



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

PRESENCIA DEL REGULÓN *soxRS* EN BACTERIAS
AISLADAS DEL AGUA DE LOS CANALES DE XOCHIMILCO
Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

ANA PATRICIA GARCÍA GARCÍA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IRMA A. ROSAS PÉREZ.

2006





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.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
García
García
Ana Patricia
55 48 13 19
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
098204607
2. Datos del tutor
Dra
Irma Aurora
Rosas
Pérez
3. Datos del sinodal 1
Dr
Carlos Fidel
Amábile
Cuevas
4. Datos del sinodal 2
Dra
Ruth Cecilia
Vanegas
Pérez
5. Datos del sinodal 3
Dra
Silke
Cram
Heydrich
6. Datos del sinodal 4
M en C
María Eva
Salinas
Cortés
7. Datos del trabajo escrito
Presencia del regulón soxRS en bacterias aisladas del agua de los canales
de Xochimilco y su relación con el estrés oxidante
63 p
2006

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES.

Gracias por tomarse de la mano y decidir caminar juntos, gracias por despertar día a día con un espíritu lleno de vida, gracias por transmitirme la buena palabra de mis abuelos, gracias por cada lágrima, desvelo y sonrisa que compartieron conmigo y mis hermanos, espero seguir aprendiendo de ustedes, espero que éste camino que empiezo a fortalecer sea un buen reflejo de ese gran amor que me han dado.

A MIS HERMANOS.

Que dicha tan grande nos ha tocado vivir, sigamos disfrutando nuestra estancia en este mundo de mil colores, recordemos nuestras miradas, nuestros juegos y nuestras travesuras para tener siempre presente la gran familia que nos antecede, y llegar exitosos y exquisitos a nuestras metas.

A MIS PROFESORES.

A todas aquellas bonitas personas que compartieron sus conocimientos académicos conmigo y con muchos otros alumnos, les agradezco mucho por haber elegido esa forma de ejercer su profesión, maestría o doctorado, algo muypreciado para el desarrollo de México.

A LOS INVESTIGADORES que contribuyeron de forma importante en la realización de mi tesis, en especial a Mari Carmen Torres, Hugo Padilla, Raúl Belmont y Jorge Membrillo, gracias por todo su apoyo, no cabe duda que sin ése espíritu universitario, no podría llegar muy lejos la ciencia en nuestro país.

Y por si fuera poco, A MI CHAPIS Y A MI SOLESITO.

Quisiera aprovechar estas líneas para decirles, como en otras ocasiones se los he dicho, y no me cansaré de repetirlo, que ahora son el gran impulso que tengo en la VIDA, que siempre agradeceré al *gran espíritu* por las bendiciones recibidas en nuestra tierna familia.

Que las mariposas nunca dejen de revolotear en nuestros corazones.....OHKA HEY

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Descripción de los genes <i>soxR</i> y <i>soxS</i> y del regulón <i>soxRS</i>	2
1.2 Importancia clínica y biológica asociada a <i>soxRS</i>	5
1.3 El regulón <i>soxRS</i> entre las bacterias Gram-negativas	7
1.4 Agentes exógenos inductores del regulón <i>soxRS</i>	7
1.5 ¿Por qué se propone buscar bacterias que presenten el regulón <i>soxRS</i> como mecanismo de defensa al estrés oxidante generado por contaminantes del agua de los canales de Xochimilco?	11
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	14
3.2 Objetivos Particulares	14
4. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO	15
5. MÉTODOS	
5.1 Diseño experimental	17
5.2 Trabajo de campo	18
5.3 Trabajo de laboratorio	
5.3.1 Caracterización físico-química del agua	19
5.3.2 Caracterización microbiológica del agua	20
5.3.3 Presencia de los genes <i>soxR</i> y <i>soxS</i> en bacterias cultivables Gram-negativas aisladas del agua en un medio con paraquat	21
5.3.4 Inducción del regulón <i>soxRS</i> de <i>E. coli</i> K12 expuesta al agua de los canales del área de estudio	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 Características físico-químicas y microbiológicas del agua	28
6.2 Presencia de los genes <i>soxR</i> y <i>soxS</i> en bacterias cultivables Gram-negativas aisladas del agua en un medio con paraquat	33
6.3 Inducción del regulón <i>soxRS</i> de <i>E. coli</i> K12 expuesta al agua de los canales del área de estudio	39
7. CONCLUSIONES	
7.1 Características físico-químicas y microbiológicas del agua	44
7.2 Presencia de los genes <i>soxR</i> y <i>soxS</i> en bacterias cultivables Gram-negativas aisladas del agua en un medio con paraquat	45
7.3 Inducción del regulón <i>soxRS</i> de <i>E. coli</i> K12 expuesta al agua de los canales del área de estudio	47
REFERENCIAS y ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes cambios en el ambiente de La Tierra, al que fueron expuestos los primeros microorganismos, fue el aumento de la concentración de dióxígeno (O_2) en la atmósfera, como resultado de la fotosíntesis bacteriana. De acuerdo a la interacción, de por lo menos, tres mecanismos distintos de evolución: mutación, intercambio genético y simbiosis, los microorganismos desarrollaron otros sistemas químicos, tales como la utilización del O_2 en la respiración (Margulis y Sagan, 1986). El O_2 ingresar a la parte intracelular por difusión pasiva, y a través de la respiración, es el aceptor de electrones para formar H_2O , y en ocasiones Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dado que cada molécula de NADH, es capaz de donar un electrón al O_2 (Tabla 1).

Tabla 1. Principales Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y Especies Reactivas de Nitrógeno (ERNs).

Radicales libres	No radicales libres
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Ozono (O_3)
Peroxilo (ROO^{\cdot})	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Hidroperoxilo ($RHOO^{\cdot}$)	Peroxinitrilo* ($ONOO^{\cdot}$)
Óxido nítrico* (NO^{\cdot})	

*ERNs

Las EROs y ERNs son agentes causantes de estrés oxidante al intervenir en distintos procesos metabólicos, dañando macromoléculas (DNA, RNA, lípidos y proteínas), cambiando estructuras y/o funciones, hecho que seleccionó distintas estrategias en los organismos para poder sobrevivir. (Hansberg, 2002)

Generalmente, las EROs son consideradas radicales libres (moléculas con un electrón desapareado, y por tanto, muy reactivos y de vida corta) pero existen EROs que no cumplen esa definición; sin embargo, pueden romperse homolíticamente y producir radicales libres.

Los organismos que actualmente utilizan el O₂ como agente oxidante de nutrientes para la obtención de energía, han desarrollado mecanismos de expresión constitutiva que les permiten regular, compensar, excretar y reparar daños causados por EROs, además de las respuestas adaptativas ante el aumento de EROs causado por xenobióticos, quienes ingresan al ciclo de oxidoreducción celular desencadenando distintas señales para aumentar la expresión de actividades de defensa.

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa que ha servido de modelo para elucidar dudas, tanto constitutivas, como adaptativas. El regulón *soxRS* es uno de los sistemas inicialmente descritos en *E. coli*, como respuesta celular para contrarrestar el efecto negativo del estrés oxidante causado por agentes generadores de superóxido (O₂⁻) y óxido nítrico (NO[•]). (Amábile-Cuevas y Demple, 1991; Nunoshiba *et al.*, 1992)

1.1 Descripción de los genes *soxR* y *soxS*, y del regulón *soxRS*.

Los genes *soxR* y *soxS* son los responsables de la activación del llamado regulón *soxRS*; están posicionados divergentemente, con una separación de 85 pb entre sus terminaciones 5'. Se ha ubicado al locus *soxRS* a 92.2 min en el mapa genético de *E. coli* K12.

El regulón *soxRS* tiene dos etapas de activación transcripcional. Por un lado la proteína SoxR, de la que se producen constitutivamente 50-100 moléculas por célula (Pomposiello y Demple, 2001), se mantiene ligada en forma de dímero al DNA, en la región promotora de *soxS*. Al interactuar esta proteína con el O₂⁻, NO[•] o moléculas nitrosiladas, los centros activos de la proteína SoxR se oxidan, lo que genera un cambio de conformación del dímero y la consecuente expresión de *soxS*. Por su parte, la proteína SoxS induce una cascada de activación de

alrededor de 45 genes (Demple *et al.*, 2002), (Figura 1). Estos genes inducibles constituyen el regulón *soxRS* (Tabla2), los cuales actúan colectivamente para evitar o reparar el daño oxidante y así ofrecer resistencia celular a agentes generadores de O_2^- , solventes orgánicos, macrófagos generadores de NO^- , antibióticos y otros xenobióticos. (Fuentes *et al.*, 2001; Koutsolioutsuo *et al.*, 2001)

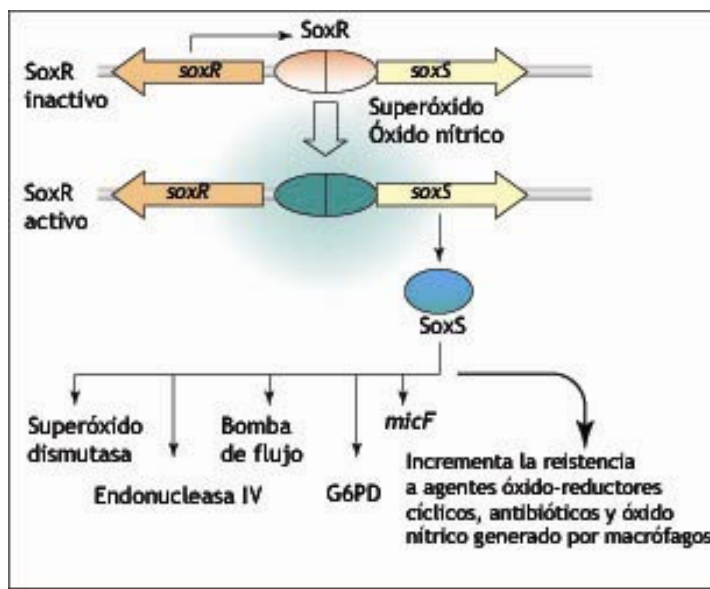


Figura 1. Mecanismos de regulación del *soxRS*. (Pomposiello y Demple, 2001)

SoxR es un polipéptido de 17 kDa. En solución, SoxR forma un dímero, donde cada monómero tiene su centro activo formado por cuatro residuos de cisteínas ligadas a un grupo metálico donde el 95% se mantiene reducido ($2Fe-2S$)²⁺ durante el crecimiento aeróbico. El dímero SoxR puede ligarse al DNA en su forma reducida u oxidada de los centros metálicos (Fe-S), pero solo en su forma oxidada activa la transcripción de *soxS*. Cuando la célula se expone a agentes generadores de O_2^- como el paraquat (ver más adelante) o generadores de NO^- , ocurre la oxidación de sus centros metálicos ($2Fe-2S$)³⁺, y por tanto hay un cambio de conformación del dímero (Figura 2) hecho que, en el modelo de activación de *soxS*, permite proponer la modificación de la topología local del promotor de *soxS*, compensando un espacio disfuncional para el reconocimiento de la RNA polimerasa, y así dar inicio de la transcripción de *soxS*.

Tabla 2. Genes descritos del regulón *soxRS*

Genes	Proteína	Función
<i>sodA</i>	Mn -superóxido dismutasa	Enzima que permite la oxidación del superóxido.
<i>zwf</i>	glucosa-6-fosfato dehidrogenasa	Enzima que reduce al NADPH.
<i>fldA</i> y <i>fldB</i>	dos flavodoxinas	Proteínas que re-reducen metales oxidados en grupos prostéticos.
<i>fpr</i>	NADPH-ferredoxin reductasa	
<i>fur</i>	Regulador del hierro activado por manganeso	Proteína que regula negativamente operones que codifican enzimas involucradas en el transporte del hierro.
<i>nfo</i>	Endonucleasa IV	Enzima reparadora del DNA.
<i>acrAB</i>	Bomba de flujo	Interviene en la excreción de tóxicos.
<i>acnA</i>	Aconitasa A	Enzima del ciclo de Krebs, cataliza la reacción reversible que convierte citrato a isocitrato, sintetizada en fase estacionaria.
<i>nfsA</i>	Nitroreductasa A	Enzima que cataliza la reducción de nitrocomponentes, dependiente de NADPH y flavin reductasa
<i>ribA</i>	GTP ciclohidrolasa	Enzima que cataliza la conversión de GTP para formar dihidroneopterin trifosfato.
<i>micF</i>	RNA-antisentido	Regulador génico que inhibe la expresión de porinas OmpF, reduciendo la permeabilidad de la membrana.
<i>fumC</i>	Fumarasa C	Enzima resistente al superóxido que reemplaza fumarasa sensible a superóxido, sigue el ciclo de Krebs.
<i>Soi17/19 y 28</i>		Función desconocida
<i>yggx</i>		Protege los grupos metálicos Fe-S de proteínas.

(Greenberg *et al.*, 1990; Amábile-Cuevas y Demple, 1991; Nunoshiba *et al.*, 1992; Liochev *et al.*, 1999; Pomposiello y Demple, 2001).

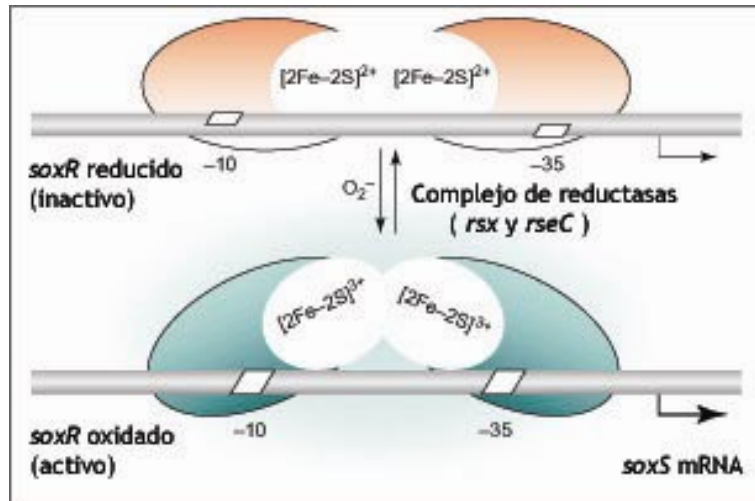


Figura 2. Mecanismo de activación de la proteína SoxR (Pomposiello y Demple, 2001)

La oxidación de SoxR es rápida, después del estrés por la exposición al O_2^- o NO^- , SoxR es re-reducido en unos cuantos minutos. Recientes estudios han contribuido para caracterizar a los loci *rsx* y *rseC* como componentes de un complejo de reductasas de la membrana citoplasmática, necesarios para mantener el estado reducido de SoxR. (Koo *et al.*, 2003)

SoxS es una proteína de 13 kDa y se le asocia a la familia de activadores transcripcionales AraC, por la homología con la región C- terminal que predice un helix-turn-helix, dominio de activación del RNA polimerasa de distintos genes (Amábile-Cuevas y Demple, 1991). La actividad de SoxS es regulada por su concentración intracelular y por su enlace a las regiones promotoras de los genes del regulón.

