



BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ingeniería

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

**VALORACIÓN TOXICOLÓGICA
DE CENIZA VOLCÁNICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA
OPCIÓN TERMINAL AMBIENTAL

PRESENTA

BIOL. LUIS ENRIQUE MIRÓN PÉREZ

ASESORA DE TESIS

DRA. MARÍA MAURA MARGARITA TEUTLI LEÓN

Co-ASESORA DE TESIS

DRA. MARTHA PATRICIA GONZÁLEZ ARAOZ

Puebla, Pue.

Enero 2016



BUAP

OFICIO SIEP No. 3990/2014

BIÓLOGO LUIS ENRIQUE MIRÓN PÉREZ

Maestría en Ingeniería, Opción terminal Ambiental
Presente.

Por medio del presente, el suscrito M.I. Edgar Iram Villagrán Arroyo, Director de la Facultad de Ingeniería, de acuerdo a su solicitud de aprobación de Tema de Tesis, le autoriza desarrollar el tema intitulado: **“Valoración toxicológica de ceniza volcánica”**, para obtener el grado de Maestro en Ingeniería, con opción terminal Ambiental. Asignándose como Asesora de Tesis a la Dra. María Maura Margarita Teutli León y Co-Asesora de Tesis a la Dra. Martha Patricia González Araoz.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Pensar bien, para vivir mejor”

Puebla, Puebla a 21 de noviembre de 2014

M.I. EDGAR IRAM VILLAGRÁN ARROYO
Director de la Facultad de Ingeniería



C.c.p. Dra. María Maura Margarita Teutli León. Asesora de tesis.

C.c.p. Dra. Martha Patricia González Araoz.- Co-Asesora de tesis.

C.c.p. Archivo

GJS/PGA/dsm.

49

M. I. EDGAR IRAM VILLAGRAN ARROYO

DIRECTOR

FACULTAD DE INGENIERIA B. U. A. P.

PRESENTE.

Estimada Maestro:

Por este medio le informo que la tesis titulada "VALORACIÓN TOXICOLÓGICA DE CENIZA VOLCÁNICA" elaborada por la **Biólogo Luis Enrique Mirón Pérez**, ha sido debidamente revisada por la abajo firmante, y las correcciones sugeridas ya se realizaron. Por lo anterior le manifiesto que no hay inconveniente para **autorizar la impresión** de la misma.

Agradeciendo su atención quedo a sus órdenes.

H. Puebla de Z., 11 de Diciembre de 2015.



Dra. Ma. Maura M. Teutli León

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
CAPÍTULO 1	12
GENERALIDADES	12
1.1 EL VOLCÁN POPOCATÉPETL.....	12
1.2 MAGMA Y CENIZA VOLCÁNICA.....	14
1.3 EFECTOS EN LA SALUD	18
1.4 EFECTO EN ECOSISTEMAS Y DIVERSOS ORGANISMOS.....	21
CAPÍTULO 2	25
EFFECTOS TÓXICOS	25
2.1 TOXICIDAD EN MICROORGANISMOS	25
2.2 MICROORGANISMOS Y SU INTERACCIÓN CON METALES PESADOS.....	26
2.3 EFECTO TÓXICO DE LOS METALES SOBRE LA CÉLULA MICROBIANA	27
2.4 MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE RESISTENCIA A LOS METALES	28
2.5 INTERACCIONES MICROBIANAS CON METALES PESADOS.....	30
2.5.1 <i>Sistemas de expulsión de Cationes</i>	30
2.5.2 <i>Sistema de expulsión de aniones</i>	33
2.6 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MICROORGANISMO-METAL....	34
2.7 EFECTOS DE LA CENIZA VOLCÁNICA EN MICROORGANISMOS.....	36
CAPÍTULO 3	39
MATERIALES Y METODOLOGÍA	39
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	39
a) <i>Escherichia coli</i>	39
b) <i>Bacillus subtilis</i>	39
c) <i>Serratia marcescens</i>	40
d) <i>Micrococcus luteus</i>	40
3.2 CENIZA VOLCÁNICA	40
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	42
3.4 MEDIOS DE CULTIVO	42
3.5 ESTERILIZACIÓN E INCUBACIÓN.....	42
3.6 CULTIVO DE MICROORGANISMOS EN CALDO NUTRITIVO: CURVA DE CRECIMIENTO ..	43

3.7 ESTUDIO TOXICOLÓGICO	43
CAPÍTULO 4	45
RESULTADOS.....	45
4.1 PREPARACIÓN DE LA CENIZA VOLCÁNICA	45
4.2 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS	45
4.3 CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO	46
4.4 ESTUDIO DE TOXICIDAD EN MEDIO SÓLIDO	48
CAPÍTULO 5	63
CONCLUSIONES.....	63
ANEXO	67
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Volcán Popocatepetl localizado en el centro de México. Se ubica junto a comunidades de altas densidades poblacionales.....	13
Figura 1.2 (a) Nomenclatura y clasificación química de las rocas volcánica usando la alcalinidad total versus el diagrama de sílice.....	15
Figura 1.3 Fotografías donde se muestran las variaciones en morfología, dimensiones y composición de la ceniza volcánica.....	16
Figura 2.1 Ejemplos de mecanismos únicos de resistencia a metales en bacterias.....	29
Figura 4.1 Siembra de cepas bacterianas usadas para los distintos estudios.....	46
Figura 4.2 Curva de calibración de crecimiento bacteriano.....	48
Figura 4.3 Fotografía de la cepa <i>Escherichia coli</i> a 48 horas de incubación en agar nutritivo con el 50% de la solución de ceniza.....	49
Figura 4.4 Fotografía de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo sin ceniza volcánica.....	50
Figura 4.5 Fotografía de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> después 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo con el 50% de la solución de ceniza volcánica.....	51
Figura 4.6 Fotografía de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> después de 48 horas de incubación a 35°C en agar bacteriológico con el 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	52
Figura 4.7 Fotografía de la cepa <i>Serratia marcescens</i> después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo al 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	53
Figura 4.8 Fotografía de la cepa <i>Micrococcus luteus</i> después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo.....	54
Figura 4.9 Cepas de <i>Micrococcus luteus</i> después de 48 horas de incubación a 35 en agar nutritivo con el 5% y 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	55
Figura 4.10 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	58
Figura 4.11 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria <i>Serratia marcescens</i>	59
Figura 4.12 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	60
Figura 4.13 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria <i>Micrococcus luteus</i>	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 3.1 Análisis Fisicoquímico de la ceniza volcánica.....	41
Tabla 3.2 Diseño experimental con sus respectivas cepas y concentraciones.....	42
Tabla 3.3 Organización de los experimentos para el estudio toxicológico.....	44
Tabla 4.1 Crecimiento bacteriano a las 6 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	56
Tabla 4.2 Crecimiento bacteriano a las 12 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	57
Tabla 4.3 Crecimiento bacteriano a las 24 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	57
Tabla 4.4 Crecimiento bacteriano a las 48 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.....	57

RESUMEN

Los componentes solubles de la ceniza volcánica en sus distintas concentraciones (5, 15, 25 y 50%), ayudaron al crecimiento en su fase exponencial de bacterias como; *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*, por el contrario, la cepa de *Micrococcus luteus* se vio afectada en su crecimiento, debido posiblemente a las concentraciones de plomo y cadmio presentes (5 ppm para ambos metales) en las diluciones del 25 y 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica (PSCV), por el contrario en observaciones realizadas a las 48 horas de incubación en un medio sólido, se obtuvo que las concentraciones de 5 y 15% parecieron ayudar en el crecimiento de la cepa. Los estudios toxicológicos en medio líquido para esta cepa, resultaron negativos para su crecimiento en las cuatro concentraciones estudiadas. Las observaciones para *Bacillus subtilis* permiten afirmar que se vio bastante beneficiada por los componentes solubles de la ceniza volcánica, debido a que su crecimiento fue mayor en comparación con las otras cepas desde tempranas horas.

INTRODUCCIÓN

La presente tesis contempla un estudio enfocado en la valorización toxicológica de la parte soluble de muestras de ceniza del volcán Popocatepetl; este estudio analiza el efecto sobre el crecimiento en su fase exponencial de distintos microorganismos, como es el caso de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*. Es un hecho conocido que la ciudad de Puebla se encuentra en una zona con actividad volcánica constante, la cual ejerce distintas afectaciones, que van desde daños a la infraestructura de la ciudades, daños al medio ambiente y efectos en la salud de sus habitantes. Cuando se presenta un evento de actividad volcánica, como son las fumarolas de vapor de agua o ceniza, la expulsión del material particulado o ceniza exhibe variaciones en forma, tamaño y composición, aunque provenga del mismo volcán.

Ejemplos en lo que se refiere a la composición de las cenizas son los reportados por Buist (1982) y Nania, (1994), respecto a el volcán “El Chichón” (Chiapas, México), el cual presentó concentraciones significativamente mayores de Manganeso (Mn), Cobre (Cu), Rubidio (Rb) Estroncio (Sr) y Niobio (Nb), que las presentes en las cenizas proveniente del Monte Santa Elena (Washington, USA). Además de que el contenido de azufre fue catorce veces mayor, así como la concentración de radionúclidos como el Torio, el Radio y el Potasio (^{232}Th , ^{226}Ra , ^{40}K , respectivamente). Se determino que contiene sílice cristalina del 0.8 a 1.2% en forma de α -cuarzo, mientras que el material proveniente del Monte Santa Elena contiene entre 3 y 7% de cristobalita; los estudios toxicológicos realizados con las cenizas de El Chichón han indicado un grado de toxicidad de nivel moderado.

Con respecto al volcán Popocatepetl, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ, 2012) reportó que la composición de las cenizas del volcán era la siguiente: 65-68% de SiO_2 , 5-6% de álcalis (óxidos de K

y Na) y 3-5% de sílice libre (cristobalita) así como partículas de Titanio y Hierro (ININ, 1997).

Existen dos factores que intervienen en la toxicidad de la ceniza volcánica sobre el ser humano, aparte de su composición fisicoquímica y de la concentración: uno es su tamaño, ya que sólo las partículas más pequeñas pueden penetrar profundamente en el pulmón y otro, es la capacidad que tienen de transportar los compuestos volátiles que se adsorben en la superficie de las mismas, pudiendo de esta manera aerotransportarse a través de grandes distancias antes de sedimentarse. En resumen, los estudios efectuados a nivel toxicológico *in vivo* e *in vitro* muestran que la ceniza volcánica tiene principalmente efectos citotóxicos, que pueden iniciar o exacerbar procesos inflamatorios crónicos preexistentes en exposiciones crónicas.

Como ya se mencionó esta ceniza volcánica puede tener diversos componentes que pueden ser tóxicos para los organismos, como es el caso de los metales pesados. La contaminación ambiental por metales está aumentando como resultado de muchas actividades antrópicas (industrialización, la quema de combustible fósil, procesos de la minería, el tráfico en las carreteras) y naturales (erupciones volcánicas), ésta puede ser una seria amenaza para los ecosistemas y sus organismos, en el caso de los microorganismos, estos pueden ser un sujeto de estudio a corto plazo de dichas afectaciones. A pesar de que los metales en formas iónicas libres son un factor tóxico significativo para la biota en el medio ambiente, los estudios sobre la diversidad bacteriana en sitios contaminados con metales pesados han demostrado una alta diversidad de microorganismos útiles para el medio ambiente monitoreado (Chen *et al.*, 2009).

Los microorganismos, omnipresentes y esenciales para el ciclo biogeoquímico mundial de los elementos, debido a la alta superficie y el área de contacto, pueden interactuar fácilmente con los metales, adaptarse fisiológicamente para sobrevivir y seguir siendo activos en condiciones de estrés ambiental (Haferburg *et al.*,

2007). Las cepas bacterianas pueden ser específicas para uno o varios metales y obligarse a adaptarse a altas concentraciones de metales pesados de acuerdo a una variedad de mecanismos. Potencialmente, se pueden acumular metales, ya sea por un metabolismo independiente (pasivo) o un proceso dependiente del metabolismo (activo) y se pueden eliminar los metales pesados a través de la bioacumulación o biosorción. En el proceso de bioacumulación, los metales son transportados desde el exterior de la célula microbiana a través de la membrana celular en el citoplasma de la célula, donde se secuestra el metal. La adsorción de metales se determina por la capacidad de absorción de la envoltura celular y es influenciada por las diferencias en la construcción de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Jiang *et al.*, 2004), por la presencia de grupos fosforilo, lipopolisacáridos, grupos carboxílicos, teicoico y ácidos teicurónico; y por parámetros tales como la toxicidad, la composición y el contenido total de metales (Haferburg *et al.*, 2007).

Debido a los estudios realizados se puede determinar que los microorganismos se pueden ver afectados por la presencia de metales presentes en el ambiente (en el caso de este estudio, presentes en cenizas volcánicas), afectando así su crecimiento durante su fase exponencial o expresando los diversos mecanismos de resistencia a distintas concentraciones, así, puede ser factible que en algún tiempo lleguen a usarse como una herramienta de Biorremediación.

JUSTIFICACIÓN

México alberga a 22 de los 300 volcanes activos a nivel mundial, los que sumados con Centroamérica y la zona andina, constituyen una de las regiones geográficas con mayor actividad volcánica en el mundo. En México han sido trece los volcanes que han producido erupciones en tiempos históricos, esta actividad es originada por la dinámica en las placas de la zona de subducción del Pacífico, las fallas Montagua-Polochic, la falla Rivera y la reactivación de la falla que de Este a Oeste da origen al Eje Neovolcánico Transmexicano (según lo publicado por el Plan de contingencias del volcán Popocatepetl, Puebla, 1995). Después de cerca de 75 años de inactividad, en 1990 el volcán Popocatepetl comenzó a mostrar signos de reactivación interna manifestada por un incremento paulatino de la sismicidad debajo del cráter y externamente, con fumarolas densas y calientes. Esta fase culminó en la madrugada del 21 de diciembre de 1994 con un importante evento eruptivo acompañado de una abundante emisión de ceniza que alcanzó a ser precipitada sobre la ciudad de Puebla. A partir de esos eventos y hasta la fecha, el volcán ha presentado diversas actividades que van desde la emisión de vapor de agua y ceniza hasta explosiones de material incandescente de leves a moderadas.

La emisión de ceniza es uno de los principales problemas que ha enfrentado la ciudad de Puebla. Esta repercute en la infraestructura de las ciudades, afectando vialidades terrestres y aéreas (cierre de aeropuertos) y principalmente en daños al ambiente como los son las afectaciones en la calidad de los cuerpos de agua, por ejemplo, en la región de Atlimeyaya-Metepec, del municipio de Atlixco, y daños a la salud humana, en la cual se han incrementado los casos de enfermedades de tipo crónico-respiratorio.

Dentro de estudios realizados a la composición de ceniza volcánica se han detectado elementos como Flúor (F), Sodio (Na), Potasio (K), Hierro (Fe) y metales pesados como Plomo (Pb) y Cadmio (Cd), debido a la presencia de estos metales

pesados, que resultan ser tóxicos para la mayoría de los organismos, es necesario comprender como pueden actuar sobre la microfauna, en una aproximación primaria se tomaron como elementos de estudio cuatro cepas de microorganismos que fueron sometidas a diferentes concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica. El estudio trató de hacerse de la manera más natural con el objeto de ver la respuesta de dichos microorganismos en las condiciones reales factibles. El tomar microorganismos como objeto de estudio nos permite, en lapsos de tiempos cortos, conocer el efecto inmediato de la parte soluble de la ceniza volcánica sobre la fase exponencial del crecimiento de cada bacteria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto toxicológico de la parte soluble de muestras de ceniza volcánica expulsada por el volcán Popocatépetl utilizando cuatro cepas de bacterias.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar la inclusión de los componentes solubles de la ceniza volcánica en la preparación y efectos sobre los medios de cultivo.
- 2) Para las cepas de bacterias seleccionadas generar las curvas de crecimiento a condiciones normales, y así obtener sus condiciones de referencia.
- 3) Evaluar el efecto toxicológico de la parte soluble de la ceniza volcánica durante el crecimiento de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* en su fase exponencial en un medio nutritivo que contiene distintas concentraciones de la parte soluble de ceniza volcánica.

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 EL VOLCÁN POPOCATÉPETL

El volcán Popocatépetl que en Náhuatl significa “Montaña que Humea” (19.02°N, 98.62°W, 5454 msnm) se encuentra localizado a 65 km al oeste de la Ciudad de México y 45 km al este de la Ciudad de Puebla. Es un volcán de tipo Estratovolcán que al entrar en erupción ha emitido cenizas andesítico-dacita-riodacita y lava (Carrasco *et al.*, 1985). El cráter se localiza a una altura de 5,452 msnm, con un diámetro estimado de 900 m, una profundidad de cráter de 150 m (desde el labio inferior) y un área de edificio volcánico de 500 km² (figura 1.1). El volcán Popocatépetl es el segundo volcán más alto de nuestro país. A lo largo de su historia ha tenido importantes erupciones volcánicas con un alto grado de explosividad. En épocas históricas, el volcán ha tenido fases de intensa actividad que han durado varios lustros (CENAPRED-UNAM, 1995).

Se tienen registros históricos de erupciones plinianas que ocurrieron alrededor del año 100 a.C. y entre 700-900 d. C (Robin, 1984; Robin y Boudal, 1987; Boudal y Robin, 1989; Martín Del Pozzo *et al.*, 1995b, 1997a). Asimismo, las emisiones de ceniza del volcán Popocatépetl se han reportado en los años 1351, 1519, 1720 y 1919-1927 (Martín-Del-Pozzo *et al.*, 1996). La penúltima actividad del volcán Popocatépetl durante el periodo de 1919-1927, consistió principalmente en emisiones de ceniza y gas, junto con un crecimiento en el domo de lava. Todos estos informes de actividad consistieron principalmente en observaciones visuales, fotos y pinturas de Dr. Atl así como varios de sus informes escritos (De la Cruz-Reyna *et al.*, 1995).

Después de 1992, el aumento de la actividad fumarólica en el Popocatépetl ha indicado un nuevo despertar del volcán. El 21 de diciembre de 1994, una serie de explosiones produjo emisiones de ceniza que alcanzaron la ciudad de Puebla, situada a unos 45 km al este del volcán. Erupciones de ceniza han continuado de manera intermitente hasta la actualidad, aunque la cantidad expulsada disminuyó drásticamente a partir de diciembre de 1994 y hasta el 05 de marzo 1996 (Martín-Del-Pozzo *et al.*, 1995a). El 5 de marzo de 1996, sin embargo, hubo un aumento visible tanto en las emisiones de fumarolas como en la expulsión de cenizas. El 20 de marzo 1996, se detectó la presencia de lava en el fondo del cráter y desde entonces se ha producido esta de forma continua. El 30 de abril de 1996, una sola erupción produjo una gran fumarola y ceniza, una depresión en el domo de lava se observó después de esa fecha y desde 1994 se han registrado grandes cantidades de dióxido de azufre (SO₂) (GVN, 1994).

