



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

CAMPUS IZTACALA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
BACTERIAS RESISTENTES A CROMATO

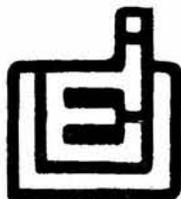
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

**LEONOR FRAGOSO VELAZQUEZ**



LOS REYES, IZTACALA, EDO. DE MEXICO.

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

**A la memoria de mi madre Ma. Luisa Velázquez.**

**A mi padre Abraham Fragoso, quien siempre me ha hecho sentir capaz.**

**A mis hermanos, Alejandro, Humberto, Elvira, Octavio, Guillermo, y Abraham porque, a su manera, siempre conté con su estímulo.**

**A la persona que, a pesar de todo, compartió conmigo el curso de mi carrera y me dió cinco años de VIDA.**

**A mi hijo que aún no nace.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mi asesor, M en C Sergio Vaca Pacheco, por su invaluable apoyo y amistad.**

**A mis compañeros de laboratorio: Elías, Lupita y Ramón, quienes me brindaron su ayuda y amistad.**

**Al M en C Carlos Cervantes y su equipo de colaboradores del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana, por su gran apoyo.**

**A la QFB Gloria Luz Paniagua Contreras y personal a su cargo del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala, por el apoyo brindado.**

## INDICE

<b>Introducción</b>	1
<b>Objetivos</b>	10
<b>Material y métodos</b>	11
Medios de cultivo y soluciones	11
Toma de muestras	14
Procesamiento de las muestras	14
Selección de bacterias resistentes a cromato	15
Identificación de las bacterias	15
Aislamiento de plásmidos	16
Determinación de cromato	16
Reducción de cromato	17
Sensibilidad a plomo	20
Sensibilidad a mercurio	20
Antibiogramas	20
<b>Resultados</b>	22
Concentración de cromato en las muestras	22
Selección de bacterias resistentes a cromato	22
Identificación de las bacterias	22
Reducción de cromato	27
Aislamiento de plásmidos	27
Sensibilidad a plomo	28
Sensibilidad a mercurio	28
Multirresistencia a antibióticos	37
<b>Discusión y conclusiones</b>	39
<b>Bibliografía</b>	43

## INTRODUCCION

El cromo es un metal pesado que se encuentra en estados de oxidación de -2 a +6. Las formas más comunes en las que se encuentra son +3 y +6. El estado trivalente (CrIII) es el más estable. El cromo hexavalente (CrVI) se combina fácilmente con el oxígeno formando los fuertes oxidantes cromato ( $\text{CrO}_4^{-2}$ ) y dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ ). Los derivados del CrIII son prácticamente insolubles en agua mientras que los compuestos hexavalentes son muy solubles (8).

En la naturaleza el cromo se encuentra en el estado trivalente en concentraciones variables; la presencia de cromo hexavalente generalmente denota contaminación causada por el hombre. El cromo se utiliza principalmente en la manufactura de aleaciones metálicas con fines estructurales o protectores; también se emplea en diversos procesos industriales como soldadura, pulpa y papel, curtido de pieles, cerámica, pirotecnia y electrónica. Los compuestos del cromo también se emplean en la fabricación de pigmentos, fungicidas, catalizadores, cintas magnéticas, refractarios y preservativos de madera y textiles (37).

Los efectos biológicos del cromo dependen de su estado de oxidación. Los cromatos son sustancias tóxicas (41, 45) y se ha demostrado que son mutágenos (32, 40) y cancerígenos (14, 15). El CrVI penetra fácilmente las membranas de las células eucarióticas; una vez en el citoplasma, es reducido a CrIII, el cual interacciona con el DNA en el núcleo (22) (Fig. 1) En contraste, el CrIII no sólo es relativamente inocuo, sino que es considerado como un micronutriente esencial (29, 34).

Las membranas biológicas son impermeables al CrIII (22) (Fig. 1). El cromo es el único metal esencial que es, además, un cancerígeno. El ión cromato puede funcionar como un análogo de sulfato debido a su similitud química y, de hecho, se ha demostrado que el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en *Pseudomonas* (30) y *Alcaligenes* (27). La captación del cromato se efectúa por la vía de transporte de sulfato (Fig. 1) y es también inhibida competitivamente por sulfato (30). La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente inhibe a los microorganismos sensibles (1,

2, 46) pero, por otra parte, selecciona variantes resistentes al ión (23, 45). La resistencia bacteriana a cromato puede deberse a mutaciones cromosómicas (generalmente afectando el transporte de sulfato) o a la presencia de plásmidos (36, 45). Se conocen varios ejemplos de bacterias resistentes a cromato (Tabla 1). Los plásmidos que confieren resistencia a cromato se han encontrado en especies de *Pseudomonas* (6, 9, 12, 39), *Alcaligenes* (27) y *Streptococcus* (13). Se ha demostrado que la resistencia a cromato se debe a la acumulación disminuída del ión por las bacterias resistentes, en comparación con las sensibles (9, 17, 27, 30, 31). El transporte de sulfato no se altera por la presencia de plásmidos que confieren resistencia a cromato (30). El mecanismo de resistencia a cromato no se conoce con precisión, pero recientemente fueron clonados y secuenciados dos determinantes de resistencia de plásmidos de *Pseudomonas* (10) y *Alcaligenes* (25, 26). El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró la presencia de un polipéptido hidrofóbico, denominado ChrA, en ambos determinantes. La secuencia de aminoácidos de las proteínas ChrA presenta homología (29 % de aminoácidos idénticos) (10, 26). La expresión de los genes de resistencia en *E. coli* permitió identificar a ChrA como una proteína membranal que se postula como responsable de la translocación de los iones cromato, probablemente por un mecanismo de expulsión (10, 11). El cromo hexavalente presente en el ambiente es reducido a la forma trivalente por la materia orgánica (35), sin embargo, la presencia de altas concentraciones sobrepasa dicha capacidad reductora causando que el CrVI persista en niveles potencialmente tóxicos. El límite permisible de cromo para el suelo en general es de 200 ppm y para el agua potable de 0.05 ppm (39a).

La reducción biológica del cromo hexavalente a la forma trivalente representa un proceso de destoxificación potencialmente útil para la descontaminación de aguas residuales y otros desechos contaminados con cromatos. Algunas bacterias resistentes a cromato son capaces de reducirlo a la forma trivalente, menos tóxica que la forma hexavalente, precipitando el metal en forma de hidróxido de cromo menos soluble (21). El empleo de bacterias para reducir CrVI con fines de descontaminación se ha descrito (7, 19, 20, 24, 33, 44) pero no se ha llevado a la práctica aún.

FIGURA 1. Interacciones de los derivados del cromo con las células bacterianas. El cromato penetra al citoplasma mediante el sistema de transporte del sulfato, codificado por genes cromosómicos. La reducción del cromo hexavalente puede ocurrir en el exterior, causando su destoxificación a cromo trivalente, o en el interior de la célula, donde el CrIII resulta tóxico debido a sus interacciones con el DNA. Una vez captado el cromato, se postula que el ión es expulsado mediante productos génicos codificados por plásmidos. Datos de las referencias 10, 22 y 30.

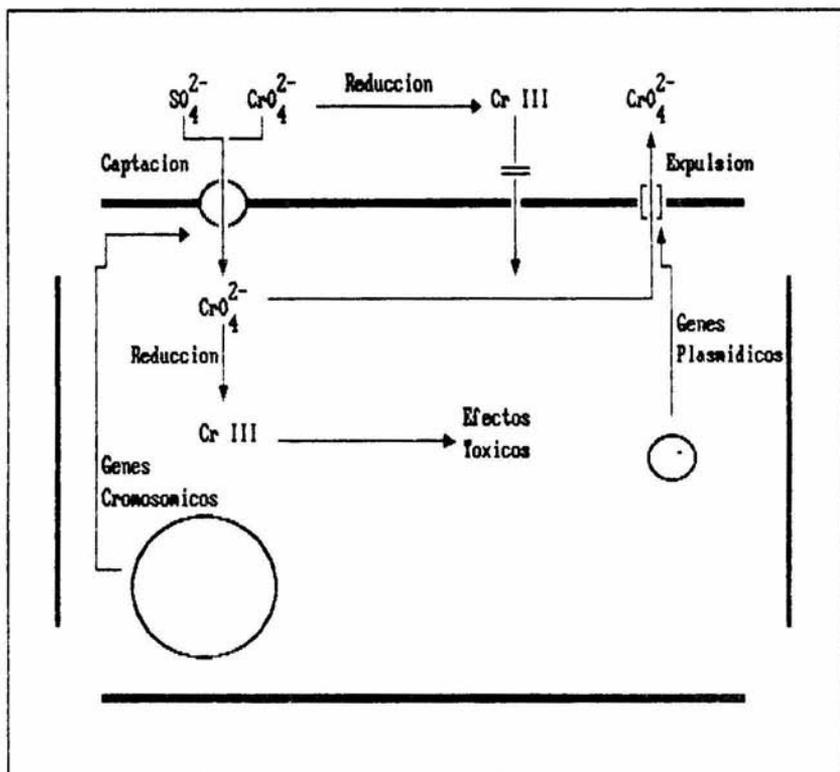


Figura 1.

