



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

BO 1236/96

Ej. 1

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE 3 POBLACIONES DE BACTERIAS EXTRAIDAS DEL SUELO DEL EX-LAGO DE TEXCOCO"

400282 [Barcode] 61060

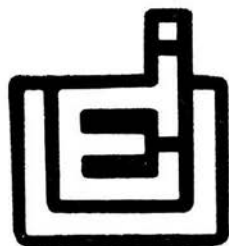
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

GEORGINA GONZALEZ FIGUEROA



ASESOR: BIOL. ELIAS PIEDRA IBARRA

AGOSTO 96



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Esta Tesis la dedico principalmente:

A mi madre y hermanos

A mi familia

A mis amigas

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a aquellos maestros que hicieron posible la realización de este trabajo, el cuál se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de la UMF, Campus-Iztacala.

Empezando por el Biól. Elías Piedra Ibarra quien tuvo la paciencia y la confianza para dirigirme en este proyecto, de verdad mil gracias.

De manera muy especial quiero agradecer al M. en C. Sergio Vaca Pacheco, ya que durante la realización del trabajo me orientó y apoyó con sus comentarios, críticas constructivas y revisión del trabajo final.

También quiero dar las gracias a la Q.F.B. Gloria Luz Paniagua por su colaboración en la determinación de las bacterias y por la revisión de éste trabajo.

De igual forma agradezco al M. en C. Daniel Muñoz por la ayuda que me brindo durante el estudio de las muestras de suelo, en el Laboratorio de Edafología.

Finalmente quiero agradecer al Dr Diego J. Arenas por las aportaciones hechas durante la revisión de trabajo. Así como al M. en C. Roberto Velazco por sus comentarios.

INDICE

	<i>Pagina</i>
INTRODUCCIÓN	2
MAPA DEL AREA DE ESTUDIO	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
1. Medios de cultivo y soluciones	
2. Toma de muestras	
3. Determinación de factores fisicoquímicos del suelo	
4. Determinación de conductividad eléctrica y salinidad del suelo	
5. Determinación de metales pesados en el suelo	
6. Determinación del número de bacterias por gramo de suelo.	
7. Aislamiento y purificación de cepas	
8. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de NaCl, Cromo, Plomo y Cadmio en las cepas aisladas, con la técnica de dilución en placa	
9. Antibiogramas	
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	35
CONCLUSIONES.	40
BIBLIOGRAFÍA.	41

INTRODUCCION

A causa del acelerado desarrollo de la industria y del incesante crecimiento de la población, el ambiente se encuentra en un proceso rápido de deterioro; una de las causas de esto es la acumulación de sustancias químicas en el suelo (Alloway, 1993), entre estas sustancias perjudiciales, con efectos nocivos para todos los organismos, sobresalen los materiales radioactivos, plaguicidas y los metales pesados. El deterioro del ambiente incluye también el aumento en la extensión de los suelos salinos. La contaminación puede ser de origen natural, de acuerdo a un ciclo biogeoquímico, o bien puede ser causada por la actividad humana (antropogénica). La contaminación natural se produce por erosión acuática, cuando aguas superficiales desgastan o destruyen la superficie terrestre, y erosión eólica; cuando la fuerza del viento desgasta lentamente la superficie terrestre. La fuente de contaminación antropogénica resulta de actividades humanas, como la industria, que durante siglos ha utilizado los metales pesados devolviéndolos posteriormente a los diferentes ecosistemas (Badillo, 1986).

Los metales pesados están ampliamente distribuidos, se encuentran en forma natural en diferentes concentraciones en la atmósfera, litósfera, biósfera e hidrósfera. Su naturaleza química es muy diversa y aún más sus efectos tóxicos sobre los sistemas biológicos, dado que permanecen en el ambiente por tiempo indefinido (Badillo, Op. Cit.). Muchos de los metales son esenciales para la vida vegetal y animal; sin embargo, en concentraciones excesivas pueden llegar a constituir una amenaza, ya que resultan perjudiciales para el crecimiento o el metabolismo de las células (Alloway, Op. Cit.).

Dentro de los metales más importantes, desde el punto de vista ambiental, figuran: Cobre, Cadmio, Mercurio, Estaño, Plomo; Vanadio, Cromo, Molibdeno, Manganeseo, Cobalto y Niquel. Una de las propiedades más importantes de éstos es su tendencia a la bioconcentración, la cual se facilita en el medio acuoso. La capacidad de interacción de un contaminante con un sistema biológico se conoce como biodisponibilidad; p.e.j. las ostras concentran zinc, mientras que otros mariscos son capaces de acumular grandes concentraciones de cadmio. Aunque los mecanismos que permiten esta bioconcentración aún no son entendidos, hay pruebas de grandes lesiones morfológicas, fisiológicas y etológicas en los organismos. (Badillo, Op Cit).

Hoy en día los organismos están expuestos a contaminantes en cantidades superiores a las que enfrentaron en el pasado; en consecuencia, las concentraciones de los contaminantes que soportan los organismos han variado considerablemente. Los metales

no tienen necesariamente más importancia que otras sustancias como contaminantes del medio, sin embargo su presencia en altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos, a la vez que tiene un efecto selectivo sobre las variantes genéticas resistentes. Los mecanismos bacterianos que confieren resistencia a altas concentraciones de metales pesados han sido, desde hace más de dos décadas, sujetos a investigación, aunque su estudio ha recibido especial atención en los últimos años, principalmente por la preocupación ante la creciente contaminación ambiental por estos metales, la selección de cepas bacterianas y la posibilidad de recuperar los metales valiosos y eliminar los tóxicos por medio de bacterias resistentes (Cervantes y col., 1991).

La naturaleza de las poblaciones bacterianas que habitan el suelo depende principalmente del grado de humedad, la concentración de hidrogeniones, la temperatura, los nutrientes disponibles y la aereación, entre otros. Las bacterias del suelo se han dividido en dos grandes grupos: las especies nativas o autóctonas; residentes verdaderos y, los organismos invasores o alóctonos. La fertilidad del suelo, a su vez depende en gran parte de la actividad bacteriana, ya que en él hay organismos, aerobios, anaerobios proteolíticos, capaces de causar descomposición y desintegración de la materia orgánica a través de la hidrólisis de proteínas y carbohidratos esenciales para los procesos vitales. (Bryan, 1976).

Las poblaciones bacterianas del suelo reflejan la cantidad de fuerzas ambientales que actúan sobre estos diminutos habitantes. La humedad ejerce un control en la actividad microbiana: dado que el agua es el componente principal del protoplasma, debe disponerse de un suministro adecuado para el desarrollo; cuando la humedad es excesiva, la proliferación microbiana se detiene no tanto a causa del exceso de agua -el cual no es perjudicial *per se*- sino principalmente porque dicho exceso limita el intercambio gaseoso y disminuye el suministro de oxígeno disponible creando así un ambiente anaeróbico. La temperatura rige los procesos biológicos, y por lo tanto, es un factor de interés en relación a las bacterias. Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento óptima y un intervalo fuera del cual el crecimiento se detiene. La mayoría de las bacterias presentes en el suelo son mesófilas, es decir, crecen a temperaturas de 25 a 30 °C, con capacidad de crecimiento entre los 15 y 45 °C. El tamaño de la población en suelos minerales está relacionado directamente con el contenido de materia orgánica, por lo que en localidades ricas en humus las bacterias son numerosas. Las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir el crecimiento de bacterias comunes, ya que para la mayoría de las especies, el óptimo está cercano a la neutralidad. Consecuentemente, el encalado de ambientes ácidos aumentaría apreciablemente la abundancia bacteriana. Aún así, suelos con un pH de 3.0, contienen muchas bacterias. Las prácticas de cultivo ejercen también

numerosos efectos biológicos directos o indirectos, las operaciones de labranza son tratamientos ambientales que generalmente causan marcadas alteraciones biológicas. De igual forma la aplicación de fertilizantes inorgánicos afecta frecuentemente tanto a plantas como a los microorganismos. La profundidad es otra variable ecológica que afecta a las bacterias, en zonas templadas, casi todos estos organismos se encuentran en el primer metro de profundidad, principalmente en los primeros centímetros (Alexander, 1980).

Los suelos salinos están clasificados universalmente en 2 grupos, de acuerdo con una serie de factores como el pH, la conductividad eléctrica, clase y cantidad de cationes presentes: los llamados suelos sódicos, que contienen sodio intercambiable en tal cantidad que altera desfavorablemente su productividad y los conocidos como simplemente salinos, que contienen sales solubles en exceso, que presentan pH menor de 8.5, se encuentran floculados debido al poco contenido de sodio intercambiable, afectando así su productividad (CONAGUA, 1991). Uno de los múltiples problemas que se presenta en los suelos con altas concentraciones de sales y que afecta la productividad vegetal, es la baja actividad microbiana de dichos suelos, como consecuencia de una serie de circunstancias que hacen al medio desfavorable para el desarrollo de microorganismos (Cervantes y Olivares, 1976).

Los terrenos del ex-Lago de Texcoco, que ocupan 26,700 Ha. cerca de la Ciudad de México, son probablemente una de las áreas del mundo en donde las concentraciones de sales solubles y de sodio intercambiable son las más elevadas. Cajuste, en 1977, reporta una conductividad eléctrica de la solución de estos suelos en el orden de 160 a 300 mmhos/cm, y un porcentaje de sodio intercambiable mayor de 90 % en ciertas partes de esta área; los cultivos de plantas resistentes a la salinidad toleran conductividades de 16 a 32 mmhos/cm. (Cajuste, 1977). El principal factor que ha influido en la salinización de estos suelos es el hecho de que la evaporación es mucho mayor que la precipitación, lo que trae como consecuencia que se concentren las sales disueltas en el agua. Además, ha influido la característica de haber sido una cuenca cerrada, en donde no existía salida de las aguas almacenadas. La mayoría de los suelos del ex-lago de Texcoco son, salino-sódico (zonas sin vegetación ni pastizales), pero también existen pequeñas áreas de suelos salinos -no sódicos. Las sales que predominan son los cloruros, carbonatos y bicarbonatos de sodio, las cuales se presentan en altas concentraciones en todo el perfil, sin embargo, las concentraciones en el suelo y subsuelo varían en función de la época de lluvias y secas, observándose que en la primera la mayor concentración es en el subsuelo y en la segunda en la superficie. (CONAGUA, op. cit.)

Mecanismos Biológicos de Resistencia a la Salinidad

Las bacterias varían en su susceptibilidad a los cambios de la presión osmótica, pero en general, presentan una mayor resistencia a estos cambios que las formas superiores (Bryan, Op. Cit.). Es por ello que estos microorganismos pueden ser manipulados genéticamente para la tolerancia osmótica (Le Rudulier y Valentine, 1982), ya que las sales pueden actuar favorablemente en las bacterias, suprimiendo la ionización de sustancias deletéreas ó reaccionar con ellas, evitando así que las bacterias sean afectadas, como es el caso de los cloruros de metales pesados, que en cantidades mayores ejercen un efecto perjudicial. (Bryan, Op. Cit.)

Entre las plantas y bacterias existen similitudes importantes respecto a la respuesta al estrés osmótico; en ambas, la presión osmótica del medio es un parámetro físico que determina la capacidad del organismo para proliferar en esas condiciones; en ambas, también se acumulan el mismo tipo de solutos en condiciones hiperosmolares, por lo que es de suponer que los mecanismos que regulan la respuesta al estrés osmótico son similares. El estrés osmótico se presenta cuando en un organismo la fuerza osmótica del medio aumenta o decrece y activa procesos de osmorregulación tendientes a contrarrestar sus efectos.