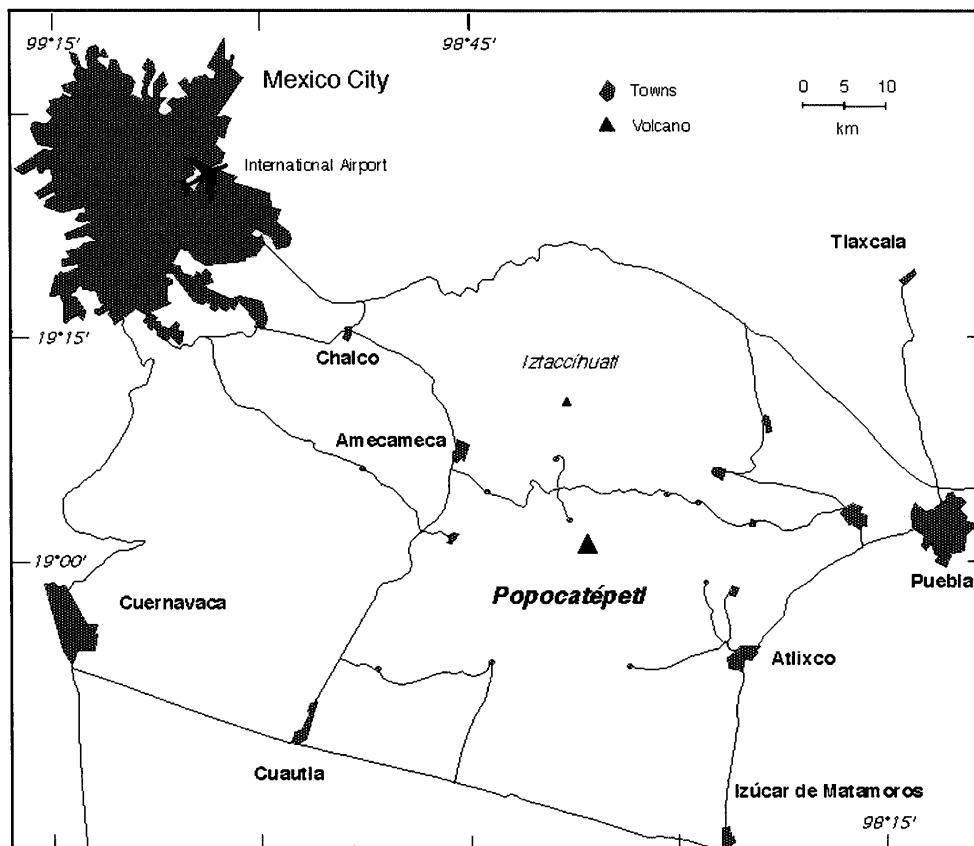


Figura 1.1 Volcán Popocatépetl localizado en el centro de México. Se ubica junto a comunidades de altas densidades poblacionales. Tomado de Delgado-Granados *et al.*, 2001.

1.2 MAGMA Y CENIZA VOLCÁNICA

El magma es producido por la fusión parcial de los materiales de la corteza (minerales) y el manto de la Tierra. En muchos casos, los minerales se cristalizan en el magma durante el ascenso a la superficie debido al enfriamiento de éste. Las características químicas del magma varían según las composiciones químicas y minerales presentes en los materiales básicos geológicos. Además, el magma varía en función de las condiciones de fusión, tales como temperatura, la presión, los componentes volátiles, su geoquímica, etc. Distintos estudios petrológicos han revelado que existen variaciones en los tipos de magma que corresponden a contextos tectónicos regionales. Estas variaciones se han clasificado en términos de la cantidad de Dióxido de Silicio (SiO_2) y Óxido de Potasio (K_2O) presentes en las rocas (figura 1.2). Teniendo en cuenta las variaciones en la composición de procesos magmáticos, existen dos tipos de mecanismos de variaciones en la composición del magma; variaciones primarias en magmas y variaciones debido a la diferenciación de un magma primario. En la Figura 1.2, se muestran diagramas de predominio de especies geológicas, en donde se correlacionan las variaciones primarias que se dan en el contenido alcalino y de K_2O respecto a un contenido similar de SiO_2 . Estas variaciones se derivan principalmente de la diversidad de los magmas primarios. Por otro lado, las últimas variaciones se producen por procesos de diferenciación para un magma primaria durante el ascenso. (Nakagawa *et al.*, 2002). El cono actual del Popocatepetl ha sido construido durante los últimos 23,000 años y está edificado por una serie de depósitos piroclásticos y coladas de lava de composición andesítica-dacítica (Macias, 2005). Se sabe que los diferentes tipos de magma influyen la composición de la fase gaseosa de las emisiones volcánicas. En el caso del volcán Popocatepetl, las rocas formadas por el enfriamiento del magma son la andesita y la riolita, las cuales tienen una composición similar en SO_4^{-2} , Cl^- y F^- en comparación con los basaltos que contienen más SO_4^{-2} , pero menos Cl^- y F^- ; las dacitas tienen bajo contenido en F^- con respecto al alto contenido de SO_4^{-2} de las andesitas, y mayor cantidad de Cl^- que las andesitas y los basaltos (Giggenbach, 1996).

En la actividad volcánica se emite roca que, debido a la fuerza con que es expelida por la ruptura del domo, se convierte en polvo o arena. El tamaño de ésta varía de 0.004 a 2 mm de diámetro. La cantidad y composición de la ceniza varía entre los volcanes y aún entre erupciones de un mismo volcán. En general la ceniza volcánica está compuesta por óxidos, principalmente de sílice, aluminio y hierro (80%), Magnesio, calcio, sodio, potasio, plomo; metales pesados como vanadio, cromo, cobalto, níquel y zinc (figuras 1.3). Se presenta en forma de polvo fino, alcanzando alturas de precipitación de 1 a 3 cm (en zona de riesgo medio) y de 5 a 10 cm (en zona de alto riesgo) (Witter *et al.*, 2005).

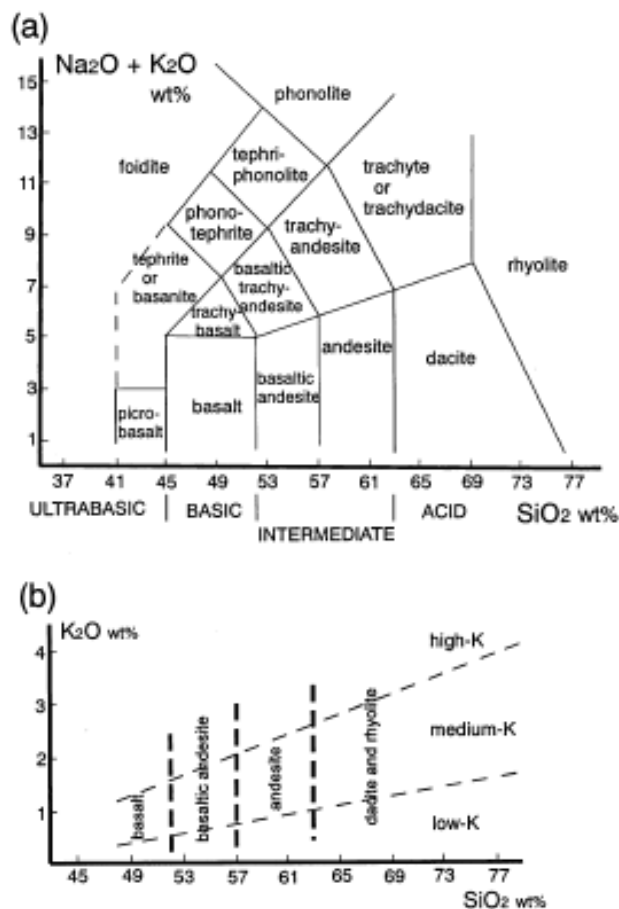


Figura 1.2 (a) Nomenclatura y clasificación química de las rocas volcánica usando la alcalinidad total versus el diagrama de sílice (Le Maitre, 1989). (b) División de basaltos, andesitas basálticas, andesitas, dacitas y riolitas según su concentración (baja-mediana-alto) de K.

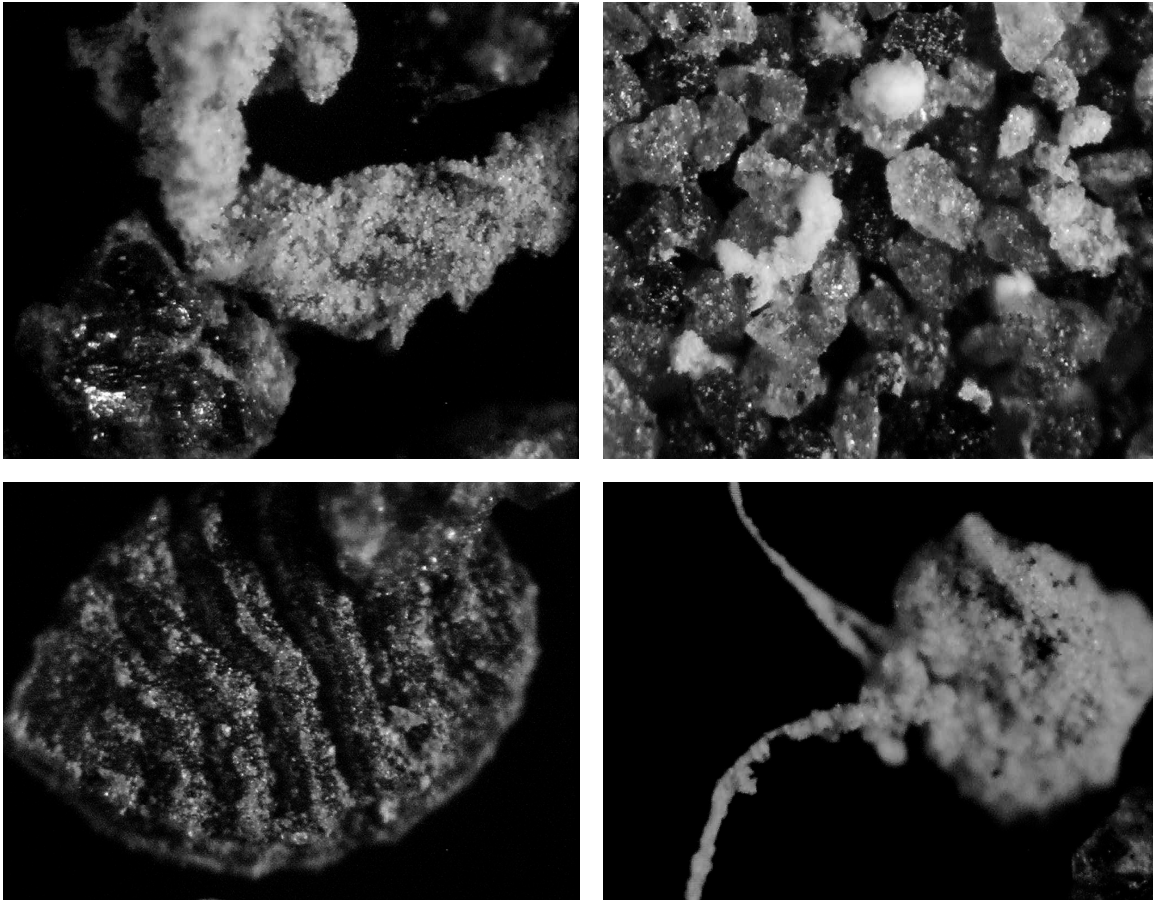
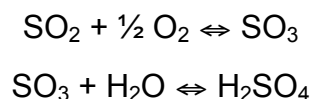


Figura 1.3 Fotografías donde se muestran las variaciones en morfología, dimensiones y composición de la ceniza volcánica.

Durante el período de actividad volcánica hay emanación de vapor de agua principalmente; pero también se han identificado gases tóxicos como el dióxido de carbono (CO_2), el dióxido y trióxido de azufre (SO_2 , SO_3), que combinados con el vapor de agua originan ácido sulfhídrico y sulfúrico (H_2S , H_2SO_4). El ácido clorhídrico (HCl), el monóxido de carbono (CO), el ácido fluorhídrico (HF), el hidrógeno (H), el helio (He) y el radón (Rn), también son expulsados durante la erupción, así como mercurio (Hg), magnesio (Mg), manganeso (Mn) y bromo (Br), entre otros (Goff *et al.*, 1998; Bobrowski *et al.*, 2003; OPS, 2005).

Se estima que se compactan en ceniza aproximadamente del 17-33% de volátiles expulsados durante una erupción volcánica (Connor *et al.*, 1993; Varekamp *et al.*,

1984). Los sulfatos se producen a partir de la reacción de SO₂ con el agua líquida adsorbida en las cenizas a través de un proceso complejo que se podría resumir mediante las siguientes reacciones:



HCl y HF también se depositan sobre la ceniza y se recuperan en los lixiviados como Cl⁻ y F⁻, respectivamente.

Una exposición masiva con estos gases puede ser fatal, simplemente por asfixia. Las emanaciones de CO₂ fueron responsables de la muerte de alrededor de 1,700 personas en el lago Nyo y más de 30 personas en el lago Monoun, en Camerún, entre el periodo de 1984 y 1986, respectivamente (Kling *et al.*, 1987; Baxter *et al.*, 1986). Exposiciones menos importantes generan empeoramiento de enfermedades respiratorias previas, y si son de suficiente magnitud y duración pueden producir alteraciones en personas sanas. Las emanaciones de SO₂ del volcán Kilauea, en Hilo Hawai, se relacionaron con un aumento en los casos de asma (Michaud *et al.*, 2005). Además, se estima que de los 491 desastres reportados durante el siglo XX, relacionados con erupciones volcánicas, 11% de éstos estuvieron relacionados con los gases emanados, y que durante estos eventos perdieron la vida 2,016 personas (2% del total) y 2,860 (18%) resultaron heridas. Pero estos lamentables acontecimientos no solamente han tenido lugar durante las erupciones volcánicas. En el Monte Aso, Japón, seis muertes de turistas estuvieron asociadas a la exposición de SO₂, y otras 59 personas tuvieron que ser hospitalizadas; el común denominador en estos casos fue que sufrían de enfermedades respiratorias crónicas (Ng'walali *et al.*, 1999).

También, las concentraciones de vapores de mercurio (Hg) detectadas en regiones volcánicas, sobrepasan las recomendadas por la OMS para exposición a nivel poblacional (1 µg/m³), y su acumulación ha sido detectada en personas

profesionales expuestos (vulcanólogos, guías, empleados de la industria geotérmica) (Siegel *et al.*, 1985). Otro de los gases tóxicos derivado de la actividad volcánica es el fluoruro de hidrógeno (HF), cuyas concentraciones cerca de un conducto de ventilación del volcán Popocatepetl se encontraron dentro de la norma de la OMS; pero aunque el riesgo de una intoxicación por vía respiratoria pareciera ser poco probable debido a su baja concentración, puede ser una importante fuente de fluorosis debido a que este gas se mezcla con el agua, alcanzando concentraciones de hasta 2,800 mg/L (Fawell *et al.*, 2012).

En el caso del Popocatepetl, el monitoreo de emisiones se ha realizado desde diciembre de 1994, después de un período de inactividad de casi 70 años. La actividad volcánica registrada durante el período de diciembre de 2000 y enero de 2001 fue particularmente intensa, ésta tuvo una influencia negativa en la calidad del aire de la ciudad de Puebla, lo cual se vio reflejado en el incremento de los índices de PM₁₀, CO y compuestos de azufre (Juárez *et al.*, 2005).

1.3 EFECTOS EN LA SALUD

Los efectos respiratorios secundarios a una erupción volcánica son producto de la exposición a la ceniza y gases volcánicos. El grado de afectación va a depender de la cantidad, composición, propiedades fisicoquímicas de estos materiales y se verá influenciado por las características topográficas locales, la dirección de los vientos y la intensidad de las lluvias. Estos factores contribuyen al desplazamiento y concentración de las emisiones volcánicas en el aire de la población expuesta (Sierra-Vargas, 2012).

Estudios epidemiológicos indican que la exposición poblacional a los gases volcánicos depende de la intensidad y duración de la actividad volcánica, así como de la altura del volcán, las características topográficas y los fenómenos meteorológicos. De tal suerte que la contaminación del aire en zonas habitadas y relativamente alejadas del volcán tendría efectos inflamatorios agudos reversibles

en la población sana, y podría provocar dificultad respiratoria en personas con padecimientos respiratorios obstructivos crónicos. Por esta razón, se debe vigilar la dispersión atmosférica de estos gases hacia áreas habitadas, con el fin de que en caso de que las concentraciones sobrepasen los estándares establecidos de calidad del aire se realicen las acciones preventivas para este tipo de contingencias (Sierra-Vargas, 2012).

Exhalaciones de ceniza de los volcanes en erupción pueden causar una serie de efectos sobre la salud tras una exposición, ya sea de emisiones iniciales o de la resuspensión de material depositado en días, meses o años. Investigadores de los Estados Unidos, Islandia, Australia han informan que la exposición a la ceniza volcánica puede favorecer el crecimiento de bacterias de acogida en el sistema respiratorio y debilitar la capacidad del sistema inmunológico para limitar ese crecimiento, contribuyendo posiblemente a las infecciones respiratorias que han sido documentadas en relación con las erupciones (Monick *et al.*, 2013).

Aunque las erupciones volcánicas son un evento bastante raro, no hay datos significativos que apoyan los efectos adversos para la salud de las partículas respirables. Lave y Seskin (1972) vinculan la contaminación atmosférica y la mortalidad prematura. Esta asociación se ha confirmado en estudios posteriores (Dockery *et al.*, 1993; Spix *et al.*, 1993; Samet *et al.*, 2000; Elliott *et al.*, 2007). Las erupciones volcánicas debido a la carga de partículas significativa en la atmósfera tienen efectos adversos sobre la salud humana, incluyendo la bronquitis, exacerbaciones del asma y síntomas respiratorios que conducen a los ingresos hospitalarios (Baxter, 1983).

Durante 1980 el Monte Santa Helena entró en erupción en el estado de Washington (EE.UU.), varias personas murieron a causa de asfixia por la ceniza volcánica y debido a lesiones cutáneas debido a las quemaduras térmicas (Bernstein *et al.*, 1986). Estudios posteriores examinaron el agua subterránea y efectos crónicos de la erupción. Aunque las exacerbaciones del asma, infecciones

de las vías respiratorias superiores, otitis y bronquitis se documentaron (Bernstein *et al.*, 1986), algunos estudios han encontrado sólo un riesgo limitado de infecciones pulmonares (Martin *et al.*, 1986).

En cuanto a la erupción del volcán Eyjafjallajökull en Islandia, Carlsen *et al.*, (2012) reportaron que en la población de Islandia expuesta a ceniza volcánica ha aumentado la prevalencia de síntomas respiratorios, especialmente el asma y la bronquitis crónica, en comparación con una población control en el norte de Islandia. Aunque otros estudios han demostrado que la exposición a la ceniza volcánica aumenta el riesgo de desarrollar infecciones respiratorias (Convit *et al.*, 2006; Naumova *et al.*, 2007; Gudmundsson, 2011), existen datos limitados sobre los mecanismos celulares implicados en este aumento de riesgo de infección en los pulmones. Dado que las infecciones de las vías respiratorias son el resultado de mecanismos inmunes innatas con discapacidad, la hipótesis de que la ceniza volcánica afecta los mecanismos inmunes innatos, específicamente la función de los macrófagos y péptidos antimicrobianos.