1.2 Importancia clínica y biológica asociada al regulón *soxRS*.

La activación del regulón *soxRS* representa un mecanismo de defensa que aumenta la resistencia a la exposición de agentes generadores de estrés oxidante, a diferentes antibióticos y a la actividad de los macrófagos, por lo que el regulón

soxRS ha sido considerado como un locus de virulencia. (Nunoshiba *et al.*, 1995; Fuentes *et al.*, 2001)

La combinación entre la actividad de algunos genes del regulón *soxRS*, como la de *acrAB* que codifica la bomba de expulsión de xenobióticos, o la disminución de la permeabilidad de la membrana donde influye *micF* al inhibir la traducción de porinas OmpF, lo ha propuesto como un mecanismo de resistencia eficiente que disminuye la concentración intracelular de un antibiótico. (Greenberg *et al.*, 1990; Koutsolioutsou *et al.*, 2001; Koutsolioutsou *et al.*, 2005)

En el caso de *E. coli*, se ha demostrado que la inducción del regulón *soxRS* aumenta la resistencia al cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina, ampicilina, bleomicina y ciprofloxacina (Greenberg *et al.*, 1990; Koutsolioutsou *et al.*, 2005), mientras que en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium confiere resistencia al ácido nalidíxico, tetraciclina, ciprofloxacina y cloranfenicol (Koutsolioutsou *et al.*, 2001) hecho que puede limitar el empleo de éstos antibióticos ante problemas sanitarios provocados por serovariedades patógenas de dichas bacterias. No obstante, desde el punto de vista ecológico, el estudio de la resistencia bacteriana a distintos factores de estrés ambiental, ha permitido entender y caracterizar distintos mecanismos (p. ej. regulón *soxRS*) que se activan, como respuesta evolutiva, para sobrevivir al cambio de un ambiente y seguir reproduciéndose y colonizando nuevos hábitats.

Por ejemplo, retomando a *E. coli* como un microorganismo a quien se ha considerado como comensal del intestino de mamíferos con diferentes variantes patogénicas (Winfield y Groisman, 2003), cuando sale de su hábitat primario que es el intestino se encuentra con distintos factores de estrés ambiental, tales como el ozono, agente generador de estrés oxidante presente en la atmósfera, del cual se demostró que el regulón *soxRS* brinda protección (Jiménez *et al.*, 2001); o distintos metales como el mercurio, el cual también se ha demostrado que induce la expresión de SoxR. (Fuentes y Amábile-Cuevas, 1997)

1.3 El regulón *soxRS* entre las bacterias Gram-negativas.

Se ha buscado a los genes *soxR* y *soxS* en otras bacterias de importancia clínica. Actualmente, con base en el análisis de secuencias de nucleótidos, se han encontrado homólogos de *soxR* y *soxS* en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, mientras que en los cromosomas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* hay ORFs (open reading frames) de posibles proteínas homólogas de SoxR de *E. coli*, pero no de SoxS (Fuentes *et al.*, 2001). Así mismo existe un reporte de que *Enterobacter agglomerans* presenta una proteína homóloga de SoxS y no de SoxR (Nunoshiba *et al.*, 1995). Sin embargo se predicen homólogos de *soxR* para por lo menos 12 especies de eubacterias, basándose en las secuencias genómicas completas (Dempfle *et al.*, 2002), aunque se requieren más estudios para aclarar si la función de dichos homólogos también se relaciona con la protección al estrés oxidante.

1.4 Agentes exógenos inductores del regulón *soxRS*.

Tomando en cuenta que el regulón *soxRS* se induce ante la exposición a agentes generadores de $O_2^{\cdot-}$ y NO^{\cdot} , y que el paraquat (PQ) depende de ciclos intracelulares de reducción y autooxidación para la producción primaria de $O_2^{\cdot-}$ y secundaria de H_2O_2 y así tener su efecto tóxico (Fridovich, 1983; Minakami *et al.*, 1990), se ha estudiado, utilizado y comprobado que el PQ es un eficiente inductor del regulón *soxRS* (Wu y Weiss, 1991), no obstante se han mencionado otros activadores del regulón como:

- © Menadiona, o vitamina K, agente oxido reductor cíclico que interviene en el transporte de electrones, utilizado en el tratamiento de pacientes con deficiencia en la fosforilación oxidativa. (Nunoshiba *et al.*, 1992; Shneyvays *et al.*, 2005)

- © Plumbagina, aislado de extractos de plantas *Plumbago* sp, el cual se ha utilizado como antibiótico por sus efectos antimicrobianos, anticancerígeno y cardiotónico, entre otros (Nunoshiba *et al.*, 1992; Panichayupakaranant y Tewtrakul, 2002)
- © Fenazin metosulfato, fármaco utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, tripanocida *in vitro*, inhibe la multiplicación de *Trypanosoma cruzi* y produce superóxido. (Nunoshiba *et al.*, 1992; Stoppani, 1999)
- © 4-nitroquinolona-N-óxido (4NQO), aromático policíclico considerado carcinogénico, bacteriostático y fungistático, así como algunos de sus derivados, 4-nitropiridina-N-óxido (4NPO) y 4-hidroxiaminoquinolona-N-óxido (4HAQO) caracterizados también como agentes oxido-reductores cíclicos. (Nunoshiba y Demple, 1993; Bond *et al.*, 1970)

El Metil viologen (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium), mejor conocido como paraquat, es un herbicida cuaternario nitrogenado (Suntres, 2002), altamente tóxico en presencia de oxígeno puesto que acelera la formación de EROs por transferencia de electrones. Como agente óxido-reductor cíclico es capaz de desviar un electrón desde las coenzimas NADH o NADPH para la reducción del oxígeno molecular (Figura 3), generando así un flujo de superóxido. (Kappus y Sies, 1981; Amábile-Cuevas y Demple, 1991)

El PQ se ha utilizado como ingrediente activo de herbicidas populares en el mundo como Weedol® y Pathclear® (Monk *et al.*, 1999) por tener gran afinidad de adsorción a partículas del suelo y materia orgánica, a pesar de que su principal desventaja es el de ser fotosensible. Además, por las concentraciones en las que se aplica en la agricultura, el PQ es considerado altamente tóxico para la mayoría de los organismos. (Suntres, 2002)

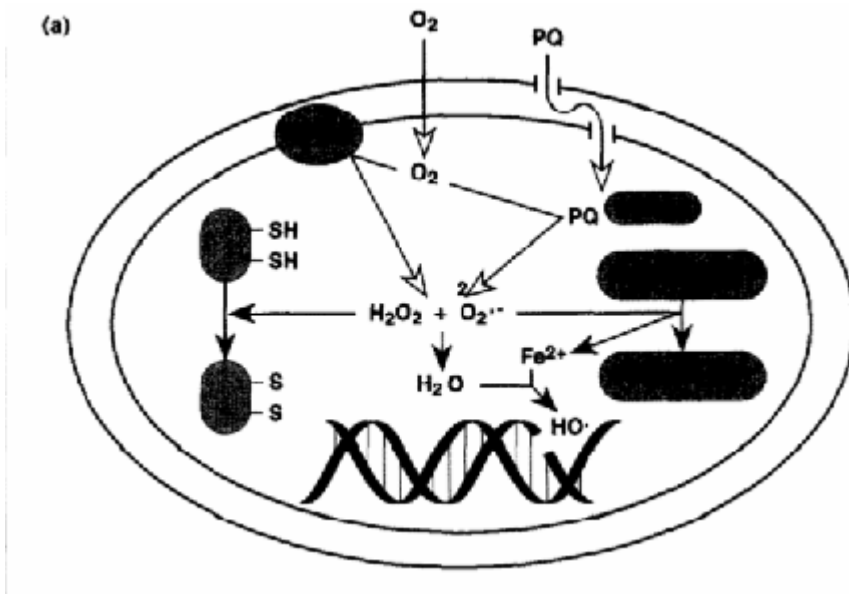


Figura 3. Mecanismo de acción del paraquat (PQ) a nivel celular (Storz e Imlay, 1999)

El Oxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es un radical libre que ha sido, recientemente, reconocido como una molécula implicada en los mecanismos de señalización. El $\text{NO}\cdot$ es un gas que puede ser generado en el endotelio vascular, en las neuronas o por macrófagos y algunos leucocitos, quienes además de producir superóxido y peróxido de hidrógeno ante un ataque microbiano, también sintetizan la enzima óxido nítrico sintasa inducida por la activación de endotoxinas y citocinas. Dicha enzima metaboliza la arginina, utilizando oxígeno y NADPH, y genera $\text{NO}\cdot$ (proceso que se relaciona con el citocromo P450). El producir grandes cantidades de $\text{NO}\cdot$ como un citotóxico, ayuda a la destrucción celular de tumores y ofrece protección para la invasión de microorganismos. (Store e Imlay, 1999)

El $\text{NO}\cdot$ ingresa a la parte intracelular por difusión pasiva y puede inhibir la función de la aconitasa (Acn) o de la citocromo oxidasa. El peroxinitrilo (HOONO) es formado durante la reacción extracelular entre $\text{O}_2\cdot^-$ y $\text{NO}\cdot$; éste puede difundir dentro de la célula e interactuar con los residuos de cisteínas o los grupos de hierro-azufre. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado también en la parte extracelular, oxida los residuos de cisteínas y, en conjunción con el hierro, al DNA.

Estas reacciones tóxicas han sido demostradas con el cultivo de bacterias, pero no han sido probadas en bacterias fagocitadas (Figura 4)

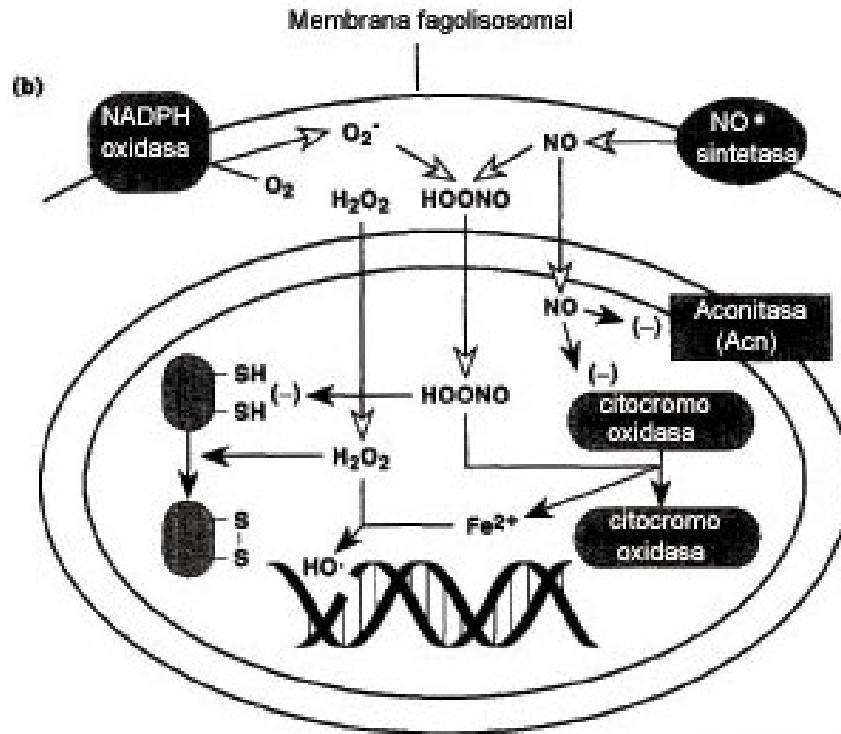


Figura 4. Contribución de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y de Nitrógeno (ERNs) al daño celular durante la fagocitosis. Las flechas de cabeza blanca indican el recurso de las EROs y ERNs, y las flechas de cabeza negra denotan el daño que éstas causan. (Storz e Imlay, 1999)

La activación del regulón *soxRS* a partir del $\text{NO}\cdot$ tiene implicaciones biológicas importantes, por ejemplo en la interacción de *E. coli* con un macrófago, si éste último genera $\text{NO}\cdot$ tal que pueda inducir al regulón *soxRS* de *E. coli*, activaría un componente múltiple de defensa para la bacteria. (Nunoshiba *et al.*, 1993)

1.5 ¿Por qué se propone buscar bacterias que presenten el regulón *soxRS* como mecanismo de defensa al estrés oxidante generado por los contaminantes del agua de los canales de Xochimilco?

El sistema chinampero de Xochimilco es un sistema formado por parcelas agrícolas suburbanas de alta productividad (Losada *et al.*, 1998), rodeadas por canales de irrigación en lo que fue el lago de Xochimilco, localizado en la parte Sur de la Cuenca de México. Actualmente, es el único lugar en el mundo que mantiene este tipo de sistema agrícola, las chinampas, por ello la UNESCO en 1987 lo declara "Patrimonio de la Humanidad", además de ser considerada como Área Natural Protegida por albergar diversas especies acuáticas y terrestres, endémicas, migratorias e introducidas. (DDF, 1993, citado por Wirth, 1997)

El agua de los canales es el recurso indispensable para el buen funcionamiento de las chinampas, además de ser el medio donde se desarrollan distintos organismos, como los peces (base económica de muchas familias), el ajolote (*Ambystoma mexicana*, especie endémica y en peligro de extinción) o bacterias degradadoras de materia orgánica (importantes en los ciclos biogeoquímicos). Sin embargo, ha cambiado en calidad y volumen a través del tiempo, por un lado por sustituir la fuente de abastecimiento que en un inicio era el agua de los manantiales, la cual fue entubada a través de un acueducto que transporta el agua hacia la Ciudad de México, y por lo cual, a mediados del siglo XX fue necesario introducir a los diferentes canales aguas residuales de diferentes plantas de tratamiento sin control de calidad, como la proveniente del Cerro de la Estrella y San Luis Tlaxiátemalco. Por otro lado, se ha construido un sistema de pozos para la extracción de agua de los mantos acuíferos para continuar con el suministro a la Ciudad de México, provocando el hundimiento de algunas parcelas o chinampas.

Asimismo, las distintas actividades antropogénicas que se llevan a cabo en la zona chinampera, representan fuentes importantes de contaminación, como son: la tecnificación de la agricultura empleando diversos plaguicidas y fertilizantes, el turismo, la introducción de especies exóticas, como el lirio acuático, la carpa y la tilapia, entre otros. Intervienen también los asentamientos irregulares que vierten sus aguas negras directamente a los canales, desde 1950 (Wirth, 1997) hasta la actualidad con frecuencia desconocida, ya que no se cuenta con un sistema de drenaje. Hechos que limitan el potencial ecológico del sistema chinampero, dado que cualquier contaminante que se deseché o introduzca, puede dispersarse y causar efectos negativos a los cultivos, al manto freático y a la biota del sistema.