Dado que la membrana citoplasmática de las bacterias es permeable al agua e impermeable a la mayoría de los metabolitos, el shock osmótico ocasiona la entrada o salida de agua conduciendo a un aumento o decremento del volumen citoplasmático. Las rígidas paredes celulares pueden resistir presiones mayores de 100 atm., por lo que un shock hiposmótico ocasiona solamente un pequeño incremento del volumen celular, en cambio un shock hiperosmótico deriva en una disminución considerable del volumen (plasmólisis). La magnitud de la plasmólisis es dependiente de la magnitud en el incremento de la osmolaridad del medio e independiente de la naturaleza de los solutos. Cuando el shock hiperosmótico no es severo, después de un breve período de tiempo, el volumen citoplasmático se restablece como resultado de un ajuste osmótico celular (respuesta al estrés osmótico) (Csonka, 1989).

La exposición celular a condiciones hiperosmóticas afecta las actividades citoplasmáticas. Las proteínas y otras biomoléculas funcionan adecuadamente en un intervalo de concentración de agua, por lo que una plasmólisis repentina disminuye o inhibe una gran variedad de procesos fisiológicos; desde la incorporación de nutrientes hasta la replicación del material genético (Roth, Leckie y Dietzler, 1985). Ohwada y Sagisaka

(1988), han reportado por ejemplo, que una plasmólisis súbita se manifiesta en un incremento en los niveles de ATP, posiblemente como consecuencia de la inhibición de la biosíntesis de otras macromoléculas.

Generalmente, los organismos responden al estrés osmótico aumentando la concentración intracelular de cierto tipo de solutos (solutos compatibles), de manera que se restablece el volumen celular. Los solutos compatibles más comúnmente sintetizados o incorporados por las bacterias son: potasio, glutamato, prolina, γ -aminobutirato, alanina, glicinobetaina, sacarosa, trehalosa y glucosilglicerol. Estos solutos comparten características que permiten su acumulación intracelular en altas concentraciones sin que ocasionen disturbios fisiológicos. El potasio, como uno de los iones intracelulares predominantes en bacterias sirve, entre otras cosas, como osmolito que mantiene la turgencia celular. En especies bacterias como *Salmonella oranienburg*, *Escherichia coli*, *Bacillus coli communis* y *Anabena viridabilis* se ha determinado que la concentración intracelular de potasio es proporcional a la osmolaridad del medio (Christian, 1955; Epstein, 1965 y Reed and Stewart, 1985), asimismo, se ha establecido una relación entre su concentración intracelular y la capacidad bacteriana para tolerar altas concentraciones osmolares del medio (Csonka, Op. Cit.). Se ha observado en cultivos de *Escherichia coli* en fase exponencial de crecimiento, que se incrementa transitoriamente la concentración de este ión; cuando se enfrentan a condiciones de alta osmolaridad, pasados 30 minutos de shock las células comienzan a excretarlo al medio (Epstein y Schultz, 1965). A la fecha no se han determinado los mecanismo precisos involucrados en la entrada y salida del potasio, sin embargo se ha determinado que el operón *Kdp* está involucrado en su transporte y retención (Epstein, 1986).

La exposición de bacterias Gram-negativas a medios con alta osmolaridad puede conducir a incrementos en la concentración de glutamato de hasta 10 veces su condición normal (Csonka, Op. Cit). Se ha demostrado también, que la concentración de glutamina aumenta en bacterias gram-positivas expuestas a condiciones de estrés osmótico aún cuando no se alcanzan los niveles de glutamato de las Gram-negativas. Dado que la glutamina, en la mayoría de las bacterias, es un precursor en la síntesis del glutamato es posible que el incremento en su concentración sea consecuencia de la necesidad de la síntesis del glutamato (Tempest y Meers, 1970)

Se ha demostrado que *E. coli* sintetiza trehalosa como respuesta al estrés osmótico. Su síntesis implica la condensación de glucosa-6-fosfato y uridin glucosa-difosfato en trehalosa-6-fosfato, la cual posteriormente es sustrato de una fosfatasa (Larsen y Sydnes, 1987). En cultivos de *E. coli* y *S. typhimurium*, en la fase exponencial de crecimiento y

sometidas a estrés osmótico, se ha determinado la presencia de una enzima, trehalosa-6-fosfato sintetasa, aún cuando no ha sido posible determinar la presencia de enzimas con la actividad trehalosa fosfato-fosfatasa; además, las mutantes bacterianas deficientes en la acumulación de trehalosa muestran también un aumento en la sensibilidad al estrés osmótico por lo que se ha sugerido que los genes implicados en su síntesis están bajo el control osmótico (Giaever y col., 1988).

Diversas bacterias pueden acumular prolina en altas concentraciones, ya sea por síntesis o por transporte desde el medio. Algunas Gram-positivas cultivadas en medios carentes de prolina y expuestas a estrés osmótico son capaces de sintetizarla y acumularla, evidencia que su síntesis está bajo el control osmótico (Brown y Stanley, 1972), en contraparte, *S. aureus* acumula prolina al activar los sistemas transportadores (Anderson y Witter, 1982). Además de la prolina, la glicinabetaina es otro compuesto que generalmente es acumulado por las bacterias enfrentadas a condiciones hiperosmolares; puede ser incorporado del medio o bien sintetizado a partir de colina. El transporte de la glicinabetaina en *S. typhimurium* y *E. coli* está mediado por los sistemas ProP y ProU (los mismos implicados en el transporte de prolina) (May y col., 1986). Los productos de los genes *bet*, los cuales están bajo el control de la presión osmótica, son los responsables de la síntesis de glicinabetaina a partir de colina en *E. coli* y representan la respuesta bacteriana al estrés osmótico mejor conocida. La formación de glicinabetaina a partir de colina implica la participación de un transportador con alta afinidad por colina, codificado por *betT*, y dos enzimas, la colina deshidrogenasa y la betaina aldehído deshidrogenasa, codificadas por *betA* y posiblemente *betC* (Andersen y col., 1988), así mismo se ha demostrado que la osmolaridad, disponibilidad de oxígeno y la temperatura, además de la presencia de colina en el medio de cultivo, influyen en la tasa de transcripción de los genes *bet* (Landfald y Strom, 1986). La concentración de colina en el suelo generalmente es baja, en contraparte la cantidad de fosfatidilcolina y otros lípidos, p.ej. lecitina, que contienen colina suele ser alta debido a la descomposición de tejidos animales y vegetales, de donde la colina puede ser liberada en forma de fosforilcolina, mediante la actividad de la fosfolipasa (C o D), para posteriormente, mediante la acción de una fosfatasa, producir colina y fósforo inorgánico (Csonka, 1989).

Resistencia a los Antibióticos y a Cromo, Cadmio y Plomo.

Es común encontrar los determinantes genéticos de resistencias a antibióticos y metales asociados en un mismo plásmido, el cual puede, además, ser transferido por conjugación de una bacteria a otra (Cervantes, Op. Cit.). El uso inadecuado que en ocasiones el hombre ha dado a los antibióticos y a los metales pesados, ha constituido un factor de selección en favor de cepas resistentes (O'Brien y col., 1987). Como ha ocurrido con otras áreas de las ciencias biológicas, el advenimiento de la tecnología de la ingeniería genética ha permitido que en la última década se haya generado una gran cantidad de información con respecto a los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos y metales pesados. La transferencia de un gen de resistencia vía un plásmido a otras cepas y especies introduce el gen a los nichos que pueden ocupar éstas últimas; favorece también la inserción del gen en otros plásmidos, los cuales a su vez pueden transferirse a otras cepas diferentes que eran inaccesibles al primer plásmido, llevando el gen de resistencia a nuevos nichos. De esta forma la diseminación del gen de resistencia podría ser preservado por recombinación con otros genes que confiriesen algún fenotipo ventajoso diferente (Amábile, C. 1988).

Los efectos biológicos del cromo dependen de su estado de oxidación; mientras que el cromo trivalente se considera un metal esencial para los organismos vivos, la forma hexavalente (cromatos y dicromatos) presenta elevada toxicidad. Se ha demostrado ampliamente que los cromatos son mutágenos y carcinógenos. El ión cromato actúa como un análogo del sulfato, debido a su similitud química, y es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en *Pseudomonas* (Ohtake y col., 1987). La resistencia bacteriana a cromato puede deberse a mutaciones cromosómicas, que generalmente afectan el transporte de sulfato, o bien a la presencia de plásmidos. Las resistencias cromosómicas y plásmidicas funcionan mediante mecanismos distintos (Cervantes y Silver, 1991)

Recientemente fueron secuenciados dos determinantes de resistencia a cromato a partir de plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Alcaligenes eutrophus*. Los genes clonados de *Pseudomonas* se expresan de manera constitutiva, mientras que los de *Alcaligenes* son inducibles (Cervantes y col., 1990). Aunque los determinantes no hibridaron en experimentos tipo Southern, el análisis de las secuencias de nucleótidos

T A B L A I

MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A CROMO, CADMIO Y PLOMO

METAL	MECANISMOS
CROMO	<p>LA RESISTENCIA A CROMO PUEDE DEBERSE A:</p> <ul style="list-style-type: none"> • MUTACIONES CROMOSOMICAS QUE GENERALMENTE AFECTAN EL TRANSPORTE DE SULFATO. • DESTOXIFICACION DEL CROMO HEXAVALENTE POR REDUCCION A TRIVALENTE. • TRANSPORTE DISMINUIDO, CONFERIDO POR PLASMIDOS
CADMIO	<ul style="list-style-type: none"> • EXPULSION POR ATPasa, CONFERIDA POR PLÁSMIDOS. • EXCRECION DE PROTEINAS CAPTADORAS DE CADMIO.
PLOMO	<ul style="list-style-type: none"> • SE SABE QUE LA RESISTENCIA A ESTE METAL ESTA DETERMINADA POR LA PRESENCIA DE PLASMIDOS, SIN EMBARGO NO SE HAN REPORTADO LOS MECANISMOS DE COMO ACTUAN ESTOS.

reveló homología entre los polipéptidos hidrofóbicos, designados ChrA, codificados por ambos determinantes. Se postula que ChrA es una proteína membranal responsable de la acumulación disminuida de cromato en las bacterias resistentes; ChrA funcionaría como un canal membranal para la translocación de los iones cromato. Un segundo polipéptido deducido de la secuencia de nucleótidos, ChrB, fue localizado en *Alcaligenes* pero no en *Pseudomonas* y se le ha asignado un papel regulador (Nies y col., 1990).

Un mecanismo de resistencia a cromato no codificado por plásmidos se relaciona con la detoxificación del cromo hexavalente por reducción a trivalente (Cervantes, Op. Cit.). Una gran variedad de cepas bacterianas es capaz de reducir cromato, incluyendo *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter* y *E. coli*. Bopp y Ehrlich encontraron que tanto las bacterias sensibles como las resistentes a cromato son capaces de reducir el cromo hexavalente, por lo que la resistencia plasmídica a cromato y la reducción de cromato son procesos independientes (Bopp y Ehrlich, 1988).

La resistencia a cadmio conferida por plásmidos se encontró inicialmente en bacterias Gram-positivas y constituye uno de los marcadores genéticos de resistencia más comunes en los plásmidos de estafilococos (Smith y Novick, 1972). En *S. aureus* el cadmio penetra a la célula por la vía de transporte de manganeso (Pery y Silver, 1982) mientras que en *E. coli* lo hace por el sistema de transporte de zinc (Laddaga y col., 1985). En ambos casos el cadmio funciona como un sustrato tóxico que inhibe competitivamente los sistemas fisiológicos de transporte de los cationes esenciales.