**TABLA 1. RESISTENCIA A CROMATO EN BACTERIAS**

ESPECIE	PLASMIDO	REF. No.
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	pMOL28	27
<i>Enterobacter cloacae</i>	?	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pMG6	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pUM505	9
<i>Pseudomonas ambigua</i>	?	17
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	pLHB1	6
<i>Streptococcus lactis</i>	varios	13

La reducción del CrVI por las bacterias puede considerarse como un mecanismo cromosómico de resistencia a cromato. La capacidad de reducir CrVI a CrIII se ha localizado en varias especies bacterianas (Tabla 2) incluyendo cepas de *Pseudomonas* (7, 16, 18, 21, 33), *Aeromonas* (20) y *Enterobacter* (42). La reducción de cromato se lleva a cabo en condiciones tanto anaerobias (donde el cromato puede actuar como aceptor final de electrones; 7, 33, 42) como aeróbicas (7, 18). Las enzimas involucradas en la reducción bacteriana de cromato no han sido caracterizadas aún, pero se ha informado de actividades reductoras de cromato asociadas ya sea con la membrana celular (7, 43) o con el citosol (18). Ishibashi y col. (18) purificaron parcialmente una reductasa de cromato, soluble y dependiente de NAD(P)H, de una cepa de *Pseudomonas putida*. Se postula que la reductasa posee un sustrato "natural" que no ha sido identificado (18).

El amplio uso industrial del cromo y la incorrecta eliminación de los desechos han creado serios problemas de contaminación ambiental en áreas urbanas y en otros ecosistemas asociados con descargas industriales (3, 41). En México existen varios ejemplos de contaminación ambiental con cromo. En el área de Lechería (Estado de México) una empresa procesadora de cromo provocó una grave contaminación que se reflejó en niveles elevados de cromo en la población (4). El amplio uso del cromo (principalmente trivalente) en León (Guanajuato) por la industria del curtido de pieles, ha causado contaminación de mantos acuíferos destinados al consumo humano. Recientemente, el río Salinas en Nuevo León fue seriamente contaminado con aguas residuales que contenían cromo y fueron derramadas por una empresa curtidora, causando daños a la fauna acuática (periódico *Excélsior*, 8 de Abril de 1990, México, D.F.).

Uno de los requerimientos para el uso de bacterias reductoras en la destoxificación de cromato es la disponibilidad de bacterias resistentes al ión. Bopp y Ehrlich (7) han informado de un procedimiento para la destoxificación de cromato mediante el uso de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* que posee la capacidad tanto de tolerar como de reducir al cromato. Un proceso similar ha sido desarrollado por Komori y col. (19)

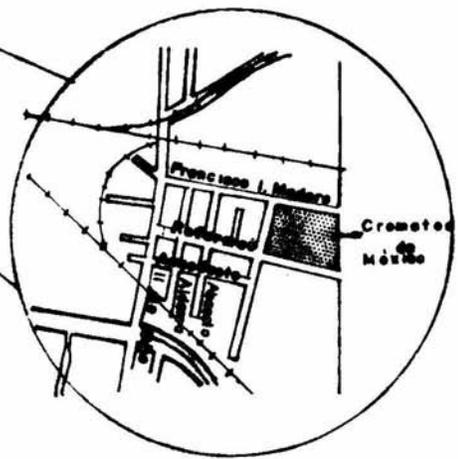
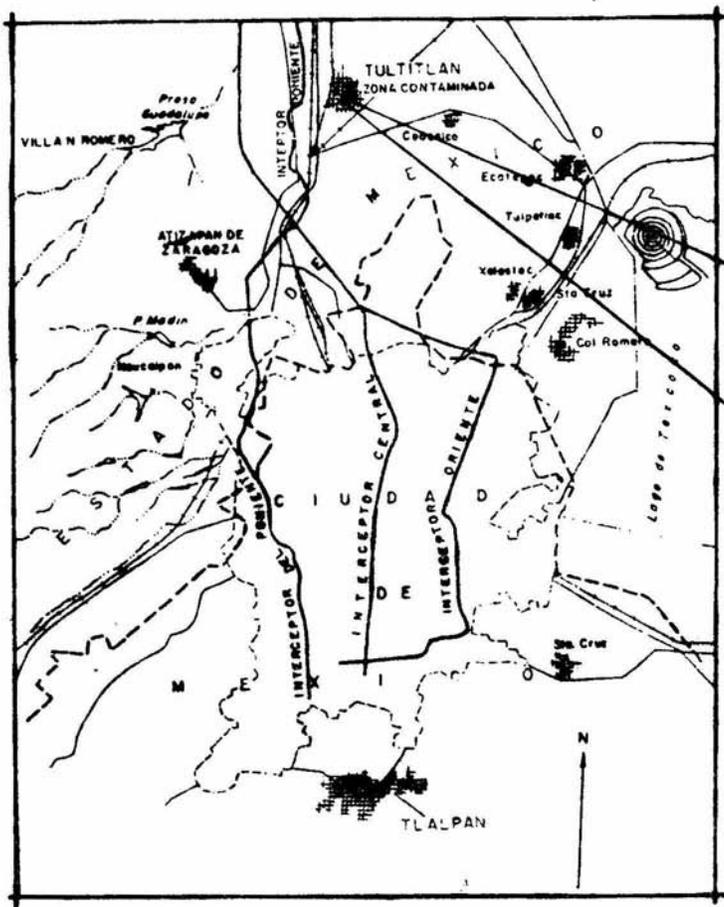
**TABLA 2. REDUCCION DE CROMATOS POR BACTERIAS**

ESPECIE	PROPIEDADES	REF. No.
<i>Aeromonas dechromatica</i>	Reducción anaerobia	20
<i>Enterobacter cloacae</i>	Reducción anaerobia por actividad asociada a la membrana	42
<i>Pseudomonas ambigua</i>	Reducción por extracto libre de células, dependiente de NADP(H)	16
<i>P. chromatophila</i>	Reducción anaerobia	21
<i>P. dechromaticans</i>	Reducción anaerobia	33
<i>P. fluorescens</i>	Reducción en condiciones aeróbicas y anaeróbicas	7
<i>P. putida</i>	Reducción aerobia por actividad soluble, dependiente de NADP(H)	18

con una cepa de *Enterobacter cloacae*. Cervantes y col. aislaron, de un área contaminada con cromo en León, Guanajuato, varias cepas bacterianas resistentes y reductoras de cromato (7a.), que se hallan en proceso de caracterización para su uso eventual en la descontaminación de aguas residuales contaminadas con cromato. Los resultados de las pruebas de destoxificación con bacterias han sido demorados, en parte, debido a que los desechos industriales contaminados con cromo frecuentemente contienen compuestos tóxicos adicionales que inhiben a los microorganismos empleados.

El entendimiento más profundo de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de la resistencia y la reducción bacterianas del cromo hexavalente redundará en un diseño más adecuado de estrategias para resolver los problemas de la contaminación ambiental por cromatos.

El propósito de este trabajo es aislar e identificar bacterias resistentes a cromato a partir de muestras de suelo de zonas circundantes a la exfábrica de Cromatos, S.A. en Lechería, Edo. de México (Fig. 2), así como del canal de aguas negras localizado a una cuadra de la exfábrica mencionada.



**ZONA DE MUESTREO**

**ZONA DE ESTUDIO**

fig 2

## OBJETIVOS

- 1) Aislar bacterias resistentes a cromato a partir de muestras colectadas de zonas circundantes a la exfabrica Cromatos S.A. ubicada en Lechería Edo. de Mexico.,
- 2) Identificar las bacterias obtenidas mediante morfología colonial, microscopía óptica y pruebas bioquímicas.,
- 3) Seleccionar las cepas altamente resistentes y determinar si reducen el Cromo VI a Cromo III .,
- 4) Determinar la presencia de plásmidos en las cepas resistentes mediante electroforesis en geles de agarosa.
- 5) Analizar, en las mismas cepas, resistencia a otros metales pesados reportados como contaminantes ambientales, así como también su resistencia a algunos antibióticos.,

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo, que fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bioxon):

BASE DE AGAR SANGRE (GS)

AGAR DE EOSINA Y AZUL DE METILENO (EMB)

AGAR NUTRITIVO (AN)

CALDO NUTRITIVO (CN)

AGAR DE MUELLER-HINTON (MH)

AGAR PARA SALMONELLA Y SHIGELLA (SS )

AGAR VERDE BRILLANTE (VB)

AGAR DE DEXTROSA SABOURAUD (SAB)

AGAR PARA ESTAFILOCOCOS No. 110 (S110)

#### **PRUEBAS BIOQUIMICAS**

AGAR DE HIERRO DE KLIGLER

Diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos basado en la propiedad de fermentar la glucosa y lactosa junto con la formación de sulfuros.

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Se usa para diferenciar las bacterias entéricas Gram negativas, basándose en la utilización del citrato.

SIM

Con su respuesta al reactivo de Kovac se evalúa la capacidad del organismo para desdoblar el indol de la molécula de Triptofano.

SACAROSA

Utilización del carbohidrato y su consecuente cambio de color.

MANITOL

## CALDO UREA

Determinar la capacidad de un organismo para desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniacó por acción de la enzima ureasa.