La contaminación fecal del agua de los canales ha causado particular interés, ya que puede representar un riesgo para la salud de gente de fuera y dentro de Xochimilco, ya que el agua es empleada para riego de alimentos que se consumen crudos, para el desarrollo de organismos acuáticos y para diferentes actividades que implican contacto primario o secundario. Por otro lado se presenta el transporte de bacterias, algas u otros microorganismos a través del aire, representando un riesgo potencial sanitario. (Rosas *et al.*, 1987)

La detección de *E. coli* en el agua de los canales ha sido el indicador más utilizado para evidenciar la persistencia de la contaminación fecal, pues como se ha mencionado, su hábitat primario es el intestino de mamíferos, y al aislarla de un ambiente externo, se propone que proviene de desechos fecales. Así es que para estimar el ingreso de contaminación fecal en el agua de los canales de Xochimilco, se han cuantificado bacterias coliformes fecales y se han aislado serovariedades de *E. coli* asociados a distintos patotipos; como STEC, ETEC, EPEC, EIEC y EAEC (Montiel, 2005). También se han aislado otras bacterias como *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginoliticus* (Solís, 2005) y *Salmonella enterica* var. Paratyphi (Rodríguez y Urzua, 1998).

Retomando lo que hemos dicho sobre el regulón *soxRS*, y la situación actual del sistema chinampero de Xochimilco, se planteó evaluar la posible existencia, en el agua de los canales de Xochimilco, de bacterias (patógenas o degradadoras) que presenten el regulón *soxRS* como mecanismo de defensa ante la presencia de contaminantes generadores de estrés oxidante, en la columna de agua, tales como el cobre, el cadmio, el cromo, el plomo, el mercurio, el vanadio, entre otros xenobióticos (Stohs y Bagchi, 1995), con el fin de contribuir al panorama general sobre el impacto ambiental que pueden estar causando distintos contaminantes en la zona chinampera de Xochimilco.

Por ello, en el presente trabajo se eligieron tres sitios de muestreo, donde se desarrollan distintas actividades antropogénicas, Puente de Urrutia (actividad agrícola), La Draga (entrada principal del agua tratada proveniente del Cerro de la Estrella) y San Lorenzo (asentamientos irregulares). Se buscaron los genes *soxR* y *soxS*, responsables de la activación del regulón, en bacterias Gram-negativas del agua de los canales, aisladas de un medio con paraquat como medio selectivo de bacterias que presenten un mecanismo protector de dicho factor de estrés. Además, en un ensayo *in vitro* (con la fusión genética *soxS::lacZ*), se evaluó si el agua de los canales induce la expresión del regulón *soxRS* de *E. coli* lo que nos puede sugerir la presencia de contaminantes generadores de estrés oxidante.

2. HIPÓTESIS

En el agua de tres canales del sistema chinampero de Xochimilco, asociado a diferentes actividades antropogénicas, encontraremos bacterias que presentan los genes *soxRS* como mecanismo de protección y reparación del daño por estrés oxidante. Además, los contaminantes del agua de los canales inducirán la expresión del regulón *soxRS* de *E. coli* como indicador de estrés por superóxido.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de los genes *soxR* y *soxS* en bacterias Gram-negativas, así como la capacidad del agua de los canales de Xochimilco, de inducir la fusión *soxS::lacZ*.

3.2 Objetivos Particulares

- ❖ Caracterizar el agua de los canales de Xochimilco muestreados, tomando en cuenta parámetros físico-químicos y microbiológicos.
- ❖ Aislar bacterias Gram-negativas del agua de los canales de Xochimilco, resistentes al paraquat, e identificarlas a través de pruebas bioquímicas. Asimismo determinar en éstas la presencia de los genes *soxR* y *soxS* iniciadores de la expresión del regulón *soxRS* mediante la técnica de PCR.
- ❖ Evaluar si el agua de los canales de Xochimilco induce la expresión de *soxS*, utilizando como indicador la fusión genética *soxS::lacZ*.

4. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

El sistema chinampero donde se realizó el estudio pertenece a la delegación de Xochimilco, la cual tiene una extensión de 128.1 km² y se localiza al sur de la Cuenca de México.

Tiene como límites políticos la delegación de Milpa Alta al sur, Tlahuac al este, Coyoacán e Iztapalapa al norte y Tlalpan al oeste. Como límites geográficos podemos mencionar la Sierra de Santa Catarina ubicada al noroeste, los volcanes Popocatepetl e Iztaccíhuatl al este, el volcán Teuhtli al sureste, la Sierra del Chichinautzin al sur y al suroeste el cerro de Xochitepec y el Ajusco.

Con el objeto de tener el agua de los canales de Xochimilco con diferente aporte de contaminación se seleccionaron tres sitios de muestreo (Tabla 3) donde se realizan diferentes actividades:

- ❖ Puente de Urrutia, es un canal primario donde predominan las actividades agrícolas, este sitio se conecta con el canal de Apatlaco.
- ❖ La Draga, también es un canal primario, se encuentra en una zona sub-urbana puesto que hay algunas casas y centros deportivos. Sin embargo, se eligió este lugar por tener la entrada principal de agua tratada al sistema chinampero, proveniente de la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella; éste sitio se encuentra sobre el canal Nacional, el cual se conecta con el canal de Cuemanco.
- ❖ El petrolero de San Lorenzo, canal terciario, se encuentra dentro de la zona urbana, en el Barrio de San Lorenzo, donde existe aporte directo de aguas negras por las casas construidas al borde del canal, también se conecta con el canal de Apatlaco.

Tabla 3. Coordenadas y símbolos de los sitios de muestreo.

Sitio	Símbolo	Latitud N (UTM) ¹	Longitud W (UTM)
Puente de Urrutia	PU	0492097	2129484
La Draga	LD	0488995	2130631
San Lorenzo	SL	0489985	2130091

¹UTM= Universal Transvers Mescator

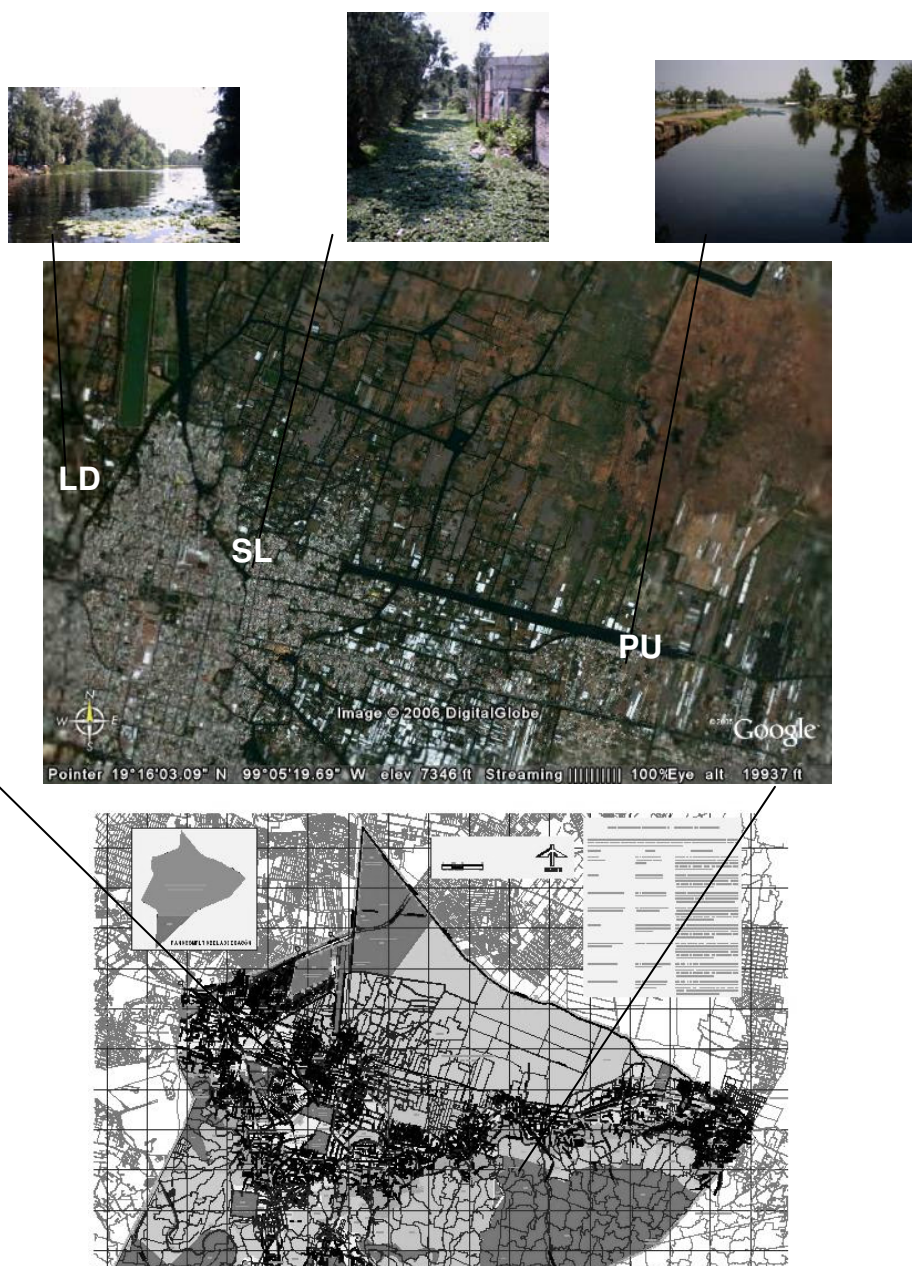
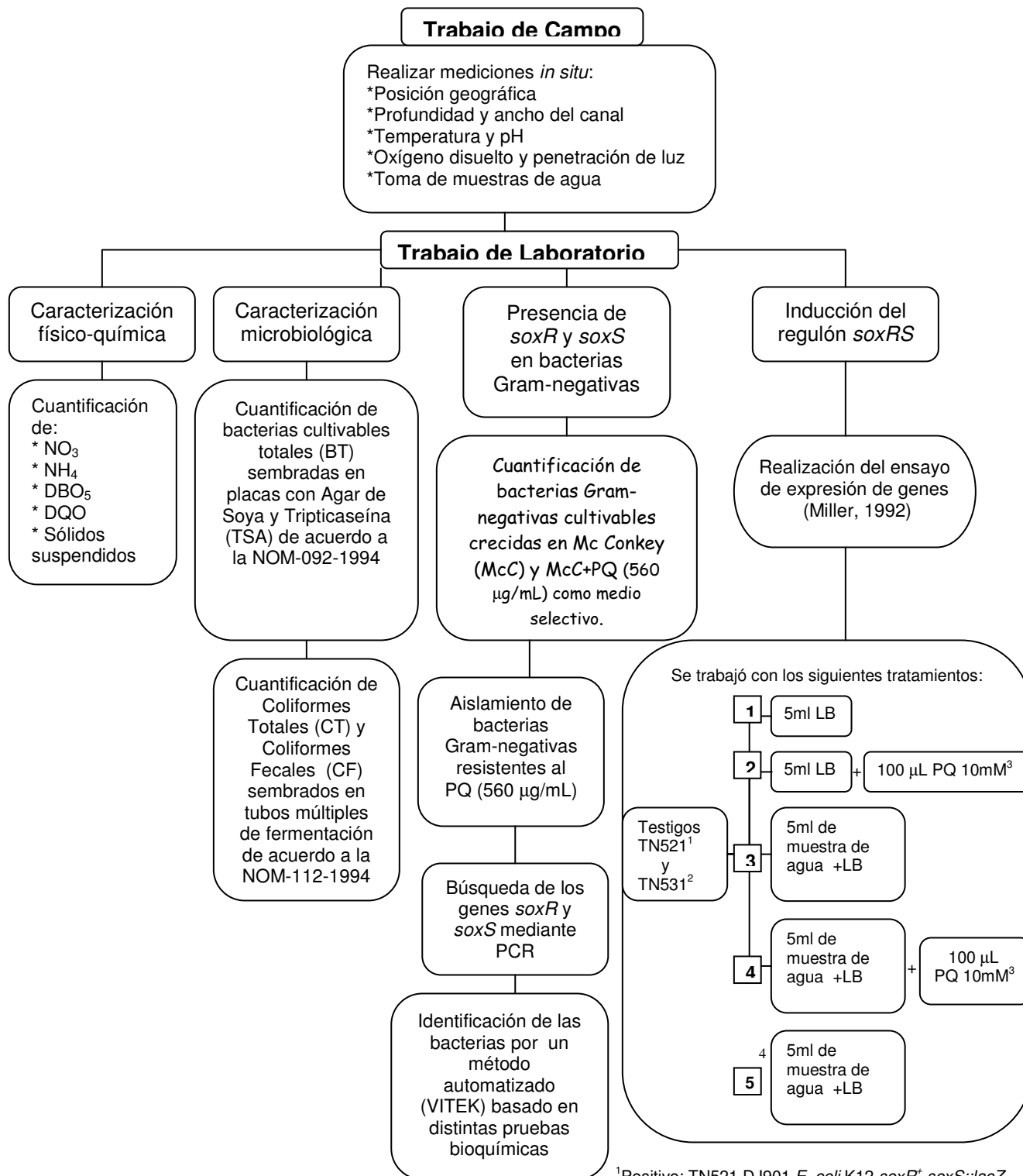


Figura 5. Localización de los sitios de muestreo, mostrando la parte inferior de la Delegación Xochimilco y en la parte media la zona chinampera.

5. MÉTODOS

5.1 Diseño experimental



¹Positivo: TN521 DJ901 *E. coli* K12 *soxR*⁺, *soxS*::*lacZ*
²Negativo: TN531 DJ901 *E. coli* K12 *soxR*⁻, *soxS*::*lacZ*
³Para tener una concentración final de 200 µM en 5 mL
⁴Tratamiento sin TN521 ni TN531, ver métodos.

5.2 Trabajo de campo.

El trabajo de campo consistió en la colecta del agua de los tres canales de Xochimilco utilizando una botella VanDorn horizontal de 3 L de capacidad, la cual permite muestrear a diferentes profundidades de la columna de agua. Todos los muestreos se realizaron a $2/3$ de la profundidad total, para tener mayor representatividad de una columna de agua. Las muestras de agua se colocaron en frascos de vidrio con tapa hermética, de 250 mL, previamente esterilizados a $115-120^{\circ}\text{C}$ / 1.05 atm durante 15 min. Los muestreos se efectuaron de 10:00 a 12:00 h., conservando las muestras en hielo hasta llegar al Laboratorio de Microbiología Ambiental, de la Facultad de Medicina-UNAM, para continuar con el análisis.

En cada muestreo se tomaron los siguientes datos:

- Posición geográfica: geoposicionador.
- Profundidad del canal: varilla graduada.
- Ancho del canal: cinta métrica.
- Temperatura del agua: termómetro de campo.
- pH del agua: potenciómetro de campo
- Oxígeno disuelto del agua: oxímetro de campo
- Penetración de luz: disco de Sechi

Las muestras se colectaron de Noviembre del 2004 a Abril del 2005, considerándola temporada de secas.