El mecanismo de resistencia a cadmio se ha estudiado con mayor detalle en *Staphylococcus aureus*. Los plásmidos responsables contienen 2 genes que confieren distintos niveles de resistencia tanto a cadmio como a zinc, *cadA* (nivel elevado) y *cadB* (nivel reducido) (Novick y col., 1979). Tynecka y col. encontraron que las células de *S. aureus*, que poseen *cadA* muestran una incorporación reducida de cadmio debido a un mecanismo de eflujo que elimina el cadmio intracelular (Tynecka y col., 1981).

Recientemente se encontró que la resistencia a cadmio del plásmido pMOL30 de *Alcaligenes eutrophus* se basa también en un eflujo del cadmio intracelular (y del zinc, níquel y cobalto, a los que también confiere resistencia) en un proceso dependiente de energía (Nies y Silver, 1989). El determinante de resistencia a cationes (denominados *czc*) del plásmido pMOL30 fue secuenciado. Después de expresar el operón *czc* en *E. coli*, Nies y col. identificaron 4 productos génicos y propusieron sus posibles funciones; *CzcA* es una proteína esencial para el eflujo de iones; *CzcB* está involucrado en el transporte de zinc; *CzcC* parece intervenir en la eliminación de cadmio y cobalto y, finalmente, *CzcD* tiene las propiedades de una proteína reguladora (Nies y col., 1989)

Un interesante mecanismo de resistencia a cadmio, probablemente no conferido por plásmidos, se basa en la excreción de proteínas captadoras de cadmio, ricas en cisteína (semejantes a las metalotioninas de células animales, vegetales y otros organismos) que han sido descritas en *Pseudomonas putida* (Higham y col., 1984).

El plomo es un agente tóxico que se acumula progresivamente en la naturaleza, es por ello, que frecuentemente se presenta como un contaminante serio del ambiente, ocasionando alteraciones fisiológicas graves en los organismos que se encuentran en contacto con él. Con respecto a las bacterias se sabe que presentan cierta resistencia al plomo, estudios realizados por Novick y Roth (1968) y Mergeay (1991), permiten saber que la resistencia a este metal está determinada por la presencia de plásmidos. Sin embargo no se han reportado estudios sobre los mecanismos de resistencia para el plomo (Vaca y Col, 1995).

Se han realizado numerosos estudios microbiológicos sobre suelos salinos pero la mayoría se ha dirigido a investigar el efecto de la salinidad sobre un determinado grupo microbiano, sin embargo, no faltan quienes realizan este estudio con una visión general, como lo es este trabajo que pretende, mediante el aislamiento de bacterias a partir de suelos salinos, determinar sus patrones de sensibilidad a la salinidad y a metales pesados, aportando así, información para posteriores estudios microbiológicos enfocados sobre esta línea.

MAPA DEL AREA DE ESTUDIO

LOCALIZACIÓN DEL EL-LAGO DE TEXCOCO Y LAZO RANCHO CARRILLO FLORES.

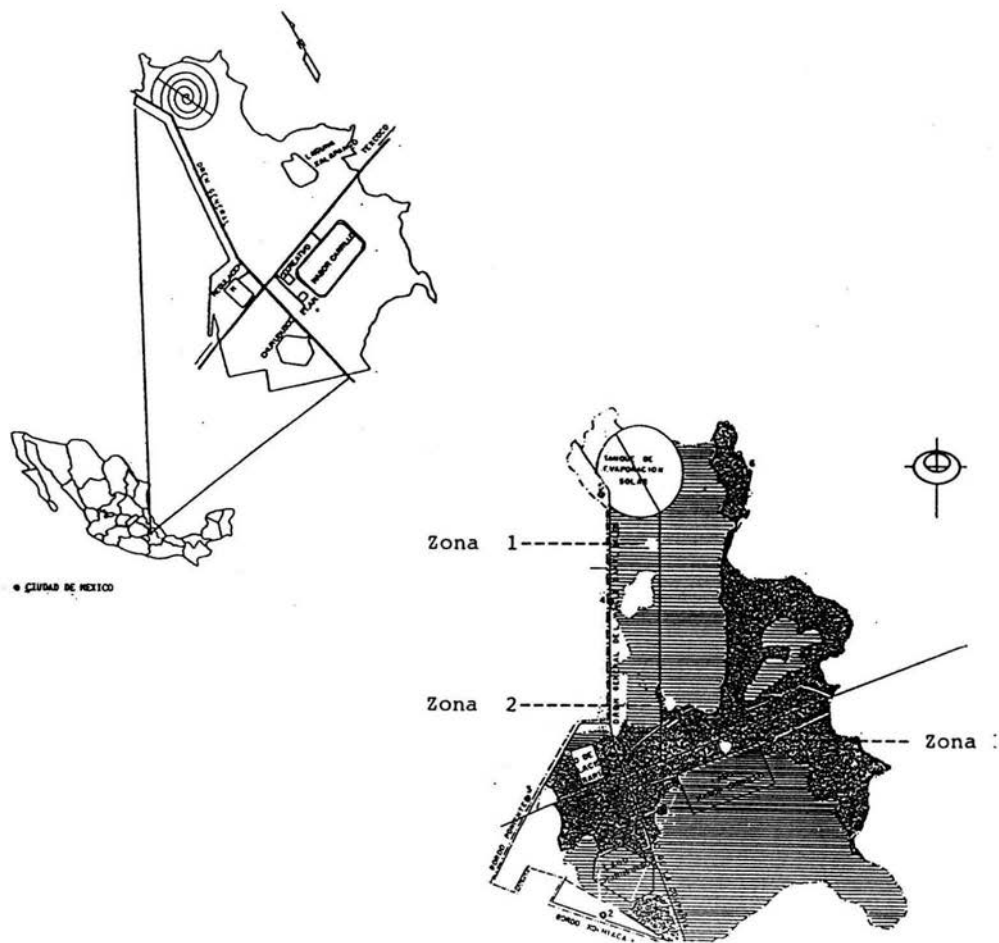


Fig. A.- Localización de las 3 zonas muestreadas dentro de los terrenos del Proyecto Ex-Lago de Texcoco

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Aislar bacterias a partir de muestras de suelo de 3 diferentes zonas del Ex-lago de Texcoco y determinar sus patrones de sensibilidad a distintas concentraciones de NaCl, cromo, cadmio y plomo.

Objetivos Particulares.

- Determinar el No. de bacterias por unidad de suelo.
- Determinar la salinidad y la concentración de cromo, cadmio y plomo en las muestras de suelo y otros parámetros fisicoquímicos (Humedad, Materia Orgánica, pH y Temperatura).
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de NaCl, plomo, cadmio y cromo, en las cepas aisladas, mediante la técnica de dilución en placa.
- Caracterizar las cepas respecto a sus patrones de resistencia a antibióticos y su respuesta a la tinción de Gram.

MATERIALES Y METODOS

1. Medios y Soluciones.

ACETONA
ACETATO DE AMONIO 1 M.
AGAR BACTERIOLOGICO
AGAR DE MUELLER-HILTON
AGAR NUTRITIVO

BUFFER DE FOSFATOS
6.8 gr-----FOSFATO DE POTASIO.
1.16 gr-----HIDROXIDO DE SODIO
ajustar a pH 7.0 con NaOH y aforar a 500 ml. Esterilizar.

CALDO NUTRITIVO
CRISTAL VIOLETA
CROMATO DE POTASIO
CLORURO DE SODIO

DEXTROSA AL 20 %
10 gr disolver en 50 ml. de agua destilada
esterilizar mediante filtración con millipore

LUGOL

MEDIO M63 10X.
136 gr fosfato de potasio KH_2PO_4
20 gr sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.5 ml sulfato de fierro FeSO_4
en 500 ml. de agua destilada, ajustar pH 7 con KOH
y aforar a 1000.

NITRATO DE CADMIO

NITRATO DE PLOMO

SAFRANINA.

SULFATO DE MAGNESIO.

Todos los medios y soluciones fueron esterilizados en autoclave durante 15 minutos a 15 lb/pulg. y 121 °C, excepto la solución de dextrosa 20% la cual fue esterilizada por filtración.

2.- Toma de muestras.

Las muestras de suelo fueron colectadas dentro del área Federal del Proyecto Ex-lago de Texcoco, determinándose tres zonas en base al tipo de agua que utilizan para el lavado de suelos, el grado de recuperación de los mismos y el tipo de vegetación presente.

- i. **Zona 1;** presenta encharcamientos de agua con salinidad alta, carece de vegetación, es considerada como un suelo no recuperado y durante la temporada seca del año se cubre con frecuencia con una costra blanquecina de sal cristalizada que hace difícil el crecimiento de plantas.
- ii. **Zona 2;** el tipo de agua que utilizan en la recuperación de los suelos en esta área es residual no tratada y tratada, la vegetación presente esta formada por pastos adaptados a la salinidad, los suelos de la zona están en proceso de recuperación.
- iii. **Zona 3;** en los suelos de esta área han crecido diferentes especies vegetales que van desde los pastos a los arbustos, para estos suelos el agua que se utiliza para su lavado y para mantener su estado proviene del depósito de agua de lluvia. así como de la Planta de Lagunas Facultativas.

Se tomaron aproximadamente 500 gr de suelo de las distintas zonas, marcando un rectángulo de 30 x 20 en la superficie y se escarbó de 15 a 20 cm. de profundidad. removiendo la tierra de tal forma que se mezcle la de arriba con la del fondo. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

3.- Determinación de Factores Físicoquímicos del Suelo.

T°C.- La temperatura fue tomada al momento de colectar las muestras, colocando un termómetro en el sitio donde se escarbó,. La hora de muestreo fue entre las 9:30 y las 11:00 a.m.

pH.- Este factor fue medido cuando se determinó la salinidad.

% Humedad.- Para la medición de humedad se utilizó el Método Gravimétrico (Jackson, 1976).

- Las muestras de suelo se pesaron el mismo día de su colecta (peso suelo humedo).
- Posteriormente la muestras se pesaron después de secarlas en una estufa a 105 °C durante 24 hrs. (peso suelo seco).
- La determinación del % de humedad se realizó con la fórmula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Peso suelo humedo} - \text{Peso suelo seco}}{\text{Peso suelo seco}} \times 100$$

% Materia Orgánica.- Para la determinación de la Materia Orgánica se empleó el Método de Walkey-Black (Jackson, 1976), el cual se basa en la oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio en un medio ácido. La reacción se mide a través del color generado por la mezcla del ácido sulfúrico con agua en el medio de reacción, por lo cual la oxidación no es completa y el exceso de dicromato se determina titulando con sulfato ferroso.

- Se pesó 0.5 gr de suelo por cada muestra y se colocó en un matríz, agregando con una bureta 5 ml. de dicromato de potasio 1 N
- A cada matríz se le adicionaron lentamente 10 ml. de ácido sulfúrico concentrado.
- Se agitaron y se dejaron reposar durante 30 min. Posteriormente se agregó a cada matríz 100 ml. de agua destilada y 5 ml. de ácido fosfórico, además de 2 a 3 gotas de indicador bariosulfanato de fenilamina.
- Finalmente se tituló con sulfato ferroso 0.5 N. El porcentaje de materia orgánica se obtuvo mediante la fórmula:

$$\% \text{ M. O.} = \frac{\text{ml. usados de dicromato de potasio} - (\text{ml. usados de sulfato ferroso} \times \text{N. real})}{\text{Gr. de Muestra}} \times 0.69$$

$$\text{Normalidad real} = \frac{10 \times 0.5}{\text{ml. de sulfato ferroso (gastados por el blanco)}}$$

4.- *Determinación de Conductividad Eléctrica y Salinidad del Suelo.*

Extracto de saturación. (Jackson, op. cit.)