### SOLUCIONES

#### BUFFER TB (5X)

Trizma base (0.089M)	53.5 g
Acido bórico (0.089 M)	30.6 g
EDTA (0.5 M) pH 8.0	20.0 ml
Agua destilada estéril	980.0 ml

#### SOLUCION LITICA

Tris 1M, pH 8.0	2.5 ml
EDTA 0.5 M	2.0 ml
SDS 20%	2.5 ml
NaOH 2N	2.75 ml
Agua destilada estéril	40.25ml

#### BUFFER PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.05 M)	4.35 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.81 mM)	0.09 g
Glucosa	2.50 g
Peptona al 15%	10.0 ml
Agua destilada estéril	500 ml
pH de 7.0	

#### REACTIVO DE DIFENIL CARBAZIDA ( DFC )

DFC	200.0 mg
Etanol al 90%	100.0 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40.0 ml
Agua desionizada	360.0 ml

#### Preparación:

Disolver la DFC en el etanol y mezclar con una solución previamente preparada con el ácido sulfúrico y el agua desionizada.

#### FENOL-CLOROFORMO (BAKER) 1:1

#### GEL DE AGAROSA AL 0.7% EN BUFFER TB

#### COLORANTE PARA ELECTROFORESIS

Sacarosa	0.7 g
Azul de bromofenol al 0.5%	0.5 ml
Buffer TB	Aforar a 10 ml

#### BROMURO DE ETIDIO

De una solución de 5 mg/ml tomar 50 µl y aforar a 500 ml con agua destilada.

## 2. TOMA DE MUESTRAS.

### a) Muestras de agua.

Se recogieron aproximadamente 50 ml de agua en frascos Gerber estériles previamente etiquetados. Las muestras se tomaron de cuatro lugares: i) De la boca de un tubo de desagüe, ii) De la zona del canal anterior a este tubo de desagüe, iii) De la zona posterior a todos los tubos de desagüe cercanos al puente que se localiza frente a la puerta de la escuela primaria de la colonia, y iv) De un charco de una calle adyacente a la exfábrica.

### b) Muestras de suelo.

Se marcó un área de aproximadamente 50 cm por lado y se escarbó hasta unos 5 cm de profundidad con un pico limpio. Se juntó la tierra removida en un montón en el centro y se mezcló completamente. Se tomaron aproximadamente 100 g de tierra y se colocaron en una bolsa de plástico previamente etiquetada.

Se tomaron 3 muestras de suelo, a intervalos regulares, de las dos calles que encuadran a la exfábrica (por dos costados) de la zona que se encuentra inmediatamente afuera de la barda de dicho predio. Se tomó una muestra adicional de un campo de cultivo de maíz localizado enfrente de la exfábrica y otra de la propia pared de tabique de la multicentrada exfábrica

## 3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de agua y suelo se trasladaron inmediatamente al laboratorio y se refrigeraron. Se procesaron el mismo día.

Se espatularon 0.1 ml, por duplicado, de cada una de las muestras de agua en cajas de agar nutritivo, para calcular el número de bacterias por ml. Se sembró el agua

sin diluir y una dilución 1:10, hecha con solución salina estéril. Las cajas se incubaron de 24-48 h a 30°C.

Se pesaron 0.5 g de cada una de las muestras de suelo y se suspendieron en 50 ml de solución salina estéril; se agitaron por 20 min a temperatura ambiente; se permitió que sedimentaran las partículas gruesas y se espatuló 0.1 ml, por duplicado, (sin diluir y diluyendo 1:10 en solución salina estéril) en cajas de agar nutritivo para calcular el número de bacterias por ml.

#### 4. SELECCION DE BACTERIAS RESISTENTES A CROMATO.

Una vez conocidos los números de bacterias por ml en cada muestra, se diluyó en solución salina estéril para tener de 300 a 1000 colonias en 0.1 ml y se espatuló en cajas de agar nutritivo adicionadas de  $K_2CrO_4$  a las siguientes concentraciones: 0, 93, 187, 375, 750, 1500 y 3000  $\mu\text{g/ml}$ . Se incubaron las cajas a 30°C por 24-48 h. Las colonias resistentes se purificaron por estría en agar nutritivo conteniendo cromato de potasio a la misma concentración a la que fueron aisladas.

#### 5. IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS.,

Las bacterias resistentes se caracterizaron tomando en cuenta la naturaleza del medio en el cual se desarrolló el microorganismo, se hizo una identificación preliminar mediante morfología colonial, creciendo las colonias aisladas en medios sólidos selectivos y diferenciales.

La identificación confirmativa fue por pruebas bioquímicas, basadas en la capacidad del organismo para producir una enzima determinada o de acuerdo al sustrato utilizado en su metabolismo. Generalmente en estos caminos metabólicos seguidos por los microorganismos se obtienen subproductos ácidos o alcalinos y son

evaluados por indicadores de pH (estas pruebas se realizaron en el laboratorio de Analisis Clinicos de la CUSI-Iztacala, bajo la direccion de la QFB Gloria Luz Paniagua Contreras).

#### 6. AISLAMIENTO DE PLASMIDOS.

Se usó el método de Kado (modificado para Pseudomonas), para lo cual se crecieron los cultivos a fase exponencial tardía ( 1.2 de absorbancia a 590 nm ) en caldo nutritivo.

Se centrifugaron 1.5 ml de cultivo en tubos eppendorf a 10 000 rpm durante 5 minutos, desechando el sobrenadante y repitiendo el paso las veces que fué necesario para obtener una pastilla de buen tamaño.

Se resuspendió el paquete celular en 100 µl de Buffer TB con ayuda del vórtex, se agregaron 600 µl de solución lítica se incubaron a 60°C durante 60 minutos e inmediatamente despues a 0° C durante 15 minutos.

Posteriormente se agregaron 700 µl de fenolcloroformo, mezclando suavemente durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos y se obtuvo el sobrenadante, el cual contenía el DNA plasmídico.

Se preparó un gel de agarosa en una cámara electroforética cubriéndolo con Buffer TB. Se depositaron 50 µl de muestra plasmídica previamente mezclada con 20 µl de colorante (azul de bromotimol) en cada pozo del gel y se aplicaron 75 volts a voltaje constante hasta que la huella del colorante llegó al extremo contrario del gel.

Enseguida se tiñó el gel con Bromuro de Etidio durante 30 minutos y posteriormente se llevó a un cuarto oscuro para observarlo con un transiluminador de luz UV y fotografiarlo con una cámara Polaroid DS34.

#### 7. DETERMINACION DE CROMATO.

El cromato se determinó espectrofotométricamente usando DifenilCarbazida (DFC) como indicador. El cromo hexavalente reacciona con

dicho reactivo produciendo un compuesto púrpura rojizo, en soluciones ligeramente ácidas, cuya absorbancia a 540 nm es proporcional a la concentración de  $\text{Cr}_2\text{O}_4$ .

Para estandarizar el método de cuantificación de cromato se montó una curva de calibración que se utilizó para determinar una concentración desconocida del ión (Fig. 3).

Se preparó un juego de cinco tubos con 5 ml de agua desionizada y se llevaron a concentraciones conocidas de cromato comprendidas en un intervalo de 2 a 8  $\mu\text{g/ml}$ , para posteriormente adicionar 1:10 en volumen de la solución de DFC. La curva se elaboró graficando las concentraciones conocidas de  $\text{Cr}_2\text{O}_4$  contra la absorbancia, cuantificándose en un espectrofotómetro a 540 nm de cinco a quince minutos después de adicionar la DFC.

## 8 .REDUCCION DE CROMATO.

Se crecieron las cepas resistentes a  $\text{Cr}_2\text{O}_4$  en 5 ml de caldo nutritivo por 6 horas con agitación y a 30° C.

Se inocularon 500 ml de caldo nutritivo con los 5 ml del cultivo anterior y se incubaron en las mismas condiciones por toda la noche para tener una concentración aproximada de bacterias de  $5 \times 10^8$  células por mililitro.