5.3 Trabajo de laboratorio.

5.3.1 Caracterización físico-química del agua

Para la caracterización físico-química de las muestras de agua, se cuantificaron en laboratorio los siguientes parámetros, además de los medidos *in situ*, Sólidos Suspendidos, Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅), Demanda Química de Oxígeno (DQO), nitratos (NO₃) y amonio (NH₄), ver ANEXO 1, en colaboración con el Laboratorio de Química Atmosférica, del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

Se tomaron las muestras de agua con la botella VanDorn horizontal y se colocaron en botellas de plástico previamente lavadas con agua desionizada, manteniéndose en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio. Los sólidos suspendidos fueron obtenidos de un volumen de 100 mL de agua, la cual fue filtrada a través de membranas Millipore de 0.45 µm de diámetro del poro. Previamente los filtros se estabilizaron durante 24 h. a 20 °C ± 2 °C y 40% ± 2% de humedad relativa y se pesaron en una balanza analítica Sartorius 0.01mg. Después de filtrar la muestra, los filtros se desecaron en una estufa a 50 °C por 24 h., se estabilizaron y se pesaron nuevamente. La DBO₅ y la DQO fueron evaluadas siguiendo las técnicas que se especifican en American Public Health Association-APHA *et al.*, 2005. Los NO₃ y el NH₄ fueron analizados usando un cromatógrafo de líquidos de alta presión para analizar iones (HPLC), Perkin Elmer, equipado con una bomba isocrática 250, con un detector de conductividad, empleando una columna Hamilton PRP-X100, de intercambio aniónico. Para el NO₃ el volumen de la inyección fue de 100 µL. La fase móvil fue ácido ftálico 2mM al 10% en acetona, ajustado a pH 5 con NaOH, con un flujo de 2mL/ min. Para el NH₄, el volumen de inyección fue de 50 µL. La fase móvil fue una solución de HNO₃ 4mM en agua-metanol (7:3), a un flujo de 2mL/ min. Las condiciones analíticas fueron las siguientes: una columna Hamilton PRP-X200, un módulo de suspensión 335SPCS, un cartucho supresor de cationes Altech.

5.3.2 Caracterización microbiológica del agua

A cada muestra se les determinaron bacterias cultivables mesófilas aerobias, consideradas como bacterias totales (BT), bacterias coliformes totales (CT) y bacterias coliformes fecales (CF).

❖ *Cuantificación de bacterias totales cultivables (BT)*

El método se basa en el crecimiento de una colonia a partir de una célula o de un cúmulo de células (bacteria cultivable) presente en una muestra de alimento o agua, donde se recomienda realizar diluciones de la muestra directa para una mejor cuantificación. En este caso se realizaron 4 diluciones (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de la muestra de agua directa. Se tomaron alícuotas de 100 μ L de la muestra directa y de sus diluciones para sembrar por espatulado en agar de soya-tripticaseína (TSA), medio general para el conteo de Bacterias mesófilas aerobias Totales cultivables (BT). Cada tratamiento y dilución se realizó por duplicado. Después de la inoculación de las placas, se incubaron a 37 °C de 24 a 48 h. para su cuantificación.

❖ *Cuantificación de Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF)*

Las bacterias coliformes son bacilos Gram-negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35 °C fermentan la lactosa. El método se basa en que las bacterias coliformes producen ácidos y CO₂ como resultado de la fermentación de la lactosa, al ser incubadas a 35 \pm 1 °C durante 24 – 48 h., lo cual se detecta por la producción de una burbuja de gas en la campana de fermentación. Se utilizan tres medios de cultivo, caldo lactosado, como medio de enriquecimiento bacteriano; caldo lactosado, verde brillante y bilis al 2% (LBVB) como medio de confirmación, el cual tiene un inhibidor para el crecimiento de bacterias gram positivas y así tener solo el crecimiento de CT; y caldo EC como

medio selectivo, donde la incubación es a $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 – 48 h. en baño maría termostático, para determinar el crecimiento de CF.

Las muestras se cultivaron de forma directa y con 4 diluciones en solución isotónica (NaCl 0.85 %), por triplicado. Primero se inocularon alícuotas de 1 ml de la muestra en 10 mL de caldo Lactosado y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 – 48 h., después se seleccionaron los tubos con producción de gas y se tomó de cada uno 100 μL para inocularlo en 10 mL de caldo LBVB y de nuevo se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 – 48 h. Por último se volvieron a elegir los tubos con producción de gas para tomar 100 μL del contenido e inocularlo en 10 mL de caldo EC e incubarlo a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 h.

5.3.3 Presencia de los genes *soxR* y *soxS* en bacterias cultivables Gram-negativas aisladas del agua en un medio con paraquat

❖ Aislamiento de bacterias

Siguiendo la técnica de cuantificación de UFC por placa descrita en la NOM-092-1994, se sembraron por espatulado alícuotas de 100 μL de muestra de agua directa y de 3 diluciones (1:10, 1:100, 1:1000) en Mc Conkey (McC), medio selectivo para el conteo de bacterias Gram-negativas y Coliformes totales, y en McC + PQ (560 $\mu\text{g}/\text{mL}$), medio selectivo para el conteo de bacterias Gram-negativas y Coliformes Totales resistentes a PQ. Se incubaron a $37^{\circ}\text{C}/ 24\text{-}48\text{ h}$.

Para la concentración de PQ en el medio selectivo se tomó en cuenta el trabajo realizado con *Escherichia coli* resistente al paraquat (560 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (Fuentes y Amábile-Cuevas, 1998)

❖ Identificación de bacterias

De las placas con PQ se seleccionaron 40 colonias de bacterias Gram-negativas por sitio, se resembraron en TSA sin PQ para su aislamiento. Posteriormente se identificaron empleando un sistema automatizado, VITEK (bioMeri ux), basado en tarjetas de identificación donde se aplican diferentes pruebas bioquímicas. En éste caso se utilizaron tarjetas de identificación para bacterias Gram-negativas (GNI⁺). Para ingresar las bacterias en dichas tarjetas se resuspende una asada de la colonia en 1.8 mL de solución salina (NaCl 0.45%) en tubos de ensayo, y se ajusta la concentración de bacterias en un colorímetro VITEK, al 1.0 de Mc Farland (3×10^8 células). El llenado de las tarjetas se realiza al vacío y después se incuban las tarjetas a 37 C/ 16 - 24h. De acuerdo al resultado de las pruebas bioquímicas, el sistema automáticamente realiza una búsqueda en su catálogo interno de especies, dando la identificación final.

❖ Análisis por PCR

A las colonias resistentes a PQ identificadas en Vitek se les buscaron los genes del regulón *soxRS*, por medio de la técnica de PCR (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando las cepas control GC4468 y DJ901 (Tabla 4) y los iniciadores *soxR* F y R, y *soxS* F y R (Tabla 5). Todas las bacterias identificadas y analizadas por PCR se conservaron en tubos criogénicos, con LB y glicerol 20%, a -70  C.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* utilizadas como controles para el análisis de PCR.

Control	Cepa	Descripción
Positivo	GC4468	<i>E. coli</i> K-12 <i>soxRS</i> ⁺ F ⁻ Δ <i>lac rpsL</i>
Negativo	DJ901	GC4468 Δ (<i>soxRS</i> - <i>zjc2205</i>) <i>zjc2204</i> :: Tn 10 Km

(Greenberg *et al.*, 1990)

Tabla 5. Secuencias de los iniciadores para la amplificación de *soxR* y *soxS*.

Genes que amplifican	Secuencia de iniciadores	Amplificado (pb)
<i>soxR</i>	F: 5' GGGAGTAGAATTCCTCAAGTTAAC 3' R: 5' CGTCGGGGGAAGCTTTCCTGTGTACC 3'	588
<i>soxS</i>	F: 5' GGCGAAGCTTCGCAGGTGTTATGC 3' R: 5' CAGATGAATTCACGAAGTGAACAC 3'	432

(Amábile-Cuevas y Demple, 1991)

Los productos de la amplificación se corrieron en un gel de agarosa 1.5 %, por 60 min / 96 VCD, utilizando un marcador de 123 pb. Después la agarosa se tiñó con bromuro de etidio, y se observaron y fotografiaron usando un transiluminador UV (Figura 6).

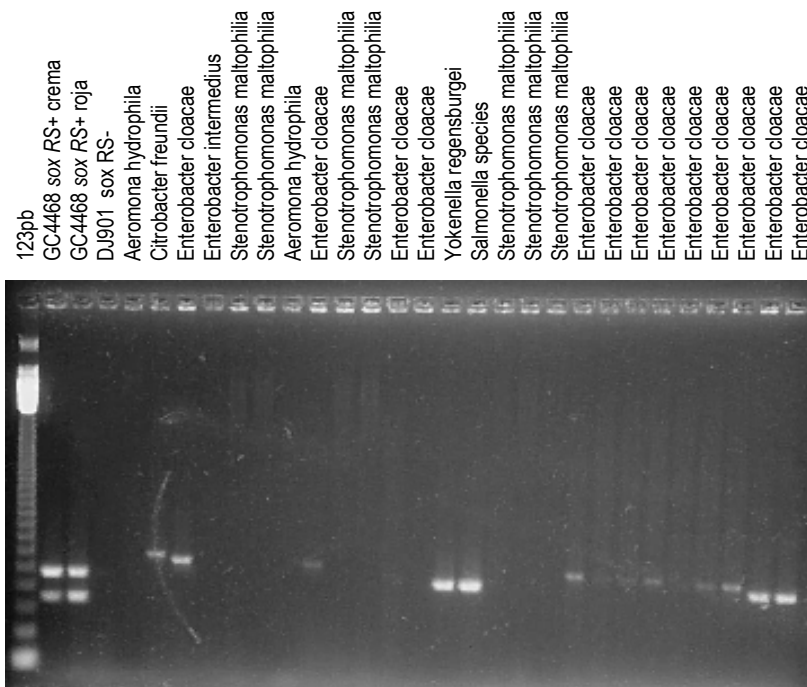


Figura 6. Electroforesis de las primeras 26 bacterias cultivables Gram-negativas, analizadas por PCR, correspondientes al sitio de muestreo de San Lorenzo.

5.3.4 Inducción del regulón *soxRS* de *E. coli* K12 expuesta al agua de los canales del área de estudio.

Para evaluar si el agua de los canales de Xochimilco induce la respuesta del regulón *soxRS* como indicador de estrés oxidante por superóxido, se utilizó la fusión genética *soxS::lacZ* (Figura 7), cuantificando la expresión de la fusión y midiendo la actividad de β -galactosidasa usando el ensayo de Miller (1992). El ensayo se estandarizó para el análisis de muestras ambientales en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, Facultad de Medicina.

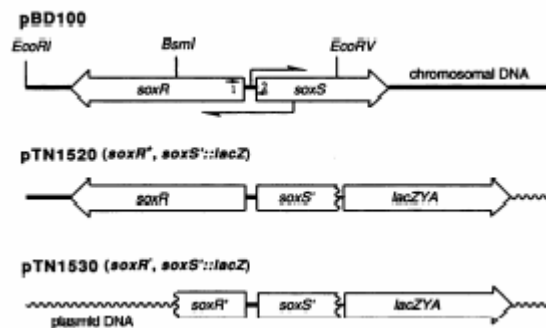


Figura 7. Estructura de la fusión *soxS::lacZ*. pBD100 es el plásmido que contiene la región *soxRS*. (Nunoshiba *et al.*, 1992)

lacZ es un gen con expresión fenotípica de fácil determinación que codifica la enzima β -galactosidasa, quien tiene como sustrato a la lactosa (Lewin, 2000). En el ensayo se utilizó al Orto-Nitrofenil-1-B-D-galactopiranosido (ONPG) como sustrato artificial de la β -galactosidasa, dado que el producto de la reacción enzimática tiene color amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la actividad de la β -galactosidasa, por lo que se puede medir la absorbencia a 420nm en el espectrofotómetro.

Fórmula para calcular la actividad de la β -galactosidasa, en Unidades Miller (cantidad de ONPG hidrolizado por la β -galactosidasa, por minuto por función de densidad óptica):

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 (\text{DO}_{420\text{nm}} - (1.75 \times \text{DO}_{550\text{nm}}))}{(t \times v \times \text{DO}_{660\text{nm}})}$$

Donde: t = tiempo de reacción (minutos)
 v = volumen de células en suspensión (mL)
 DO_{420nm} = densidad óptica de reacción enzimática (nanómetros)
 DO_{550nm} = densidad óptica de residuos celulares (nanómetros)
 DO_{660nm} = densidad óptica de células (nanómetros)

Para descartar errores del ensayo, se tuvo un testigo positivo (TN521) y un testigo negativo (TN531), (Tabla 6). Para cada ensayo se crecieron los testigos en 3 mL de medio LB (Luria Berttani) en incubación a 37°C/ 200rpm toda la noche. De dicho cultivo se tomaron 200 μ L y se inocularon 5 mL de LB fresco, incubándolos a 37°C/ 200rpm/ 90min para alcanzar la fase exponencial del cultivo. Después se centrifugaron a 10000rpm/ 5min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de bacterias en los siguientes tratamientos, y se incubaron a 37°C/ 200rpm/ 60min. Los tratamientos 1,2 3 y 4 se aplicaron para la cepa TN521 y solo 1, 2 y 3 para la cepa TN531:

1. Inducción basal: 5 mL de medio LB, sin agente oxidante para determinar la actividad basal de la β -galactosidasa.
2. Inducción con paraquat (PQ): 5 mL de LB + 100 μ L de PQ 10mM, para tener una concentración final de 200 μ M, concentración a la que se ha reportado la inducción del regulón *soxRS*, teniendo referencia positiva de la producción de β -galactosidasa en TN521 y referencia negativa en TN531, (Nunoshiba *et al.*, 1992). En éste tratamiento se utilizaron 4 tubos, para agregar en tres de ellos el agua de cada canal, después de haber extraído la β -galactosidasa, con el fin de tener un control para el posible efecto inhibitorio de la enzima, por parte de los solutos del agua.
3. Inducción con agua de Xochimilco (AX): 5 mL de agua de Xochimilco, previamente filtrada con Millipore de 0.45 μ m de diámetro del poro, más 125 mg de LB como fuente nutritiva. Cada muestra fue trabajada de forma independiente.
4. Inducción con PQ y AX: 5 mL de AX + PQ 200 μ M + 125 mg de LB, para observar el efecto del paraquat en el agua de Xochimilco.

5. Bacterias del AX: 5 mL de AX + 125 mg de LB, para determinar que la producción de β -galactosidasa de las bacterias presentes *per se* en el agua de Xochimilco no interfieran en los tratamientos anteriores.

La incubación se detuvo en hielo, 15min, y se centrifugó a 10000rpm/ 8min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de bacterias con 1 mL de solución isotónica (NaCl 0.85 %), se mezcló y volvió a centrifugar a 10000rpm/ 5min. Por último se resuspendió con 1 mL de Buffer Z (BZ), (ver ANEXO 2), y se midió la concentración bacteriana en el espectrofotómetro (600nm) usando como blanco 1 mL de BZ. Se realizaron diluciones para cada tubo, de la siguiente manera:

30 μ L cultivo + 970 μ L BZ

50 μ L cultivo + 950 μ L BZ

100 μ L cultivo + 900 μ L BZ

Se utilizó 1 mL de BZ como control de los reactivos.