- Se pusieron a secar las muestras para tamizar la tierra.
- Se pesaron 350 gr. de cada muestra de suelo, para prepararse con agua destilada saturándolas a modo de lodo, dejándose así en refrigeración por 24 hrs.
- Una vez transcurrido este tiempo, se procedió mediante la técnica de extracción al vacío, a digerir las muestras durante 1.5 h permitiendo así que la recuperación del líquido fuera completa, para después determinar, mediante un puente wheatstone YSI M33 S-C-T METER de corriente alterna, la conductividad eléctrica y la salinidad.

5.- *Determinación de Metales Pesados en el Suelo.*

Para la determinación de los metales pesados; cromo, cadmio y plomo, se prepararon las muestras mediante la técnica de filtrado con Acetato de amonio pH 7 a fin de cuantificar las concentraciones intercambiables presentes en el suelo.

Técnica de Filtrado (Jackson, 1976).

- Se pesaron 5 gr de cada muestra de suelo y se colocaron en un embudo con papel filtro sobre un matrás.
- Se filtraron con solución de Acetato de amonio pH 7 de 10 en 10 ml hasta obtener 50 ml finales de solución.

- Una vez obtenidas las soluciones problema, se cuantificó el plomo, el cromo y el cadmio presentes en las 3 muestras de suelo, mediante el Espectrofotómetro de Absorción Atómica SP 192 PYE UNICAM.

6.- Determinación del Número de Bacterias por Gramo de Suelo.

Se pesaron 0.5 gr. de cada una de las muestras de suelo y se suspendieron en 50 ml de Sol. salina estéril en un matríz, colocándose en agitación durante 30 min. a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo se espatularon 0.1 ml de cada muestra, por duplicado (sin diluir y diluyendo 1:10 en Sol. salina estéril), en cajas de agar nutritivo preparadas previamente, incubándolas a 32 °C durante 24 hrs., con lo cual se calculó el número de bacterias por gramo de suelo.

7.- Aislamiento y Purificación de Cepas.

Se procedió a aislar las diferentes cepas que se encontraron en las 3 muestras de suelo, resemebrándolas hasta su purificación.

Dentro de la caracterización que se realizó a esas cepas, se determinó su capacidad de crecer en Medio M63 (medio mínimo) debido a que, para determinar las MIC de NaCl era necesario utilizar medio mínimo, puesto que los medios ricos contienen osmoprotectores (principalmente prolina).

La identificación morfológica de las cepas se realizó mediante la tinción de Gram.

8.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Una vez realizado lo anterior se determinaron las MICs de NaCl, plomo, cadmio y cromo, para cada cepa, mediante la dilución en placa utilizando el replicador de Steers.

Para la determinación de las MIC se prepararon previamente cajas petri con diferentes concentraciones de Cloruro de sodio para la salinidad, Nitrato de plomo para el plomo, Nitrato de cadmio para cadmio y Cromato de potasio para cromo.

Para el Cloruro de sodio se preparó una solución de 4M, de la cual se realizaron diferentes diluciones que nos dieran concentraciones diferentes desde 0.2 a 2 M.

De igual forma para el Nitrato de plomo se realizaron de una solución de 2.5 gr. en 5 ml. de agua destilada, las concentraciones: 0.195, 0.390, 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 $\mu\text{g./ml}$.

Para el Nitrato de cadmio se preparó una solución de 0.5 gr. en 5 ml. de agua destilada, tomando diferentes cantidades que nos llevaran a concentraciones de: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 $\mu\text{g. / ml}$.

Para las diferentes concentraciones de Cromato de potasio, 96.75, 187.5, 375, 750, 1500 y 3000 $\mu\text{g. / ml}$. se partió de una solución de 3.75 gr. en 5 ml. de agua destilada.

Una vez que se obtuvieron cada una de las concentraciones en 250 ml. de agar nutritivo. (éste último solo se ocupó para los metales, ya que para el NaCl se utilizó M63 + agar bacteriológico), se vaciaron en cajas petri esperando que solidificaran para ser utilizadas con el replicador de Steers.

Para la realización de la técnica de dilución en placa, se pusieron a crecer previamente cada cepa bacteriana en tubos de ensaye con un ml. de medio líquido M63 (medio mínimo), durante 24 hrs. a 30°C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a instalar el Replicador de Steers, el cual se esterilizó con alcohol y/o fenol colocándolo cerca de los mecheros. De igual forma las placas de bronce que contienen los pozos donde fueron colocadas las bacterias así como los salientes que embonan en los pozos y las puntillas de las jeringas automáticas fueron esterilizadas, evitándose así, contaminantes que interfieran con los resultados obtenidos.

Posteriormente se procedió a tomar 200 μl de cada una de las cepas bacterianas y se colocaron en los distintos pozos de la placa adicionándoles a cada pozo 400 μl de medio mínimo M63.

Finalmente y una vez llenos los pozos se presionaron las placas de tal forma que embonaran y se pudiera tomar muestra de los pozos, misma que se depositaron en la superficie de las cajas petri anteriormente preparadas. Finalmente se Incubaron las cajas durante 24 hrs. 32 °C.

9.- *Antibiogramas.*

Esta prueba se fundamenta en que al colocar un disco impregnado con determinada cantidad de antimicrobiano, sobre un medio sólido inoculado de bacterias, el antimicrobiano difundirá, formándose un gradiente de concentración que inhibe o permite el crecimiento de la bacteria.

- Se prepararon cajas petri con agar Müeller-Hilton para inocular en ellas a los microorganismos.
- Se tomó con un isopo estéril de algodón de 4 a 5 colonias de cada cepa y se sembraron en las cajas previamente preparadas.
- Una vez realizado lo anterior, se colocaron los discos con unas pinzas estériles presionándolos ligeramente para asegurar su contacto con la superficie.
- Finalmente se incubaron las cajas durante 24 hrs. a 30 °C.
- Transcurrido este tiempo se procedió a la observación de los halos de inhibición, clasificando a las cepas como resistentes o sensibles.

RESULTADOS.

1. Determinación de Parámetros Físicoquímicos

La conductividad se determinó según se describe en el apartado de metodología, los resultados como puede observarse en la tabla II, indican que el valor de la conductividad eléctrica de la zona 1 triplica aproximadamente al valor correspondiente a la zona 3 y cuadruplica al de la zona 2.

T A B L A II

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS SUELOS MUESTREADOS. LOS VALORES SON UN PROMEDIO DE 2 DETERMINACIONES INDEPENDIENTES.

PARAMETROS/MUESTRA	ZONA 1	ZONA 2	ZONA 3
CONDUCTIVIDAD/DEL EXTRACTO DE SATURACION DEL SUELO	160 mmhos/cm	42 mmhos/cm	68 mmhos/cm
% DE SALES EN EL SUELO	3.59	0.8959	1.71
pH	10	9.3	9.1
% DE HUMEDAD	37.72 %	15.33 %	48.68 %
TEMPERATURA	27 °C	23 °C	21 °C
% MATERIA ORGANICA	4.28 %	6.54 %	6.93 %

Los valores presentados de salinidad fueron obtenidos al aplicar la ecuación

$$\% \text{ de sales en el suelo} = 0.064 \times L \text{ mmhos/cm} \times \frac{\% \text{ de agua en el suelo cuando se somete a extracción}}{100}$$

Los resultados indican que la zona 1 contiene el mayor porcentaje de sales en el suelo (3.59%) seguido por la zona 3 (1.71) y finalmente la zona 2 cuyo valor es aproximadamente 1%.

Los valores de pH se obtuvieron a partir del extracto de saturación, en la tabla II se indica que el valor más alcalino corresponde con la zona 1, mientras que el menos alcalino corresponde a la zona 3.

La temperatura determinada en las zonas no llega a rebasar los 30 ° C, se observa que el valor mas alto (27) corresponde con la zona 1, mientras que el menor (21) corresponde a la 3.

En la tabla puede observarse que para el caso del porcentaje de humedad y de materia orgánica, la zona 3 muestra los valores mas elevados (48.68 y 6.93 respectivamente). en comparación con la zona 1 y 2.

2. Determinación de Metales Pesados

Para cada una de las zonas se cuantificó la concentración en partes por millón de los siguientes metales: Cromo, Cadmio y Plomo, los resultados se presentan en la tabla III. Realizándose para cromo y plomo curvas patrón con cromato de potasio y nitrato de plomo respectivamente (ver Fig. 2).

T A B L A III

CONCENTRACIONES DE METALES PESADOS EN LAS MUESTRAS DE SUELO.

ppm	Zonas: 1	2	3
CROMO	0.5	0.5	0.5
CADMIO	0.051	0.048	0.047
PLOMO	1.0	0.75	0.75

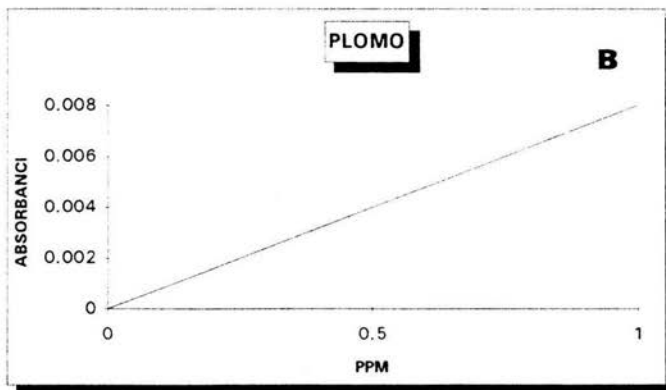
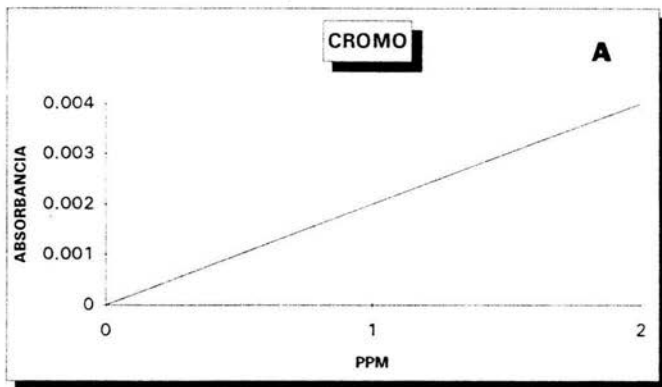


Figura 2. Curvas Patrón para la Cuantificación de Cromo (A) y Plomo (B), mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Los valores son el resultado de 3 mediciones realizadas con el Espectrofómetro de Absorción Atómica SP 192 PYE UNICAM del Laboratorio de Edafología, UMF-IZTACALA.

Los resultados indican que no hay diferencias en la concentración de cromo en las tres zonas muestreadas (0.5 ppm), para el caso del plomo, las zonas 2 y 3 presentan concentraciones iguales (0.75 ppm), mientras que la zona 1 tiene un valor más elevado (1 ppm). Respecto al cadmio, los valores de las tres zonas son similares 0.051, 0.048, y 0.047 para la zona 1, 2 y 3 respectivamente.

3. *Determinación del número de unidades formadoras de colonias (U.F.C) por gramo de suelo.*

En la Tabla IV se indican los resultados de las U.F.C. por gramo de suelo, ahí se puede observar que los valores de las zonas 2 y 3 son aproximadamente iguales, mientras que el correspondiente para la zona 1 disminuye en un orden de magnitud.

T A B L A IV.

NO. DE UFC/G EN LOS SUELOS MUESTREADOS.

	Número de U.F.C/gramo
ZONA 1	1×10^4
ZONA 2	7.4×10^5
ZONA 3	8.6×10^5

4. *Aislamiento y purificación de cepas.*

Se aislaron y purificaron 42 cepas bacterianas a partir de las 3 muestras de suelo, se procedió a determinar su capacidad metabólica creciéndolas en medio mínimo (M 63) el cual contiene dextrosa como única fuente de carbono. El 99.95 % de las cepas resultaron protótrofas, siendo estas las cepas a las que se les determinó las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de metales pesados y salinidad. Además se determinó la morfología de las cepas mediante la Tinción de Gram y se observó que el 83 % fueron Bacilos Gram+.

5. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias para Metales Pesados y Salinidad.

Las concentraciones mínimas inhibitorias de Cromo, Cadmio, Plomo y NaCl se determinaron mediante el método de dilución en placa, como se describe en metodología, y los resultados se presentan las figuras 3, 4, 5, y 6.

- La grafica A de la figura 3 muestra la distribución de la susceptibilidad al cromo de las cepas aisladas a apartir de la zona 1. Se puede observar que estas cepas se distribuyen en dos grupos distintos, el pico de 375 $\mu\text{g/ml}$ corresponde al 40 % del total de las cepas denominándola población sensible, en el segundo grupo encontramos el 60 % de las cepas restantes, las cuales presentan una MIC de 3000 $\mu\text{g/ml}$.
- Las tres distribuciones fueron bimodales; en los 3 casos el de corte sensible-resistente coincidió en 750 $\mu\text{g/ml}$, variando sólomente el pico de las resistentes en la zona 1 (3000 $\mu\text{g/ml}$) respecto a la zona 2 y 3 (1500 $\mu\text{g/ml}$). Esto puede observarse en las gráficas B y C

En la Figura 4 se presenta la distribución de la susceptibilidad al Cadmio de las cepas bacterianas aisladas.

- Se presenta en la gráfica A, la distribución de MICs de las bacterias de la zona 1. esta población se distribuye en dos grupos; el sensible con un MIC de 25 $\mu\text{g/ml}$ donde se encuentra el 40 % de la población y el resistente con un MIC de 100 $\mu\text{g/ml}$ que agrupa otro 40 %, el 20 % restante presenta una susceptibilidad intermedia de 50 $\mu\text{g/ml}$.
- La gráficas B y C, correspondientes a las zonas 2 y 3, se diferencian de la anterior, dado que estas bacterias se distribuyen en un solo grupo de susceptibilidad en torno a 50 $\mu\text{g/ml}$. El 80 % de las cepas de la zona 2 presentan esta MIC, mientras que en la zona 3 solo es el 55 %. El 5 % de las bacterias de la zona 2 presentaron un MIC de 100 $\mu\text{g/ml}$, a diferencia de las bacterias de la zona 3, las cuales el 32 % se inhiben a esta concentración.

Dado que en las zonas 2 y 3 se obtuvo una distribución unimodal y observando los resultados de la zona 1, podemos considerar a estas bacterias como de resistencia intermedia a cadmio.

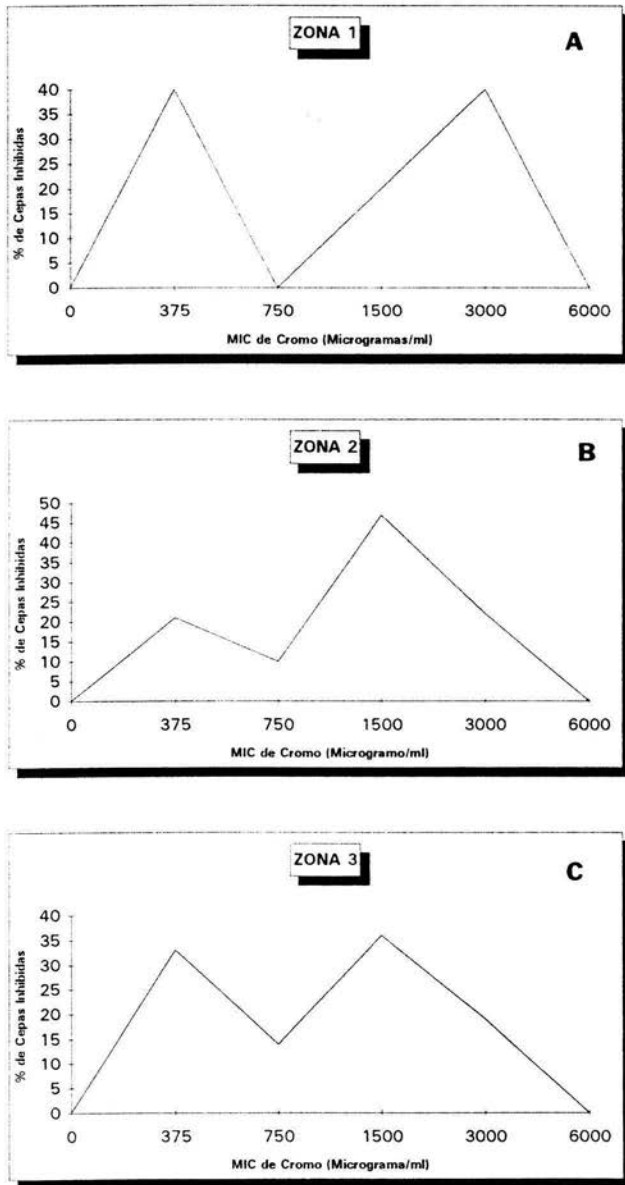


Figura 3. Distribución de las concentraciones mínimas inhibitorias de cromo determinadas para las poblaciones bacterianas aisladas de suelos del Ex-Lago de Texcoco, obtenidas por el método de dilución en placa descrita en metodología.

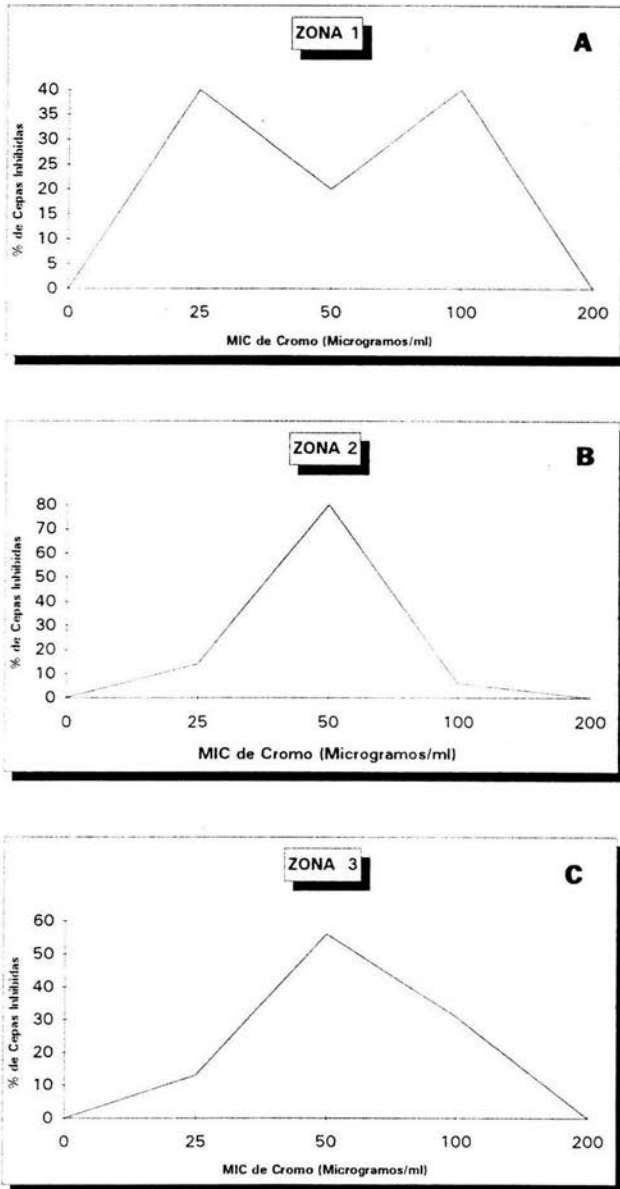


Figura 4. Distribución de las MIC's de cadmio determinadas en las 3 poblaciones bacterianas aisladas de suelos del Ex-Lago de Texcoco, las cuales se determinaron mediante la técnica de dilución en placa descrita en metodología. Se gráficaron los datos de 3 ensayos independientes lo mismo en las gráficas para el cromo.

En la figura 5 se presentan las gráficas de los resultados al enfrentar las poblaciones bacterianas a concentraciones de Plomo que oscilaron entre 0.195 y 6400 $\mu\text{g/ml}$.

- En las gráficas A, B y C las bacterias forman un solo grupo, sin embargo el primer pico corresponde a 1600 $\mu\text{g/ml}$ y agrupa al 80 % de la población, mientras que en la gráfica B encontramos para esa MIC sólo al 57 %. En la gráfica C la distribución de la susceptibilidad es distinta, el mayor porcentaje de la población, presenta una MIC de 3200 $\mu\text{g/ml}$ y el restante, el 40 %, tiene una MIC de 1600 $\mu\text{g/ml}$. En la primera gráfica sólo el 20 % de la población de la zona 1 presenta una MIC de 3200 $\mu\text{g/ml}$. mientras que en la zona 2 cerca del 40 % de la población tiene ésa MIC.

Finalmente en la Figura 6, se gráficas las concentraciones de NaCl que inhiben el crecimiento de las poblaciones bacterianas. La gráfica A corresponde a la Zona 1 la B a la zona 2 y la C a la zona 3.

- En la gráfica C podemos observar que la población bacteriana de esta zona presenta un comportamiento bimodal, donde el punto de corte entre una población sensible y una resistente está dado por 0.8 M. A diferencia de las poblaciones de las zonas 1 y 2 donde las gráficas A y B respectivamente, representan un comportamiento unimodal, el cual nos indica que la sensibilidad de estas poblaciones a NaCl es mayor o igual a 0.6 M

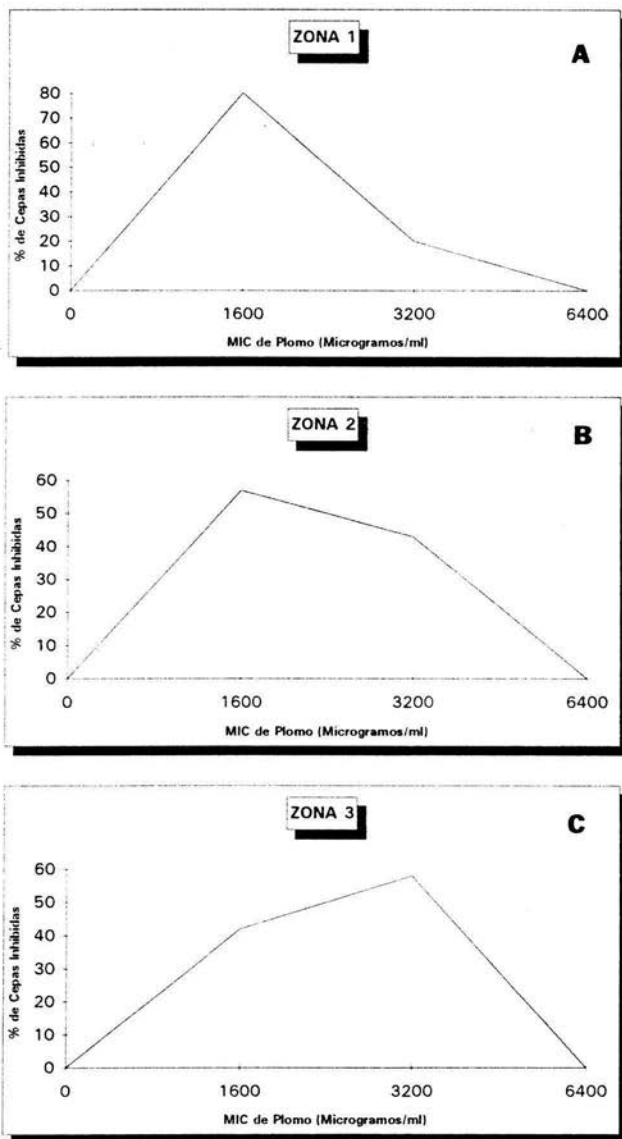


Figura 5. Distribución de las MIC's de plomo para las 3 poblaciones bacterianas aisladas del Ex-Lago de Texcoco. Se gráficán los resultados de al menos 3 ensayos independientes descritos en metodología.