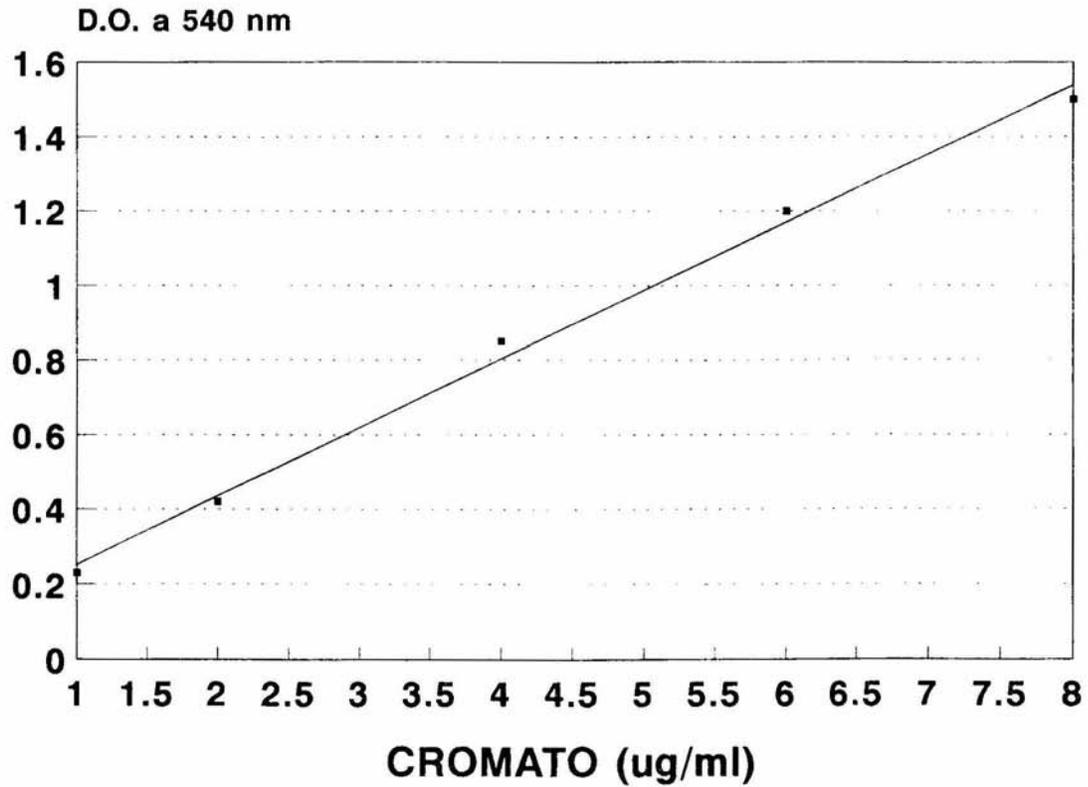
Las bacterias se cosecharon centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos, desechando el sobrenadante y resuspendiendo en 30 ml de Buffer  $\text{PO}_4^{2-}$ , para ahora obtener una concentración aproximada de bacterias de  $5 \times 10^9$  células por mililitro.

El cultivo resultante se llevó a una concentración aproximada de 40  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{Cr}_2\text{O}_4$  y se incubó a 30°C con agitación.

Se tomaron muestras de 5 ml a diferentes tiempos durante 24 horas y se separó la solución acuosa por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se tomó 1 ml del sobrenadante más 4 ml de agua desionizada (para tener una dilución 1:5 de  $\text{Cr}_2\text{O}_4$  la cual es detectable en el rango de 0.2-8  $\mu\text{g/ml}$ , que se cubre con la curva de calibración) y se le agregaron 0.5 ml de reactivo de DFC. Se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro de 5 a 15 minutos después de la centrifugación.

FIGURA 3. Curva de calibración de cromato. Se prepararon soluciones patrón de cromato de potasio y se hicieron reaccionar alícuotas con difenilcarbazida, como se describe en material y métodos, para posteriormente medir la absorción de luz a 540 nm, cuya magnitud es proporcional a la concentración de cromato.

**FIGURA 3**  
**CURVA DE CALIBRACION DE CROMATO**



### 9. SENSIBILIDAD A $Pb(NO_3)_2$ ,

Se preparó una serie de tubos con 5 ml de caldo nutritivo llevándolos a las siguientes concentraciones de plomo ( 0, 100, 200, 400, 800, 1 600 y 3 200  $\mu g/ml$ ).

A partir de un cultivo bacteriano saturado crecido toda la noche a  $30^\circ C$  con agitación, se hizo una dilución 1:50 en cada uno de los tubos anteriormente citados y éstos se incubaron durante 24 horas a  $30^\circ C$  con agitación.

Se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

### 10. SENSIBILIDAD A $HgCl_2$

Los cultivos se prepararon de la misma manera que en el caso de plomo pero para mercurio las concentraciones fueron ( 0, 5, 10, 15, 30 y 60  $\mu g/ml$ ).

### 11. ANTIBIOGRAMAS

Se determinó la sensibilidad a algunos antibióticos, para lo cual se crecieron las cepas resistentes a cromato en 5 ml de caldo nutritivo incubándolas a  $30^\circ C$  hasta que se observó turbidez en el medio.

Los cultivos resultantes se inocularon en cajas petri con agar Muller-Hinton con un hisopo estéril, estriando el medio en tres direcciones sobre la totalidad de la superficie del agar, para obtener un inóculo uniforme.

Inmediatamente después de que secó el inóculo, en un tiempo no mayor a 15 minutos después de haber inoculado la placa, se colocó en cada caja un multidisco impregnado con antibióticos tomándolo con pinzas estériles. Los discos se presionaron ligeramente para asegurar el contacto con la superficie y posteriormente se incubaron las cajas a  $35^\circ C$  durante 24 horas.

Se hizo un análisis cualitativo de la prueba evaluando los resultados por observación visual directa aceptando como bacterias resistentes a un determinado antimicrobiano a aquellas cepas cuyo diámetro del halo de inhibición no excede de 14

mm. Se consideraron como sensibles las cepas cuyo diámetro de inhibición fue  $> 15$  mm.

## RESULTADOS

### 1. CONCENTRACION DE CROMATO EN LAS MUESTRAS,

Por el método colorimétrico descrito en la metodología se cuantificó la concentración de cromato presente en las muestras colectadas (Tabla 3). Encontrando que las muestras de agua tienen una menor concentración de cromato que las de suelo.

Las muestras tomadas del interior del predio donde se ubicaba la exfábrica de cromatos (4 y 5) presentaron la mayor concentración del metal, lo cual concuerda con el hecho de que a simple vista se apreciaba el color café amarillento característico del cromo en dicho lugar de muestreo.

### 2. SELECCION DE BACTERIAS RESISTENTES A CROMATO

Después de hacer las respectivas diluciones e incubar durante 24 horas a 30<sup>o</sup> C se observó crecimiento en los cultivos que contenían hasta 750 µg/ml del ión. Y a las 48 horas se presentaron algunas colonias bacterianas en las concentraciones de 1500 y 3000 µg/ml (Tabla 4). Pero todas crecieron a la máxima concentración al resembrarlas.

La frecuencia de cepas resistentes a cromato en todas las muestras tiene como tendencia general a disminuir a medida que aumenta la concentración de cromato en el medio de cultivo. Las muestras 4 y 5 mostraron el menor número de unidades formadoras de colonia (Tabla 4) y la menor frecuencia de cepas resistentes a cromato (Fig. 4).

### 3. IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS

Por morfología colonial, observación microscópica y tinción de Gram se hizo una clasificación preliminar distinguiendo grupos de bacilos Gram (-), bacilos Gram (+) y un grupo de cocos Gram (+) que se desarrollaron de diferente forma en los medios selectivos.

**TABLA 3. CONCENTRACION DE CrVI EN LAS MUESTRAS**

<b>MUESTRA</b>	<b>ppm</b>
<b>1</b>	<b>288</b>
<b>2</b>	<b>118</b>
<b>3</b>	<b>176</b>
<b>4</b>	<b>4000</b>
<b>5</b>	<b>600</b>
<b>6</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>3.3</b>
<b>9</b>	<b>2.9</b>
<b>10</b>	<b>3.5</b>

Se cuantificó la concentración de CrVI en las muestras colorimétricamente, utilizando difenilcarbazida, como se describe en material y métodos.

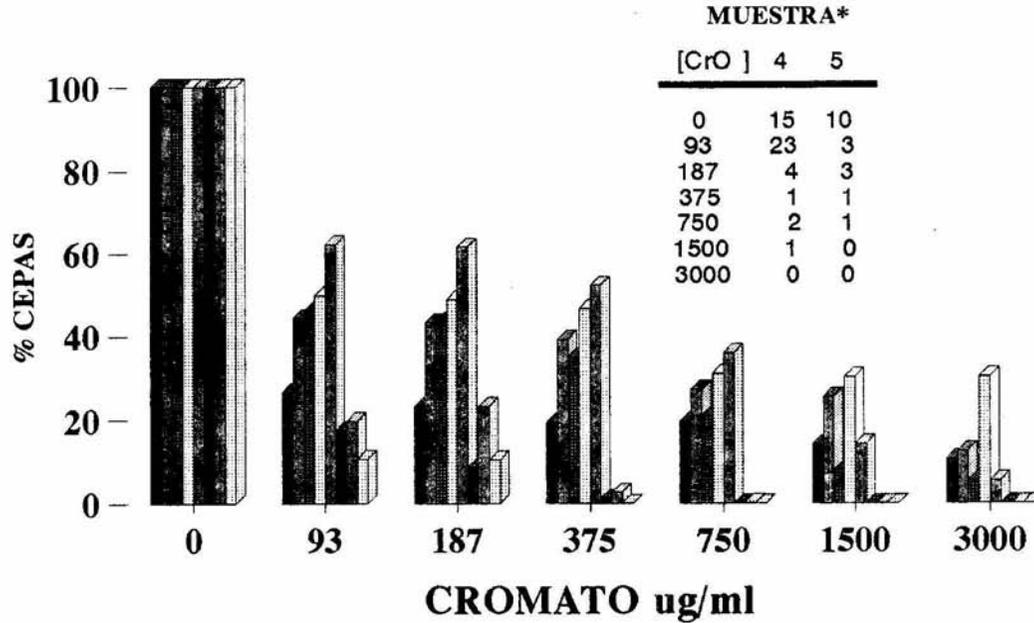
TABLA 4. NUMERO DE UFC EN LAS MUESTRAS

MUESTRA	ufc/g o ml (x 10 <sup>-5</sup> )
1	1.88
2	1.68
3	1.37
4	0.15
5	0.10
6	1.22
7	1.30
8	152
9	65
10	276

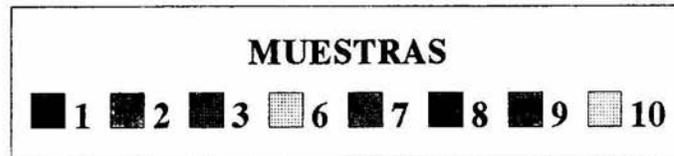
Las muestras de suelo se suspendieron en solución salina estéril y se espatularon alicuotas en AN. Se contó el número de ufc/g después de incubar 48 h a 30°C . Alicuotas de las muestras de agua se sembraron en AN, se incubó 48 h a 30°C y se calculó el número de ufc/ml.