Se agregaron 2 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS al 0.1% para extraer la β -galactosidasa, se agitó e incubó a temperatura ambiente/ 10 min. Después, en las repeticiones del tratamiento 2, se agregaron 30 μ L, 50 μ L y 100 μ L de agua de los tres canales de Xochimilco, cada canal en una serie de tubos. En seguida, se agregó 200 μ L de ONPG (4 mg/mL) a cada tubo, y se incubó a temperatura ambiente/ 10-20 min. En cuanto viró el medio a color amarillo se detuvo la reacción con 500 μ L de Na₂CO₃ 1M y se midió la absorbencia a 420 nm (ONPG hidrolizado) y 550 nm (restos celulares) usando como blanco el control de los reactivos. Por último se calculó la actividad de la β -galactosidasa (Unidades Miller) empleando la fórmula antes mencionada.

Tabla 6. Testigos y cepas de *E. coli* utilizadas en el ensayo β - galactosidasa.

Cepa	Descripción
TN521	DJ901 Φ (<i>soxR</i> ⁺ <i>soxS'</i> :: <i>lacZ</i>)
TN531	DJ901 Φ (Δ <i>soxR</i> <i>soxS'</i> :: <i>lacZ</i>)

(Nunoshiba *et al.*, 1992; Fuentes y Amábile-Cuevas, 1997;

Fuentes y Amábile-Cuevas, 1998; Fuentes *et al.*, 2001)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema chinampero de Xochimilco, desarrollado desde los aztecas hasta nuestros días, se ha utilizado como estrategia para incrementar la producción agrícola, bajo el supuesto de integrar la materia orgánica como nutrientes formados durante la mineralización de esta en el fondo de los canales de riego, previa aeración. De tal manera que se propicia en el fondo de los canales parte del ciclo de detritus, permitiendo la autodepuración del sistema. Todo ello posible por la gran actividad microbiana y el eficiente manejo de los agricultores.

Actualmente la eficiencia del sistema ha cambiado. Dicho cambio está relacionado con las distintas actividades que el hombre realiza dentro del sistema, dado que se encuentra ubicado en un núcleo urbano, donde ha aumentado la densidad poblacional, en parte por la llegada de migrantes de diversos lugares de la República Mexicana (Losada *et al.*, 1998). Sin embargo siendo el sistema chinampero único en el mundo, a pesar de estar relacionado con otros sistemas de cultivo como los “Hortilonages” en Francia, resulta difícil establecer límites de distintos parámetros físicos, químicos y biológicos que nos den información sobre el impacto ambiental y riesgo ecológico de la contaminación en las chinampas de Xochimilco.

No obstante, en el presente trabajo se ha tratado de identificar zonas donde prevalecen diferentes actividades humanas, para comparar los parámetros entre ellos y generar información base para su análisis a largo plazo, contribuyendo así en la construcción de un plan de manejo del sistema que nos permita a futuro, seguir gozando de los múltiples servicios ambientales que brinda la zona, tales como la modulación del microclima, la producción de oxígeno, como sumideros de bióxido de carbono y otros compuestos, retención de agua superficial, recarga de agua subterránea, además de los servicios culturales, sociales y económicos, como el turismo y la recreación.

6.1 Características físico-químicas y microbiológicas del agua.

Con el objetivo de caracterizar el agua de los tres canales de Xochimilco, con diferente aporte de contaminación, se midieron distintos parámetros físicos – químicos que se muestran en la Tabla 7, así como parámetros microbiológicos que se muestran en la Tabla 8. Para su discusión se hace referencia, en la última columna de ambas tablas, a distintas normas nacionales e internacionales, así como a distintos trabajos que se han realizado en la zona chinampera de Xochimilco, considerando solo la temporada de secas, dado que fue la temporada en el que se desarrollo éste trabajo.

Tabla 7. Parámetros físico-químicos del agua de los canales muestreados (Puente de Urrutia, PU; La Draga, LD; y San Lorenzo, SL).

	PU	LD	SL	Valores de referencia
Aportes antropogénicos	Act. agrícola	Agua tratada	Desechos urbanos	
Número de muestras	4	4	4	
Ancho del canal (m)	10	15	5	
Profundidad del canal (m)	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.3 ± 0.03	
Temperatura (°C)	20.0 ± 0.2	19.8 ± 0.3	19.2 ± 0.1	10 – 22 ³
pH	7.9 ± 0.2	7.3 ± 0.3	7.0 ± 0.1	7.7 ± 0.2 ⁴
				7.9 ± 0.4 ⁵
				7.9 ± 0.6 ⁶
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.5 ± 2.2	4.7 ± 0.8	0.5 ± 0.1	5 ⁷
Profundidad del disco de Sechi (cm)	20 ± 2	30 ± 5	10 ± 1	
Sólidos Suspendidos (mg/L)	88.8 ± 20	82.2 ± 20	104.5 ± 59	20 directo
				30 indirecto ⁸
				50 ⁹
				5 – 35 ¹⁰

DBO ₅ ¹ (mg/L)	62.8 ± 37	48.2 ± 29	78.8 ± 34	20 directo 30 indirecto ⁸
				5 – 45 ¹⁰
DQO ² (mg/L)	182.5 ± 78	120.2 ± 54	121.2 ± 54	20 – 200 ¹⁰
				68 ± 29 ⁵
NO ₃ ⁻ (mg/L)	0.7 ± 0.4	1.0 ± .8	2.6 ± 2	1.2 ± 0.2 ⁴
				0.8 ± 0.7 ⁵
				0.4 ± 0.4 secas ¹¹
				0.003 secas ¹²
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0.6 ± 0.4	3.6 ± 3	4.8 ± 3	4.7 ± 1.8 ⁴
				0.4 ± 0.2 ⁵
				0.3 ± 0.1 secas ¹¹
				1.5 secas ¹²

¹ Demanda Bioquímica de Oxígeno

² Demanda Química de Oxígeno

³ Trabajo en Xochimilco, variaciones de temperatura en el día, Martínez y Jáuregui, 2000

⁴ Trabajo en Xochimilco, Báez *et al.*, 1975

⁵ Trabajo en Xochimilco, Pedraza, 1995

⁶ Trabajo en Xochimilco, Cime, 2003

⁷ CE-CCA-001/89, Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para el desarrollo de organismos acuáticos

⁸ NOM-003-ECOL-1997, Norma Oficial Mexicana, para aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, ya sea en contacto directo o contacto indirecto.

⁹ CE-CCA-001/89, Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para el riego agrícola

¹⁰ Parámetros internacionales para el reuso agrícola del agua, Lazaroya y Bahri, 1997; Wallace y Batchelor, 1997

¹¹ Trabajo en Xochimilco, en temporada de secas, Cruz y Martínez, 1999

¹² Trabajo en Xochimilco, en temporada de secas, Ortiz y Ruvalcaba, 2005

Tabla 8. Concentraciones promedio de bacterias cultivables: Bacterias Totales (BT), Coliformes Totales (CT) y Coliformes Fecales (CF), aisladas del agua de los tres canales muestreados (P. de Urrutia, PU; La Draga, LD; y San Lorenzo, SL).

	PU	LD	SL	Valores de referencia
Número de muestras	4	4	4	
BT (UFCx10 ⁶ / 100 mL)	4 ± 2	8 ± 5	47 ± 14	0.013 ¹

CT (NMP / 100 mL)	2525 ± 250	3625 ± 1144	245000 ± 33166	3925000 ± 5181459 ²
				110500 ± 111367 ³
				10 – 2000 ⁴
CF (NMP / 100 mL)	680 ± 289	715 ± 208	155000 ± 41231	1600 ¹
				1258 ± 915 ³
				107712 ± 467306 ⁵
				8109 ± 25436 ⁶
				240 directo 1000 indirecto ⁷
CF / CT	0.27	0.2	0.63	

¹ Trabajo en Xochimilco, Coutiño, 1981

² Trabajo en Xochimilco, Báez *et al.*, 1975

³ Trabajo en Xochimilco, Rosas *et al.*, 1984

⁴ Parámetros internacionales para el reuso agrícola del agua, Lazaroya y Bahri, 1997; Wallace y Batchelor, 1997

⁵ Trabajo en Xochimilco, Pedraza, 1995

⁶ Trabajo en Xochimilco, Juárez *et al.*, 2003

⁷ NOM-003-ECOL-1997, Norma Oficial Mexicana, para aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.

❖ Puente de Urrutia (PU)

La temperatura no varía mucho de un sitio a otro (19.2 – 20.0 °C) y el pH lo podemos considerar neutro para todos los sitios, aunque en PU, se registró una leve tendencia hacia la alcalinidad (pH 7.9), dato parecido a los reportes anteriores. Esto debido, posiblemente a la adopción de nuevas tecnologías en la actividad agrícola que se lleva a cabo en dicho lugar, tales como el uso de fertilizantes, plaguicidas e invernaderos, factores responsables del aumento en la concentración de sales en el suelo, y en consecuencia del flujo pluvial, el arrastre de dichas sales a los canales. El impacto de las nuevas tecnologías agrícolas en PU se apoya teniendo la mayor DQO (182.5 mg/L) en comparación con los otros sitios, a pesar de que los tres sitios, en promedio, rebasan lo reportado por Pedraza (1995), hecho que aún no limita el reuso del agua en actividades agrícolas, según las normas internacionales.

Los parámetros que sí están normados y que en PU se rebasan, son los sólidos suspendidos (PU tiene 88.8 mg/L y el máximo en las normas es 50 mg/L) y la DBO5 (PU tiene 62.8 mg/L y el máximo en las normas es 45 mg/L), sugiriendo un riesgo en la utilización de dicha agua para el regadío de los cultivos, dado que las partículas resuspendidas en la columna de agua pueden acompañarse de microorganismos, próximos a su deposición en los cultivos. Aunque, la concentración de CF no sobrepasa el límite propuesto por la NOM-003-ECOL-1997. En ocasiones, en ésta zona se extrae el agua con una bomba ubicada a orillas del canal, y es transportada por pipas a diferentes lugares de Xochimilco para el regadío de jardines y cultivos, por lo que se propone cambiar dicha estrategia, dado que cada vez que se extrae el agua, se remueve el sedimento del fondo y orillas del canal.

❖ La Draga (LD)

En LD se observa mayor profundidad del disco de Sechi (30 cm), que en PU (20 cm), lo que sugiere mayor transparencia del agua, y por tanto mayor penetración de luz, sin embargo igual que en los otros sitios, se rebasa los límites de sólidos suspendidos propuestos por la NOM-003-ECOL-1997 y las normas internacionales para el reuso del agua en servicios al público, además de tener mayor concentración de NH_4^+ (3.6 mg/L) que de NO_3^- (1.0 mg/L), indicando un aporte externo de materia orgánica, aunque no sea precisamente materia fecal, dado que, igual que en PU, se tiene concentraciones de CF menor que el límite que propone la NOM-003-ECOL-1997. En cuanto al oxígeno disuelto, el promedio es un poco menor (4.7 mg/L) de lo que sugiere la norma para el desarrollo de organismos acuáticos (CE-CCA-001/89, 5 mg/L), y la DBO5 en LD (48.5 mg/L) es un poco mayor de lo que sugieren las normas internacionales (5 – 45 mg/L), por lo que se pueden proponer medidas correctivas para mejorar dichos parámetros, empezando con un mejor acondicionamiento del canal o semiconducto que transporta el agua tratada, desde la Planta de Tratamiento Cerro de la Estrella, hasta la zona chinampera de Xochimilco.

❖ San Lorenzo (SL)

El canal de SL es crítico por tener poco volumen de agua (poco ancho, 5 m y poco profundo, 0.3 m) y baja concentración de oxígeno disuelto (0.5 mg/L), hecho que dificulta el aprovechamiento del agua en la acuicultura, ya que no se cumple con la concentración mínima de oxígeno disuelto, para el desarrollo de organismos acuáticos que se propone en los CE-CCA-001/89 (5 mg/L). Además de tener la menor penetración de luz, reflejada en la profundidad del disco de Secchi (10 cm), y la mayor cantidad de sólidos suspendidos (104.5 mg/L) que como ya se mencionó, rebasa los límites propuestos por la NOM-003-ECOL-1997, los CE-CCA-001/89 y las normas internacionales (20 – 50 mg/L), igual que la DBO5 (78.8 mg/L), donde se propone de 5 – 45 mg/L.

Esto ligado a las concentraciones de NH_4^+ (4.8 mg/L) mayor que de NO_3^- (2.6 mg/L) y a las altas concentraciones de BT (47×10^6 UFC /100 mL), CT (245,000 NMP/100mL) y CF (155,000 NMP/100mL) cuantificadas en dicha zona, sugieren el aporte de materia fecal al canal de SL, debido posiblemente a la presencia de asentamientos urbanos a orillas del canal, responsables de las descargas domésticas, además del aporte de materia orgánica por escorrentías, por filtrado de nutrimentos del suelo y por la erosión de las chinampas. En SL la relación CF/CT es de 0.63, es decir, más del 50% de CT son CF, y la concentración de CF rebasa el límite propuesto por la NOM-003-ECOL-1997. Hecho que hace al agua de SL poco utilizable, y nos permite proponerlo como un sitio prioritario para planes de manejo sanitario. Por lo pronto, no se recomienda el regadío de cultivos con el agua del canal de SL, por el riesgo de deposición de microorganismos en las plantas.

6.2 Presencia de los genes *soxR* y *soxS* en bacterias cultivables Gram-negativas (GN) aisladas del agua en un medio con paraquat (PQ)

Con el fin de realizar la búsqueda de los genes *soxR* y *soxS* más dirigida, hacia el universo de bacterias GN presentes en el agua de los canales de Xochimilco, se utilizó un medio selectivo de McC + PQ (ver métodos) para la cuantificación de bacterias GN y CT, datos que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Concentraciones promedio de las bacterias cultivables: Gram-negativas (GN), Coliformes Totales (CT) y bacterias resistentes al Paraquat (PQ), de los canales muestreados (P. de Urrutia, PU; La Draga, LD; y San Lorenzo, SL).

	PU	LD	SL
Número de muestras	4	4	4
	UFC x 10³ /100mL		
GN	457 ± 127	430 ± 14	2553 ± 820
CT	217 ± 138	70 ± 16	1070 ± 469
GN + PQ	211±28	118±44	887±387
CT + PQ	143±59	54±11	676±333
	% de supervivencia ¹		
GN + PQ / GN	46.2	27.4	34.7
CT + PQ / CT	65.9	77.1	63.2

¹ El porcentaje de supervivencia, se refiere a la comparación de UFC de bacterias crecidas en placas con un medio si PQ (McC), con las crecidas en el medio selectivo (McC + PQ).