Una exposición constante a las cenizas tienen como antecedentes la presencia de broncoespamos de la vía aérea en infantes, posterior a la erupción del volcán Soufrière en la isla de Monserrat (Horwell *et al.*, 2003). También se han registrado la aparición de síntomas respiratorios como disminución en el flujo expiratorio forzado (FEV) y han aumentado la sintomatología respiratoria en poblaciones que se localizaban a 24 y 50 kilómetros del volcán, como sucedió durante la actividad del volcán Sakurajima en Japón y el Monte Santa Helena en Washington (Johnson *et al.*, 1982; Baxter *et al.*, 1983; Yano *et al.*, 1990). Estudios epidemiológicos referentes a la actividad del volcán Masaya en Nicaragua, revelaron casos de irritación de la piel y de las vías aéreas (Baxter *et al.*, 1993). Las implicaciones en la salud de poblaciones cercanas al volcán Yasur en Tanna, Nueva Zelanda se caracterizaron por alteraciones respiratorias, estrés y por la aparición de fluorosis a nivel óseo y dental (Cronin *et al.*, 2002).

La evaluación de la exposición a ceniza volcánica en los guardabosques de Washington, mostró una disminución en los niveles de C3 y C4 (factores de complemento; proteínas involucradas en el proceso de inflamación) con respecto al grupo de referencia, además de un marcado descenso de los niveles de inmunoglobulina G (IgG) en el suero después de un año de exposición a la ceniza volcánica. Los datos plantean que la exposición a la inhalación de ceniza afecta las funciones inmunológicas (Olenchock *et al.*, 1983).

Estudios epidemiológicos realizados en Biancavilla, una población al oeste de Sicilia (Italia) localizada en un área volcánica, han revelado el incremento en la incidencia de mesotelioma pleural maligno, carcinoma, fibrosis pulmonar y daños en el ADN. Estos efectos se relacionan con la exposición que presenta la población a rocas de origen volcánico y que contienen rocas anfíboles. El tipo de reactividad biológica de las trazas de anfíboles es parecido al de los restos de asbestos, las cuales se sabe que inducen fibrosis inflamatoria a nivel pulmonar y daños en el ADN a largo plazo, ocasionando carcinoma y mesotelioma pulmonar (Rapisarda *et al.*, 2003; Umran, 2003).

1.4 EFECTO EN ECOSISTEMAS Y DIVERSOS ORGANISMOS

La actividad volcánica es una fuente natural de contaminación, la cual aporta una cantidad considerable de contaminantes en suelo, atmósfera y agua. Se ha documentado que dicha actividad representa riesgos para los ecosistemas y las poblaciones humanas que se ubican cerca de los sitios volcánicos, no obstante se ha descrito que incluso organismos que se localizan a distancias considerables de las zonas con actividad volcánica también pueden verse afectados. Dentro de los principales riesgos volcánicos destacan la emisión de ceniza y gases, relacionándose con la cantidad y el número de exposiciones a dichos eventos (Rivera-Tapia *et al.*, 2005).

Posterior a la erupción del volcán Irazú en Costa Rica (1963-1965) una evaluación realizada mostró que la ceniza altera significativamente las condiciones ecológicas de diversas poblaciones de insectos (Willie *et al.*, 1975). En el estado de Alaska se contabilizaron pérdidas económicas por los cambios adversos sufridos en las comunidades de salmón debido a las condiciones ambientales derivadas de su actividad volcánica (Dorova *et al.*, 1999). Por su parte, Vandergast *et al.*, (2004) plantean que la actividad volcánica influye en la estructura genética de poblaciones de invertebrados en Hawái, lo que condiciona la fragmentación, el crecimiento masivo y el potencial para una evolución acelerada.

Los efectos causados por la contaminación han permitido detectar manifestaciones y alteraciones, tanto en el hombre como animales, que aún no han sido del todo bien definidas (Venkatesh, 1988). Por ejemplo, la exposición de un grupo de ratas a cenizas, no favoreció la susceptibilidad a la infección por *citomegalovirus*; sin embargo, la infección por estreptococos provocó la muerte de los animales a las 24 horas (Grose *et al.*, 1985). Antonini *et al.*, (2002) demostraron experimentalmente que se favorece una mayor susceptibilidad a la infección por *Listeria monocytogenes* tras la exposición a ceniza, produciéndose daños en el tejido pulmonar.

Trabajos relacionados con la exposición a la inhalación de ceniza volcánica en modelos animales indican un aumento de los niveles de fibrinógeno en plasma y un incremento en el porcentaje de leucocitos polimorfonucleares, principalmente eosinófilos, así como una disminución del porcentaje de macrófagos a nivel alveolar. Por su parte, los estudios citogenéticos en animales que han sido expuestos a diferentes concentraciones y tipos de contaminantes ambientales muestran una elevada frecuencia de células alteradas (Grose *et al.*, 1985; Rubes *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 2000).

En un estudio de exposición a la inhalación de la ceniza volcánica procedente del Monte Santa Helena, en un grupo de hámsters (dos horas diarias durante un año),

permitió detectar cambios en la función y morfología del tejido pulmonar de los animales, caracterizado por alveolitis y fibrosis, a nivel traqueal, se dio una reducción en la actividad ciliar además de cambios citomorfológicos. Así mismo, se observó la llegada de neutrófilos que regulan la adhesión local de moléculas, induciendo quimiotaxis de células inflamatorias en las vías aéreas (Schiff *et al.*, 1981; Raub *et al.*, 1985; Graham *et al.*, 1985). La exposición a la inhalación de ceniza en hámster, proveniente de la actividad del volcán Popocatepetl, provocó una reacción inflamatoria aguda y crónica, un foco neumónico con detritus celulares e infiltración de linfocitos en el tejido pulmonar (Rivera *et al.*, 2003).

Las cenizas volcánicas son bajas en nutrientes y fuentes de energía. Entre los microorganismos del aire que llegan con las cenizas, las precipitaciones atmosféricas, y durante la fusión de la nieve, sólo aquellos con metabolismo económico y de adaptación a ambientes pobres en nutrientes para sobrevivir. Tales son, por ejemplo, los miembros del grupo de microorganismos oligotróficos y facultativos oligotróficos. Las cianobacterias, siendo microorganismos fotosintéticos y fijadores de nitrógeno, son capaz de crecer bajo condiciones extremas, también debe de esperarse a que participen en la transformación de las cenizas volcánicas (Pimenov, 1983; Kuzyakina, 1985).

La mutua interacción de factores como son el alto contenido de materia orgánica, la actividad microbiana y su composición alofánica influyen sobre la alta capacidad de retención de fósforo de estos suelos, la cual encarece significativamente la producción agrícola. Es un hecho comprobado que la población microbiana es un factor importante que define las características de un suelo, especialmente en lo referente a su fertilidad, Al mismo tiempo, es indudable que el entorno ecológico primario en el que se desarrolla esta microflora, principalmente la fracción inorgánica arcillosa del suelo, influenciara de manera notable los procesos bioquímicos que esta flora impulsa *in situ*. Esto es especialmente relevante en los suelos derivados de cenizas volcánicas, cuyo constituyente fundamental de su fracción arcillosa es el alofano, término genérico que se usa para designar a

aluminios/silicatos amorfos de razón $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ variables y cuyas cargas de los recubrimientos superficiales son dependientes del pH. La actividad fisicoquímica superficial de estos alofanos es alta, adsorbiendo con mucha tenacidad especies aniónicas, por ejemplo fosfatos y algunos sustratos orgánicos, por ejemplo enzimas y sustancias húmicas.

CAPÍTULO 2

EFFECTOS TÓXICOS

2.1 TOXICIDAD EN MICROORGANISMOS

La contaminación ambiental con metales pesados constituye un creciente problema mundial. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables. Solo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos. Los microorganismos resistentes a metales pesados presentan potencialidades para el diseño de tecnologías aplicables en el campo de la Biorremediación de ambientes contaminados. Los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados presentan gran importancia desde el punto de vista de la biotecnología ambiental o biorremediación y existen tres áreas fundamentales de aplicación: 1) incorporación de los determinantes de resistencia desde un organismo a otro que sería utilizado en procesos relacionados con metales pesados, 2) en la bioextracción de metales estratégicos, preciosos o radiactivos, directamente desde los minerales o por recobrado de metales desde los efluentes de los procesos industriales y 3) en la restauración de los ambientes contaminados con metales.

Las aplicaciones industriales de las bacterias resistentes a metales o sus genes incluyen el uso de biosensores para el control y seguimiento de la concentración de estos elementos en una gran variedad de sustratos y suelos, el desarrollo de biorreactores para extraer o eliminar metales pesados desde efluentes contaminados o suelos, bioaumentación y fitorremediación.

2.2 MICROORGANISMOS Y SU INTERACCIÓN CON METALES PESADOS

Ciertos metales cumplen funciones celulares que no pueden ser satisfechas por las moléculas orgánicas, y estos metales son, por tanto, indispensables para la bioquímica de la vida en todos los organismos. Iones metálicos específicos son cruciales para la estructura de las membranas celulares y el ADN; aproximadamente la mitad de todas las proteínas conocidas se prevé que sea dependiente de átomos de metal para su estructura y su participación en los procesos celulares fundamentales, como la transferencia de electrones y la catálisis (Waldron *et al.*, 2009). No obstante, estos metales esenciales son letales para todas las células cuando están presentes en exceso. Además, ciertos metales no esenciales como la plata (Ag), mercurio (Hg) y telurio (Te), son extremadamente tóxicos para la mayoría de bacterias y tienen actividad microbicida en concentraciones excepcionalmente bajas. Debido a esta potente toxicidad para bacterias y levaduras, metales particulares se han utilizado como agentes antimicrobianos desde la antigüedad.

Los metales pesados son bien conocidos por ser tóxicos para la mayoría de los organismos cuando están presentes en concentraciones excesivas. Por lo tanto, no es sorprendente que la toxicidad de metales pesados a los microorganismos en el ambiente a menudo haya sido reportado. Se han reportado que los efectos de metales pesados, por ejemplo, en los procesos microbianos del suelo se remontan a comienzos del siglo pasado (Lipman *et al.*, 1914; Brown *et al.*, 1916). Pero sólo cuando se observó los grandes efectos negativos de las emisiones de metales pesados procedentes de fundiciones en los ecosistemas circundantes entre los años de 1960 a 1970, fue cuando se dieron cuenta de la severidad hacia los microorganismos del suelo y los procesos microbianos del suelo, los cuales pueden llegar a ser perturbados por elevadas concentraciones de metales, resultando a veces, en la perturbación de los ecosistemas de una forma muy grave (Tyler, 1975).

2.3 EFECTO TÓXICO DE LOS METALES SOBRE LA CÉLULA MICROBIANA

Los metales son tóxicos, ya que, como resultado de su naturaleza fuertemente iónica, por lo que se unen a muchos ligandos celulares y desplazan metales nativos esenciales de su sitio normal de unión. Por ejemplo, el ión arseniato puede reemplazar al fosfato en la célula microbiana. Los metales también alteran las proteínas mediante la unión a grupos sulfidrilos y a los ácidos nucleicos mediante la unión a grupos fosfatos o hidroxilos. Como resultado, la configuración de las proteínas y el ADN es interrumpida en funcionamiento. El cadmio, por ejemplo, compite con el zinc celular y se une a sitios no específicos del ADN, induciendo así, un desplegamiento o ruptura en la hebras simples. Los metales también pueden alterar la fosforilación oxidativa y la permeabilidad en las membranas, como se ha visto con el ión vanadato y mercurio. Los microorganismos generalmente usan vías específicas de transporte para metales esenciales de su membrana celular hacia el interior celular. Desafortunadamente, los metales tóxicos también puede atravesar la membrana, ya sea por difusión o utilizando las vías para otros metales. Así, el transporte del Cd^{2+} se da usando la vía del Mn^{2+} en *Staphylococcus aureus* (Timberley *et al.*, 2000).

La interacción microbio-metal da como resultado un decremento en el crecimiento, cambios morfológicos anormales o en la inhibición de procesos bioquímicos celulares. Los efectos tóxicos de los metales también se pueden ver en toda la comunidad bacteriana. En respuesta a la toxicidad por metales, el número y diversidad de una comunidad puede decrecer. Sin embargo, existen pocos estudios acerca de sus efectos en las comunidades. Mientras que un individuo aislado de una población puede generar resistencia, como hace una población de microorganismos para interactuar de tal forma que le confiera resistencia así como a un individuo. Posiblemente la interacción continua con los metales genere resistencia, y esta puede ser transmitida a futuras generaciones, formando así, poblaciones resistentes a los metales (Timberley *et al.*, 2000).

2.4 MECANISMOS MICROBIOLÓGICOS DE RESISTENCIA A LOS METALES

Algunos microorganismos se cree que han desarrollado resistencia a metales debido a su exposición a los metales tóxicos, poco después de que comenzara la vida sobre la Tierra. Se cree que otros han desarrollado resistencia en respuesta a la reciente exposición por contaminación por metales durante los últimos 50 años. La reciente evolución a la contaminación del medio ambiente con metales de origen antropogénico ha incrementado la necesidad de investigar la resistencia de los microorganismos a los metales, así como a su uso para la biorremediación. Los microorganismos están directamente influenciados al destino de los metales en el medio ambiente y así, dar una posibilidad para el tratamiento de estos en distintos medios contaminados (Timberley *et al.*, 2000).

En respuesta al medio ambiente contaminado con metales, los microorganismos han desarrollado mecanismos ingeniosos de resistencia y desintoxicación que pueden ser intracelulares o extracelulares, muchos pueden ser específicos a un determinado metal o mecanismos generales, capaces de interactuar con una gran variedad de metales. Entre los cuales se tienen; procesos de volatilización, reducción, precipitación como sales metálicas y mecanismos en las membranas (captura y protección) celulares como las bombas de expulsión (figura 2.1). Algunos mecanismos de resistencia son codificados en plásmidos, los cuales tienden a ser específicos para determinados metales. La resistencia de los microorganismos a los metales se puede dividir en tres categorías (Beveridge *et al.*, 1997):

- a) Mecanismos de resistencia generales y que no requieren de estrés al metal.
- b) Mecanismos de resistencia que son específicos por activación a un determinado metal.
- c) Mecanismos de resistencia generales y que son activados por condiciones de estrés a metales.

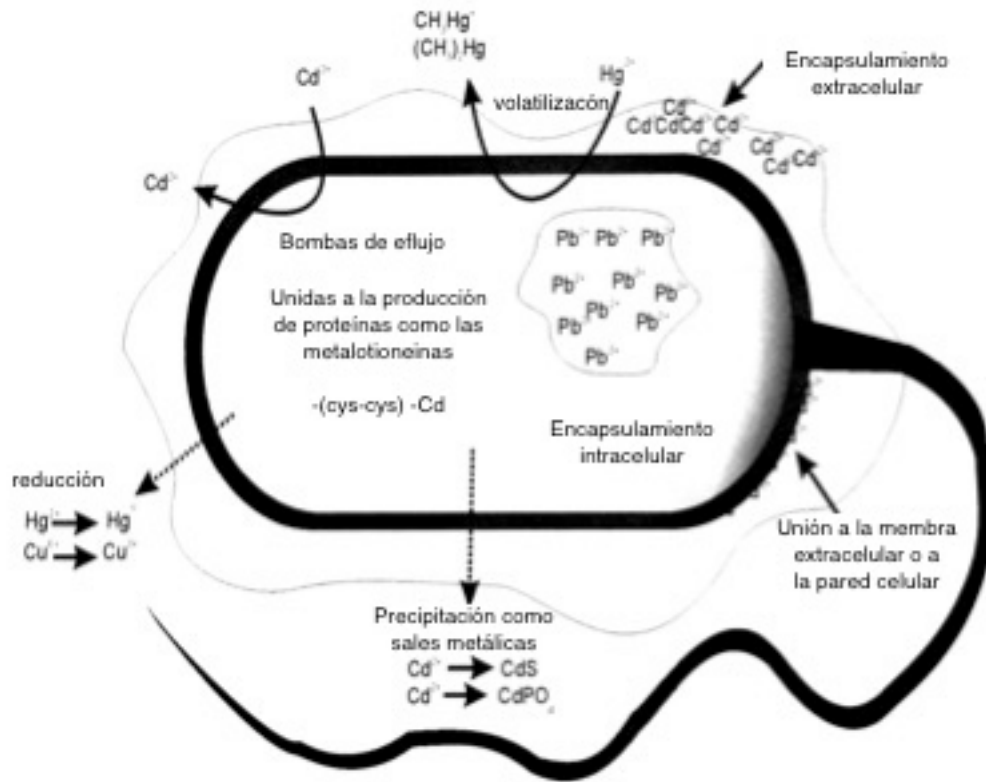


Figura 2.1 Ejemplo de mecanismos únicos de resistencia a metales en bacterias (adaptado de Beveridge, 1997).

Los mecanismos generales de resistencia generalmente sirven para otras funciones. Por ejemplo, la producción de biopelículas, mientras más efectiva es la producción de biopelícula se provee una barrera contra la entrada de metales al interior de la célula bacteriana, además de servir como una fuente protectora contra la desecación y la depredación. El único propósito de los mecanismos dependientes de metales, tanto específicos como generales, es el de proteger a la célula de la toxicidad del metal (Beveridge *et al.*, 1997). Ejemplos de estos mecanismos incluyen bombas de expulsión y producción de metalotioneinas (MTs, grupo de familias de proteínas ricas en cisteína y de bajo peso molecular, que pueden ser inducidas por metales como Cu, Zn, Cd, Ag y Hg. Así, organismos marinos expuestos a metales tóxicos y que sufren alteraciones fisiológicas, usan estas proteínas como biomarcadores de exposición) (Gupta *et al.*, 1993).

2.5 INTERACCIONES MICROBIANAS CON METALES PESADOS

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005). Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad, b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas, y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular. Para los mecanismos de expulsión se tiene la disponibilidad de las secuencias de genomas completos, se cuenta actualmente con una gran cantidad de información sobre los genes que codifican transportadores de metales pesados, muchos de ellos caracterizados a los niveles bioquímico y estructural.

2.5.1 Sistemas de expulsión de Cationes.

Entre ellos se encuentran los sistemas que expulsan iones derivados de cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y zinc. Se han identificado tres tipos principales de sistemas de expulsión (Nies, 2003) y se presentan en orden de su complejidad:

- i) Los facilitadores de difusión de cationes (CDF) son proteínas que se encuentran distribuidas en los tres dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya). Generalmente transportan zinc pero también pueden expulsar otros cationes como cadmio, cobalto, níquel e incluso hierro (Haney et al., 2005). Las proteínas CDF son polipéptidos de tamaño mediano (menos de 400 residuos) que poseen seis segmentos transmembranales (STM), funcionan como homodímeros en la membrana interna, y expulsan los sustratos al espacio periplásmico. El transporte de los iones se asocia con un proceso quimiosmótico que involucra el intercambio con protones en el cual participan residuos de histidina, aspartato y glutamato. El prototipo de este grupo de

transportadores es la proteína CzcD, identificada en un plásmido de la β -proteobacteria hipertolerante a metales *Cupriavidus metallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus*).