FIGURA 4. Frecuencia de cepas resistentes a cromato. Las muestras de suelo se suspendieron en solución salina estéril y se espatularon alícuotas en agar nutritivo adicionado de cromato de potasio a las concentraciones indicadas. Se contó el número de UFC/g después de incubar 48 h a 30°C. Alícuotas de las muestras de agua se sembraron en agar nutritivo más cromato de potasio. Se incubó 48 h a 30°C y se calculó el número de UFC/ml.

# FIGURA 4 FRECUENCIA DE CEPAS RESISTENTES A CROMATO



26



\* Num. de UFC

De acuerdo a lo anterior y a las reacciones obtenidas de las pruebas bioquímicas, se caracterizaron seis cepas: *Aerobacter cloacae*, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, y *Staphylococcus aureus* cuyas características se presentan en la Tabla 5.

#### 4. REDUCCION DE CROMATO.

El siguiente paso después de obtener e identificar a las bacterias altamente resistentes a cromo fue evaluar su capacidad para reducir el cromo hexavalente (CrVI) a su estado trivalente (Cr III).

Las cuatro cepas probadas fueron reductoras, pero *Alcaligenes faecalis* presentó un mayor poder reductor, casi a la par de la cepa control positivo QC12 reportada como reductora rápida (7a). En tres horas estas dos cepas redujeron la concentración de cromo en un 60 %, a las cinco horas el 78.8 % del cromo estaba reducido a (CrIII) y pasadas veinticuatro horas no se detectó (CrVI) (Fig. 5).

*Aerobacter cloacae*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* tuvieron un comportamiento similar entre sí. Después de tres horas redujeron el cromo en un 30%, a las cinco horas se redujo el 38 %, en siete horas el 48 %, y finalmente a las veinticuatro horas sólo *Aerobacter cloacae* logró reducir completamente el cromo, mientras que *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* presentaron trazas de cromo (Fig. 5).

#### 5. AISLAMIENTO DE PLASMIDOS.

Por el método de Kado (modificado para *Pseudomonas*) se aisló el DNA plasmídico de las bacterias Gram (-) (*Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis* y *Aerobacter cloacae*) y se les hizo un análisis electroforético en gel de agarosa. Las tres cepas presentaron plásmidos, lo cual sugiere la posibilidad de que la resistencia a cromo esté conferida por estos elementos extracromosómicos.

En *Escherichia coli* se observó una banda que tiene un corrimiento en el gel de agarosa similar al del DNA del cromosoma bacteriano. En *Alcaligenes faecalis* el DNA plasmídico presentó un mayor desplazamiento en el gel que el anterior. Y en el

carril de *Aerobacter cloacae* se pueden distinguir cuatro bandas con diferentes movilidades electroforéticas (Fig. 6).

## 6. SENSIBILIDAD A PLOMO

Se determinó la concentración de plomo en la que se presenta el 50% de sobrevivencia de las cepas. Para *Bacillus sp.* fue a 300 µg/ml, lo que la hace la más sensible; para *Escherichia coli* a 400 µg/ml. *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter cloacae* y *Alcaligenes faecalis*, resultaron ser las más resistentes del grupo, presentando un comportamiento similar entre sí, a la concentración de 900 µg/ml del metal, a la que se redujo la absorbancia hasta el 50% (Fig. 7).

Kondo et al. (19a), usando una técnica diferente (determinación de la concentración mínima inhibitoria, CMI, por dilución en placa, utilizando el replicador de Steers) y con una población de 415 cepas, reportan como resistentes a plomo, aquellas cuya CMI es > 800 µg/ml. Miranda et al. (24a) determinaron una CMI de 800-1600 µg/ml para una población de 45 cepas, en su mayoría Gram positivas, aisladas de muestras de suelo obtenidas de sitios localizados a 10-20 m del periférico norte.

## 7. SENSIBILIDAD A MERCURIO

La cepa que tiene mayor resistencia a mercurio es *Aerobacter cloacae*, ya que la absorbancia del cultivo disminuye al 50% a una concentración de 30 µg/ml, mientras que para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus sp.* la concentración es de 22 µg/ml y finalmente las más sensibles fueron *Escherichia coli* y *Alcaligenes faecalis* con una concentración de 19 y 20 µg/ml respectivamente, para disminuir a la mitad la absorbancia de los cultivos (Fig. 8 ). Kondo et al.(19a) determinaron la susceptibilidad de 415 cepas de *S.aureus* y designaron como resistentes a aquellas cuyo MIC fue de 12.5 µg/ml de mercurio, mientras que Miranda et al., trabajaron con 45 cepas diferentes y registraron como resistentes a las que mostraron un MIC > 54 µg/ml (25a).

**TABLA 5. IDENTIFICACION DE LAS BACTERIAS**

BACTERIA	MOVILIDAD	GLUCOSA	LACTOSA	SACAROSA	MANTOL	INDOL	UREA	CITRATO	GRAM
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	N
<i>A. cloacae</i>	+	+	+	+	+	V	+	+	N
<i>A. faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	N

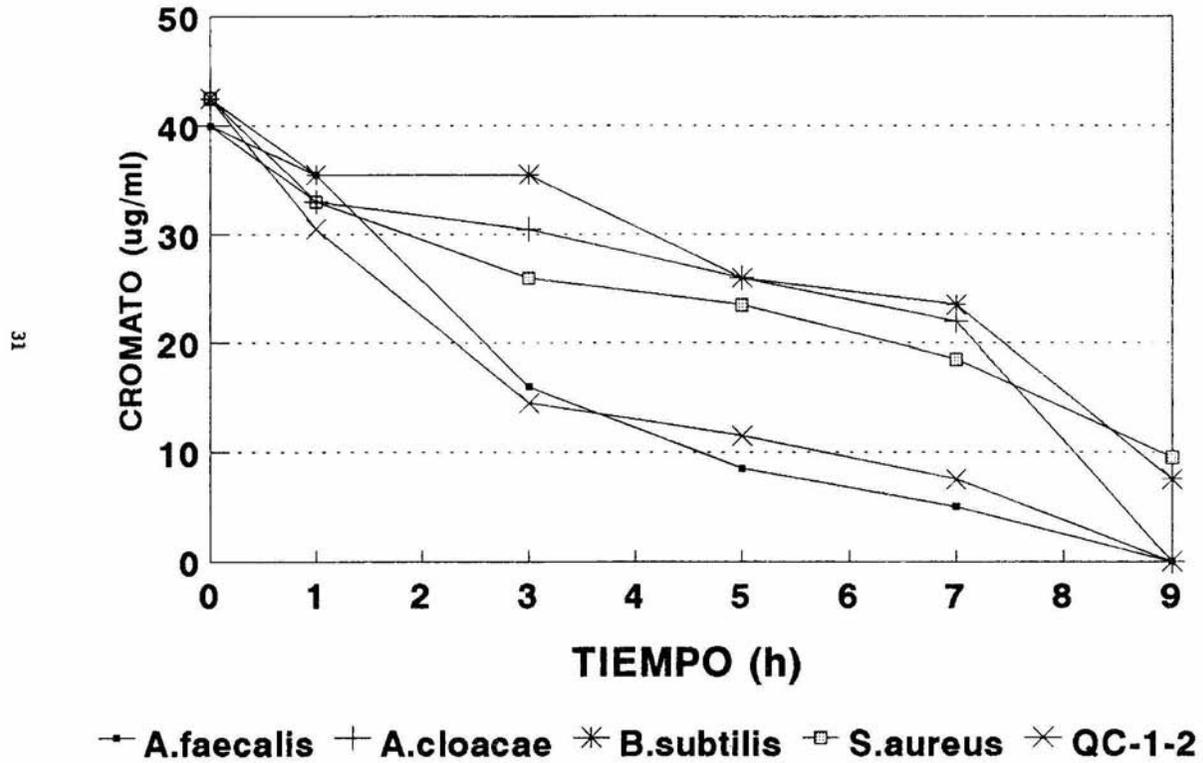
Las bacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas estándar y por morfología colonial y microscópica.

*S. aureus* forma colonias doradas en S110, es manitol positivo, coagulasa positivo y Gram positivo.