En primer lugar podemos mencionar que SL sigue siendo el sitio con mayor densidad, en promedio, de bacterias (GN, CT, GN+PQ, y CT+PQ), reflejando el impacto de los asentamientos humanos a orillas del canal. Las CT es un grupo amplio de bacterias que se encuentran presentes en el ambiente, sin ser necesariamente patógenas, sino participantes en el ciclo del detritus o en otros ciclos biogeoquímicos, sin embargo el que exista una densidad mucho mayor en un sitio del sistema chinampero (SL) que en otro, nos refleja dinámicas bacterianas distintas. Directamente no podemos hablar de CF, aunque si tomamos en cuenta la relación de CF/CT que existe en SL (Tabla 8), donde más del 50% de CT pueden estar representadas por CF, resulta interesante el crecimiento del 63.2 % de CT en el medio con PQ, puesto que la mitad de ellas pueden estar representadas por CF.

En segundo lugar podemos señalar que, tanto SL como PU la mitad de las bacterias Gram-negativas son CT, mientras que en LD la sexta parte, aproximadamente, de las bacterias Gram-negativas son CT, esto debido posiblemente a: a) el poco aporte de materia fecal en el canal de LD, b) la presencia de agentes que limiten el desarrollo de bacterias CT en dicha zona. De cualquier manera, las coliformes de LD, a pesar de estar en menor proporción, son particularmente más resistentes al PQ, que las coliformes de los otros sitios, hecho que permite discutir la presencia y exposición actual ha agentes generadores de estrés oxidante del tipo PQ, los cuales pueden estar matando a la mayoría de las coliformes, excepto las resistentes ha dichos agentes.

Una fuente de agentes generadores de estrés oxidante, en el canal de LD, puede ser el aporte de agua tratada proveniente de la Planta de Tratamiento del Cerro de la Estrella, de donde se ha propuesto el ingreso de contaminantes industriales, como consecuencia de la baja calidad de tratamiento, que se les dan a las aguas negras provenientes de la zona de Iztapalapa, delegación con grandes industrias (Chávez, 2003). Aunque no podemos descartar que la concentración de

PQ utilizada en el medio selectivo sea diferente para otras bacterias distintas a *E. coli*, ya que solo en ésta se ha estandarizado la dosis.

Del medio selectivo (McC + PQ) se seleccionaron 40 colonias al azar, por cada sitio, para su aislamiento e identificación. De ello resultaron 11 especies diferentes (Tabla 10), de las cuales *Enterobacter cloacae* resultó ser más frecuente en PU y LD, mientras que *Aeromonas hydrophila* fue más frecuente en SL, hecho relevante ya que dentro de ésta especie existen serotipos patógenos para ranas, peces y humanos, causando en humanos diarreas y bacteremia (Bergey *et al.*, 2000).

Además SL sigue llamando la atención por ser el único sitio donde se pudo identificar *E. coli*, bacteria más común de la microbiota intestinal pero que al adquirir genes de patogenicidad se ven involucradas en diarreas, infecciones urinarias, infecciones nosocomiales incluyendo septicemia y meningitis; *Vibrio parahaemolyticus*, principal causa de intoxicación alimenticia causada por consumo de pescado contaminado además de estar relacionado con diarreas y diferentes infecciones extra intestinales; *Klebsiella pneumoniae*, patógena oportunista que puede causar infección nosocomial y urinaria, neonatal, bacteremia y neumonía en humanos, y un 10% no se pudieron identificar en el sistema automatizado, quizás por la limitación que se tiene en la biblioteca de especies de donde se basa la identificación.

Tabla 10. Frecuencia de aislamiento de bacterias cultivables Gram-negativas, para cada sitio (P. de Urrutia, PU; La Draga, LD; y San Lorenzo, SL) aisladas de un medio con paraquat (560 µg/mL) y algunas características de ellas

Especies	PU	LD	SL	soxR ¹	soxS	L/ C/ O/ P ²	Catalasa	Oxidasa
	%	%	%				+ / -	+ / -
Fam. Enterobacteriaceae								
<i>Enterobacter cloacae</i>	55.0	50.0	5.0	X		L/ O	+	-
<i>Enterobacter intermedius</i>	2.5	15.0	0	X		L	+	-
<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	2.5	2.5	X		L	+	-
<i>Escherichia coli</i>	0	0	15.0	X	X	C/ P	+	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2.5	10.0	7.5	X	X	L/ O	+	-
<i>Salmonella</i> sp	2.5	0	0	X		P	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	5.0			L/ O	+	-
<i>Yokenella regensburgel</i>	2.5	0	0	X		L	+	-
Fam. Aeromonadaceae								
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7.5	10.0	52.5	X	X	L/ O	+	+
Fam. Vibrionaceae								
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	0	2.5			L/ O		+
Fam. Xanthomonadaceae								
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ³	27.5	12.5	0			O	+	- / +
No Identificado	0	0	10.0	X				
Total	100=40	100=40	100=40					

(Bergey *et al.*, 2000; Lennette *et al.*, 1985).

¹ Con variaciones intraespecíficas

² L= de vida libre, C= comensal, O= patógeno oportunista de humanos P= patógeno

³ Especie aerobia, el resto son anaerobias facultativas.

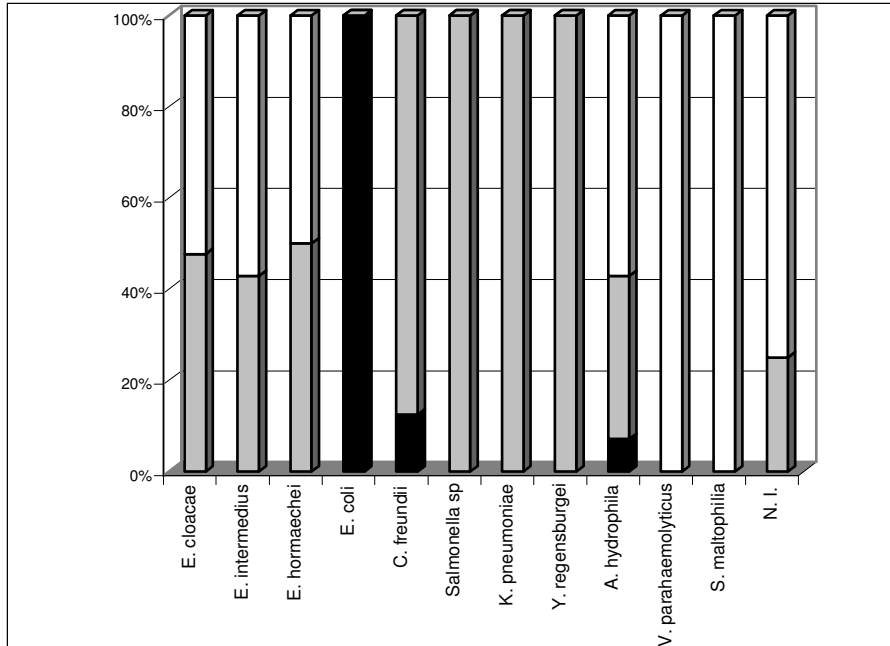


Figura 8. Presencia de los genes *soxR* y *soxS* en cada especie. Las columnas negras representan: el porcentaje de bacterias con *soxR* y *soxS*; las columnas grises: con solo *soxR*; y las columnas blancas: sin ninguno de los genes.

En cuanto a la presencia de alguno o ambos genes *soxR* y *soxS*, resultaron cosas interesantes. De las 11 especies identificadas, solo 3 presentaron *soxR* y *soxS*, de las cuales 2 resultaron con variaciones intraespecíficas (Figura 8). En el caso de *Escherichia coli*, fue la única especie que presentó *soxR* y *soxS* en todos los individuos aislados, mientras que en *Citrobacter freundii* el 12.5% presentó *soxR* y *soxS* y el 87.5% solo presentó *soxR*. En *Aeromonas hydrophila* el 7.1% presentó *soxR* y *soxS*, el 35.7% presentó solo *soxR* y el 57.1% no presentó ninguno de los genes.

3 especies presentaron solo *soxR*, en todos sus individuos aislados, (*Salmonella* sp, *Klebsiella pneumoniae* y *Yokenella regensburgi*), mientras que otras 3 especies presentaron *soxR* en alguno de sus individuos aislados (*Enterobacter cloacae* 47.7%, *Enterobacter intermedius* 42.9% y *Enterobacter hormaechei* 50%) más el 25% de individuos no identificados. Y por último se

identificaron dos especies que no presentaron alguno de los genes *soxR* y *soxS* (*Vibrio parahaemolyticus* y *Stenotrophomonas maltophilia*).

De todo ello, la primer interrogante que surge es ¿qué función llevaría a cabo SoxR, sin *soxS*?. Al respecto, se ha publicado que en *Pseudomonas aeruginosa*, quien no tiene *soxS*; SoxR activa seis genes en respuesta a la inducción del estrés por O_2^- , donde la mayoría de los genes codifican proteínas involucradas en la excreción de xenobióticos. Aunque no sea considerado un regulador clave para la respuesta al estrés oxidante, se ha demostrado que se requiere SoxR para obtener virulencia durante la infección pulmonar en modelos de ratón (Palma *et al.*, 2005).

Con éstos resultados no se puede afirmar que se esté expresando *soxR*, pero sí hay manera de comprobarlo. Como un segundo paso a éste trabajo, se puede evaluar la producción de RNAm de *soxR*, en las distintas especies aisladas del agua de los canales de Xochimilco, para acercarnos más a lo propuesto para *P. aeruginosa*.

Sin embargo, ante tantas variaciones intraespecíficas no podemos descartar la posibilidad de tratarse de fallas técnicas, como que los oligos diseñados para *E. coli*, no hallan reconocido las secuencias de *soxR*, y sobre todo de *soxS* en las otras especies.

De las 3 especies que presentaron *soxR* y *soxS*, *E. coli* resultó con mayor porcentaje que las otras dos especies, hecho que era de esperarse dado que en *E. coli* K12 se describió el regulón *soxRS*. En las otras dos especies (*A. hydrophila* y *C. freundii*) no se habían reportado antes la presencia de éstos genes, lo cual es interesante, aunque no se puede afirmar que lo estén expresando. Se sabe que las 3 bacterias están clasificadas dentro de la misma Clase III, de las gamma-proteobacterias, donde *Escherichia* es un género muy emparentado con *Citrobacter* dado que pertenecen al mismo Orden XII, de las Enterobacteriales y a

la misma Familia I, de las Enterobacteriaceas, mientras que *Aeromonas* se encuentra en un Orden y Familia diferente, Orden XI-Aeromonadales, Familia I-Aeromonadaceae (ver ANEXO 3).

Por ello no es muy clara la relación filogenética entre *E. coli*, *C. freundii*, *A. hydrophila* y el resto de las especies aisladas del agua de los canales de Xochimilco, con la presencia o no de los genes activadores del regulón *soxRS*, por lo que podemos proponer que: a) el regulón *soxRS* no es un mecanismo relacionado filogenéticamente, sino en todo caso, atiende a la presencia o no de agentes generadores de estrés oxidante o b) errores en la identificación, dado que el sistema automatizado VITEK utiliza una biblioteca dirigida hacia especies clínicas, por lo que se recomienda volver a identificar las bacterias.

6.3 Inducción del regulón *soxRS* de *E. coli* k12 expuesta al agua de los canales del área de estudio.

Con el fin de iniciar la evaluación de los contaminantes presentes en el agua de los canales de Xochimilco, como generadores de estrés oxidante, se realizó el presente ensayo, como se describe en los métodos.

Tabla 11. Valores promedio de la actividad del regulón *soxRS*¹ en los tratamientos 1 y 2.

Testigos	Tratamiento 1 (producción basal)	Tratamiento 2 (inducción con PQ)
(+) TN521 ²	193 ± 38	4572 ± 745
(-) TN531 ³	95 ± 18	114 ± 30

¹ Ensayo *in vitro* en Unidades Miller

² Testigo positivo: TN521 DJ901 *E. coli* K12 *soxR*⁺,*soxS*::*lacZ*

³ Testigo negativo: TN531 DJ901 *E. coli* K12 *soxR*⁻,*soxS*::*lacZ*

En el tratamiento 1 (Tabla 11), considerado como inducción basal, no se parte de cero en ninguno de los testigos dado que, como se ha reportado en la literatura, *soxS* se expresa en bajas concentraciones a pesar de no estar expuesto a agentes productores de superóxido (Nunoshiba *et al.*, 1992). En el tratamiento 2, exposición al paraquat (PQ, 200 μ M), se comprueba la funcionalidad de nuestros testigos, puesto que TN521 aumenta más de 20 veces su inducción basal, mientras que TN531, tomando en cuenta la desviación estándar, queda dentro del intervalo basal.

Tabla 12. Valores promedio de la actividad del regulón *soxRS*¹ en los tratamientos 3 y 4

	Puente de Urrutia		La Draga		San Lorenzo	
Número de muestras	4		4		4	
Tratamientos ²	TN521 ⁴	TN531 ⁵	TN521	TN531	TN521	TN531
3 (AX)	155±59	116±8	143±21	104±22	196±40	102±4
4 (PQ+AX)	3036±692		3656±543		2217±816	

¹ Ensayo *in vitro* en Unidades Miller

² En el tratamiento 5 siempre se obtuvo cero, indicando que no hay interferencia de β -galactosidasa de bacterias del agua de Xochimilco.

Los resultados obtenidos con TN521 en la exposición al agua de los canales de Xochimilco, tratamiento 3, suponen en primer instancia que no hay agentes generadores de estrés oxidante, al menos no en las concentraciones que el sistema puede detectar, cuyo mínimo es de 10 μ M de PQ, dado que los datos de éste tercer tratamiento quedan dentro de los intervalos iniciales. Sin embargo tomando en cuenta que en el agua podemos encontrar una gran complejidad de agentes químicos, resultó interesante probar si el efecto del PQ sería el mismo en el tratamiento 2 que en el tratamiento 4, en la interacción del PQ con el agua de Xochimilco, con la finalidad de simular un poco lo que le podría pasar a un agente, generador de estrés oxidante, que ingresara al sistema.

En éste caso fue evidente la disminución de la inducción del PQ en el tratamiento 4 (Figura 9).