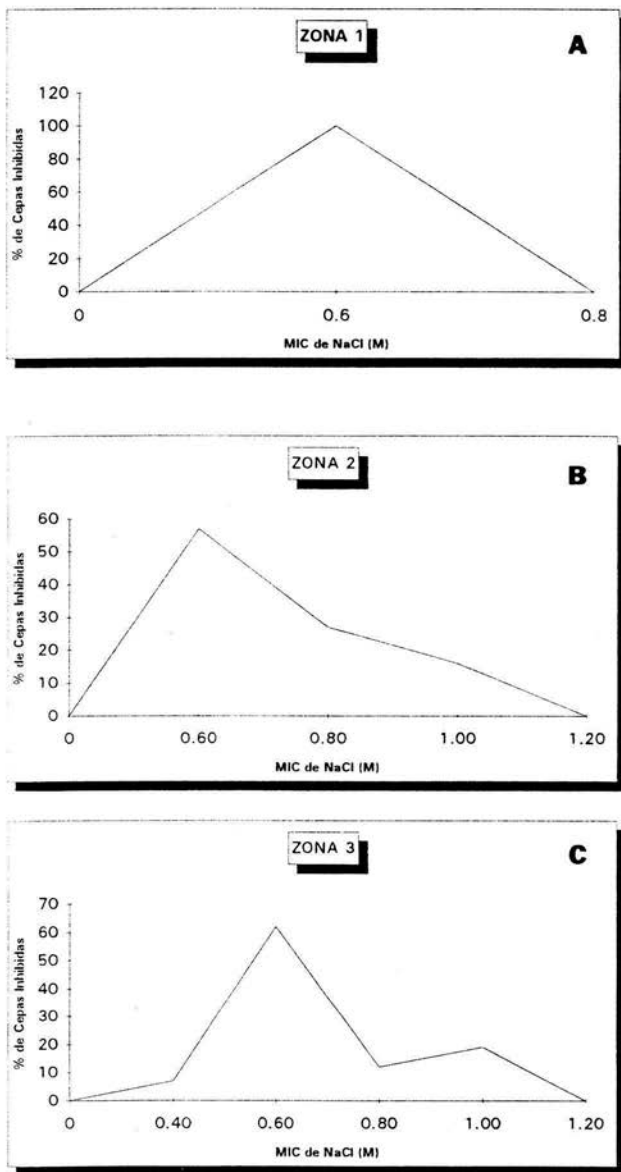


Figura 6. Determinación de las MIC's de NaCl de 3 poblaciones bacterianas aisladas de suelo, obtenidas de 3 ensayos independiente empleando la técnica de dilución en placa.

6. Determinación de la resistencia a antibióticos.

Se determinó en las 42 cepas aisladas de las 3 zonas la resistencia a 12 antibióticos: Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefuroxima, Dicloxacilina, Eritromicina, Gentamicina, Pefloxacina, Penicilina, Tetraciclina y Trimetropim-Sulfametoxazol.

En la Figura 7 se muestran los porcentajes de multiresistencia de las cepas de las zonas 2 y 3. Los resultados correspondientes a las cepas de la zona 1 no se presentan en gráficas dado que el porcentaje de cepas que resistieron 6, 7, 8 y 9 antibióticos fue idéntico para todos los casos (16.6%).

- En la grafica A se presentan los porcentajes de multiresistencia de las cepas aisladas de la zona 2; cerca del 40 % de la población resiste 7 antibióticos, como lo muestra la barra correspondiente, 20 % resiste 8 antibióticos, 15 % a 5, 10 % a 3 y finalmente la resistencia a 2 y 6 antibióticos presenta los porcentajes más bajos, en esta población (5 % aproximadamente).
- Los resultados de la población de la zona 3, se presentan en la gráfica B ahí se muestra que la mitad de esta población, presenta multiresistencia a 8 antibióticos y que el restante se distribuye de la siguiente manera: 6.25 % resiste a 2 y 5 antibióticos, y 31 % a 7.

En la Figura 8 se presenta la distribución de resistencia a cada uno de los antibióticos de las tres poblaciones bacterianas.

- Las cepas de la zona 1 (gráfica A) muestran con mayor frecuencia resistencia a la Penicilina (100 %), la frecuencia de resistencia a Ceftazidima, Cefuroxima o Ampicilina se presenta en el 66.6 % de la población, el 50 % de la población resiste a Dicloxacilina, Cefalotina o Cefotaxima y finalmente el 33.3 % de la población resiste a Eritromicina o Trimetoprim-Sulfametoxazol.
- La gráfica B muestra que las cepas presentan mayor frecuencia de resistencia a los Antibioticos: Penicilina, Dicloxacilina o Cefalotina en un porcentaje del 85.7 %, seguidas en porcentaje por las cepas resistentes a Ceftazidima (76.1%), Cefuroxiam (71.4%), Ampicilina o Cefotaxima (57.1%) y finalmente la Trimetoprim-Sulfametoxazol (47.6 %).

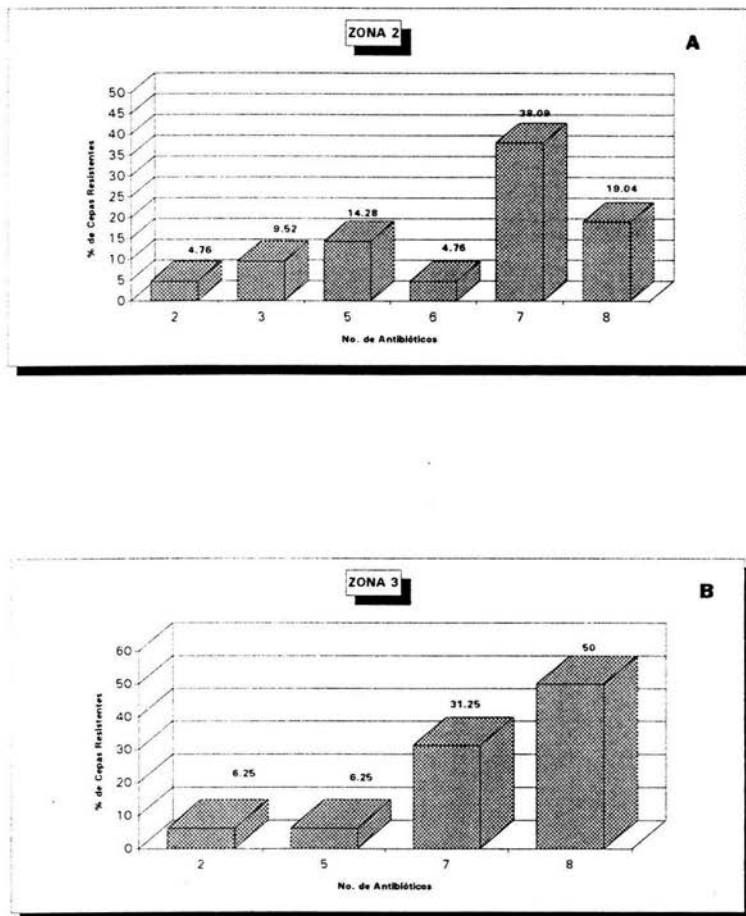


Figura 7. Multirresistencia a antibióticos presentada por las poblaciones bacterianas aisladas del suelo del Ex-Lago de Texcoco.

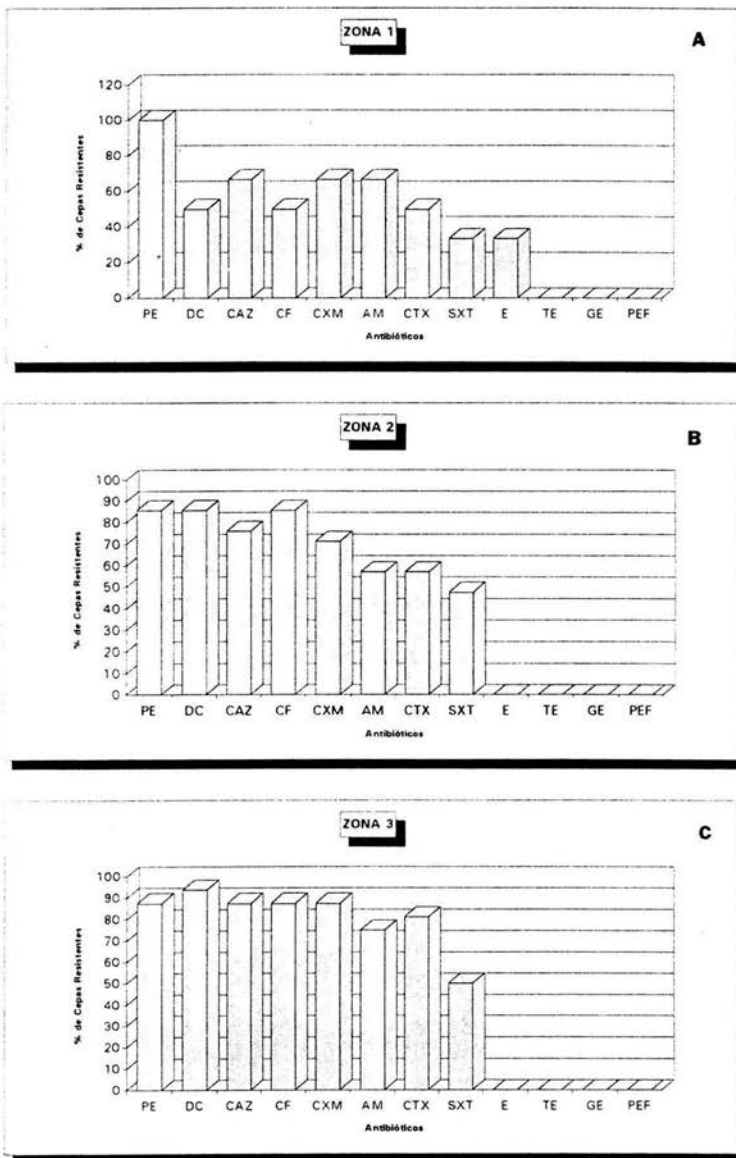


Figura 8. Frecuencia de resistencia a antibióticos en las poblaciones bacterianas aisladas de suelos del Ex-Lago de Texcoco. Se gráficn los datos de 2 ensayos independientes.

PE: Penicilina DC: Dicloxacilina CAZ: Cefotazidima
 CF: Cefalotina CXM: Cefuroxima AM: Ampicilina
 CTX: Cefotaxima SXT: Trimetropim-Sulfametoxazol
 E: Eritromicina TE: Tetraciclina GE: Gentamicina
 PEF: Pefloxacina

ZONA 1			ZONA 2			ZONA 3		
	No. de Cepas	%	No. de Cepas	%	No. de Cepas	%		
PE	6	100.0	18	85.7	14	87.5		
DC	3	50.0	18	85.7	15	93.7		
CAZ	4	66.6	16	76.1	14	87.5		
CF	3	50.0	18	85.7	14	87.5		
CXM	4	66.6	15	71.4	14	87.5		
AM	4	66.6	12	57.1	12	75.0		
CTX	3	50.0	12	57.1	13	81.2		
SXT	2	33.3	10	47.6	8	50.0		
E	2	33.3	0	0	0	0		
TE	0	0	0	0	0	0		
GE	0	0	0	0	0	0		
PEF	0	0	0	0	0	0		

Las cepas de la zona 3 (gráfica C) fueron en su mayoría resistencia a Dicloxacilina (93.7%), seguidas por las resistentes a Penicilina, Cefalotina, Ceftazidima o Cefuroxima (87.5 %), Cefotaxima (81.2 %) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (50%).