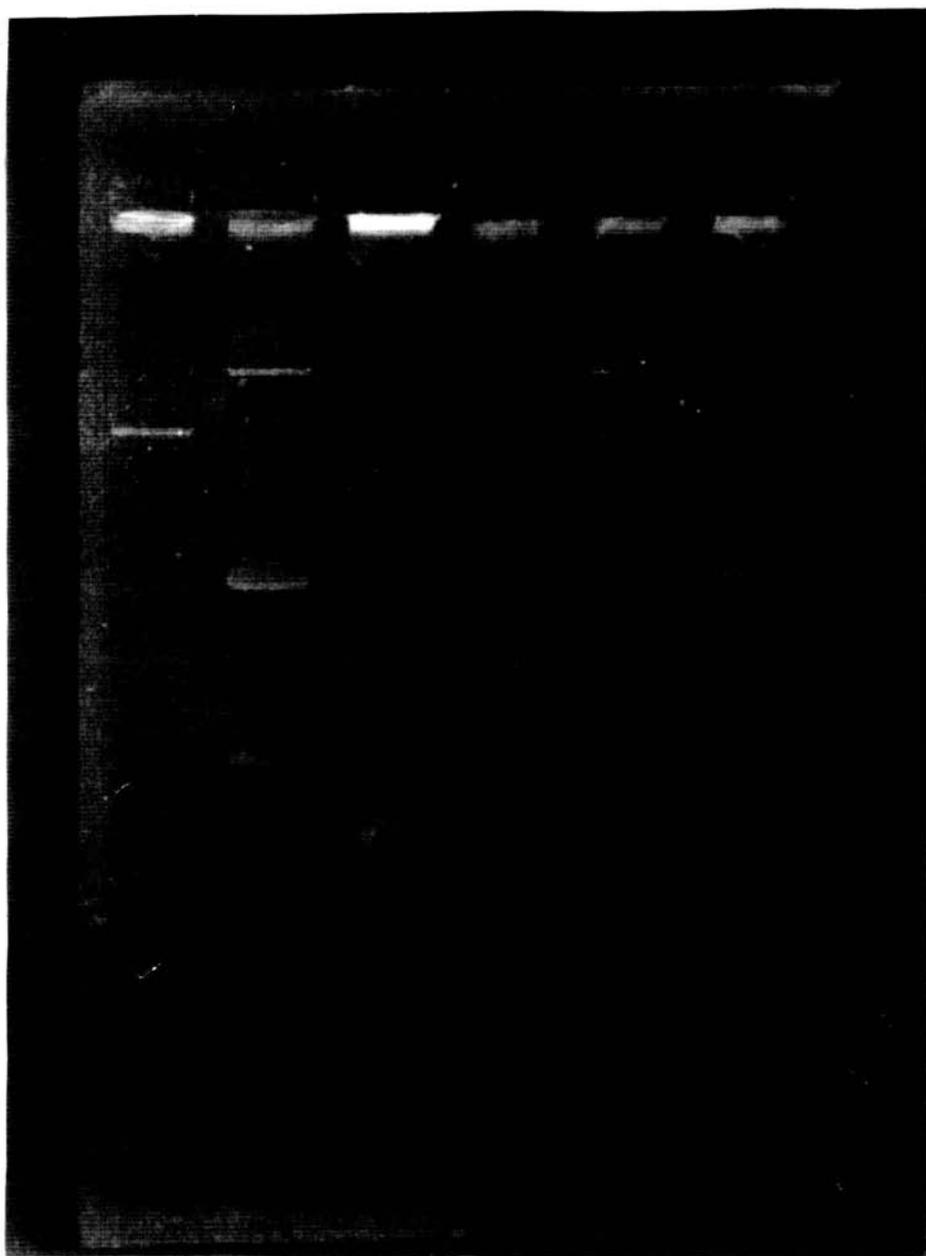
*B. subtilis* forma colonias redondas, lisas, blancas y cremosas en GS. Es Gram negativo.

**FIGURA 5. Reducción de cromato.** Se crecieron las cepas en caldo nutritivo a 30°C hasta la fase estacionaria. Las bacterias se resuspendieron en Buffer de fosfatos (aprox.  $5 \times 10^9$ /ml) más 40 µg/ml de cromato de potasio. Se incubó a 30°C con agitación y se cuantificó la concentración de CrVI con difenilcarbazida a los tiempos indicados.

**FIGURA 5**  
**REDUCCION DE CROMATO**



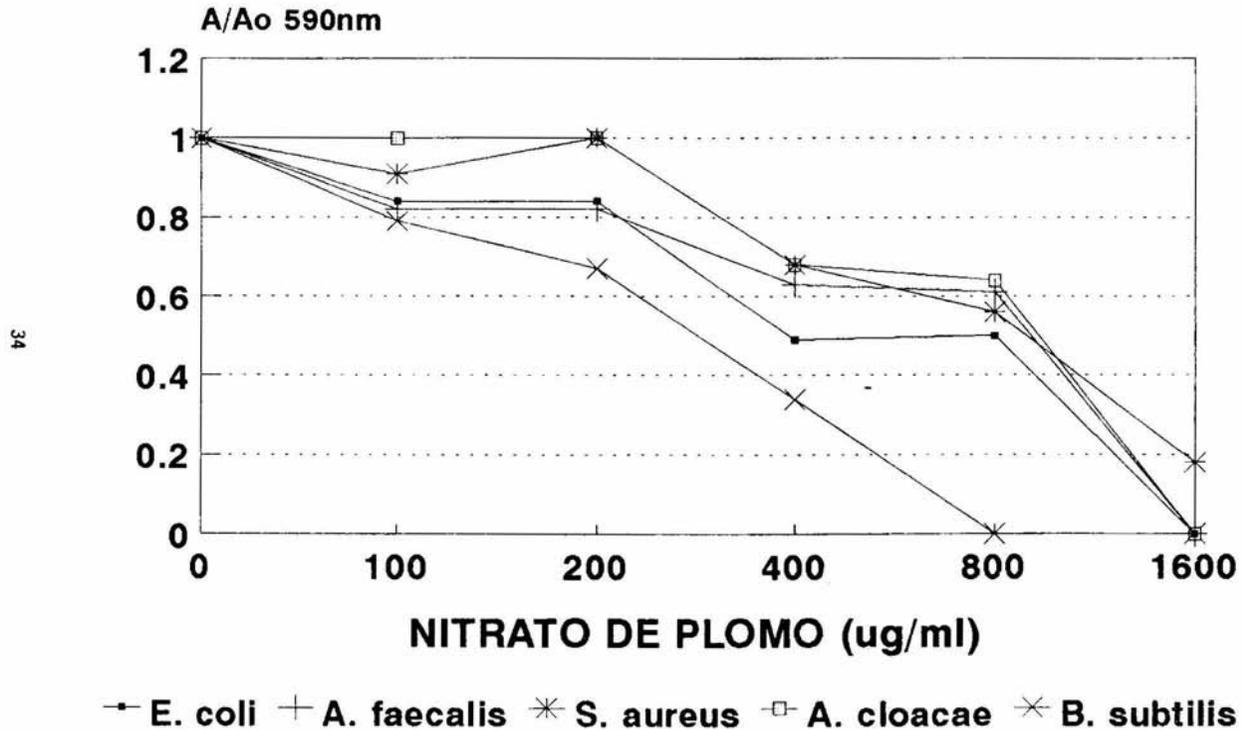
9=24h



**Fig. 6.** Electroforesis en gel de agarosa. Se usó el método de Kado (modificado para *Pseudomonas*). A) Control QC-19-2, B), E), y F) *Aerobacter cloacae*, C) *Escherichia coli*, y D) *Alcaligenes faecalis*.

**FIGURA 7.** Se preparó una serie de tubos con caldo nutritivo más nitrato de plomo a las concentraciones indicadas; éstos se inocularon con las cepas bacterianas, diluyendo 1:50 un cultivo saturado. Se incubó a 30°C con agitación y se midió la absorbancia a 590 nm.