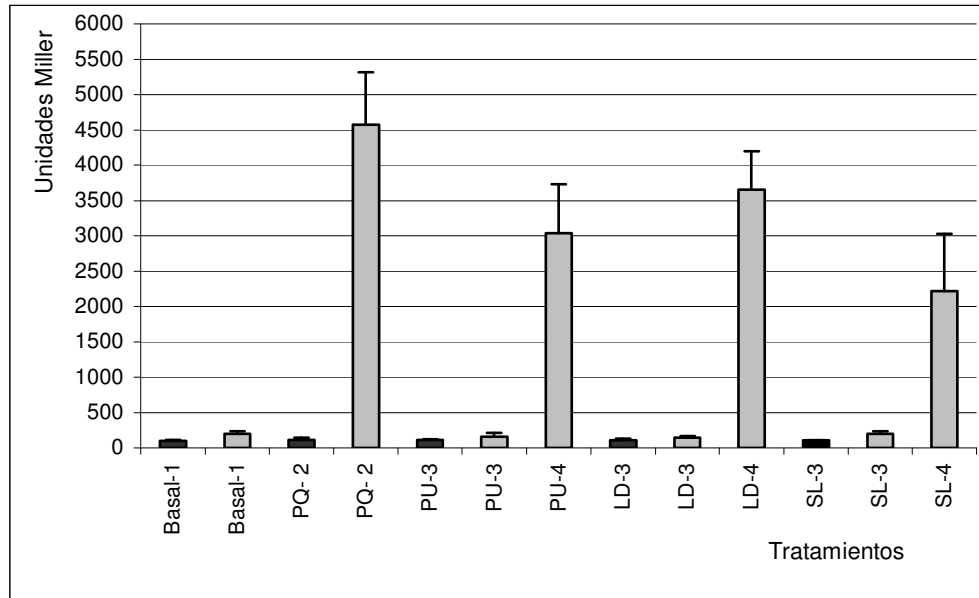


Figura 9. Actividad del regulon *soxRS* en diferentes cepas de *E. coli* (valores promedio y desviación estándar). Las barras negras indican el ensayo con el testigo negativo (TN531) y las barras grises con el testigo positivo (TN521). Los números se refieren a los distintos tratamientos: 1-inducción basal; 2-inducción con paraquat (PQ); 3-inducción con las muestras de agua de Xochimilco (PU-Puente de Urrutia, LD-La Draga y SL-San Lorenzo) y 4-inducción del PQ con el agua de Xochimilco (PU, LD y SL respectivamente).

De los aspectos planteados como posibles respuestas, se encontró sustento bibliográfico para tres de ellos.

Primero, la posible afectación de la actividad enzimática de la β -galactosidasa utilizada como indicadora de la inducción del regulón *soxRS*, ya que Pineda y colaboradores (1999) reportaron que el agua de Xochimilco afecta dicha actividad de *E. coli* K12OR85, inhibiéndola de 20% a 76%, resultados determinados por un método parecido al de éste trabajo, que aunque no especifican muchos detalles, se sabe que expusieron 1mL de cultivo a 0.5 mL de agua de los canales de Xochimilco + 0.5 mL de H₂O destilada-estéril, incubando a 37°C /120 min. Así se menciona que la inhibición de la β -galactosidasa fue mayor en las estaciones que están más en contacto con las descargas de agua residual doméstica sin tratar, las cuales presentan elementos que puede inhibir la actividad

enzimática del microorganismo en más de un 50%, como los detergentes y los metales pesados.

Si en este trabajo se hubiera tenido una disminución de β -galactosidasa en el testigo positivo (TN521), en el tratamiento 2 (añadiendo el agua de los tres canales de Xochimilco después de haber extraído la enzima, como se describe en los métodos), se apoyaría la propuesta de que el agua de los canales de Xochimilco contiene algún elemento u agente que afecta la actividad de β -galactosidasa, sin embargo no se observa dicha disminución. (Figura 10)

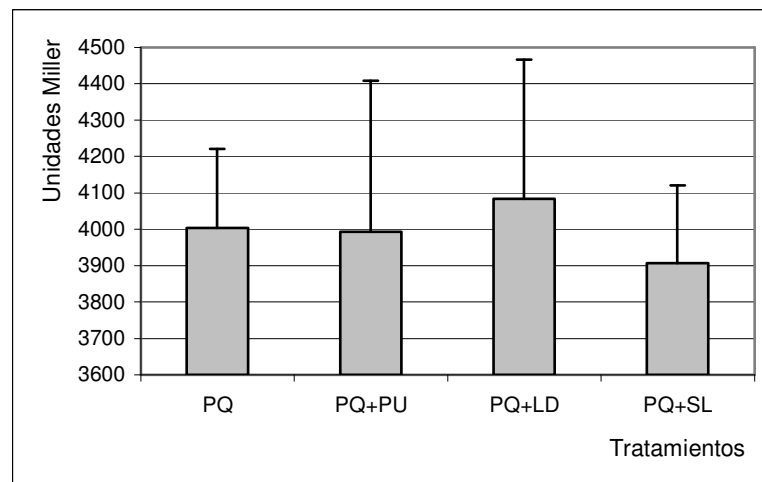


Figura 10. Resultados del tratamiento 2 en el control positivo (TN521). Después de haber extraído la β -galactosidasa en 4 tubos del tratamiento 2, se agregaron en 3 de ellos el agua de Puente de Urrutia (PU), La Draga (LD) y San Lorenzo (SL).

Segundo, la no entrada del paraquat (PQ) a la célula, disminuyendo así la inducción del regulón *soxRS*, dado por la presencia, en el agua de los canales de Xochimilco, de agentes que pudieran: a) secuestrar o precipitar al PQ, tales como las partículas del suelo, la materia orgánica o agentes quelantes que han sido reportados en la literatura, como extractos de levadura, triptona y soytona (Minakami *et al.*, 1990), u otros derivados de las distintas rutas metabólicas que se llevan a cabo en la columna de agua; b) disminuir la permeabilidad celular de *E. coli*, dado por el aumento de sales en el medio, quienes pueden llegar a inhibir

del 95% al 100% la letalidad del PQ (Kitzler y Fridovich, 1986; Liochev y Fridovich, 1993).

Tercero, la posible inactivación del superóxido dado por la presencia de antioxidantes en el agua de los canales de Xochimilco. Al respecto podemos mencionar la posible presencia de vitaminas, como resultado de la degradación de la materia orgánica en la columna de agua, tales como el ácido ascórbico, o vitamina C, que al ser soluble en agua es muy efectivo para atrapar radicales libres; la vitamina E, o α -tocoferol, el cual puede obtenerse de aceites vegetales, puesto que se localiza en las membranas de los tilacoides de plantas, algas y algunas cianobacterias (Hansberg, 2002). *Escherichia coli* se ha tratado *in vivo* con ambas vitaminas (C y E) para conocer si se afecta la activación del regulón *soxRS* dependiente de superóxido, y se ha observado un aumento a la tolerancia del PQ, además de una reducción en la actividad basal de β -galactosidasa cuando se trata con cualquiera de las dos vitaminas (Fuentes y Amábile-Cuevas, 1998).

Dentro de otros agentes con efectos antioxidantes, que pueden estar presentes en el agua de los canales, está a) el hierro, elemento no dispensable para muchas enzimas que llevan a cabo reacciones de óxido-reducción, por ser un efectivo quelante de ERO_s; b) los carotenos, quienes reaccionan con los radicales peroxilo y el NO₂, generando un radical estable que puede ser reducido por el ascorbato; c) los fenoles, se sabe que cuentan con actividad antioxidante *in vitro*; d) antioxidantes liposomales, ácidos grasos y algunos aceites (Suntres, 2002; Hansberg, 2002; Munné, 2005). Éstos y otros compuestos más pueden formar parte de lo que Aruoma y colaboradores (2002) han llamado cóctel de antioxidantes, puesto que han probado derivados de la fermentación de algunos cultivos (arroz, papaya y hierbas marinas) que metabolizan distintos microorganismos (bacterias lactosas (+), levaduras y bacterias fotosintéticas), resultando efectos antioxidantes en pruebas con ratas, hecho que puede estarse dando dentro de las múltiples dinámicas del sistema chinampero, sistema acuático agrícola-urbano.

7. CONCLUSIONES

7.1 Características físico-químicas y microbiológicas del agua.

De acuerdo a los distintos parámetros medidos en éste trabajo, se concluye que no se puede recomendar ningún uso (recreativo, piscícola, o de riego de cultivos) para el agua del canal de San Lorenzo, sitio con mayor presencia de asentamientos irregulares, dado que la concentración de oxígeno disuelto, sólidos suspendidos y DBO_5 quedan fuera de las normas nacionales (NOM-003-ECOL-1997 y CE-CCA-001/89) e internacionales. Además de su alta densidad de bacterias totales cultivables (BT), coliformes totales (CT) y coliformes fecales (CF), concentraciones que rebasan lo propuesto por la NOM-003-ECOL-1997 y las normas internacionales para el reuso agrícola. Por otro lado, el poco volumen de agua en el canal de SL, diez veces menor que en los otros canales, nos permite considerarlo como un canal en proceso de desecación, donde debe evaluarse los costos para su rehabilitación o para controlar la dispersión del agua a otros canales.

El agua de los canales de La Draga y Puente de Urrutia tiene características similares y aunque no todos los parámetros están normados, la baja concentración de coliformes fecales nos indican poca contaminación fecal y por tanto, la posibilidad de proponer proyectos para uso recreativo, piscícola o para riego de cultivos, sin dejar de lado que en los tres sitios se pasan los límites máximos permisibles de sólidos suspendidos que menciona la NOM-003-ECOL-1997. Por otro lado, en P. de Urrutia se sugiere dar un seguimiento del uso y control de fertilizantes, invernaderos y productos no biodegradables en los cultivos, ya que se tiene una tendencia a la alcalinidad (pH 7.9) y mayor demanda química de oxígeno (DQO), parámetros que deben seguirse monitoreando, para corroborar su aumento a través del tiempo.

7.2 Presencia de los genes *soxR* y *soxS* en bacterias cultivables Gram-negativas aisladas del agua en un medio con paraquat

El tener más del 50% de bacterias resistentes al paraquat (PQ) en los tres sitios, nos permite proponer de forma preliminar que:

- a) Son bacterias que tienen mecanismos de defensa ante agentes óxido-reductores cíclicos, o las condiciones del agua de los canales de Xochimilco mantienen disminuida su permeabilidad celular, de tal manera que no afecte su viabilidad, crecimiento y desarrollo en un medio con PQ.
- b) Se encuentran expuestas a algún o algunos agentes oxido-reductores cíclicos en el agua de los canales de Xochimilco, puesto que en *E. coli* se ha demostrado que a esa concentración de PQ (560 µg/mL) solo se desarrollan bacterias con expresión constitutiva del regulón *soxRS*, o puede ser que la concentración selectiva de PQ descrita para *E. coli*, sea diferente para las especies bacterianas silvestres.
- c) La exposición a dichos agentes es diferente para cada canal, por lo menos en La Draga, dado que se obtuvo mayor porcentaje de supervivencia de coliformes totales (CT) que en los otros sitios, por lo que es necesario regular las distintas actividades antropogénicas que se llevan a cabo en las distintas zonas del sistema chinampero, dado que se puede estar tratando de una acumulación de contaminantes a largo plazo.
- d) Existen diferentes fuentes de contaminación en los tres canales que permiten en cada uno la prevaencia de distintas especies resistentes al PQ, por lo que sería importante profundizar en la patogenicidad de

dichas especies, para evaluar el impacto microbiológico-sanitario, de dichos contaminantes vertidos al agua de los canales de Xochimilco.

De acuerdo al mecanismo de protección que se ha investigado en *E. coli*, se esperaba encontrar en las otras bacterias los dos genes reguladores del regulón *soxRS*. Sin embargo, en el análisis de PCR, no todas las bacterias presentaron el gen *soxR*, y solo *E. coli*, *Aeromonas hydrofila* y *Citrobacter freundii*, presentaron *soxR* y *soxS*. Por lo que se concluye que:

- A) Las bacterias, distintas de *E. coli*, *Aeromonas hydrofila* y *Citrobacter freundii*, que resultaron resistentes al PQ deben tener un(os) mecanismo(s) de defensa ante agentes oxido-reductor cíclicos, distinto del regulón *soxRS*, o puede que los genes *soxR* y *soxS* no hayan amplificado con los oligos diseñados para *E. coli*.
- B) Las especies que solo presentaron *soxR*, pueden estar en una situación similar a la descrita en *Pseudomonas aeruginosa*, donde SoxR, por sí solo es un inductor de genes ante el estrés oxidante, que aunque no sea de los principales mecanismos de protección puede estar regulando otros mecanismos, como el aumento de virulencia. (Palma *et al.*, 2005).
- C) Se propone seguir la investigación con las tres especies que presentaron ambos genes (*soxR* y *soxS*) para conocer su distribución en otros canales y evaluar su resistencia a antibióticos.

7.3 Inducción del regulón *soxRS* de *E. coli* k12 expuesta al agua de los canales del área de estudio.

En el ensayo *in vitro*, no se pudo detectar la presencia de agentes oxidoreductores cíclicos, puesto que el agua de Xochimilco no incrementó la actividad del regulón *soxRS*, en comparación con la inducción que produce el PQ. Sin embargo, en el tratamiento de exposición con PQ y agua de Xochimilco, al mismo tiempo, se tiene una disminución del efecto del PQ.

Dado que el PQ debe penetrar a la célula para generar superóxido, lo que haya en el agua de Xochimilco debe:

- a) Impedir la entrada del PQ a la célula, de acuerdo a las condiciones físico-químicas del agua, como el pH, sólidos suspendidos, materia orgánica, entre otros.
- b) Impedir la reacción redox del PQ con NADH para generar superóxido, por la presencia de agentes quelantes.
- c) Inactivar al superóxido directamente con alguna molécula pequeña, capaz de atravesar la membrana celular, de modo que alcance una concentración afectiva en el citoplasma bacteriano, como un ión metálico o por la presencia de un cóctel de antioxidantes (Aruoma, *et al.*, 2002), por ejemplo los fenoles provenientes de la degradación del material vegetal, vitaminas, etc.
- d) Se descarta que se trate de la inhibición de la actividad enzimática de β -galactosidasa, por detergentes o metales pesados presentes en el agua de Xochimilco, como lo proponen Pineda y colaboradores (1999), dado que se manejan los controles adecuados.

En general se puede concluir que existen bacterias en el agua de los tres canales de Xochimilco, analizados en éste trabajo, que están expuestas a algún o algunos agentes oxido-reductores cíclicos similares al PQ (560 µg/mL). La exposición es diferente en cada canal, igual que las respuestas para regular, compensar, excretar y reparar el daño ante dichos agentes. La presencia de los genes *soxRS*, o solo *soxR*, en algunas bacterias, sugieren su participación en los mecanismos de protección y reparación del daño por estrés oxidante generado por los contaminantes del agua de los canales, a pesar de que no se pudo inducir la expresión del regulón *soxRS* de *E. coli*, dado que el agua de los canales impide la formación de superóxido intracelular, ya sea por la no entrada del PQ a la bacteria, que no halla reacción redox entre el PQ y el NADH, y/o la inactivación del superóxido *per se*.