- Finalmente se determinaron los diferentes patrones de resistencia a antibióticos. observándose que los 3 patrones descritos en la tabla V, son muy similares diferenciándose solo por los antibiótico SXT y CTX.

T A B L A V

PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

No. DE PATRONES	No. de Cepas	PATRONES
13	1	
1	2	CF CAZ AM SXT CXM DC PE
1	9	CF CAZ AM CTX CXM DC PE
1	13	CF CAZ AM SXT CTX CXM DC PE

DISCUSION DE RESULTADOS

El término suelo salino ha sido utilizado para designar aquel que contiene sales solubles en tal cantidad que alteran desfavorablemente su productividad agrícola y se caracterizan, principalmente, por presentar en el extracto de saturación una conductividad eléctrica mayor de 4 mmhos/cm a 25°C. (Richards, 1982 y Conagua, 1991). Se ha establecido que el porcentaje de sales solubles en el extracto de saturación de un suelo no-salino oscila entre 0 y 0.1, de un suelo ligeramente salino entre 0.1 y 0.3 y moderadamente salino entre 0.3 y 0.5 (Campbell y Richards, 1950 y Richards, 1954).

En trabajos como los de Rdzedowski (1975) y Cajuste (1977), se ha establecido que la mayoría de los suelos del Ex-Lago de Texcoco pertenecen al grupo denominado "suelos salino-sódicos", los cuales ofrecen condiciones difíciles para el desarrollo de especies vegetales. La Comisión Nacional del Agua en su informe 1995 establece además que las condiciones prevalecientes en el Ex-Lago de Texcoco favorecen la formación de tolveneras durante el período de vientos del noreste que levantan no solo polvo sino también detritus y gérmenes patógenos (bacterias) provocando graves problemas de salud pública. El Gobierno Federal, a través del Plan Ex-Lago de Texcoco, ha realizado acciones para favorecer la recuperación de las zonas degradadas de estos suelos, se considera que con el aprovechamiento racional de los recursos naturales, la recuperación de los suelos, el desarrollo forestal y el saneamiento ambiental convertirán a esta zona en una reserva territorial que ayude a solucionar la problemática ambiental generada en el área metropolitana de la Ciudad de México. Con esta finalidad se han venido lavando los suelos salinos de esta área con distintos tipos de agua, logrando la recuperación de algunas partes del suelo, sin embargo, ésta no ha sido uniforme, dado que hay zonas donde sólo se encuentran pastos y otras donde además existen formas arbustivas y arbóreas (CONAGUA 1995)

Dado que en el Ex-Lago de Texcoco se cuenta con suelos con distinto grado de salinización y que las poblaciones bacterianas del suelo reflejan las fuerzas ambientales que actúan sobre ellas (Alexander, 1980), en el presente trabajo se caracterizaron poblaciones bacterianas provenientes de cada una de estas zonas respecto a la sensibilidad a Cloruro de Sodio, Cromo, Plomo y Cadmio. Con esa finalidad se procedió a verificar los parámetros físicos de las muestras de suelo utilizadas. Los resultados indican que las tres zonas muestreadas presentan el tipo de suelo llamado "salino", aunque los porcentajes de sales y la conductividad eléctrica en cada uno de los suelos difieren entre sí, sobrepasan los valores establecidos para los suelos salinos (Jackson, 1976)

Debido al gran número y variedad de bacterias presentes en el suelo, su caracterización es difícil, en un ambiente heterogéneo cualquier modificación por pequeña que sea puede causar efectos microecológicos suficientes para cambiar la diversidad microbiana de 10 a 100 veces en lugares separados hasta por un centímetro (Alexander 1980), en suelos como el de la zona 1 que presenta un ambiente adverso, debido a su alto contenido de sales las cuales aumentan la presión osmótica y al elevado pH, hacen que el número de bacterias por unidad de suelo encontradas sea menor que en las otras 2 zonas estudiadas, ya que estos factores limitan el crecimiento de las poblaciones bacterianas (Ingraham, 1982). Nuestros resultados indican que el número de bacterias por gramo de la zona 3 (8×10^5) es mayor respecto al de las otras zonas (1×10^4 para la 1 y 7.4×10^5 para la 2). aún cuando los factores fisicoquímicos de esta zona son más drásticos que los de la zona 2 parece ser que en este caso no fueron limitantes para el desarrollo de las poblaciones bacterianas. Partiendo de esta observación suponemos que o bien en estas poblaciones existen mecanismos que les permiten su desarrollo, o bien que la presencia de diversidad vegetal ha creado una gran catidad de micronichos distintos favorables.

La actividad humana ha ocasionado través de los tiempos un aumento en la concentración de metales pesados, por depósito de partículas del aire y agua contaminada, en los diferentes componentes ambientales. Tan solo en los últimos 20 años la acumulación de plomo, cromo, mercurio, cadmio etc, ha aumentado crónicamente en los suelos y los ecosistemas (OMS, 1989), estas condiciones han actuado como presiones de selección favoreciendo la aparición y proliferación de organismos adecuados a esas condiciones.

Se ha reportado que las concentraciones más altas de metales pesados están cerca de complejos urbanos, minas metalúrgicas y carreteras (Alloway, 1993 y Vaca y col., 1995). Los suelos del Ex-lago de Texcoco no son la excepción, ya que en su extensa área, además de depositar aguas de lluvia y de rios, se depositan y se emplean las aguas negras que tranportan los canales del drenaje general del Valle y llevan grandes cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos provenientes de actividades industriales, urbanas y rurales. La cuantificación de los metales (Cr Cd y Pb) de las muestras de las 3 zonas estudiadas, indica que las concentraciones de plomo (0.75 a 1.0 ppm), cadmio (0.047 a 0.051 ppm) y cromo (0.5 ppm) no rebasan los límites ambientales establecidos para los suelos por la Organización Mundial de la Salud (1989), para el caso del plomo, la concentración media en suelo es de 5 a 25 mg/kg y en áreas contaminadas se pueden encontrar hasta 8 g/kg; en cuanto al cromo, éste se puede encontrar en concentraciones de 125 hasta 250 mg/kg, finalmente los valores habituales para el cadmio en suelo son de 1 mg/kg (OMS 1989).

La resistencia bacteriana a metales pesados y a la salinidad constituyen un claro ejemplo de la capacidad que tienen estos microorganismos para adaptarse a situaciones desfavorables. En este trabajo, las bacterias aisladas de las 3 zonas de estudio fueron expuestas a diferentes concentraciones de Pb, Cr, Cd y NaCl, con la finalidad de determinar la MIC. Respecto al cromo las poblaciones de las tres zonas como se indica en el apartado de resultados se distribuyen en dos poblaciones, la sensible, cuyo crecimiento se inhibe con 750 µg/ml y la resistente que crece en medio con 300 µg/ml. Campos y cols. (1995), Vaca y col. (1995) y Fragoso (1994) trabajando con cepas aisladas de distintas zonas contaminadas de las Cds de León, Gto. y México, han reportado una distribución bimodal con picos menores de 750 µg/ml para la población sensible y mayores para la resistente. Algunos autores han reportados que la resistencia al cromo esta determinada por una alteración en el transportador de sulfato dado que el cromo es incorporado por esta vía (Ohtake y col. 1987). Un mecanismo adicional de resistencia es la reducción de cromo hexavalente a cromo trivalente, forma menos tóxica (Gvozdyak y col, 1986; Horitsu y col. 1987; Bopp y Ehrlich, 1988; Wang y col, 1990; Ishibashi y col. 1990). Esta resistencia puede ser conferida también por plásmidos (Ohtake y col. 1987; Bopp y Ehrlich, 1988; Cervantes y Ohtake, 1988; Cervantes y Silver, 1992).

El comportamiento de las poblaciones bacterianas con respecto al cadmio las agrupa en torno a un pico de resistencia, entre los puntos de 50 y 100 µg/ml, la gráfica de la zona 1 presenta un porcentaje de la población sensible a 25 µg/ml. Los trabajos de Cervantes y col. (1986) y Vaca y col. (1995), analizando cepas de distinto origen, reportaron poblaciones moderadamente resistentes al cadmio las cuales presentan una MIC distribuida entre 25 a 100 µg/ml, por otro lado Nakahara y col. (1977) reportó una MIC mayor de 200 µg/ml para una colección clínica de *Staphylococcus*, según Silver y Walderhaugh, (1992) este resultado probablemente se debe a la existencia de mecanismos de resistencia altamente eficientes presentados por las bacterias al cadmio, los que se basan en el eflujo intracelular de iones tóxicos (Silver y col. 1989; Cervantes y col. 1994; Higham, D.P. y col. 1984).

Poblaciones bacterianas sensibles al plomo sólo han sido reportados por Nakahara y col, (1997) distribuidas entre 3.3 a 6.2 µg/ml, otros estudios (Nakahara y col. 1977; Cervantes y col, 1986; Vaca y col. 1995) enfocados al comportamiento de las bacterias con respecto al plomo han reportado, como en el presente trabajo, poblaciones distribuidas en un solo pico de resistencia cuyas concentraciones van de 1600 a 3200 µg/ml. Con la finalidad de encontrar poblaciones sensibles, se emplearon concentraciones extremadamente pequeñas de 0.0975 a 6.25 µg/ml, sin embargo no se identificó tal población. En este sentido Vaca y Cervantes han sugerido que no se encuentran

distribuciones bimodales dado que el plomo en el suelo forma complejos que lo hacen no disponible por las bacterias y por lo tanto no ha actuado como presión selectiva en favor de poblaciones resistentes y sensibles (Vaca y Cervantes com. per.). Los procesos que han sido considerados como responsables de la resistencia bacteriana al plomo es la precipitación como sulfuro de plomo o como plomo metilado (Summers y Silvers, 1978), además Novick y Roth (1968) reportaron que para *Staphylococcus aureus* la resistencia a plomo esta determinada por un plásmido, sin embargo, en ambos casos los mecanismos no ha sido descritos.

Finalmente, las concentraciones minimas inhibitorias de NaCl observadas en las poblaciones bacterianas indican que la mayoría de las bacterias inhiben su crecimiento cuando se les enfrenta a concentraciones de 0.6 M de esa sal, solamente en la zona 3 puede determinarse un comportamiento bimodal, en este caso puede asignarse como población sensible a la que se distribuye alrededor del pico antes mencionado y población resistente a la que inhibe su crecimiento con concentraciones de 1 M. Los reportes de Le Rudulier y Valentine (1982) indican que enterobacterias como *E. coli* son incapaces de crecer y multiplicarse en un medio que contenga NaCl al 0.8 M, sin embargo, al ser suplementado este medio con glicinbetaína o prolina, la duplicación se ve estimulada, atribuyendoles a estos metabolitos un papel de osmoreguladores, por otro lado, Velasco (1995) reportó que el crecimiento de *P. aeruginosa* se restablece cuando se adiciona betaína al medio que contiene 1200 mM de NaCl (Velasco y cols., 1995). La mayoría de los estudios que abordan el comportamiento bacteriano, sometidas a factores estresantes, han sido los enfocados al proceso de regulación. La resistencia a la salinidad y los mecanismos por los que está regulada, han sido estudiada en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*s, y *Bacillus subtilis* (Epstein y Schultz, 1965; Novick y Roth, 1968; Le Rudulier y Valentine, 1982; Anderson y Witter, 1982; May y col., 1986; Giaever y col., 1988; Anderson y col., 1988; Csonka, 1989 y Boch y col., 1994; Velasco y col., 1995), en ellos se ha concluido que estos microorganismos aumentan la concentración intracelular de cierto tipo de solutos (osmoreguladores) en respuesta al estres en el que son sometidos.