- ii) Las ATPasas tipo P constituyen una superfamilia de transportadores de metales que son energizadas por la hidrólisis del ATP (Solioz et al., 1994). Como las proteínas CDF, las ATPasas tipo P (llamadas así porque el γ -fosfato liberado en la hidrólisis del ATP se une en forma covalente a la enzima) están ampliamente distribuidas en los tres dominios de la vida y sus sustratos son iones como H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} y Cd^{2+} . Este tipo de ATPasas se localizan en la membrana interna y pueden transportar iones hacia el interior celular, comúnmente iones fisiológicos como Mg^{2+} , o bien funcionar como sistemas de expulsión, removiendo metales tóxicos al espacio periplásmico. Al igual que los transportadores CDF, estas ATPasas deben asociar su función con proteínas de la membrana externa (por ejemplo, las porinas) para lograr expulsar el sustrato tóxico hasta el exterior celular. Los miembros del enorme grupo de ATPasas tipo P involucradas en el transporte de metales pesados poseen una prolina precedida o seguida de una cisteína; este motivo (CPx) es esencial para su función. Estas ATPasas son proteínas con más de 700 residuos formadas por seis STM, una gran región citoplásmica que une el ATP, y varias parejas de cisteínas que atrapan a los metales que han de ser expulsados. ATPasas CPx que transportan cobre, por ejemplo, se relacionan con las severas enfermedades humanas de Menkes y de Wilson. En bacterias, la ATPasa tipo P más estudiada es la proteína CadA codificada en un plásmido de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, *C. metallidurans* es notable al poseer en su genoma los genes para 10 ATPasas tipo P que, en conjunto, participan en la homeostasis, o en la resistencia, a cadmio, cobre, plomo y zinc. Otros grupos bacterianos como cianobacterias, micobacterias o *Rhizobium* albergan también un gran número de ATPasas de metales en sus genomas.

- iii) El tercer grupo de proteínas involucradas en la expulsión de metales está formado por los transportadores de la familia RND, denominada así porque sus miembros participan en procesos de resistencia, nodulación y división celular en diferentes especies bacterianas (Saier, 2003). A diferencia de los dos tipos de transportadores anteriores, estas proteínas sólo se han identificado en bacterias, donde constituyen una gran superfamilia. Se trata de proteínas de alrededor de 1,000 residuos presentes en la membrana interna, que expulsan compuestos de índole diversa. Las proteínas RND que participan en la expulsión de metales comúnmente se asocian con una pareja de polipéptidos auxiliares: una proteína pequeña de la membrana externa y una proteína periplásmica que une (o fusiona) a las membranas interna y externa (Paulsen et al., 1996). El complejo se encuentra en la membrana como un multímero formado probablemente por tres copias de cada proteína. En *C. metallidurans* la asociación se presenta desde el nivel genético: los genes que codifican las proteínas CzcC, B y A forman un operón (por ello, la familia se conoce también como de transportadores CBA, para distinguirla de las ATPasas ABC). El enorme complejo proteico funciona como una eficiente bomba de expulsión que transporta los iones tóxicos desde el citoplasma hasta el exterior de la célula bacteriana (a diferencia de los otros sistemas de expulsión que sólo translocan su sustrato al espacio periplásmico). Como ocurre con las proteínas CDF, los transportadores CBA funcionan como antiportadores quimiosmóticos de cationes y protones. El sistema CzcCBA de *Cupriavidus* es capaz de expulsar cadmio, zinc y cobalto, pero se conocen ejemplos de complejos RND de otras especies bacterianas que transportan níquel, cobalto, plata o cobre.

2.5.2 Sistema de expulsión de aniones.

En este grupo se encuentran los transportadores que expulsan a los oxianiones derivados de arsénico y de cromo e incluyen tanto sistemas quimiosmóticos como relacionados con ATPasas.

- i) El metaloide arsénico puede formar dos tipos de oxianiones: arsenito (AsO_2^- , la forma más tóxica) y arsenato (AsO_4^{3-}). El primer ejemplo de un sistema de expulsión de arsenito es el operón *arsABC* codificado en un plásmido de *Escherichia coli*. El arsenito es expulsado por un complejo formado por *ArsB*, una proteína de la membrana interna de alrededor de 400 residuos y 12 STM, y *ArsA*, una proteína hidrofílica asociada con la membrana y con actividad de ATPasa. *ArsA* proporciona la energía para el transporte de arsenito y no posee similitud de secuencia con las ATPasas tipo P ni con las ATPasas tipo ABC (Mukhopadhyay et al., 2002). El mecanismo de tolerancia se completa con una pequeña proteína adicional, *ArsC*, que es una arsenato reductasa que transforma el arsenato en arsenito, el cual puede ahora ser expulsado por el complejo *ArsAB*. De esta forma, el sistema *ars* confiere resistencia a ambos oxianiones. Se conocen numerosos homólogos del operón *ars* en diversas especies bacterianas, presentes tanto en plásmidos como en cromosomas (Mukhopadhyay et al., 2002). Muchos de estos operones carecen del gen para la ATPasa *ArsA* y, en estos casos, el transportador *ArsB* es capaz de expulsar el arsenito impulsado por el potencial eléctrico transmembranal generado por la cadena respiratoria (Mukhopadhyay et al., 2002). Este es el único sistema de expulsión de iones inorgánicos tóxicos que puede funcionar de manera dual: impulsado por la hidrólisis del ATP o por un proceso quimiosmótico.
- ii) El sistema de expulsión del oxianión tóxico cromato (CrO_4^{2-}) se identificó inicialmente en plásmidos de *Pseudomonas aeruginosa* y de *C. metallidurans* que codifican la proteína *ChrA* (Cervantes et al., 2001).

Esta proteína expulsa el cromato del citoplasma en un proceso quimiosmótico dependiente de la cadena respiratoria (Pimentel et al., 2002). ChrA es parecida a ArsB en tamaño, topología y mecanismo de acción (cuando ésta no se asocia con la ATPasa), aunque no comparten similitud en sus secuencias de aminoácidos. Actualmente se reconocen docenas de homólogos de ChrA, plasmídicos y cromosómicos, que constituyen a la familia de transportadores CHR (Nies et al., 1998), aunque su participación en la expulsión de cromato sólo se ha demostrado en las proteínas de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans*. Las proteínas ChrA, como ocurre con miembros de otras familias de transportadores, surgieron de la duplicación de un gen ancestral que codificaba sólo seis STM (Nies et al., 1998). Mediante mutagénesis se encontró que la mayoría de los aminoácidos esenciales para la función de ChrA de *P. aeruginosa* se localizan en la mitad amino terminal (Aguilera et al., 2004), sugiriendo que los dominios amino y carboxilo terminales tienen funciones distintas en la expulsión del cromato. El análisis filogenético de la familia CHR apoya esta hipótesis al mostrar que la secuencia de aminoácidos de la mitad amino se encuentra más conservada que la de la mitad carboxilo.

2.6 MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MICROORGANISMO-METAL

Se deben de aplicar consideraciones únicas al estudiar las interacciones de microorganismos-metal. Las concentraciones de metales a macroescala reflejan pobremente la influencia tóxica de metales sobre la escala de los microorganismos. Retirar las concentraciones tóxicas de metales no evalúa con precisión la concentración tóxica biológica. Debido a que los metales no son biológicamente degradados, es difícil determinar si y como los metales están siendo desintoxicados cuando las concentraciones de metales no varían. Sin

embargo, nuevas técnicas y desarrollos analíticos en la química de los metales, microbiología y biología molecular están haciendo posible ampliar el conocimiento de cómo influyen los metales a un microorganismo en un ambiente determinado (Beveridge *et al.*, 1997).

El cultivo de microorganismos resistentes a metales en el laboratorio frecuentemente ocurre en un medio rico en nutrientes o en medios químicos específicos, cuando estos contienen extracto de levadura, buffer de fosfatos y aminoácidos que unen iones metálicos. Medios con pH neutro es un complemento que ayuda a la unión de iones en los medios de cultivo. La presencia y su cantidad de estos componentes influencia fuertemente la biodisponibilidad de los metales, de este modo influencia la toxicidad del metal sobre el microorganismo. Así, dependiendo del medio de cultivo, la toxicidad del metal puede variar. Por ejemplo, ha sido demostrado que *Tetrahymena pyriformis* puede tolerar hasta 100 veces más concentraciones de cadmio (II) en un medio enriquecido comparado con un medio de cultivo normal (Nilsson, 1981). Así, es necesario tomar en consideración varios factores para escoger el medio de cultivo adecuado para evaluar la resistencia de los microorganismos a los metales. Por ejemplo, los buffer de fosfatos precipitan fuertemente los iones metálicos. Quitar la producción de fosfatos en ciertos microorganismos permite su protección para ciertos metales. Los buffers que carecen de unión a los metales, incluidos los de ácidos sulfónicos tales como el MES [2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico; C₆H₁₃NO₄SCH₂O] y el PIPES (ácido 1,4-piperazinedietansulfónico) optimizan la biodisponibilidad del metal en el medio de cultivo. Finalmente el pH influencia fuertemente la biodisponibilidad de los metales. Los metales tienden a precipitar con sales carbónicas a pH > 7.0 (Timberley *et al.*, 2000).

Cuando se estudia la resistencia a metales, se asume que el decremento en la concentración de metales solubles corresponde a la concentración de metales absorbidos por el microorganismo. Sin embargo, hay que ser muy cuidadosos a la hora de interpretar los datos, debido a que las características o los componentes

del medio pudieron haber precipitado los metales, incluso existe la posibilidad de que se hayan unido a las paredes de los frascos o tubos. El control de inóculos de metal sin la presencia de microorganismos son necesarias para discutir los resultados y lograr establecer unas diferencias entre la remoción por microorganismos o por la remoción química del medio como tal. Cabe señalar que mientras es relativamente fácil determinar un estimado a macroescala de la biodisponibilidad en el medio ambiente, tal estimación no refleja la concentración a microescala del metal. Así que incluso si se miden niveles muy bajos de metales solubles, es probable que en algunos niveles sustanciales de microporos para la biodisponibilidad de metales, pueden ser encontrados estos metales. Esto explicaría por qué microorganismos en ambientes contaminados con metales (no solubles) pudieran exhibir una resistencia extrema (Timberley *et al.*, 2000).

2.7 EFECTOS DE LA CENIZA VOLCÁNICA EN MICROORGANISMOS

Uno de los factores más importantes que determina la disponibilidad biológica de un metal en un sistema es su unión a otros componentes ambientales. Si un metal se elimina total o parcialmente mediante la unión, pueden dar como resultado una disminución o desaparición completa de los efectos tóxicos. La actividad biológica de iones de metales pesados puede ser notablemente afectada por la presencia de otros iones. Los cationes como el magnesio y el calcio a menudo pueden reducir la inhibición de metales pesados. Los efectos tóxicos del níquel, cobalto, cadmio, zinc, y manganeso de *Escherichia coli* se redujeron en medios con un alto contenido de magnesio. La toxicidad de níquel y cobalto a *Aspergillus. aerogenes*, *Aspergillus niger* y *Candida utilis* también fue disminuida por el magnesio. Para estos organismos, utilizando radioisótopos de níquel y cobalto, se encontró que los altos niveles de magnesio reducen las cantidades de níquel y cobalto tomadas por las células (Gadd, 1978).

La meteorización biogénica de rocas y minerales que es causada por diversos microorganismos y los productos de su metabolismo; actualmente es un tema de

intensa investigación. La investigación sobre cenizas volcánicas es de especial interés, ya que se ocupa de la cuestión del transporte que permite llegar a la biosfera directamente desde el interior de la Tierra y actuar como el material inicial para litogénesis sedimentaria volcanogénico y la formación del suelo (Karavaiko *et al.*, 2004).

Las publicaciones de interacciones de cenizas con microorganismos son escasas; algunas referencias obtenidas se citan a continuación:

Brock (1978) publicó el hecho de un sobrecrecimiento microbiano en distintos tipos de cenizas.

Pimenov (1983) describió una diversidad de microorganismos que se desarrollan sobre cenizas en zonas donde era intensiva y consecutiva la caída de esta.

Kuzyakina (1985) investigó la relación de las cenizas con los microorganismos en distintos eventos volcánicos a lo largo de la cordillera rusa.

Gerasimenko *et al.*, (2013) demostraron que las bacterias están prácticamente ausentes en cenizas volcánicas. Los experimentos reportados con la inoculación de cenizas con bacterias no mostraron crecimiento en cenizas estériles y no estériles. Ellos siguieron que las cenizas volcánicas frescas son desfavorables para el crecimiento de microorganismos debido a sus componentes tóxicos.

Sin embargo, Karpov *et al.* (2007) describe el desarrollo activo de biopelículas de cianobacterias en el lago Karym Skoe resultado de los cambios en la composición de las aguas causada por una lluvia de cenizas abundantes durante la erupción del volcán Karymskii.

Naimark *et al.*, (2009) realizaron un análisis experimental que involucra bacterias fototróficas anoxigénicas (APB), éste reveló el efecto estimulador de cenizas

volcánicas en su crecimiento. Los productos del metabolismo bacteriano formaron complejos organominerales con el sustrato de cenizas, y esta fue probablemente en la etapa inicial de formación de minerales de la arcilla de las cenizas volcánicas.

Karamba *et al.*, (2014) probaron el efecto de los metales pesados en la cepa *Serratia marcescens* AQ07 para afirmar su efecto sobre el crecimiento y la biodegradación de cianuro. Se utilizó 1 ppm de diez diferentes metales pesados se experimentó *in-vitro* en un medio tampón que contenía cianuro de potasio 200 ppm. Ellos son: la plata, arsénico, cadmio, cobalto, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo y zinc. Sus resultados demostraron que el mercurio tiene efecto significativo sobre el crecimiento (densidad óptica 0.13 a 72 horas) y la biodegradación de cianuro de eliminación de solamente 24.7% en comparación con el control que no tiene ninguna incorporación de metal pesado (densidad óptica 0.74 y 92% de eliminación, respectivamente), mientras que otros eliminan por encima 80%. Otros estudios sobre mercurio revelaron que tiene un efecto significativo en las bacterias, incluso tan bajas como 0.1 ppm. Esto ilustra que el mercurio puede obstaculizar significativamente la biodegradación de cianuro por *Serratia marcescens* cepa AQ07.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

La aproximación experimental consideró cepas bacterianas, medios de cultivo y ceniza volcánica (componentes solubles).

3.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas utilizadas en este estudio corresponden a las siguientes cepas puras aisladas y cultivadas en caldo nutritivo, y cuyas principales características son:

a) *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) normalmente viven en los intestinos de las personas y animales, es quizás el microorganismo mas estudiado. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram-negativo). Es un microorganismo anaerobio facultativo, cuya movilidad se da por flagelos que rodean todo el cuerpo celular. No son formadoras de esporas y son capaces de fermentar glucosa y lactosa. La mayoría de las *E. coli* son inofensivas y en realidad son una parte importante de un tracto intestinal humano sano. Sin embargo, algunos de *E. coli* son patógenas, lo que significa que pueden causar enfermedades, diarrea o enfermedad fuera del tracto intestinal.

b) *Bacillus subtilis*

Es un microorganismo considerado como no patógeno para el ser humano. Es una bacteria que da positivo a la tinción de Gram (Gram-positivo), es de tipo aerobio y se considera positiva a la catalasa y tiene la capacidad de formar endoesporas,

además de ser considerado como ubiquitario (presente en agua, suelo, aire, residuos orgánicos, etc.).

c) *Serratia marcescens*

Es un bacilo móvil negativo a la tinción de Gram (Gram-negativo). Puede ser patógeno para el ser humano (conjuntivitis, queratitis, meningitis, etc.) y es uno de los principales causantes de enfermedades nosocomiales y urinarias. *S. marcescens* se caracteriza por su crecimiento en colonias de color rojo, debido al pigmento prodigiosina.

d) *Micrococcus luteus*

Es una bacteria en forma de coco aerobia obligatoria, es positiva a la tinción de Gram (Gram-positiva). En las reacciones químicas es positiva a la ureasa y a la catalasa. Es una bacteria que puede crecer en agua, suelo y aire, formando una microbiota bacteriana en la piel de los mamíferos.

3.2 CENIZA VOLCÁNICA

La ceniza volcánica fue colectada en distintas localidades de la Ciudad de Puebla (Atlixco, San Nicolás de los Ranchos, Cuautlancingo, Puebla capital centro y colonias como La Margarita, Balcones del Sur y Bosques de San Sebastian) durante el 2012 y en diferentes periodos de exhalación del volcán Popocatepetl. En la tabla 3.1 se resumen los estudios analíticos realizados a las muestras de ceniza.

Tabla 3.1. Análisis Fisicoquímicos de la ceniza volcánica

Localidad	M	Masa	pH	CE ms/cm	Dr, ppm	Cl, ppm	SO ₄ , ppm	NO ₃ , ppm	PO ₄ , ppm	F, ppm	Na, ppm	K, ppm	Fe, ppm	Pb, ppm	Cd, ppm	Na mg/kg	K mg/kg	Fe mg/kg	Pb mg/kg	Cd mg/kg
Atlixco	I	15.5894	8.12	2.09	161.28	19.71	560	40	3	1.87	2	5	3	6.7	0.5	4	10	6	13.4	1
	II	15.0944	8.03	2.17	104.82	24.64	520	60	5	2.45	2	6.6	8.9	7.5	0.8	4	13.2	17.8	15	1.6
San Nicolás de los Ranchos	III-0	20.1319	8.93	6.41	56.448	44.35	440	10	1	1.88	9.1	29.35	7.9	5.9	0.8	18.2	58.7	15.8	11.8	1.6
	III-1	20.2003	8.63	1.9	80.64	34.49	180	50	5	2.2	4.2	11.23	8	7.2	0.9	8.4	22.46	16	14.4	1.8
La Margarita	III-2	20.9262	8.27	1.22	80.64	19.71	20	70	10	2.15	2.2	6.68	10.6	7.1	0.8	4.4	13.36	21.2	14.2	1.6
	IV-0	3.7153	6.4	0.17	40.32	24.64	0	10	2	1.9	0.64	1.7	12.3	10.3	1.2	1.28	3.4	24.6	20.6	2.4
Cuatlancingo	IV-1	4.1158	7.19	0.34	64.512	29.57	20	20	1	1.95	1.3	1.17	11.7	9.9	1.3	2.6	2.34	23.4	19.8	2.6
	IV-2	10.3205	5.42	1.2	80.64	19.71	200	110	4	1.9	1.4	2.83	14.9	5.07	0.7	2.8	5.66	29.8	10.14	1.4
V-0	V-0	10.0317	7.81	1.8	120.96	19.71	440	80	6	2.133	4.06	16.05	52.8	9.6	1.6	8.12	32.1	105.6	19.2	3.2
	V-1	8	7.92	1.14	80.64	19.71	240	80	2	1.833	2.06	6.94	21.5	7.7	1.5	4.12	13.88	43	15.4	3
Balcones del Sur	V-2	20.1116	5.35	1.24	80.64	19.71	100	30	2	2.167	1.02	4.7	18.2	9.6	1.07	2.04	9.4	36.4	19.2	2.14
	VI-0	3.1076	7.51	0.5	88.704	19.71	220	40	4	0	0.96	8.46	29.2	11	1.5	1.92	16.92	58.4	22	3
Bosques de San Sebastian	VI-1	7.0049	6.51	0.63	40.32	19.71	0	90	5	2.4	2.4	3.43	16.2	10.5	1.7	4.8	6.86	32.4	21	3.4
	VI-2	4.967	6.29	0.48	40.32	24.64	0	20	17	0	2.5	5.64	17.7	6.1	1.7	5	11.28	35.4	12.2	3.4
		11.67	7.31	1.52	80.06	24.29	210.00	50.71	4.79	1.77	2.56	7.84	16.64	8.16	1.15	5.12	15.68	33.27	16.31	2.30

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se realizó utilizando como variables experimentales la concentración y los microorganismos, tomando como base las cuatro cepas, sometidas a diferentes concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica, en diferentes medios (tabla 3.2).