ANEXO 1

Parámetros físico-químicos

- ❖ El oxígeno disuelto en agua es un parámetro muy utilizado para evaluar el desarrollo de organismos aerobios en un cuerpo de agua.
- ❖ La temperatura y el pH intervienen en las reacciones químicas que se llevan a cabo en el agua, la solubilidad de los gases y el metabolismo de los organismos y microorganismos.
- ❖ La profundidad del disco de Sechi nos habla de la turbiedad o transparencia del agua
- ❖ Los sólidos suspendidos, nos habla de los sedimentos que se resuspenden en una columna de agua, donde no solo existen arcillas y/ o limos, sino microorganismos, tales como bacterias.
- ❖ La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5) es utilizado para conocer la demanda del oxígeno, como elemento principal para el crecimiento aerobio microbiano, necesario para la realización de procesos de óxido-reducción del nitrógeno, hierro y azufre de proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA, etc.
- ❖ La Demanda Química de Oxígeno (DQO) calcula la oxidación de algunos compuestos que no son normalmente oxidados en el proceso biológico, por lo que éste parámetro nos puede proporcionar información sobre la demanda de oxígeno por parte de plaguicidas u otros compuestos no biodegradables que están presentes en el agua, discusión que se complica al ser un parámetro no contemplado en las normas mexicanas.
- ❖ Los nitratos (NO_3^-) y fosfatos son nutrientes solubles en el agua que requieren algunos organismos para su desarrollo, pero si se encuentran en concentraciones excesivas, permiten el crecimiento desmesurado de algas, plantas, entre otros, provocando un enriquecimiento en el estado trófico de los sistemas acuáticos.
- ❖ El amonio (NH_4^+) es un nutriente poco biodisponible, dado que su carga es positiva y al interactuar con las arcillas, de carga negativa, queda atrapado en aglomerados.

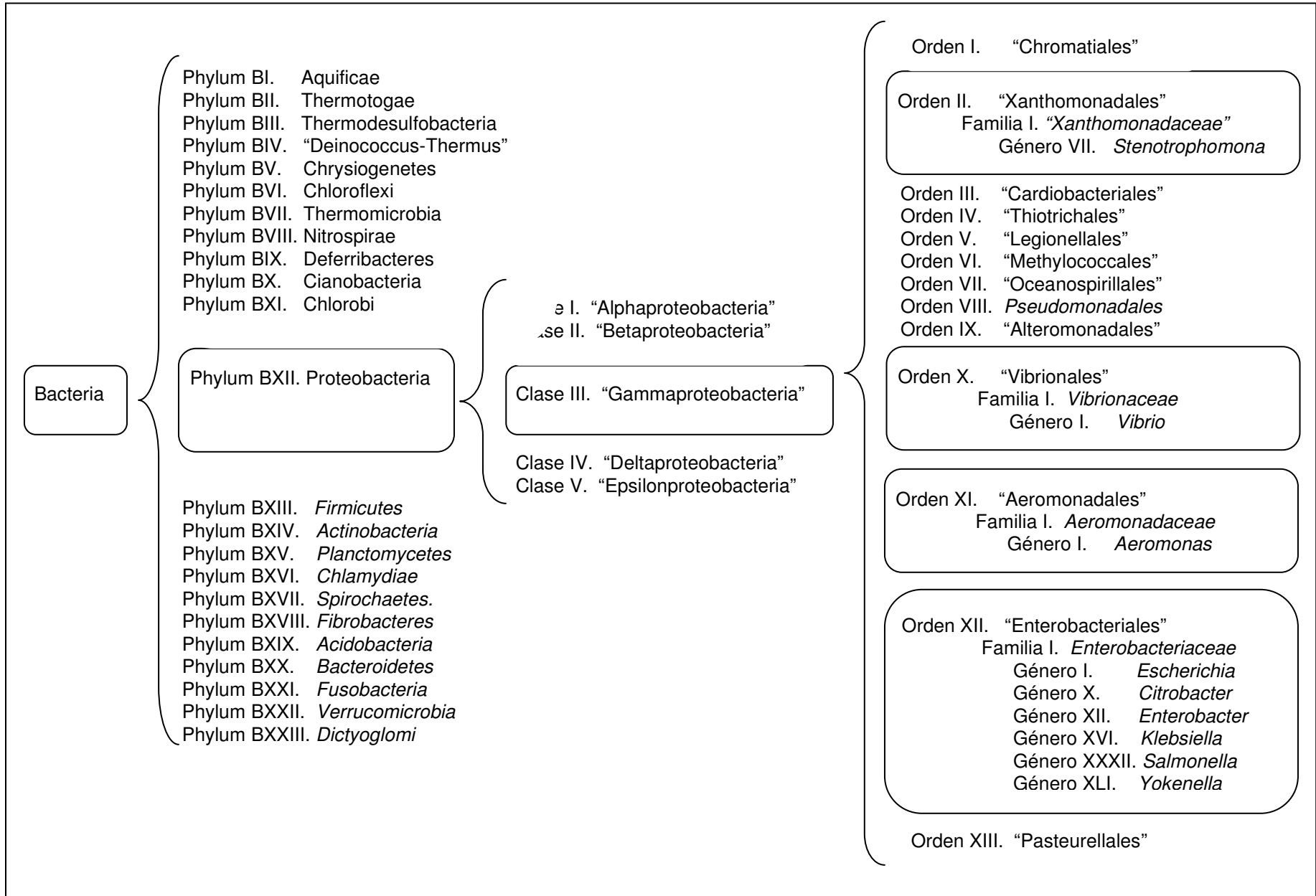
ANEXO 2

Para preparar 1 L de Buffer Z se realiza la siguiente mezcla:

Reactivo	Concentración (mM)	Cantidad
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	16.1 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40	5.5 g
KCl	10	0.75 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	0.246 g
β -mercaptoetanol	50	2.7 mL

No se debe usar autoclave, solo ajustar a pH 7 y mantener en refrigeración.

ANEXO 3. Relación filogenética de las especies identificadas (Bergey et al., 2000)



REFERENCIAS.

Amábile-Cuevas, C. F. y Demple, B. 1991. Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4479-4484.

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Environment Federation (WEF). 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21^a Ed. APHA-AWWA-WEF. Denver. USA.

Aruoma, O. I., Deiana, M., Rosa, A., Casu, V., Piga, R., Peccagnini, S., Dessi, M. A., Ke, B., Liang, Y. F. y Higa, T. 2002. Assessment of the ability of the antioxidant cocktail-derived from fermentation of plants with effective microorganisms (EM-X) to modulate oxidative damage in the kidney and liver of rats in vivo: studies upon the profile of poly-and-mono-unsaturated fatty acids. *Toxicol. Lett.* **135**: 209-217.

Báez, A. P., Belmont, R. y González, O. 1975. Modificación de la calidad de las aguas del lago de Xochimilco por el uso de aguas negras en su recarga. *Boletín I. Geofísica.* 1055-1070.

Bergey, D. H., Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9^a Ed. Lippincott Williams-Wilkins. Baltimore. USA.

Bond, T. J., Yung, K. L. y Tarbell, T. A. 1970. Characteristics of growth inhibition of *Lactobacillus casei* by 4-nitroquinoline-*n*-oxide. *Appl. Microbiol.* **20**: 536-538.

CE-CCA-001/89. 1989. Criterios ecológicos de calidad del agua para el desarrollo de organismos acuáticos y para el riego agrícola. SEMARNAT y CNA. Diario Oficial de la Federación.

Chávez, E. J. 2003. Determinación de la calidad microbiológica de hortalizas de mayor consumo en Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Cime, J. 2003. Diversidad de ácaros en Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Coutiño, M. 1981. Evaluación bacteriana en vegetales irrigados con aguas negras en la zona de San Gregorio, Xochimilco. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

Cruz, M. R. y Martínez, A. A. 1999. Respuesta fotosíntesis-irradiación del nanoplancton de dos sistemas acuáticos urbanos. *Rev. Biol. Trop.* 47: 37-42.

Demple, B., Ding, H. y Jorgensen, M. 2002. *Escherichia coli* SoxR protein: sensor /transducer of oxidative stress and nitric oxide. *Meth. Enzymol.* **348**: 355-364.

D. D. F., Departamento del Distrito Federal. 1993. El rescate ecológico de Xochimilco. México. D. F.

Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 239-257.

Fuentes, A. M. y Amábile-Cuevas, C. F. 1997. Mercury induces multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli* through activation of SoxR, a redox-sensing regulatory protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **154**: 385-388.

Fuentes, A. M. y Amábile-Cuevas, C. F. 1998. Antioxidant vitamins C and E affect the superoxide-mediated induction of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. *Microbiology*. **144**: 1731-1736.

Fuentes, A. M., Díaz-Mejía, J. J., Maldonado-Rodriguez, R. y Amábile-Cuevas, C. F. 2001. Differential activities of the SoxR protein of *Escherichia coli*: SoxS is not required for gene activation under iron deprivation. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**: 271-275.

Greenberg, J. T., Monach, P. A., Chou, J. H., Josephy, P. D. y Demple, B. 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6181-6185.

Hansberg T. W., 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Boletín Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, UNAM. **XXVI**: 19-53.

Jiménez, G. A., Léautaud, V. y Amábile-Cuevas, C. F. 2001. Regulatory locus *soxRS* partially protects *Escherichia coli* against ozone. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**: 175-177.

Juárez, F. L. A., Silva, S. J., Uribe, S. F. J. y Cifuentes, G. E. 2003. Microbiological indicators of water quality in the Xochimilco canals, Mexico City. *Salud Publica Mex.* **45**: 389-395.

Kappus, H. y Sies, H. 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia.* **37**: 1233-1358.

Kitzler, J. y Fridovich, I. 1986. Effects of salts on the lethality of paraquat. *J. Bacteriol.* **167**: 346-349.

Koo, S. M., Hee, L. J., Yeon, R. S., Sik, Y. W., Won, L. J., Lok, L. K., Sang, K. Y., Ouk, K. S. y Hye, R. J. 2003. A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. EMBO J. **22**: 2614-2622.

Koutsolioutsou, A., Martins, E. A., White, D. G., Levy, S. B. y Demple, B. 2001. A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium). Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 38-43.

Koutsolioutsou, A., Peña-Llopis, S. y Demple, B. 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **49**: 2746-2752.

Lazaroya, V. y Bahri, A. 1997. Water Reuse for Irrigation: Agriculture, Landscapes and turf grass. CRC Press. Florida. USA.

Lennette, E. H., Balows, A., Hauster, W. J. y Shadomy, H. J. 1985. Manual of Clinical Microbiology. 4^a Ed. American Society of Microbiology. Washington, D. C.

Lewin, B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. New York. USA.

Liochev, S. I. y Fridovich, I. 1993. Effects of paraquat on *Escherichia coli*: sensitivity to small changes in pH of the medium. A cautionary note. Arch. Biochem. Biophys. **306**: 518-520.

Liochev, S. I., Hausladen, A. y Fridovich I. 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 3537 – 3539.

Losada, H., Martínez, H., Vieyra, J., Pealing, R., Zavala, R. y Cortés, J. 1998. Urban agriculture in the metropolitan zone of Mexico City; changes over time in urban, suburban and peri-urban areas. *Environ. Urban.* **10**: 37-54.

Margulis, L. y Sagan, D. 1986. *Microcosmos. Four Billion Years of Evolution from Our Microbial Ancestors.* Summit Books. New York. USA.

Martínez, A. A. y Jáuregui, E. 2000. On the environmental role of urban lakes in Mexico City. *Urban Ecosystems.* **4**: 145-166.

Miller, J. H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.

Minakami, H., Kitzler, J. W. y Fridovich, I. 1990. Effects of pH, glucose and chelating agents on lethality of paraquat to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 691-195.

Monk, P. M. S., Turner, C. y Akhtar, S. P. 1999. Electrochemical behaviour of methyl viologen in a matrix of paper. *Electrochim. Acta.* **44**: 4817-4826.

Montiel, R. C. 2005. Evaluación de la calidad bacteriológica del agua de los canales de Xochimilco y caracterización serológica de *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. U.N.A.M.

Munné, B. S. 2005. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* **162**: 743-748.

Newman, M. C. y Unger, M. A. 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology.* 2^{da}ed., Lewis Publishers. New York. USA

NOM-003-ECOL-1997. 1997 Norma Oficial Mexicana para aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público, en contacto directo o indirecto. Diario Oficial de la Nación.

Nunoshiba, T., Hidalgo, E., Amábile –Cuevas, C. F. y Demple, B. 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. J. Bacteriol. **174**: 6054-6060.

Nunoshiba, T. y Demple, B. 1993. Potent intracellular oxidative stress exerted by carcinogen 4-nitroquinoline-*N*-oxide. Cancer Res. **53**: 3250-3252.

Nunoshiba, T., Rojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. y Demple, B. 1993. Activation by nitric oxide of an oxidative stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**: 9993-9997.

Nunoshiba, T., Rojas-Walker, T., Tannenbaum, S. R. y Demple, B. 1995. Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. Infect. Immun. **63**: 794-798.

Ortiz, J. B. R. y Ruvalcaba, A.G. 2005. Evaluación del estado trófico del lago de Xochimilco, México. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza. U.N.A.M.

Palma, M., Zurita, J., Ferreras, J. A., Worgall, S., Larone, D. H., Shi, L., Campagne, F. y Quadri, L. E. N. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. Infect. Immun. **73**: 2958 – 2966.

Panichayupakaranant, P. y Tewtrakul, S. 2002. Plumbagin production by root cultures of *Plumbago rosea*. Electron. J. Biotechnol. **5**: 228 – 232.

Pedraza, G. M. T. 1995. Comparación hidrológica de los canales de dos zonas chinamperas de la región Xochimilco-Tláhuac a través de sus parámetros físico-químicos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.

Pineda, F. G., Hernández, T., Cruz, M. C. y Gutiérrez, C. T. 1999. Aplicación de dos microbioensayos para evaluar la contaminación presente en las cuencas Xochimilco y Lerma-Santiago. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **41**: 251-258.

Pomposiello, P. J. y Demple, B. 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* **19**: 109-114.

Rodríguez, G. P. y Urzua, C. M. G. 1998. Análisis bacteriológico de aguas residuales en las plantas de tratamiento de la Delegación Xochimilco. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán. U.N.A.M.

Rosas, I., Báez A. y Coutiño M. 1984. Bacteriological quality of crops irrigated with wastewater in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1074-1079.

Rosas, I., Roy, O. G., Mosiño, P., Báez, A. y Rivera, L. 1987. Abundance and heterogeneity of algae in the Mexico City atmosphere. *Geofísica Internacional.* **26**: 359-373.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.

Shneyvays, V., Leshem, D., Shmist, Y., Zinman, T. y Shainberg, A. 2005. Effects of menadione and its derivative on cultured cardiomyocytes with mitochondrial disorders. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**: 149-158.

Solís, S. G. A. 2005. Aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* de los canales de Xochimilco. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. U.N.A.M.

Stohs, S. J. y Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 321 – 336.

Stoppani, A. O. M. 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*. **59**: 147-165.

Storz G. e Imlay, J. A. 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:188-194.

Suntres, Z. E. 2002. Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*. **180**: 65-77

Wallace, J.S. y Batchelor, C.H. 1997. Managing water resources for crop production. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **352**: 937-947

Winfield, M. D. y Groisman, E. A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3687-3694.

Wu I. y Weiss B. 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2864-2871.

Wirth, C. J. 1997. The governmental response to environmental degradation in the Xochimilco ecological zone of Mexico City. Latin American Studies Association. Encuentro Internacional. Guadalajara. México.