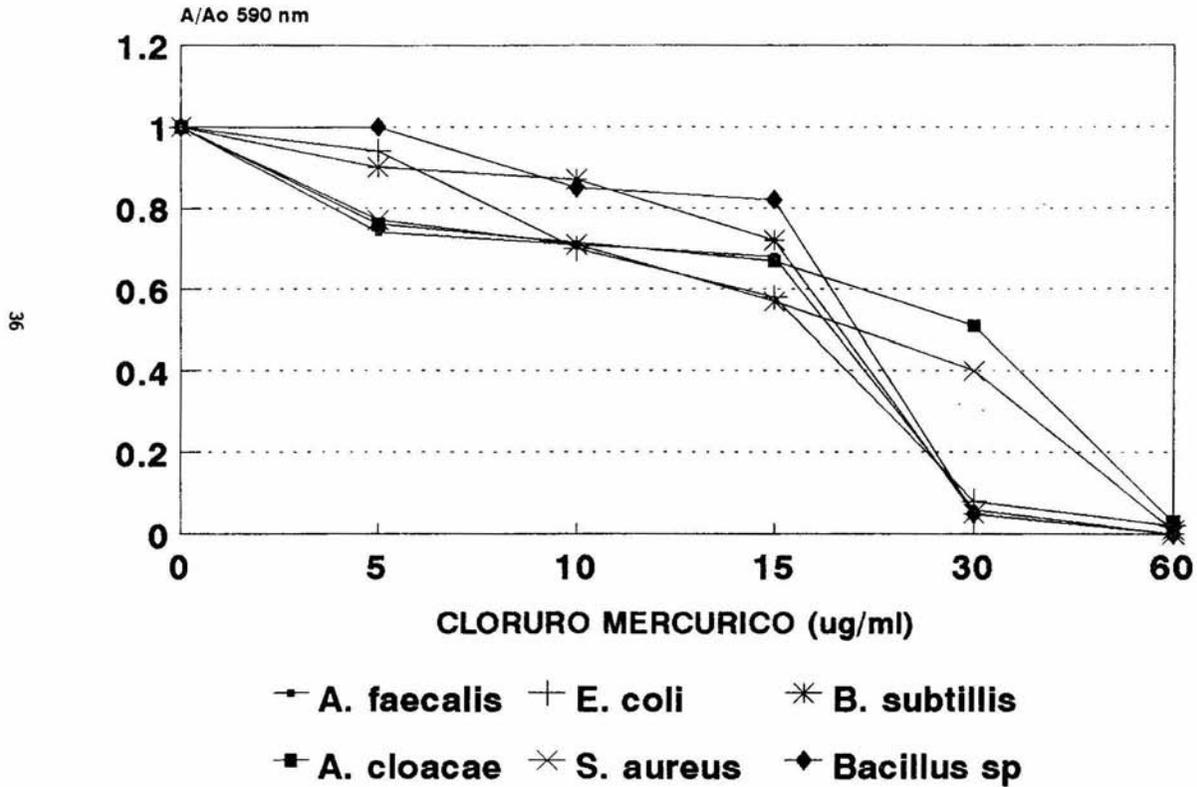
# FIGURA 7 SENSIBILIDAD A PLOMO



B ON/30. DIL. 1:50 en  
C.N.+Pb 30/24h

**FIGURA 8. Sensibilidad a mercurio.** Las condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en la leyenda de la figura 7, excepto porque se usó cloruro mercúrico.

**FIGURA 8**  
**SENSIBILIDAD A MERCURIO**



## 8. MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIOTICOS.

Todas las cepas estudiada resultaron resistentes a por lo menos dos antibióticos, como es el caso de *E.coli*, a tres, *S.aureus*, *A. cloacae* y *B. subtilis*; a cinco *Bacillus sp.* y a seis *A. faecalis*.( Tabla 6 ).

**TABLA 6. PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS**

<b>BACTERIA</b>	<b>ANTIBIOTICOS</b>
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina, cloranfenicol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tetraciclina, cloxacilina, lincomicina
<i>Bacillus subtilis</i>	Carbenicilina, nitrofurantoína, gentamicina
<i>Aerobacter cloacae</i>	Ampicilina, cefalotina, cloranfenicol
<i>Bacillus sp.</i>	Ampicilina, cefalotina, Ac. nalidíxico, nitrofurantoína, carbenicilina
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Ampicilina, cloranfenicol, Ac. nalidíxico, estreptomina, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina

Las cepas se sembraron en agar de Muller-Hinton y se determinó su resistencia a antibióticos por el método de Kirby-Bauer.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los efectos biológicos del cromo dependen de su estado de oxidación, la forma hexavalente es sumamente tóxica para los organismos vivos, presenta efectos mutagénicos y es considerada carcinogénica en humanos (40). El cromo trivalente es más estable y mucho menos tóxico además de que se considera como un micronutriente esencial (29).

Con el fin de obtener bacterias resistentes a cromato se acudió a una zona contaminada con el ión y se evaluó la concentración de cromato en diferentes puntos de muestreo por los alrededores e interior del predio que anteriormente fue la fabrica de Cromatos S.A.

Los indices de cromato obtenidos resultaron por arriba de los niveles permisibles en agua (0.05 ppm) y suelo (200 ppm) ya que en la mayoría de las muestras la concentración fue superior (Tabla 3 y Ref. 37a).

La presencia de cromato en el ambiente produce un efecto inhibitorio en los microorganismos, pero al mismo tiempo selecciona variantes resistentes.

La frecuencia de cepas resistentes disminuye a medida que aumenta la concentración de cromato y se consideran como resistentes las colonias que crecen por lo menos a 750  $\mu\text{g/ml}$  del ión que es la concentración en donde se inhibe el control sensible y también es límite poblacional entre sensibles y resistentes encontrado por otros autores (7a).

No hay diferencia significativa entre las muestras de agua y suelo ya que no se observa una tendencia definida en el número de unidades formadoras de colonia (UFC) y en la frecuencia de cepas resistentes a cromato entre los diferentes puntos de muestreo. En las muestras de agua se obtuvo un mayor número de UFC pero una menor frecuencia de cepas resistentes a cromato, lo cual es aceptable debido a que las muestras presentan menor concentración del metal y esto impide que se provoque una presión de selección.

Se aislaron seis cepas que crecieron a por lo menos 750  $\mu\text{g/ml}$  de cromato en las muestras originales, pero todas ellas fueron capaces de crecer incluso a 3000  $\mu\text{g/ml}$ , cuando fueron resembradas.

La identificación por microscopía óptica y pruebas bioquímicas dio como resultado tres cepas Gram negativas: *Aerobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Alcaligenes faecalis*; y tres Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus sp.*

Algunas bacterias resistentes a cromato son capaces de reducirlo a la forma trivalente menos tóxica que la forma hexavalente (21). En este caso, todas las cepas aisladas resistentes a cromato también fueron reductoras. *Alcaligenes faecalis* reduce al cromo dos veces más rápido que las otras cepas y casi igual que la cepa testigo QC19-2 considerada como una reductora rápida (7a).

Los determinantes genéticos que confieren resistencia a metales pesados generalmente se localizan en plásmidos y no en el cromosoma bacteriano (36). Por esta razón se analizó el contenido de plásmidos de las cepas resistentes a cromato por electroforesis en gel de agarosa según el método de Kado (modificado para *Pseudomonas*), encontrando que todas las cepas aisladas tienen bandas de DNA extracromosómico que se desplazan a diferentes distancias en el gel. En base a lo anterior se puede decir que posiblemente sea un plasmido lo que confiere la resistencia al metal pero para confirmarlo habría que hacer otros estudios como son: Transferir el o los plásmidos por conjugación a una cepa sensible a cromo para determinar si adquiere resistencia a este metal; y, curación de las cepas resistentes con naranja de acridina o bromuro de etidio para determinar si al perder el elemento genético extracromosómico pierden la resistencia a cromato.

Muchos plásmidos confieren resistencia a más de un compuesto tóxico, siendo frecuente la asociación de marcadores de resistencia a antibióticos y metales pesados. Por esta razón analizamos la resistencia a antibióticos y plomo y mercurio en las cepas que estudiamos.

En el caso del mercurio, las cepas más resistentes fueron *Aerobacter cloacae* y *Staphylococcus aureus*, cuya absorbancia se reduce al 50% hasta una concentración de 30 µg/ml del metal (Fig. 8), por lo que podemos considerarlas como resistentes, toda vez que Kondo et al. consideran resistentes a aquellas cepas cuya CMI es de 12.5 µg/ml; si bien hay que hacer notar que los métodos son diferentes, ya que en la CMI se utiliza medio sólido y la técnica de dilución en placa, registrándose la concentración mínima a la que no se observa crecimiento del inóculo, mientras que nosotros empleamos cultivos líquidos y determinamos la concentración del metal que reduce la absorbancia a la mitad.

Las cepas menos sensibles a plomo fueron *Staphylococcus aureus*, *Aerobacter cloacae* y *Alcaligenes faecalis*, cuya absorbancia se redujo al 50% hasta 900 µg/ml del metal (Fig. 7).

Respecto a los antibióticos, las seis cepas estudiadas mostraron multiresistencia, a dos antibióticos (*E. coli*), 3 (*S. aureus*, *A. Cloacae* y *B. subtilis*), 5 (*Bacillus sp.*) y 6 (*A. faecalis*). Los patrones de multiresistencia se muestran en la Tabla 6.

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que los determinantes de resistencia a metales y antibióticos que poseen las cepas estudiadas residen en plásmidos, ya que es muy poco probable que posean tantas mutaciones puntuales individuales que confieran las resistencias. Además, en todas las bacterias se observaron plásmidos cuando se realizó el análisis electroforético.

A pesar de que estas cepas fueron aisladas del ambiente, no sorprende que posean resistencia a antibióticos, ya que muy probablemente la selección para resistencia a uno (cromato) o mas metales (plomo, mercurio), permitió la selección indirecta para resistencia a antibióticos si los genes responsables de ambas están ligados físicamente en el mismo plásmido.

Se han reportado casos inversos, en donde cepas clínicas, aisladas de pacientes, sujetas a presión selectiva para resistencia a antibióticos son también resistentes a metales pesados (12).

Las bacterias resistentes a cromato y reductoras rápidas pueden, al menos teóricamente, ser utilizadas para descontaminar cuerpos de agua que contienen este metal. De las cepas que estudiamos, *A. faecalis* sería la más indicada para este propósito, ya que es resistente a cromato (CMI >3000 µg/ml) y lo reduce rápidamente (Fig. 5) mostrando también resistencia a plomo, característica que posibilitaría su uso para descontaminar el cromato de cuerpos de agua que además contengan plomo.