Tabla 3.2 Diseño experimental con sus respectivas cepas y concentraciones.

Información sobre las variables			
Nombre corto	Nombre largo	Unidad	Unidad (símbolo)
4.000	Concentración	Porcentaje	%
4.000	Microorganismo	Cepas	c

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de Cultivo y suplementos utilizados durante todas las series de experimentos de la presente Tesis fueron los siguientes:

- Caldo Nutritivo (Bioxon)
- Agar Nutritivo (Bioxon)
- Agar Bacteriológico (Bioxon)
- Peptona de Caseína (Bioxon)

3.5 ESTERILIZACIÓN E INCUBACIÓN

Todo material de cristal y medio de cultivo, así como la parte soluble de la ceniza (1:1) en agua tridestilada fueron esterilizados en una autoclave a 18 lb de presión durante 15 minutos. La incubación de las cepas bacterianas (*Escherichia coli*,

Micrococcus luteus, *Bacillus subtilis* y *Serratia marcescens*) se llevó a cabo a 35°C, tanto en caldo nutritivo como en agar nutritivo y agar bacteriológico en cajas de Petri estériles

3.6 CULTIVO DE MICROORGANISMOS EN CALDO NUTRITIVO: CURVA DE CRECIMIENTO

Para realizar ensayos microbiológicos bajo condiciones equivalentes es necesario trabajar con la misma cantidad de biomasa en una fase de crecimiento similar. Una de las formas de medir la biomasa y determinar las fases de crecimiento de la misma es utilizando un método que relacione dicha biomasa con una magnitud física tal como la absorbancia de luz. Para estas determinaciones se utilizó un espectrofotómetro (Hach DR/2500), en el cual la luz atraviesa un tubo conteniendo el cultivo bacteriano. El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo (I_0) y la transmitida (I) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia (A) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre I_0 y I de la luz transmitida por la suspensión, $A = \log I_0/I$. A medida que la concentración celular aumenta, el cultivo se hace más turbio y se reduce la cantidad de luz transmitida que alcanza la célula fotoeléctrica (dicha intensidad se detecta como corriente en un galvanómetro). Esta reducción de la intensidad de luz transmitida es consecuencia de la difracción de la luz por parte de las células. Sin embargo, la absorbancia no es una medida directa del número de células, por lo cual es necesario realizar una curva de calibración para obtener la correspondencia entre las medidas de la biomasa en el cultivo y las de Absorbancia (medidas a 600 nm de longitud de onda).

3.7 ESTUDIO TOXICOLÓGICO

Para el estudio del efecto que tienen las distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica obtenida preparando una muestra analítica (1:1), se analiza el crecimiento en la fase exponencial de las distintas cepas, se sustituyó el

agua tridestilada del medio de cultivo (sólido y líquido) por los siguientes porcentajes de muestra analítica: 100% (50%), 50% (25%), 30% (15%) y 10% (5%). La revisión de los cultivos (toma de fotografías) se hizo a las 6, 12, 24 y 48 horas para los medios sólidos y cada 3 horas para los líquidos. En la tabla 3.3 se resume la organización de los experimentos.

Tabla 3.3 Organización de los experimentos para el estudio toxicológico.

Cepa	Porcentaje en el medio de la parte soluble de la ceniza volcánica				Medición (horas)
	5%	15%	25%	50%	
<i>Escherichia coli</i>	√	√	√	√	6, 12, 24 y 48
<i>Bacillus subtilis</i>	√	√	√	√	6, 12, 24 y 48
<i>Serratia marcescens</i>	√	√	√	√	6, 12, 24 y 48
<i>Micrococcus luteus</i>	√	√	√	√	6, 12, 24 y 48

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 PREPARACIÓN DE LA CENIZA VOLCÁNICA

La parte soluble de la ceniza volcánica se preparó en porción de 1:1, es decir, se pesaron 200 gramos de ceniza y se depositaron en 200 ml de agua tridestilada, la mezcla fue sometida a 30 minutos de agitación constante de forma manual para después dejarla reposar 24 horas. La parte soluble de la ceniza volcánica fue esterilizada y usada para preparar los distintos medios de cultivo (placa y tubo).

4.2 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las especies microbianas utilizadas durante este estudio fueron: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* y *Micrococcus luteus*, donadas por el laboratorio de Ingeniería Ambiental de la facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Puebla. El primer paso fue aislarlas del medio donde se encontraban en refrigeración y adaptarlas al ambiente para que con el fin de lograr un adecuado desarrollo.

El proceso de siembra consistió en tomar del tubo vial una azada (de cada una de las cepas) en condiciones de esterilidad y pasarlas en placas Petri con Agar Nutritivo preparado y esterilizado conforme a lo descrito en la metodología. El crecimiento de las distintas cepas se hizo realizó a 35°C durante 48 horas, la siembra fue mediante estriado con el fin de obtener colonias de bacterias aisladas, en la figura 4.1 se muestran fotografías de las placas, las cuales fueron utilizadas para obtener las adecuadas curvas de calibración y realizar los distintos estudios de toxicidad.

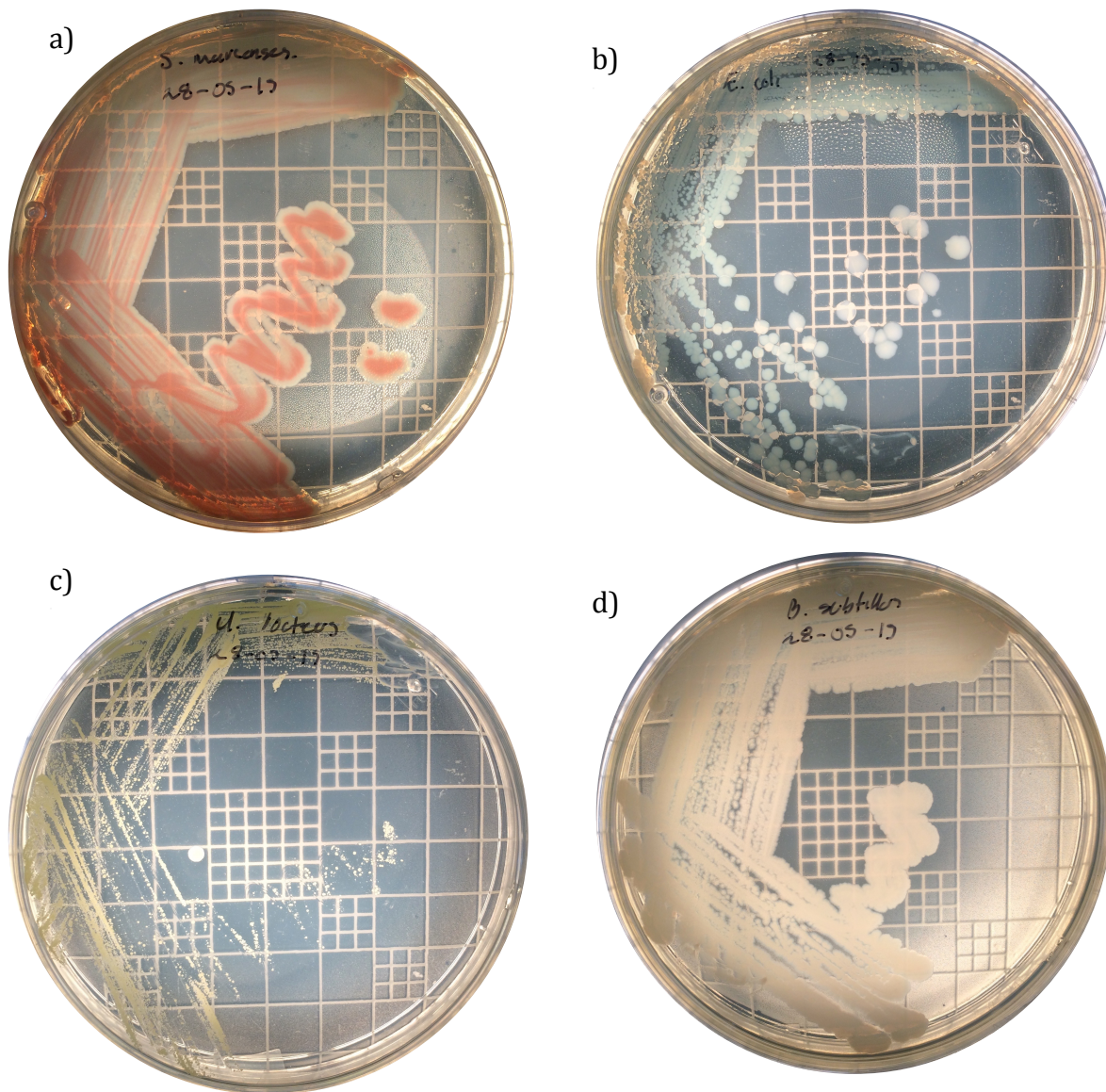


Figura 4.1 Siembra de cepas bacterianas usadas para los distintos estudios: a) *Serratia marcescens*, b) *Escherichia coli*, c) *Micrococcus luteus* y c) *Bacillus subtilis*.

4.3 CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

En la figura 4.2 se muestran las distintas curvas de calibración para el crecimiento de las diferentes cepas bacterianas. Las cepas crecieron a partir de una azada de

la cepas que fueron aisladas y resembradas en 300 ml Caldo Nutritivo en una incubadora a 35°C, el propósito de realizar una curva de calibración es de; primero, demostrar que el crecimiento de las cepas es el adecuado y segundo, tratar de determinar en qué punto (hora) las cepas presentan la cantidad de biomasa similares para poder realizar los experimentos de toxicidad.

Para la realización de la curva de crecimiento de los distintos microorganismos se emplearon tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo estéril en los cuales se inocularon en condiciones de esterilidad 10 µl del cultivo madre. Todos los tubos fueron incubados a 35°C. Este ensayo se hizo por triplicado y en una sola serie de tubos para cada una de las cepas con el fin de todos crecieran bajo las mismas condiciones. La cantidad de biomasa se determinó por turbiedad en un espectrofotómetro Hach DR/2500 a 600 nm cada 3 horas durante todo el día posible y durante los tres días seguidos.

Todas las cepas presentaron el típico crecimiento bacteriano, teniendo una fase de adaptación durante las primeras 6 horas, la fase exponencial se dio entre las 6 y las 32 horas, posteriormente se dio la fase estacionaria entre las 32 y 72 horas, para finalmente comenzar con su fase de muerte bacteriana posterior a las 72 horas, a partir de este punto ya no se hicieron medidas debido a que ya no eran necesarias para el estudio. Gracias a la curva de calibración se pudo observar que aproximadamente a las 24 horas, las cepas bacterianas presentan densidades ópticas muy similares, es decir, una biomasa similar, con lo que se tomó esta hora de crecimiento exponencial como referente para realizar los estudios de toxicidad.

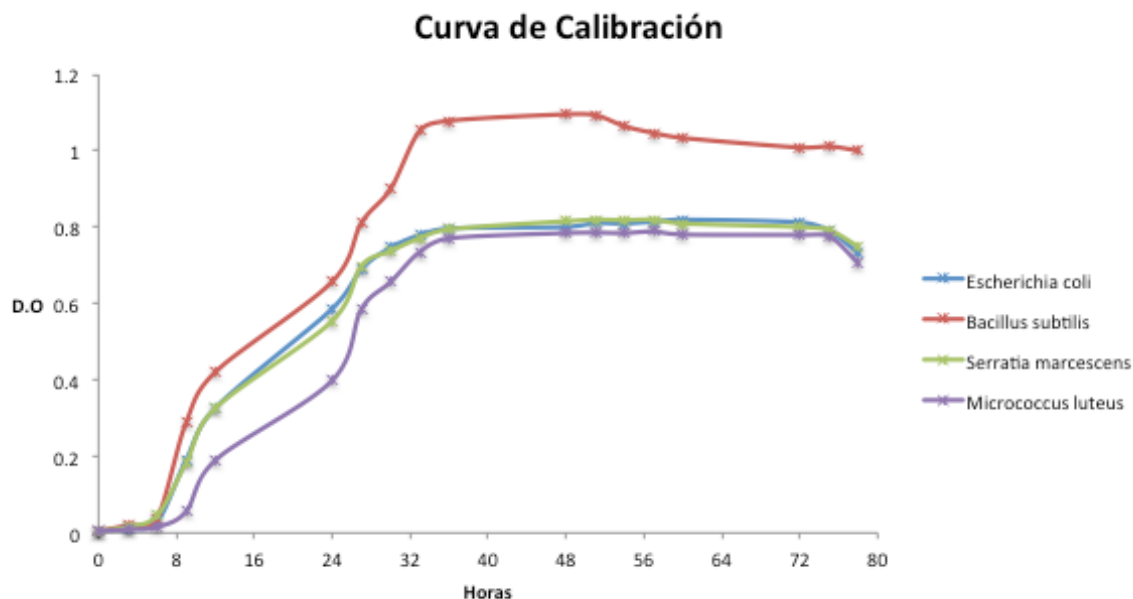


Figura 4.2 Curva de calibración de crecimiento de las distintas cepas utilizadas durante el estudio.

4.4 ESTUDIO DE TOXICIDAD EN MEDIO SÓLIDO

Para el estudio de toxicidad se tomaron 10 μ l a las 24 horas (presentaban prácticamente la misma D.O.) de su fase de crecimiento exponencial de cada una de las cepas. Esta cantidad (10 μ l de cada cepa) se depositaron en las cajas de Petri estériles, posteriormente se depositaron en ellas el medio de cultivo (agar nutritivo) con los respectivos porcentajes de la parte soluble de la ceniza volcánica para cada una de las cepas

a) *Escherichia coli*.

La cepa de *Escherichia coli* presentó un crecimiento elevado después de las 48 horas de incubación, durante el crecimiento se pudo observar cambios en la morfología de las colonias, en especial una especie de nubosidad formada, debido posiblemente a los compuestos presentes en la ceniza. La parte importante de este estudio era conocer si las distintas concentraciones de Plomo (PB) y Cadmio

(Cd) presentes en la ceniza podrían interferir con el desarrollo de los microorganismos durante su fase exponencial de crecimiento. Como se pudo observar durante el monitoreo de la cepa se puede determinar que la parte soluble de la ceniza volcánica, fuera de ocasionar un daño durante su desarrollo, al parecer la ceniza está actuando como factor nutritivo, debido a que, a comparación de la muestra que creció en ausencia de ceniza, la que si lo hizo presentó un mayor número de colonias durante las 48 horas de monitoreo (figura 4.3). En concentraciones de ceniza (parte soluble) del 5 y 15% el crecimiento fue prácticamente el mismo, mientras que para el de 25 y 50% fue ligeramente mayor, presentando un poco más en esta última.

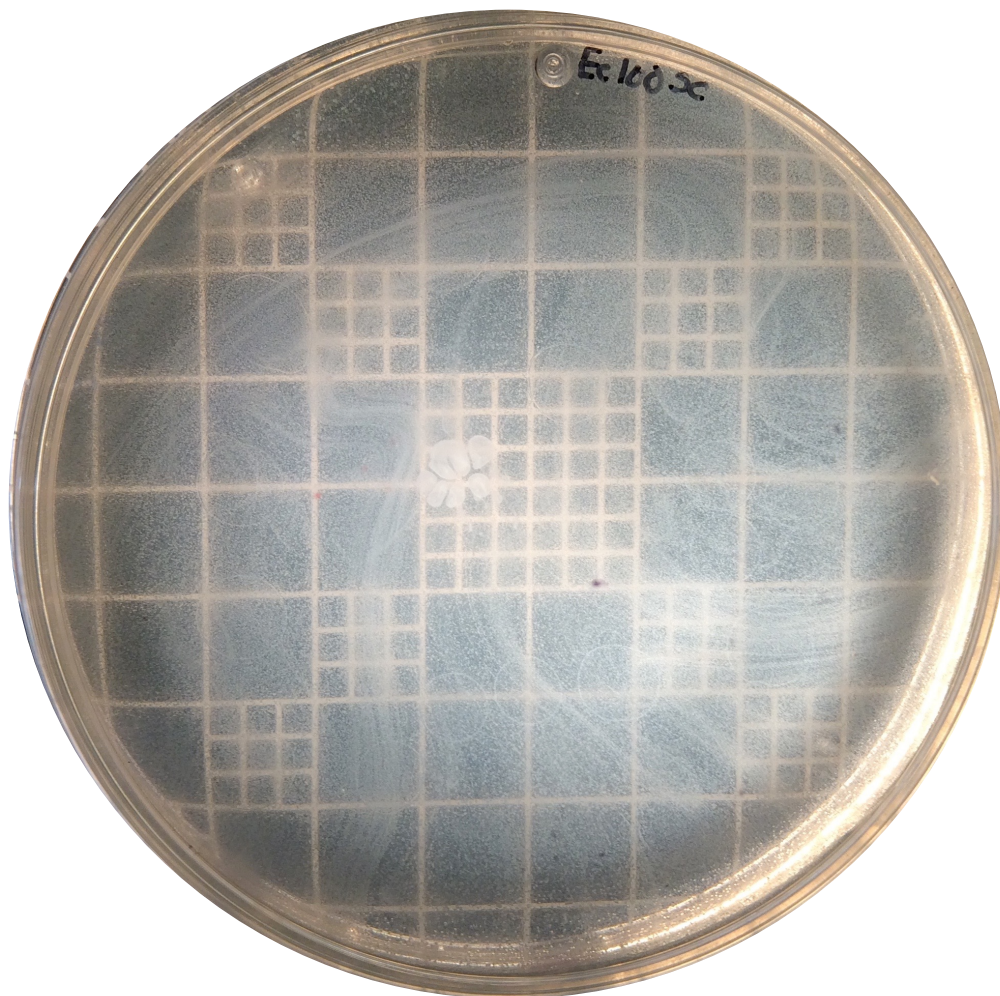


Figura 4.3 Fotografía de la cepa *Escherichia coli* a 48 horas de incubación en agar nutritivo con el 50% de la solución de ceniza.

b) *Bacillus subtilis*

La cepa de *Bacillus subtilis* (figura 4.4) presentó un sobrecrecimiento en presencia de cualquier concentración de la parte soluble de la ceniza volcánica (5, 15, 25 y 50%) en comparación a la cepa control. *B. subtilis* al ser una bacteria formadora de esporas y ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en el suelo, parece estar mejor adaptada cuando se le somete a ciertas sustancias tóxicas, en este caso a las concentraciones de metales como plomo y cadmio presentes en la ceniza volcánica. Al parecer y al igual que *E. coli* esta bacteria es capaz de soportar las concentraciones de estos metales mediante alguno de los mecanismos descritos anteriormente y utilizar los demás componentes orgánicos presentes en la ceniza como factor nutricional de crecimiento (figura 4.5).