Se ha establecido que la resistencia bacteriana a los antibioticos puede estar mediada por material genético extracromosómico; también se ha establecido que mediante esta vía pueden insertarse genes en cepas que carecen de ellos confiriendoles de esta manera fenotipos que les permiten ocupar nichos antes inaccesibles, al mismo tiempo se ha determinado que algunos de estos plásmidos son los responsables de conferir resistencia a algunos factores estresantes como metales pesados. Por estas razones en el presente

trabajo se caracterizó a las cepas aisladas del Ex-Lago de Texcoco respecto a su patrón de resistencia a antibióticos.

Como se anotó en el apartado de resultados, se determinaron cepas que presentan sensibilidad a los antibióticos; eritromicina, gentamicina, pefloxacina y tetraciclina, los cuales son agentes antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, impidiendo la unión de ARNt bacteriano a las subunidad ribosómica de 30 s. Por otro lado las cepas aisladas que presentaron resistencia a los antibióticos como; penicilina, dicloxacilina, cefalotina, cefuroxima, ceftazidima y cefataxima, pudieran presentar mecanismos no genéticos y genéticos como: 1) la ausencia de los lugares de destino del fármaco dentro de la bacteria, 2) la permeabilidad inadecuada que hace a un antibiótico ineficaz, 3) la alteración de las macromoléculas a las que se une el fármaco, 4) la síntesis de una enzima que destruya al antibiótico, p ej. β -lactamasa, que escinde los anillos β -lactámicos de la penicilina y cefalosporinas; 5) la inactivación por un mecanismo bioquímico, como es la acetilación de los aminoglucósidos, entre otros, que les confiera dicha resistencia (Murray y col., 1992).

Como se ha mencionado son múltiples los reportes que atribuyen la resistencia a antibióticos a la presencia de material genético extracromosómico. Los patrones de multiresistencia a 7 y 8 antibióticos en las cepas aisladas, presentan una frecuencia alta. Esto nos lleva a suponer que la resistencia en estas cepas está determinada por plásmidos. La resistencia bacteriana a antibióticos determinada por mutaciones cromosómicas aparece con una frecuencia de de alrededor de por 10^{-7} lo tanto la probabilidad de que una bacteria acumule 7 u 8 mutaciones que les permita resistir a otros tantos antibióticos, que por otro lado tienen distinto mecanismo de acción, es muy baja. Sin embargo es necesario aislar de las cepas multiresistentes a los probables plásmidos a fin de determinar su responsabilidad en los fenotipos mencionados.

CONCLUSIONES

- Los suelos del Ex-lago de Texcoco son del tipo Salino-Sódico, dada su conductividad eléctrica y el % de salinidad, los tratamientos que el gobierno federal ha aplicado han ocasionado la formación de áreas con características fisicoquímicas distintas, creando de esta manera nichos que favorecen el desarrollo de poblaciones bacterianas con genotipos que les permiten adaptarse a esas condiciones o bien, estas bacterias pueden formar esporas resistentes a condiciones adversas.
- De las cepas aisladas de las tres muestras de suelo analizadas, el 83% fueron Gram +. El número de unidades formadoras de colonias por unidad de suelo desciende con el orden siguiente: Zona 3, 2 y 1.
- Las elevadas concentraciones de sal en las muestras de suelo muestran cómo este factor ha sido selectivo, de manera que las poblaciones bacterianas aisladas de las tres zonas, presentan mecanismos que les permiten resistir concentraciones de hasta 1 M de sal.
- Las concentraciones de cromo, cadmio y plomo, cuantificadas en las muestras de suelo, estuvieron muy por debajo de los valores límites permisibles. Es por ello que suponemos que las bacterias aisladas de esas zonas, debieron de haber llegado ya seleccionadas en las aguas negras con que se lavan los suelos.
- Dada la frecuencia de resistencia y patrones de multiresistencia a antibióticos es muy probable que este fenotipo esté conferido por determinantes extracromosómicos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alexander M., 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. Editorial AGT. España. pp. 27-36.
2. Alloway, B. J., 1993. Heavy Metals in Soils. Ed. Blackie Academic & Professional. USA. pp. 2-4.
3. Amábile, C. 1988. La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos. Ciencia y Desarrollo. **80**:57-68
4. Andersen, P.A., Kaasen, I. O. B. Styrvold, G. Boulnois and A. R. Strom. 1988. Molecular cloning, physical mapping and expression of *bet* genes governing the osmo-regulatory choline-glycinebetaine pathway of *Escherichia coli*. J. Gen Microbiol. **134**:1737-1746.
5. Anderson, C. B. and L. D. Witter. 1982. Glutamine and proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. J. Bacteriol. **143**:1501-1503.
6. Badillo German, J. F., 1986. Evaluación preliminar de la Contaminación por Metales Pesados. Tesis de Biología. ENEP-Iztacala, UNAM.
7. Bryan, H. Arthur. 1976. Bacteriología: capítulo 8, Bacterias del Suelo. Editorial Continental. México. pp. 153-169.
8. Boch, J., Kempf, B. & Bremer, E., 1994. Osmoregulation in *Bacillus subtilis* Accumulation of the Osmoprotectant Glycine Betaine from Exogenously Provided Choline. J. Bacteriol. **176** (17): 5364-5371.
9. Campbell & Richards, 1950. Agrom. Journ, 42:582
10. Campos, J., Martínez-Pacheco, M. & Cervantes, C., 1995. Hexavalent-Chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus sp* strain. Antonie van Leeuwenhoek. **00**:1-6.
11. Cajuste, L. J., 1977. Química de Suelos con un enfoque Agrícola. Talleres Gráficos de la Nación. México. pp. 131-132.
12. Cervantes, L. A. & Olivares, J., 1976. Estudio Microbiológico de un Suelo Salino "El Salitre". Rev. Lat-amer. Microbiol. **18**:73-76.
13. Cervantes, C., Chavez, J. & Vaca, S., 1991. Mecanismos de Resistencia Bacteriana a Metales Pesados. Rev. Lat-amer. Microbiol. **33**:61-70.
14. Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Misra y Silver, S. 1990. Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. **172**:287-291.

15. Cervantes, C. & S. Silver. 1991. Chromate resistance determinants. Aceptado para su publicación en *Molecular Toxicology*.
16. CONAGUA. 1991. Estudio de Factibilidad de la 2a. Etapa del Proyecto Ex-Lago de Texcoco. Tomo II. PIASA. México.
17. Corey, O. G. & Galvaño, L. A., 1989. Plomo: serie 8. Organización Mundial de la Salud.
18. Csonka, N. L., 1989. Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiol. Reviews.* **53**(1):121-147.
19. Christian, J. H. B., 1955. The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg*. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**:75-82.
20. Epstein, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**:73-78.
21. ----- and S. G. Schultz. 1965. Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content. *J. Gen. Physiol.* **49**:221-234.
22. Fragoso, V., L., 1994. Aislamiento y Caracterización de Bacterias Resistentes a Cromato. Tesis de Lic. Biología. UNAM Campus-Iztacala.
23. Giaever, H. M., O. B. Styrvoid, I. Kaasen and A. R. Strom. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**:2841-2849.
24. Higham, D. P., P. J. Sadler & M. D. Scawen. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science.* **225**:1043-1046.
25. Ingraham, J., 1982., Effect of Temperature, pH, Water Activity and Pressure on Growth. *Experimental Microbiol Ecology*. Ed. By Richard, G. Burns and Howard Slater. Blackwell Scientific.
26. Jackson, M. L.. 1976. Análisis Químico de Suelos. 3er. Ed. Editorial Omega. Barcelona, España. pp 662
27. Laddaga, R. A. & S. Silver. 1985. Cadmium uptake in *Escherichia coli*. K12. *J. Bacteriol.* **162**:1100-1105.
28. Landfald, B. & A. R. Strom. 1986. Choline-glycinebetaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**:849-855.
29. Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald and A. R. Strom. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli*. by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid and trehalose. *Arch. Microbiol.* **147**:1-7.

30. Le Redulier, D. & Valentine, C. R.. 1982. Genetic Engineering in Agriculture: Osmoregulation. TIBS. 7(12): 431-433.
31. May, G., E. Fattz, M. Villarejo and E. Bremer. 1986. Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. 205:225-233.
32. Mergeay, M., Springael D & Top, E., 1991. Gene transfer in polluted soils, In: Fry JC & Day MJ (Eds) Bacterial Genetics in Natural Environments. pp 152-171 Chapman and Hall, New York.
33. Murray, P., Drew, W., Cobayashi, G. & Thompson, J., 1992. Microbiología Médica. Wolfe Publishing Limited. Capitulo 4 pp 37-46.
34. Nies, A., D. H. Nies & S. Silver. 1990. Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. 265:5648-5653.
35. ----- & L. Chu. 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:7351-7355.
36. Novick, R. P., E. Murphy, T. J. Gryczan, E. Baron & I. Edelman. 1979. Penicillinase plasmid of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. Plasmid. 2:109-129.
37. Novick, R., P., & Roth, C., 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 95: 1335-1342.
38. O' Brien, T, & the Members of Task Force 2. 1987. Resistance of bacteria to Antibacterial Agents: Report of Task Force 2. Rev. Infect. Dis. 9 (Suppl. 3):S244-S316.
39. Ohtake, H., C. Cervantes & S. Silver. 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. J. Bacteriol. 169:3853-3856.
40. Ohwada, T. and S. Sagisaka. 1988. An immediate and steep increase in ATP concentration in response to reduced turgor pressure in *Escherichia coli*. B. Arch. Biochem. Biophys. 259:157-163.
41. Ortiz, B. & C. A. Ortiz. 1980. Edafología. 3er. Ed. Editorial UACH, Chapingo, México pp 331.
42. Osrkov, S. L. 1948. Experiments on the active and passive permeability of *Bacillus coli communis*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25:277-283.
43. Perry, R.D. & S. Silver. 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. J. Bacteriol. 150:973-976.

44. Reed, R. H. and W. D. P. Stewart. 1985. Evidencie for turgor-sensitive K influx in the cyanobacterium *Anabena variabilis* ATCC 29413 and *Synechocystis* PCC6714. *Biochim. Biophys. Acta* **812**:155-162.
45. Richards, L. A., 1982 . Diagnóstico y rehabilitación de Suelos Salinos Y Sódicos. Ed. Limusa. Mexico. pp 7-9.
46. Richards., 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S: D.A. Agr. Handb 60. pp 9.
47. Roth, W. G., M. P. Leckie and D. N. Dietzler. 1985. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**:442-449.
48. Silver, S. & T. K. Misra. 1988. Plasmid-mediated heavy metal resistances. *Ann Rev: Microbiol.* **42**:717-743.
49. Smith, K. & R. P. Novick. 1972. Genetic studies on plasmid-linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **112**:761-762.
50. Tempest, D. W., J. L. Merrs and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* **117**:405-407.
51. Tynecka, Z., Z. Gos & J. Zajac. 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **147**:313-319.
52. Vaca, P., S., Miranda, R., & Cervantes, C., 1995. Inorganic-ion resistance by bacteria isolated from a Mexico City freeway. *Antonie Van Leewenhoek* **67**: 333-337.
53. Velasco, R., Burgoa, R., Flores, E., Hernández, E., Villa, A. & Vaca, S., 1995. Osmorregulation in *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic shock. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* **37**:209-216.