, se sabe que en anfibios y aves las colinesterasas activan ciertos estados en el desarrollo de algunos órganos como la notocorda, somitos y miótomos. En gastrulas de erizos de mar, la actividad de la colinesterasa ha sido correlacionada con los movimientos de tejidos y los procesos de diferenciación, así una inhibición enzimática durante el proceso de diferenciación explicaría los efectos teratogénicos comunes de contaminantes químicos ya sean organofosforados u organoclorados.

Elliott-Feeley y Armstrong (1982) informan deficiencias nutricionales en embriones de anfibios al no producirse la hidrólisis del vitelo por inhibición de esterasas cuando los embriones son sometidos a la acción de compuestos organofosforados. Estos autores también citan a estos compuestos como responsables de micromelia y alteración en el plumaje en embriones de pollo, pues inhibirían enzimas necesarias para la síntesis de NAD. Siempre a nivel enzimático se ha informado que el DDT inhibe la carbohidrasa, enzima responsable del transporte y la incorporación de calcio en huevos de aves (Schürmann y col. 1974).

Aunque no fue nuestro propósito relacionar las alteraciones morfológicas provocadas por el DDT en *C. caudiverbera* con mofificaciones a nivel enzimático, la literatura está aportando en la actualidad valiosos antecedentes para explicar los mecanismos moleculares que pueden estar operando en la interacción de los contaminantes químicos con los sistemas biológicos.

Se necesita saber más sobre los efectos tóxicos en organismos silvestres, no objetivos, del DDT y otros plaguicidas usados en Chile, especialmente en áreas donde la aplicación de estos compuestos es periódica. Existen antecedentes que en praderas de la Novena Región se aplican dosis de 1 a 1,5 kg de DDT por há con el objetivo de controlar con éxito y economía complejos de hepiálidos (cuncunillas). Esto ha motivado investigaciones sobre la presencia de DDT en tejidos adiposos de bovinos en esas áreas encontrándose concentraciones entre 0,3 a 430 ppm del insecticida en muestras de otoño y primavera, respectivamente (López, 1986).

Por otra parte, otros compuestos deberían ser ensayados y el análisis de los resultados debería permitir el desarrollo local de una investigación científica que pueda contribuir a resolver problemas relacionados con el manejo de pesticidas en la agricultura.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Dirección de Investigación de la Universidad de Concepción, por el financiamiento a través del Proyecto N° 20.31.13 y al Prof. Manuel E. Almonacid por su aporte y críticas al manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

Bjerk, J.E. and Brevik, E.M. 1980. Organochlorine Compounds in Aquatic Environments. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 9:743-750.

Burdick, G.E.; Harris, E.J.; Dean, H.J.; Walker, T.M.; Skea, J.; Colby, D. 1973. La acumulación de DDT en truchas lacustres y su efecto sobre la reproducción, *In*: Origen y Control de la Contaminación Ambiental. Editor M.A. Strobbe. Editorial Continental. 1° Edición. :309-321.

Cooke, A.S. 1972. The effects of DDT, Dieldrin and 2,4D on Amphibian spawn and tadpoles. Environ. Pollut. 3:51-68.

Davis, K.R.; Schultz, T.W.; Dumont, J.N. 1981. Toxic and Teratogenic Effects of Selected Aromatic Amines on Embryos of the Amphibian *Xenopus laevis*. Arch. Environm. Contam. Toxicol. 10:371-391.

Dawson, D.A.; Mc Carmick, C.A. and Bantle, J.A. 1985. Detection of Teratogenic Substances in Acidic Mine Water Samples using the frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). J. App, Toxicol. 5(4):234-244.

Dumpert, K. and Zeitz. E. 1984. Platanna *(Xenopus laevis)* as a Test Organism for Determining the Embryotoxic Effects of Environmental Chemicals. Ecotox. Environm. Safety 8:55-74.

Edmisten, G.E. and Bantle, J.A. 1982. Use of *Xenopus laevis* larvae in 96-Hour, Flow-through Toxicity Test with Naphthalene. Bull Environm. Contam. Toxicol. 29:392-399.

Elliot-Feeley, E. and Armstrong, J.B. 1982. Effects of Fenitrothion and Carbaryl on *Xenopus laevis* development. Toxicology. 22:319-335.

Gavilán, J.F. y Hermosilla, I. 1984. Técnica experimental para realizar bioensayos toxicológicos con animales acuáticos. Bol. Soc. Biol. Concepción, Chile. 55:155-160.

Gibbs, E.L.; Nace, G.W. and Emmons, M.B. 1971. The live Frog Is Almost Dead. Bio. Science. 21(20):1027-1034.

Gosner, K.L. 1960. A Simplified Table for staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. Herpetologica 16:183-190.

Jorquera, B. y L. Izquierdo. 1964, Tabla Normal de *Calyptocephalella gayi* (Rana chilena). Biológica XXXVII:43-45.

Khan, H.M. and Curtkomp, L.K. 1982. Effects of DDT, DDE and PCBs on Mitocondrial Respiration. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 29:577-585.

Laughlin, R. and Linden, O. 1982. Sublethal responses of the Tadpoles of the European frog *Rana temporaria* to two Tributyltin compouns. Bull. Environm. Contam. Toxicol. 28:494-499.

López V.H. 1986. Determinación de clorados en grasa de bovinos en la IX Región, Chile. *In*: Versiones abreviadas del II Encuentro Científico sobre el Medio Ambiente, I :174-179.

Montes, L., Tamayo, R., Pinto, M. y Cristi, R. 1986. Residuos de Pesticidas en las carnes de la Décima Región, Chile. *In*: Versiones abreviadas del II Encuentro Científico sobre el Medio Ambiente :215-221.

Nasle, R. y Woolson, E. 1967. Persistence of Chlorinated Hydrocarbon Insecticides in Soils. Science 157:924-927.

Pérez-Coll, C.S., Herkowts, J. y Salibian, A. 1985. Efectos del Cadmio sobre el desarrollo de un anfibio. Arch. Biol. Med. Exp. 18:33-40.

Schürmann, R.; Flores, A.; Mayer, H. 1974. El problema de los pesticidas en Chile. Discusión sobre el hallazgo de DDT, pesticida organoclorado, en tejido adiposo humano de la provincia de Concepción. Bol. Soc. Biol. de Concepción, Chile. XLVIII :77-84.

Venegas, S.W., Hermosilla, I. 1986. Estados larvales de la rana chilena, vigías del Medio Ambiente. *In*: Versiones abreviadas del II Encuentro Científico sobre el Medio Ambiente, I :352-358.

Woodwell, G.: Martin, F. 1964. Persistence of DDT in soils of Heavily Sprayed Forest Stands. Science 145:481-483.

Woodwell, G.: Wurster, Ch.; Isaacson, P. 1967. DDT Residues in an East Estuary: A case of Biological Concentration of a Persistant Insecticide. Science 156:821-823.