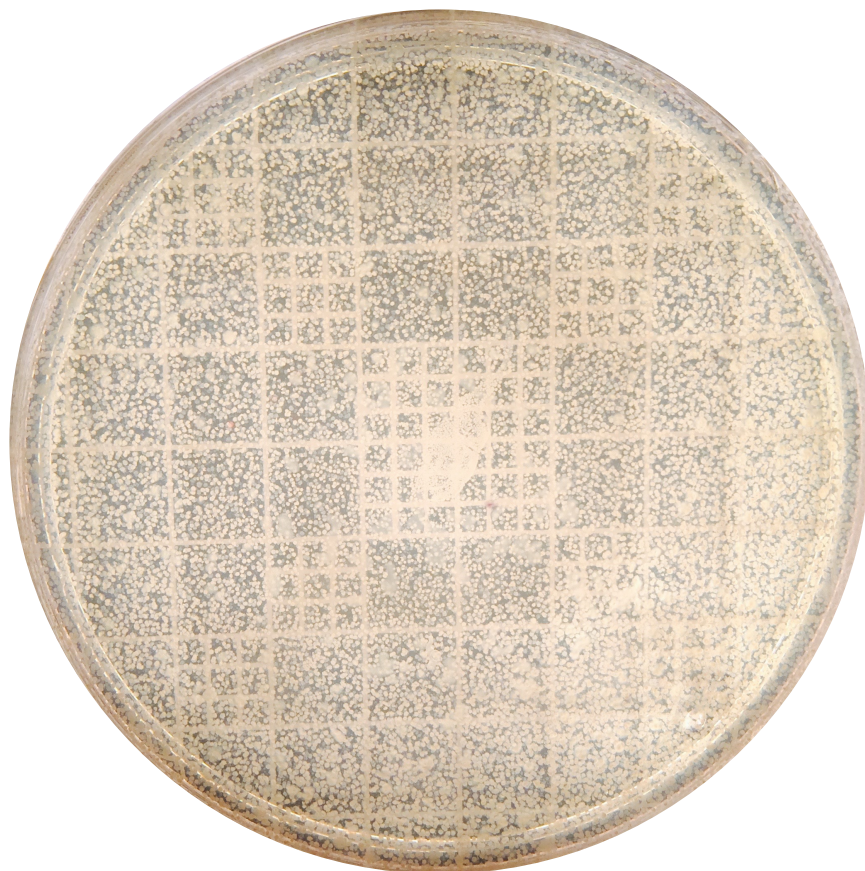


Figura 4.4 Fotografía de la cepa *Bacillus subtilis* después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo sin ceniza volcánica.



Figura 4.5 Fotografía de la cepa *Bacillus subtilis* después 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo con el 50% de la solución de ceniza volcánica.

Para comprobar que realmente la parte soluble de la ceniza volcánica (en este caso al 50%) estaba contribuyendo favorablemente al crecimiento de las cepas bacterianas, como se muestra en la cepa de *Bacillus subtilis*, esta se sembró en agar ausente de cualquier tipo medio nutritivo y utilizando solo la ceniza volcánica (parte soluble) como fuente de alimento. El resultado fue que después de 48 horas de incubación a 35°C se formaron colonias de bacterias como se muestra en la figura 4.6

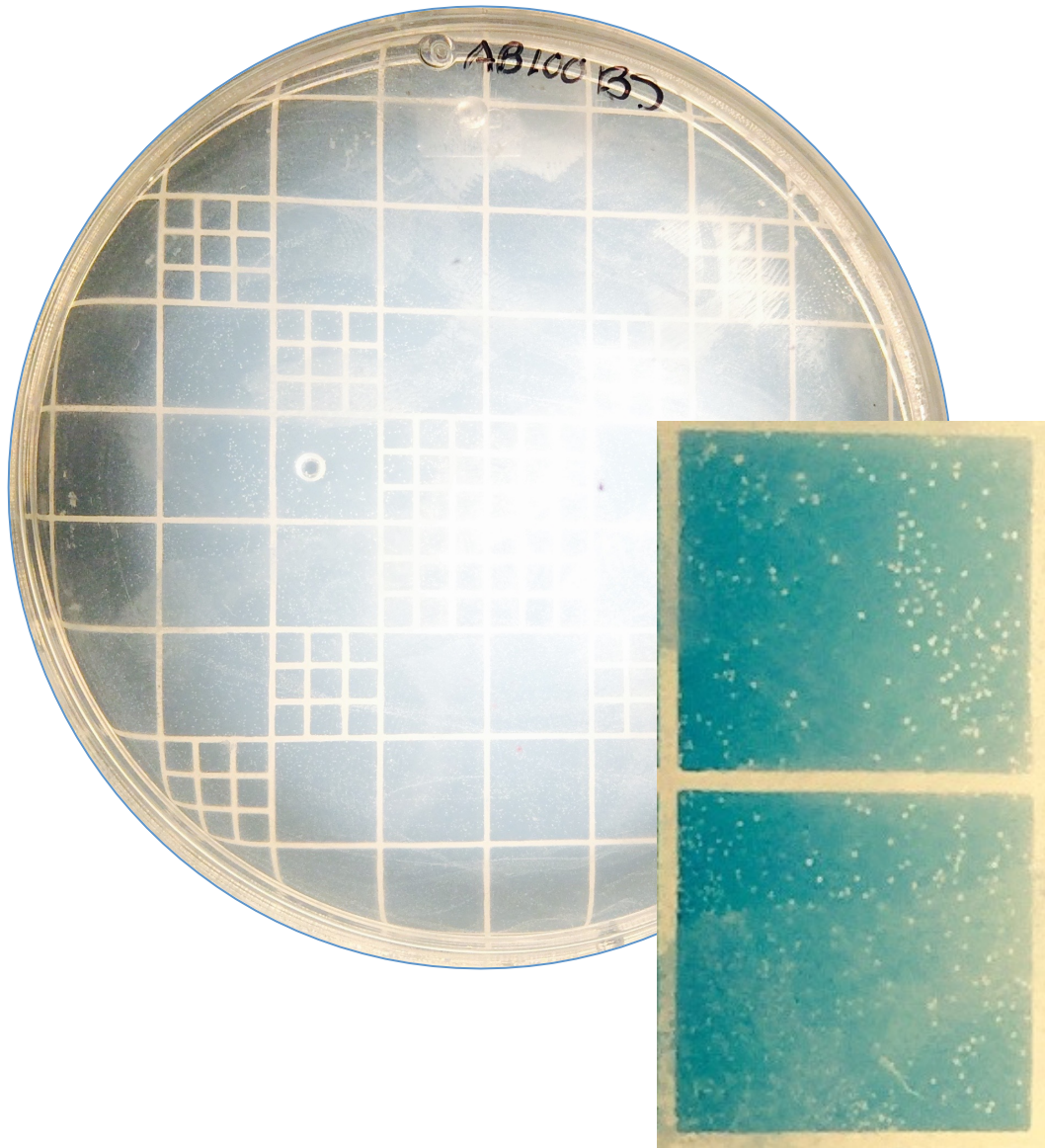


Figura 4.6 Fotografía de la cepa *Bacillus subtilis* después de 48 horas de incubación a 35°C en agar bacteriológico con el 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica utilizada como fuente nutritiva.

b) *Serratia marcescens*

La cepa de *Serratia marcescens* presentó un comportamiento similar al de la bacteria *E. coli* en cuanto al uso de la parte soluble de la ceniza volcánica en

diferentes concentraciones en distintas como suplemento nutricional, el crecimiento con el 5 y 15% fue muy similar al igual que el que se dio con el 25 y 50% (figura 4.7). En cuanto a la morfología de la colonias de bacterias, esta no presentaron esa nubosidad que se dio en las cepas de *E. coli* y su color rojo (típico de este microorganismo) se mantuvo en la mayoría de las colonias.

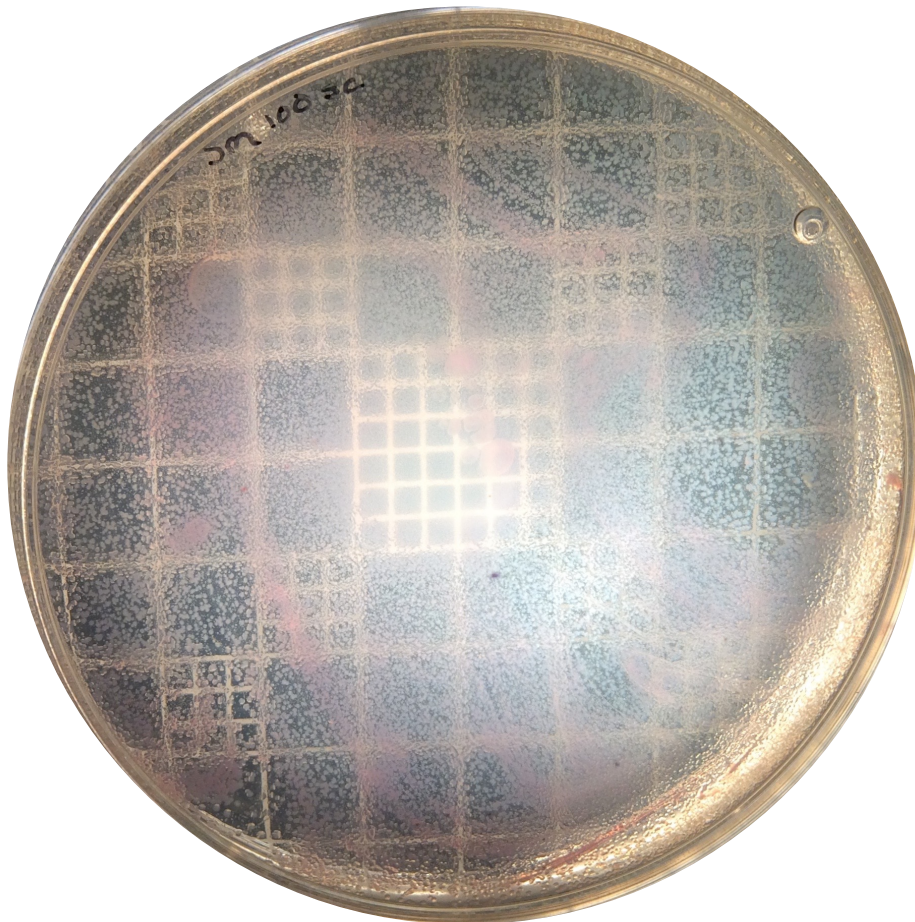


Figura 4.7 Fotografía de la cepa *Serratia marcescens* después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo al 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica.

d) *Micrococcus luteus*

Este microorganismo (figura 4.8) fue al único que pareció afectarle de manera negativa en concentraciones del 50% la presencia de plomo y cadmio presentes en la parte soluble de la ceniza volcánica debido a que después de 48 horas el crecimiento era casi nulo, mientras que en concentraciones menores de la parte soluble de la ceniza volcánica (5 y 15%) ayudó de una manera significativa a su crecimiento (figura 4.9).

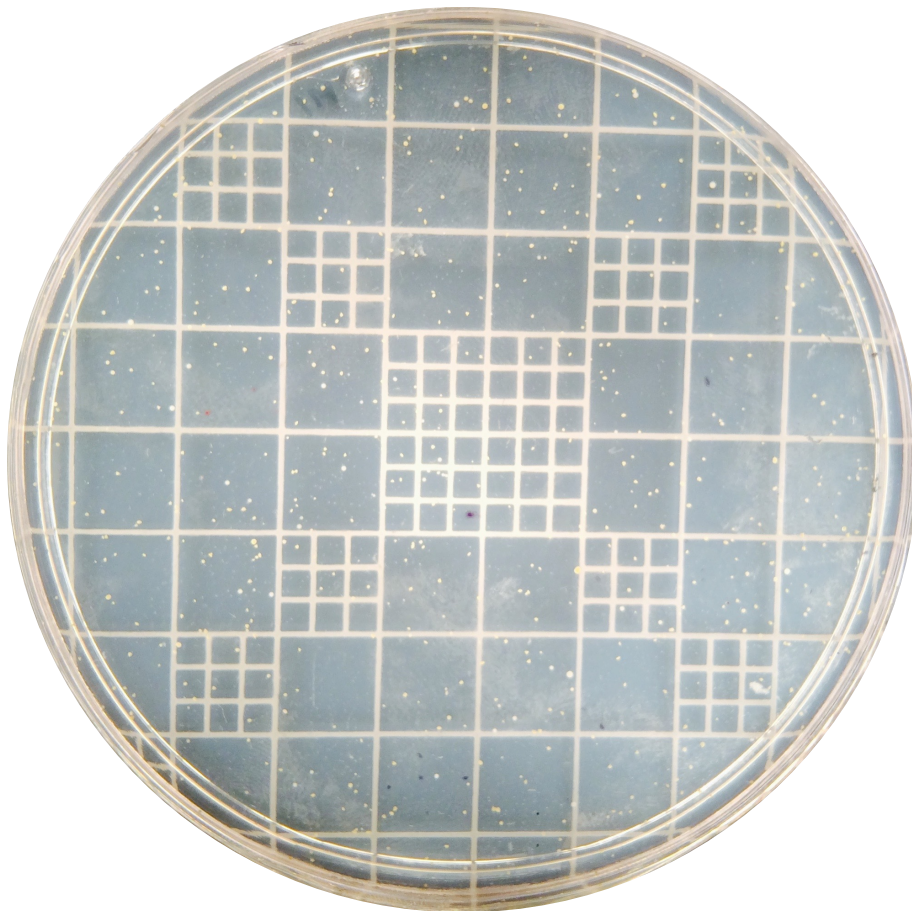


Figura 4.8 Fotografía de la cepa *Micrococcus luteus* después de 48 horas de incubación a 35°C en agar nutritivo.

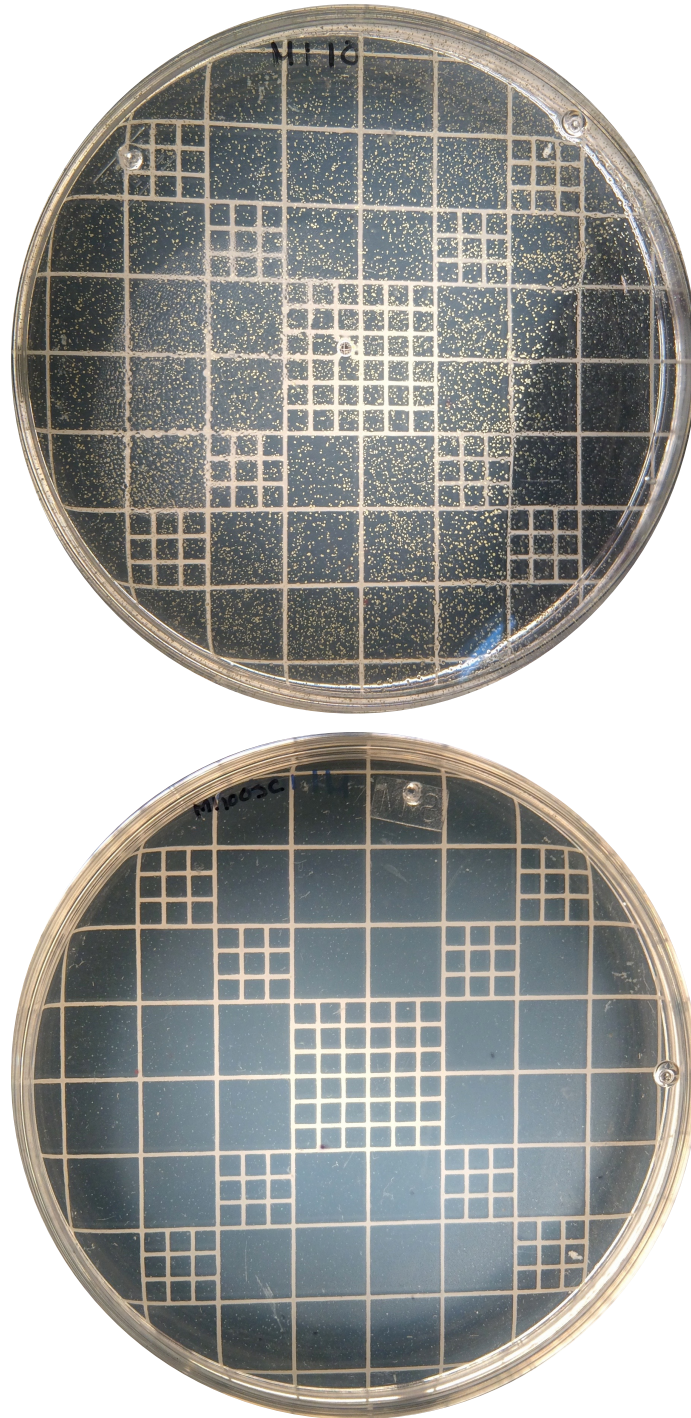


Figura 4.9 Ceba de *Micrococcus luteus* después de 48 horas de incubación a 35 en agar nutritivo con el 5% (arriba) y al 50% (abajo) de la parte soluble de la ceniza volcánica.

Este comportamiento posiblemente se debe a que la cepa de *Micrococcus luteus* no está continuamente expuesta a este tipo de contaminación y debido a que

cuando tiene contacto con concentraciones mínimas, ésta toma del medio los nutrientes suficientes para ayudarla durante su desarrollo, sin embargo cuando la concentración aumenta en el medio de desarrollo, su crecimiento se ve disminuido y retardado, quizás a la sobresaturación del medio o las concentraciones presentes de plomo y cadmio.