Sin embargo, la descontaminación del cromato presente en cuerpos de agua utilizando bacterias resistentes y reductoras es un problema que trasciende el campo de la biología, constituye más bien un problema no sólo microbiológico sino de ingeniería.

En el laboratorio es posible simular un cuerpo de agua contaminado con cromato y detoxificarlo con bacterias resistentes y reductoras. Una manera consiste en introducir el cultivo de la bacteria en una bolsa de diálisis que se coloca en el matraz, con agitación leve, para después determinar la desaparición del CrVI con la subsecuente presencia de CrIII, menos tóxico. Realizar esto en un lago o una presa es otro problema para el que se requiere la participación de ingenieros que diseñen los dispositivos adecuados. En este contexto hay que señalar también que el cuerpo de agua puede contener otros contaminantes a los que la bacteria es sensible; o bien, pueden estar presentes otros microbios u organismos más complejos que eliminen a la bacteria que se introduzca.

No obstante, el desarrollo tecnológico empleado con fines de biorremediación sólo será posible si se aíslan y caracterizan los microorganismos capaces de llevarlo a cabo, sobre todo cuando se conoce la base genética y bioquímica de la resistencia y la reducción.

## BIBLIOGRAFIA

1. AISLABIE, J. & M.W. LOUITT. 1984. The effect of effluent high in chromium on marine sediment aerobic heterotrophic bacteria. *Marine Environ. Res.* 13:69-79.
2. AJMAL, M., A.A. NOMANI & A. AHMAD. 1984. Acute toxicity of chrome electroplating wastes to microorganisms: Adsorption of chromate and chromium (VI) on a mixture of clay and sand. *Water Air Soil Pollut.* 23:119-127.
3. AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. 1982. The Sources, Chemistry, Fate and Effects of Chromium in Aquatic Environment. Washington, D.C., American Petroleum Institute.
4. BAEZ, A.P., I.P. ROSAS, R.D. BELMONT, O.G. GONZALEZ & E.B. GOMEZ. 1977. Determinación de cromo en dos poblaciones humanas no ocupacionalmente expuestas. *An. Inst. Biol. Univ. Nat. Auton. Mex.* 48:77-93.
5. BEVERIDGE, T.J., C.W. FORSBERG & R.J. DOYLE. 1982. Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. *J. Bacteriol.* 150:1438-1448.
6. BOPP, L.H., A.M. CHAKRABARTY & H.L. EHRLICH. 1983. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 155:1105-1109.
7. BOPP, L.H. & H.L. EHRLICH. 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* LB300. *Arch. Microbiol.* 150:426-431.
- 7.a CAMPOS, J. & CERVANTES, C. 1991. Aislamiento de bacterias de zonas contaminadas con cromo: II. Reducción enzimática de cromato. Anuario III, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, pp. 95-115.
8. CARY, E.W. 1982. Chromium in air, soil and natural waters. En: LANGARD, S. (ed.) *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. p. 49-64. Amsterdam, Elsevier.
9. CERVANTES, C. & H. OHTAKE. 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56:173-176.
10. CERVANTES, C., H. OHTAKE, L. CHU, T.K. MISRA & S. SILVER. 1990. Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172:287-291.
11. CERVANTES, C. & S. SILVER. 1990. Inorganic cation and anion transport systems of *Pseudomonas*. En: SILVER, S., A.M. CHAKRABARTY, B. IGLEWSKI & S. KAPLAN (eds.) *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenicity and Evolving Biotechnology*. p. 359-372. Washington, D.C., American Society for Microbiology.

12. CERVANTES-YEGA, C., J. CHAVEZ, N.A. CORDOYA, P. DE LA MORA, & J. VELASCO. 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbios* 48:159-163.
13. EFSTATHIOU, J.D. & L.L. McKAY. 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 130:257-265.
14. ENTERLINE, P.E. 1974. Respiratory cancer among chromate workers. *J. Occup. Med.* 16:523-526.
15. GRUBER, J.E. & K.W. JENNETTE. 1978. Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82:700-706.
16. HORITSU, H., S. FUTO, Y. MIYAZAWA, S. OGAI & K. KAWAI. 1987. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* 51:2417-2420.
17. HORITSU, H., S. FUTO, K. OZAWA & K. KAWAI. 1983. Comparison of characteristics of hexavalent chromium tolerant bacterium, *Pseudomonas ambigua* G-1, and its hexavalent chromium-sensitive mutant. *Agric. Biol. Chem.* 47:2907-2908.
18. ISHIBASHI, Y., C. CERVANTES & S. SILVER. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2268-2270.
19. KOMORI, K., P. WANG, A. RIVAS, K. TODA & H. OHTAKE. 1989. Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* 35:951-954.
- 19a. KONDO, I., ISHIKAWA, T. AND NAKAHARA, H. 1976. Heavy Metal Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Z. Bakt. Parasit. Infekt. Hyg. I. Abt. Suppl.* 5:212-230.
20. KVASNIKOV, E.I., V.V. STEPANYUK, T.M. KLUSHNIKOVA, N.S. SERPOKRYLOV, G.A. SIMONOVA, T.P. KASATKINA & L.P. PANCHENKO. 1985. A new chromium-reducing gram variable bacterium with mixed type of flagellation. *Mikrobiologiya* 54:83-88.
21. LEBEDEVA, E.V. & N.N. LYALIKOVA. 1979. Reduction of crocoite by *Pseudomonas chromatophila* sp. nov. *Mikrobiologiya* 48:517-522.
22. LEVIS, A.G. & V. BIANCHI. 1982. Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. In: LANGARD, S. (ed.) *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. p. 171-208. Amsterdam, Elsevier.
23. LULI, G.W., J.W. TALNAGI, W.R. STROHL & R.M. PFISTER. 1983. Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:846-854.
24. MAEDA, Y., Y. SHOJI, A. YONEDA & T. AZUMI. 1984. Preliminary studies on treatment of chromium tannery waste sludge by anaerobic digestion. *J. Ferment. Technol.* 62:421-427.

- 24a. MIRANDA, R., G. MARTINEZ, Y. PEÑA, A. GOMEZ-TAGLE & S. YACA, 1992. Resistencia bacteriana a plomo y otros metales pesados tóxicos. XII Coloquio de Investigación, ENEPI-UNAM, Nov. 30 a Dic. 4.
25. NIES, A., D.H. NIES & S. SILVER. 1989. Cloning and expression of plasmid genes encoding resistance to chromate and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:5065-5070.
26. NIES, A., D.H. NIES & S. SILVER. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
27. NIES, D.H. & S. SILVER. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171:896-900.
28. NORRIS, P.R. & D.P. KELLY. 1979. Accumulation of metals by bacteria and yeasts. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:299-308.
29. OFFENBACHER, E.G. & F.X. PI-SUNYER. 1988. Chromium in human nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 8:543-563.
30. OHTAKE, H., C. CERVANTES & S. SILVER. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169:3853-3856.
31. OHTAKE, H., K. KOMORI, C. CERVANTES & K. TODA. 1989. Chromate resistance in chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:85-88.
32. PETRILLI, F.L. & S. DE FLORA. 1977. Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:805-809.
33. ROMANENKO, V.I. & V.W. KORENKOV. 1977. A pure culture of bacteria utilizing chromates and bichromates as hydrogen acceptors in growth under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya* 46:414-417.
34. SCHROEDER, H.A. 1968. The role of chromium in mammalian nutrition. *Am. J. Clin Nutr.* 21:230-244.
35. SCHROEDER, D.C. & G.F. LEE. 1975. Potential transformations of chromium in natural waters. *Water Air Soil Pollut.* 4:355-365.
36. SILVER, S. & T.K. MISRA. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:717-743.
37. STERN, R.M. 1982. Chromium compounds: Production and occupational exposure. En: LANGARD, S. (ed.) *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. p. 5-47. Amsterdam, Elsevier.
- 37a. STOKER, H.S. & S.L. SEAGER, 1981. Química Ambiental: Contaminación del aire y del agua. Ed. Blume, Barcelona.

38. STRANDBERG, G.W., S.E. SHUMATE II & J.R. PARROTT Jr. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:237-245.
39. SUMMERS, A.O. & G.A. JACOBY. 1978. Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:637-640.
40. VENITT, S. & L.S. LEVY. 1974. Mutagenicity of chromate in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature* 250:493-495.
41. VILLALOBOS-PIETRINI, R. 1977. Efectos biológicos del cromo. *An. Inst. Biol. Univ. Nat. Auton. Mex.* 48:115-162.
42. WANG, P.C., T. MORI, K. KOMORI, M. SASATSU, K. TODA & H. OHTAKE. 1989. Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1665-1669.
43. WANG, P.C., T. MORI, K. TODA & H. OHTAKE. 1989. Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *J. Bacteriol.* 172:1670-1672.
44. WILLIAMS, J.W. & S. SILVER. 1984. Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.* 6:530-536.
45. WONG, P.T.S. & J.T. TREVORS. 1988. Chromium toxicity to algae and bacteria. En: NRIAGU, J.O. & E. NIEBOER (eds.) *Chromium in the Natural and Human Environments*. p. 305-315. New York, Wiley.
46. ZIBILSKE, L.M. & G.H. WAGNER. 1982. Bacterial growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage sludge containing cadmium, chromium and copper. *Soil Sci.* 134:364-370.