El comportamiento de las distintas cepas bacterianas se resume en las siguientes tablas en donde se representa de manera sencilla, la cantidad de bacterias que crecieron durante las distintas horas de estudio (6, 12, 24 y 48) y las correspondientes concentraciones de la parte soluble de ceniza volcánica a las que fueron expuestas las bacterias. En la tabla 4.1 se puede apreciar que la bacteria *Bacillus subtilis* presenta un ligero crecimiento con respecto a las demás cepas. Este mayor crecimiento se mantiene hasta las 48 horas como se muestra en las tablas siguientes. Para el caso de *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*, el crecimiento durante las 48 horas es ligeramente mayor a la cepa de referencia, así se puede ver en las tablas 4.3 y 4.4. La bacteria *Micrococcus luteus* fue la única que se vio afectada por los componentes solubles de la ceniza volcánica (concentraciones del 25 y 50%), en concentraciones menores (5 y 10%), ayudó ligeramente en su crecimiento.

Tabla 4.1 Crecimiento bacteriano a las 6 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.

Cepa	6 Horas				
	N	5%	10%	25%	50%
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	++	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	++	++
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	++	++
<i>Micrococcus luteus</i>	+	-	-	-	-

Tabla 4.2 Crecimiento bacteriano a las 12 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.

Cepa	12 Horas				
	N	5%	10%	25%	50%
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	+++	++++	++++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	++	+++	+++
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	++	+++	+++
<i>Micrococcus luteus</i>	++	-	-	-	-

Tabla 4.3 Crecimiento bacteriano a las 24 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.

Cepa	24 Horas				
	N	5%	10%	25%	50%
<i>Bacillus subtilis</i>	++	++	+++	++++	+++++
<i>Escherichia coli</i>	++	++	++	+++	++++
<i>Serratia marcescens</i>	++	++	++	+++	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	++	++	++	++	-

Tabla 4.4 Crecimiento bacteriano a las 48 horas en condiciones normales y con sus distintas concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica.

Cepa	48 Horas				
	N	5%	10%	25%	50%
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	++++	+++++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+++	++++	++++
<i>Serratia marcescens</i>	+++	+++	+++	++++	++++
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	+++	+++	+++	+

4.5 ESTUDIO DE TOXICIDAD EN MEDIO LÍQUIDO

Para este estudio se utilizó tubos de ensayo con 10 ml de Caldo Nutritivo, preparados con sus respectivas partes de solución soluble de la ceniza volcánica. Se inocularon 10 μ l de cultivo de cada cepa y se incubaron a 35°C en sus respectivos medios de cultivo. La biomasa se determinó cada tres horas durante todo el día, por tres días seguidos, en un espectrofotómetro Hach DR/2500 a 600 nm.

Para el caso de la cepa de *Escherichia coli* como se muestra en la figura 4.9, su crecimiento en medio líquido a diferentes concentraciones de la parte soluble de la ceniza volcánica, mostró un incremento gradual en el crecimiento celular al ir aumentando la cantidad de ceniza, como se puede observar en dicha gráfica, este aumento, aunque poco, nos indica que los componentes de la parte soluble de la ceniza volcánica están actuando como una fuente extra de nutrientes para la cepa, y que la concentración de metales pesados presentes en ella, como plomo y cadmio, no están teniendo un efecto negativo en el desarrollo de la bacteria. Se puede observar en las gráficas, que *Escherichia coli* a las 48 horas en caldo nutritivo, presento una Densidad Óptica (DO) de 0.801, la cual aumento a 0.850 (5% PSCV¹), a 0.852 (15% PSCV), a 0.979 (PSCV) y a 0.982 (PSCV).

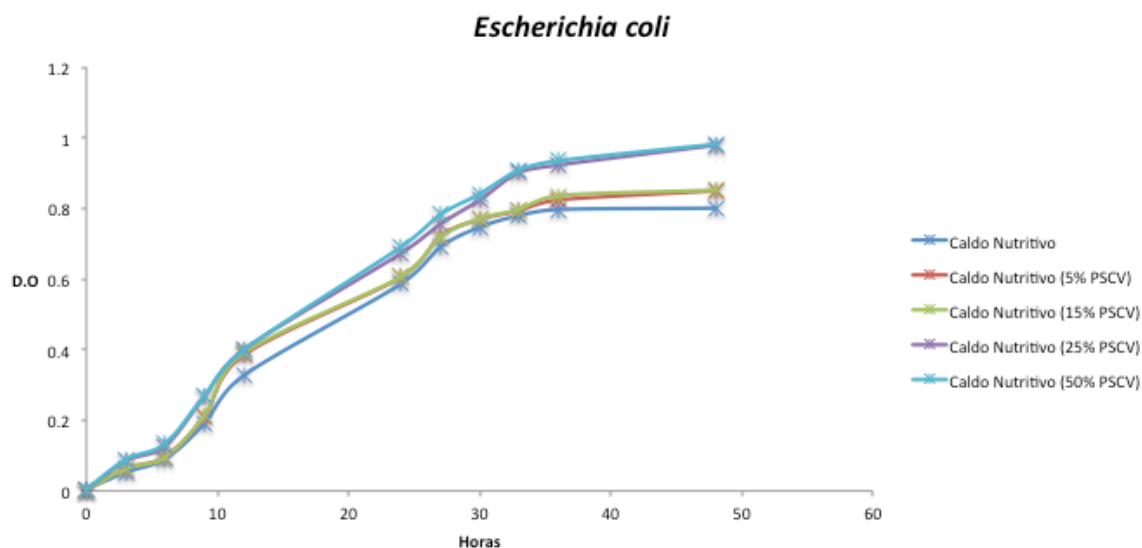


Figura 4.10 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*, cuando se pone en contacto con los componentes solubles de la ceniza volcánica.

¹ Parte Soluble de la Ceniza Volcánica.

Este comportamiento de crecimiento celular fue muy similar para la bacteria *Serratia marcescens* (figura 4.10), en la cual también se vió incrementado el desarrollo de la cepa, debido probablemente a la presencia de los compuestos solubles de la ceniza volcánica y como en el caso de *Escherichia coli*, al parecer los metales tóxicos presentes en la ceniza volcánica no interfieren de manera significativa durante su fase de división celular. *Serratia marcescens* presentó una DO en caldo nutritivo de 0.816 a las 48 horas de incubación, la cual fue en aumento, pasando por 0.819 (5% PSCV), 0.828 (15% PSCV), 0.916 (25% PSCV) y 0.954 (50% PSCV), todas estas mediciones fueron también a las 48 horas. Como se mencionó con anterioridad, *S. marcescens* presenta un típico color rojo al formar colonias, esta característica morfológica se vio alterada en algunas colonias como se aprecia en las fotografías de la figura 4.6 del crecimiento en placa de la cepa.

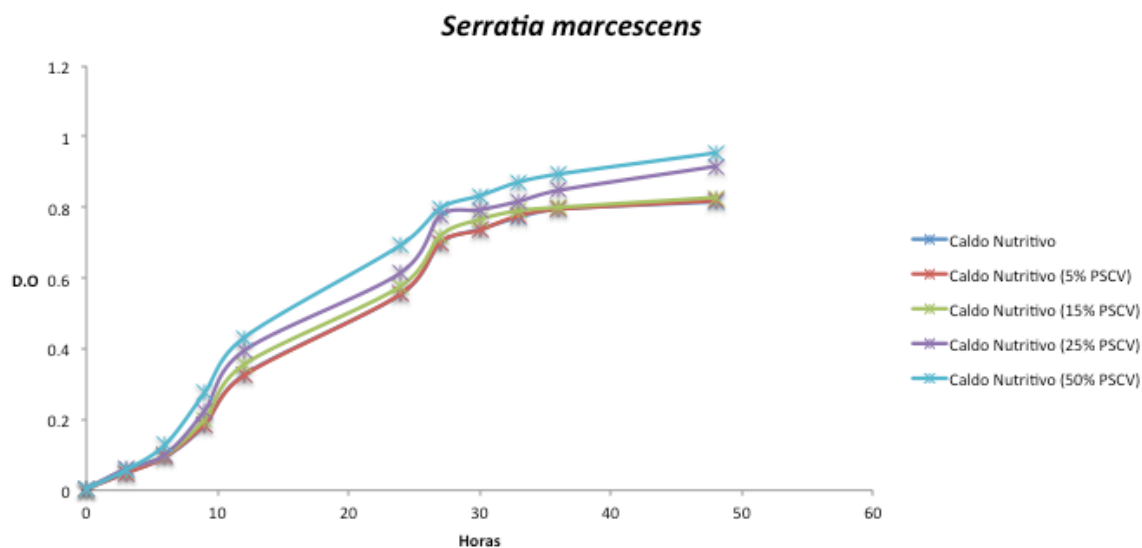


Figura 4.11 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria *Serratia marcescens*, cuando se pone en contacto con los componentes solubles de la ceniza volcánica.

El crecimiento de *Bacillus subtilis* (figura 4.11) bajo la presencia de la parte soluble de la ceniza volcánica mostró un acelerado aumento en su crecimiento, desde las primeras horas en que estuvo en contacto con la parte soluble de la ceniza volcánica, la cepa aprovechó los nutrientes presentes en la solución, lo cual favoreció dicho crecimiento acelerado de la bacteria. Este comportamiento se pudo observar tanto en el crecimiento en agar nutritivo como en el caldo nutritivo, ambos en presencia de los componentes solubles de la ceniza volcánica. Como se puede observar en la gráfica continua, la cepa presentó una densidad óptica de 1.096 a 48 horas de incubación a 35°C, ésta fue aumentando de manera considerable a 1.233 (5% PSCV), 1.250 (15% PSCV), 1.352 (25% PSCV) y así, hasta llegar a 1.435 a las 48 horas con una concentración del 50% de la parte soluble de la ceniza volcánica. Como se mencionó con las cepas anteriores, esto nos indica que las bacterias se están beneficiando más de los componentes solubles en la ceniza volcánica para su adecuado desarrollo, que de los metales tóxicos presentes (plomo y cadmio) los cuales podrían interferir con el crecimiento de la cepa.

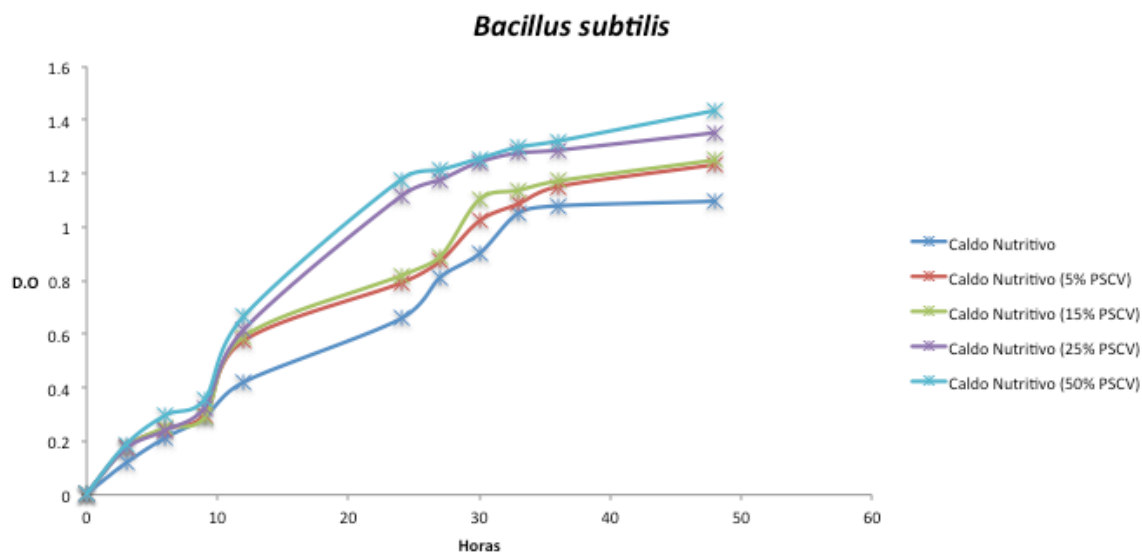


Figura 4.12 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis*, cuando se pone en contacto con los componentes solubles de la ceniza volcánica.

Micrococcus luteus fue la única cepa bacteriana que se vio afectada en su crecimiento celular, debido posiblemente a la presencia de los metales tóxicos presentes en los componentes solubles (plomo y cadmio) de la ceniza volcánica (figura 4.11). El desarrollo normal de la cepa muestra una densidad óptica de 0.785 después de 48 horas de incubación a 35°C en caldo nutritivo. Conforme la concentración iba en aumento del 5, 15, 25 hasta el 50%, la densidad óptica disminuía de 0.717, 0.701, 0.228 y 0.133% respectivamente a 48 horas. Como se puede observar en la gráfica, cuando la cepa fue sometida a concentraciones del 25 y 50%, su crecimiento fue casi constante después de 24 horas y solo presentaron un ligero aumento a las 48 horas. A diferencia del crecimiento en placa, donde, en concentraciones del 5 y 15% favoreció a un crecimiento ligero en la formación de colonias, en los experimento en caldo nutritivo, este comportamiento no fue observado, al contrario, el desarrollo en medio líquido se vio afectado desde la concentración del 5% de los componentes solubles de la ceniza volcánica.

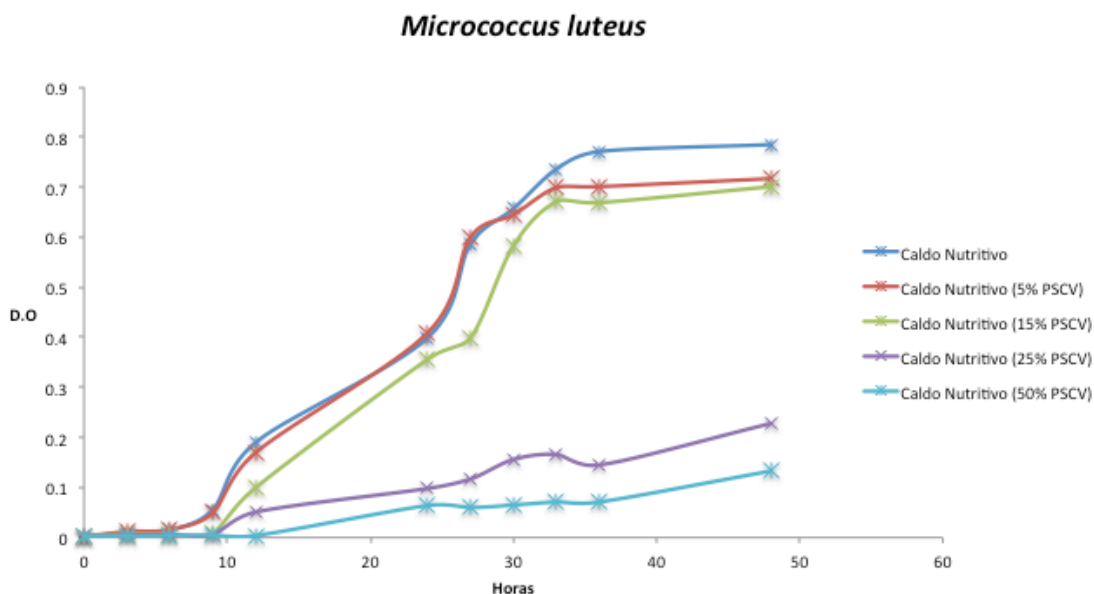


Figura 4.13 Gráfico donde se muestra el crecimiento de la bacteria *Micrococcus luteus*, cuando se pone en contacto con los componentes solubles de la ceniza volcánica.

De manera general se puede decir que bacterias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens* aprovecharon los componentes solubles de la ceniza volcánica, por otro lado, la cepa de *Micrococcus luteus* se vio afectada en su crecimiento celular por dichos componentes solubles, posiblemente debido a la presencia de metales tóxicos como plomo y cadmio. Las tablas con el seguimiento de densidades ópticas de las bacterias usadas en este experimento se muestran completas en los anexos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Considerando que los distintos organismos fueron sometidos a las mismas condiciones de crecimiento y bajo la misma masa microbiana, pero a diferentes concentraciones (5, 15, 25 y 50 por ciento) de la parte soluble de la ceniza; de los resultados se pudieron obtener las siguientes conclusiones.

En el caso de la cepa de *Bacillus subtilis* (Bs), ésta presentó un crecimiento potencializado con los diferentes porcentajes de concentración de los componentes solubles de la ceniza volcánica, recordando que *B. subtilis* es una bacteria no patógena para el ser humano, presente en suelo y agua y que tiene la capacidad de formar esporas, haciéndola así, resistente a condiciones ambientales no favorables. Esta habilidad podría ser una de las responsables de resistir a los “ataques” de componentes tóxicos, como podrían ser los metales pesados ya sea plomo y cadmio. Su maquinaria metabólica para combatir estos compuestos tóxicos, como se describe en el capítulo 2, sería posiblemente la mejor explicación por la cual, los metales ya mencionados, no interfirieron durante su desarrollo celular, aprovechando así, los demás componentes de la parte soluble de la ceniza volcánica, un nutriente extra para aumentar su tasa de crecimiento. Como se muestra en los resultados, la cepa no parece ser afectada por la presencia de los metales en la ceniza, no en agar ni en caldo nutritivo. Esto se pudo comprobar cuando la cepa fue sometida a crecimiento en agar bacteriológico (el cual carece de nutrientes apropiados para su crecimiento) y en el cual se pudo observar el desarrollo de colonias de Bs.

En la cepa de *Micrococcus luteus* se pudo observar, que mientras más era la concentración de la parte soluble de la ceniza volcánica, experimento en caldo nutritivo, ésta afectaba el crecimiento de la bacteria (debido posiblemente a la

presencia de plomo y cadmio), al punto de que en una concentración del 50% de la parte de los componentes solubles de la ceniza volcánica, ésta ya presentaba un crecimiento lento y casi constante. Cuando la cepa de *Micrococcus luteus*, creció en agar nutritivo, presentó un ligero aumento en su tasa de crecimiento a concentraciones menores (5 y 15%), sin embargo, a concentraciones del 25 y 50% la formación de colonias fue mínima.

Para el caso de las cepas *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*, la presencia de los metales tóxicos como plomo y cadmio no pareció afectar su crecimiento celular, pero los demás componentes solubles de la ceniza volcánica tampoco incrementaron el desarrollo de su masa celular. El crecimiento para ambas cepas fue mínimo al ponerlas en contacto con las diferentes concentraciones de ceniza en comparación con las cepas que creció en condiciones normales.

Se puede concluir que la presencia de la parte soluble de la ceniza volcánica favorece al crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y mayormente para *Bacillus subtilis* y que para la cepa de *Micrococcus luteus*, perjudica su crecimiento y esto probablemente debido a la presencia de metales pesados como plomo y cadmio.

Ambientalmente esto podría ser un gran problema, en primera debido a que esto podría ocasionar que las bacterias mencionadas con anterioridad, y que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, obtuvieran una mayor cantidad de nutrientes para su crecimiento, y aunque se ha demostrado que la ceniza volcánica exhalada durante las erupciones volcánicas carece de algún tipo de microorganismo, esta es depositada, ya sea en el suelo o en cuerpos de agua, ocasionando que los microorganismos encuentren una apropiada cantidad de nutrientes, tengan un mayor crecimiento celular, y que además, debido a que dichas concentraciones de metales pesados, no son letales para las bacterias, esto les ayudaría a que su maquinaria haga mas eficiente sus asimilación y eliminación, provocando que su resistencia hacia estos metales sea cada vez mas

efectiva. Dichos metales pueden ser expulsados al ambiente, pero en la mayoría de los casos permanecen encapsulados dentro de la bacteria y esto podría ser un problema en cuanto la bioacumulación en los diferentes niveles tróficos de la cadena alimenticia.

Una posible explicación de que los componentes solubles de la ceniza volcánica, haciendo referencia al plomo y cadmio, no afectara el crecimiento de las cepas bacterianas (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*) es de que, probablemente, como son microorganismos ampliamente distribuidos en el ambiente, y que constantemente están sometidos a condiciones ambientales no aptas para un adecuado desarrollo, las maquinarias de defensa contra estos elementos tóxicos, se hacen cada vez más eficientes, haciendo así, a dichas bacterias y posiblemente a otras, resistentes a los compuestos tóxicos mencionados.

En cambio, la cepa de *Micrococcus luteus* al no estar en un contacto constante al medio ambiente, esta se vio afectada de una manera significativa, por los componentes solubles de la ceniza volcánica (plomo y cadmio), conforme se aumentaba la concentración de esta. Aunque dicha información genética para la codificación de estas maquinarias metabólicas que combaten los compuestos tóxicos está presente, esta no se encuentra activa para su defensa, y posiblemente si se sometieran a un mayor tiempo de exposición de estas concentraciones de ceniza, la cepa terminaría adaptando después de un tiempo y posiblemente generaría resistencia a los metales mencionados.

Otro problema que se tiene que enfrentar como sociedad, y sobre todo en la parte de salud pública, es de que, estas bacterias al generar resistencia hacia los metales, pueden convertirse en patógenos potenciales para el hombre, al estar en un contacto constante con las concentraciones de metales como plomo y cadmio, ya descritas con anterioridad, y debido a que estamos en una zona de constante actividad volcánica, sus respectivos procesos de combate contra metales tóxicos,

hacen más resistente a las cepas bacterianas, y posiblemente, hacerlas de mayor resistencia contra los antibióticos, ocasionando así, mayor grado de enfermedad para la población. Y como ya se mencionó, tener una mayor cantidad de bacterias en el ambiente (agua y suelo), puede llegar a ocasionar algún tipo de desequilibrio en las cadenas tróficas, así como procesos de bioacumulación entre las mismas.

Debido a todo esto es necesario no descuidar y seguir haciendo estudios, correspondientes a los efectos que están teniendo los componente de la ceniza volcánica, en distintos organismos de los diferentes niveles tróficos, así como sus efectos a corto y largo plazo, lo que podría llegar a ocasionar esta sobrepoblación de bacterias en los distintos cuerpos de agua/suelo, y ocasionar así, algún tipo de desequilibrio ecológico en el ambiente.

ANEXO

Densidades Ópticas de las distintas cepas bacterianas usadas durante los experimentos.

Escherichia coli

Tiempo (horas)	DO sin PSCV	DO (Distintas concentraciones de PSCV ¹)			
		5%	15%	25%	50%
0.45	0.005	0.005	0.003	0.004	0.005
3	0.053	0.064	0.063	0.085	0.089
6	0.091	0.097	0.096	0.127	0.134
9	0.191	0.211	0.213	0.267	0.27
12	0.327	0.385	0.39	0.4	0.399
24	0.587	0.606	0.607	0.673	0.691
27	0.691	0.722	0.719	0.756	0.783
30	0.747	0.769	0.771	0.824	0.841
33	0.78	0.794	0.797	0.902	0.909
36	0.797	0.824	0.836	0.923	0.935
48	0.801	0.85	0.852	0.979	0.982

Serratia marcescens

Tiempo (horas)	DO sin PSCV	DO (Distintas concentraciones de PSCV ¹)			
		5%	15%	25%	50%
0.45	0.005	0.004	0.004	0.005	0.004
3	0.049	0.048	0.059	0.06	0.057
6	0.094	0.095	0.099	0.101	0.129
9	0.183	0.186	0.2	0.224	0.275
12	0.326	0.324	0.355	0.394	0.431
24	0.555	0.556	0.578	0.616	0.694
27	0.699	0.701	0.72	0.776	0.798
30	0.738	0.736	0.766	0.793	0.833
33	0.772	0.777	0.791	0.817	0.872
36	0.795	0.795	0.8	0.848	0.894
48	0.816	0.819	0.828	0.916	0.954

Bacillus subtilis

Tiempo (horas)	DO sin PSCV	DO (Distintas concentraciones de PSCV ¹)			
		5%	15%	25%	50%
0.45	0.004	0.005	0.003	0.005	0.004
3	0.119	0.179	0.175	0.173	0.188
6	0.213	0.246	0.25	0.241	0.297
9	0.289	0.299	0.289	0.326	0.356
12	0.421	0.576	0.591	0.617	0.667
24	0.658	0.791	0.818	1.115	1.177
27	0.812	0.873	0.89	1.176	1.213
30	0.901	1.023	1.103	1.243	1.256
33	1.053	1.087	1.137	1.277	1.299
36	1.079	1.151	1.172	1.287	1.321
48	1.096	1.233	1.25	1.352	1.435

Micrococcus luteus

Tiempo (horas)	DO sin PSCV	DO (Distintas concentraciones de PSCV ¹)			
		5%	15%	25%	50%
0.45	0.003	0.002	0.004	0.003	0.004
3	0.009	0.012	0.007	0.005	0.003
6	0.015	0.016	0.007	0.006	0.004
9	0.056	0.05	0.009	0.006	0.005
12	0.19	0.17	0.1	0.051	0.004
24	0.399	0.409	0.356	0.098	0.064
27	0.586	0.6	0.399	0.117	0.06
30	0.657	0.645	0.583	0.156	0.065
33	0.736	0.699	0.671	0.166	0.071
36	0.771	0.701	0.669	0.145	0.071
48	0.785	0.717	0.701	0.228	0.133

¹ Parte Soluble de la Ceniza Volcánica

BIBLIOGRAFÍA

- Baxter P.J. **1983**. Health hazards of volcanic eruptions. *Coll Physicians Lond* 17:180–182.
- Baxter P.J., Kapila M. & Mfonfu D. **1989**. Lake Nyos disaster, Cameroon, 1986: the medical effects of large scale emission of carbon dioxide? *BMJ* 298:1437-1441.
- Beveridge T. J., Hughes M. N., Lee H., Leung K. T., Poole R. K., Savvaidis I., Silver S. & Trevors J. T. **1997**. Metal-microbe interactions: Contemporary approaches. *Adv Microbiol Phys* 38:177-243.
- Bernstein R. S., Baxter P. J., Falk H., Ing R., Foster L. & Frost F. **1986**. Immediate public health concerns and actions in volcanic eruptions: lessons from the Mount St. Helens eruptions, May 18 October 18, 1980. *Am J Public Health* 76:25–37.
- Bobrowski N., Hönninger G., Galle B. & Platt U. **2003**. Detection of bromine monoxide in a volcanic plume. *Nature* 423:273-276.
- Boudal C. & Robin C. **1989**. Volcan Popocatepetl. Recent eruptive history and potential hazards and risks in future eruptions. in IAVCEI Proceedings in Volcanology. Ed. J. H. Letter. *Volcanic Hazards* 110-128.
- Brock, T.D. **1978**. Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures, Heidelberg. *Springer*. 107-111.
- Buist A. S. **1982**. Are volcanoes hazardous to your health? What have we learned from Mount St. Helens? *West J Med* 137:294-301.
- Carrasco G., Silva L., Delgado H. & Urrutia J. **1985**. Geología y Paleomagnetismo del Popocatepetl. *Memorias Unión Geofísica Mexicana, A.C. UGM*. 205-225.
- Carlsen H. K., Hauksdottir A., Valdimarsdottir U. A., Gíslason T., Einarsdottir G. & Runolfsson H. **2012**. Health effects following the Eyjafjallajökull volcanic eruption: a cohort study. *BMJ Open* 2:e001851; doi:10.1136/bmjopen-2012-001851.
- Chen X. C., Hu S. P., Shen C. F., Dou C. M., Shi J. & Chen Y. X. **2009**. Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. *Biores Technol* 100:330–337
- Connor C. B., Powell L., Thomas J., Navarro M. & Strauch W. **1993**. Comparison of volatile concentrations in three Cerro Negro, Nicaragua, Eruptions. Abstracts, 50 Años del Volcán Parícutín, Reunión Internacional Conmemorativa. Uruapan, Mich.
- Convit J., Ulrich M., Castillo J., De Lima H., Perez M. & Caballero N. **2006**. Inorganic particles in the skin of inhabitants of volcanic areas of Central America: their possible immunomodulatory influence in leishmaniasis and leprosy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:734–739.
- De la Cruz-Reyna S., Quezada J. L., Peña A. C., Zepeda O. & Sánchez T. **1995**. Historia de la Actividad Reciente del Popocatepetl (1345-1995). In Volcán Popocatepetl Estudios Realizados Durante la Crisis de 1994-1995, ed. Comité Científico Asesor, Chap. VI, pp. 3±22. Sistema Nacional de Protección Civil, Centro Nacional de Prevención de Desastres, UNAM, México, D.F.
- Dockery D. W., Pope C. A., Xu X., Spengler J. D., Ware J. H., & Fay M. E. **1993**. An association between air pollution and mortality in six U.S. Cities. *N Engl J Med* 329:1753–1759.

- Elliott P., Shaddick G., Wakefield J. C., De Hoogh C. & Briggs D. J. **2007**. Long-term associations of outdoor air pollution with mortality in Great Britain. *Thorax* 62:1088–1094.
- Fawell J., Bailey K. & Chilton J. **2006**. Fluoride in Drinkingwater. World Health Organization (WHO).
- Gadd G. M. & Griffiths A. J. **1978**. Microorganism and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*. 4:303-317.
- Gerasimenko L. M., Orleanskii V. K., Karpov G. A. & Uchatinskaya G. T. **2013**. Interaction of Cyanobacteria with volcanic ashes. *Microbiology* 82(1):111-118
- Giggenbach W. F. **1996**. Chemical composition of volcanic gases. In: Scarpa, R., Tilling, R.I. (Eds.), Monitoring and Mitigation of Volcano Hazards. *Springer-Verlag, Berlin* 221–256.
- Goff F., Janik C. J. & Delgado H. **1998**. Geochemical surveillance of magmatic volatiles at Popocatépetl volcano, Mexico. *Geol Soc Am Bull* 110:695-710.
- Gudmundsson G. **2011**. Respiratory health effects of volcanic ash with special reference to Iceland. A review. *Clin Respir J* 5:2–9.
- Gupta A., Morby A. P., Turner J. S., Whitton B. S., & Robinson N. J. **1993**. Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (H1P1). *Mol Microbiol* 7:189-195.
- GVN (Global Volcanism Network). **1994**. Popocatépetl (México) Small eruption on 21 December ends decades long slumber. *Smithsonian Institution* 19(11):2-4.
- Haferburg G & Kothe E. **2007**. Microbes and metals: interactions in the environment. *J of Basic Micro* 47:453–467.
- Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Dirección General de Salud Ambiental. Gobierno Federal. Caracterización de materia particulada aeroportada asociada a la actividad del volcán Popocatépetl (verano de 1997). Informe técnico final. Gerencia de Ciencias Ambientales, Departamento de Estudios del Ambiente. México: **1997**.
- Jiang W., Saxena A., Song B., Ward B. B., Beveridge T. J. & Myneni S. C. **2004**. Elucidation of functional groups on Gram-positive and Gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Lang* 20:11433–11442
- Juárez A., Gay C. & Flores Y. **2005**. Impact of the Popocatepetl's volcanic activity on the air quality of Puebla City, México. *Atmósfera* 18:57-69.
- Karamba K. I., Mohd A. S., Mohd Y. S. & Siti A. Ahmad. **2014**. Effect of Heavy Metals on Cyanide Biodegradation by Resting Cells of *Serratia marcescens* strain AQ07. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*. 2:58-60.
- Karavaiko, G. I. **2004**. Microbial Destruction of Silicate Minerals, in Trudy Instituta Mikrobiologii im. S.N.Vinogradskogo (Proc. Winogradsky Inst. Microbiol.), Gal'chenko. V.F., Ed., Moscow: Nauka 172–196.
- Karpov G. A., Nikolaeva A. G., Lupikina E. G., Bortnikova S. B. & Ushakov S. V. **2007**. Hydrochemical and Geochemical Composition of the Matter in the Lake Karymskoe Basin in the PostCatastrophe Period (1996–2005), Mat. Nauch. Tekh. Konf. "Geofiz. monitoring Kamchatki (Proc. Sci.Tech. Conf. Geophysical Monitoring of Kamchatka) 17–18.

- Kling G. W., Clark M. A. & Wagner G. N. **1987**. The 1986 lake Nyos gas disaster in Cameroon, West Africa. *Science* 236:169-175.
- Kuzyakina T.I. **1985**. Microbial Transformation of Volcanic Ash, in Vulkanizm i svyazannye s nim protsessy (Volcanism and Associated Processes). *Petropavlovsk-Kam-chatskii: Dal'nauka* (3):232–234.
- Lave L. B. & Seskin E. P. **1972**. Air pollution, climate, and home heating: their effects on U.S. mortality rates. *Am J Public Health* 62:909–916.
- Macias J. L. **2005**. Geología e historia eruptiva de algunos de los grandes volcanes activos de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana – Volumen conmemorativo del Centenario, temas selectos de la Geología Mexicana* 57(3):379-424.
- Martin T. R., Wehner A. P. & Butler J. **1986**. Evaluation of physical health effects due to volcanic hazards: the use of experimental systems to estimate the pulmonary toxicity of volcanic ash. *Am J Public Health* 76:59–65.
- Martin-Del-Pozzo A. L., Espinasa P. R., Armienta M. A., Aguayo A., Reyes M., Sanchez G., Cruz O., Cenicerros N., Lugo J., González V., Butrón M. A. & Villarreal M. **1995a**. In Volcán Popocatepetl Estudios Realizados Durante la Crisis de 1994-1995, ed. Comité Científico Asesor, Chap. VI. Sistema Nacional de Protección Civil, Centro Nacional de Prevención de Desastres, UNAM, México, D.F. 285-299.
- Martin-Del-Pozzo A. L., Espinasa R., Armienta M. A., Aguayo A., Reyes M., Sanchez G., Cruz O. & Cenicerros N. **1995b**. Recent eruptions at Popocatepetl and their effect on the heavily populated areas nearby. *Per Mineral* 64:223-224.
- Martin-Del-Pozzo A. L., Cordova C. & López J. **1996**. Volcanic impact on the Southern Basin of Mexico during the holocene. *Q. Int., in press*.
- Martin-Del-Pozzo A. L., Espinasa R., Lugo J., Barba L., López J., Plunkett P., Uruñuela G. & Manzanilla L. **1997a**. Volcanic impact in Central Mexico. *IAVCEI Excursion Guide* 31.
- Michaud J. P., Grove J. S. & Krupitsky D. **2004**. Emergency department visits and “vog” related air quality in Hilo, Hawai'i. *Environ Res* 95:11-19.
- Monick M. **2013**. Effects of Eyjafjallajökull volcanic ash on innate immune system responses and bacterial growth in vitro. *Environ Health Perspect* 121(6):691–698.
- Naimark, E.B., Kompantseva, E.I., & Komova, A.V. **2009**. Interaction between Anoxygenic Phototrophic Bacteria of the Genus Rhodovulum and Volcanic Ash. *Microbiology* 78(6):747–756.
- Nania J. M., Rodríguez G. M., Fruchter J. S., Olsen K. B. & Hooper P. R. **1994**. In the shadow of El Chichon: an overview of the medical impact of the 28 March to 4 April 1982 eruptions of the Mexican volcano. *Prehosp Disaster Med* 9:58-66.
- Naumova E. N., Yepes H., Griffiths J. K., Sempértegui F., Khurana G. & Jagai J. S. **2007**. Emergency room visits for respiratory conditions in children increased after Guagua Pichincha volcanic eruptions in April 2000 in Quito, Ecuador observational study: time series analysis. *Environ Health* 6:21;doi:10.1186/1476-069X-6-21.
- Nilsson J. R. **1981**. Effects of copper on phagocytosis in *Tetrahymena pyriformis*. *Protoplasma*. 109:359-370.
- Ng'walali P. M., Koreeda A., Kibayashi K. & Tsunenari S. **1999**. Fatalities by inhalation of volcanic gas at Mt. Aso crater in Kumamoto, Japan. *Leg Med (Tokyo)* 1:180-184.

Organización Panamericana de la Salud. Guía de preparativos de salud frente a erupciones volcánicas. Módulo 1: El sector salud frente al riesgo volcánico. Organización Mundial de la Salud, **2005**.

Pimenov E. P. **1983**. Functioning of Microbial Complexes in the Zones of Intense Volcanic Ash Falls, Extended Abstract of Cand. Sci. (Biol) Dissertation, AlmaAta: *Inst. Microbiol. Virusol. KazSSR Acad. Sci.*

Rivera-Tapia A., Yañez-Santos A. & Cedillo-Ramírez L. **2003**. Emisión de ceniza volcánica y sus efectos. *Ecosistemas AEET*. 14(3): 107-115.

Robin C. **1984**. Le Volcan Popocatepetl (Mexique) structure, evolution petrologique et risques. *Bull. Volcanol* 47, 1-23.

Robin C. & Boudal C. **1987**. A gigantic Bezymianny type event at the beginning of modern Popocatepetl. *J Volcanol Geotherm Res* 31:115-130.

Samet J. M., Dominici F., Curriero F. C., Coursac I. & Zeger S. L. **2000**. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987–1994. *N Engl J Med* 343:1742–1749.

Siegel B. Z. & Siegel S. M. **1985**. Mercury in human hair: uncertainties in the meaning and significance of 'unexposed' and 'exposed' in simple population. *Water Air Soil Pollut* 26:191-199.

Sierra-Vargas M.P. **2012**. Las cenizas, gases volcánicos y la salud respiratoria. *Neumol Cir Torax* 71(2):132.138.

Timberley M. R. & Pepper I. **2000**. Environmental Microbiology, Chapter 17: Microorganism and Metal Pollutants. Academic press. 403-423.

Tyler G. **1975**. Effect of heavy metal pollution on decomposition and mineralization rates in forest soil. In *Heavy Metals in the Environment*, eds. T. C. Hutchinson, A. L.

Varekamp J. C., Luhr J. F. & Prestegaard K. L. **1984**. The 1982 eruptions of El Chichón volcano (Chiapas, México): Character of the eruptions, ash-fall deposits and gasphase. *J Volcanol Geotherm Res* 23.39-68.

Waldron, K. J. & Robinson, N. J. **2009**. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nature Rev. Microbiol.* 7, 25–35.

Witter J. B., Kress V. C. & Newhall C. G. **2005**. Volcán Popocatépetl, Mexico. Petrology, magma mixing, and immediate sources of volatiles for the 1994-present eruption. *J Petrology* 46:2337-2366.